

**Egy rendezetlen miozin fragmens, a homodimer
S100A4 fehérje, illetve az egymással alkotott
„átkaroló” komplex NMR-spektroszkópiai jellemzése**



Készítette: Pálfy Gyula

Szak: Vegyész MSc III. évfolyam

Témavezető: Dr. Bodor Andrea,

ELTE TTK Analitikai Kémiai Tanszék egyetemi adjunktusa

Szerkezeti Kémia és Biológia Laboratórium
Eötvös Loránd Tudományegyetem
Természettudományi Kar
Budapest, 2012

Tartalomjegyzék

Rövidítésjegyzék	3
1. Bevezetés.....	4
2. Irodalmi előzmények.....	5
3. Célkitűzések	9
4. Kísérleti módszerek és mérések	10
4.1. A felvett spektrumok és az asszignáció menetének ismertetése	10
4.2. Az asszignációhoz használt program ismertetése	12
4.3. A mért minták és a mérések részletei.....	13
5. Az eredmények értékelése és következtetések.....	16
5.1. Az MIIA-fragmens vizsgálata	16
5.1.1. Az asszignáció eredménye	16
5.1.2. Az MIIA-fragmens rendezetlen voltának bizonyítékai.....	18
5.1.3. A hőmérséklet-függés vizsgálata	19
5.1.4. A másodlagos kémiai eltolódás értékek	21
5.1.5. A különböző módszerekben használatos random coil-értékek összevetése	22
5.2. Az S100A4 vizsgálata	24
5.2.1. Az asszignáció eredménye	24
5.2.2. A másodlagos kémiai eltolódás értékek és az S100A4 térszerkezete	26
5.3. Az MIIA-S100A4 komplex vizsgálata.....	28
5.3.1. Az asszignáció eredménye	28
5.3.2. A másodlagos kémiai eltolódás értékek és a komplex térszerkezete	31
6. Összefoglalás.....	33
7. Summary	34
8. Köszönetnyilvánítás	35
9. Hivatkozások jegyzéke.....	36

Rövidítésjegyzék

ACD	assembly competence domain
CARA	Computer Aided Resonance Assignment
DSS	2,2-dimetil-2-szilapentán-5-szulfonsav
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy
IDP	intrinsically disordered protein
ITC	izotermális titrációs kalorimetria
IUP	intrinsically unstructured protein
MES	2-(<i>N</i> -morfolino)-etánszulfonsav
MIIA	nemizom-miozin IIA
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
SCS	másodlagos kémiai eltolódás
TCEP	trisz (2-karboxietil)foszfin-hidroklorid
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy

1. Bevezetés

Az utóbbi két évtizedben a tumorkutatáson belül különösen nagy hangsúlyt kapott egy, az áttétképződésben jelentős szerepet játszó kalciumkötő homodimer fehérje, az S100A4 vizsgálata. A daganat áttétképződése (más néven metasztázis) során a kezdetben kialakult rákos sejtek elvándorolnak a test más részeire, majd nagy sebességgel osztódva újabb daganatokat képeznek. Ez jelentősen növeli a daganatos betegségek halálos kimenetelének valószínűségét, ezért e folyamat megértése kulcsfontosságú a gyógyítás szempontjából is. Jelentős számú bizonyíték született arra, hogy a metasztázis létrejöttében az intracellulárisan előforduló S100A4 az egyik központi szereplő, mégpedig feltehetően annak a nemizom-miozin IIA-val alkotott fehérjekomplexe.

Munkánk során ezt a kölcsönhatást vizsgáltuk NMR segítségével. Az NMR különösen hasznos, ha a molekuláknak nemcsak a szerkezetéről, hanem dinamikájáról is szeretnénk információt kapni. Elsősorban e komplex oldatbeli dinamikájának vizsgálata a fő célunk – és ennek előkészítésében játszott fontos szerepet az általam végzett munka.

A komplex vizsgálata során több, a biokémiai ismeretszerzésen túlmutató érdekes következtetést lehetett levonni. Az egyik az általunk vizsgált nemizom-miozin IIA nehézláncának egy 45 aminosavból felépülő fragmensének szerkezeti jellemzése, amely rendezetlen szerkezetű (tehát IDP, más szóval IUP fehérje). A rendezetlen fehérjékre az utóbbi évtizedben irányult egyre nagyobb figyelem, így ez ma egyre jobban kutatott terület a szerkezeti biokémián belül. Munkám során a rendezetlen fehérjék működésének megértéséhez is igyekeztem hozzájárulni ezen a kiragadott példán keresztül. Ezen kívül a komplex szerkezete is eltér a megszokottól: a homodimer S100A4 fehérjét a miozin lánc mintegy „átkarolja”, így a homodimer szimmetriája megszűnik, mivel a két ekvivalens kötőhelyre a miozin különböző részei kötnek, következésképp a két kötőhely megkülönböztethetővé válik – többé már nem ekvivalensek. Ezt a jelenséget NMR-rel kiválóan lehet tanulmányozni és kimutatni, ahogy majd látni fogjuk.

2. Irodalmi előzmények

Az S100A4 fehérje (más nevein Mts1, metasztazin, kalvaszkulin, p9Ka, 18A2, pEL98, Fsp-1 és CAPL) rendellenes működése (fokozott expressziója) a tumor metasztázis egyik fő okozója lehet. Többek között ezt támasztják alá a következő kísérleti bizonyítékok: metasztatikus patkány és egér emlőtumoros sejtek S100A4-szintje nagyobb a nemmetasztatikusokénál¹, a rosszindulatú humán emlőtumorban magasabb az S100A4 expressziós szintje a jóindulatú emlőtumorénál², ez összefüggésben áll a túlélési arányokkal is³. Az S100A4 fokozott expressziója a nemmetasztatikus patkány és egér emlősejteket metasztatikussá változtatja, míg az expresszió szintjének csökkenése metasztatikus sejtekben megszünteti a metasztázisra való hajlamot^{4,5}. Az emlőrák modellezésére használt transzgenikus egerekben, a jóindulatú emlőtumor sejteiben az S100A4 fokozott expressziója tüdőrák kifejlődését eredményezte⁶. Az S100A4 fokozott expressziós szintje hozzájárul további fibrotikus és gyulladásos betegségek, úgymint a reumatoid arthritis, szívnagyobbodás és vesefibrózis kialakulásához^{7,8}.

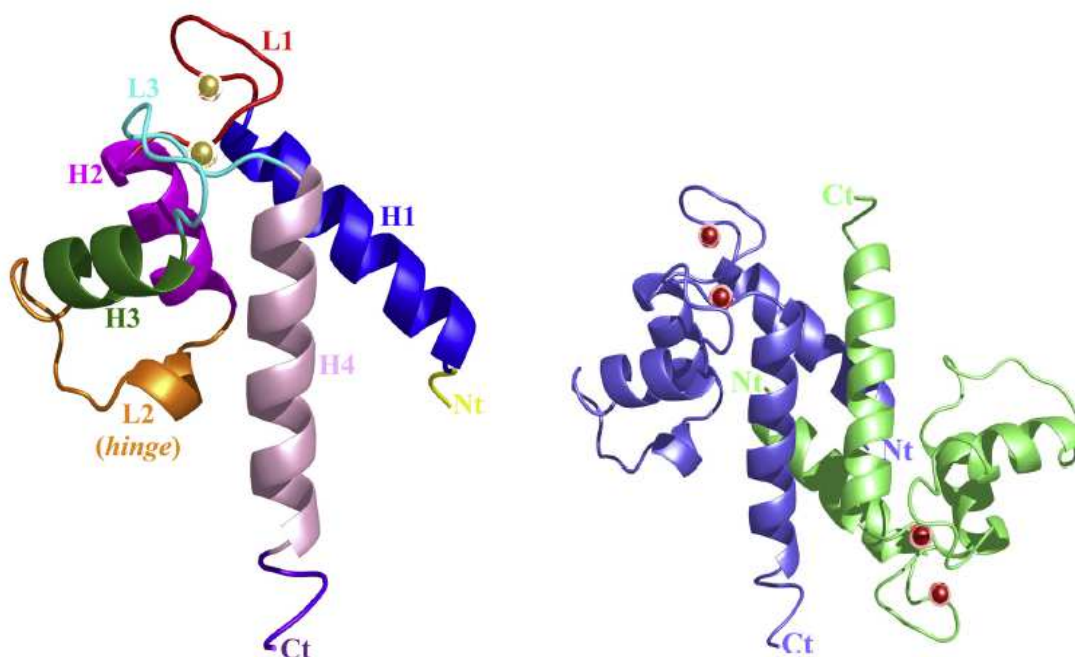
Az S100A4 az S100 fehérjék családjába tartozik, amely fehérjék nevüket onnan kapták, hogy oldhatók telített ammónium-szulfát-oldatban⁹. Az S100-család tagjai Ca^{2+} -kötő kistömegű (10-12 kDa) homodimer savas fehérjék, amelyek alegységenként egy EF-hand és egy pszeudo-EF-hand motívumot tartalmaznak, azaz fehérjénként összesen négy Ca^{2+} -iont képesek megkötni (az EF-hand hélix-hurok-hélix motívumot jelent, amely általában Ca^{2+} -ion koordinálására alkalmas)¹⁰. Az S100 fehérjék szerepet játszanak olyan folyamatokban, mint a sejtciklus-szabályozás, fehérjefoszforiláció, sejtnövekedés, sejtmozgás, differenciálódás, a sejtváz dinamikus egyensúlyának szabályozása, gyulladás és a kalcium-homeosztázis^{11,12}. Ugyanakkor a család több tagja különböző típusú és stádiumú tumoros megbetegedésben is szerepet játszhat, hiszen az S100A4-en kívül, az S100A6, S100A7 és S100B fehérjéknek is fokozott expressziós szintjét találták tumoros sejtekben¹³.

Az S100A4 biológiai szerepe még nem teljesen tisztázott. Ismert azonban, hogy több célfehérjével komplexet képez: a sejtvázat felépítő fehérjékkel, mint a nemizom-miozin IIA, tropomiozin és F-aktin^{14,15,16}, szignálfehérjékkel, mint a liprin- β 1¹⁷, a p53 nevű transzkripciósfaktorral¹⁸, sejtfelületen elhelyezkedő molekulákkal, mint az annexin A2 és Tag7^{19,20}. Az S100A4 metasztázisban játszott szerepe feltételezhetően a sejtvázat alkotó molekulák depolimerizálásával állhat összefüggésben, ezáltal előidézve a sejt mozgékonyágát. Ugyanis a nemizom-miozin IIA nehézláncával (továbbiakban egyszerűen MIIA-val jelöljük) komplexet képezve az S100A4 a miozin filamentumok szétesését eredményezi. Ez nem

pusztán a polimer-monomer egyensúly eltolódása révén történik, hanem az S100A4 aktívan részt vesz a depolimerizáció folyamatában és a polimerizáció gátlásában – habár a depolimerizációnak jelenleg csak feltételezett mechanizmusa ismert²¹.

Az S100A4 egérben és emberben előforduló típusát vizsgálták eddig (mindkettő 101 aminosavból álló fehérje). Mindkét fajból származó forma teljes oldatfázisú NMR-asszignációja ismert. A humán apo-típus (Ca^{2+} -ion nélküli), valamint az egér apo-típus (Ca^{2+} -ion nélküli) és holo-típus (Ca^{2+} -kötött) asszignációját 2D és 3D heteronukleáris spektrumok segítségével végezték el^{22,23,24}.

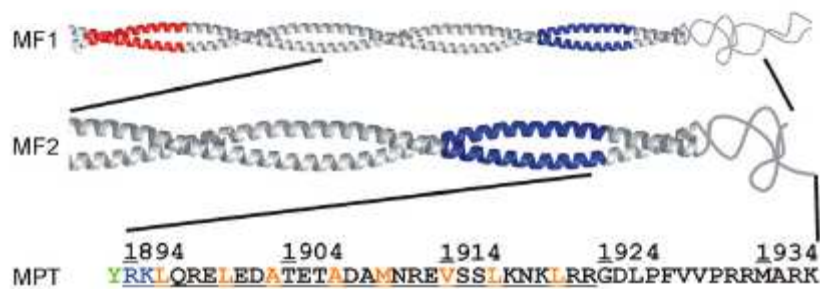
Az S100A4 térszerkezetét mind oldat-NMR, mind röntgendiffrakciós módszerekkel vizsgálták, apo- és holo-formában egyaránt^{21,25,26,27,28}. Mindkét módszerrel meghatározott szerkezetben a két alegység másodrendű kötésekkel kapcsolódik egymáshoz. A következő fontosabb szerkezeti elemek találhatók a fehérje egy alegységében: az N-terminális felőli végén található az egyik Ca^{2+} -kötő úgynevezett pseudo-EF-hand motívum – ez egy α -hélix (H1), egy β -hurok (L1) és egy másik, az előzőre merőleges α -hélixből (H2) épül fel –, ezután egy újabb hurok (L2) következik, amelyet „sarokkőnek” (hinge) is neveznek. Ezután a C-terminális végén található a másik Ca^{2+} -kötő domén, a kanonikus EF-hand, azon belül szintén van egy α -hélix (H3), egy β -hurok (L3) és egy újabb α -hélix (H4). Egy röntgendiffrakcióval meghatározott szerkezet látható az **1. ábrán**. A kanonikus EF-hand motívum a közismert Ca^{2+} -kötő fehérjében, a kalmodulinban is előfordul²⁹. A kanonikus EF-hand és a pseudo-EF-hand motívumok között az a különbség, hogy az előbbi esetében a Ca^{2+} -koordinációban 12 aminosav oldalláncának oxigén atomja vesz részt, míg az utóbbi esetében 14 aminosav gerinc karbonil oxigén atomja³⁰. A legtöbb mérés szerint kanonikus EF-hand motívum nagyobb affinitással köti a Ca^{2+} -iont a pseudo-EF-hand motívumnál, habár ebben nem egyeznek meg az irodalmi adatok, ugyanis a fehérjekoncentrációjától, a körülményektől és a módszertől függően más-más K_d értékeket mértek³¹. Az apo-formának és a holo-formának különbözik a térszerkezete. A Ca^{2+} -ion megkötésének folyamatát NMR-rel is vizsgálták titrálással³². A Ca^{2+} -ion kötés hatására jelentős térszerkezeti változás következik be: elsősorban a C-terminális felőli EF-hand motívum héliceinek térállása változik meg^{25,27}. A célfehérjék (vagy peptidek) az L2 hurok, H3 hélix és H4 hélix által képzett hidrofób kötőzsebbe tudnak kötődni^{21,25}. A kölcsönható partnerek általában α -hélix szerkezetet vesznek fel. Az apo-S100A4-ben ez a hidrofób kötőzsebek el van rejtve a fehérje belsejében, míg a holo-S100A4-ben a kölcsönható partnerek számára elérhetővé válik az említett térszerkezeti változás következtében (a fehérje „kinyílik”). Ez azt jelenti, hogy az S100A4 funkciója a Ca^{2+} -ion koncentrációtól függ, vagyis ezzel szabályozható.



1. ábra: A Ca^{2+} -kötött, azaz holo-S100A4 térszerkezete két nézetből. A szerkezeteket röntgendiffrakciós módszerrel határozták meg²⁵. A bal oldali ábrán láthatók a homodimer két láncának másodlagos szerkezeti elemei (H1-H4 α -hélixek és L1-L3 β -hurkok), a jobb oldali ábrán pedig az X-típusú négyhélixes köteg szerkezet (X type four-helix bundle).

Érdekesség, hogy az S100A4 hajlamos a polimerizációra is, ugyanis a C-terminális végén levő – egyébként flexibilis térszerkezetű – régiója egy másik S100A4-molekula hidrofób kötőzsebébe tud kötni. Ez a polimerizáció (elsősorban pentamerek keletkeznek) egy bizonyos fehérje-koncentráció felett következik be, illetve bizonyos molekulákkal indukálható. A polimerizáció következtében a fehérje elveszíti természetes funkcióját; ez lehetőséget ad az S100A4 inhibeálására kis molekulákkal, vagyis ez utóbbiak potenciális gyógyszerek lehetnek a metasztázis ellen³³. NMR-rel végeztek relaxációs méréseket is az egér S100A4-re vonatkozóan³⁴, amelyekből kiderült, hogy az S100A4 legmerevebb részei a H1 és H4 hélixek, ugyanis ezek tartják össze a dimert (a H1, H1', H4 és H4' hélixek úgynevezett „X-típusú négyhélixes köteget”, X type four-helix bundle-t alkotnak). A köztes régiók (H2 hélix, L2 hurok és H3 hélix) és a C-terminális vég ezzel szemben sokkal mozgékonyabb régiók.

