

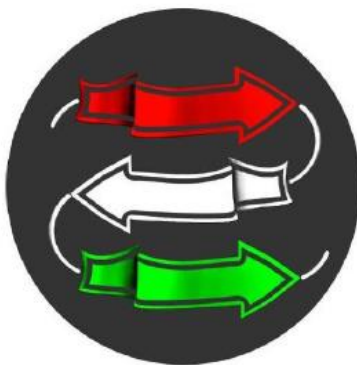
——— Tudományos Diákköri Dolgozat ———

KOLTAI ANDRÁS

Ciszteinek szerkezetstabilizáló hatásának vizsgálata minifehérjékben

Témavezető: Prof. Perczel András

**ELTE Szerkezeti Kémia és
Biológia Laboratórium**



**MTA-ELTE Fehérje-
modellező Kutatócsoport**

——— Eötvös Loránd Tudományegyetem ———
——— Természettudományi Kar ———
—— Budapest, 2014 ——

Köszönetnyilvánítás

Köszönetet mondok elsősorban témavezetőmnek, *Perczel András* Professzor Úrnak, az ELTE Szerkezeti Kémia és Biológia Laboratórium, és az MTA-ELTE Fehérjemodellező Kutatócsoport vezetőjének, amiért lehetővé tette, hogy munkámat kutatócsoportjában végezzem, valamint különösen azért, hogy témavezetésemet személyesen vállalta el, és munkámat mindvégig segítő figyelemmel kísérte.

Köszönettel tartozom *Rovó Petrának*, aki megtanított az NMR spektrumok feldolgozására és a fehérjék térszerkezet-számolására, valamint az NMR mérések alapjaira. Köszönöm, hogy munkám során mindig számíthattam gyors, pontos és minden tekintetben kimerítő tanácsaira, észrevételeire, kritikájára.

Köszönöm *Farkas Viktornak*, hogy megtanított a CD mérések feldolgozásának alapjaira, és hogy az általam tanulmányozott molekulák CD spektroszkópiai vizsgálatát elvégezte. Köszönöm, hogy a munkám során felmerülő - nem csak preparatív jellegű - kérdésekben mindvégig segítségemre volt.

Köszönöm *Láng Andrásnak*, hogy minden kisebb-nagyobb kérdés vagy probléma esetén a segítségemre volt, és számtalan nélkülözhetetlen lépésre megtanított.

Köszönettel tartozom továbbá az általam vizsgált molekulák előállításáért *Szabó Máriának*, *Stráner Pálnak* és *Taricska Nórának*, valamint *Tóth Gábornak* és a Szegedi Tudományegyetem Orvosi Vegytani Intézetében működő kutatócsoportjának; a kiegészítő tömegspektrometriás vizsgálatok elvégzéséért *Kapros Anitának*; az NMR mérések értékelése kapcsán nyújtott tanácsaiért *Bodor Andreának* és *Szalai Ágoston Biankának*; a dinamikai mérések elvégzéséért *Frank Lőhrnek*, a frankfurti Zentrum für Biomolekulare Magnetische Resonanz munkatársának, a számítógépes szimulációkért *Karancsiné Menyhárd Dórának*, a munkám során nélkülözhetetlen informatikai háttér biztosításáért pedig *Jákli Imrének*.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm Kedvesemnek, *Váli Mónikának*, hogy mindvégig mellettem állt, és megértő türelemmel támogatott még akkor is, amikor szabadidőm jelentős részét munkámra fordítottam.

Tartalomjegyzék

I. Összefoglaló.....	6
II. Rövidítések jegyzéke	7
III. Bevezetés	8
IV. Irodalmi előzmények	9
1. Minifehérjék és a fehérjetervezés.....	9
2. Az Exendin-4 és a Trp-kalitka	10
V. Elméleti háttér.....	12
1. Fehérjék térszerkezet-vizsgálata	12
2. Fehérjék vizsgálata NMR spektroszkópiával	13
3. NMR spektrumok asszignációja.....	14
4. Fehérjék térszerkezetének vizsgálata NMR mérések alapján	15
5. Térszerkezet-számolás NMR mérések alapján	15
6. Dinamikai mérések.....	16
7. Makromolekulák méretének vizsgálata NMR spektroszkópiával.....	17
VI. Célkitűzés.....	18
VII. Alkalmazott módszerek	19
1. Bevezető megjegyzések	19
2. Vizsgált molekulák és NMR mérések	19
3. Tömegspektrometriás mérések.....	22
4. A spektrumok feldolgozása	22
5. A szerkezeti adatok elemzése.....	23
a) Másodlagos kémiai eltolódások összevetése	23
b) Másodlagos kémiai eltolódásokból meghatározott paraméterek	24
c) Szerkezetek elemzése iCING szoftvercsomag segítségével	25
d) NOE kényszerfeltételek összevetése.....	26
e) Oxidált és redukált szerkezetek összevetése	27
6. Dinamikai mérések feldolgozása	28
7. DOSY mérések feldolgozása	28
VIII. Eredmények	30
1. Előzetes célkitűzés	30
a) A H5 szerkezete	30
b) A H5_SS_ox szerkezetének vizsgálata	31
c) A H5_SS_red szerkezetének vizsgálata	32
2. Részeredmények.....	33

3.	Célkitűzés bővítése: H2 származékok vizsgálata.....	34
a)	A H2 szerkezete	34
b)	A H2_SS_ox szerkezetének vizsgálata	35
c)	A H2_SS_red szerkezetének vizsgálata	36
4.	A H2 származékok vizsgálatának tapasztalatai.....	36
5.	A redukált ciszteinek hatásának vizsgálata	37
a)	A H2_A1C vizsgálata	37
6.	A H5 származékok dinamikájának vizsgálata.....	38
7.	A vizsgált molekulák összehasonlító elemzése.....	40
a)	Előzetes várakozások	40
b)	Szerkezetek „vizuális elemzése”	40
c)	A Trp-kalitka és az α -hélix jellemzése.....	40
d)	Tendenciák a CSD értékekben	43
e)	Sóhidak	46
f)	RMSD értékek	46
g)	NOE kényszerfeltételek	47
h)	Ser OH – látszik vagy nem látszik?	48
8.	A molekulaméret-vizsgálatok eredményei.....	49
IX.	Összegzés	50
X.	Kitekintés	52
XI.	Függelék.....	53
1.	Alkalmazott módszerek.....	53
a)	Preparatív munka	53
b)	NMR mérések	53
c)	Asszignáció	54
d)	Szerkezetszámolás	55
e)	A szerkezetek elemzése iCING szoftvercsomaggal.....	56
f)	Molekulák ábrázolása	57
g)	Grafikonok készítése.....	57
h)	R_1 és R_2 paraméterek meghatározása	57
i)	hetNOE paraméterek meghatározása	57
j)	Spektrális sűrűségfüggvény	57
k)	Lipari-Szabó-féle analízis	57
l)	CPMG mérések feldolgozása.....	58

m)	Hőmérsékletfüggő HSQC mérések feldolgozása	59
n)	DOSY mérések feldolgozása	59
o)	Összefüggés az atom-atom távolság és a jel nagysága között	60
p)	A Y8 oldalláncának pozíciója	62
q)	A diszulfidhíd <i>in situ</i> redukciója.....	64
2.	A szerkezetek összevetésének adatai	66
3.	A dinamikai elemzés ábrái	69
a)	Nyers adatok	69
b)	Lipari-Szabó-féle analízis	70
c)	CPMG effektust mutató ábrák 300 K-en	71
d)	[¹⁵ N- ¹ H]-HSQC spektrumok hőmérsékletfüggése	72
4.	A számolt szerkezetek Ramachandran-diagramjai.....	74
5.	Kémiai eltolódások.....	86
6.	NOE kényszerfeltételek.....	89
XII.	Ábrák és táblázatok jegyzéke.....	99
XIII.	Irodalomjegyzék	101
XIV.	Szerzői nyilatkozat	103

I. Összefoglaló

Ciszteinek szerkezetstabilizáló hatásának vizsgálata minifehérjékben

Koltai András, vegyész mesterszakos hallgató

ELTE Szerkezeti Kémia és Biológia Laboratórium

Témavezető: **Prof. Perczel András**, egyetemi tanár
ELTE Szerves Kémiai Tanszék

Kutatócsoportunk a közelmúltban elsőként tervezett és állított elő olyan Trp-kalitka minifehérjéket, melyekbe a belső mozgékonyosság redukálása és a szerkezet stabilizálása céljából diszulfidhíd került beépítésre.

Munkám során a diszulfidhíd szerkezetstabilizáló hatását, illetve a diszulfidhíd redukciójának hatására bekövetkező szerkezeti és dinamikai változásokat vizsgáltam NMR spektroszkópiával.

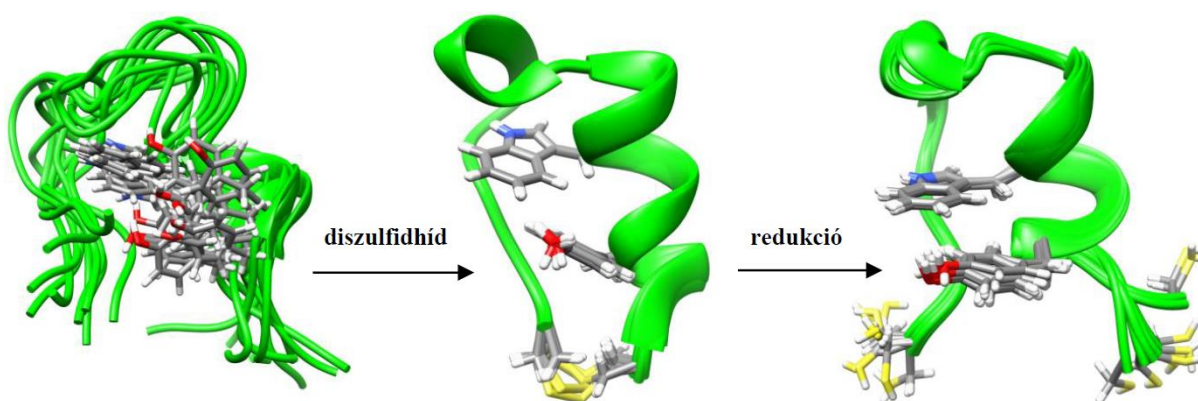
A vizsgált minifehérjék:

H2	AV	RLYIQ	WLKEG	GPSSG	RPPPS
H2_SS	CV	RLYIQ	WLKEG	GPSSG	RPPP
H5	EEEAV	RLYIQ	WLKEG	GPSSG	RPPPS
H5_SS	EEECV	RLYIQ	WLKEG	GPSSG	RPPP

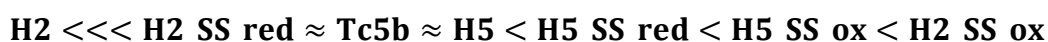
A H5 szerkezetének stabilizálása céljából, a konformáció megtartásával diszulfidhíd került beépítésre, ami várákosunknak megfelelően stabilizálta a szerkezetet. Meglepő módon a diszulfidhíd redukciójával nem kaptuk vissza az eredeti H5 szerkezetét, hanem annál valamivel stabilabb molekulához jutottunk.

Ennek további tanulmányozása céljából a - már alacsony hőmérsékleten is igen erősen destabilizált - H2-be is diszulfidhidat építettünk be. A szerkezet, amit kaptunk, minimálisan még a H5_SS_ox-nál is stabilabb.

A redukcióval kapott H2_SS_red-től azt vártuk, hogy a H2-höz hasonló, ám ezen várákosunk nem teljesült, ugyanis annál lényegesen stabilabb, kompaktabb molekulához jutottunk.



A szerkezetek elemzése során megállapítottam, hogy a Trp-kalitka-jelleg és a szerkezet rendezettsége, kompaktsága alapján a következő sorrend állítható fel.



A ciszteinek tehát a diszulfidhíd redukciója után is nagymértékben stabilizálják a szerkezetet.

II. Rövidítések jegyzéke

- 1D, 2D, 3D egy-, két-, illetve háromdimenziós (spektrum)
- A, Ala alanin
- AS aminosav
- C, Cys cisztein
- CD Cirkuláris Dikroizmus (spektroszkópia)
- COSY Correlation Spectroscopy
- CPMG Carr-Purcell-Meiboom-Gill (sequence)
- CSD Chemical Shift Deviation
- D, Asp aszparaginsav
- DOSY Diffusion-Ordered Spectroscopy
- DSS 2,2-dimetil-2-szilapentán-5-szulfonsav
- E, Glu glutaminsav
- Ex-4 Exendin-4
- G, Gly glicin
- HA, H α α -helyzetű hidrogénatom, vagy ennek kémiai eltolódása
- HB, H β β -helyzetű hidrogénatom, vagy ennek kémiai eltolódása
- hetNOE heteronuclear Nuclear Overhauser Effect
- HG, H γ γ - helyzetű hidrogénatom, vagy ennek kémiai eltolódása
- HN a gerinc peptidkötésben résztvevő NH csoportjának hidrogénje, vagy ennek kémiai eltolódása
- HPLC High Performance Liquid Chromatography
- HSQC Heteronuclear Single Quantum Coherence (spectroscopy)
- I, Ile izoleucin
- IR Infra Red
- K, Lys lizin
- L, Leu leucin
- MD Molecular Dynamics (Simulation)
- MS Mass Spectrometry
- N a gerinc peptidkötésben résztvevő nitrogénje, vagy ennek kémiai eltolódása
- N, Asn aszparagin
- NMR Nuclear Magnetic Resonance
- NOE Nuclear Overhauser Effect
- NOESY Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
- P, Pro prolin
- PDB Protein Database
- Q, Gln glutamin
- R, Arg Arginin
- RMSD Root Mean Square Deviation
- S, Ser serin
- Shift Chemical Shift (=kémiai eltolódás, ppm-ben)
- TCEP tri-(2-karboxietil)-foszfin
- TFE trifluor-ecetsav
- TOCSY Total Correlation Spectroscopy
- V, Val valin
- W, Trp triptofán
- Y, Tyr tirozin

III. Bevezetés

Az élő szervezetekben végbemenő biokémiai folyamatok túlnyomó többségében - legyen az hasznos vagy éppen nemkívánatos folyamat - kulcsfontosságú szerepük van a kisebb-nagyobb peptideknek és fehérjéknek. Az orvos-, és élettudományok fejlődésének és a gyógyítás új útjainak felfedezésének megkerülhetetlen szereplői a fehérjék. A biokémiai folyamatok molekuláris szinten való megértéséhez, és különösen ezek befolyásolásának megtanulásához feltétlenül szükséges a fehérjék működésének megértése.

A jelenleg alkalmazott kismolekulás gyógyszerek hatása a legtöbb esetben nem megfelelően specifikus, ebből kifolyólag hatékonyságuk korlátozott, mellékhatásaik súlya pedig megkérdőjelezhetetlen. Ezzel szemben a fehérje-fehérje kölcsönhatás rendkívül magas fokú specifikust tesz lehetővé. Napjainkban egyre jelentősebb erőfeszítések történnek a peptid és fehérje hatóanyagok fejlesztése és gyakorlati alkalmazása terén. Ezen folyamat kiteljesedéséhez elengedhetetlen az ún. racionális fehérjetervezés, mely egy adott biológiai funkciót ellátni képes fehérje tervezését jelenti. Ehhez azonban szükséges mind a szekvencia-szerkezet, mind pedig a szerkezet-funkció összefüggések ismerete. A fehérjetervezéssel és fehérje térszerkezet-vizsgálattal foglalkozó alapkutatás egyik legfontosabb célkitűzése annak megismerése, hogy a szekvencia és annak tudatos változtatásai miként befolyásolják egy adott fehérje térszerkezetét, stabilitását és dinamikáját, végső soron a megfelelő biokémiai reakciópartnerrel való kölcsönhatását. Ezen a téren széleskörű ismereteink vannak elsősorban a másodlagos szerkezeti elemek szekvencia-függésére vonatkozóan, a harmadlagos szerkezetet befolyásoló szekvenciális hatások azonban kevésbé ismertek.

Általános szekvencia-szerkezet összefüggések megállapítására és tanulmányozására elterjedt az ún. minifehérjék vizsgálata. Ezek olyan, néhányszor tíz aminosavból álló polipeptidek, melyeket fehérjének nevezünk, hiszen jól definiált harmadlagos szerkezettel rendelkeznek. Ezen egyszerű modellrendszereken jól tanulmányozhatóak azon hatások, melyek a „valódi” fehérjék szerkezetét és stabilitását is meghatározzák. A leggyakrabban tanulmányozott minifehérjék közé tartoznak a mindössze 20 aminosavból felépülő Tc5b, és származékai, a Trp-kalitka fehérjék. Ezek jelentőségét az általános jellegű vizsgálatok lehetőségén túl az adja, hogy a Tc5b alapjául szolgáló, azzal rendkívül szoros szerkezeti és szekvenciális rokonságot mutató Exendin-4 szintetikus változata, az exenatid *Byetta* néven forgalomban lévő gyógyszere a kettes típusú diabétesznek. Csakhogy az Exendin-4 sajnos számos mellékhatással bír, emiatt szerteágazó kutatások folynak olyan Trp-kalitka előállítására, mely a megfelelő receptorhoz való jobb kötődése folytán nagyobb hatékonyság mellett kevesebb mellékhatást okoz.

IV. Irodalmi előzmények

1. Minifehérjék és a fehérjetervezés

A minifehérjék olyan, természetes aminosavakból felépülő polimerek, melyeket csupán méretük alapján egyértelműen polipeptidnek tekinthetnénk, hiszen csak néhányszor tíz aminosavból állnak. Ennek ellenére fehérjének nevezzük őket, ugyanis mindazon szerkezeti tulajdonságokkal rendelkeznek, melyekkel egy „igazi”, több száz, vagy több ezer aminosavból álló fehérje: nem csupán másodlagos szerkezeti elemek figyelhetők meg bennük, hanem jól definiált, stabil harmadlagos szerkezettel rendelkeznek, mely vizes oldatban - kvázi fiziológias körülmények között - más fehérjékkel való kölcsönhatás nélkül alakul ki.

A minifehérjék tehát olyan, egyszerű modellrendszerek, melyeken mindazon hatások és folyamatok tanulmányozhatóak, melyek a természetes fehérjék feltekeredését, szerkezetét, stabilitását, dinamikáját, végső soron biológiai funkcióját befolyásolják. Annak, hogy egyszerű modellrendszereket vizsgálunk, egyrésről technikai okai vannak. Különösen igaz ez az NMR spektroszkópiai vizsgálatok esetében, ugyanis az NMR spektroszkópiával vizsgálható mérettartomány erősen korlátozott, ráadásul a molekula méretének növelésével egyre bonyolultabb technikákat kell alkalmazni, ezáltal mind a költségek, mind a humán erőforrás-igény exponenciálisan nőnek.

Másfelől viszont egyszerű modellrendszerek esetében könnyebben elkülöníthetőek a különböző hatások, és így apró szekvenciális változtatásokat eszközölve egyértelműen azonosítható azok következménye.

A minifehérjéken megfigyelt összefüggések jól alkalmazhatóak nagyobb rendszerek vizsgálata során is, illetve alapul szolgálhatnak a racionális fehérjetervezéshez.

A fehérjetervezés olyan eljárás, melynek során adott szerkezeti tulajdonságokkal - hosszabb távon pedig adott biológiai funkcióval - rendelkező fehérjeszekvenciát alakítunk ki.

A fehérjetervezésben alapvetően kétféle vezérlő elv figyelhető meg. A *redesign* fehérjetervezés során meglévő, általában természetes eredetű, vagy természetes eredetű fehérjékből kialakított molekulákat vesznek alapul, és ezekben pontszerű szekvenciális módosításokat eszközölve igyekeznek elérni a kívánt szerkezeti hatást. Ez tehát egy soklépéses folyamat, melynek során minden módosítás hatását meg kell vizsgálni, eldönteni, hogy az kedvező, semleges, vagy kedvezőtlen a kitűzött cél szempontjából, majd ennek tükrében további módosításokat végrehajtani.

A másik eljárás a *de novo design*, melynek során az ismert szekvencia-szerkezet összefüggések és az aminosavak szerkezetének, töltéseloszlásának birtokában *ab initio* számításokon alapuló eljárással határozzák meg a szükséges szekvenciát.

Értelemszerűen a két eljárás nem zárja ki egymást. A sikeres fehérjetervezéshez a preparatív tevékenység, a műszeres szerkezetkutatás, a számítógépes modellezés és a biológiai vizsgálatok összehangolt együttesére van szükség.

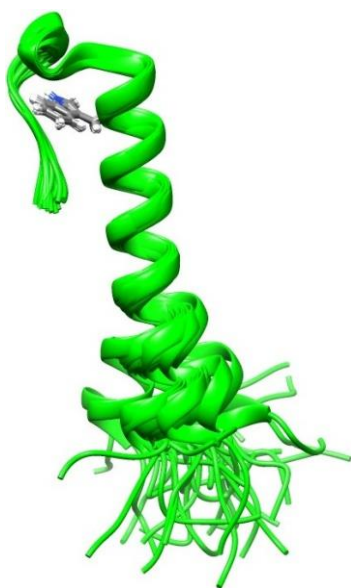
2. Az Exendin-4 és a Trp-kalitka

Neidigh és mts. a *Gila monster* viperagyík nyálából izolált 39 aminosav hosszú Exendin-4 fehérje [1] csonkolásával és módosításával állították elő a legkisebb minifehérjét, mely mindösszesen 20 aminosavból áll, ennek ellenére jól definiált harmadlagos szerkezettel rendelkezik: egy α -hélix, egy 3_{10} -hélix és egy poliprolin-II hélix burkolja a szerkezetet stabilizáló hidrofób magot, mely egy, a molekula belsejébe temetett Trp-oldallánc köré szerveződik. Ezt a jellegzetes harmadlagos struktúrát Trp-kalitkának (Trp-cage) nevezték, és a fehérje neve is részben ebből származik: Tc5b. [2] A szerkezetet tehát alapvetően a hidrofób kölcsönhatás alakítja ki, ugyanakkor rendkívül nagy szerepe van a szerkezetet stabilizáló Asp-Arg sóhídnak is. [3]

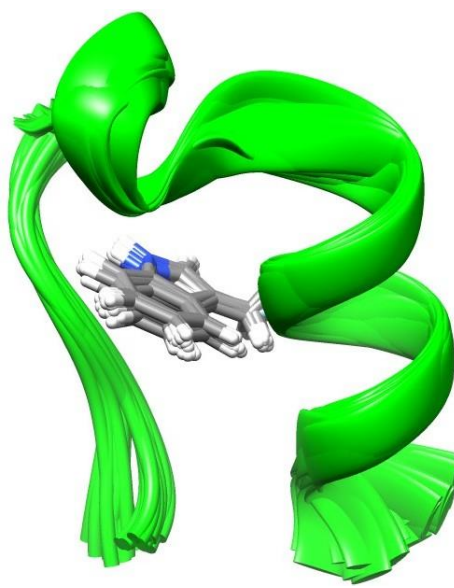
Az Ex-4 szekvenciája: HGEG TFTSD LSKQM EEEAV RLFIE WLKNG GPSSG APPPS.

A Tc5b szekvenciája: **NLYIQ** WLK**DG** GPSSG **R**PPPS.

A Tc5b rendkívül kis mérete és stabil szerkezete miatt széles körben elterjedt modellrendszer a fehérjék térszerkezet-vizsgálatával foglalkozók körében, ennek eredményeképp mára számtalan Tc5b származék és ezek szerkezete vagy éppen rendezetlen volta szerepel az irodalomban. Ezeket a származékokat nevezzük Trp-kalitka minifehérjéknek.



1. ábra: Az Exendin-4



2. ábra: A Tc5b

Kutatócsoportunkban nagy hagyománya van a Trp-kalitka tanulmányozásának, ennek során az elmúlt években sok új mutáns, valamint ezek szerkezete és dinamikája került leírásra.

Csoportunkban a Tc5b szerkezetstabilizáló sóhídjának szerepét már sokat vizsgálták, ennek során előbb a 9-es helyzetű Asp-at Glu-ra cserélték, ezáltal a hosszabb oldallánc és a hidrofób mag között kölcsönhatást alakítottak ki, valamint a sóhíd létrejöttéhez szükséges töltött csoportok is közelebb kerülhettek egymáshoz. [4] Az így létrehozott fehérje a Tc6b, melynek szekvenciája: NLYIQ WLK**E**G GPSSG RPPPS.

Később a sóhíd szerepének vizsgálatát a beépített metilén-csoport helyzetének szisztematikus változtatásával és a pH-függés tanulmányozásával folytatták. [5]

Csoportunkban a közelmúltban elvégezték a Tc6b-ből az Exendin-4 felé vezető lánchosszabbítást lépésenként, minden egyes aminosav beépítése után térszerkezet-vizsgálatot, és több esetben dinamikai vizsgálatot is végezve. Az így létrehozott „hosszabbított” Trp-kalitka minifehérjék neve H1, H2, H3 ... H19 aszerint, hogy a Tc6b szekvenciájánál hány aminosavval hosszabb az adott molekula. [6]

Ezen túlmenően a közelmúltban érdekes eredmények láttak napvilágot a fehérjék egyik legérdekesebb, és gyógyászati szempontból is rendkívül jelentős tulajdonsága, az aggregáció kapcsán. A fehérjék az aggregáció során elvesztik natív térszerkezetüket és ezzel értelem-szerűen biológiai aktivitásuk is megszűnik, vagy megváltozik. Ezzel a jelenséggel hozzák összefüggésbe többek között az Alzheimer-kórt. Szerkezetvizsgálat során az aggregáció általában nemkívánatos jelenség, a közelmúltban Trp-kalitka minifehérjékkel azonban aggregációt modellező kísérleteket is végeztek. [7]

V. Elméleti háttér

1. Fehérjék térszerkezet-vizsgálata

Fehérjék térszerkezet-vizsgálata során alapvetően vagy globális térszerkezeti információt, vagy atomi felbontású szerkezetet keresünk. Előbbi célnak kiválóan megfelel a csoportunkban is rutinszerűen alkalmazott CD spektroszkópia, melynek segítségével gyorsan, egyszerűen és alacsony költségek mellett információt kaphatunk a fehérjében megtalálható másodlagos szerkezeti elemekről, valamint ezek arányáról. Emellett más optikai spektroszkópiai eljárásokat is alkalmaznak hasonló célra, ezek közül az IR spektroszkópia emelkedik ki. [8]

Ha a fehérje térszerkezetét atomi szinten szeretnénk vizsgálni, vagy egyszerűen csak annak eldöntése a cél, hogy a CD spektroszkópiával kimutatott másodlagos szerkezeti elemek hol helyezkednek el a molekulában, akkor alapvetően két technika áll rendelkezésre: a Röntgen-krisztallográfia és az NMR spektroszkópia.