A metasztázis szempontjából különösen fontos az S100A4-MIIA komplex mélyebb ismerete. Az MIIA egy hosszú, közel 2000 aminosavból felépülő coiled-coil szerkezetű fehérje, amelynek C-terminális vége, az úgynevezett ACD-domén (assembly competence domain) a filamentképzésben játszik fontos szerepet. Az S100A4 kötőhelye a coiled-coil végén és az ACD domén elején található³⁵. Az ACD domén rendezetlen szerkezetű. A rendezetlen szerkezetű fehérjéknek (IUP, más néven IDP fehérjéknek) nincs meghatározott



2. ábra: A nemizom-miozin IIA coiled-coil térszerkezetű, a végén található az ACD-domén, amely kinagyítva látható²¹. Ebben a régióban köt a nemizom-miozin IIA molekula az S100A4-molekulához.

térszerkezete, és ez a funkciójukhoz szükséges is^{36,37}. Általában hidrophil aminosavakból többet tartalmaznak a rendezett fehérjéknél, emiatt nincs hidrofób magjuk, amelyre a szerkezet felépülhetne. A rendezett szerkezet hiánya miatt atomi szinten csak az NMR alkalmas a vizsgálatukra, melynek segítségével oldatfázisban vizsgálhatók.

Az MIIA rövidebb-hosszabb fragmenseinek S100A4-gyel való kölcsönhatását vizsgálták (egy ilyen fragmens látható a **2. ábrán**): kinetikai mérések és ITC-mérések segítségével a komplexek kinetikai paramétereit^{26,31}, röntgendiffrakcióval²¹ és NMR-rel²⁸ pedig a komplex térszerkezetét határozták meg (a röntgendiffrakció esetében mutáns S100A4-et használtak a polimerizáció elkerülése végett). A mérésekből kiderült, hogy egy molekula MIIA egy molekula homodimer S100A4-gyel (azaz 1:2 arányban) képez komplexet, oly módon, hogy a homodimer S100A4 két kötőhelyéhez az MIIA két különböző régiója kötődik. Ez az aszimmetrikus komplexképződés viszonylag ritka homodimer fehérjék esetében. Az MIIA térszerkezete a kötődés során megváltozik, ugyanis a coiled-coil szerkezet α -hélixszé alakul át. Az aszimmetria megjelenése jól követhető az S100A4 2D ^1H - ^{15}N HSQC spektrumán, ahol több jel megkettőződik vagy kiszélesedik a komplexképződés hatására. A komplex térszerkezetének ismeretében egy, az MIIA S100A4 általi depolimerizációjának lehetséges mechanizmusára is javaslatot tettek Kiss és mtsai²¹.

3. Célkitűzések

Először az MIIA egy 45 aminosavból felépülő fragmensét vizsgáltuk. Az erről felvett különböző 2D és 3D NMR spektrumok segítségével célunk a teljes asszignáció volt. Mivel ezt a fragmenst korábban nem használták az S100A4-gyel való komplex vizsgálatára, az asszignációhoz semmilyen korábbi irodalmi adat értékét nem lehetett felhasználni. Ezután az eltolódások ismeretében azok elemzésével a rendezetlen szerkezetű közepes méretű fehérje további vizsgálatát terveztük elvégezni, elsősorban a másodlagos kémiai eltolódás értékek (SCS értékek) felhasználásával. Az eredmények ismeretében a különböző random coil számítási módszereket is összevethetjük: az adott rendszerre kapott SCS értékek összehasonlításával. Ezen kívül különböző hőmérsékleteken is felvettünk 2D ^1H - ^{15}N HSQC spektrumokat, hogy a térszerkezetre vonatkozó információkat tovább bővíthessük. Az MIIA teljes asszignációjának ismeretében dinamikai méréseket is lehet végezni, illetve kiértékelni – ez azonban mostani munkámnak nem része.

A következő lépés a Ca^{2+} -kötött holo-S100A4 NMR-rel történő vizsgálata volt, szintén 2D és 3D NMR spektrumok felvételével. A teljes asszignáció az irodalomból ismert (igaz, csak az MIIA-val alkotott vad-típus komplexe esetében, miközben mi egy rövidített fragmenst vizsgáltunk, ráadásul először szabad formában), amelynek felhasználásával lehetett elvégezni az asszignációt. Itt elsősorban már csak a 2D ^1H - ^{15}N HSQC spektrum jeleinek azonosítása volt a fő célunk. Az SCS értékeket egy ilyen rendezett fehérjére is érdemes megvizsgálni és a különböző random coil értékkel kapott eredményeket összevetni.

A harmadik lépés végül a komplex teljes asszignációja: a jelölt S100A4 és jelöletlen MIIA komplexét vizsgáltuk 2D és 3D NMR spektrumok segítségével. Az asszignációt könnyíti, hogy a szabad állapotú S100A4 asszignációját, valamint az irodalmi értékeket is fel lehet használni, mégis az aszimmetria következtében megjelenő kétszeres jelmennyiség azonosítása komoly feladat, tekintve, hogy a jelek eltolódása a szabad állapothoz képest különböző a 2D ^1H - ^{15}N HSQC spektrumokban minden egyes jel esetében (függ a kölcsönható partner távolságától adott atomok esetében). A dinamikai számításokhoz a 2D ^1H - ^{15}N HSQC jelek azonosítása szükséges, ezért a komplex esetében is ez volt a fő célunk.

4. Kísérleti módszerek és mérések

4.1. A felvett spektrumok és az asszignáció menetének ismertetése

A teljes asszignációhoz különböző 2D és 3D spektrumokat vettünk fel. Az alábbiakban ezen spektrumokat és az ezek felhasználásával történő asszignáció menetét mutatom be.

Az általunk felhasznált spektrumok heteronukleáris többdimenziós spektrumok, amelyeket mind a H-csatornában detektáltunk. A felhasznált spektrumok: 2D ^1H - ^{15}N HSQC (a legtöbb 3D spektrumnak ez képezi H-N dimenziók menti vetületét), 2D ^1H - ^{13}C HSQC, 3D HNCA, 3D HN(CO)CA, 3D CC(CO)NH, 3D HNCACB, 3D HSQC-TOCSY és 3D HSQC-NOESY.

A heteronukleáris 2D HSQC spektrumok megmutatják, hogy mely H-jelhez mely N-, illetve C-jel tartozik az 1D spektrumban (ott van keresztcsúcs, ahol összetartoznak a jelek). Ennek felvételéhez N-jelölt, illetve C-jelölt mintára van szükség. Elsősorban a 2D ^1H - ^{15}N HSQC spektrumot használtuk fel, amelyen láthatók az amid N- és a hozzátartozó H-jelek, így aminosavanként egy jelet kapunk. Emellett a többi N-H kötést tartalmazó oldalláncok is megjelennek a spektrumon (aszparagin, glutamin, lizin, arginin, hisztidin és triptofán esetében); ezek általában más régióban találhatók a főlánc amid jeleihez képest, valamint az $-\text{NH}_2$ jelek esetében adott N-hez két H jele is tartozik. Az itt kijelölt aminosavanként egy-egy keresztcsúcsához kapcsolódnak a további mérések. Fontos megjegyezni, hogy 2D ^1H - ^{15}N HSQC spektrumon a prolinok nem adnak jelet, mivel ezek amid N-atomjaihoz nem kapcsolódik H-atom. A 2D ^1H - ^{13}C HSQC spektrumot, amelyben az összetartozó H- és C-jelek keresztcsúcsai láthatók, elsősorban ellenőrzésre és a 3D spektrumokból kapott C-jelek eltolódásainak pontosítására használtuk fel – a 2D spektrumokban ugyanis nagyobb felbontást lehet elérni a 3D spektrumokhoz képest.

A 3D HNCO spektrumon a 2D ^1H - ^{15}N HSQC spektrumban is megjelenő H és (amid) N mellett a harmadik dimenzióban az előző aminosavhoz tartozó karbonil (általában C'-vel jelölt) jelek láthatók. Mivel minden egyes amid N-H pároshoz egyetlen karbonil-jel tartozhat (kivéve, ha az első aminosav is ad jelet a spektrumon, ami ritkán fordul elő), a 3D HNCO segítségével könnyű eldönteni a jelek egybeesése esetén, hogy valójában hány keresztcsúcs átfedéséből keletkezett egy-egy jel.

A 3D HNCA spektrumon a 2D ^1H - ^{15}N HSQC-ban is megjelenő H és (amid) N mellett a harmadik dimenziót a C^α -jelek képezik. Adott aminosav N-H jeléhez általában két C^α -jelet is kapunk, ugyanis nemcsak az adott *i*-edik aminosav C^α -jelét, hanem az előtte levő, (*i*-1)-edik

aminosav C^α -jele is megjelenik a spektrumon. Utóbbi általában kisebb intenzitású az előbbi jelnél. A 3D HN(CO)CA spektrum ehhez képest pusztán abban különbözik, hogy csak az $(i-1)$ -edik aminosav C^α -jele látható a spektrumon. Ezekből következik, hogy a két spektrum összevetéséből egyértelművé válik, hogy a 3D HNCA spektrumon melyik az i -edik és melyik az $(i-1)$ -edik aminosav C^α -jele. A különböző H-N keresztcsúcsokhoz tartozó C_i^α - és C_{i-1}^α -jelek sorba állíthatók az egyezések alapján az aminosav-szekvenciának megfelelően (ugyanis az i -edik aminosavhoz tartozó C_{i-1}^α eltolódása meg kell, hogy egyezzen az $(i-1)$ -edik aminosavhoz tartozó C_i^α eltolódásával, mivel a kettő ugyanaz). Ezt a sorba állítást lehet ellenőrizni a 3D HNCACB spektrum segítségével is, amely adott H-N keresztcsúcsához tartozó C_i^α - és C_{i-1}^α -jelek mellett egyúttal – ellentétes előjelű intenzitással – a C_i^β - és C_{i-1}^β -jeleket is tartalmazza (ebből tehát a C^β -atomok eltolódásait is megkapjuk, valamint a megfelelő C_i^β és C_{i-1}^β -jelek egyezése újabb bizonyítékot nyújt a helyes sorba állításra).

A 3D CC(CO)NH spektrum esetében egy adott H és (amid) N jelhez a harmadik dimenzióban egy C-TOCSY jelsorozat tartozik: az előző aminosav oldallánca összes C-atomjának eltolódása látható elméletileg. Itt a jelintenzitások változók, attól függően, hogy milyen messze van egy adott oldalláncbeli C-atom a gerincben található N-H-kötéstől. Ezen spektrum segítségével tehát a teljes oldallánc C-atomjainak eltolódásait kaphatjuk meg. Ez megerősíti a korábban megkapott HSQC jelek asszignációját az által, hogy ellenőrizhetjük, hogy valóban olyan eltolódás-mintázat látható a 3D CC(CO)NH spektrumon, mint amit vártunk, ismerve az adott aminosav előtti aminosav oldalláncát.

Az eddig ismertetett minden 3D spektrumhoz ^{13}C - ^{15}N -jelölt (más néven duplán jelölt) mintára van szükség, hiszen egyik izotóp természetes előfordulási aránya sem teszi lehetővé a kellő jelintenzitást a spektrumfelvétel során.

Az oldalláncok H-atomjainak eltolódását a 3D HSQC-TOCSY spektrumból tudjuk meghatározni. Ez esetben a 2D ^1H - ^{15}N HSQC spektrumban is megtalálható jelhez a harmadik dimenzióban az adott aminosav oldalláncának H-TOCSY-jelsorozatát kapjuk meg. A 3D HSQC-NOESY spektrum pedig ugyanilyen, azzal a különbséggel, hogy a H-TOCSY-jelsorozat helyett H-NOESY-jelsorozatot kapunk a harmadik dimenzióban. E kettőt összevetve a H-NOE jeleket is megkapjuk, amelyből a térszerkezetre is lehet következtetni. A két spektrumhoz nincs szükség duplán jelölt mintára, hanem elég a ^{15}N -jelölt minta is, amelyet általában sokkal könnyebb és olcsóbb is előállítani.

4.2. Az asszignációhoz használt program ismertetése

A felvett spektrumokat a Bruker TopSpin 3.1 programmal processzáltuk, majd a CARA (Computer Aided Resonance Assignment)³⁸ nevű program segítségével végeztem el az asszignációt. A CARA program különösen hasznos a többdimenziós spektrumok, így főként a bioNMR spektrumok asszignációja esetében. A programba beolvasható az összes spektrum, amelyeket egy adott mintáról felvettünk, és ezeket egyszerre képes kezelni: ha az egyikben asszignáltunk egy jelet, ez a többi spektrumban is megjelenik. Többféle nézetben nyitható meg egy-egy spektrum: a 2D spektrumokat – a fehérjék esetében általában ez a 2D HSQC – például a SynchroScope, HomoScope, MonoScope, PoliScope nézetben, attól függően, hogy milyen funkciót szeretnénk használni. Az asszignáció esetében a SynchroScope bizonyul a leghasznosabbnak: ebben ugyanis kijelölhetők a HSQC keresztcsúcsok (ezek lesznek a sorszámozott úgynevezett „system”-ek). Ahogy korábban bemutattuk, a 3D spektrumok általában ezekre a 2D ^1H - ^{15}N HSQC jelekre épülnek rá. A SynchroScope-ban megnézhető, hogy egy-egy HSQC jel felett a 3D-spektrumban milyen jelek láthatók (ezt két különböző oldal felőli nézetben tekinthető meg: a 3D spektrumot kockának feltételezve annak két oldala felől).

A 3D spektrumok úgy elemezhetők, hogy a StripScope nézet megnyitása után abban az adott systemhez (tehát HSQC jelhez) tartozó úgynevezett „strip”-et tekinthetjük meg. A strip az adott HSQC jel feletti harmadik dimenzióból származó kis szélességű vetületet („csíkot”) jelenti. Itt kijelölhetők a karbonil C-, az oldallánc C- és H-jelek. A stripek a korábban ismertetett módon a StripScope nézetben sorba állíthatók, sőt összekapcsolhatók. Így az ismert szekvencia segítségével a program automatikusan a sorszámmal rendeli a megfelelő aminosavat. Ehhez egy azonosított aminosavtól szükséges elindulni, mely az eltolódás értékek alapján azonosítható a szekvenciától függően egyedi módon: például a glicin C^α -jele jellegzetesen kis eltolódású, ezen kívül a HSQC spektrumban a N-dimenzióban gyakran kis eltolódásnál jelenik meg a jele, vagy a szerin esetében az átlagossal ellentétben a C^β -nak nagyobb az eltolódása a C^α -nál, vagy az arginin és lizin C-TOCSY jele a 3D CC(CO)NH spektrumban jellegzetes mintázatot mutat. Az asszignációt az is megkönnyíti, hogy a program figyelembe veszi a szekvenciát, az adott spektrumban meghatározható jeleket, és az adott aminosav HSQC jelének asszignációja után annak szerkezetét is, így felkínálja, hogy milyen atomok lehetségesek egy adott jel asszignációja esetében. Ezen kívül tud javaslatot tenni a stripek összekötésére is, a javaslat helyessége valószínűségének megjelölésével együtt.

4.3. A mért minták és a mérések részletei

Az MIIA-nak egy 45 aminosavból felépülő fragmensét vizsgáltunk, amely teljes egészében tartalmazza azt a régiót, amely az S100A4-fehérjéhez kötődik (Tyr1893-Lys1937). Aminosav-szekvenciája a következő: YRKLQ RELED ATETA DAMNR EVSSL KNKLR RGDLP FVVPR RMARK. A 2D ^1H - ^{15}N HSQC, a 2D ^1H - ^{13}C HSQC, a 3D HNCA, a 3D HN(CO)CA, 3D HNCACB és a 3D CC(CO)NH spektrumok felvételéhez ^{13}C - ^{15}N -jelölt mintát használtunk, a 3D HSQC-TOCSY és 3D HSQC-NOESY spektrumok felvételéhez és a hőmérséklet-függés vizsgálatához pedig ^{15}N -jelölt mintát. A ^{13}C - ^{15}N -jelölt NMR-minta összetétele: 300 μl 0,80 mM ^{13}C - ^{15}N -jelölt MIIA, 10-20 mM MES pufferben, pH = 6,2, 30 μl D_2O -t (~10 %). A méréseket 283 K-en végeztük. Az ^{15}N -jelölt NMR-minta összetétele: 450 μl 0,72 mM ^{15}N -jelölt MIIA, 20 mM MES puffer, 10 mM TCEP puffer, 20 mM NaCl, 3 mM NaN_3 , 1 mM CaCl_2 , pH = 5,4, 50 μl D_2O (10%). A 3D HSQC-TOCSY és 3D HSQC-NOESY spektrumok esetében 283 K-en végeztük a mérést, a hőmérséklet-függés vizsgálatához 283 K-en, 293 K-en és 303 K-en vettünk fel 2D ^1H - ^{15}N HSQC spektrumokat. A mintákhoz további 5 μl DSS-t tettünk a referenciálás érdekében. Mindkét mintát Shigemi-csőben mértük.