A Röntgen-krisztallográfiás vizsgálatok során a fehérjéből egykristályt növesztenek, és ezt Röntgen-diffrakciós eljárással vizsgálva a szerkezetnek megfelelő diffrakciós képhez, majd elektronsűrűségi térképhez jutnak, ennek finomításával pedig meghatározzák az atomi koordinátákat. A módszer vitathatatlan előnye az NMR spektroszkópiával szemben, hogy lényegesen nagyobb rendszereket lehet vizsgálni. Hátránya viszont egyrészt, hogy a fehérjéből kristályt kell növeszteni, ami viszonylag nagyobb mennyiségű, tiszta mintát igényel, ráadásul az egykristály kialakulása egyáltalán nem törvényszerű, a kísérletek sokszor eredménytelenül végződnek. A másik hátrány, hogy a fehérjék a természetestől alapvetően különböző állapotban, kristályrácsban vizsgálhatóak, és - noha az elmúlt időben számos olyan esetet írtak le, amikor a kristályrácsba diffundáltatott szubsztrát átalakulását az enzim kristályos állapotban is képes volt katalizálni - a kristályrácsban kialakuló térszerkezetből nem következtethetünk fenntartások nélkül az oldatbeli szerkezetre.

Ezzel szemben az NMR spektroszkópia nagy előnye, hogy a fehérjéket tetszőlegesen adalékolt vizes oldatban mérhetjük, és így lehetőség adódik kvázi fiziológiás körülmények között való mérésre is. Emellett többek között az oldószer, illetve a hőmérséklet változtatásának, vagy különböző sók hozzáadásának a térszerkezetre gyakorolt hatását is megfigyelhetjük. Ugyanígy befolyásolhatjuk a térszerkezetet az oldószer polaritásának változtatásával. Értelemszerűen polárisabb oldószerben jobban érvényesül a molekulán belül a hidrofób kölcsönhatás, és ez tökéletesebb feltekeredést eredményezhet. Közismert, hogy az oldószerhez TFE-t adagolva a helicitás nő. A Trp-kalitka is sokkal rendezettebbé, stabilabbá válik TFE hatására.

Az NMR hatalmas előnye ezen túlmenően, hogy lehetővé teszi dinamikai mérések elvégzését, miáltal információt nyerhetünk a fehérje dinamikájáról, illetve mozgékonyágáról is. Ugyanakkor az NMR spektroszkópia hátránya, hogy csak lényegesen kisebb rendszerek vizsgálatára nyílik lehetőség, atomi felbontást pedig csak egészen kicsi modellrendszereken lehet megállapítani.

2. Fehérjék vizsgálata NMR spektroszkópiával

Mivel az NMR alapjelenségre és az alapvető NMR alkalmazásokra vonatkozóan ma már mind angol, mind magyar nyelven kiváló munkák állnak rendelkezésre, én ezek ismeretét feltételezem. [9] Ugyancsak ismertnek veszem a 2D és 3D NMR spektrumok felvételének elméleti hátterét és módszereit, valamint a jelhozzárendelés szabályait, elsősorban azért, mert ezt az elmúlt években kutatócsoportunk több tagja is részletesen leírta magyar nyelvű munkáiban. [10] [11] [12]

A kismolekulás NMR vizsgálatok során rutinnak számító 1D ^1H és ^{13}C technikák fehérjék esetében nem alkalmazhatóak, mivel a rendkívül nagyszámú jel közül sok hasonló kémiai eltolódásnál jelentkeznek, egymással nagymértékben átfednek, és így a jelhozzárendelés (asszignáció) lehetetlen. A fehérjék NMR spektroszkópiái vizsgálata során 1D spektrumokat leginkább az esetleges változások követésére és a szerkezet állandóságának ellenőrzésére használunk.

Az asszignációt az teszi lehetővé, ha többdimenziós spektrumokat veszünk fel. Ezek közül leggyakrabban homonukleáris 2D spektrumokat – $[\text{}^1\text{H}-\text{}^1\text{H}]\text{-COSY}$, $[\text{}^1\text{H}-\text{}^1\text{H}]\text{-TOCSY}$ és $[\text{}^1\text{H}-\text{}^1\text{H}]\text{-NOESY}$ – használunk, ezek alapján ugyanis kisebb fehérjék teljes jelhozzárendelése (valamennyi ^1H mag kémiai eltolódásának megállapítása) elvégezhető. A spektrumból nyert információ egyrészt a gerincatomok kémiai eltolódása, melyből következtethetünk az adott szakaszt jellemző másodlagos struktúrára vagy rendezetlenségre, másrészt a spektrumban asszignált NOESY csúcsok alapján felállított távolság jellegű kényszerfeltételek felhasználásával lehetőségünk van az atomi struktúra meghatározására.

Bizonyos esetekben a fenti három spektrum felvétele nem elegendő. Ez egyrészt akkor fordul elő, ha a jelek átfedése miatt az asszignáció 2D spektrumok alapján sem oldható meg, és emiatt szükségessé válik egy harmadik dimenzió szerinti felbontás. Ilyenkor a harmadik dimenzió általában a ^{15}N , tehát leggyakrabban $\text{TOCSY}-[\text{}^{15}\text{N}-\text{}^1\text{H}]\text{-HSQC}$ és $\text{NOESY}-[\text{}^{15}\text{N}-\text{}^1\text{H}]\text{-HSQC}$ spektrumokat veszünk fel. A másik eset az, ha dinamikai vizsgálatokat szeretnénk végezni, akkor $[\text{}^{15}\text{N}-\text{}^1\text{H}]\text{-HSQC}$ spektrumokat kell feldolgoznunk. Az asszignáció elvégezhető a 3D spektrumok alapján, vagy szerencsés esetben úgy is, hogy a homonukleáris

spektrumokon asszignált HN eltolódások alapján asszignáljuk a 2D-s [^{15}N - ^1H]-HSQC spektrumot. Ezen technikák hátránya azonban, hogy míg a homonukleáris spektrumok felvételéhez megfelelő a természetes izotópeloszlásnak megfelelő minta, ezek felvételének feltétele a ^{15}N jelölt minta, amely azonban csak izotópjelölt táptalajon, expresszióval állítható elő, ez pedig igen költségessé teszi a vizsgálatot.

Speciális esetekben olyan mérések elvégzése is szükséges lehet, amelyekhez ^{13}C jelölt mintára is szükség van, ez azonban értelemszerűen a költségeket is rendkívüli mértékben megnöveli.

Itt ragadom meg az alkalmat, hogy ismét kiemeljem a minifehérjék rendkívüli jelentőségét. Ezek ugyanis kis méretüknél fogva lehetővé teszik a homonukleáris spektrumok alapján való teljes asszignációt, ezáltal a bonyolultabb mérések és a lényegesen drágább izotópjelölt minta előállítása mellőzhető. Tc5b származékok szerkezetének meghatározásához egyáltalán nincsen szükség heteronukleáris spektrumra, így izotópjelölt mintát csak akkor kell előállítani, ha dinamikai vizsgálatokat is végzünk.

Dinamikai mérések esetén alapvetően T_1 és T_2 relaxáció méréseket, valamint heteronukleáris NOE (hetNOE) méréseket szokás elvégezni. Ezeken kívül - a molekula dinamikájának vizsgálatait kiegészítendő - egyéb méréseket is végezhetünk.

3. NMR spektrumok asszignációja

Az NMR spektrumok asszignációja (jelhozzárendelés) már egészen kisméretű minifehérjék esetében is rendkívül hosszadalmas és bonyolult feladat, mely egyáltalán nem mechanikus, és mindenképp emberi munkát igényel. Noha számos olyan kísérlet történt, mely a folyamat automatizálására alkalmas szoftver fejlesztését tűzte ki célul, a gyakorlatban széles körben alkalmazható megoldás nem ismert. [13] [14] [15] [16] [17]

Az asszignáció során több, ugyanazon mintáról, időben közvetlenül egymás után felvett spektrumot használunk, melyekben az egyes magok kémiai eltolódásai értelemszerűen megegyeznek, az egyes spektrumok azonban más-más információt hordoznak. Míg bizonyos esetekben elegendő a jelek egy részének - leggyakrabban a gerincatomok jeleinek - hozzárendelése, más esetekben a spektrumban megjelenő valamennyi csúcs azonosítása szükséges lehet. A térszerkezet-számolás feltétele a NOESY spektrum valamennyi csúcsának asszignációja.

4. Fehérjék térszerkezetének vizsgálata NMR mérések alapján

A fehérjék NMR spektroszkópiával való térszerkezet-vizsgálatának több módszere létezik. Már a gerincatomok eltolódásaiból sok információhoz juthatunk. Az egyes aminosavakat általában a gerincatomok másodlagos kémiai eltolódásával (CSD, Chemical Shift Deviation) jellemezzük, melyet úgy kapunk, hogy a spektrumban asszignált kémiai eltolódásból kivonjuk az ún. random coil referencia eltolódást. Ezek irodalmi adatok, melyeket különböző körülmények között mérve, néhány aminosavas rendezetlen peptidekben, általában GGXGG penta-peptidekben határoztak meg, ahol X jelöli a vizsgált aminosavat. [18] [19]

A másodlagos kémiai eltolódások alapvetően árulkodnak az adott aminosav kémiai környezetéről, ami természetesen a lokális szerkezet függvénye. Így a rendezetlen fragmensekben a másodlagos kémiai eltolódásokban semmilyen tendencia vagy extrém érték nem figyelhető meg, míg a másodlagos szerkezeti elemeket felépítő aminosavak esetében valamilyen tendencia mutatkozik. Rendkívül informatív lehet egy-egy kiugró érték is, hiszen ez valamilyen kiemelkedően szokatlan kémiai környezetről tanúskodik. Például a Tc5b G11 esetében megfigyelhető, hogy a két H α kémiai eltolódásában, és így CSD értékében hatalmas különbség adódik. Ennek oka, hogy az egyik atom a térben közeli Trp-oldallánc aromás árnyékolási kúpjában helyezkedik el, a másik viszont kevésbé részesül ebben a kölcsönhatásban. Ez az eltolódás-különbség annyira jellemző a Trp-kalitkára, hogy pusztán ennek ismeretében nagy biztonsággal következtethetünk a fehérje rendezettségének mértékére.

Léteznek olyan algoritmusok is, melyek a kémiai eltolódások alapján becslést adnak a molekulában előforduló másodlagos szerkezeti elemekre és ezek elhelyezkedésére. Ilyen eljárásokkal azonban a harmadlagos szerkezetre legfeljebb közeli analógiák ismeretében következtethetünk. Ilyen a fenti példa a Trp-kalitkában.

5. Térszerkezet-számolás NMR mérések alapján

Míg a másodlagos kémiai eltolódások alapján csupán a másodlagos struktúrelemekre következtethetünk, szerkezetszámolás útján atomi felbontást határozhatunk meg, ily módon a másodlagos szerkezeti elemek relatív térbeli helyzetét, azaz a harmadlagos szerkezetet is megismerhetjük.

Az NMR spektrumokon alapuló szerkezetszámolás elvi alapja, hogy a NOESY spektrumban asszignált csúcsok mindegyike megfeleltethető egy-egy távolság jellegű kényszerfeltételnek. Ennek jelentése, hogy a keresztcsúcsot adó atomok térben „közel” vannak egymáshoz. Ez számszerűen első megközelítésben 5 Å-öt, vagy annál kisebb távolságot jelent, azonban a

mérési paraméterek és a jel nagyságának függvényében a pontos távolság ettől kis mértékben eltérhet.

A szerkezetszámolás során a spektrumban asszignált csúcsok alapján létrehozott kényszerfeltétel-lista alapján keresünk olyan szerkezetet, amely valamennyi kényszerfeltételnek megfelel. Mivel az átfedő jelek miatt a csúcsok asszignációja sok esetben nem egyértelmű, a szerkezetszámolás egy iteratív folyamat, melynek során az asszignációt lépésről lépésre kis mértékben tökéletesítjük. Ezt az eljárást addig folytatjuk, amíg olyan szerkezethez nem jutunk, amely megfelel a spektrum által prediktált kényszerfeltételeknek.

Ha a spektrumban nem tudtunk elegendő kényszerfeltételt asszignálni, nem fogunk egyértelmű szerkezethez jutni, ez esetben a fehérjénk rendezetlen, vagy legalábbis erősen destabilizált.

6. Dinamikai mérések

Az NMR spektroszkópia vitathatatlan előnye a másik, atomi felbontást nyújtó módszerhez, a Röntgen-diffrakcióhoz képest, hogy nem pusztán a rendszer pillanatképét vizsgálhatjuk, hanem az idő, mint dimenzió is rendelkezésünkre áll, és lehetőségünk nyílik különféle, időben lejátszódó események vizsgálatára. Ennek különösen nagy jelentősége van a makromolekulák esetében, hiszen ezek olyan belső konformációs mozgásokkal rendelkeznek, melyek szerkezetüket, és így különféle tulajdonságaikat alapvetően változtatják meg.

Fehérjék dinamikáját több megközelítésből vizsgálhatjuk, ezek közül a legalapvetőbb, és legelterjedtebb az ún. gerincdinamika-vizsgálat, mikor az oldalláncok konformációjától eltekintünk, és csupán a peptidgerinc belső mozgásait vizsgáljuk. Azt tudjuk tehát feltérképezni, hogy a fehérje gerincének mely szakasza mennyire végez mozgásokat az adott időskálán. Többnyire megkülönböztetünk ún. gyors és lassú mozgásokat. Előbbi igen gyakori, ps-ns időskálán lejátszódó mozgás, utóbbi, a μ s-ms időskálán való mozgás azonban lényegesen ritkább, ugyanakkor kulcsfontosságú információkkal szolgálhat a molekula fel-, és letekeredéséről, különböző fő konformerek közti átalakulásáról.

A fehérjék dinamikai vizsgálata több szempontból is nehézkes. Egyrészt feltétlenül izotópjelölt mintára van szükség, ami a költségeket értelemszerűen sokszorozza. Legegyszerűbb esetben is ^{15}N jelölt minta szükséges, melyben valamennyi nitrogén helyén ^{15}N izotóp van, bonyolultabb mérésekhez azonban ún. duplán jelölt minta kell, melyben a szenek is mind ^{13}C -ra vannak cserélve. Ezen minták bakteriális expresszióval, izotópjelölt táptalajon állíthatóak elő, igen drágán. Még extrémebb vizsgálatokhoz szelektíven jelölt

mintákat kell használni, melyekben jellemzően bizonyos szén, esetleg hidrogének vannak ^{13}C és ^2H jelöléssel ellátva, ezen mintáknak azonban az ára is extrém.

Az sem elhanyagolható szempont, hogy a dinamikai mérések igen időigényes, többdimenziós mérések, így maga a mérés is jelentős költségekkel jár.

Ezen okoknál fogva a térszerkezet-vizsgálatnál sokkal ritkábban szokás dinamikai vizsgálatokat végezni.

7. Makromolekulák méretének vizsgálata NMR spektroszkópiával

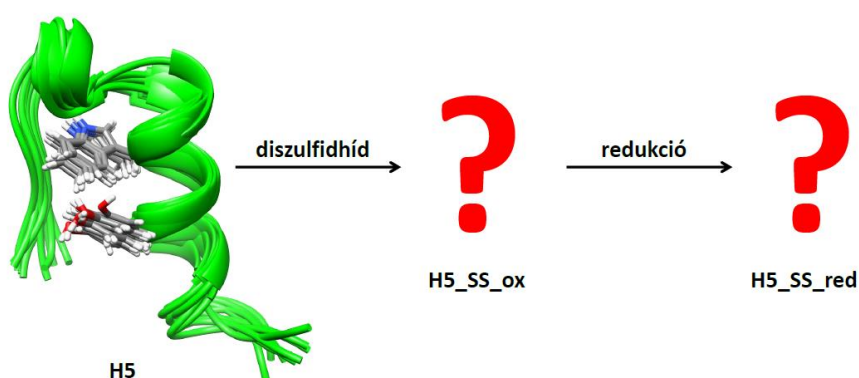
Makromolekulák méretének szakszerű vizsgálata alapvetően a kolloidika tárgya, lehetőségünk van azonban speciális NMR mérésekkel is képet alkotni az oldott molekulák hidrodinamikai sugaráról. Fontosnak tartom hangsúlyozni, hogy az NMR spektroszkópia igen korlátozottan alkalmazható, magam is számos elvi és gyakorlati kétséggel tekintek ezekre a mérésekre - nem tudunk például eloszlást vizsgálni, csupán egyetlen, legfeljebb néhány diszkrét értéket kapunk - ugyanakkor hasznos kiegészítő vizsgálatnak tartom a DOSY méréseket.

A DOSY egy olyan speciális NMR spektroszkópiai eljárás, melyben az oldatban lévő molekulák diffúziós állandóját határozhatjuk meg, speciális szekvenciák alkalmazásával. Lényegében arról van szó, hogy egy olyan pszeudo-kétdimenziós spektrumot veszünk fel, melyben a második (pszeudo) dimenzió egy szisztematikusan változtatott *delay* (rövid várakozás) a szekvenciában, melynek során a molekula elmozdul. Gradiens technika alkalmazásával információt nyerhetünk a molekulák átlagos elmozdulásáról a *delay* alatt, kellő számú adatpont esetében pedig exponenciális illesztéssel meghatározható a diffúziós állandó, abból pedig – elvileg - a moláris tömeg közelítő értéke. [20]

VI. Célkitűzés

Kutatócsoportunkban már korábban is és jelenleg is számos vizsgálat folyik olyan Trp-kalitikák tervezése és vizsgálata céljából, melyek szerkezetük és stabilitásuk folytán remélhetőleg jobb receptorkötést tesznek lehetővé.

Munkám során arra voltunk kíváncsiak, hogy ha egy Trp-kalitka minifehérjébe - erre a célra a H5-öt választottuk ki - diszulfidhidat építünk be oly módon, hogy a molekula elvileg térben amúgy is közeli láncvégeit kötjük össze - tehát az eredeti konformációt rögzítjük -, akkor a diszulfidhíd beépítése és redukciója milyen hatással lesz a molekula térszerkezetére és stabilitására.



3. ábra: Célkitűzés

Arra számítottunk, hogy a diszulfidhíd beépítésével nagymértékben stabilizálódik a szerkezet - hiszen összekötjük a láncvégeket, megakadályozva ezzel a letekeredést - a redukcióval pedig szerkezeti szempontból visszkapjuk az eredeti, ciszteint nem tartalmazó molekulát.

Mivel előzetes várakozásaink nem igazán teljesültek, célkitűzésünket bővítve vizsgálatainkat megismételtük a H2 származékain is. Azért tettünk így, mert míg a H5 már ciszteinek nélkül is jól definiált, stabil szerkezettel rendelkezik, addig a H2 igen erőteljesen destabilizált.

Tapasztalataink alapján a redukált ciszteinek szerkezetstabilizáló hatásának vizsgálatával folytattuk munkánkat.

VII. Alkalmazott módszerek

1. Bevezető megjegyzések

A csoportunkban folyó kutatás komplexitásából eredően munkám elvégzéséhez elengedhetetlenül szükséges volt a csoport tagjaival, és néhány esetben külső partnerekkel való együttműködés. Ennek eredményeképp a dolgozatomban szereplő eredmények nem kizárólag az én munkámon alapulnak.

Az általam vizsgált fehérjék előállítását és tisztítását részben *Szabó Mária*, *Stráner Pál* és *Taricska Nóra* végezte csoportunk expressziós laborjában, részben pedig *Tóth Gábor* kutatócsoportja a Szegedi Tudományegyetem Orvosi Vegytani Intézetében. A tömegspektrometriás méréseket *Kapros Anita* végezte a Szerves Kémiai Tanszék készülékén. A CD spektroszkópiai mérések elvégzése és értékelése *Farkas Viktor* munkája. Az NMR spektroszkópiai méréseket részben *Láng András*, *Perczel András* és *Rovó Petra* végezték a Kémiai Intézet, illetve a Kar készülékein, részben pedig *Frank Lóhr*, a frankfurti Zentrum für Biomolekulare Magnetische Resonanz munkatársa végezte. Az NMR vizsgálatokat kiegészítő MD szimulációk *Karancsiné Menyhárd Dóra* munkái.

Magam végeztem az NMR spektrumok asszignációját és a dolgozatban szereplő valamennyi, NMR spektroszkópián alapuló szerkezet-meghatározást és elemzést, illetve az utóbbi időben a minták összeállítását és mérését is.

A saját munkámat mutatom be részletesen, de értelemszerűen megemlítek olyan eredményeket is, melyek mások munkáját dicsérik.

Az általam alkalmazott módszereket terjedelmi okok miatt itt csak vázlatosan tüntettem fel, a reprodukálhatóság követelményének is megfelelő részletes leírás a Függelék XI.1. fejezetében található meg.

2. Vizsgált molekulák és NMR mérések

A Tc5b, illetve a Tc6b hosszabbításával nyert molekulák elnevezésére nincsenek egyértelműen elfogadott szabályok, mivel ezek a közelmúltban csoportunkban készültek el, és még nem kerültek leírásra. [6] Angol nyelven E2, és E5 vagy E2-Trp-cage és E5-Trp-cage neveket kaptak, ami az elongated-Trp-cage kifejezés rövidítése. Magyar nyelven H2 és H5 néven szoktuk őket említeni, ami származtatható a „hosszabbított” kifejezésből vagy a hélix kifejezésből is, mivel a hélix hossza lett megnövekedve. Én H2-nek és H5-nek nevezem a molekulákat.

A mutánsok elnevezése során követett, a szakirodalomban bevett gyakorlat szerint az alapmolekula neve után a mutációkat tüntetem fel. Például a H2_A1C olyan H2 származék, melyben az 1. pozícióban lévő alanin ciszteinre lett cserélve.

Az irodalomban már szereplő [6] H2 és H5 mutációjával két Cys került beépítésre, melyek egy szerkezetstabilizáló diszulfidhidat alkotnak. Ezek a molekulák kapták a H2_SS_ox és a H5_SS_ox elnevezéseket. A diszulfidhidas molekulák mérése után *in situ* redukcióra került sor, így jutottunk a H2_SS_red, illetve a H5_SS_red molekulákhoz. A redukció menetét részletesen leírtam a Függelék XI.1. fejezet q) pontjában.

Rajtam kívül álló okokból a referencia (H2 és H5) molekulák a Tc6b származékai, míg a ciszteint tartalmazó molekulák a Tc5b-ből származtathatóak. A kettő között tehát egy nem tervezett **D/E** mutáció a különbség, ez pedig nyilván megkérdőjelezi az összehasonlítás hihetőségét. Emiatt a közelmúltban elvégeztem a Tc6b-alapú, ciszteint tartalmazó molekulák vizsgálatát is, hogy a kép teljes legyen. Megkülönböztetésül a Tc6b-alapú molekulákat **CEC**, a Tc5b alapúakat pedig **CDC** jelöléssel láttam el. A dolgozat megírásakor a CEC molekulák mérési eredményei már rendelkezésre állnak, az adatok feldolgozásával azonban még nem végeztem, így azokat nem tudom jó szívvel szerepeltetni a dolgozatomban, csupán azon adatokat tüntetem fel, melyek helyességéről meg vagyok győződve. Abban azonban már egészen biztos vagyok, hogy a D/E csere nem okozott jelentős változást, és semmiben nem befolyásolta a korábban levont következtetéseimet. Ennek ellenére akkor fogom precíznek gondolni a munkámat, ha a CEC molekulák minden adata fel lesz dolgozva.

Később, a redukált ciszteinek szerkezetstabilizáló hatásának vizsgálata céljából olyan mutánsokkal kezdtünk foglalkozni, melyekben csak az egyik, vagy csak a másik cisztein került beépítésre: H2_A1C, H5_A4C és H5_S25C. Ezek mind Tc6b-alapú molekulák, tehát a kritikus pozícióban **E** van bennük.

Sajnos a H5 ezen származékainak NMR mérése során nem vettem figyelembe a szabad SH csoportok reaktív jellegét, és így az NMR mérés során intermolekuláris diszulfidhidak alakultak ki – tehát egyfajta dimerek képződtek – emiatt a spektrumokat nem tudtam értékelni. A méréseket ezért redukálószer jelenlétében szeretném megismételni, H5_S25C-ből azonban egyelőre nem áll rendelkezésemre minta, a H5_A4C pedig olyan mértékben aggregálódik, hogy eddig nem sikerült mérhető mintát készítenem.

Ebből okulva a H2_A1C mérése során eleve hozzáadtam a mintához a diszulfidhid redukciójára szolgáló reagenst (TCEP), így a mérés során nem képződtek dimerek.

A következő minifehérjéket vizsgáltam.

H2	AV RLYIQ WLKEG GPSSG RPPPS
H2_SS (CDC)	CV RLYIQ WLKDGPSSG RPPPC
H2_SS (CEC)	CV RLYIQ WLKEG GPSSG RPPPC
H2_A1C	CV RLYIQ WLKEG GPSSG RPPPS
H5	EEEAV RLYIQ WLKEG GPSSG RPPPS
H5_SS (CDC)	EEECV RLYIQ WLKDGPSSG RPPPC
H5_SS (CEC)	EEECV RLYIQ WLKEG GPSSG RPPPC
H5_A4C	EEECV RLYIQ WLKEG GPSSG RPPPS
H5_S25C	EEEAV RLYIQ WLKEG GPSSG RPPPC

Mivel munkám folyamatban lévő kutatás, egyelőre nem minden vizsgálat eredménye van feldolgozva. Emiatt a H2, H2_SS_ox/red, valamint a H5, H5_SS_ox/red molekulák CDC variánsainak esetében teljeskörű, elkészült elemzést tudok bemutatni, azonban a H2_A1C, H5_A4C és a H5_S25C, illetve a CEC variánsok esetében csak részeredmények állnak rendelkezésre.

A vizsgált molekulákról rendelkezésre álló méréseket az 1. táblázatban foglaltam össze. Ebben a táblázatban „Bp” a Természettudományi Kar 700 MHz-es spektrométerén, „Fr” pedig a *Frank Löhr* által Frankfurtban, a Zentrum für Biomolekulare Magnetische Resonanz 600 MHz-es készülékén felvett méréseket jelöli.

A mérések alapvetően 288 K-en készültek, értelemszerűen a hőmérsékletfüggő [^{15}N - ^1H]-HSQC és a 300 K-en felvett CPMG kivételével. A spektrométerek a hőmérsékletek tekintetében a Bruker által ajánlott metanol-d₄ eljárással lettek kalibrálva.