Az S100A4-nek egy olyan változatát vizsgáltuk, amelyről az utolsó 13 aminosav hiányzik (jelölése: S100A4d13). Erre azért volt szükség, hogy a polimerizációt elkerüljük. A kötődési vizsgálatok K_d -értékei alapján ennek a rövidített fragmensnek az MIIA-val történő kötődésének módja megegyezik a vad-típussal (nM-os tartományba esik mindkettő). A szekvencia továbbá tartalmaz három extra aminosavat (GSH-szekvencia) az elején, amelyek az expresszió módja folytán kerültek rá. Az általunk vizsgált fehérje így módon tehát 91 aminosavból épül fel, teljes szekvenciája a következő: GSH MACPL EKALD VMVST FHKYS GKEGD KFKLN KSELK ELLTR ELPSF LGKRT DEAAF QKLMS NLDSN RDNEV DFQEY CVFLS CIAMM CNE. Az NMR-minta összetétele: 485 μl ^{13}C - ^{15}N -jelölt S100A4d13-oldat, 4,5 μl TCEP puffer, 5,5 μl CaCl_2 , pH = 5,64, 5 μl DSS (referenciáló anyag) és 50 μl D_2O (10 %). A fehérje 1 mM körüli végső koncentrációban van ebben az oldatban. A méréseket 300 K hőmérsékleten végeztük Shigemi-csőben.

A komplex esetében jelöletlen MIIA-t és ^{13}C - ^{15}N -jelölt S100A4d13 mintát használtunk a következő összetételben: 3 mg MIIA 30 μl oldatban (ez 18,5 mM koncentráció), 100 mM MES pufferben + 300 μl ^{13}C - ^{15}N -jelölt S100A4d13 (benne 10 mM CaCl_2 és 5 mM TCEP puffer), pH = 6. Tehát az S100A4 jeleinek a komplexképződés folytán bekövetkező megváltozását vizsgáltuk. A méréseket 300 K hőmérsékleten végeztük Shigemi-csőben.

A spektrumokat Bruker Avance 700 MHz készüléken vettük fel. Az **1. táblázat** tartalmazza a mérések részleteit. Az MIIA-esetében minden spektrumot felvettünk a korábban említettek közül a 3D HNCO kivételével, amelyre nem volt szükség a kevés jel miatt. Az S100A4 és a komplex esetében az asszignációhoz az irodalmi előzményeket is fel lehetett használni, ezért az MIIA-hoz képest kevesebb spektrum felvétele is elegendő volt.

Minta	Mérés típusa	FID mérete			NS	Spektrumablak szélessége / ppm			D1 / s
		F1	F2	F3		F1	F2	F3	
<i>MIIA-fragmens</i>	2D ^1H - ^{15}N HSQC	256 (^{15}N)	2048 (^1H)	–	8	24,0000	10,0015	–	2,0000
	2D ^1H - ^{13}C HSQC	256 (^{13}C)	1024 (^1H)	–	8	85,0000	10,0015	–	2,0000
	3D HNCA	128 (^{13}C)	40 (^{15}N)	1024 (^1H)	8	32,0626	24,0000	10,0015	1,5000
	3D HN(CO)CA	128 (^{13}C)	40 (^{15}N)	1024 (^1H)	8	32,0110	24,0000	10,0015	1,5000
	3D CC(CO)NH	128 (^{13}C)	40 (^{15}N)	1024 (^1H)	16	75,0155	24,0000	10,0015	1,5000
	3D HNCACB	128 (^{13}C)	40 (^{15}N)	1024 (^1H)	16	75,0155	24,0000	10,0015	1,5000
	3D HSQC-TOCSY ¹	128 (^1H)	40 (^{15}N)	2048 (^1H)	16	10,5016	26,0000	10,5016	1,1000
	3D HSQC-NOESY ²	128 (^1H)	40 (^{15}N)	2048 (^1H)	16	10,5016	26,0000	10,5016	1,1000
<i>hőmérséklet-függés</i>	2D ^1H - ^{15}N HSQC (283 K)	256 (^{15}N)	2048 (^1H)	–	2	24,0000	10,0015	–	1,4000
	2D ^1H - ^{15}N HSQC (293 K)	256 (^{15}N)	2048 (^1H)	–	2	24,0000	10,0015	–	1,4000
	2D ^1H - ^{15}N HSQC (303 K)	256 (^{15}N)	2048 (^1H)	–	2	24,0000	10,0015	–	1,4000
<i>S100A4d13</i>	2D ^1H - ^{15}N HSQC	128 (^{15}N)	2048 (^1H)	–	4	30,0000	12,9838	–	1,5000
	3D HNCA	128 (^{13}C)	40 (^{15}N)	1024 (^1H)	16	32,0626	30,0000	14,0021	1,1000
	3D HN(CO)CA	128 (^{13}C)	40 (^{15}N)	1024 (^1H)	8	32,0110	24,0000	12,9838	1,3000
	3D CC(CO)NH	64 (^{13}C)	40 (^{15}N)	1024 (^1H)	64	75,0155	30,0000	14,0021	1,0000
	3D HNCO	128 (^{13}C)	40 (^{15}N)	2048 (^1H)	16	22,0849	30,0000	12,9838	1,3000
<i>Komplex</i>	2D ^1H - ^{15}N HSQC	256 (^{15}N)	2048 (^1H)	–	16	30,0000	14,0021	–	1,3000
	3D HNCA	128 (^{13}C)	40 (^{15}N)	1024 (^1H)	16	32,0626	30,0000	14,0021	1,1500
	3D CC(CO)NH	64 (^{13}C)	40 (^{15}N)	1024 (^1H)	64	75,0155	30,0000	14,0021	1,0000
	3D HNCO	64 (^{13}C)	40 (^{15}N)	2048 (^1H)	16	22,0849	30,0000	12,9838	1,3000

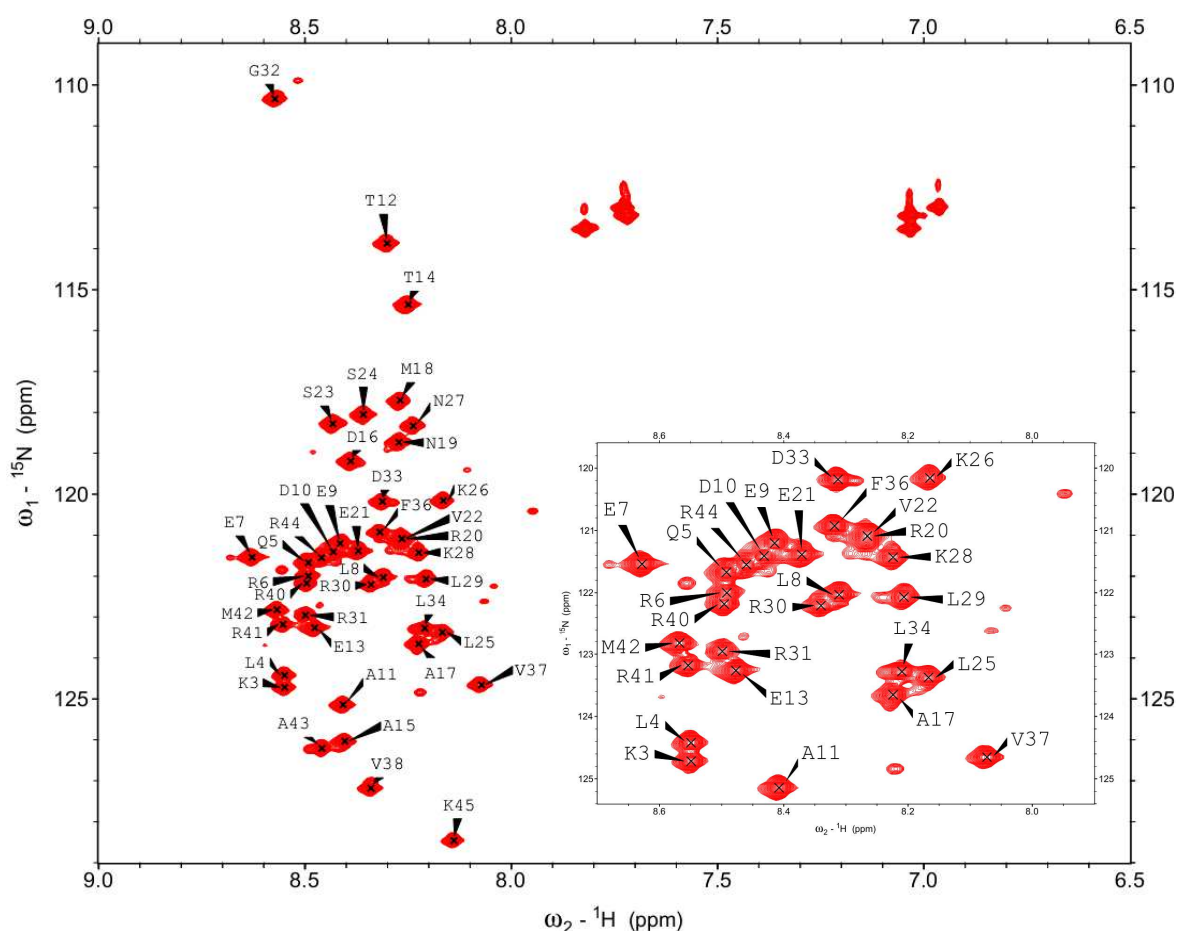
1. táblázat: Az NMR-mérések típusai és paraméterei (a FID mérete – „Size of FID” paraméter – az egyes dimenziók méretét, az NS a mérések ismétlésének számát, a Spektrumablak szélessége – „Spectral width” paraméter – a spektrum adott dimenziójának minimális és maximális eltolódás értékének különbsége, a D1 a relaxációs időt jelenti). A méréseket 700 MHz Bruker Avance készüléken végeztük. A minták minden esetben ^{13}C - ^{15}N -jelöltek, kivéve az MIIA-fragmens 3D HSQC-TOCSY, 3D HSQC-NOESY és a 2D ^1H - ^{15}N HSQC spektrumai hőmérséklet-függésének vizsgálatához felvett spektrumait, amelyek ^{15}N -jelölt mintával készültek. Megjegyzések: ¹ mixing time: 70 ms, ² mixing time: 100 ms.

5. Az eredmények értékelése és következtetések

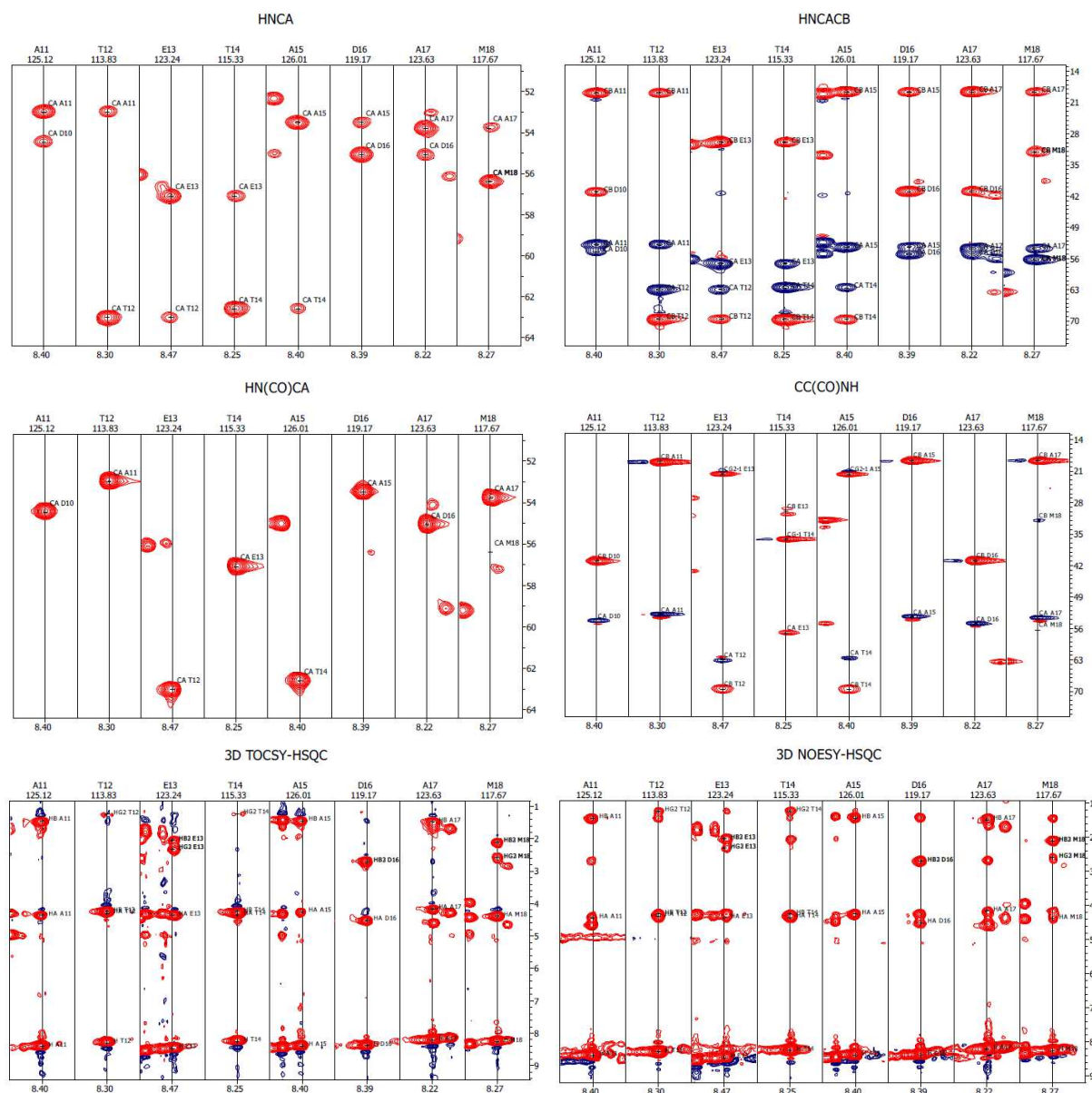
5.1. Az MIIA-fragmens vizsgálata

5.1.1. Az asszignáció eredménye

Az asszignációt sikeresen elvégeztem. Az asszignált 2D ^1H - ^{15}N HSQC spektrum a **3. ábrán** látható, a háromdimenziós spektrumokból készített stripek egy-egy részlete pedig a **4. ábrán**. Az első két aminosav (Y1 és R2) és a prolinok (P35 és P39) nem jelennek meg a 2D ^1H - ^{15}N HSQC spektrumon, ezek közül az Y1 egyes atomjai (H^α és C^α) a 2D ^1H - ^{13}C HSQC spektrum alapján, a P35 és P39 egyes C-atomjai pedig a 3D CC(CO)NH spektrum alapján azonosítható. Az R2 átfed a többi argininnal a 2D ^1H - ^{13}C HSQC spektrumban, ezért ez alapján sem asszignálható. Az utolsó aminosav, a K45 oldallánca C-atomjainak nem tudjuk meghatározni az eltolódását. A karbonil C-atomok eltolódásait nem határoztuk meg 3D HNCO mérés hiányában.



3. ábra: Az MIIA-fragmens asszignált 2D ^1H - ^{15}N HSQC spektruma. A kinagyított részleten megfigyelhetők a minor jelek (kis intenzitású jelek), amelyek részben cisz-térállású prolinokhoz közel eső aminosavak jelei (a prolin esetében a transz-térállás a stabilabb így ez a gyakoribb).



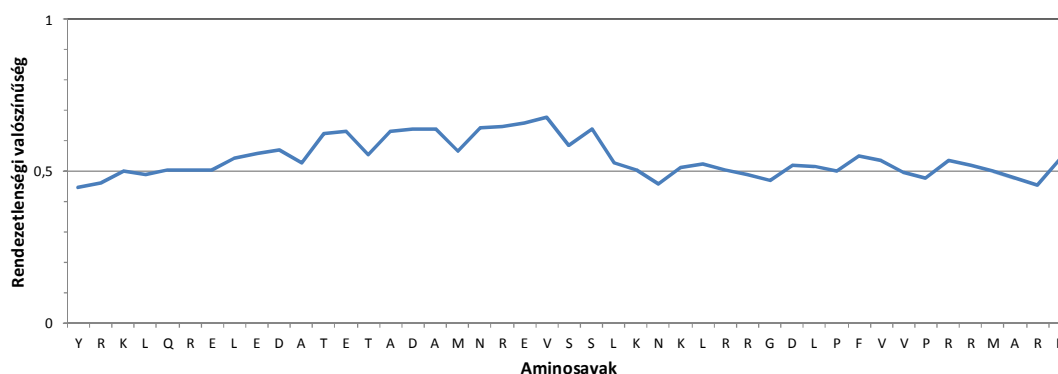
4. ábra: Az MIIA-fragmens asszignációjának A11-M18 közötti részlete a 3D HNCA, 3D HN(CO)CA, 3D HNCACB, 3D CC(CO)NH, 3D HSQC-TOCSY és 3D HSQC-NOESY spektrumok alapján. A stripek sorba állítása a 3D HNCA és 3D HN(CO)CA spektrumok alapján végezhető el, a 3D HNCACB segítségével ellenőrizhető. A 3D HNCA és 3D HNCACB spektrumon látható, hogy az egymást megelőző stripeken az azonos jelek megtalálhatók (C^{α} és C^{β} jelek).

A 2D ^1H - ^{15}N HSQC spektrumon az intenzív, úgynevezett major keresztcsúcsok mellett megfigyelhető néhány kis intenzitású, minor keresztcsúcs is. Ezek közül némelyiket sikerült asszignálni, amiből kiderült, hogy ezek a prolinokhoz közeli aminosavak minor jelei. A prolin ugyanis cisz- és transz-térállást egyaránt felvehet. A transz a stabilabb, így ez a gyakoribb, tehát a major jelek a csak transz-térállású prolinokat tartalmazó molekulákban a prolinokhoz közeli aminosavak jelei, míg a minor jelek cisz-térállású prolint is tartalmazó prolinhoz közeli aminosavak jelei lehetnek.

5.1.2. Az MIIA-fragmens rendezetlen voltának bizonyítékai

Az MIIA-fragmens rendezetlen térszerkezetűnek bizonyult a mérések alapján – erre több egyértelmű bizonyíték van. A szekvencia alapján is rendezetlen szerkezet várható: ennek kimutatására az IUPred analízis alkalmas³⁹. Ebből minden egyes aminosavra kapható egy relatív szám, amely annak valószínűségét jellemzi, hogy az adott aminosavnál rendezetlen szerkezetű a fehérje. A 0,5 feletti értékek esetén valószínűsíthető a rendezetlen szerkezet. Az analízis eredménye látható az **5. ábrán**.

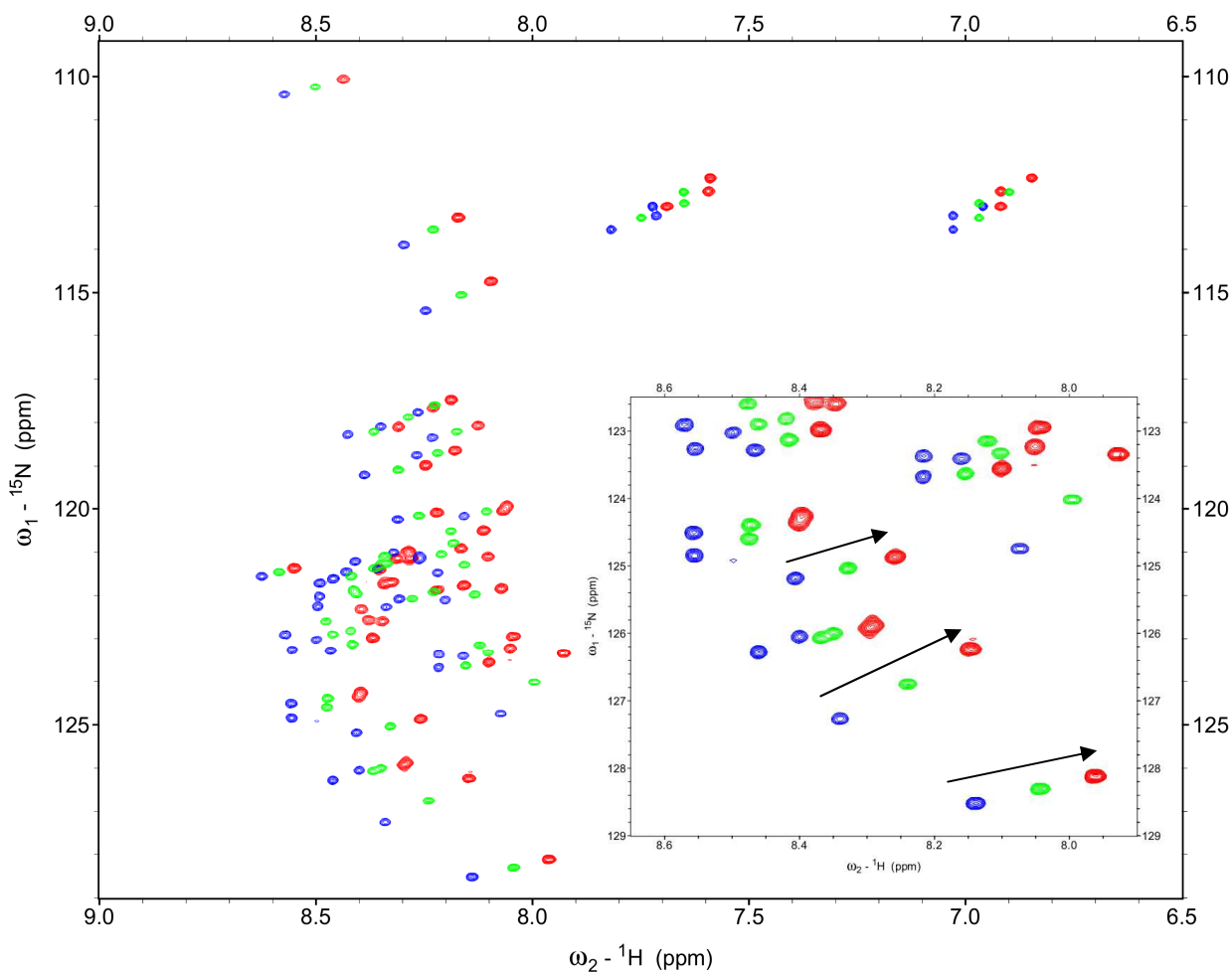
A mérésekből szerzett bizonyítékok a rendezetlenségre: a 2D ^1H - ^{15}N HSQC spektrumon a jelek közel vannak egymáshoz, mindkét dimenzióban szűk tartományba esnek (H-dimenzióban 0,554 ppm, N-dimenzióban 18,132 ppm a legnagyobb és legkisebb eltolódás különbsége), valamint az eltolódás értékek közel vannak a random coil értékekhez (ez részletesebben a másodlagos kémiai eltolódások elemzésénél olvasható). A 3D HSQC-NOESY spektrumban nagyon kevés úgynevezett long-range NOE-jel található. Ezek az adott aminosav amid H-jének a szomszédján kívüli H-ekkel adott keresztcsúcsait jelenti. A rendezetlen szerkezet esetében a molekula gombolyag szerkezet helyett nyújtott szerkezetű, vagyis távolabb vannak az egyes atomok egymástól, ezért kevés a long-range NOE-jel. A hőmérséklet-függés vizsgálata is alátámasztja a rendezetlenséget, ugyanis a háromféle hőmérsékleten felvett 2D ^1H - ^{15}N HSQC spektrum jeleinek eltolódás értéke lineárisan változik a hőmérséklettel. Ez azt jelenti, hogy nincs változás a másodlagos térszerkezetben, ami vagy a rendezetlenségnek, vagy az igen stabil másodlagos térszerkezetnek lehet a következménye (a nem különösen stabil térszerkezettel rendelkező fehérjéknek változik a térszerkezete a hőmérséklet változásával a le- és feltekeredés miatt, ezért az eltolódásoknak nemlineáris a hőmérséklet-függése). Az előzőekkel összevetve a lineáris hőmérséklet-függést jelen esetben a rendezetlen térszerkezet magyarázza.



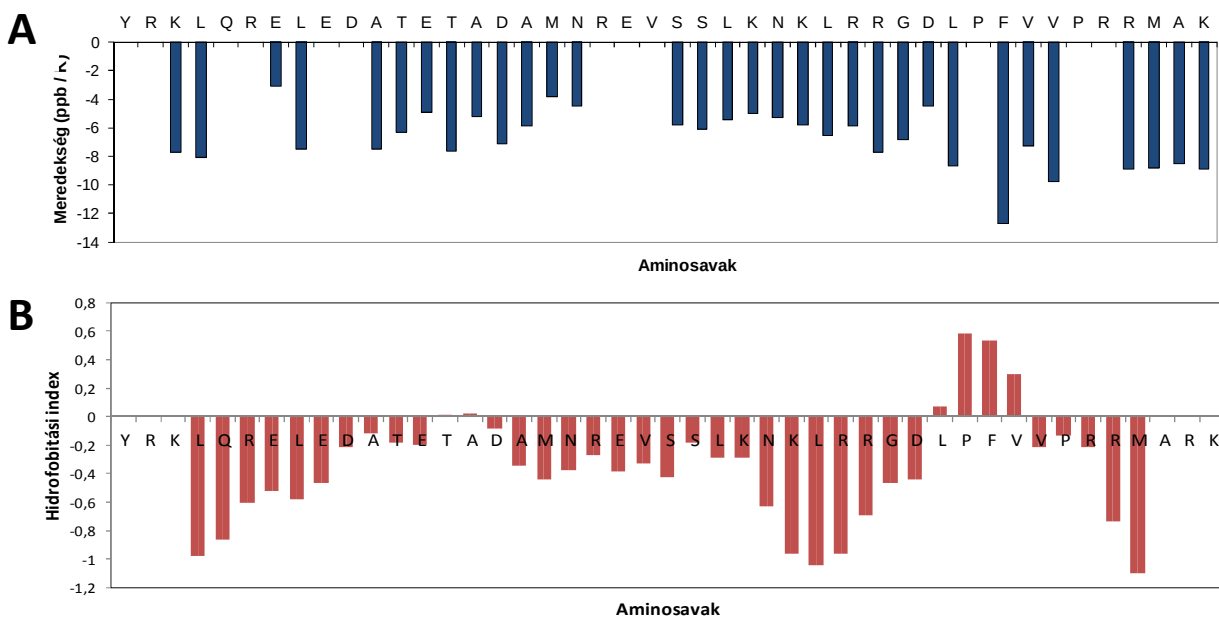
5. ábra: Az MIIA szekvencia alapján történő IUPred analízise. Az IUPred analízis azt mutatja meg, hogy milyen valószínűséggel lesz rendezetlen egy szerkezet. A 0,5 feletti érték a rendezetlenséget valószínűsíti az adott régióban.

5.1.3. A hőmérséklet-függés vizsgálata

A 283 K, 293 K és 303 K hőmérsékleten felvett 2D ^1H - ^{15}N HSQC spektrumok egymásra téve a **6. ábrán** láthatók. Nem minden egyes jel esetében egyértelmű, hogy melyik három tartozik össze az átfedések miatt. A jelek nagyobb részénél azonban sikerült egymáshoz rendelni a három jelet, és ezek H-eltolódásaira egyenest illesztettünk. Az illesztés R^2 -értéke minden esetben 0,998-nál nagyobb érték, tehát lineárisnak tekinthető a hőmérséklet-függés. Ez a korábbiak értelmében alátámasztja, hogy az MIIA-fragmens rendezetlen térszerkezetű. Az illesztett egyenesek meredekségei a szekvencia függvényében a **7. ábrán** szerepelnek. A meredekség értékeket érdemes összevetni a hidrofobitással. Ehhez az Eisenberg-féle hidrofobitási indexet⁴⁰ használtuk, amely vizsgálatban a szekvencia egy pontjánál annál inkább hidrofób a fehérje, minél nagyobb pozitív értékű a hidrofobitási index, és annál jobban hidrofil, minél nagyobb negatív értéket vesz fel a hidrofobitási index. Ez is a **7. ábrán** látható az MIIA-fragmensre vonatkozóan. A két diagramot összevetve látjuk, hogy abban a régióban változik leginkább a hőmérséklettel az eltolódás, ahol a hidrofobitási index hidrofóbnak prediktálja a fehérjét (a P35 és P39 közötti szakasz). Ebből valószínűsíthető, hogy ezen régió egyfajta hidrofób-mag kezdeménynek is tekinthető, amelyre ugyan nem épül egyértelmű térszerkezet, de külső hatásra (például komplexképződés esetén a kölcsönható partner hatására) ez a rész hozzájárulhat a térszerkezet kialakulásának kezdeményezéséhez.



6. ábra: A hőmérsékletfüggés vizsgálata: a 2D ^1H - ^{15}N HSQC spektrum 283 K-en (kék), 293 K-en (zöld) és 303 K-en (piros) felvéve. Ahol meghatározhatók az összetartozó keresztcsúcsok, a lineáris hőmérsékletfüggés látható (a zöld és piros jel közötti távolság megegyezik a kék és zöld közötti távolsággal).



7. ábra: Az amid H-eltolódásának hőmérséklet-függésére illesztett egyenes meredkségei a szekvencia függvényében (A), ahol meghatározható. A meredkségek ott a legnagyobbak, ahol hidrofóbnak prediktálja az Eisenberg-féle hidrofobitási index (B) a fehérjét, azaz a P35 és P39 közötti régióban. Ez tekinthető egy hidrofób mag-kezdeménynek is.

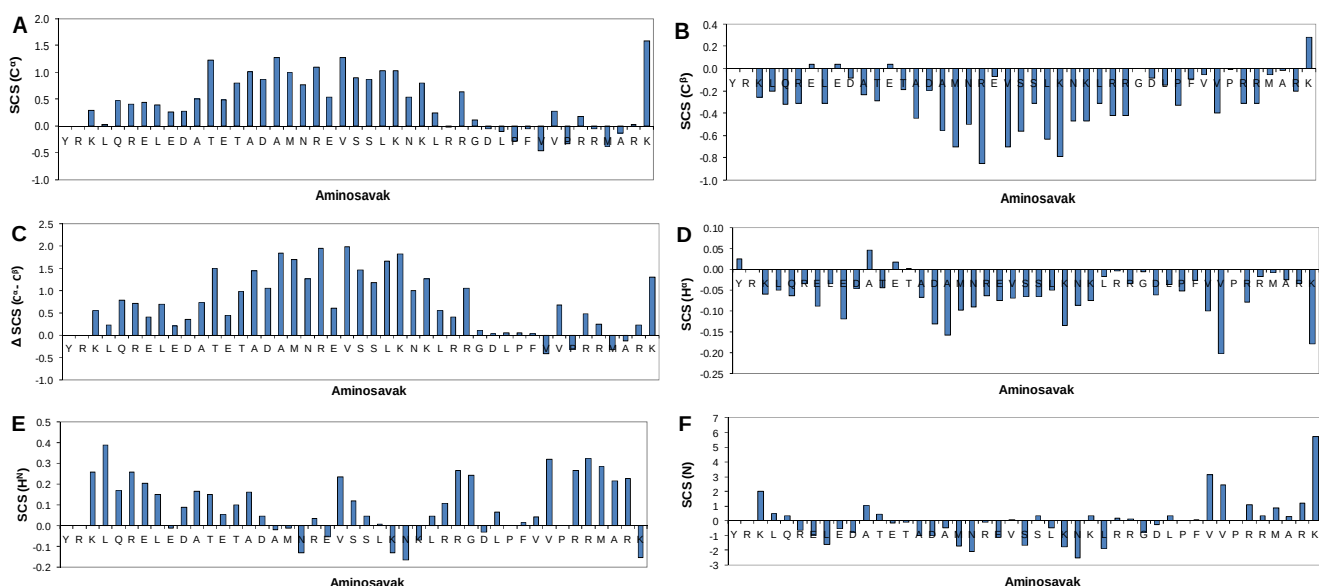
5.1.4. A másodlagos kémiai eltolódás értékek

A térszerkezet vizsgálatához hasznos információt szolgáltatnak a másodlagos kémiai eltolódás értékek (secondary chemical shifts, rövidítve SCS). Ezeket a következőképpen lehet kiszámítani a kémiai eltolódásokból adott atom esetében:

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

ahol δ_m a mért eltolódás érték, δ_{rc} pedig a random coil, azaz tökéletesen rendezetlennek tekintett fehérjében mért eltolódás érték. A random coil értéket közvetlenül nem lehet mérni – ezt különböző módokon szokták kiszámolni. Jelen munkában a Wishart és mtsai⁴¹ által leírt módszert vettük alapul (Braun és mtsai⁴² által leírt korrekció figyelembe vételével). Az SCS értékek a C^α -, C^β -, H^α -, H^N - (amid H) és amid N-atomokra, valamint a ΔSCS ($C^\alpha - C^\beta$) értékek a szekvencia függvényében a **8. ábrán** láthatók. Az SCS értékekből megállapítható, hogy a fehérje rendezetlen, ugyanis rendezett fehérje esetében az SCS értékek átlagosan több egység nagyságrendűek (2-6 ppm közötti érték), míg az MIIA-fragmens esetében átlagosan 1 ppm alattiak, vagyis a random coil értékekhez közel esnek.