1. táblázat: A mérések összesítése

	^1H - ^1H (COSY, TOCSY, NOESY)	^{13}C HSQC	^{15}N HSQC	3D (TOCSY - ^{15}N HSQC, NOESY - ^{15}N HSQC)	dinamika (T_1 , T_2 , hetNOE)	CPMG (288 K)	CPMG (300 K)	hőmérsékletfüggő HSQC	DOSY
H2	Bp								Bp
H2_SS_ox (CEC)	Bp								Bp
H2_SS_ox (CDC)	Bp								
H2_SS_red (CEC)	Bp								Bp
H2_SS_red (CDC)	Bp								
H2_A1C	Bp								Bp
H5	Bp		Fr		Fr	Fr	Fr	Bp (277-315 K, 500 MHz)	Bp
H5_SS_ox (CEC)	Bp								Bp
H5_SS_ox (CDC)	Bp	Bp	Fr	Fr	Fr	Fr		Fr (277-327 K)	
H5_SS_red (CEC)	Bp								Bp
H5_SS_red (CDC)	Bp		Fr	Fr	Fr	Fr	Fr	Fr (277-327 K)	
H5_A4C									Bp

Megjegyzés: Az 1. táblázatban szürke háttérrel jelölt mérések feldolgozása folyamatban van, így ezek eredménye a dolgozatban csak korlátozottan szerepel.

3. Tömegspektrometriás mérések

A munkám során felhasznált valamennyi tömegspektrometriás mérést *Kapros Anita* végezte el, az eredményeket azonban magam elemeztem.

Ezen mérések célja egyfelől a liofilizált minta tisztaságának ellenőrzése a mérés előtt, másrésről pedig a mérést követően, az NMR mintából is szoktunk MS-t mérni. Utóbbiból ellenőrizni tudom, hogy a redukálószerként alkalmazott TCEP redukált alakja nem fogyott-e el, és így nem alakulhattak-e ki nemkívánatos diszulfidhidak. Emellett a fehérjemolekula csúcsai alapján is ellenőrizni tudom, hogy nem képződtek-e esetleg kovalens, diszulfidhidas dimerek, vagy nem alakult-e ki intramolekuláris diszulfidhíd. Utóbbi a mindösszesen 2 Da-os tömegkülönbség és a nem túl jó felbontás miatt nem lehetett egyértelműen kizárni, ezért egy modellkísérletben az NMR mérést követően *N*-etilmaleimiddel származékot képeztünk [21], és így már egyértelműen igazolható volt a tömegspektrum alapján a mintában a szabad SH-csoportok jelenléte, tehát a nemkívánatos diszulfidhidak képződését kizárhattuk.

4. A spektrumok feldolgozása

A H2 és a H5 molekulák homonukleáris asszignációja, valamint az ehhez tartozó ^1H eltolódás-, és kényszerfeltétel-listák és a szerkezeti koordináták teljes egészében az irodalomban szereplő adatok. [6] ezeket kutatócsoportunkban *Rovó Petra* végezte, de mivel ezen mérések 277 K-en készültek, a kísérleteket 288 K-en megismételtem, de még nem dolgoztam fel.

A H2_SS és a H5_SS molekulák oxidált és redukált alakjainak, illetve a H2_A1C minden mérését, valamint a H5 dinamikai méréseit magam dolgoztam fel. A CEC molekulákat ugyancsak magam dolgozom fel.

A H5_A4C és a H5_S25C mérése során sajnálatos módon intermolekuláris diszulfidhíd kialakulásával dimerek képződtek, ezt MS-sel igazoltuk. Emiatt ezen spektrumokat ugyan nagyrészt asszignáltam, az eredmények viszont használhatatlanok, így ezen méréseket redukálószer jelenlétében tervezzük megismételni.

A H2 származékokból még nem készült ^{15}N jelölt minta, így heteronukleáris mérések elvégzésére és a dinamika vizsgálatára nem volt lehetőségünk. A H5 dinamikája szerepel az irodalomban, de mivel azok az adatok 500 MHz-en és 277 K-en felvett méréseken alapulnak, a H5 dinamikai méréseit is megismételtük a H5_SS molekulákéval azonos körülmények között, és ezen mérések adatait már magam dolgoztam fel. Ehhez a H5 irodalmi eltolódásait vettem alapul. [6] Az eltérő hőmérséklet és térerő miatt az általam kapott eredmények értelemszerűen különböznek az irodalmi adatoktól.

Az általam feldolgozott valamennyi 2D és 3D spektrum asszignációját Sparky 3.114 szoftverrel [22] végeztem, és valamennyi adatot, valamint spektrumképet a Sparky megfelelő funkcióival írtam ki. A Sparkyból kiírt adatokat Microsoft Office Excel 2007 és Origin 6.0 segítségével dolgoztam fel.

A szerkezetszámolást CNS 1.1 programcsomaggal végeztem [23], a szerkezeteimet pedig iCING szerkezetelemző-validáló szoftvercsomaggal [24] ellenőriztem. A kész szerkezetekről UCSF Chimera 1.7 segítségével [25] készítettem képeket.

5. A szerkezeti adatok elemzése

Amellett, hogy a vizsgált molekulák szerkezetét az NMR mérések alapján meghatároztam, a szerkezeteket több szempontból is elemeztem. Ez egyrészt a spektrumokból nyert nyers adatok elemzését jelenti, másrészt pedig az általam készített szerkezetek elemzését.

A fentebb már említett okokból kifolyólag ebben az elemzésben csak hat molekula szerepel.

a) Másodlagos kémiai eltolódások összevetése

Mivel az általam vizsgált négy molekulában összesen 514 eltolódást határoztam meg, a H2 és H5 molekulák kapcsán pedig további 243 eltolódást kellett feldolgoznom, olyan mennyiségű adathoz jutottam, melynek kezelése rendkívül bonyolulttá vált, és valamennyi kémiai eltolódás összevetése szinte megoldhatatlan feladat lett volna. Különösen azért, mert pusztán a kémiai eltolódások összevetéséből alapvetően nem könnyű szerkezeti következtetéseket levonni. Ez alól kivételt jelentenek a gerincatomok eltolódásai, melyek egyrészt jobban összevethetőek, másrészt pedig ezek kémiai eltolódása teljesen egyértelmű összefüggést mutat a lokális gerinckonformációval.

A gerincnitrogének, valamint a HN és a H α hidrogének kémiai eltolódásait hasonlítottam össze oly módon, hogy meghatároztam a különböző molekulák megfelelő atomjainak másodlagos kémiai eltolódását (CSD), és ezt vetettem össze (VIII.4. fejezet, d) pont).

A CSD értékeket úgy kaptam, hogy a spektrumban asszignált kémiai eltolódásból kivontam a megfelelő random coil referencia eltolódást. Referenciaként ^1H magokra a *Wütrich és mts.* által meghatározott [18], majd *Fesinmeyer és mts.* által módosított [19] random coil eltolódásokat, ^{15}N magok esetén pedig *Kjaergaard és mts.* adatait [26] használtam fel.

A CSD értékeket a szekvencia függvényében ábrázoltam, és ebből igyekeztem következtetéseket levonni a szerkezetek különbségeire vonatkozóan.

Fontos megemlíteni, hogy a CSD értékeket a szerkezet jóslására is felhasználhatjuk, ugyanis a szekvencia függvényében ábrázolva az adatokat, jól látható, hogy mely fragmens rendezetlen,

melyik helikális, melyik redő. Rendezetlen fehérjék vizsgálata során, amikor nem lehet szerkezetet meghatározni, igen informatív tud lenni a CSD-ken alapuló becslés.

Mivel munkám során valamennyi vizsgált molekula szerkezetét meghatároztam, nekem becslésre nem volt szükségem. Értelemszerűen megnyugtató, hogy az általam számolt szerkezetek korrelálnak a CSD adatok alapján várható struktúrával, de nem ez volt a fő célom.

Elsősorban arra szolgált a CSD adatok elemzése, hogy a hasonló szerkezetek között mutatózó kisebb-nagyobb eltéréseket egyértelműen azonosítani tudjam, ugyanis a szerkezetek „vizuális elemzése” nyilvánvalóan nem teljesen objektív. A CSD adatok összevetésével viszont egyrészt alátámasztottam azokat a megállapításaimat, melyek első ránézésre is nyilvánvalóak, másrészt számos egyéb apró különbséget fedeztem fel.

b) Másodlagos kémiai eltolódásokból meghatározott paraméterek

Az irodalomban létezik néhány olyan paraméter, melyeket a Trp-kalitka szerkezet „jóságának”, tehát a molekula rendezettségének, stabilitásának jellemzésére szoktak megadni. Ezen paraméterek egy része irodalmi eredetű [27], de a csoportunkban zajló Trp-kalitka vizsgálatok során ezek kis mértékben módosultak, illetve újak kerültek bevezetésre *Rovó Petra* munkája nyomán. [12]

Megfigyelték, hogy néhány konkrét CSD érték jól jellemzi a Trp-kalitka rendezettségét. Ezek az eltolódások a L12 H α , G16 H α 2, P17 H β 1, R21 H α , P23 H α , P23 H β 1, P24 H δ 1, P24 H δ 2, illetve *Rovó Petra* munkáiban a W11 H ϵ 1. Mivel ezek a CSD értékek külön-külön is jól jellemzik a Trp-kalitka jellegét, ezek abszolútérték-összege különösen jó mérőszám, így ezt elnevezték CSD_{cage} értéknek. Minél nagyobb ez a szám, annál jobban feltekeredett a fehérje, annál jellegzetesebb a Trp-kalitka.

Ehhez hasonlóan néhány eltolódás, a Y8 H α , a Q10 H α , a W11 H α és a K13 H α CSD értékei a helicitást jellemzik, így az ezek abszolútérték-összegeként kapott CSD_{helix} érték jó mérőszáma a molekula helikális jellegének.

A CSD_{cage} mérőszám alkalmazhatóságát azonban sajnos jelentősen csökkenti, hogy bizonyos molekulákban nem minden eltolódást lehet asszignálni. A hiányzó értékek értelemszerűen összehasonlíthatatlanná teszik az összegeket, ezért bevezették az $X_{\text{f(cage)}}$ értéket, mely a CSD_{cage} értéktől abban különbözik, hogy csak azokat az eltolódásokat veszi figyelembe, melyeket minden molekulában lehet asszignálni. Ezek a L12 H α , P17 H β 1, R21 H α , P23 H α , P24 H δ 1, P24 H δ 2 és a W11 H ϵ 1. Ezt az abszolútérték-összeget osztjuk egy referencia értékkel, így egy viszonyszámot kapunk. Referenciaként a Tc5b-t alkalmaztam, mivel korábban ezt tekintettük a „legtökéletesebben” feltekeredett szerkezetnek, így minden más molekulára

1,00-nál kisebb számot kaptunk [28]. Időközben találtam még „tökéletesebb” szerkezeteket, ennek ellenére egyelőre megmaradt referenciaként a Tc5b. Lényegében nincs jelentősége, hogy mit tekintünk referenciának, az összevethetőséget nem rontja, ha kapunk 1,00-nál nagyobb értékeket is.

Ehhez hasonlóan bevezették az $X_f(\text{helix})$ értéket is, amely mindazon eltolódásokat figyelembe veszi, mint a $\text{CSD}_{\text{helix}}$ érték, de könnyebben összevethetővé teszi az adatokat.

Az $X_f(\text{cage})$ és az $X_f(\text{helix})$ értékek egy megfelelő referenciát választva alkalmasak a folded/unfolded (feltekeredett és rendezetlen) populációk arányának becslésére. Ebben az esetben viszont már valóban nehezen értelmezhető az 1,00-nál nagyobb érték. Ennek ellenére első megközelítésben a referencia választásától függetlenül igaz, hogy a nagyobb szám jelente: nagyobb a feltekeredett populáció aránya.

Ezekon kívül a Trp-kalitkát jól jellemzi a G16 H α 2 extrém kémiai eltolódása, vagy a G16 két H α eltolódásának különbsége, mely abból adódik, hogy a magok a Trp-oldallánc aromás árnyékolási kúpjába kerülnek, de a két mag a köztük lévő távolság miatt számottevően különböző mértékben hat kölcsön az árnyékolási kúppal. Ezen két eltolódás különbsége önmagában is jól jellemzi a szerkezetet, és jól korrelál a fenti négy mérőszámmal, így ezt a különbséget is bevezették szerkezetek összehasonlítására. [27]

Én magam az általam vizsgált molekulákon megfigyeltem, hogy a diszulfidhíd redukciója szignifikánsan megváltoztatja a Y8 HN eltolódását, így ezzel az értékkel elsősorban az oxidált és redukált molekulák közti különbség jellemezhető. Emiatt én a saját molekuláim jellemzésére bevezettem ennek a magnak a CSD értékét is (VIII.4. fejezet, c) pont).

c) Szerkezetek elemzése iCING szoftvercsomag segítségével

Az iCING szoftvercsomag egy olyan, kifejezetten NMR spektroszkópiai fehérjeszerkezetek elemzésre kifejlesztett felület, mely egy webszerveren számos ismert és széles körben alkalmazott szoftverrel vizsgálja a feltöltött szerkezetet. [24]

A szoftvercsomag elképesztő mennyiségű kimeneti adatot generál, ezek nagyobb részét egyelőre nem tudom értelmezni. Három célra azonban így is kiválóan alkalmasnak bizonyult az iCING.

Az iCING beépítve tartalmazza a Procheck nevű szoftvert [29], mely a bemeneti szerkezet konformációs adatait veti össze egy meglehetősen nagy adathalmaz, a PDB adatbázis elemeivel. Lényegében azt vizsgálja, hogy a feltöltött szerkezet konformációs adatai mennyire „szokványosak”. Fontos tehát, hogy nem minősíti a szerkezetet aszerint, hogy „jó” vagy „rossz”, csupán arra hívja fel a felhasználó figyelmét, hogy bizonyos konformációs szögek

„szokatlanok”. Az így kapott adatokat, mint minden statisztikát, megfelelő kritikával kell szemlélni, de olyan szempontból mindenképp rendkívül hasznos, hogy felhívja a figyelmet azokra a régiókra, melyeket esetleg újra meg kell vizsgálni. Ezeket a kimeneti adatokat az ún. Ramachandran-diagramon rajzolja ki, mely egy olyan koordináta-rendszer, amiben a két tengelyen a gerinckonformációt jellemző ϕ és ψ szögek helyezkednek el. Míg bizonyos ϕ - ψ szögpárok gyakoribbak, addig mások kevésbé könnyen valósulnak meg. A felület minden egyes pontja megfelel egy-egy ilyen szögpárnak, és bizonyos régiók kedvezőbbek, mások kedvezőtlenebbek.

Dolgozatomban valamennyi szerkezet és a megfelelő szerkezetsokaságok Ramachandran-grafikonjait feltüntettem (Függelék XI.3. fejezet). Ezeken is jól látható, hogy vannak statisztikailag kedvezőtlen konformációk is, de a fentiek tükrében ezt nem gondolom problémának.

A másik, általam használt funkciója az iCING szoftvercsomagnak, hogy megkeresi a szerkezetben a sóhidakat, szerkezetsokaság esetén pedig azt is feltünteti, hogy a szerkezetek mekkora részében található meg az adott szerkezetstabilizáló elem (VIII.4. fejezet, e) pont).

A harmadik funkció az RMSD adatok meghatározása. Az RMSD érték arról nyújt információt, hogy a szerkezetsokaság elemei mennyire hasonlóak. Az RMSD érték a szerkezetekben megtalálható atomok koordinátáinak Å-ben kifejezett szórása. Ezt meghatározzuk valamennyi atomra, és külön a gerincatomokra is. Értelemszerűen minél kisebb az RMSD érték, annál jobban definiált, annál stabilabb szerkezetről beszélhetünk. Ha az érték nagy, az azt jelenti, hogy a szerkezet lazább, destabilizált. Az RMSD értékek igen szemléletesen alátámasztják a más következtetések alapján tett megállapításaimat (VIII.4. fejezet, f) pont).

d) NOE kényszerfeltételek összevetése

Mivel az általam meghatározott négy szerkezetben összesen 2322 NOE kényszerfeltételt határoztam meg, és ezt a H2 és H5 molekulák 587 további kényszerfeltételével együtt kellett vizsgálnom, a tételes összevetés értelemszerűen lehetetlen volt. Emiatt a szerkezetek jellemzésére csupán a kényszerfeltételek számát használtam fel. Ennek elvi alapja, hogy minél több kényszerfeltételt prediktál egy spektrum, annál rendezettebb, annál stabilabb szerkezetre számíthatunk. Ezt a képet értelemszerűen azért több szempontból is szükséges árnyalni, és mivel ezt nem tudtam egzakt módon megoldani, az a véleményem, hogy az általam közölt számadatok és ezek összevetése nem tekinthetőek a szerkezetek egzakt jellemzésének, mindazonáltal önmagukért beszélnek, és jól korrelálnak a más szempontok alapján meghatározott adatokkal.

Az egyik fontos tényező, hogy a kényszerfeltételek száma nyilvánvalóan függ az aminosavak számától, ugyanakkor viszont nem lehet a kapott adatokat egyszerűen az aminosavak számával osztva normálni, hiszen a szekvencia hosszának növelésével nyilvánvalóan nem lineárisan nő a kényszerfeltételek száma.

A másik, a számokat árnyaló körülmény, hogy nem minden NOE kényszerfeltétel bír azonos szerkezet-prediktáló hatással. Ezt úgy próbáltam figyelembe venni, hogy a feldolgozás során nem csak a kényszerfeltételek számát adtam meg, hanem aszerint csoportosítva is megszámloltam őket, hogy szekvenciálisan milyen távoli aminosavak között hatnak. Nyilvánvaló ugyanis, hogy az egyazon aminosav két atomja közötti ún. $i+0$ -ás kényszerfeltétel csak igen ritka esetben jelent bármi többlet szerkezeti információt az aminosavak egyszerű geometriájához képest. A szomszédos aminosavak közötti ún. $i+1$ -es, vagy más néven szekvenciális kényszerfeltételek sokszor ugyancsak jelentéktelenek a térszerkezet szempontjából. Valójában az $i+3$ -as kényszerfeltételektől kezd szerkezeti szempontból igazán informatív lenni a lista, hiszen például egy α -hélixben számos $i+3$ -as kényszerfeltétel jelenik meg. Az ún. távoli - tehát egymástól szekvenciálisan távoli aminosavak között ható - NOE kényszerfeltételek már igen nagymértékben hozzájárulnak a szerkezethez, így ezeknek kitüntetett jelentősége van.

Fontos megjegyezni, hogy a szerkezet-meghatározás szempontjából jelentéktelen, vagy kevéssé jelentős $i+0$ -ás, illetve $i+1$ -es kényszerfeltételek sem feleslegesek, az asszignáció során ugyanis ezek teszik lehetővé az egyes aminosavak azonosítását és szekvencia szerinti sorba rendezését.

A NOE kényszerfeltételek összeszámolása tehát nem igazán egzakt jellemzése a szerkezeteknek, de a más módszerekkel nyert adatok kiegészítésére, alátámasztására jól felhasználható (VIII.4. fejezet, g) pont).

e) Oxidált és redukált szerkezetek összevetése

Az oxidált és redukált szerkezetek között már ránézésre is számos jelentős különbség mutatkozik, a korrekt elemzés érdekében azonban összegyűjtöttem azokat az eltolódásokat, melyekben számottevő különbség van az oxidált és a redukált szerkezetek között (Függelék XI.2. fejezet). Ez az adatsor elsősorban azt szemlélteti, hogy a diszulfidhíd redukciója nem kizárólag a Cys-ek közvetlen környezetében okoz változásokat, hanem a molekula egész szerkezetére hatással van.

6. Dinamikai mérések feldolgozása

Dinamikai mérések csak a H5, valamint a H5_SS_ox/red molekulákról készültek.

A rendelkezésemre álló T_1 és T_2 relaxációs, valamint heteronukleáris NOE (hetNOE) mérések alapján meghatároztam az R_1 , R_2 és hetNOE paramétereket, ezek alapján kiszámítottam a spektrális sűrűségfüggvények $J(0)$, $J(\omega_H)$ és $J(\omega_N)$ értékeit, illetve a Tensor 2.0 szoftver [30] segítségével Lipari-Szabó-féle analízist végeztem. Az általam alkalmazott módszerek részletesen szerepelnek a Függelék XI.1. fejezetében.

Mindhárom molekulára végeztünk CPMG méréseket, de ezek kvantitatív értékelésére még nem került sor. A kvalitatív értékelés menetét leírtam a Függelék XI.1. fejezet l) pontjában.

Vizsgáltuk a molekulák [^{15}N - ^1H] HSQC spektrumainak hőmérsékletfüggését is (mivel a közelmúltban csoportunkban érdekes vizsgálatokat folytattak ennek értelmezésére vonatkozóan [31]), a kvantitatív értékelésre azonban még itt sem került sor. A hőmérsékletfüggő HSQC spektrumok a Függelék XI.3. fejezet d) pontjában találhatók.

7. DOSY mérések feldolgozása

A DOSY mérések feldolgozása elvileg két fázisra bontható. Az elsőben meghatározzuk a molekula diffúziós állandóját, a másodikban pedig a diffúziós állandóból kiszámíthatjuk a molekula méretét alapvetően jellemző moláris tömeget.

Valamennyi vizsgált molekuláról végeztem DOSY méréseket, és minden esetben meghatároztam a diffúziós állandót a Bruker TopSpin 3.2 relaxációs moduljának segítségével.

Kísérletet tettem a moláris tömegek számítására [20], itt azonban nyilvánvalóan nagyságrendileg sem helyes adatokat kaptam, így ezek az értékek nem is szerepelnek a dolgozatomban. Ennek oka véleményem szerint az, hogy a molekulaméret meghatározása során több olyan értéket is használnom kellene – dinamikai viszkozitás, hidratációs korrekciós faktorok, alaktényező – melyeket nem ismerek, az irodalmi analógiák alapján becsült értékek pedig valószínűleg nagyon hibásak. Tapasztalatom szerint az általam használni próbált egyenlet különösen érzékeny az alaktényezőre, ezt pedig legfeljebb becsülni tudom, ráadásul ez nyilvánvalóan nagyban függ attól, hogy melyik szerkezet mennyire kompakt, illetve mekkora a fel-, és letekeredett populáció aránya.

A fenti nehézségek miatt úgy döntöttem, hogy megelégszem azzal, hogy meghatároztam a diffúziós állandókat, majd ezek hatványozásával előállítottam egy olyan számot, mely arányos a molekulamérettel (csak a korrekciós faktorokban tér el).

Ezek az értékek önmagukban nyilván semmitmondóak, egymással összevetve azonban információt kaphattam a vizsgált molekulák egymáshoz viszonyított relatív méretéről, és ezen adatok szépen korrelálnak az egyéb eredményeimmel.

Próbálkozásaimat a Függelék XI.1. fejezetének n) pontja tartalmazza.

VIII. Eredmények

1. Előzetes célkitűzés

Alapvető célkitűzésünk volt annak vizsgálata, hogy ha a H5-be diszulfidhidat építünk be oly módon, hogy azzal a molekula térben elvileg amúgy is közeli láncvégeit kötjük össze – tehát a természetes konformációt rögzítjük –, akkor a diszulfidhíd beépítése, illetve redukciója milyen hatással lesz a molekula térszerkezetére és stabilitására nézve.

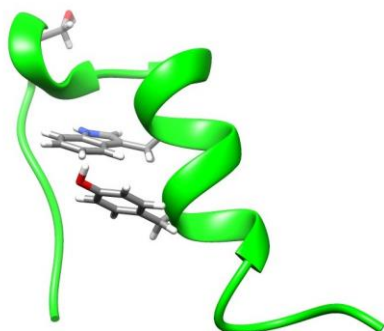
Arra számítottunk, hogy a diszulfidhíd beépítésével nagymértékben stabilizálódik a szerkezet – hiszen összekötjük a láncvégeket, megakadályozva ezzel a letekeredést – a redukcióval pedig szerkezeti szempontból visszakapjuk az eredeti, ciszteint nem tartalmazó molekulát.

a) A H5 szerkezete

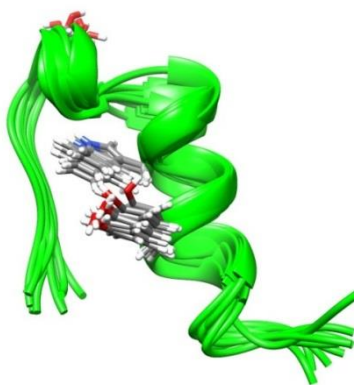
A H5 szerkezetét *Rovó Petra* határozta meg. Én az irodalomban szereplő átlagszerkezetet (4. ábra) és egy 9 elemből álló szerkezetsokaságot (5. ábra), valamint az eltolódás-, és kényszerfeltétel-listát használtam fel. [6] Az elemzést, és az ehhez szükséges adatok generálását magam végeztem.

A szerkezet viszonylag jól definiált, de már a szerkezetsokaságot ábrázoló képen is jól látszik, hogy az egyes szerkezetek között van számottevő eltérés. A gerinc RMSD-je 0,78 Å, a teljes RMSD pedig 1,40 Å.

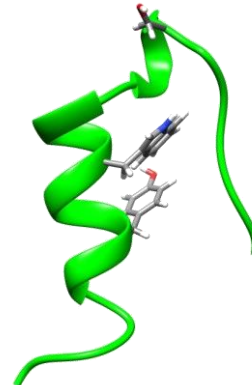
A szerkezet a H5_SS molekulakéval összehasonlítva egyértelműen sokkal lazább. Ezt bizonyítja a nagyobb RMSD érték mellett az, hogy – a H5_SS_ox/red molekulákkal ellentétben – a S19 HG jele nem látszik a spektrumban, a molekula szerkezetében pedig megfigyelhető, hogy az OH csoport a molekula felszínén kifelé néz (6. ábra).



4. ábra: A H5 szerkezete



5. ábra: A H5 9 elemű szerkezetsokasága

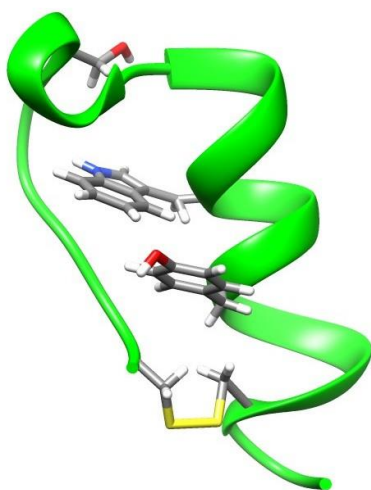


6. ábra: A S19 HG helyzete a H5-ben

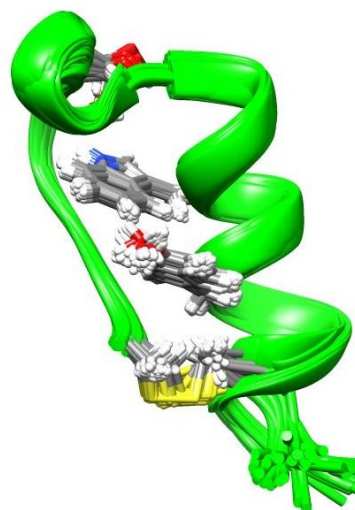
b) A H5_SS_ox szerkezetének vizsgálata

A H5_SS_ox szerkezetét homonukleáris spektrumok alapján határoztam meg, a szerkezet finomításához azonban felhasználtam TOCSY- ^{15}N - ^1H]-HSQC és NOESY- ^{15}N - ^1H]-HSQC spektrumokat is.

Készítettem egy átlagszerkezetet 75 db, azonos kényszerfeltétel-lista alapján számított szerkezet átlagolásával (7. ábra) és egy 75 elemből álló szerkezetsokaságot (8. ábra).



7. ábra: A H5_SS_ox szerkezete

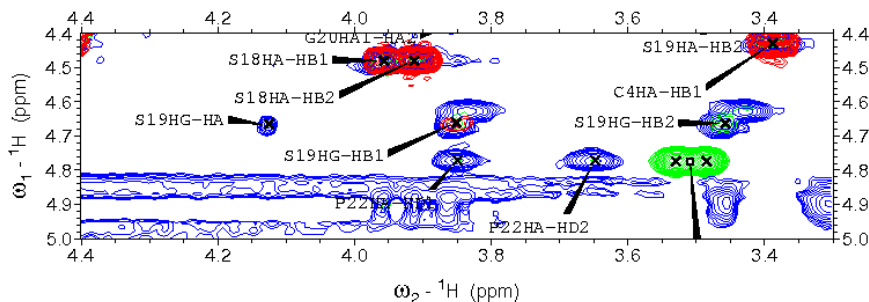


8. ábra: A H5_SS_ox 75 elemű szerkezetsokasága

A szerkezet jól definiált, a szerkezetsokaságot ábrázoló képen is jól látszik, hogy az egyes szerkezetek között nem mutatkozik nagy eltérés. A gerinc RMSD-je 0,56 Å, a teljes RMSD pedig 1,24 Å. A szerkezetek között nagyobb eltérés csak az E1-E3 szakaszon figyelhető meg, hiszen ezt a szakaszt már nem stabilizálja a diszulfidhíd.

A szerkezet alapvetően két érdekességgel szolgált. Az egyik az, hogy az α -hélix elején egy meglehetősen szokatlan kanyar található. Itt a hélix egy kissé ki van tekeredve, tehát ezen a szakaszon nagyobb a hélix sugara és menetmagassága, mint máshol. Megállapítható tehát, hogy a diszulfidhíd kissé szokatlan pozícióban stabilizálja a hélix elejét, tehát egyáltalán nem olyan a molekulának ez a szakasza, mint amilyen diszulfidhíd nélkül lenne.

A másik érdekesség, hogy a spektrumban látszik a S19 HG jele (9. ábra).



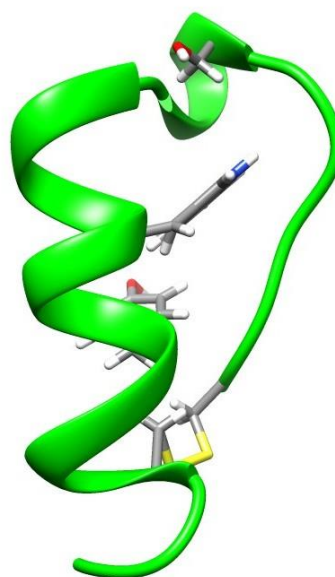
9. ábra: A S19 HG jelei a H5_SS_ox spektrumában

Ez azért érdekes, mert a disszociálisan protonok - például COOH, vagy OH csoportok - protikus oldószerben igen ritkán adnak jelet, hiszen gyorsan cserélnek az oldószer protonjaival, így a jel kiszélesedik, eltűnik. Ennek megfelelően a Trp-kalitikák spektrumaiban nem szokott jelet adni sem a Tyr, sem a Ser-ek OH protonja.

Ha mégis látszik egy disszociálisan proton jele, az annak bizonyítéka, hogy az oldószer protonjaival való csere gátolt. Fehérjék esetében ez arra vezethető vissza, hogy az adott csoport a molekula belsejében, egy hidrofób környezetben el van temetve, és emiatt az oldószer molekuláival való protoncsere lehetetlen.

Ebben az esetben is arról van szó, hogy az adott OH csoport a molekula belsejébe fordul, és – a spektrum alapján – az oldószer nem fér hozzá. Mivel Trp-kalitikák irodalmában ilyet még nem találtam, úgy tűnik, hogy minden eddiginél nagyobb hidrofóbicitású magot, tehát minden eddiginél nagyobb stabilitású Trp-kalitikát sikerült előállítani.

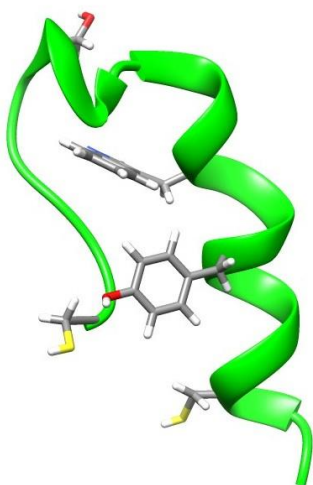
Ez egy közvetett, de igen egyértelmű bizonyítéka a diszulfidhíd szerkezetstabilizáló hatásának.



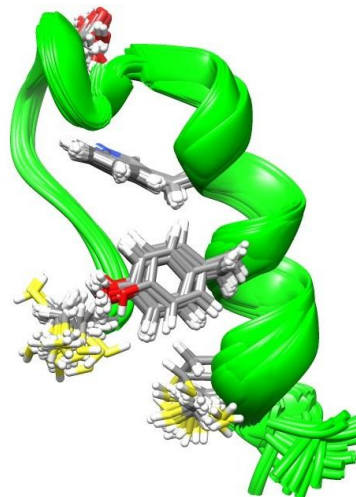
10. ábra: A S19 HG helyzete a H5_SS_ox-ban

c) A H5_SS_red szerkezetének vizsgálata

A H5_SS_red szerkezetét homonukleáris spektrumok alapján határoztam meg, a szerkezet finomításához azonban felhasználtam TOCSY- $[^{15}\text{N}-^1\text{H}]$ -HSQC és NOESY- $[^{15}\text{N}-^1\text{H}]$ -HSQC spektrumokat is. Készítettem egy átlagszerkezetet 53 db, azonos kényszerfeltétel-lista alapján számított szerkezet átlagolásával (11. ábra) és egy 53 elemből álló szerkezetsokaságot (12. ábra). A szerkezet jól definiált, noha nem annyira, mint a H5_SS_ox. A gerinc RMSD-je 0,62 Å, a teljes RMSD pedig 1,35 Å.



11. ábra: A H5_SS_red szerkezete



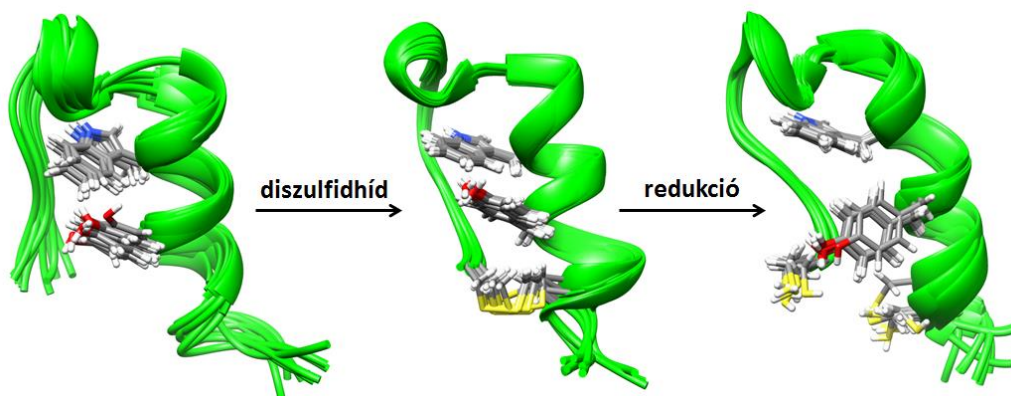
12. ábra: A H5_SS_red 53 elemű szerkezetsokasága

Érdekes módon a redukált szerkezet ugyan lazább az oxidáltnál, de nem olyan mértékben, mint amit a H5 szerkezete alapján várnánk. Ezt bizonyítja az is, hogy a S19 HG jele ebben a spektrumban is látszik, noha a szerkezet alapján nyilvánvaló, hogy sokkal kevésbé van eltemetve, mint az oxidált molekulában.

2. Részeredmények

A H5 és a H5_SS_ox/red molekulák vizsgálatával kapott eredményeink nem voltak meglepőek olyan szempontból, hogy előzetes várakozásainknak megfelelően a diszulfidhíd beépítése valóban nagymértékben stabilizálódott a molekula, a diszulfidhíd redukciója pedig valóban destabilizációt eredményezett.

Meglepő tapasztalat volt azonban, hogy a redukcióval egyáltalán nem kaptuk vissza az eredeti, ciszteint nem tartalmazó molekula szerkezetét, hanem egy annál számottevően stabilabb struktúrához jutottunk.



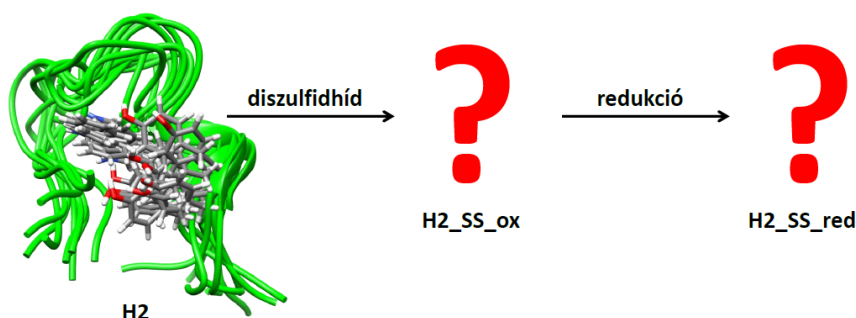
13. ábra: A H5 származékok 10 elemű szerkezetsokaságai

Arra a következtetésre jutottunk, hogy a ciszteinek a diszulfidhíd redukciója után is stabilizálják a szerkezetet.

3. Célkitűzés bővítése: H2 származékok vizsgálata

Mivel a H5_SS_red stabilitása meglepő eredmény volt, úgy döntöttünk, hogy vizsgálatainkat egy olyan rendszeren folytatjuk, melyen a diszulfidhíd és a redukált ciszteinek szerkezetstabilizáló hatása könnyebben tanulmányozható. Erre a célra a H5-nél három aminosavval rövidebb H2-t választottuk ki, míg ugyanis a H5 már ciszteinek nélkül is jól definiált, stabil szerkezettel rendelkezik, addig a H2 erősen destabilizált.

Kérdésünk ismételten az volt, hogy a diszulfidhíd beépítése és redukciója milyen hatással lesz a szerkezetre és stabilitásra

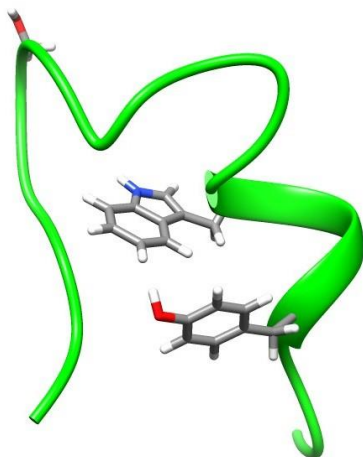


14. ábra: A H2 származékok vizsgálatának célja

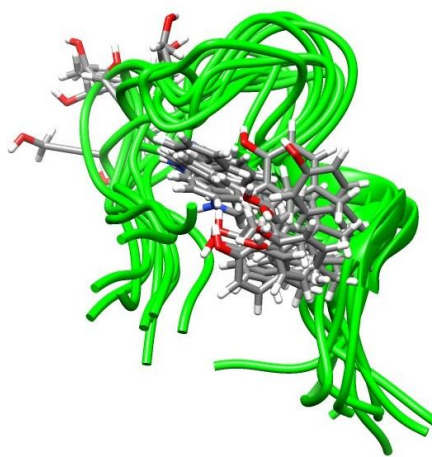
a) A H2 szerkezete

A H2 szerkezetét *Rovó Petra* határozta meg. Én az irodalomban szereplő átlagszerkezetet (15. ábra) és egy 10 elemből álló szerkezetsokaságot (16. ábra), valamint az eltolódás-, és kényszerfeltétel-listát használtam fel. [6] Ennek alapján generáltam az összevetéshez szükséges adatokat.

A molekula erősen destabilizált, ez a csupán 10 elemű szerkezetsokaságot ábrázoló képen is jól látszik. A gerinc RMSD-je 1,73 Å, a teljes RMSD pedig 2,31 Å.



15. ábra: A H2 szerkezete



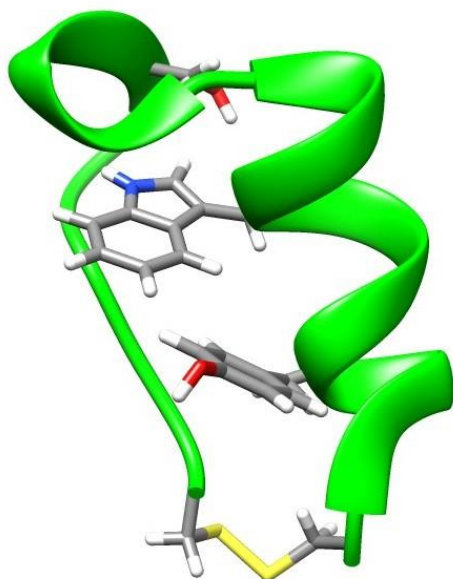
16. ábra: A H2 10 elemű szerkezetsokasága

b) A H2_SS_ox szerkezetének vizsgálata

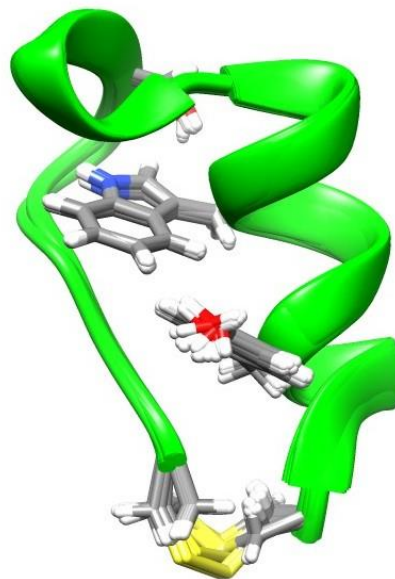
A H2_SS_ox szerkezetét homonukleáris spektrumok alapján határoztam meg.

Készítettem egy átlagszerkezetet 35 db, azonos kényszerfeltétel-lista alapján számított szerkezet átlagolásával (17. ábra) és egy 35 elemből álló szerkezetsokaságot (18. ábra).

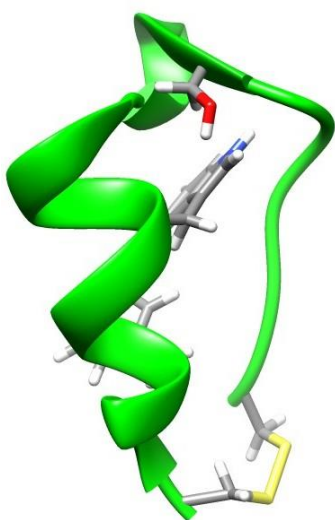
A szerkezet igen jól definiált, valamennyi vizsgált molekula - és valószínűleg valamennyi Trp-kalitka - közül egyértelműen a legstabilabb és legrendezettebb. A gerinc RMSD-je 0,11 Å, a teljes RMSD pedig 0,44 Å.



17. ábra: A H2_SS_ox szerkezete



18. ábra: A H2_SS_ox 35 elemű szerkezetsokasága



19. ábra: A S16 HG helyzete a H2_SS_ox-ban



20. ábra: A S16 HG helyzete a H2_SS_ox-ban

A H2 származékok közül egyedül ebben a molekulában látszik a S16 HG jele, ami egyértelműen összhangban van a rendkívül rendezett és stabil szerkezettel.

c) A H2_SS_red szerkezetének vizsgálata

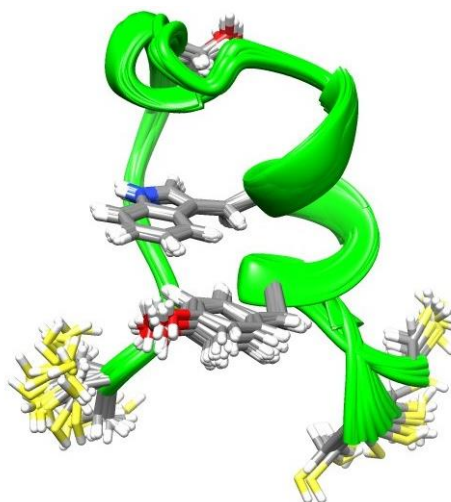
A H2_SS_red szerkezetét homonukleáris spektrumok alapján határoztam meg.

Készítettem egy átlagszerkezetet 36 db, azonos kényszerfeltétel-lista alapján számított szerkezet átlagolásával (21. ábra) és egy 36 elemből álló szerkezetsokaságot (22. ábra).

A szerkezet az oxidált molekulánál lényegesen kevésbé stabilabb. A gerinc RMSD-je 0,50 Å, a teljes RMSD pedig 0,91 Å. Mindenképp figyelemre méltó azonban, hogy a H2-höz képest sokkal stabilabb a szerkezet.



21. ábra: A H2_SS_red szerkezete

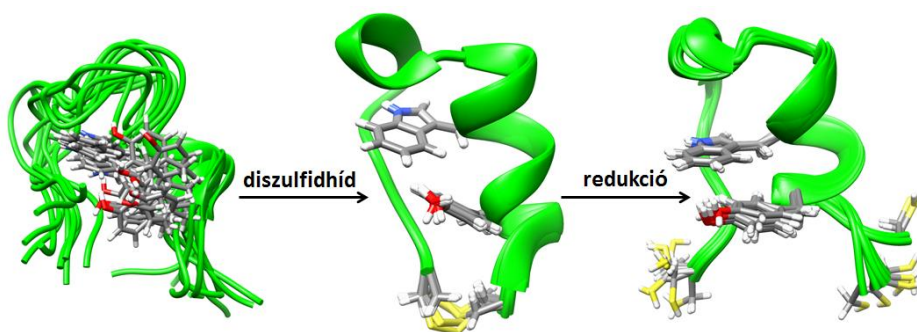


22. ábra: A H2_SS_red 36 elemű szerkezetsokasága

A molekula lazább szerkezetével is magyarázható, és a szerkezetben is jól látszik, hogy a S16 HG helyzete egészen más, mint az oxidált molekulában, ennek megfelelően a spektrumban nem látszik a jele.

4. A H2 származékok vizsgálatának tapasztalatai

A H2 származékok vizsgálata során meglepő tapasztalatokat szereztünk. Az igen erősen destabilizált H2-be diszulfidhidat építve minden eddiginél nagyobb stabilitású Trp-kalitkához jutottunk, a redukcióval pedig ugyan jelentős destabilizációt értünk el, a redukált molekula és az eredeti, ciszteint nem tartalmazó molekula szerkezetében és stabilitásában azonban hatalmas különbség mutatkozik.



23. ábra: A H2 származékok 10 elemű szerkezetsokaságai

5. A redukált ciszteinek hatásának vizsgálata

Mivel mind a H5, mind a H2 származékok vizsgálatának legérdekesebb tapasztalata az volt, hogy a ciszteinek a diszulfidhíd redukciója után is stabilizálják a molekulát, ennek további vizsgálata céljából olyan mutánsokkal kezdtünk foglalkozni, melyekbe csak az egyik, illetve csak a másik cisztein került beépítésre. Ezzel azt kívántuk eldönteni, hogy a szerkezetstabilizáló hatásért az egyik, vagy a másik, vagy mindkét cisztein együttesen felelős. Irodalmi analógiák és MD szimulációk alapján feltételezhető, hogy a C4/C1 szabad SH csoportja a C-terminális karboxillal alakít ki poláros kölcsönhatást, erre azonban bizonyítékunk nincsen, és az NMR szerkezetekkel sem egyezik maradéktalanul ez a feltevés. Ezen vizsgálataink folyamatban vannak, egyelőre csupán a H2_A1C esetében tudok részeredményeikről beszámolni.

a) A H2_A1C vizsgálata

A H2_A1C vizsgálata folyamatban van, atomi felbontású szerkezetet még nem számoltam, a kémiai eltolódások elemzéséből azonban arra következtetek, hogy a molekula szerkezete elhanyagolható mértékben különbözik a H2_SS_red molekuláétól, tehát valószínűleg helyes az a feltételezésünk, mely szerint a terminális ciszteinek nincs jelentős szerepe, hanem a lánc elején található cisztein stabilizálja a molekulát.

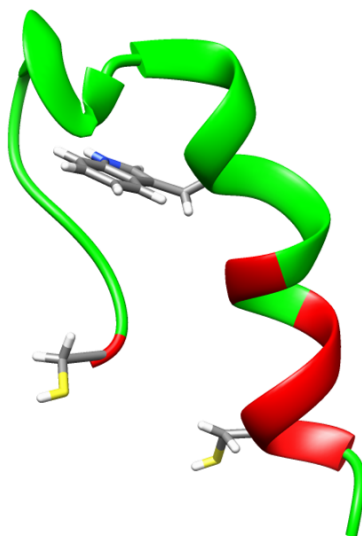
6. A H5 származékok dinamikájának vizsgálata

A H5, H5_SS_ox és a H5_SS_red esetében dinamikai méréseket is végeztünk, átfogó dinamikai elemzés készítésére azonban egyelőre nem volt mód, ehhez további mérések lennének szükségesek.

Az elvégzett dinamikai méréseket azonban feldolgoztam (a fontosabb ábrák megtalálhatóak a Függelék XI.3. fejezetében), és ennek során igyekeztem olyan következtetéseket levonni, melyek a szerkezetvizsgálattal összefüggésbe hozhatóak.

Szerencsére a dinamikai tapasztalatok jól korrelálnak a szerkezetvizsgálat eredményeivel, meghökkentő következtetésekre nem jutottam. A dinamikai mérések jól tükrözik, hogy a molekula legmerevebb része az α -hélix, a láncvégek – különösen a C-terminális – mozgékonyabbak, ugyanakkor viszont ez a mozgékonyság megszűnik a diszulfidhíd beépítésével, de már a redukált ciszteinek is nagymértékben csökkentik.

Érdekes eredményeket akkor tapasztaltunk, amikor speciális mérési eljárással elkülönítettük egymástól a molekula gyors – ps-ns időskálán lejátszódó – és lassú - μ s-ms időskálájú – mozgásait. Utóbbi igen ritkán tapasztalható jelenség, melyet mi kizárólag a H5_SS_red molekulában, a szabad SH csoportok környezetében tapasztaltunk (24. ábra).



24. ábra: Lassú cserét (μ s-ms) mutató aminosavak (piros) a H5_SS_red molekulában

Arról van tehát szó, hogy míg az egész molekula „vibrál” a ps-ns időskálán, közben a μ s-ms időskálán fluktuál két vagy több konformer között! Ezek a konformerek értelemszerűen hasonlóak, csak a lassú cserét mutató aminosavak (24. ábra) környezetében különböznek számottevően.

Mindez jól egybevág a csoportunkban *Karancsiné Menyhárd Dóra* által végzett MD szimulációk eredményével, melyek szerint egy major és két minor konformert feltételezhe-

tünk, és az egyik minor konformerben a C4 SH a terminális karboxillal poláros kölcsönhatást alakít ki. Igaz, hogy ilyen kölcsönhatás az NMR szerkezetben nem látszik, ennek magyarázata azonban pusztán abban rejlik, hogy NMR-ben csak a major konformert látom. Ugyankor viszont a rendkívül kompakt minor konformer jelenléte magyarázatul szolgálhat a meghökkentő stabilitásra.

.

7. A vizsgált molekulák összehasonlító elemzése

A vizsgált molekulák szerkezetét igyekeztem minél több szempont alapján összehasonlítani. Az összehasonlítást nehezíti a szekvenciák közötti különbség (A-C, S-C, illetve E-D különbségek). Ez az adott aminosavaknál értelemszerűen kiugró adatokat okozhatott. Az aminosavak számozásakor a H5 származékokból indultam ki, ennek megfelelően a H2 származékok első aminosava mindenhol C4-ként szerepel.

Referenciaként feltüntettem a Tc5b irodalmi adatai alapján általam generált értékeket is. [32]

a) Előzetes várakozások

Arra számítottunk, hogy a diszulfidhíd beépítésével nagymértékben stabilizálódik a szerkezet - hiszen összekötjük a láncvégeket, megakadályozva ezzel a letekeredést - a redukcióval pedig szerkezeti szempontból visszkapjuk az eredeti, ciszteint nem tartalmazó molekulát.

b) Szerkezetek „vizuális elemzése”

Első ránézésre a H5 származékok között óriási különbségek nincsenek. Az oxidált és a redukált is egy kissé stabilabb, mint a H5, ezen felül azonban az egyetlen jelentős különbség, hogy a H5_SS_ox hélixének az eleje a Y8-ig meglehetősen furcsán csavarodik, egyértelműen nagyobb a sugara az első menetnek, mint a többinek. Ez a redukció hatására megszűnik, de a H5_SS_red hélice is különbözik a H5-től, ugyanis egyértelműen van benne egy finom görbület.

A H2 származékok esetében sokkal jelentősebb a különbség. A H2-nek alig van valami laza szerkezete, ezzel szemben a H2_SS_ox egyértelműen a legstabilabb, legrendezettebb valamennyi vizsgált molekula közül. Meglepő módon ráadásul a redukcióval sem kapjuk vissza a H2-t, ugyanis a H2_SS_red-nek is egyértelműen van szerkezete, noha szemmel láthatóan kisé destabilizált az oxidált molekuláéhoz képest.

A H2 és a H5 származékok közötti különbségek közül mindenképp kiemelendő, hogy a H5 összehasonlíthatatlanul rendezettebb, mint a H2. Ezen kívül a másik érdekesség, hogy a H2_SS_ox hélixének az eleje is különbözik a H5_SS_ox megfelelő részétől, előbbiben ugyanis a legelső menet is a többivel nagyjából megegyező sugarú.

c) A Trp-kalitka és az α -hélix jellemzése

A másodlagos kémiai eltolódások ismeretében meghatároztam a vizsgált molekulák CSD_{cage} értékét (2. táblázat), mely a Trp-kalitka-jellegről ad információt, valamint a CSD_{helix} értékeket (3. táblázat), mely a helicitást jellemző szám. Minél nagyobbak ezek az értékek, annál stabilabb a Trp-kalitka, illetve a hélix.