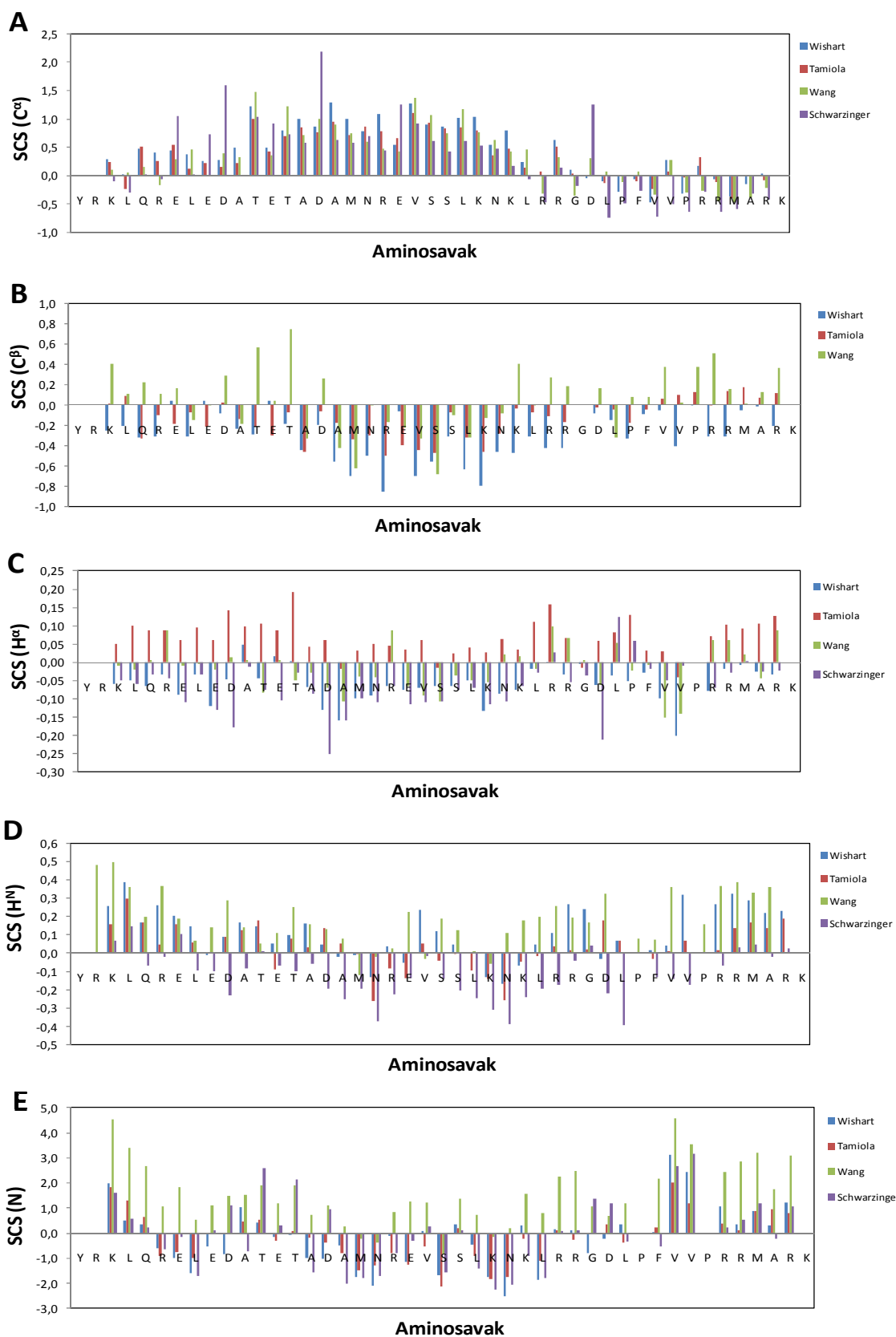
Az SCS értékek elemzéséből kiderült, hogy az MIIA-fragmens középső régiójában, az A11-R31 aminosavak közti régióban mutat egyfajta részleges rendezettséget, amelyet inherens helicitásnak hívhatunk. Az SCS értékek mind a C^α -, mind a C^β -, mind a H^α -atomokra számítva, valamint ebből következően a ΔSCS ($C^\alpha - C^\beta$) értékek ebben a régióban az átlagosnál nagyobb abszolút értékűek (C^α és ΔSCS ($C^\alpha - C^\beta$) esetében pozitív, C^β és H^α esetében pedig negatív értékűek). Ez arra utal, hogy ebben a régióban α -hélix szerkezet folyamatos fel- és leépülése történik dinamikusan, ami előremutat arra a szerkezetre, amelyet a fragmens felvesz az S100A4-gyel képzett komplexben. Ez a jelenség arra enged következtetni, hogy bizonyos esetekben a rendezetlen fehérjék mégsem teljesen rendezetlenek, hanem (legalábbis NMR segítségével) kimutathatók bennük részlegesen rendezett régiók, amelyek a komplexképződésben felvett határozott térszerkezetre hasonlítanak. Feltételezhető tehát, hogy ebből a régióból indul ki a fragmens α -hélix szerkezetté alakulása a komplexképződés során.



8. ábra: Az MIIA-fragmens SCS értékei a C^α - (A), a C^β - (B), a H^α - (D), a H^N - (E) és az amid N- (F) atomokra, valamint a ΔSCS ($C^\alpha-C^\beta$) értékei (C) a szekvencia függvényében. Az A-D diagramokból megállapítható az inherens helicitás (dinamikusan fel- és leépülő hélixszerkezet) jelenléte a fragmens A11-R31 közötti régiójában.

5.1.5. A különböző módszerekben használatos random coil-értékek összevetése

Az SCS-értékek kiszámításához többféle random coil érték használatos, amelyeket különböző módon kapnak meg. Ezek összehasonlítása végett a Wishart és mtsai^{41,42}, a Tamiola és mtsai⁴³, a Wang és mtsa⁴⁴, valamint a Schwarzsinger és mtsai⁴⁵ által leírt módszer alapján kiszámítottuk az MIIA-fragmens SCS értékeit (C^α -, C^β -, H^α -, H^N - és amid N-atomokra). A kapott értékek a szekvencia függvényében a **9. ábrán** láthatók. A Schwarzsinger-féle módszer nem használható a C^β -atomokra, ezért ebben az esetben nincsenek SCS értékek. A diagramokból kiderült, hogy egyes esetekben némely módszer eltér a többitől: a C^β -atomokat tekintve a Wang-féle (sok esetben ellentétes az előjele is) és a H^α -atomokat tekintve a Tamiola-féle (szintén sok esetben ellentétes az előjele) módszer. A Schwarzsinger-féle módszerben mind a C^α -, mind a H^α -atomokra vonatkozóan érdekes módon az aszparaginsav esetében a többi módszertől jelentősen eltérő, kiugró értéket kapunk. A H^N - és N-atomok esetében nem egyezik mindenhol az előjel, de a tendencia igen hasonló minden módszer esetében. Az előjelbeli különbségek egy konstanssal való eltolásnak lehetnek az eredményei, ezért a tendencia fontosabb az előjelnél. Összegezve megállapíthatjuk, hogy az általunk használt Wishart-féle módszer megfelelő minden atomra, mivel ezzel számolva minden esetben az átlagos értékek körüli értéket kapunk.

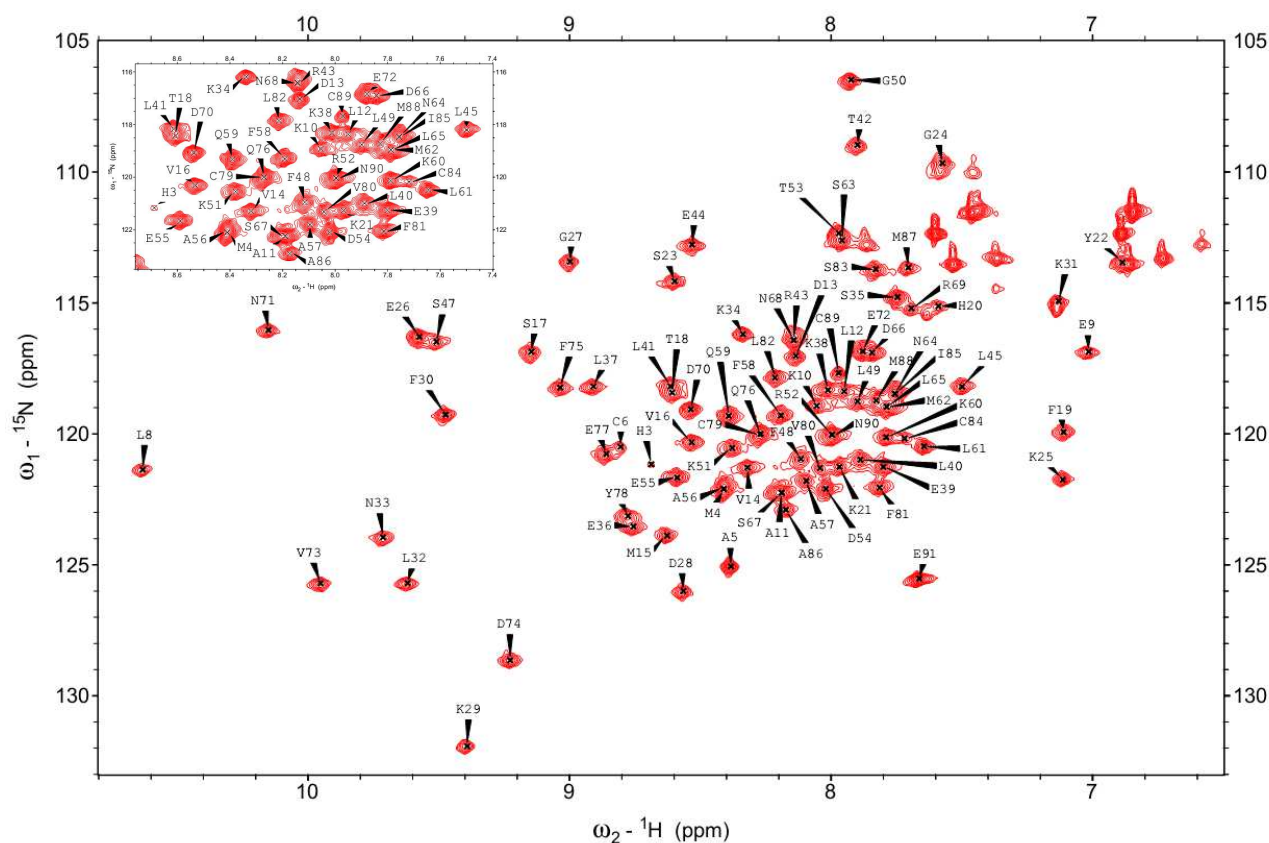


9. ábra: Négyféle random coil érték kiszámítási módszerének összevetése: a Wishart-féle^{41,42}, a Tamiola-féle⁴³, a Wang-féle⁴⁴ és a Schwarzingger-féle⁴⁵ módszerekkel kiszámított SCS értékek az MIIA-fragmensre a C^α , C^β , H^α , H^β és amid N-atomok esetében. Az általunk használt Wishart-féle módszer mindig az átlagos értékek közelében van, tehát megbízhatóan használható minden atomra.

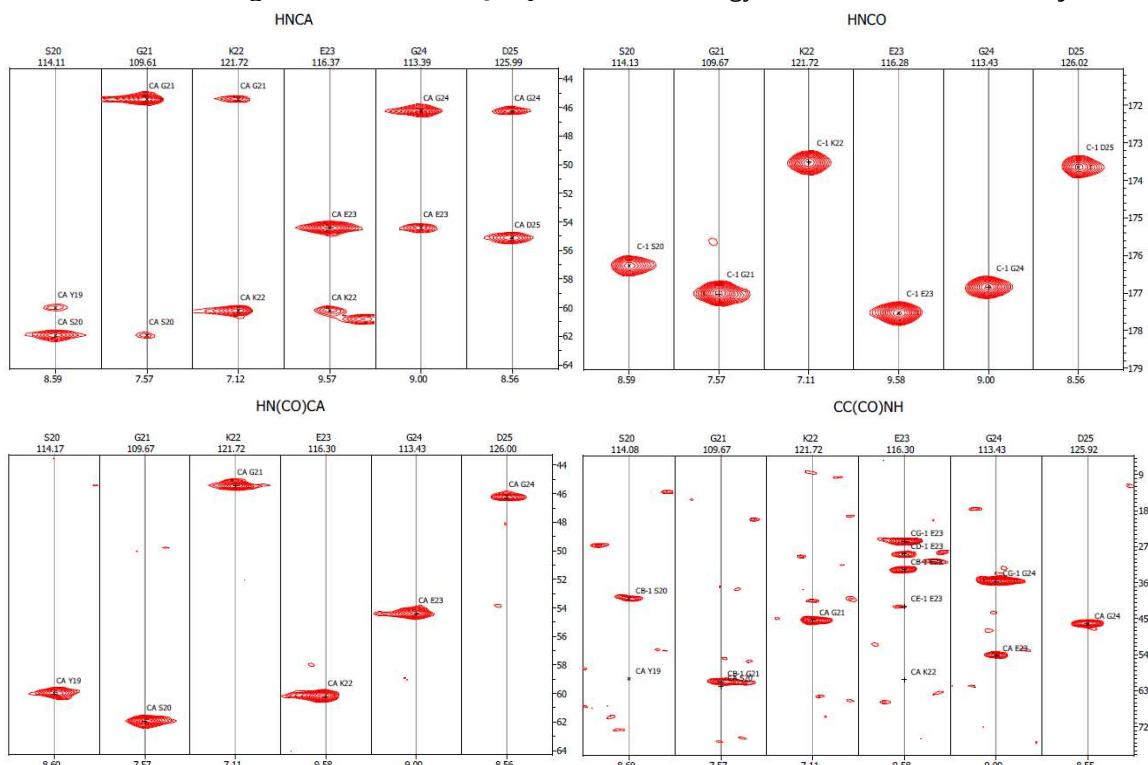
5.2. Az S100A4 vizsgálata

5.2.1. Az asszignáció eredménye

Az asszignációt sikeresen elvégeztem. Az asszignált 2D ^1H - ^{15}N HSQC spektrum a **10. ábrán** látható, a háromdimenziós spektrumokból készített stripek egy-egy részlete pedig a **11. ábrán**. Teljes asszignációra nem volt szükség, ezért az oldalláncok esetében csak a C-atomok eltolódásait határoztam meg (ez is csak a 2D ^1H - ^{15}N HSQC keresztcsúcsok asszignációjához szükséges). Az első két aminosav (G-2 és S-1) és a prolinok (P4 és P43) ebben az esetben sem adnak jelet a 2D ^1H - ^{15}N HSQC spektrumon. A 3D CC(CO)NH spektrumon egyes jelek (sok esetben a C^α -jelek) kis intenzitással vagy egyáltalán nem jelennek meg. A spektrumra jellemző, hogy sokszor több jel egybe esik vagy nagyon közel van egymáshoz. A 2D ^1H - ^{15}N HSQC spektrumon több jel van, mint amennyit az S100A4d13 aminosav-szekvenciája alapján várnánk. E néhány extra jel származhat az expresszió során keletkezett, a fehérje mellett az oldatban maradt szennyező anyagból is, amelyeket a tisztítás során nem lehetett eltávolítani. Az S100A4 rendezett térszerkezetét mutatja az a tény, hogy a 2D ^1H - ^{15}N HSQC spektrumon mindkét dimenzióban sokkal szélesebb tartományban helyezkednek el a keresztcsúcsok, mint a rendezetlen MIIA-fragmens esetében (H-dimenzióban 3,746 ppm, N-dimenzióban 25,440 ppm a legnagyobb és legkisebb eltolódás különbsége).