2. táblázat: A Trp-kalitikák összehasonlítása a CSD_{cage} érték alapján

	Szekvencia	Chemical Shift Deviations									CSD _{cage}
		12 α	16 α 2	17 β 1	21 α	23 α	23 β 2	24 δ 1	24 δ 2	11 ϵ 1	
Random coil referencia		4.385	3.972	2.295	4.396	4.471	1.981	3.653	3.653	10.220	
Tc5b	NLYIQWLKDGGPSSGRPPPS	-0.929	-3.033	-0.223	0.632	-1.840	-1.540	-0.482	-0.667	-0.484	9.83
H2	AVRLYIQWLKEGGPSSGRPPPS	-0.561		0.093	0.368	-0.507	-1.303	-0.160	-0.344	-0.254	
H2_SS_ox_CDC	CVRLYIQWLKDGGPSSGRPPPC	-0.969	-3.405	0.256	0.695	-2.264	-1.596	-0.657	-0.872	-0.583	11.30
H2_SS_red_CDC	CVRLYIQWLKDGGPSSGRPPPC	-0.934	-3.048	0.222	0.632	-1.859	-1.520	-0.469	-0.691	-0.481	9.86
H2_SS_ox_CEC	CVRLYIQWLKEGGPSSGRPPPC	-1.016	-3.250	0.245	0.606	-2.235	-1.486	-0.723	-0.862	-0.675	11.10
H2_SS_red_CEC	CVRLYIQWLKEGGPSSGRPPPC	-0.943	-2.781	0.201	0.550	-1.774	-1.371	-0.496	-0.670	-0.534	9.32
H2_A1C	CVRLYIQWLKEGGPSSGRPPPS	-0.921	-2.679	0.194	0.535	-2.156	-1.342	-0.466	-0.640	-0.524	9.46
H5	EEEAVRLYIEWLKEGGPSSGRPPPS	-1.041	-3.123	0.220	0.578	-1.972	-1.597	-0.541	-0.698	-0.561	10.33
H5_SS_ox_CDC	EEECVRLYIQWLKDGGPSSGRPPPC	-0.975	-3.384	0.245	0.671	-2.266	-1.482	-0.710	-0.889	-0.619	11.24
H5_SS_red_CDC	EEECVRLYIQWLKDGGPSSGRPPPC	-0.999	-3.322	0.232	0.684	-1.998	-1.707	-0.519	-0.726	-0.505	10.69
H5_SS_ox_CEC	EEECVRLYIQWLKEGGPSSGRPPPC	-1.017	-3.246	0.239	0.577	-2.251	-1.384	-0.785	-0.895	-0.706	11.10
H5_SS_red_CEC	EEECVRLYIQWLKEGGPSSGRPPPC										
H5_A4C	EEECVRLYIQWLKEGGPSSGRPPPS										

3. táblázat: A helicitás összehasonlítása a CSD_{helix} érték alapján

	Szekvencia	Chemical Shift Deviations				CSD _{helix}
		8 α	10 α	11 α	13 α	
Random coil referencia		4.604	4.373	4.702	4.358	
Tc5b	NLYIQWLKDGGPSSGRPPPS	-0.457	-0.456	-0.429	-0.429	1.771
H2	AVRLYIQWLKEGGPSSGRPPPS	-0.269	-0.255	-0.278	-0.283	1.085
H2_SS_ox_CDC	CVRLYIQWLKDGGPSSGRPPPC	-0.657	-0.456	-0.460	-0.423	1.996
H2_SS_red_CDC	CVRLYIQWLKDGGPSSGRPPPC	-0.476	-0.440	-0.425	-0.419	1.760
H2_SS_ox_CEC	CVRLYIQWLKEGGPSSGRPPPC	-0.634	-0.322	-0.506	-0.377	1.839
H2_SS_red_CEC	CVRLYIQWLKEGGPSSGRPPPC	-0.456	-0.323	-0.459	-0.362	1.600
H2_A1C	CVRLYIQWLKEGGPSSGRPPPS	-0.448	-0.319	-0.450	-0.356	1.573
H5	EEEAVRLYIEWLKEGGPSSGRPPPS	-0.478	-0.326	-0.508	-0.403	1.715
H5_SS_ox_CDC	EEECVRLYIQWLKDGGPSSGRPPPC	-0.611	-0.461	-0.463	-0.431	1.966
H5_SS_red_CDC	EEECVRLYIQWLKDGGPSSGRPPPC	-0.541	-0.470	-0.464	-0.449	1.924
H5_SS_ox_CEC	EEECVRLYIQWLKEGGPSSGRPPPC	-0.596	-0.326	-0.514	-0.384	1.820
H5_SS_red_CEC	EEECVRLYIQWLKEGGPSSGRPPPC					
H5_A4C	EEECVRLYIQWLKEGGPSSGRPPPS					

Sajnos a CSD_{cage} érték nem minden molekulára áll rendelkezésre. [6] Emiatt a H2 származékokat egymással nem lehet összehasonlítani.

A fenti torzítástól megtisztított adatok alapján kiszámítottam az $X_f(\text{cage})$ értékeket, amelyek ugyan egy fontos eltolódást figyelmen kívül hagynak, de ezáltal teljes mértékben összevethetőek. Ezen értékeknél a Tc5b-t tekintem referenciának, és ahhoz viszonyítva jellemzem a Trp-kalitikát. Az $X_f(\text{helix})$ érték hasonló módon jellemzi a helicitást. (4. táblázat)

4. táblázat: A vizsgált molekulák kalitka-, és hélix-jellegének összevetése

	Szekvencia	$X_i(\text{cage})$	$X_i(\text{helix})$
Random coil referencia			
Tc5b	NLYIQWLKDGGPSSGRPPPS	0.861	0.887
H2	AVRLYIQWLKEGGPSSGRPPPS	0.455	0.544
H2_SS_ox_CDC	CVRLYIQWLKDGGPSSGRPPPC	1.000	1.000
H2_SS_red_CDC	CVRLYIQWLKDGGPSSGRPPPC	0.863	0.882
H2_SS_ox_CEC	CVRLYIQWLKEGGPSSGRPPPC	0.994	0.921
H2_SS_red_CEC	CVRLYIQWLKEGGPSSGRPPPC	0.829	0.802
H2_A1C	CVRLYIQWLKEGGPSSGRPPPS	0.859	0.788
H5	EEEAVRLYIEWLKEGGPSSGRPPPS	0.913	0.859
H5_SS_ox_CDC	EEECVRLYIQWLKDGGPSSGRPPPC	0.996	0.985
H5_SS_red_CDC	EEECVRLYIQWLKDGGPSSGRPPPC	0.934	0.964
H5_SS_ox_CEC	EEECVRLYIQWLKEGGPSSGRPPPC	0.995	0.912
H5_SS_red_CEC	EEECVRLYIQWLKEGGPSSGRPPPC		
H5_A4C	EEECVRLYIQWLKEGGPSSGRPPPS		

A Trp-kalitkák szerkezetében a G16 két H α -ja kölcsönhatásba kerül a Trp-oldallánc aromás árnyékolási kúpjával, de ez a kölcsönhatás a két mag esetében számottevően különböző mértékű. Emiatt a két eltolódásban extrém nagy különbség adódik. Ezzel a különbséggel jól jellemezhetőek a vizsgált szerkezetek: minél nagyobb az eltolódás-különbség, annál stabilabb, rendezettebb a Trp-kalitka.

5. táblázat: A G16 H α jeleinek eltolódás-különbsége az egyes szerkezetekben

	Szekvencia	$\Delta\Delta G_{11}$
Random coil referencia		0.000
Tc5b	NLYIQWLKDGGPSSGRPPPS	2.239
H2	AVRLYIQWLKEGGPSSGRPPPS	
H2_SS_ox_CDC	CVRLYIQWLKDGGPSSGRPPPC	2.540
H2_SS_red_CDC	CVRLYIQWLKDGGPSSGRPPPC	2.245
H2_SS_ox_CEC	CVRLYIQWLKEGGPSSGRPPPC	2.302
H2_SS_red_CEC	CVRLYIQWLKEGGPSSGRPPPC	1.919
H2_A1C	CVRLYIQWLKEGGPSSGRPPPS	1.837
H5	EEEAVRLYIEWLKEGGPSSGRPPPS	2.172
H5_SS_ox_CDC	EEECVRLYIQWLKDGGPSSGRPPPC	2.503
H5_SS_red_CDC	EEECVRLYIQWLKDGGPSSGRPPPC	2.479
H5_SS_ox_CEC	EEECVRLYIQWLKEGGPSSGRPPPC	2.279
H5_SS_red_CEC	EEECVRLYIQWLKEGGPSSGRPPPC	
H5_A4C	EEECVRLYIQWLKEGGPSSGRPPPS	

Megfigyeltem, hogy a redukció hatására következetesen és számottevő mértékben változik a Y8 HN eltolódása.

6. táblázat: A Y8 HN eltolódása az egyes molekulákban

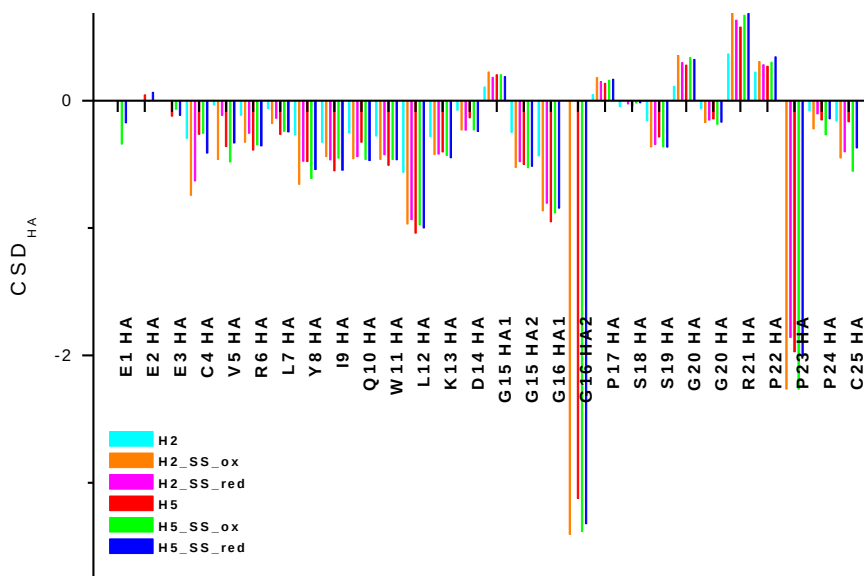
	Szekvencia	Másodlagos kémiai eltolódás
		8 HN
Random coil referencia		0.000
Tc5b	NLYIQWLKDGGPSSGRPPPS	0.467
H2	AVRLYIQWLKEGGPSSGRPPPS	0.334
H2_SS_ox_CDC	CVRLYIQWLKDGGPSSGRPPPC	1.024
H2_SS_red_CDC	CVRLYIQWLKDGGPSSGRPPPC	0.277
H2_SS_ox_CEC	CVRLYIQWLKEGGPSSGRPPPC	0.94
H2_SS_red_CEC	CVRLYIQWLKEGGPSSGRPPPC	0.231
H2_A1C	CVRLYIQWLKEGGPSSGRPPPS	0.244
H5	EEEAVRLYIEWLKEGGPSSGRPPPS	0.007
H5_SS_ox_CDC	EEECVRLYIQWLKDGGPSSGRPPPC	1.198
H5_SS_red_CDC	EEECVRLYIQWLKDGGPSSGRPPPC	0.270
H5_SS_ox_CEC	EEECVRLYIQWLKEGGPSSGRPPPC	1.148
H5_SS_red_CEC	EEECVRLYIQWLKEGGPSSGRPPPC	
H5_A4C	EEECVRLYIQWLKEGGPSSGRPPPS	

Ennek oka még nem teljesen tisztázott. Feltételeztem, hogy a hélix elejének az oxidált szerkezetekben megfigyelhető torzulásával hozható összefüggésbe. Ezt a feltételezést támasztja alá, hogy a H2 származékokban kisebb az eltolódás-különbség, mint a H5 származékokban. Szemre egyértelműen utóbbiban torzul jobban a hélix.

Valószínűbb azonban, hogy a diszulfidhíd árnyékolja a Y8 HN magot. Utóbbi feltételezést támasztja alá, hogy a H5_SS_ox-ban a diszulfidhíd és a Y8 HN távolsága kb. 1 Å-mel kisebb, mint a H2_SS_ox-ban.

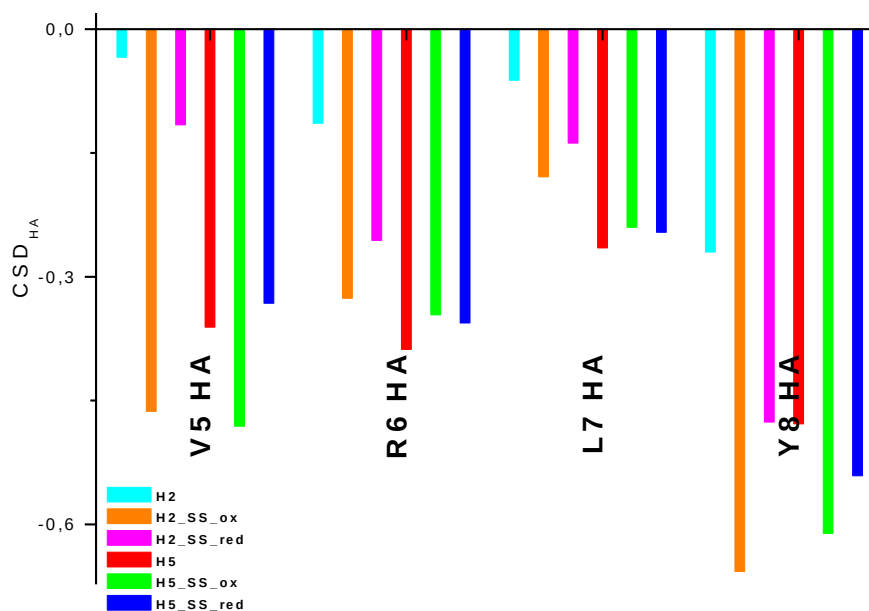
d) Tendenciák a CSD értékekben

A másodlagos kémiai eltolódásokat ábrázoló grafikonokat elsősorban az egyes szerkezetekben mutatkozó különbségek azonosítása érdekében készítettem a H α , HN és N atomokra.



25. ábra: A HA eltolódások CSD értékei

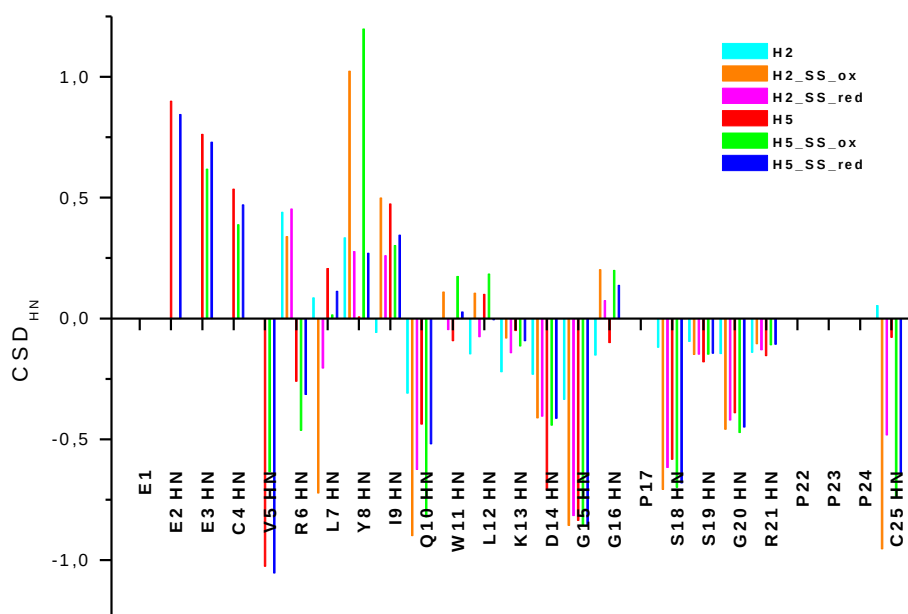
A jobb áttekinthetőség kedvéért a 25. ábra releváns részét kinagyítva tartalmazza a 26. ábra.



26. ábra: A V5 és a Y8 CSD_{HA} értékei

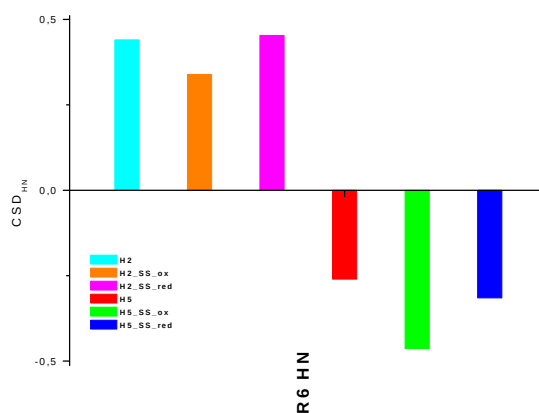
A 25. ábra szemléletesen mutatja a G16 $Ha1$ és $Ha2$ eltolódások közötti különbséget, melynek okát fentebb részleteztem. A másodlagos kémiai eltolódásokban jól megfigyelhető, hogy az α -helikális szakaszon a CSD_{HA} értékek negatívak, ez összhangban van a számolt szerkezetekkel. A 26. ábra alapján elsősorban a V5 és a Y8 HA eltolódásaiban figyelhető meg egyértelmű tendencia. Itt jól látszik, hogy az oxidált szerkezetekben mindkét eltolódás extrém értékeket vesz fel, ugyanakkor az is egyértelmű, hogy a redukcióval nem kaptuk vissza a Cys-t nem tartalmazó H2 és H5 szerkezetét.

Ehhez hasonlóan meghatároztam a CSD_{HN} értékeket is (27. ábra).

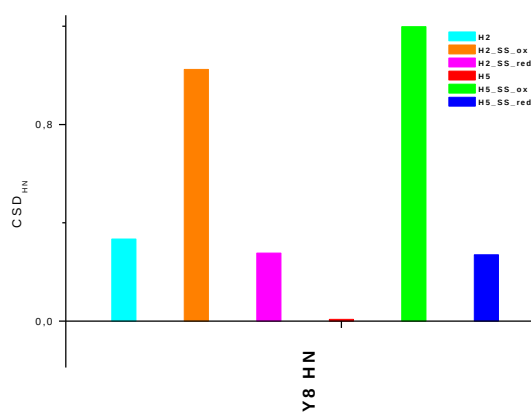


27. ábra: A HN eltolódások CSD értékei

A HN eltolódások tekintetében különösen érdekes az R6, ahol a H2 és a H5 származékok között mutatkozik jelentős különbség, valamint a Y8, melynek HN eltolódását a diszulfidhíd egyértelműen extrém mértékben befolyásolja (28. ábra és 29. ábra).



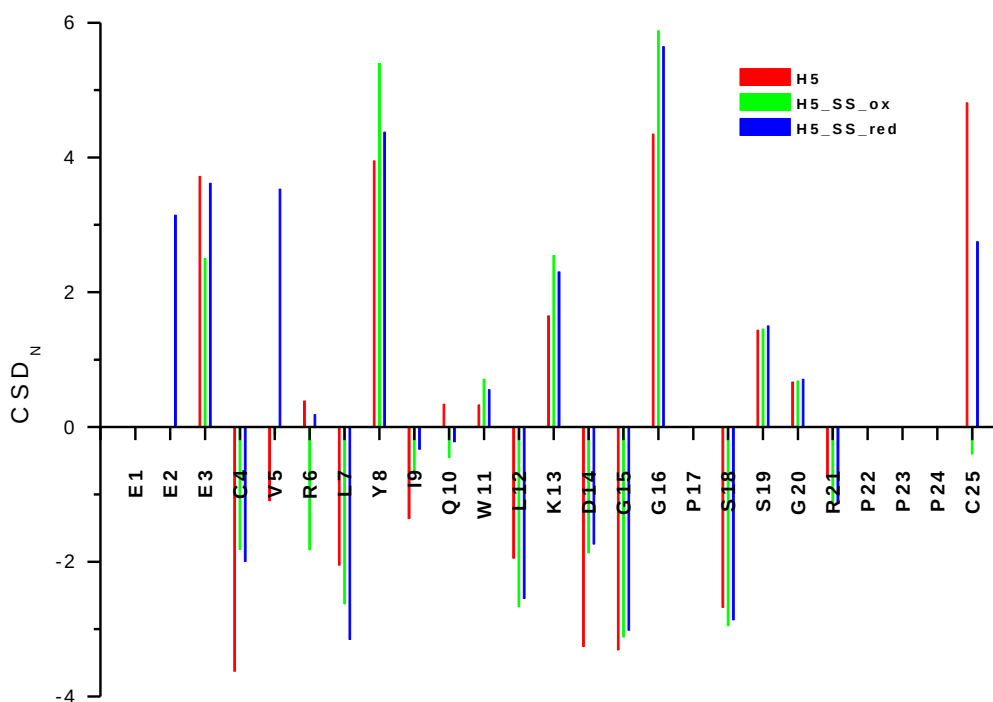
28. ábra: Az R6 CSD_{HN} értékei



29. ábra: Az Y8 CSD_{HN} értékei

A Y8 HN eltolódásainak változására magyarázatul szolgál a hélix torzulás, valamint a diszulfidhíd árnyékolási kúpja, ezt fentebb részleteztem. Az R6 HN változására egyelőre nem tudok magyarázatot adni.

A CSD_N értékek (30. ábra) újabb bizonyítékul szolgálnak a H5 és a redukált szerkezet közötti számottevő különbségekre. Emellett figyelemre méltó, hogy míg a C4 CSD_N értéke alig változik a redukció hatására, a C25 N esetében a változás hatalmas. Ennek okát egyelőre nem ismerjük, de feltételezésem szerint összefüggésben áll a redukált Cys-ek közötti kölcsönhatással. Ennek további vizsgálatát tervezzük.



30. ábra: Az N eltolódások CSD értékei

e) Sóhidak

Az iCING szoftvercsomag [24] segítségével azonosítottam a szerkezetekben megtalálható sóhidakat. A százalékos eredmények azt adják meg, hogy az általam készített szerkezet-sokaság elemeinek hány százalékában található meg az adott sóhíd.

7. táblázat: Sóhidak a H2 származékokban

	H2 (irod.)	H2_SS_ox		H2_SS_red	
	E14-K13	D14-K13	D14-R21	D14-K13	D14-R21
sóhíd		6 %			6 %
N-O híd		3 %			6 %
ionpár	100 %	91 %	100 %	86 %	88 %
nincs				14 %	

8. táblázat: Sóhidak a H5 származékokban

	H5 (irodalmi)						H5_SS_ox				H5_SS_red			
	E2-K13	E2-R6	E3-R6	E14-R6	E14-K13	E14-R21	E2-R6	E3-R6	D14-K13	D14-R21	E1-R6	E2-R6	E3-R6	D14-R21
sóhíd		11 %								16 %	2 %		8 %	
N-O híd						11 %	7 %	3 %		41 %		2 %	73 %	28 %
ionpár	89 %	78 %	100 %	89 %	78 %	89 %	73 %	97 %	100 %	43 %	74 %	77 %	19 %	72 %
nincs	11 %	11 %		11 %	22 %		20 %				24 %	21 %		

A fenti két táblázat alapján egyértelmű, hogy a legfontosabbak a D14-K13 közötti és a D14-R21 közötti sóhidak. Utóbbi szerepéről széleskörű ismeretekkel rendelkezünk, ennek igen jelentős szerepe van a szerkezet stabilizálásában. [3] [5] Jól látható, hogy az erősen destabilizált H2-ben ez a szerkezetstabilizáló elem egyáltalán nincs meg.

Érdekes különbséget fedeztem fel a H5 és származékai között. A lánc eleje - E1-E3 - és az R6 között kialakuló sóhidak ugyanis minden származékban megfigyelhetők, de a szerkezet-sokaság elemei közül nem mindegyikben. Ennek oka, hogy a lánc elejének viszonylagos szerkezeti instabilitása miatt a szerkezetek egy jelentős részében közelebb kerülhetnek egymáshoz a sóhíd kialakításában résztvevő csoportok.

A legérdekesebb azonban az E2 és a K13 közötti sóhíd, ezek ugyanis szekvenciálisan meglehetősen távol esnek egymástól. A H5-ben azonban annyira flexibilis a molekula eleje, hogy a szerkezetek jelentős részében közel kerülhetnek egymáshoz ezek a csoportok. Az pedig, hogy ezt a sóhidat sem a diszulfidhidas, sem a redukált származékban nem lehet kimutatni, miközben a H5-ben nagy arányban - 89 %-ban - van jelen, egyértelmű bizonyítéka annak, hogy a H5_SS_ox/red molekulák sokkal kevésbé flexibilisek. Ez egy újabb indirekt bizonyítéka a redukált származék stabilitásának.

f) RMSD értékek

Az RMSD érték a szerkezet-sokaság elemei között a megfelelő atomok koordinátáinak szórását adja meg Å-ben. Minél kisebb ez az érték, annál jobban definiált, stabilabb a szerkezet. Én az RMSD értékeket az iCING szoftvercsomag segítségével határoztam meg, külön csak a gerincatomokra, és valamennyi atomra is.

9. táblázat: A vizsgált molekulák szerkezetsokaságainak RMSD értékei

	Szekvencia	RMSD (gerinc)	RMSD (teljes)	Szerkezetsokaság elemeinek száma
H2	AVRLYIQWLKEGGPSSGRPPPS	1.73	2.31	10
H2_SS_ox	CVRLYIQWLKDGGPSSGRPPPC	0.11	0.44	35
H2_SS_red	CVRLYIQWLKDGGPSSGRPPPC	0.50	0.91	36
H5	EEEAVRLYIEWLKEGGPSSGRPPPS	0.78	1.40	9
H5_SS_ox	EEECVRLYIQWLKDGGPSSGRPPPC	0.56	1.24	75
H5_SS_red	EEECVRLYIQWLKDGGPSSGRPPPC	0.62	1.35	53

Az RMSD értékek szemléletesen támasztják alá az egyes szerkezetek stabilitására tett megállapításaimat.

g) NOE kényszerfeltételek

A szerkezetet meghatározó NOE kényszerfeltételek számából is következtethetünk a szerkezet rendezettségére. Kitüntetett jelentősége van az ún. távoli NOE kényszerfeltételeknek, melyek a molekula másodlagos szerkezeti elemeinek stabilizálásában és a harmadlagos struktúra kialakításában bírnak nagy jelentőséggel. Az egymástól néhány aminosav távolságra lévő kényszerfeltételek között is vannak olyanok, melyek a harmadlagos szerkezetet stabilizálják, ám ezek túlnyomó többsége elsősorban a másodlagos szerkezet szempontjából jelentős.

10. táblázat: NOE kényszerfeltételek száma a vizsgált molekulákban

	i+0	i+1	i+2	i+3	i+4	i+5	i+6	i+7	i+8	i+9	i+10	i+11	i+12	i+13	i+14	i+15	i+16	i+17	i+18	i+19	i+20	i+21	Σ
Tc5b	43	62	9	18	9	2	4	0	0	0	5	2	8	1	0	1	5	0	0	0	0	0	169
H2	136	37	2	4	6	1	7	0	0	0	4	0	2	1	0	1	2	0	0	0	0	0	203
H2_SS_ox	259	143	36	64	30	20	16	0	7	1	15	8	16	15	1	7	9	4	2	0	1	2	656
H2_SS_red	241	98	26	32	15	8	12	0	1	0	8	5	11	3	0	10	6	1	0	0	0	0	477
H5	176	101	16	29	16	6	8	1	0	0	11	1	10	0	0	8	1	0	0	0	0	0	384
H5_SS_ox	274	136	17	53	28	15	16	0	6	0	9	3	14	14	0	8	12	4	0	0	0	0	609
H5_SS_red	264	123	28	59	25	10	9	1	2	0	12	5	14	9	0	5	9	5	0	0	0	0	580

A 10. táblázatban összeszámoltam, hogy az egyes szerkezetekben hány NOE kényszerfeltételt sikerült definiálnom, és ezeket csoportosítottam az érintett aminosavak szekvenciális távolságának függvényében. Noha ezt az adatsort nem tartom teljesen egzaktnek a vizsgált molekulák aminosavszámának különbsége miatt, a megállapításaimmal jól korreláló számokkal alátámasztottam a szerkezetek elemzése során tett megállapításaimat.

A 10. táblázat könnyen értelmezhető, szemléletes adatait külön feltüntettem a 11. táblázatban.

A 11. táblázatban szereplő adatok közül az i+3-as kényszerfeltételek száma a helicitással, az i+0-ás kényszerfeltételek nélkül számolt összeg pedig a teljes szerkezet stabilitásával áll összefüggésben.

11. táblázat: A NOE kényszerfeltételek könnyen értelmezhető számadatai

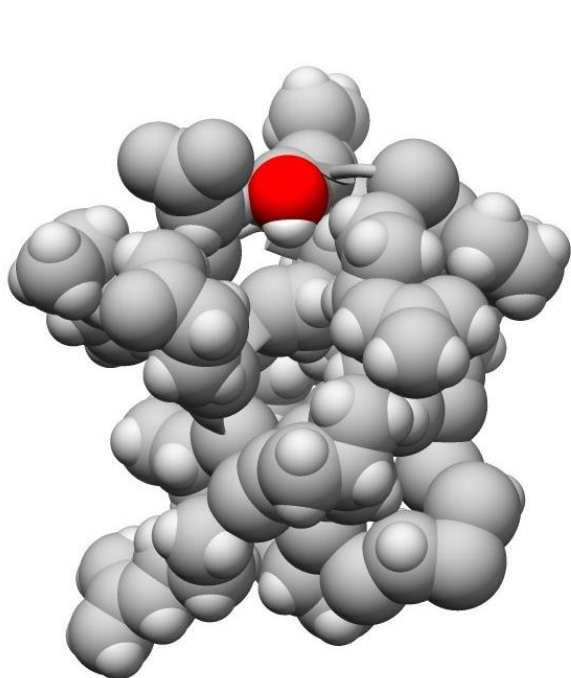
	i+3	Σ (kivéve i+0)
Tc5b	18	126
H2	4	67
H2_SS_ox	64	397
H2_SS_red	32	236
H5	29	208
H5_SS_ox	53	335
H5_SS_red	59	316

h) Ser OH – látszik vagy nem látszik?

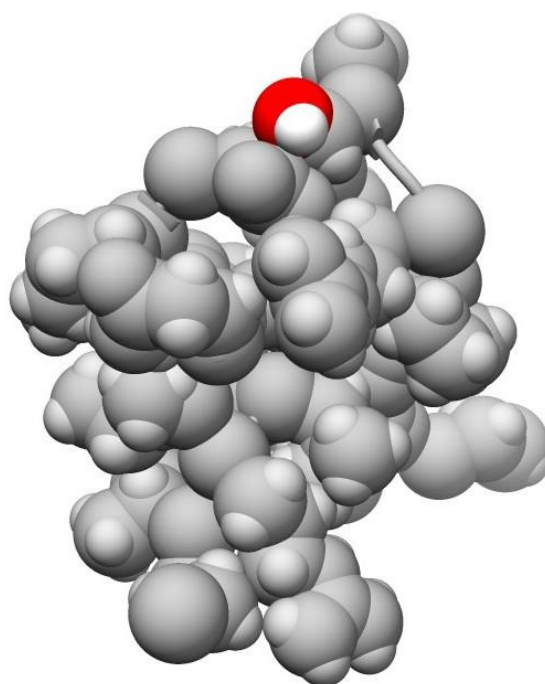
A disszociálható protonok protikus oldószerekben általában nem adnak jelet, ugyanis az oldószer protonjaival folyamatos cserereakcióban vesznek részt. Ennek megfelelően fehérjékben, közel semleges pH-n nem látszanak sem COOH, sem OH hidrogének.

Az általam vizsgált molekulák között azonban néhány esetben - a H2_SS_ox, valamint a H5_SS_ox/red molekulákban - sikerült a S19 HG jelét (OH proton jelét) asszignálnom. Ennek magyarázata nyilvánvalóan az, hogy a kémiai csere gátolt, ebből pedig arra lehet következtetni, hogy a S19 HG (H2 származékokban S16 HG) olyan mértékben el van temetve a molekula hidrofób magjában, hogy az oldószer molekulái nem férnek hozzá.

Ezt a jelentős különbséget a H2_SS-ox és a H2_SS_red példáján mutatom be.



31. ábra: A S16 eltemetett OH csoportja a H2_SS_ox szerkezetében



32. ábra: A S16 OH csoportja a H2_SS_red szerkezetében

Jól látható, hogy míg a H2_SS_ox molekulában a S16 HG egy üreg mélyén helyezkedik el, és ott is befelé fordul, addig a redukált molekulában ugyanez az atom a molekula felszínén található. Mivel semleges pH-n és vizes közegben mértük a spektrumokat, nyilvánvalóan nem csak a hidrogén, hanem az oxigénatom helyzete is kulcsfontosságú a protoncsere reakció szempontjából. Az oxigén helyzete, és így a hozzáférhetősége is jelentősen különbözik.

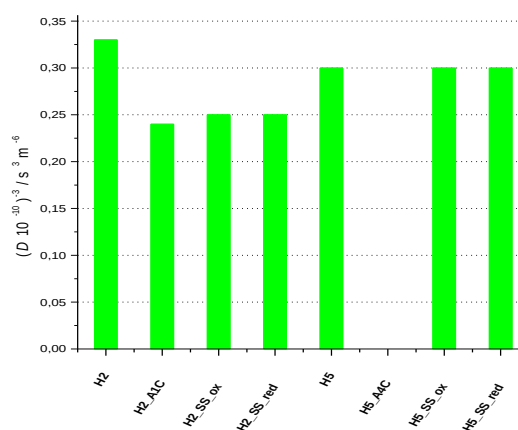
Ez a jelenség indirekt bizonyítéka annak, hogy a vizsgált molekulák közül a H2_SS_ox és a H5_SS_ox/red molekulák a legstabilabbak, hiszen ezekben alakult ki olyan stabilitású hidrofób mag, amely még a kérdéses Ser OH csoportját is képes eltemetni, és megakadályozni az oldószer hozzáférését.

8. A molekulaméret-vizsgálatok eredményei

A DOSY mérések alapján meghatároztam a vizsgált molekulák diffúziós állandóját, majd ennek hatványozásával előállítottam egy olyan értéket, mely a hidrodinamikai sugárral arányos, és így a vizsgált molekulák méretét összehasonlíthatóvá teszi (12. táblázat és 33. ábra). (Bővebben a Függelék XI.1. fejezet n) pontjában.)

12. táblázat: A DOSY mérések alapján meghatározott diffúziós állandók, valamint a molekulák méretét jellemző értékek

	$D \cdot 10^{-10} / \text{m}^2 \text{s}^{-1}$	$(D \cdot 10^{-10})^{-3} / \text{s}^3 \text{m}^{-6}$
H2	1.45	0.33
H2_A1C	1.61	0.24
H2_SS_ox	1.58	0.25
H2_SS_red	1.58	0.25
H5	1.49	0.30
H5_A4C		
H5_SS_ox	1.49	0.30
H5_SS_red	1.50	0.30



33. ábra: A molekulák méretének összevetése

A DOSY mérések csupán kiegészítő vizsgálatnak szántam, azonban mindenféleképp megnyugtató, hogy az eredmények korrelálnak az egyéb módszerek alapján felállított elképzeléseimmel. Jól látható, hogy mind a H2, mind a H5 származékok esetében a diszulfidhíd beépítése jelentősen csökkenti a molekula méretét, tehát kompaktabbá válik a szerkezet, nyilvánvalóan nő a feltekeredett populáció aránya. A diszulfidhíd redukciója nem okoz számottevő változást, ezt a meglepő eredményt a DOSY mérések is alátámasztják. Arra, hogy a H2_A1C miért kisebb, mint a H2_SS molekulák, egyelőre nem tudok magyarázatot adni, azt azonban a kémiai eltolódások elemzésével is megállapítottam, hogy a H2_A1C rendezettsége alapján a H2_SS molekulákhoz áll közel, és nem a H2-höz.

Mindenképp figyelemre méltó, hogy a H2 molekula hidratált mérete számottevően nagyobb a H5 molekuláénál, noha utóbbi nagyságrendileg 0,4 kDa-nal nehezebb! Jól látszik tehát, hogy a H2 jelentősen instabilabb, mint a H5, nyilvánvalóan a feltekeredett és letekeredett populációk arányában is hatalmas különbség van. Ebből is látszik azonban, hogy ezzel a módszerrel a fehérjék moláris tömegére vonatkozó információt csak akkor kaphatnánk, ha a szerkezetek közötti hasonlóság sokkal nagyobb mértékű lenne. Ennek oka véleményem szerint az, hogy ilyen mértékben különböző feltekeredtség esetében nem lehet egyértelműen meghatározni az alaktényezőt, ez pedig alapvetően befolyásolná a számításokat (VII.7. fejezet).

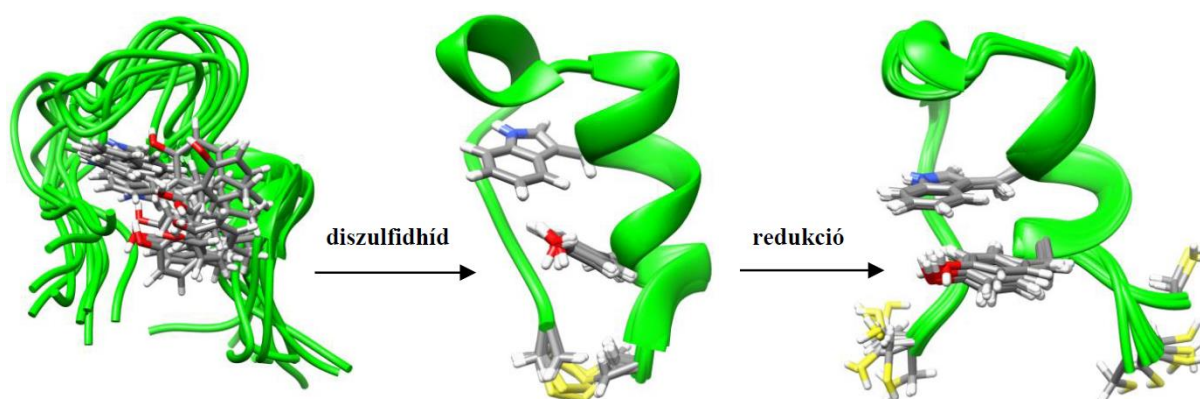
IX. Összegzés

Munkám célja elsősorban annak tanulmányozása volt, hogy a diszulfidhíd beépítése és redukciója miként befolyásolja az erősen destabilizált H2 és a jól definiált szerkezettel bíró H5 térszerkezetét.

A H5 szerkezetének stabilizálása céljából, a konformáció megtartásával diszulfidhíd került beépítésre, ami várákozásunknak megfelelően stabilizálta a szerkezetet. Meglepő módon azonban a diszulfidhíd redukciójával nem kaptuk vissza az eredeti H5 szerkezetét, hanem annál valamivel stabilabb molekulához jutottunk.

Ennek további tanulmányozása céljából a - már alacsony hőmérsékleten is igen erősen destabilizált - H2-be is diszulfidhidat építettünk be. A szerkezet, amit kaptunk, minimálisan még a H5_SS_ox-nál is stabilabb.

A redukcióval kapott H2_SS_red-től azt vártuk, hogy a H2-höz hasonló destabilizált szerkezete lesz, ám ezen várákozásunk egyáltalán nem igazolódott be, ugyanis a vártnál igen jelentősen stabilabb molekulához jutottunk.



34. ábra: Összegzés

A szerkezeteket számos, többé-kevésbé egzakt szempont alapján elemeztem, ezen elemzés legfontosabb adatait összefoglaltam a 13. táblázatban. Sajnos ez az adatsor meglehetősen hiányos, hiszen számos eredmény értékelése még folyamatban van. Ennek ellenére már most egyértelmű, hogy a hiányzó adatok a dolgozatom következtetéseit nem befolyásolják.

13. táblázat: A szerkezeteket jellemző adatok

	hélix			Trp-kalitka					
	NOE (i+3)	CSD _{helix}	X _f (helix)	Σ NOE (kiv. i+0)	CSD _{cage}	X _f (cage)	ΔG16 Hα	RMSD (gerinc)	RMSD (teljes)
Tc5b	18	1.771	0.887	126	9.830	0.861	2.239	0.54	1.08
H2	4	1.085	0.544	67		0.455		1.73	2.31
H2_SS_ox_CDC	64	1.996	1.000	397	11.297	1.000	2.540	0.11	0.44
H2_SS_red_CDC	32	1.760	0.882	236	9.856	0.863	2.245	0.50	0.91
H2_SS_ox_CEC		1.839	0.921		11.098	0.994	2.302		
H2_SS_red_CEC		1.600	0.802		9.320	0.829	1.919		
H2_A1C		1.573	0.788		9.457	0.859	1.837		
H5	29	1.715	0.859	208	10.331	0.913	2.172	0.78	1.40
H5_SS_ox_CDC	53	1.966	0.985	335	11.241	0.996	2.503	0.56	1.24
H5_SS_red_CDC	59	1.924	0.964	316	10.692	0.934	2.479	0.62	1.35
H5_SS_ox_CEC		1.820	0.912		11.100	0.995	2.279		
H5_SS_red_CEC									
H5_A4C									

A táblázatban külön szerepelnek a helicitást jellemző adatok és a Trp-kalitkára, tehát a teljes szerkezet stabilitására jellemző értékek. A 13. táblázat adatai alapján az általam vizsgált molekulák szerkezetének rendezettségére, stabilitására a következő sorrendet állítottam fel.

$$\mathbf{H2} \lll \mathbf{H2_SS_red} \approx \mathbf{Tc5b} \approx \mathbf{H5} < \mathbf{H5_SS_red} < \mathbf{H5_SS_ox} < \mathbf{H2_SS_ox}$$

Ezt a sorrendet a táblázat valamennyi adatsora alátámasztja, számottevő mértékben ellentmondó adatok nincsenek. Ugyanezt megerősítik a csoportunkban *Farkas Viktor* által végzett CD mérések is. Ráadásul a sorrend indirekt módon alátámasztható a szerkezetek „vizuális elemzésével”, a sóhidak elemzésével, és a S19 HG jeleivel is. Ez a jel – amely a kitüntetett stabilitás indirekt bizonyítéka - csak a sorrendben utolsó három molekula szerkezetében látszik, egyetlen más, általam ismert Trp-kalitkában sem fordul elő ilyen!

Mindezek alapján egyértelműen kijelenthető, hogy a diszulfidhíd beépítésével nagymértékben sikerült stabilizálni a Trp-kalitka szerkezetét, és minden eddig ismert származékot meghaladó hidrofóbicitást sikerült elérni a molekula belsejében.

Nagyon érdekes következtetés azonban, hogy a diszulfidhíd redukciójával egyáltalán nem kapjuk vissza a H2, illetve a H5 szerkezetét.

A H5 származékokról dinamikai mérések is készültek, melyek feldolgozását elvégeztem. Ezek is alátámasztják, hogy a H5_SS_red molekulában a szekvencia eleje és vége között, a redukált Cys-ek környezetében olyan kölcsönhatás figyelhető meg, amely sem a H5-ben, sem a H5_SS_ox-ban nincs jelen.

A Cys-ek kölcsönhatását jelenleg is vizsgáljuk.

X. Kitekintés

Az eddig elvégzett vizsgálataink nyomán bebizonyosodott, hogy a Trp-kalitka szerkezete nagymértékben stabilizálható diszulfidhíd beépítésével, ezáltal rendkívül nagyszámú ismert Tc5b és Exendin-4 származék stabilizálása válik lehetővé. Reményeink szerint az így létrehozott, stabil struktúrák ellenállóbbak lesznek a hődenaturációval és az aggregációval szemben, valamint jobb receptorkötést tesznek majd lehetővé. Ezek vizsgálatát a jövőben tervezzük.

Ugyanakkor nem várt eredményként arra jutottunk, hogy a diszulfidhíd nem csak oxidált állapotban képes stabilizálni a molekulát, hiszen a redukált – diszulfidhidat már nem tartalmazó - molekula stabilitását is nagymértékben növeli a redukált Cys-ek jelenléte.

Ennek pontos módját és okát azonban nem ismerjük, ezért jelenleg olyan származékokat vizsgálunk, melyekben csak egyik, vagy csak másik pozícióba került Cys.

XI. Függelék

1. Alkalmazott módszerek

Terjedelmi okokból az általam alkalmazott módszerek részletes, a reprodukálhatóság követelményét is kielégítő leírása nem képezi részét a dolgozatnak, csak itt, a Függelékben található meg.

a) Preparatív munka

A H2 és H2_SS minták, valamint a H5 jelöletlen mintája, és a H5_S25C a Szegedi Tudományegyetem Orvosi Vegytani Intézetében készültek *Tóth Gábor* vezetésével, szilárdfázisú peptidszintézissel, a H2_A1C és a H5_A4C mintáját *Farkas Viktor* készítette szilárdfázisú peptidszintézissel, a H5 ¹⁵N jelölt mintáját *Szabó Mária*, a H5_SS ¹⁵N jelölt és jelöletlen mintáit pedig *Taricska Nóra* expresszáta csoportunk expressziós laborjában. A Szegeden készült mintákat tisztítva kaptuk, az expresszált mintákat pedig csoportunk elválasztástechnikai laboratóriumában fordított fázisú HPLC-vel tisztították, majd a tisztaságot MS-sel ellenőrizték.

b) NMR mérések

Az NMR mérések több helyen készültek, ezeket az 1. táblázatban foglaltam össze. A minták összetétele a következő volt.

H2	<i>ismeretlen, referenciaként DSS, pH=6,82</i>
H2	1,25 mg, 540 µl H ₂ O, 60 µl D ₂ O, referenciaként DSS, pH=7,0
H2_SS (CDC)	2,6 mg, 540 µl H ₂ O, 60 µl D ₂ O, referenciaként DSS, pH=7,1
H2_SS (CEC)	1,06 mg, 540 µl H ₂ O, 60 µl D ₂ O, referenciaként DSS, pH=7,0
H2_A1C	1,40 mg, 540 µl H ₂ O, 60 µl D ₂ O, referenciaként DSS, pH=7,0
H5 (jelöletlen)	<i>ismeretlen, referenciaként DSS, pH=6,84</i>
H5 (jelöletlen)	0,82 mg, 540 µl H ₂ O, 60 µl D ₂ O, referenciaként DSS, pH=7,0
H5_SS (CDC) (jelöletlen)	3,0 mg, 540 µl H ₂ O, 60 µl D ₂ O, referenciaként DSS, pH=7,02
H5_SS (CEC)	1,20 mg, 540 µl H ₂ O, 60 µl D ₂ O, referenciaként DSS, pH=7,0
H5 (¹⁵ N jelölt)	0,5 mg, 310 µl H ₂ O, 20 µl D ₂ O, referenciaként DSS, pH=7,07
H5_SS (¹⁵ N jelölt)	0,5 mg, 310 µl H ₂ O, 20 µl D ₂ O, referenciaként DSS, pH=7,10

A dőlttel szedett minták korábban készültek, azok mérésének eredményei megtalálhatóak az irodalomban, én ezt csupán az összevetés kedvéért szerepeltettem dolgozatomban. [6]

A redukált minták, valamint a H2_A1C kb. 2,5-szeres feleslegben tartalmaztak TCEP-et.

A H5 származékok esetében a szerkezet meghatározása a jelöletlen minták mérésén alapul, a dinamikai mérések és ^{15}N eltolódások pedig a jelölt mintán. A H2 és a H5 jelöletlen mintákat *Perczel András* mérte a Kémiai Intézet Bruker DRX 500 MHz-es NMR spektroszkópján, a H2_SS, H2_A1C, valamint a H5_SS, H5_A4C, H5_S25C jelöletlen mintáit *Láng András* a Kémiai Intézet Bruker Avance-III 700 MHz-es NMR spektroszkópján, a H5 és a H5_SS jelölt mintáit pedig *Frank Löhr* a frankfurti Zentrum für Biomolekulare Magnetische Resonanz 600 MHz-es Bruker spektrométerén. Ez a spektrométer krio mérőfejjel van felszerelve, ami lehetővé teszi igen híg minták mérését, emiatt lehettek az itt mért minták számottevően alacsonyabb koncentrációjúak a többinél.

A mérések során az oldószer alapvetően H_2O volt, a lockolás miatt azonban 5-10 % D_2O -t kell a mintához adni. Tiszta D_2O -ban azért nem szokás mérni, mert az enyhén disszociálabilis protonok meglehetősen gyorsan deutériumra cserélnek, és így a jelek eltűnnek. Referenciaként igen kis mennyiségben DSS-t adagolunk a mintához, és ennek a jeléhez kalibráljuk az eltolódásskálát 0,0 ppm pontjára. A spektrumokat Bruker gyári pulzusszekvenciákkal vesszük fel, a mérést és a spektrumok feldolgozását, processzálasát is Bruker Topspin 3.0, újabban 3.1 segítségével végezzük.

A mintákról először minden esetben 1D spektrumot veszünk fel, majd ezt a mérések végén is megismételjük a minta állandóságának ellenőrzése végett. Alapesetben homonukleáris [^1H - ^1H]-COSY, [^1H - ^1H]-TOCSY és [^1H - ^1H]-NOESY spektrumokat veszünk fel, melyet szükség - és ^{15}N jelölt minta - esetén [^{15}N - ^1H]-HSQC, esetleg TOCSY- ^{15}N - ^1H -HSQC és NOESY- ^{15}N - ^1H -HSQC spektrumok felvétele követ.

Dinamikai mérések esetében T_1 és T_2 relaxációt és hetNOE effektust mértünk 288 K-en, CPMG mérést végeztünk 288 K-en és 300 K-en, valamint a HSQC spektrum hőmérsékletfüggését követtük oly módon, hogy a hőmérsékletet 5 K-enként emelve egy-egy 1D, illetve [^{15}N - ^1H]-HSQC spektrumot vettünk fel.

c) Asszignáció

Az asszignáció menetére vonatkozóan az elmúlt években csoportunkban is több magyar nyelvű leírás született, így ennek menetét ismertnek tételezem. [10] [11] [12] Az asszignációt mind a 2D, mind pedig a 3D spektrumok esetében Sparky 3.114 segítségével [22] végeztem, és a feldolgozás során minden adatot a Sparky megfelelő funkcióival írtam ki .txt fájlba. A spektrumképeket szintén a Sparky „Print” funkciójával készítettem.

d) Szerkezetszámolás

A szerkezetszámolás elvére és menetére vonatkozóan szintén születtek már a csoportunkban összefoglaló jellegű munkák, így ezt sem részletezem. [10] [12]

A Sparkyban a NOESY spektrumon asszignáltam valamennyi keresztesúcsot a spektrum megfelelő tartományaiban (indol-alifás, amid-alifás, aromás-alifás, alifás-alifás, aromás-aromás, amid-amid, és indol-aromás régió), majd ezeket a csúcsokat a Sparkyval integráltam és az xf parancs segítségével írtam ki a kényszerfeltétel-listát. A NOE kényszerfeltételekhez minden esetben (1.8 0.0 3.2) határokat adtam meg, azaz a kényszerfeltételeket úgy definiáltam, hogy a kényszerfeltételeknek megfelelő atom-atom távolságok 1,8-5,0 Å-ösek legyenek. A szerkezetszámolást CNS Solve 1.1 programmal [23] végeztem. Minden iteratív lépésben 10 db szerkezetet számoltam a megfelelő kényszerfeltétel-lista alapján, majd a tíz szerkezet alapján megkerestem a felülvizsgálandó csúcsokat, javítottam a listát, és újabb tíz szerkezetet számoltam. Ezt addig folytattam, amíg a molekula szerkezete szemre szép, a számított energiája pedig viszonylag alacsony nem lett. Amikor a kényszerfeltétel-listát véglegesnek gondoltam, ezen lista alapján számoltam 1000 db szerkezetet, majd ezek néhány százaléknyi legjobb (legalacsonyabb energiájú) elemeinek felhasználásával készítettem egy átlagszerkezetet, az átlagszerkezet meghatározásához használt elemeket pedig szerkezetsokaságként mentettem el. Ezt követően az átlagszerkezetet és a szerkezetsokaságot is ellenőriztem. (Ezt a Függelék XI.1. fejezet e) pontjában írtam le.)

Próbálkoztam azzal, hogy azon jelek esetében, ahol # jelöléssel 2 vagy 3, degenerált jelet adó atomra hivatkozom, megnövelem a konfidencia intervallum felső határát (2 atom esetén +1, 3 atom esetén +1,5, a Tyr HD# és HE# jelei esetében pedig szintén +1,5). Ennek tapasztalatom szerint nem volt számottevő hatása a szerkezetre, sem vizuálisan, sem pedig a Procheck [29] szerint, csupán a NOE-energiát tudtam vele számottevően csökkenteni, ezt azonban nem tartottam fontosnak, emiatt sehol nem dolgoztam különböző konfidencia intervallumokkal.