10. ábra: Az S100A4 asszignált 2D ^1H - ^{15}N HSQC spektruma. A kinagyított részen az összecsúszó jelek láthatók.

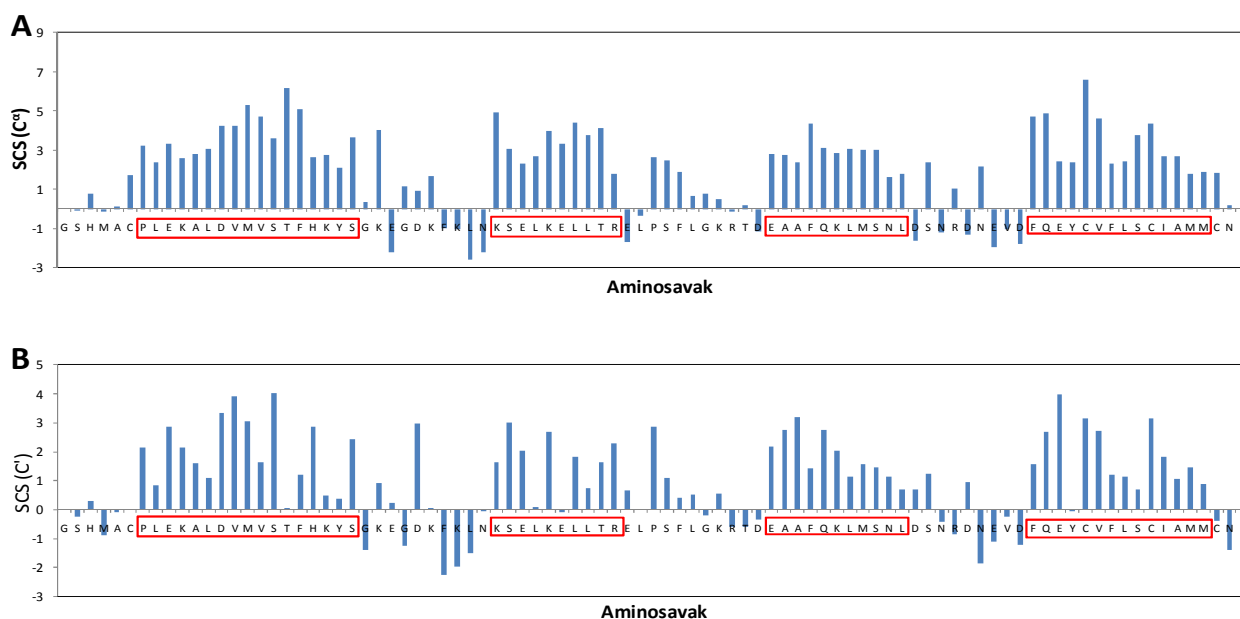


11. ábra: Az S100A4 asszignációjának S20-D25 közötti részlete a 3D HNCA, 3D HN(CO)CA, 3D HNCO, 3D CC(CO)NH spektrumok alapján. A stripek sorba állítása a 3D HNCA és 3D HN(CO)CA spektrumok alapján végezhető el. A 3D HNCA spektrumon látható, hogy az egymást megelőző stripeken az azonos jelek megtalálhatók (C^α jelek). A 3D CC(CO)NH spektrumon megfigyelhető, hogy a C^α -jelek gyakran nem jelennek meg (a 3D HN(CO)CA spektrum alapján várható helyük be van jelölve a stripeken).

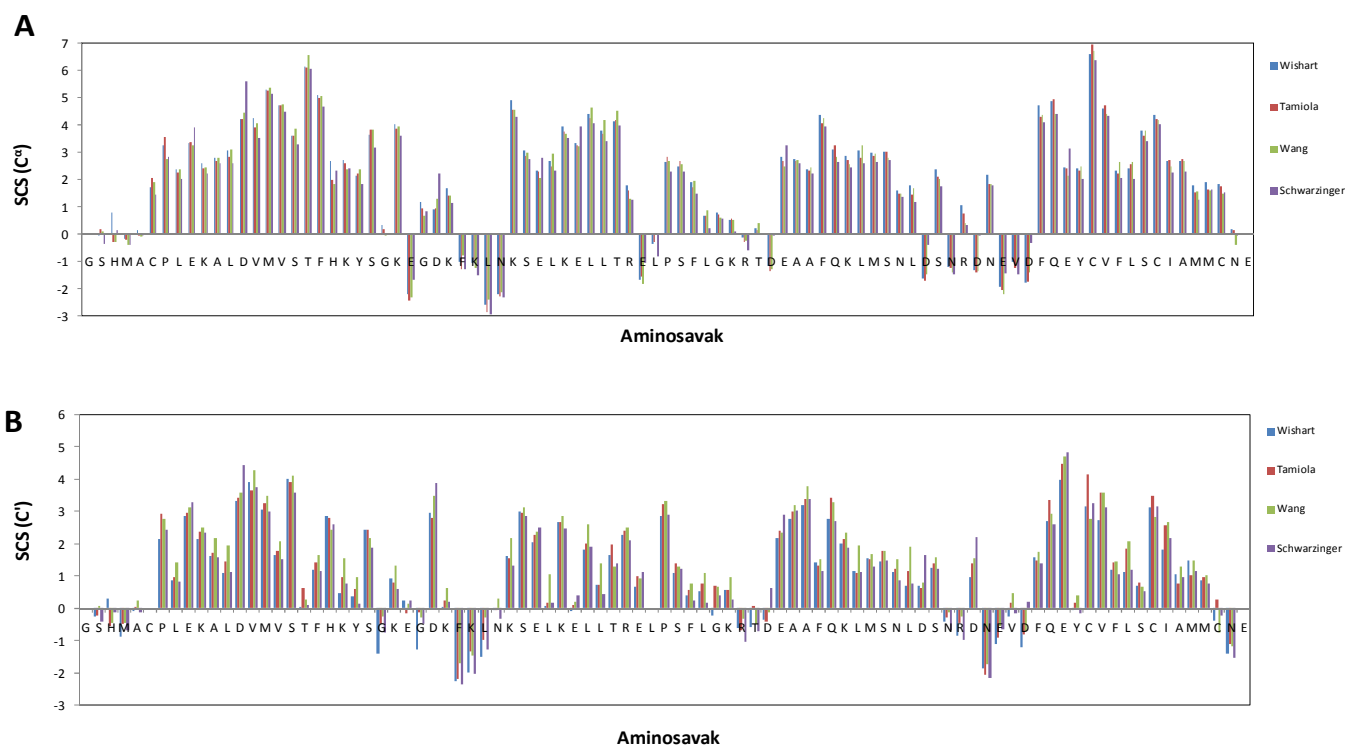
5.2.2. A másodlagos kémiai eltolódás értékek és az S100A4 térszerkezete

A spektrumok asszignációja után az S100A4 jeleire is kiszámítottuk az SCS értékeket (12. ábrán láthatók). Itt is a Wishart-féle módszert^{41,42} alkalmaztuk a random coil értékek kiszámítására. Ebben az esetben csak a C α -atomokra és a karbonil C-atomokra (C'-atomokra) kiszámított SCS értékek informatívak, ezért csak ezek szerepelnek az ábrán. Az SCS értékek a négy α -hélix (H1-H4) régiójában az átlagosnál nagyobb értékűek (2-6 ppm), míg a köztes régiókban akár negatív értékűek is lehetnek. Az így módon kijelölt α -hélix-tartományok jól egyeznek az irodalomban korábban leírt szerkezetekkel^{25,27,32}.

A C α - és C'-atomokra kiszámítottuk a korábban leírt másik három módszerrel is az SCS értékeket (13. ábra). Megállapítható, hogy rendezett szerkezet esetén a különböző számítási módszerekkel kapott random coil értékekből számított SCS értékek releváns módon nem különböznek egymástól. Ennek oka lehet, hogy az SCS értékek abszolút értéke jóval nagyobb, átlagosan többszöröse a rendezetlen szerkezet esetén kapott SCS értékeknek, ezért a random coil értékek kis különbsége kevésbé jelentékeny a rendezett esetben. Megjegyzendő, hogy a Schwarzsinger-féle módszer esetében az aszparaginsavnál ismét kiugró értékeket kapunk.



12. ábra: Az S100A4 SCS értékei a C α - (A) és a C'- (B) atomokra. A pirossal bekeretezett régiók a négy α -hélixet jelentik (H1-H4), amelyek határait a két diagram összevetéséből határoztunk meg. Az így kijelölt α -hélix régiók jó egyezést mutatnak az irodalomban már leírt térszerkezetekkel^{25,27,32} (néhol van csak néhány aminosav eltérés, ami az eltérő mérési körülményekre tekintettel könnyen értelmezhető).



13. ábra: Az S100A4 SCS értékei C α - (A) és C'- (B) atomokra kiszámítva Wishart-féle^{41,42}, a Tamiola-féle⁴³, a Wang-féle⁴⁴ és a Schwarzsinger-féle⁴⁵ módszerekkel. A négy módszer ebben az esetben, tehát rendezett fehérje esetén hasonló eredményt ad. Ennek oka lehet az is, hogy a random coil értékekben megjelenő különbség jelentősen kisebb az SCS érték abszolút értékénél ebben az esetben.

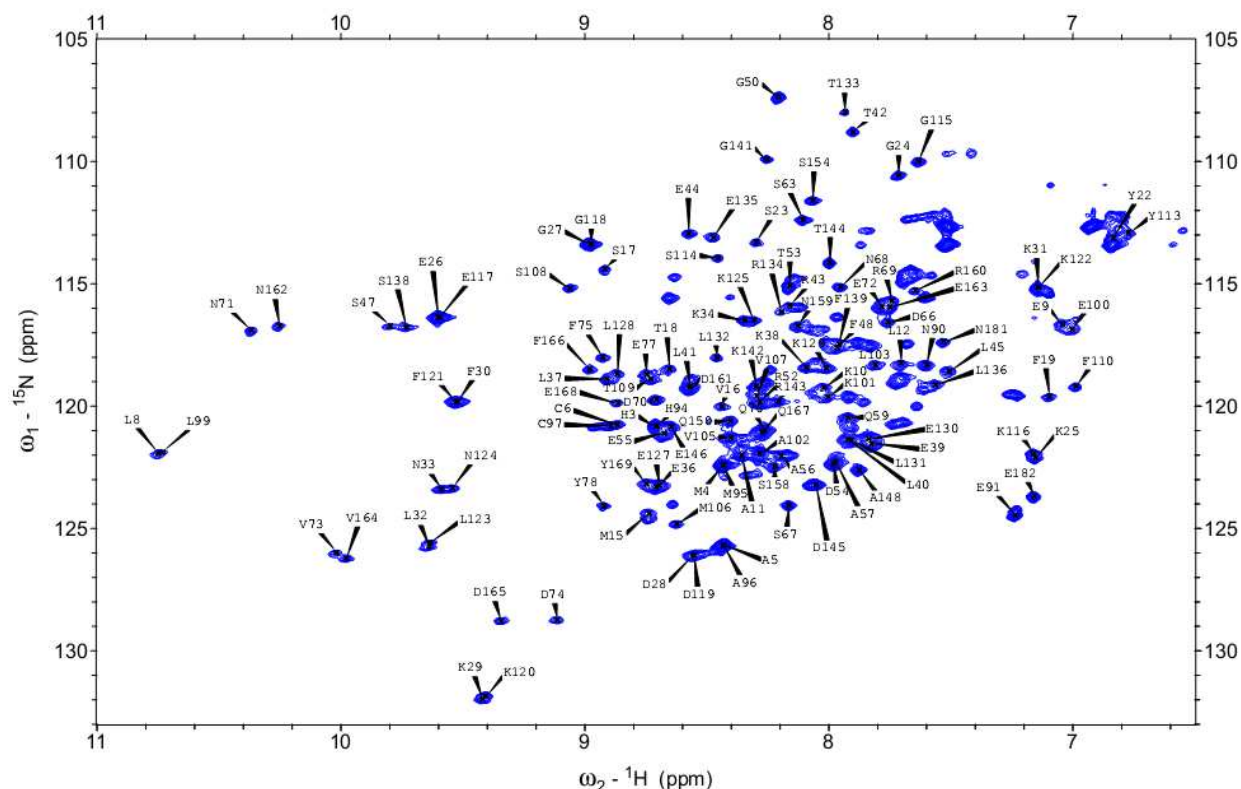
5.3. Az MIIA-S100A4 komplex vizsgálata

5.3.1. Az asszignáció eredménye

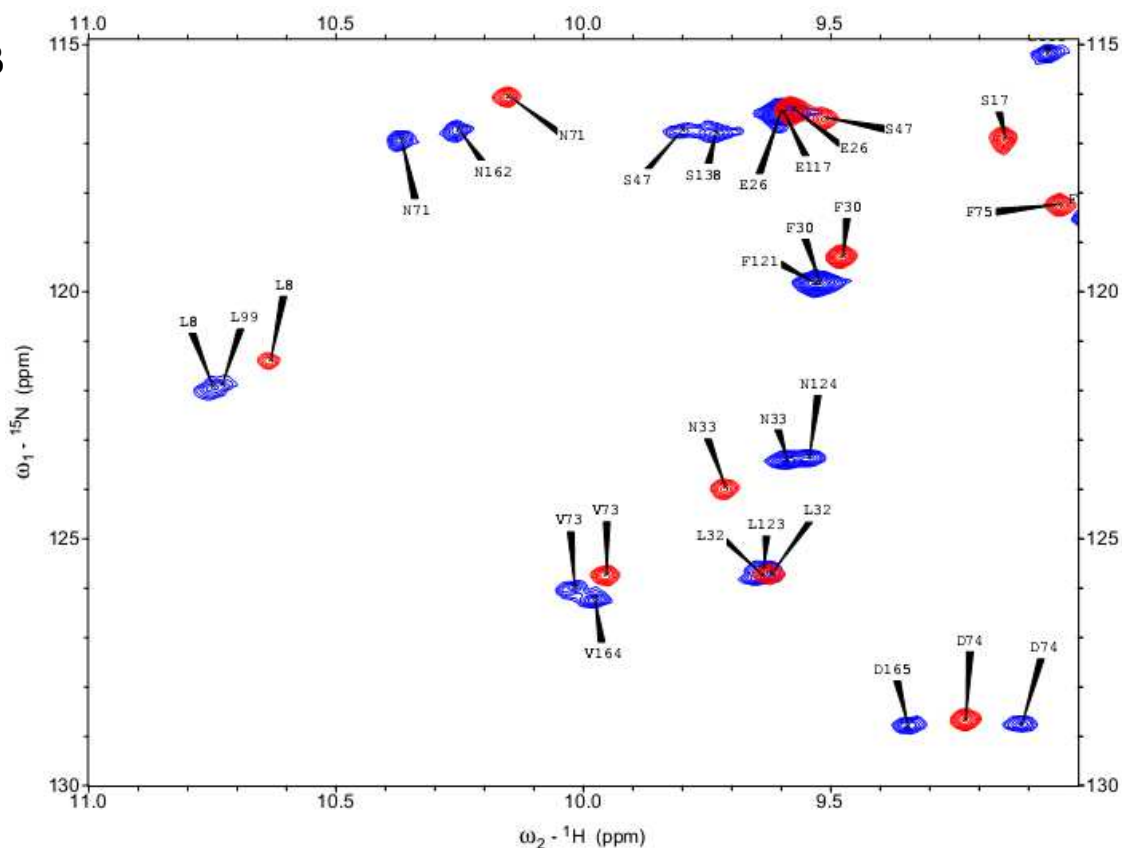
A komplex asszignációját elvégeztem a mért négy spektrum alapján (2D ^1H - ^{15}N HSQC, 3D HNCA, 3D HNCO, 3D CC(CO)NH). Ezekből az amid H- és N-atomok mellett a C'- és a C $^\alpha$ -atomok eltolódásait lehetett meghatározni. A 3D CC(CO)NH spektrum jelei néhol nagyon kis intenzitásúak vagy nem jelennek meg (C $^\alpha$ -atomok jelei a szabad S100A4-hez hasonlóan gyakran nem jelennek meg). A **14. ábrán** látható asszignált 2D ^1H - ^{15}N HSQC spektrumon megfigyelhető a jelkettőződés, ami az aszimmetrikus komplex képződésének következménye. A homodimer két tagja (az A- és a B-lánc) ugyanis különböző kémiai környezetbe kerül, mivel az MIIA-fragmens két különböző régiója kötődik a két kötőhelyre. A csúcsok 1–91. között az A-lánchoz, 91–182. között pedig a B-lánchoz tartoznak. Néhány aminosav nem jelenik meg a spektrumon, ezek jelei valószínűleg a komplexképződés következtében kiszélesedtek (a várt, összesen 182 jelnél kevesebb van a spektrumon). A jelek nagy részét sikerült asszignálni, amelyiket nem, azokat további spektrumok felvételével lehet egyértelműen meghatározni a későbbiekben. Az asszignációt a szabad állapotú S100A4 eltolódásainak ismerete megkönnyíti. A **15. ábrán** a háromdimenziós spektrumokból készített stripek egy-egy részlete látható, amelyek a két lánc egy párhuzamos szakaszából készültek.