Ezen eljárás elvi létjogosultságát az adja, hogy abban az esetben, ha a spektrumban több atom (2 vagy 3 atom, tipikusan metilén-, illetve metil-csoportokban, vagy aromás gyűrűben) jele degenerált, akkor ezekre az asszignáció és szerkezetszámolás során együttesen hivatkozunk, # jellel. Ebben az esetben a CNS algoritmus úgy dolgozik, hogy a hivatkozott atomok által kijelölt geometriai középpontban helyez el egy „átlag atomot”. Mivel azonban a geometriai középpont értelemszerűen a tér bizonyos részeinél nagyobb távolságra van, mint a helyettesített atomok egyike, indokolt lehet a konfidencia intervallum felső határának emelése, azaz feltételezhetjük, hogy az „átlag atom” nagyobb távolságról is ad NOESY csúcsot, mint egy valódi atom.

Korábban próbálkoztam azzal is, hogy már a Sparkyból úgy írassam ki az adatokat, hogy a jeleket kategorizálom, de mivel nem sikerült egyértelmű összefüggést találnom az integrál, illetve intenzitás, valamint az atom-atom távolság között, ezzel is felhagytam. (Ezt a Függelék XI.1. fejezet n) pontjában írtam le.)

Ennek elvi létjogosultságát az adja, hogy a NOESY jel nagysága fordítottan arányos az érintett atomok távolságának hatodik hatványával. Elvileg tehát feltételezhető, hogy távolabbi atomok kisebb jelet adnak, mint az egymáshoz közelebbiek. Noha semmi kétségem afelől, hogy ez így is van, erre csak abban az esetben alapoznám a szerkezetszámolást, ha ezt matematikailag egzakt módon le tudnám írni, ez pedig egyelőre nem sikerült. Azt is kipróbáltam, hogy az intenzitás, illetve az integrál alapján számolva van-e különbség, de mivel arra jutottam, hogy nincs, mindenhol integráltam a jeleket.

e) A szerkezetek elemzése iCING szoftvercsomaggal

Az általam számolt szerkezeteket az iCING nevű szoftvercsomag [24] segítségével elemeztem. Ehhez a szerkezetet tartalmazó pdb fájlt feltöltöttem a

<https://nmr.cmbi.ru.nl/icing/iCing.html?locale=de#file> weboldalra, majd lefuttattam az elemzést. Az iCING számos szerkeztelemző-validáló szoftvert egyesít, így többek között például a Procheck/Aqua, a DSSP, a CYANA, a TALOS, WATTOS, WHAT CHECK programokat (<http://nmr.cmbi.ru.nl/cing/Software.html>). Ezek a szoftverek rengeteg szempont alapján elemzik a szerkezeteket. Megkeresik a másodlagos szerkezeti elemeket, a sóhidakat, a szokatlan gerinckonformációkat. A szerkezet „jóságát” alapvetően annak „szokványos voltával” jellemzik. Ezt adatbázisokban megtalálható adatokkal való összevetés alapján teszik.

Én abból az adathalmazból, amit .zip formátumban minden egyes szerkezetemre letöltöttem, egyelőre elsősorban a Procheck Ramachandran-grafikonjait használtam a szerkezeteim ellenőrzéséhez, és tökéletesítéséhez.

Elvileg akkor tekinthető egy szerkezet „szokványosnak”, ha az aminosavak legalább 90 %-a a Ramachandran-diagram legjobb tartományában (Residues in most favoured regions) található. Egy szerkezet nem feltétlenül „rossz” attól, hogy „szokatlan”, ez csak annyit jelent, hogy az adott aminosav környezetét érdemes még egyszer megnézni. Értelemszerűen mindig arra törekedtem, hogy a fenti feltétel teljesüljön, de ez sokszor nem sikerült. Ha a kérdéses aminosavak újbóli vizsgálata sem hozott eredményt, megelégedtem azzal, ha az aminosavak nagy többsége a legjobb kategóriába, a többi pedig a második legjobb kategóriába (Residues in additional allowed regions) tartozik.

Az így kapott Ramachandran-diagramokat a Függelék XI.3. fejezete tartalmazza.

Ezen kívül az iCING szoftvercsomag segítségével határoztam meg a szerkezetekben megtalálható sóhidakat, és a szerkezetsokaság elemeinek egyezését jellemző RMSD értékeket.

f) Molekulák ábrázolása

A vizsgált molekulákról az általam meghatározott átlagszerkezetet, illetve szerkezetsokaságot tartalmazó .pdb fájlok felhasználásával, UCSF Chimera 1.7 használatával [25] készítettem ábrákat.

g) Grafikonok készítése

A grafikonokat Origin 6.0 használatával készítettem.

h) R_1 és R_2 paraméterek meghatározása

A T_1 és a T_2 relaxáció mérése során [^1H - ^{15}N]-HSQC spektrumokat mérünk különböző relaxációs idők alkalmazásával. A különböző t_{relax} mellett mért spektrumokat egymásra téve asszignáltam, majd a Sparky rh funkciójának használatával elvégeztem azt az illesztést, melynek során az illesztett exponenciális függvény kitevőjében szereplő T_1 (illetve T_2) meghatározható. Az így kapott T_1 és T_2 értékek reciproka az R_1 és R_2 relaxációs paraméter. Az R_1 és R_2 paraméterek hibáit az illesztés során kapott hibából a Gauss-féle hibaterjedési törvény alkalmazásával számítottam ki:

$$SD_{R_1} = \frac{SD_{T_1}}{(T_1)^2}$$

i) hetNOE paraméterek meghatározása

A hetNOE effektus mérésekor két [1H-15N]-HSQC spektrumot veszünk fel, az egyik egy referencia, melyben nincsen hetNOE effektus, a második, ún. szubspektrumban pedig van. A hetNOE mérések feldolgozásakor a referencia spektrumon asszignáltam, majd a szubspektrumra átvittem az asszignációt, és ott már nem adtam ki újra a pc parancsot. Az intenzitásokat mindkét spektrumról külön-külön kilistáztam, majd Excell segítségével képeztem a szub/ref hányadost, és ezt Origin 6.0 használatával aminosavanként ábrázoltam.

j) Spektrális sűrűségfüggvény

Az R_1 , R_2 és hetNOE paraméterek birtokában meghatároztam a tiszta komponenseket, azaz a spektrális sűrűségfüggvény (J) értékeit az $\omega=0$, ω_N és a $0,87\omega_H$ pontokban. [33]

k) Lipari-Szabó-féle analízis

A Lipari-Szabó-féle analízist a Tensor 2.0 szoftver [30] segítségével végeztem el. A szoftver az illesztéshez az R_1 , R_2 és ezek hibája, valamint a hetNOE paramétereket igényli. Először izotróp diffúziós tenzort feltételezve meghatároztam a molekula globális rotációs korrelációs

idejét (τ_c), oly módon, hogy az illesztéshez azon aminosavakat vettem figyelembe, melyek esetében az R_2/R_1 hányados az átlagértéktől legfeljebb a szórás értékével tért el.

Az így meghatározott τ_c birtokában (most már a kiugró adatokat is felhasználva) elvégeztem az illesztést, melynek során a modellnek megfelelő dinamikai paramétereket nyertem.

l) CPMG mérések feldolgozása

A CPMG mérések [34] spektrumait Sparkyban egymásra raktam, a referencia spektrumon asszignáltam, majd az asszignációt átvittem a többi spektrumra is, és ott újra kiadtam a pc parancsot. Az egyes spektrumokról külön-külön kiírtam a jelek integrálját, valamint intenzitását. Egy esetben, a H5_SS_red 288 K-es CPMG mérésére elvégeztem a feldolgozást intenzitás és integrál alapján is, de mivel számottevő különbséget nem tapasztaltam, mindenhol intenzitás alapján dolgoztam.

Minden jelre külön-külön kiszámítottam az R_2 értékeket az alábbi képlet alkalmazásával.

$$R_{2,i} = - \frac{\ln\left(\frac{I_i}{I_{\text{ref}}}\right)}{\frac{t_{\text{CPMG}}}{s}}$$

ahol I_i az adott jel intenzitása az i -edik spektrumban, I_{ref} az adott jel intenzitása a referencia spektrumban, t_{CPMG} pedig a CPMG mérés teljes ideje (relaxation period) másodpercben kifejezve.

Az R_2 értékeket magonként ábrázoltam a Hz-ben kifejezett ν_{CPMG} függvényében. Az így kapott CPMG grafikonokat kvalitatív módon elemezve állapítottuk meg, hogy mely aminosavak esetében mérhető CPMG effektus, ezek az ábrák a Függelék XI.3. fejezet c) pontjában találhatóak.

A CPMG mérések analízisére van lehetőség kvantitatív módon is, ezt azonban egyelőre nem végeztem el.

m) Hőmérsékletfüggő HSQC mérések feldolgozása

Az elmúlt időszakban kutatócsoportunkban érdekes eredmények születtek a [^{15}N - ^1H]-HSQC spektrum hőmérsékletfüggésére vonatkozóan [31], emiatt a ^{15}N jelölt minták esetében a méréseket elvégeztük, a kvantitatív elemzésre azonban egyelőre nem került sor.

A különböző hőmérsékleten felvett HSQC spektrumokat egymásra raktam, a 277 K-es spektrumon asszignáltam, majd a 14. táblázatban feltüntetett színekkel jelöltem a spektrumokat (hideg szín alacsonyabb hőmérséklet, meleg szín magasabb hőmérséklet).

Az így elkészített spektrumból képet generáltam. A spektrumképek a Függelék XI.3. fejezet d) pontjában találhatóak.

n) DOSY mérések feldolgozása

A DOSY mérések feldolgozása során először meghatároztam a vizsgált molekulák diffúziós állandóját a Bruker TopSpin 3.2 relaxációs moduljának segítségével. A feldolgozást elvégeztem mind a jelek intenzitásának, mind pedig az integráljának lecsengése alapján, oly módon, hogy a W indol NH-ját, a teljes amid-régiót, a teljes aromás tartományt és a metil-régiót is külön-külön értékeltem. Munkám során arra a következtetésre jutottam, hogy ezen adatsorok közül a metil-régió integrálja, valamint az aromás-, és a metil-régió intenzitása használható, ezek közül azonban a legjobb illesztéseket az aromás régió jeleinek intenzitására tudtam végezni, ezért ezt az adatsort használom a VIII.8. fejezetben is.

Annak oka, hogy az adatsorok többsége nem bizonyult használhatónak, nyilvánvalóan abban rejlik, hogy a minták sajnos tartalmaznak kismolekulás szennyezőket, melyek jelei nem igazán válnak el a fehérje jeleitől, az pedig, ha a kismolekula jeleit is figyelembe veszem, nyilvánvalóan torzítja az eredményt. A metil-régió mellett a kismolekulák jelei viszonylag jól elválnak, itt igyekeztem úgy integrálni, hogy ezeket ne vegyem figyelembe, de ez valószínűleg nem sikerült maradéktalanul. Az aromás tartományban szerencsére nincsenek kismolekuláktól származó jelek, így itt meglehetősen jó adatsorokat kaptam. (A kismolekuláktól származó jelek szélességük alapján első pillantásra megkülönböztethetőek a fehérje jeleitől az 1D ^1H spektrumban.)

14. táblázat: A hőmérsékletfüggő HSQC színezése

T / K	színezés
277	blue
282	cyan
287	green blue
292	green
297	light green
302	yellow
307	orange
312	coral
317	red yellow
322	red
327	maroon

A diffúziós állandókat tehát az aromás jelek intenzitására illesztett exponenciális lecsengésű görbéből határoztam meg (12. táblázat).

Az így kapott diffúziós állandók felhasználásával megkíséreltem kiszámítani a moláris tömegeket az alábbi képlet használatával. [20]

$$M = \left(\frac{k \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot F \cdot D} \right)^3 \cdot \frac{4 \cdot \pi \cdot N_A}{3 \cdot (V_2 + \delta_1 \cdot V_1)}$$

ahol M a moláris tömeg, k a Boltzmann-állandó, T a hőmérséklet (288 K), F az alaktényező, ezzel kapcsolatban tanácstalan vagyok, véleményem szerint az ettől való nagymértékű függés miatt kaptam nyilvánvalóan rossz eredményeket, D a diffúziós állandó, N_A az Avogadro-állandó, V_1 , V_2 és δ_1 pedig a hidratáltságot jellemző korrekciós faktorok, itt irodalmi analógiák alapján igyekeztem az értékeket meghatározni ($V_1 = 0,001002$, $\delta_1 = 0,4$, $V_2 = 0,00073$). [20] [28]

Mivel a moláris tömeg számítására vonatkozó próbálkozásaim kudarcot vallottak – meggyőződésem szerint elsősorban amiatt, hogy az alaktényezőt nem tudom meghatározni, ugyanis más és más érték lenne a különböző mértékű letekeredettség miatt – úgy döntöttem, hogy D hatványozásával előállítok egy olyan értéket, mely jellemző a molekulák hidrodinamikai sugarára (de nem egyenesen arányos azzal!), és így hasonlítom össze a vizsgált fehérjék méretét.

o) Összefüggés az atom-atom távolság és a jel nagysága között

A szerkezetszámolás egzaktabbá tétele érdekében igyekeztem összefüggést találni az atom-atom távolság, illetve a jel intenzitása, valamint integrálja között. Mivel a NOE effektus a távolság reciprokának hatodik hatványával arányos, egy

$$jel = A + B \times \frac{1}{r^6}$$

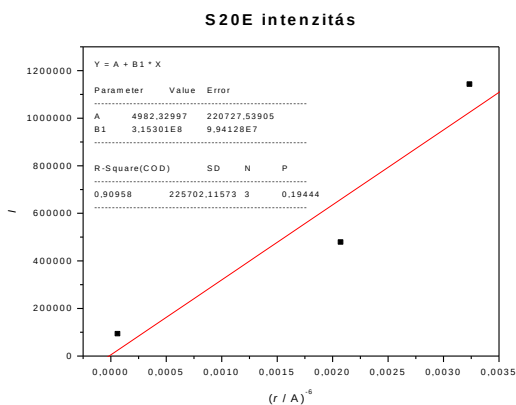
alakú függvényt kerestem. *Jel*-ként mind az intenzitást, mind az integrált vizsgáltam.

Ezt úgy oldottam meg, hogy a viszonylag merevnek és állandónak tekinthető Trp-oldallánc aromás protonjainak távolságát megmértem Open-Source PyMOL 1.1 [35] segítségével, majd az így kapott értékeket próbáltam korreláltatni a megfelelő NOESY jelek intenzitásával, valamint integráljával.

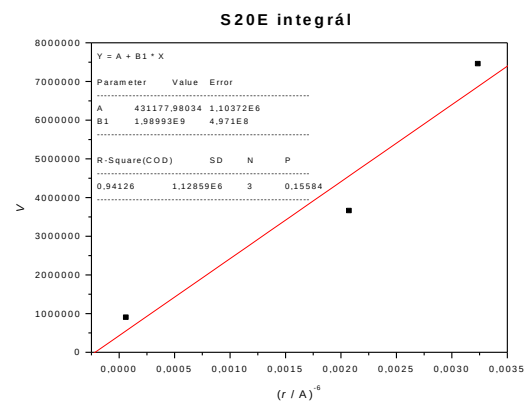
Ezt elvégeztem a dolgozatomban nem szereplő, korábban már leírt, de általam is meghatározott Tc5b_S20E és a dolgozatomban is szereplő, általam meghatározott H5_SS_ox szerkezetek esetében is.

15. táblázat: Vizsgált adatok a Tc5b_S20E esetében

AS	Atom	Atom	$r / \text{\AA}$	$(r / \text{\AA})^{-6}$	V	I
Trp6	HD1	HE1	2.6	0.0032371	7.45E+06	1141077
Trp6	HD1	HZ2	5.0	0.0000640	8.92E+05	91850
Trp6	HZ2	HE1	2.8	0.0020752	3.65E+06	477171



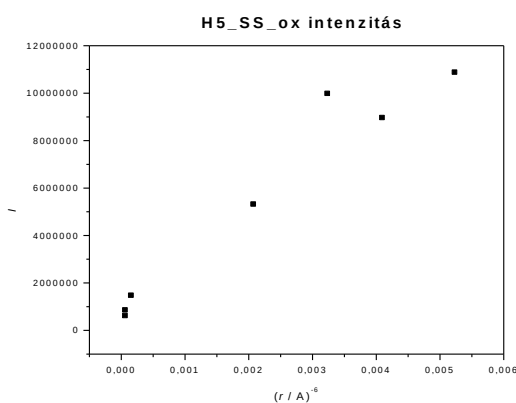
35. ábra: Az intenzitás - atom-atom távolság függvény a Tc5b_S20E esetében



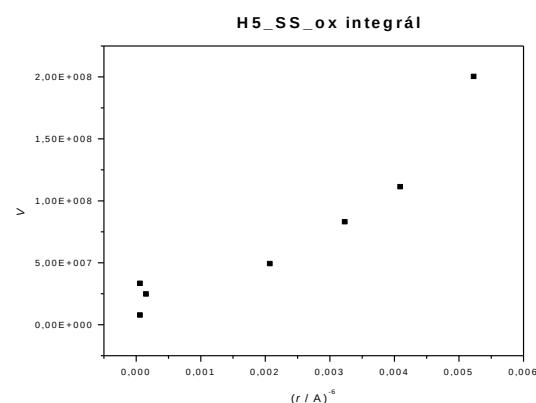
36. ábra: Az integrál - atom-atom távolság függvény a Tc5b_S20E esetében

16. táblázat: Vizsgált adatok a H5_SS_ox esetében

AS	Atom	Atom	$r / \text{\AA}$	$(r / \text{\AA})^{-6}$	V	I
Trp11	HD1	HE1	2.6	0.0032371	8.27E+07	9970097
Trp11	HD1	HZ2	5.0	0.0000640	3.30E+07	844253
Trp11	HE3	HH2	4.3	0.0001582	2.44E+07	1459606
Trp11	HE3	HZ2	5.0	0.0000640	7.46E+06	601314
Trp11	HE3	HZ3	2.5	0.0040960	1.11E+08	8950909
Trp11	HZ2	HE1	2.8	0.0020752	4.89E+07	5304403
Trp11	HZ3	HH2	2.4	0.0052328	2.00E+08	10865234



37. ábra: Az intenzitás - atom-atom távolság függvény a H5_SS_ox esetében



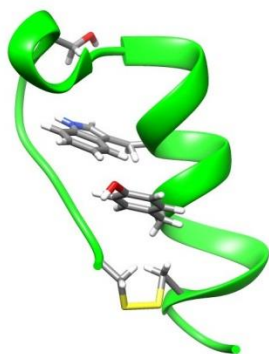
38. ábra: Az integrál - atom-atom távolság függvény a H5_SS_ox esetében

Ez a próbálkozás nem váltotta be a hozzá fűzött reményeket, mivel nem sikerült olyan függvényt meghatározni, amely megengedhető hibával leírná a *Jel-r* összefüggést, ezért a

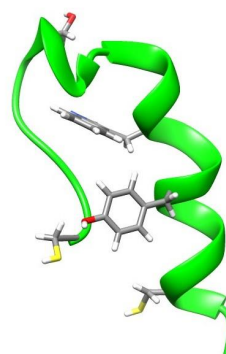
NOE kényszerfeltételeket nem kategorizáltam távolság szerint. (Bővebben a Függelék XI.1. fejezet d) pontjában.)

p) A Y8 oldalláncának pozíciója

A szerkezetszámolás során - a végső finomításkor - komoly problémákat okozott, hogy a Y8 oldalláncának aromás gyűrűje bizonyos esetekben megmagyarázhatatlan pozíciókat vesz fel. Ez elsősorban a H5_SS_ox és a H5_SS_red összevetésekor okozott komoly nehézséget.



39. ábra: A H5_SS_ox szerkezete



40. ábra: A H5_SS_red szerkezete

Noha ez a jelenség itt a leginkább szembeűnő, egyáltalán nem egyedi. Különösen a W11 és a Y8 gyűrűsíkainak relatív helyzetének különbsége tűnik hibásnak.

Ezzel a problémával viszont egyáltalán nem csak a saját szerkezeteimben találkoztam.

Megfigyeltem például, hogy a csoportunkban korábban leírt szerkezetek is - ebben az egyben - jelentősebben különböznek a PDB adatbázisban megtalálható Tc5b szerkezettől. [32]Először a saját munkámban kerestem a hibát, így igyekeztem megtalálni azokat a NOE kényszerfeltételeket, amelyek a gyűrűt ilyen, vagy olyan pozícióban rögzítik.

Ennek során tettem a következő érdekes megfigyelést. Egy 1000 db szerkezetből álló sokaságból számoltam több átlagot oly módon, hogy a CNS által számolt NOE energiát fokozatosan csökkentve, egyre kevesebb (alacsonyabb energiájú) szerkezetet vettem figyelembe az átlagszerkezet meghatározásakor. Eközben a kényszerfeltétel-listát értelemszerűen nem változtattam, hiszen az 1000 db szerkezet ugyanazon kényszerfeltételek alapján készült. Ahogy vittem lejjebb a NOE energia korlátját, úgy a Y8 gyűrűje fokozatosan tett egy kb. 90 °-os fordulatot. A 41. ábra mutatja a magasabb (kék) illetve alacsonyabb (zöld) energiájú átlagszerkezetet. A Y8 gyűrűjének elfordulásától eltekintve nem tapasztaltam jelentősebb különbséget a két átlagszerkezet között.

A másik érdekes megfigyelésem az volt, hogy mivel a Y8 oldalláncának jelei párosával degeneráltak (tehát HD# és HE# asszignálható), nem tudtam olyan kényszerfeltételt találni, amely egyértelműen megszabná a gyűrű elhelyezkedését. Sőt: mivel nem tudunk különbséget tenni a

gyűrű két „széle” között, elvileg sem lehet olyan kényszerfeltételt találni, amely a gyűrű pozícióját egyértelműen rögzítené.

Ennek eredményeképp arra a következtetésre jutottam, hogy a szerkezetszámolás szempontjából lényegében a Y8 oldallánca egy hengerszimmetrikus objektum, melynek palástján egy-egy körön helyezkednek el a HD#, illetve a HE# atompárok. Azt azonban, hogy a körön hol, nem tudjuk megadni. Innentől kezdve pedig lényegében a henger forgástengelyének pozícióját tudjuk a szerkezetszámolás során meghatározni, de ennél többet nem.

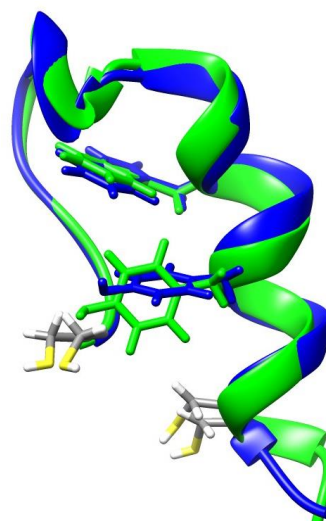
Ha pedig ez a feltételezés igaz, akkor nincs értelme a gyűrű síkjának elhelyezkedéséről beszélni, hiszen az teljesen esetleges. A dolog súlyát növeli, hogy - tudtommal - valamennyi Trp-kalitka esetében HD# és HE# látszik.

Véleményemet alátámasztja az alábbi idézet, melyre később találtam rá:

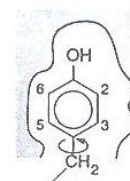
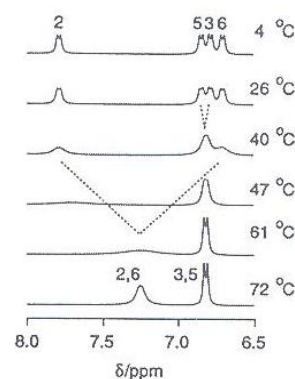
„Ha a fehérje merev, a tirozin négy gyűrűprotonjának lokális környezete és – amennyiben a véletlen egybeesésektől eltekintünk – kémiai eltolódásai különbözőek. (...) Ha azonban a gyűrű kétfogású tengelye körül 180 °-os átfordulásokat végez” HD1 és HD2, illetve HE1 és HE2 „felcserélődnek, és ha ez a csere gyors a frekvencia-különbséghez viszonyítva, akkor csak két rezonanciajel lesz észlelhető.” (...) „Egy fehérjében rögzített tirozinegység gyűrűprotonjainak kémiai eltolódás-különbsége tipikusan 1 ppm, úgyhogy a négy aromás rezonanciajel összeolvadása 500 MHz-en mérve kb. 500 s⁻¹-nél következik be.” A 40. ábra ugyaninnen származik.

(P. J. Hore: Mágneses magrezonancia, 65. oldal). [9]

Az a véleményem tehát, hogy a rendelkezésre álló NMR mérések szerint a Y8 oldallánca több száz Hz-es frekvenciával forog a gyűrű szimmetriatengelye körül, így a gyűrű pontos síkját, valamint a Y8 és W11 oldallancok gyűrűsíkjainak relatív térbeli helyzetét nem csak meghatározni nem lehet, hanem ezek a fogalmak lényegében értelmezhetetlenek.



41. ábra: A H5_SS_red magasabb (kék) illetve alacsonyabb (zöld) energiájú átlagszerkezete

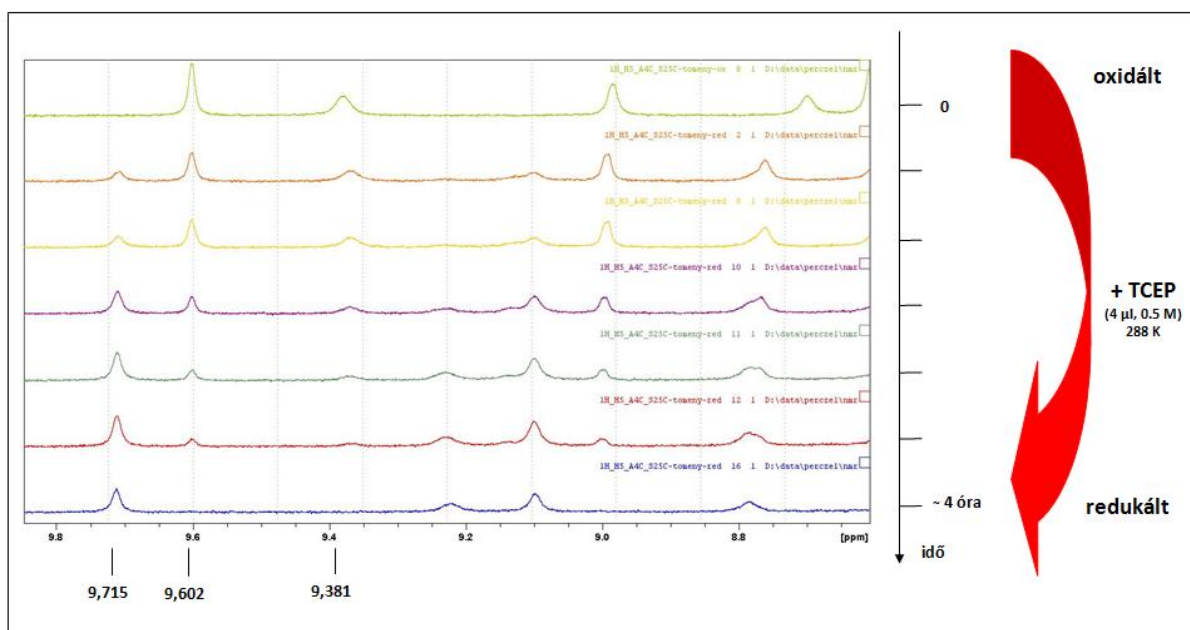


42. ábra: A Tyr-oldallánc jelei [9]

q) A diszulfidhíd *in situ* redukciója

A H2_SS és a H5_SS molekulák mérését úgy végeztük, hogy az oxidált formából elkészítettük az NMR mintát, ezt megmértük, majd az NMR csőben *in situ* redukáltuk, és ezt követően végeztük el a redukált molekula mérését. Ezzel a módszerrel egyrészt biztosítani tudtuk, hogy az oxidált és a redukált alak mérése a lehető legnagyobb mértékben egyező körülmények között történjen, másrészt pedig ez volt a legegyszerűbb - és leginkább költség-hatékony - eljárás.