Az asszignáció egyik nehéz feladata a komplex esetében, hogy eldöntsük adott aminosavhoz tartozó jelpár esetében, hogy melyik tartozik az A-lánchoz és melyik a B-lánchoz. Ez abban az esetben könnyebb, amikor a C $^\alpha$ -jelek eltolódásai különböznek, akár kis mértékben. Ekkor ugyanis az egymást követő aminosavak egymáshoz köthetők, így az egy lánchoz tartozó aminosavak meghatározhatók. A prolinok és minden meg nem jelenő vagy nem asszignált aminosav esetében viszont megtörik ez a lánc, ezért nem mondható ki egyértelműen, hogy a megfelelő lánc-részleteket kapcsoltuk össze. Továbbá sok esetben a C $^\alpha$ -jelek eltolódásai is egybeesnek, ekkor még bizonytalanabb, hogy melyik lánchoz melyik jel tartozik. Ezekben az esetekben az irodalomban leírt értékek alapján²⁸ döntöttem el, hogy melyik lánchoz tartozik az adott jel. Viszont azt is meg kell jegyezni itt, hogy az Elliott és mtsai által közölt asszignáció esetében sem derül ki, hogyan döntötték el, hogy melyik jel melyik lánchoz tartozik.

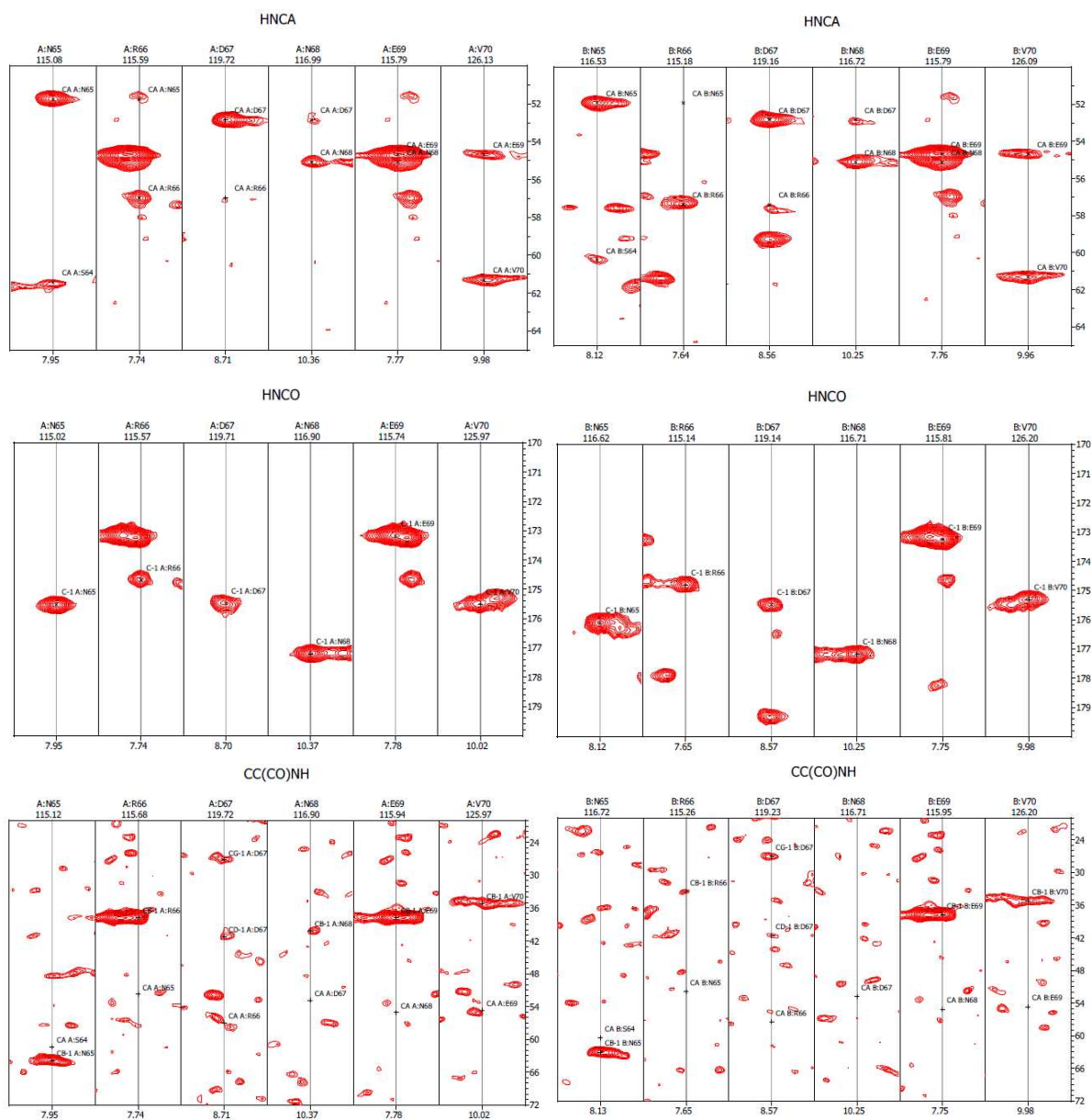
A



B



14. ábra: A komplex 2D ^1H - ^{15}N HSQC spektruma (A). Az A-lánc az 1-91. sorszámú keresztcsúcsok, a B-lánc a 91-182. sorszámú keresztcsúcsok. Alul szabad állapotú S100A4 (piros) és a komplexben lévő S100A4 (kék) egymásra illesztett 2D ^1H - ^{15}N HSQC spektrumainak egy részlete látható (B). A HSQC jelek a komplex aszimmetrikus volta miatt megkettőződnek.



15. ábra: Az S100A4 MIIA-fragmenssel alkotott komplexbeli asszignációjának N65-V70 közötti részlete mind az A-, mind a B-lánc esetében (a bal oldali ábrák az A-lánc, a jobb oldali ábrák a B-lánchoz tartoznak). A mért háromdimenziós spektrumok: 3D HNCA, 3D HNCB, 3D CC(CO)NH. A 3D HNCA spektrumon itt is látható, hogy az egymást megelőző stripeken az azonos jelek megtalálhatók (C^α jelek). A 3D CC(CO)NH spektrumon megfigyelhető, hogy a C^α -jelek gyakran nem jelennek meg a szabad állapotú S100A4 esetében tapasztaltakhoz hasonlóan.

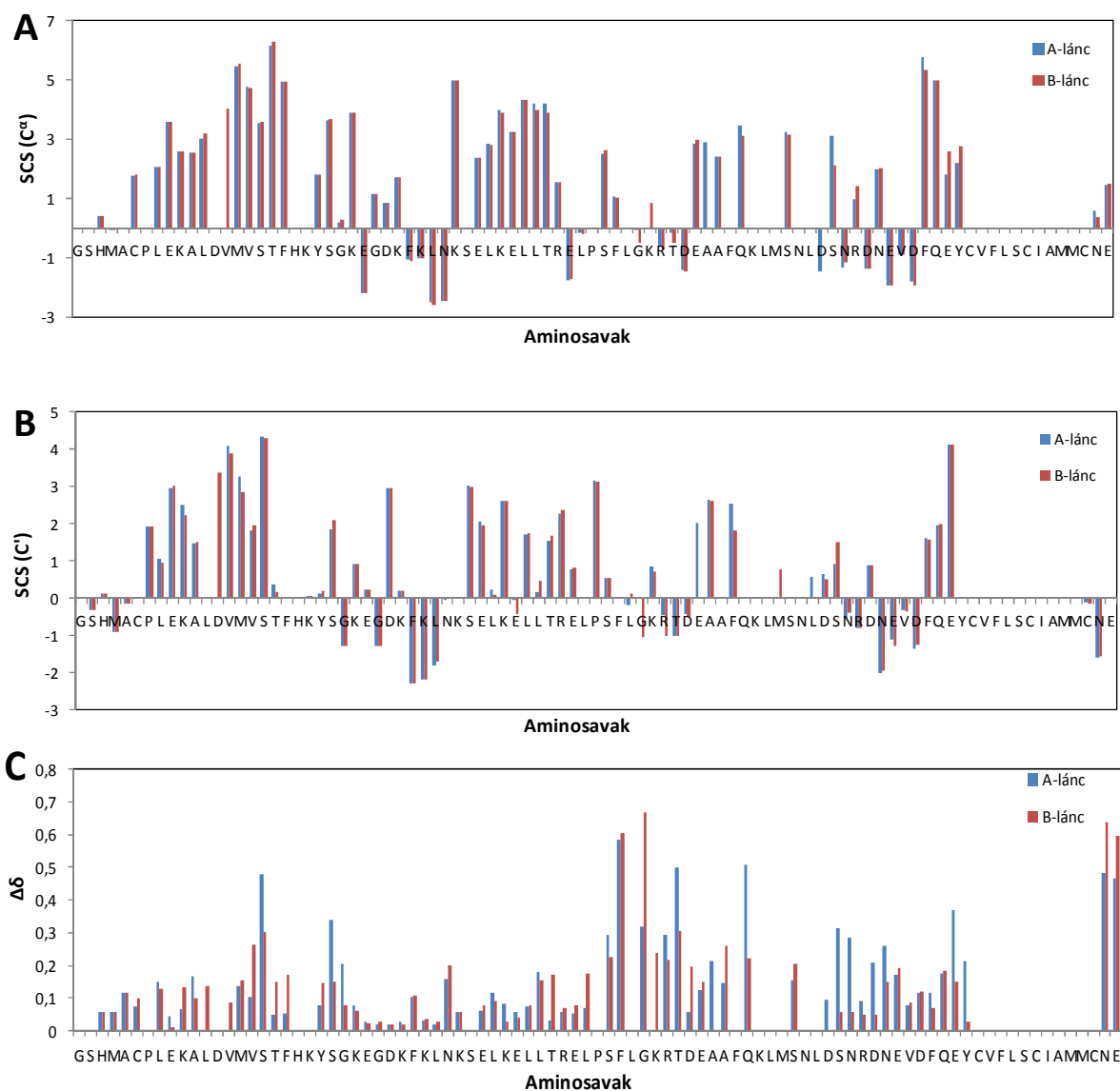
5.3.2. A másodlagos kémiai eltolódás értékek és a komplex térszerkezete

A komplexbeli S100A4 C^α- és C'-atomjaira is kiszámítottuk a másodlagos kémiai eltolódás értékeket. A két láncot egy diagramon ábrázoltuk az aminosav-szekvencia függvényében (**16A. és 16B. ábra**). Itt is a Wishart-féle módszert^{41,42} alkalmaztuk a random coil értékek kiszámítására. A két lánc SCS értékei közel esnek egymáshoz. A négy hélix ebben az esetben is kimutatható az átlagosnál nagyobb SCS értékű régiókban.

Érdekes megvizsgálni a szabad állapothoz képest történt változást a 2D ¹H-¹⁵N HSQC spektrum eltolódás értékeiben. Ezt a következő képlet értelmében egy számmal lehet jellemezni a H- és N-dimenziók esetében:

$$\Delta\delta = \sqrt{[\delta(N_{\text{komplex}}) - \delta(N_{\text{szabad}})]^2 + [0,17 \{ \delta(H_{\text{komplex}}) - \delta(H_{\text{szabad}}) \}]^2}.$$

Ezt a $\Delta\delta$ -értéket minden aminosavra kiszámítottuk mindkét láncra, és az aminosav-szekvencia függvényben ábrázoltuk (**16C. ábra**). Ebből megállapítható, hogy a molekula C-terminális régiója szenved nagyobb kémiai környezet-változást mindkét lánc esetében, mivel az eltolódások ebben a régióban változnak meg legnagyobb mértékben. Ez teljes összhangban van azzal, hogy az S100A4-molekula kötőhelyét az L2 hurok, a H3 és a H4 hélixek képezik, tehát az MIIA-fragmens is ide kötődik mindkét lánc esetében.



16. ábra: Az S100A4 MIIA-fragmenssel alkotott komplexbeli két láncára számított SCS értékek az aminosav-szekvencia függvényében a C α - (A) és a C'- (B) atomokra. A C ábrán az amid H- és amid N-atomokra vonatkozó összesített eltolódás-változás értékek láthatók mindkét láncra. A HSQC jelek a kötőhelynél, azaz az L2 hurok, H3 és H4 hélixnél változnak meg leginkább a komplex képződése miatt.

6. Összefoglalás

Az S100A4 egy kalciumkötő homodimer fehérje, az S100 fehérjék családjából. A nemizom-miozin IIA-val alkotott intracelluláris komplexe feltételezhetően kulcsszerepet játszik a tumor metasztázis kialakulásában. Munkánk során ezt a komplexet vizsgáltuk NMR-rel. A nemizom-miozin IIA egy 45 aminosavból felépülő ^{13}C - ^{15}N -jelölt és ^{15}N -jelölt fragmenséről (MIIA), majd a szabad állapotú ^{13}C - ^{15}N -jelölt S100A4d13 molekuláról (az S100A4 C-terminális végéről 13 aminosav levágásával készült fragmens), végül a ^{13}C - ^{15}N -jelölt S100A4d13 jelöletlen MIIA-val alkotott komplexéről vettünk fel 2D és 3D heteronukleáris NMR-spektrumokat, amelyeket asszignáltam. Mindegyik esetben kiszámítottuk a másodlagos kémiai eltolódás értékeket (SCS) is különböző atomokra.

Az MIIA-fragmens teljes asszignációjából, az SCS értékek elemzéséből, valamint a 2D ^1H - ^{15}N HSQC spektrum hőmérséklet-függésének vizsgálatából egyértelműen bizonyítható, hogy ez a 45 aminosavból felépülő fragmens IUP-fehérje, azaz rendezetlen térszerkezetű – a szekvencia alapján várható módon. Az SCS értékek elemzése rámutatott, hogy a fragmens középső (az A11-R31 aminosavak közötti) régiójában inherens helicitás, azaz dinamikus fel- és leépülő α -hélix szerkezet mutatható ki, ami előremutat az MIIA komplexben felvett térszerkezetére. Ez a jelenség újdonság a rendezetlen szerkezetű fehérjék körében, amely csak NMR-rel vizsgálható.

Az SCS értékek kiszámításához többféle módon definiálják az irodalomban a random coil eltolódási értékeket. Ezek közül többet összevetettünk, és arra a következtetésre jutottunk, hogy az általunk használt Wishart-féle módszer megbízható.

Az S100A4 asszignációját is elvégeztem. Az eltolódások és az SCS értékek elemzéséből kimutatható, hogy ez rendezett térszerkezetű, s az irodalomból ismert térszerkezetében szereplő négy α -hélix is kimutatható.

Az S100A4 MIIA-fragmensével alkotott komplexe szokatlan módon aszimmetrikus komplex, tehát az S100A4-homodimer két lánc egy molekula MIIA-val alkot komplexet. Emiatt a két lánc eltérő kémiai környezetbe kerül, és ezt az NMR egyértelműen kimutatja: a 2D ^1H - ^{15}N HSQC spektrumon megkettőződnek a jelek. Ezen jeleket is asszignáltam munkám során. A komplexkötődés helyét is kimutattam az eltolódás értékek megváltozásainak elemzéséből.

Az asszignációk eredményesek voltak, tehát ezek alapján el tudjuk kezdeni a dinamika vizsgálatát, ami a komplex képződéséről és szerkezetéről újabb információkat fog szolgáltatni.

7. Summary

S100A4 is a homodimeric calcium-binding protein from the family of S100 proteins. Its intracellular complex formed with nonmuscle myosin IIA plays a key role in the development of tumor metastasis. In the present study we investigated the properties of this complex by NMR spectroscopy. 2D and 3D heteronuclear NMR spectra of a 45 amino acid fragment of nonmuscle myosin IIA (MIIA), the S100A4 molecule and the complex of labeled S100A4 with unlabeled MIIA were recorded and were subsequently assigned. Based on the full assignment of the MIIA fragment, the analysis of secondary chemical shifts and the temperature dependence of the 2D ^1H - ^{15}N HSQC spectrum, it is unambiguously shown that this 45 amino acid fragment is unstructured in solution. Examination of the SCS values indicated that the central stretch of the fragment (amino acids A11 to R31) possesses inherent helicity manifesting in dynamical build-up and breakdown of alpha-helical structure, which is indicative of its structure in the complex formed with S100A4. We have also carried out the comparison of different random coil parameters used for the calculation of the SCS values. Analysis of the chemical shifts from the assignment of the S100A4 spectrum and the SCS values revealed that this protein has a distinct tertiary structure, and the four alpha-helices known from the published structure were fully resolved. The complex formed by S100A4 and MIIA is surprisingly an asymmetric one in the sense that the two chains of the homodimeric S100A4 form a ternary complex with a single MIIA molecule. Therefore the two chains are in different chemical environments, what is unequivocally demonstrated by NMR: signal duplication can be seen in the 2D ^1H - ^{15}N HSQC spectrum. These signals were also assigned in the present work. The location of complex formation is also revealed from the analysis of the chemical shift changes. On the basis of the assignment the investigation of protein dynamics can be undertaken, which will provide further insight into the mechanism of complex formation and the structure of the complex formed.

8. Köszönetnyilvánítás

Szeretném köszönetemet és hálámat kifejezni mindennek előtt a Mindenhatónak, Aki nemcsak létrehozott, hanem fenn is tartott mindeddig, és Aki e munkám megírásában is megsegített.

Nagyon hálás vagyok témavezetőm, Dr. Bodor Andrea hasznos szakmai tanácsaiért és bátorításáért. Munkám segítségével fektetett ideje és energiája pótolhatatlan segítséget jelentett.

Köszönettel tartozom Dr. Perczel Andrásnak, az ELTE Szerkezeti Kémia és Biológia Laboratóriumát vezető professzorának, hogy csoportjában dolgozhatok, valamint a csoport többi tagjainak is mindennemű segítségért hálás vagyok.

Köszönöm Dr. Nyitray Lászlónak és Kiss Bencének, az ELTE Motorfehérje Szerkezeti Biológiai Kutatócsoportja vezetőjének és doktoranduszának az együttműködés lehetőségét, valamint az általuk előállított fehérjéket, amelyeket NMR-rel vizsgáltunk.

Köszönöm továbbá Riskó Áron barátomnak jelen munka szövegének stilisztikai, nyelvi áttekintését és a megfogalmazásban nyújtott segítségét, valamint Vass Mártonnak az angol összefoglaló megírásában adott segítségét.

A kutatás a TÁMOP 4.2.4.A/1-11-1-2012-0001 azonosító számú „Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése országos program” című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

9. Hivatkozások jegyzéke

- ¹ Embralidze, A., Tulchinsky, E., Grigorian, M., Afanasyeva A., Senin, V., Revazova, E., Lukanidin, E. „Isolation and characterization of a gene specifically expressed in different metastatic cells and whose deduced gene product has a high degree of homology to a Ca²⁺-binding protein family” *Genes Dev.* **3**, 1989.: 1086-1093.
- ² Nikitenko, L. L., Lloyd, B. H., Rudland, P. S., Fear, S., Barraclough, R. „Localisation by in situ hybridisation of S100A4 (p9Ka) mRNA in primary human breast tumour specimens” *Int. J. Cancer* **86**, 2000.: 219-228.
- ³ Platt-Higgins, A. M., Renshaw, C. A., West, C. R., Winstanley, J. H., De Silva Rudland, S., Barraclough, R., Rudland, P. S. „Comparison of the metastasis-inducing protein S100A4 (p9ka) with other prognostic markers in human breast cancer” *Int. J. Cancer* **89**, 2000.: 198-208.
- ⁴ Grigorian, M., Ambartsumian, N., Lykkesfeldt, A. E., Bastholm, L., Elling, F., Georgiev, G., Lukanidin, E. „Effect of mts1 (S100A4) expression on the progression of human breast cancer cells” *Int. J. Cancer* **67**, 1996.: 831-841.
- ⁵ Maelandsmo, G. M., Hovig, E., Skrede, M., Engebraaten, O., Florenes, V. A., Myklebost, O., Grigorian, M., Lukanidin, E., Scanlon, K. J., Fodstad, O. „Reversal of the in vivo metastatic phenotype of human tumor cells by an anti-CAPL (mts1) ribozyme” *Cancer Res.* **56**, 1996.: 5490-5498.
- ⁶ Ambartsumian, N. S., Grigorian, M. S., Larsen, I. F., Karlstrom, O., Sidenius, N., Rygaard, J., Georgiev, G., Lukanidin, E. „Metastasis of mammary carcinomas in GRS/A hybrid mice transgenic for the mts1 gene” *Oncogene* **13**, 1996.: 1621-1630.
- ⁷ Schneider, M., Hansen, J. L., Sheikh, S. P. „S100A4: a common mediator of epithelial-mesenchymal transition, fibrosis and regeneration in diseases?” *J. Mol. Med.* **86**, 2008.: 507-522.
- ⁸ Grigorian, M., Ambartsumian, N., Lukanidin, E. „Metastasis-inducing S100A4 protein: implication in non-malignant human pathologies” *Curr. Mol. Med.* **8**, 2008.: 492-496.
- ⁹ Moore, B. „A soluble protein characteristic of the nervous system” *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **19**, 1965.: 739-744.

- ¹⁰ Heizmann, C. W., Cox, J. A. „New perspectives on S100 proteins: a multi-functional Ca(2+)-Zn(2+)- and Cu(2+)-binding protein family” *Biometals* **11**, 1998.: 383-397.
- ¹¹ Donato, R. „S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles” *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **33**, 2001.: 637-668.
- ¹² Donato, R. „Intracellular and extracellular roles of S100 proteins” *Microsc. Res. Tech.* **60**, 2003.: 540-551.
- ¹³ Emberley, E. D., Murphy, L. C., Watson, P. H. „S100 proteins and their influence on pro-survival pathway in cancer” *Biochem. Cell Biol.* **82**, 2004.: 508-515.
- ¹⁴ Kriajevska, M.V., Cardenas, M. N., Grigorian, M. S., Ambartsumian, N. S., Georgiev, G. P., Lukanidin, E.M. „Non-muscle myosin heavy chain as a possible target for protein encoded by metastasis-related mts-1 gene” *J. Biol. Chem.* **269(31)**, 1994.: 19679-19682.
- ¹⁵ Takenaga, K., Nakamura, Y., Sakiyama, S., Hasegawa, Y., Sato, K., Endo H. „Binding of pEL98 protein, an S100-related calcium-binding protein, to nonmuscle tropomyosin” *J. Cell Biol.* **124(5)**, 1994.: 757-768.
- ¹⁶ Watanabe Y, Usada, N., Minami, H., Morita, T., Tsugane, S., Ishikawa, R., Kohama, K., Tomida, Y., Hidaka, H. „Calvasculin, as a factor affecting the microfilament assemblies in rat fibroblasts transfected by src gene” *FEBS Lett.* **324(1)**, 1993.: 51-55.
- ¹⁷ Kriajevska M, Fischer-Larsen, M., Moertz, E., Vorm, O., Tulchinsky, E., Grigorian, M., Ambartsumian, N., Lukanidin, E. „Liprin beta 1, a member of the family of LAR transmembrane tyrosine phosphatase-interacting proteins, is a new target for the metastasis-associated protein S100A4 (Mts1)” *J. Biol. Chem.* **277(7)**, 2002.: 5229-5235.
- ¹⁸ Grigorian, M., Andresen, S., Tulchinsky, E., Kriajevska, M., Carlberg, C., Kruse, C., Cohn, M., Ambartsumian, N., Christensen, A., Selivanova, G., Lukanidin, E. „Tumor suppressor p53 protein is a new target for the metastasis-associated Mts1/S100A4 protein: functional consequences of their interaction” *J. Biol. Chem.* **276(25)**, 2001.: 22699-22708.
- ¹⁹ Semov, A., Moreno, M. J., Onichtchenko, A., Abulrob, A., Ball, M., Ekiel, I., Pietrzynski, G., Stanimirovic, D., Alakhov, V. „Metastasis-associated protein S100A4 induces angiogenesis through interaction with Annexin II and accelerated plasmin formation” *J. Biol. Chem.* **280(21)**, 2005.: 20833-20841.

- ²⁰ Dukhanina, E. A., Kabanova, O.D., Lukyanova, T.I., Shatalov, Y.V., Yashin, D.V., Romanova, E. A., Gnuchev, N. V., Galkin, A. V., Georgiev, G. P., Sashchenko, L. P. „Opposite roles of metastasin (S100A4) in two potentially tumoricidal mechanisms involving human lymphocyte protein Tag7 and Hsp70” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 2009.: 13963-13967.
- ²¹ Kiss, B., Duelli, A., Radnai, L., Kékesi, K. A., Katona, G., Nyitray, L. „Crystal structure of the S100A4-nonmuscle myosin IIA tail fragment complex reveals an asymmetric target binding mechanism” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 2012.: 6048-6053.
- ²² Rustandi, R., Vallely, K. M., Varlamova, O., Klein, M. G., Almo, S. C., Bresnick, A. R., Weber, D. J. „¹H, ¹³C, ¹⁵N NMR sequence-specific resonance assignments for human apo-Mts1 (S100A4)” *J. Biomol. NMR* **19**, 2001.: 381-382.
- ²³ Dutta, K., Cox, C. J., Alexandrov, A., Huang, H., Basavappa, R., Pascal, S. M. „Sequence-specific chemical shift assignment and chemical shift indexing of murine apo-Mts1” *J. Biomol. NMR* **22**, 2002.: 181-182.
- ²⁴ Cox, C. J., Dutta, K., Basavappa, R., Zain, S. B., Pascal, S. M. „Sequence-specific chemical shift assignment of calcium-loaded murine S100A4” *J. Biomol. NMR* **23**, 2002.: 153-154.
- ²⁵ Pathuri, P., Vogeley, L., Luecke, H. „Crystal structure of metastasis-associated protein S100A4 in the active calcium-bound form” *J. Mol. Biol.* **383**, 2008.: 62-67.
- ²⁶ Malashkevich, V. N., Varney, K. M., Garrett, S. C., Wilder, P. T., Knight, D., Charpentier, T. H., Ramagopal, U. A., Almo, S. C., Weber, D. J., Bresnick, A. R. „Structure of Ca²⁺-bound S100A4 and its interaction with peptides derived from nonmuscle myosin-IIA” *Biochemistry* **47**, 2008.: 5111-5126.
- ²⁷ Vallely, K. M., Rustandi, R. R., Ellis, K. C., Varlamova, O., Bresnick, A. R., Weber, D. J. „Solution structure of human Mts1 (S100A4) as determined by NMR spectroscopy” *Biochemistry* **41**, 2002.: 12670-12680.
- ²⁸ Elliott, P. R., Irvine, A. F., Jung, H. S., Tozawa, K., Pastok, M. W., Picone, R., Badyal, S. K., Basran, J., Rudland, P. S., Barraclough, R., Lian, L. Y., Bagshaw, C. R., Kriajevska, M., Barsukov, I. L. „Asymmetric mode of Ca²⁺-S100A4 interaction with nonmuscle myosin IIA generates nanomolar affinity required for filament remodeling” *Structure* **20**, 2012.: 654-666.

- ²⁹ Babu, Y. S., Bugg, C. E., Cook, W. J.: „Structure of calmodulin refined at 2.2 Å resolution” *J. Mol. Biol.* **204**(1), 1988.: 191-204.
- ³⁰ Garrett, S. C., Varney, K. M., Weber, D. J., Bresnick, A. R. „S100A4, a mediator of metastasis” *J. Biol. Chem.* **281**, 2006.: 677-680.
- ³¹ Badyal, S. K., Basran, J., Bhanji, N., Kim, J. H., Chavda, A. P., Jung, H. S., Craig, R., Elliott, P. R., Irvine, A. F., Barsukov, I. L., Kriajevska, M., Bagshaw, C. R. „Mechanism of the Ca²⁺-dependent interaction between S100A4 and tail fragments of nonmuscle myosin heavy chain IIA” *J. Mol. Biol.* **405**, 2011.: 1004-1026.
- ³² Dutta, K., Cox C. J., Huang, H., Basavappa, R., Pascal, S. M. „Calcium coordination studies of the metastatic Mts1 protein” *Biochemistry* **41**, 2002.: 4239-4245.
- ³³ Malashkevich, V. N., Dulyaninova, N. G., Ramagopal, U. A., Liriano, M. A., Varney, K. M., Knight, D., Brenowitz, M., Weber, D. J., Almo, S. C., Bresnick, A. R. „Phenothiazines inhibit S100A4 function by inducing protein oligomerization” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 2010.: 8605-8610.
- ³⁴ Dutta, K., Cox, C. J., Basavappa, R., Pascal, S. M. „15N relaxation studies of Apo-Mts1: a dynamic S100 protein” *Biochemistry* **47**, 2008.: 7637-7647.
- ³⁵ Li, Z. H., Spektor, A., Varlamova, O., Bresnick, A. R. „Mts1 regulates the assembly of nonmuscle myosin-IIA” *Biochemistry* **42**, 2003.: 14258-14266.
- ³⁶ Tompa, P.: „Intrinsically unstructured proteins” *Trends Biochem. Sci.* **27**, 2002.: 527-533.
- ³⁷ Uversky, V. N.: „Intrinsically disordered proteins from A to Z” *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **43**, 2011.:1090-1103.
- ³⁸ Keller, R. L. J. „The computer aided resonance assignment tutorial” *CANTINA Verlag*, Goldau, Switzerland, 2004.
- ³⁹ Dosztányi, Zs., Csizmók, V., Tompa, P., Simon, I.: „IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content” *Bioinformatics* **21**, 2005.: 3433-3434.
- ⁴⁰ Eisenberg, D., Wesson, M., Wilcox, W. In Fasman, G.D., ed., „Prediction of protein structure and the principles of protein conformation” *Plenum Press*, New York, 1989.: 635-646.

- ⁴¹ Wishart, D. S., Bigam, C. G., Holm, A., Hodges, R. S., Sykes, B. D.: „¹H, ¹³C and ¹⁵N random coil NMR chemical shifts of the common amino acids. I. Investigations of nearest-neighbor effects” *J. Biomol NMR* **5**, 1995.: 67-81.
- ⁴² Braun, D., Wider G., Wüthrich, K.: „Sequence-corrected ¹⁵N »random coil« chemical shifts” *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 1994.: 8466-8469.
- ⁴³ Tamiola, K., Burcin, A., Mulder, F. A.: „Sequence-specific random coil chemical shifts of intrinsically disordered proteins” *J. Am. Chem. Soc.* **132(51)**, 2010.: 18000-18003.
- ⁴⁴ Wang, Y., Jardetzky, O.: „Investigation of the neighboring residue effects on protein chemical shifts” *J. Am. Chem. Soc.* **124(47)**, 2002.: 14075-14084.
- ⁴⁵ Schwarzingher, S., Kroon, G. J., Foss, T. R., Chung, J., Wright, P. E., Dyson, H. J.: „Sequence-dependent correction of random coil NMR chemical shifts” *J. Am. Chem. Soc.* **123(13)**, 2001.: 2970-2978.