Az *in situ* redukció úgy zajlott, hogy az NMR csövet a készülékből kivéve, kb. 4 µl 0,5 mol dm⁻³-es TCEP (tri-(2-karboxietil)-foszfín) oldatot adtunk hozzá, majd a készülékbe visszahelyeztük, és 288 K-en tartva, 1D spektrumok felvételével követtük a redukció folyamatát. Az első kísérletben még nem tudtuk, hogy milyen jeleket követünk, egyszerűen az állandóság beálltáig várakoztunk, a későbbi mérésekben már célzottabban tudtuk végezni a redukció követését. A redukció folyamatát a 43. ábra szemlélteti a H5_SS_ox jelöletlen minta redukciójának példáján, a redukció során követett jeleket pedig a 17. táblázat tartalmazza.



43. ábra: Az *in situ* redukció követése

17. táblázat: Az *in situ* redukció követésére alkalmas jelek

AS	Atom	Shift	
		H5_SS_ox	H5_SS_red
Y8	HN	9.381	8.453
W11	HE1	9.602	9.715

Mivel ilyen jellegű redukcióra, és ennek NMR spektroszkópiával való követésére nem találunk irodalmi példát, meg kellett győződnünk arról, hogy a TCEP hozzáadásával valóban

elértük a kívánt hatást, tehát a diszulfidhíd valóban megszűnt. Ennek bizonyítására összegyűjtöttem azokat a jeleket, melyek az oxidált és a redukált molekulákban különböznek (22. táblázat) és ezek között megtaláltam a feltételezett redukcióban közvetlenül érintett Cys-ek jeleit is (18. táblázat). Ezzel egyértelműen bizonyítást nyert, hogy a redukálószer hatására valóban a diszulfidhíd redukálódott, az első kísérletben végrehajtott állandóságig való titrálás pedig bizonyítéka annak, hogy a redukció teljes mértékben végbement.

18. táblázat: A diszulfidhíd redukcióját bizonyító eltolódás-változások

AS	Atom	H2_SS_ox	H2_SS_red	H5_SS_ox	H5_SS_red
C4	HA	3.943	4.056	4.430	4.274
C4	HB1	3.310	2.922	3.390	3.054
C25	HB1	3.513	2.882	3.744	2.927
C25	HB2	3.189	2.882	3.310	2.927
C25	HN	7.358	7.829	7.576	7.671

A 18. táblázatban szereplő eltolódás-változások közül különösen a H β -atomok eltolódásának szisztematikus megváltozása bizonyítja a redukciót.

Emellett közvetlen bizonyítéka a redukciónak, hogy az oxidált és a redukált alak kényszerfeltétel-készlete jelentősen különbözik a Cys-ek környezetében. Teljes bizonyossággal kijelenthető a NOESY spektrum alapján, hogy míg az oxidált alakban a két Cys oldallánca „közel” van egymáshoz, addig a redukált alakban ez a távolság jelentősen megnő, ez pedig értelemszerűen elképzelhetetlen lenne, ha a redukció nem menne végbe.

2. A szerkezetek összevetésének adatai

A 19. táblázat tartalmazza a vizsgált molekulák HA eltolódásait és CSD_{HA} értékeit. Ennek alapján készültek a VIII.4. fejezet d) pont CSD_{HA} ábrái.

19. táblázat: HA eltolódások és CSD értékek

	H2 (Irodalmi)		H2_SS_ox		H2_SS_red		H5 (Irodalmi)		H5_SS_ox		H5_SS_red	
	Shift	CSD	Shift	CSD	Shift	CSD	Shift	CSD	Shift	CSD	Shift	CSD
E1 HA									3.954	-0.341	4.121	-0.174
E2 HA							4.341	0.046	4.289	-0.006	4.361	0.066
E3 HA							4.173	-0.122	4.228	-0.067	4.180	-0.115
C4 HA	4.053	-0.296	3.943	-0.743	4.056	-0.630	4.086	-0.263	4.430	-0.256	4.274	-0.412
V5 HA	4.150	-0.034	3.721	-0.463	4.068	-0.116	3.823	-0.361	3.703	-0.481	3.852	-0.332
R6 HA	4.282	-0.114	4.070	-0.326	4.140	-0.256	4.008	-0.388	4.050	-0.346	4.040	-0.356
L7 HA	4.323	-0.062	4.206	-0.179	4.247	-0.138	4.120	-0.265	4.145	-0.240	4.139	-0.246
Y8 HA	4.334	-0.270	3.947	-0.657	4.128	-0.476	4.126	-0.478	3.993	-0.611	4.063	-0.541
I9 HA	3.898	-0.326	3.784	-0.440	3.758	-0.466	3.673	-0.551	3.773	-0.451	3.678	-0.546
Q10 HA	4.120	-0.253	3.917	-0.456	3.933	-0.440	4.047	-0.326	3.912	-0.461	3.903	-0.470
W11 HA	4.424	-0.278	4.242	-0.460	4.277	-0.425	4.194	-0.508	4.239	-0.463	4.238	-0.464
L12 HA	3.823	-0.562	3.416	-0.969	3.451	-0.934	3.344	-1.041	3.410	-0.975	3.386	-0.999
K13 HA	4.076	-0.282	3.935	-0.423	3.939	-0.419	3.955	-0.403	3.927	-0.431	3.909	-0.449
D14 HA	4.220	-0.075	4.535	-0.230	4.533	-0.232	4.161	-0.134	4.534	-0.231	4.523	-0.242
G15 HA1	4.080	0.108	4.198	0.226	4.155	0.183	4.176	0.204	4.176	0.204	4.161	0.189
G15 HA2	3.722	-0.250	3.448	-0.524	3.492	-0.480	3.471	-0.501	3.445	-0.527	3.457	-0.515
G16 HA1	3.539	-0.433	3.107	-0.865	3.167	-0.805	3.021	-0.951	3.091	-0.881	3.129	-0.843
G16 HA2			0.567	-3.405			0.849	-3.123	0.588	-3.384	0.650	-3.322
P17 HA	4.518	0.047	4.652	0.181	4.621	0.150	4.607	0.136	4.632	0.161	4.639	0.168
S18 HA	4.453	-0.045	4.500	0.002	4.472	-0.026	4.457	-0.041	4.480	-0.018	4.481	-0.017
S19 HA	4.340	-0.158	4.135	-0.363	4.155	-0.343	4.213	-0.285	4.136	-0.362	4.133	-0.365
G20 HA1	4.084	0.112	4.327	0.355	4.271	0.299	4.252	0.280	4.312	0.340	4.296	0.324
G20 HA2	3.911	-0.061	3.800	-0.172	3.820	-0.152	3.828	-0.144	3.786	-0.186	3.803	-0.169
R21 HA	4.763	0.367	5.091	0.695	5.028	0.632	4.974	0.578	5.067	0.671	5.080	0.684
P22 HA	4.695	0.224	4.779	0.308	4.753	0.282	4.741	0.270	4.773	0.302	4.815	0.344
P23 HA			2.207	-2.264	2.612	-1.859	2.499	-1.972	2.205	-2.266	2.473	-1.998
P24 HA	4.391	-0.080	4.249	-0.222	4.367	-0.104	4.320	-0.151	4.202	-0.269	4.329	-0.142
C25 HA	4.338	-0.160	4.236	-0.450	4.285	-0.401	4.331	-0.167	4.132	-0.554	4.315	-0.371

Az 20. táblázat tartalmazza a vizsgált molekulák HN eltolódásait. Ennek alapján készültek a VIII.4. fejezet d) pont CSD_{HN} ábrái.

20. táblázat: HN eltolódások és CSD értékek

	H2 (irodalmi)		H2_SS_ox		H2_SS_red		H5 (irodalmi)		H5_SS_ox		H5_SS_red	
	Shift	CSD	Shift	CSD	Shift	CSD	Shift	CSD	Shift	CSD	Shift	CSD
E2 HN							9.268	0.900			9.212	0.844
E3 HN							9.130	0.762	8.986	0.618	9.098	0.730
C4 HN							8.784	0.535	8.700	0.388	8.782	0.470
V5 HN							7.410	-1.026	7.802	-0.634	7.382	-1.054
R6 HN	8.714	0.440	8.613	0.339	8.727	0.453	8.014	-0.260	7.811	-0.463	7.959	-0.315
L7 HN	8.508	0.085	7.700	-0.723	8.218	-0.205	8.630	0.207	8.438	0.015	8.536	0.113
Y8 HN	8.517	0.334	9.207	1.024	8.460	0.277	8.190	0.007	9.381	1.198	8.453	0.270
I9 HN	8.137	-0.058	8.694	0.499	8.455	0.260	8.669	0.474	8.497	0.302	8.540	0.345
Q10 HN	8.102	-0.309	7.512	-0.899	7.786	-0.625	7.973	-0.438	7.589	-0.822	7.892	-0.519
W11 HN	8.094	0.000	8.204	0.110	8.047	-0.047	8.002	-0.092	8.268	0.174	8.121	0.027
L12 HN	8.276	-0.147	8.528	0.105	8.347	-0.076	8.523	0.100	8.607	0.184	8.417	-0.006
K13 HN	8.187	-0.221	8.327	-0.081	8.266	-0.142	8.358	-0.050	8.294	-0.114	8.316	-0.092
D14 HN	8.137	-0.231	7.998	-0.412	8.005	-0.405	7.658	-0.710	7.968	-0.442	7.997	-0.413
G15 HN	8.056	-0.335	7.534	-0.857	7.575	-0.816	7.555	-0.836	7.534	-0.857	7.534	-0.857
G16 HN	8.239	-0.152	8.593	0.202	8.465	0.074	8.291	-0.100	8.590	0.199	8.528	0.137
S18 HN	8.260	-0.120	7.672	-0.708	7.763	-0.617	7.797	-0.583	7.681	-0.699	7.699	-0.681
S19 HN	8.285	-0.095	8.231	-0.149	8.232	-0.148	8.200	-0.180	8.232	-0.148	8.236	-0.144
G20 HN	8.245	-0.146	7.932	-0.459	7.970	-0.421	8.000	-0.391	7.919	-0.472	7.941	-0.450
R21 HN	8.134	-0.140	8.169	-0.105	8.144	-0.130	8.120	-0.154	8.165	-0.109	8.167	-0.107
C25 HN	8.434	0.054	7.358	-0.954	7.829	-0.483	8.302	-0.078	7.576	-0.736	7.671	-0.641

A 21. táblázat tartalmazza a vizsgált molekulák N eltolódásait. Ennek alapján készültek a VIII.4. fejezet d) pont CSD_N ábrái.

21. táblázat: N eltolódások és CSD értékek

	H5		H5_SS_ox		H5_SS_red	
	Shift	CSD	Shift	CSD	Shift	CSD
E2 N					124.174	3.144
E3 N	124.750	3.720	123.530	2.500	124.649	3.619
C4 N	120.513	-3.627	116.923	-1.817	116.741	-1.999
V5 N	118.205	-1.095	119.193	-0.107	122.831	3.531
R6 N	121.107	0.387	118.897	-1.823	120.905	0.185
L7 N	119.779	-2.051	119.203	-2.627	118.675	-3.155
Y8 N	124.429	3.949	125.877	5.397	124.858	4.378
I9 N	118.719	-1.361	119.430	-0.650	119.751	-0.329
Q10 N	120.380	0.340	119.588	-0.452	119.819	-0.221
W11 N	121.587	0.327	121.970	0.710	121.816	0.556
L12 N	119.884	-1.946	119.160	-2.670	119.284	-2.546
K13 N	122.639	1.649	123.537	2.547	123.292	2.302
D14 N	117.771	-3.259	118.562	-1.868	118.692	-1.738
G15 N	105.732	-3.308	105.923	-3.117	106.022	-3.018
G16 N	113.390	4.350	114.923	5.883	114.686	5.646
S18 N	113.362	-2.678	113.089	-2.951	113.176	-2.864
S19 N	117.478	1.438	117.494	1.454	117.541	1.501
G20 N	109.708	0.668	109.724	0.684	109.750	0.710
R21 N	119.978	-0.742	119.602	-1.118	119.581	-1.139
C25 N	120.851	4.811	118.337	-0.403	121.491	2.751

Az oxidált és redukált szerkezetek között mind a H2, mind a H5 származékokban számottevő eltérés mutatkozik. Megfigyeltem néhány olyan ^1H eltolódást, amely rendkívül szignifikánsan és mindkét molekulában megváltozik a redukció hatására. Ezeket a 22. táblázatban gyűjtöttem össze. A táblázatban az adatok a változás mértéke szerint csökkenő sorrendben szerepelnek.

22. táblázat: A redukció hatására szignifikánsan változó ^1H eltolódások

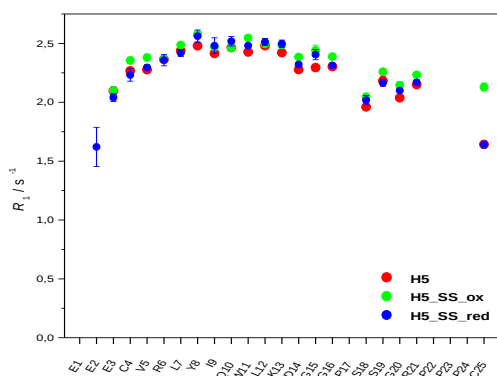
AS	Atom	H2_SS_ox	H2_SS_red	H5_SS_ox	H5_SS_red
Y8	HN	9.207	8.460	9.381	8.453
C25	HB1	3.513	2.882	3.744	2.927
L7	HN	7.700	8.218	8.438	8.536
C25	HN	7.358	7.829	7.576	7.671
P23	HA	2.207	2.612	2.205	2.473
C4	HB1	3.310	2.922	3.390	3.054
V5	HA	3.721	4.068	3.703	3.852
C4	HA	3.943	4.056	4.430	4.274
C25	HB2	3.189	2.882	3.310	2.927
Q10	HN	7.512	7.786	7.589	7.892
L12	HG	1.888	1.622	1.878	1.645
I9	HN	8.694	8.455	8.497	8.540
W11	HE3	6.878	7.069	6.908	7.011
P24	HD1	2.996	3.184	2.943	3.134
L12	HN	8.528	8.347	8.607	8.417
Y8	HA	3.947	4.128	3.993	4.063
P24	HD2	2.781	2.962	2.764	2.927
L12	HB1	2.109	1.947	2.076	1.998
W11	HN	8.204	8.047	8.268	8.121
I9	HG11	1.930	1.794	1.963	1.910
G16	HN	8.593	8.465	8.590	8.528
L12	HD1#	1.078	0.954	1.058	0.937
P24	HA	4.249	4.367	4.202	4.329
R6	HN	8.613	8.727	7.811	7.959
W11	HE1	9.637	9.739	9.601	9.715

3. A dinamikai elemzés ábrái

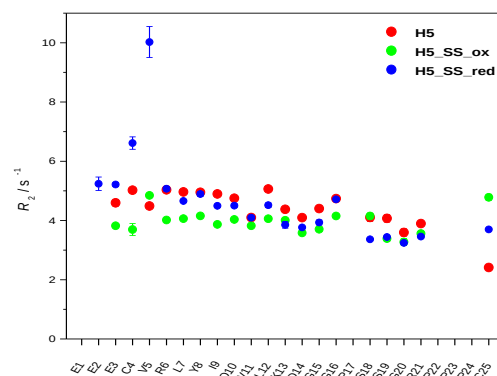
A Függelék ezen fejezetében a dinamikai elemzés fontosabb ábráit gyűjtöttem össze. Mivel a teljeskörű dinamikai elemzéshez további mérések elvégzésére lenne szükség, a dinamikai mérések eredményeit csak a szerkezetvizsgálat következtetéseinek alátámasztására használtam.

a) Nyers adatok

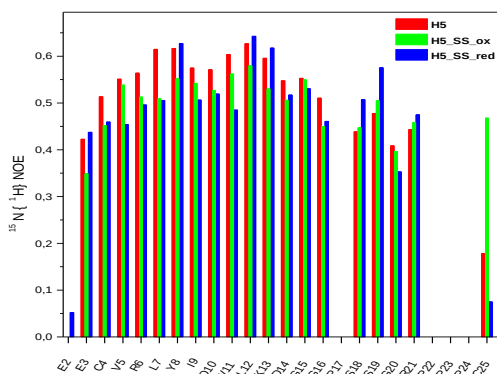
A T_1 és T_2 relaxációs mérések, valamint a hetNOE mérések alapján meghatároztam az R_1 , R_2 és hetNOE paramétereket, ezek felhasználásával pedig a spektrális sűrűségfüggvény (J) értékeit az $\omega=0$, ω_N és a $0,87\omega_H$ pontokban. [33]



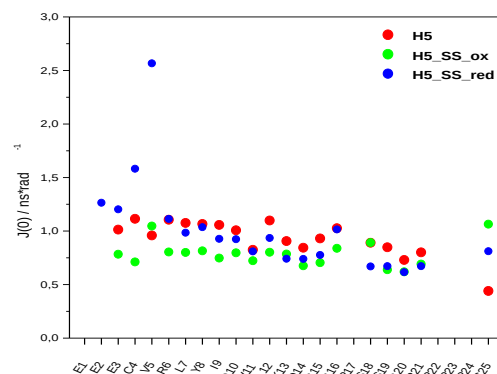
44. ábra: R_1 relaxációs paraméterek



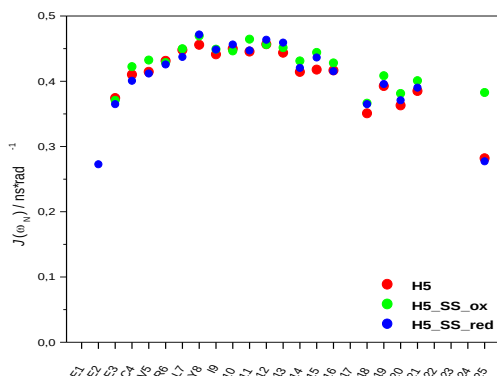
47. ábra: R_2 relaxációs paraméterek



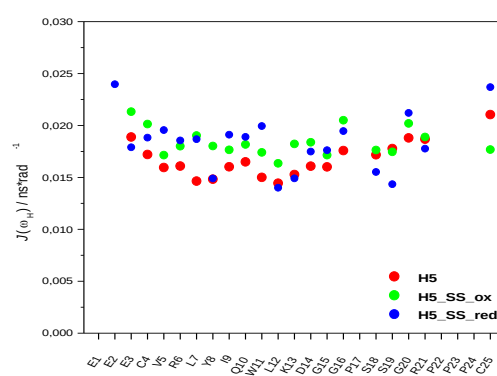
45. ábra: hetNOE paraméterek



48. ábra: $J(0)$ értékek



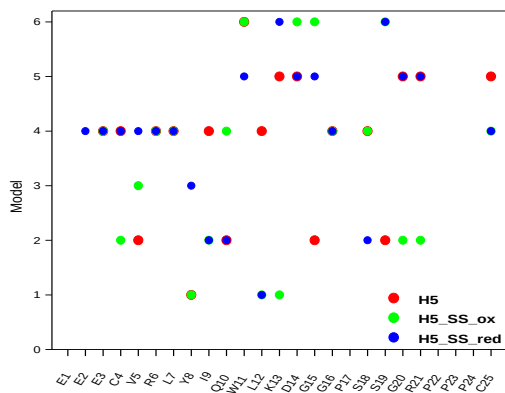
46. ábra: $J(\omega_N)$ értékek



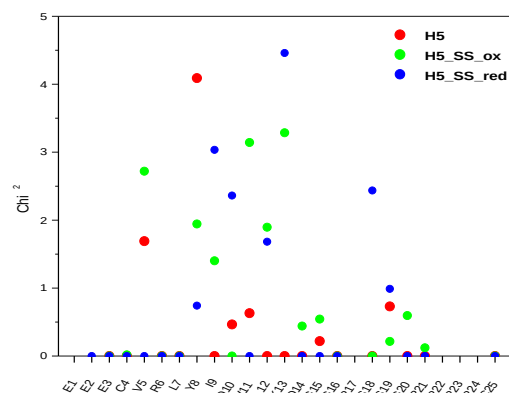
49. ábra: $J(\omega_H)$ értékek

b) Lipari-Szabó-féle analízis

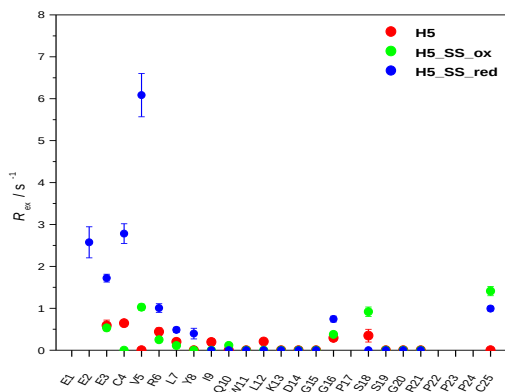
Az R_1 , R_2 és hetNOE paraméterek alapján Tensor 2.0 [30] használatával elvégeztem a Lipari-Szabó féle analízist, melynek eredményeit az alábbi ábrák tartalmazzák.



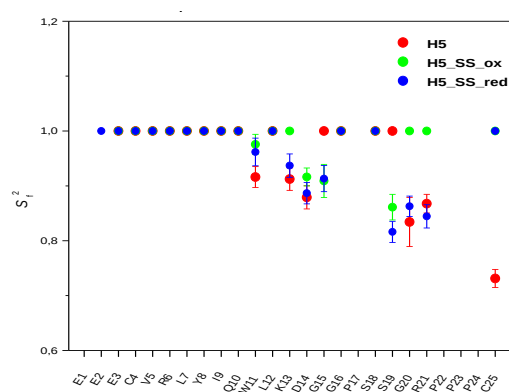
50. ábra: A Tensor által alkalmazott modellek



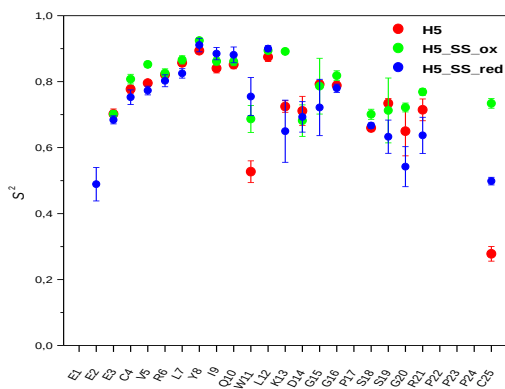
53. ábra: χ^2 értékek



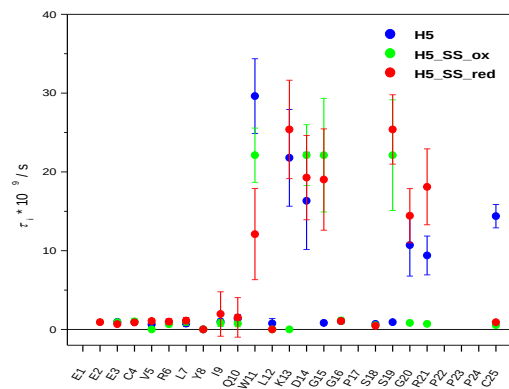
51. ábra: R_{ex} relaxációs paraméterek



54. ábra: S_f^2 paraméterek



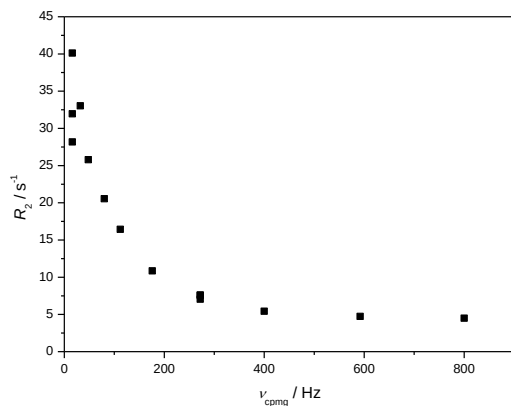
52. ábra: S^2 rend paraméterek



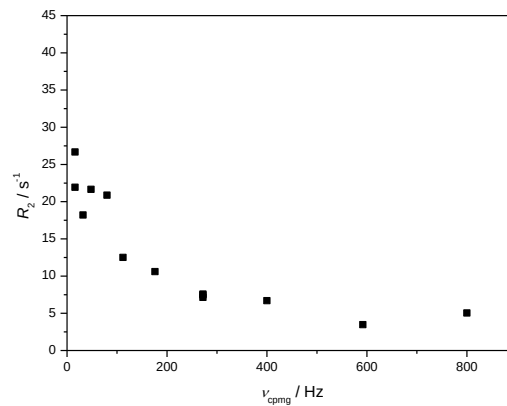
55. ábra: τ_i paraméterek

c) CPMG effektust mutató ábrák 300 K-en

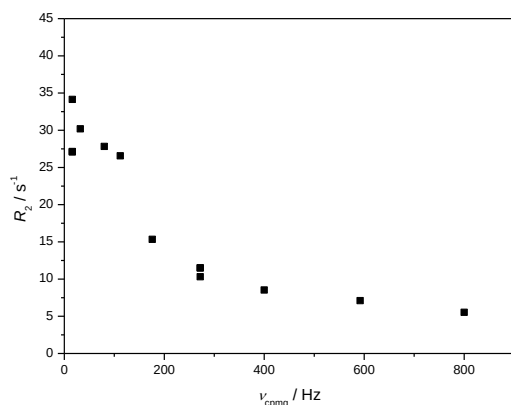
A H5 és a H5_SS_ox esetében CPMG effektust (olyan lassú cserét, mely a kémiai eltolódást megváltoztatja) nem tapasztaltunk, a H5_SS_red esetében azonban a redukált Cys-ek környezetében, az alább feltüntetett aminosavak esetében sikerült CPMG effektust mérnünk.



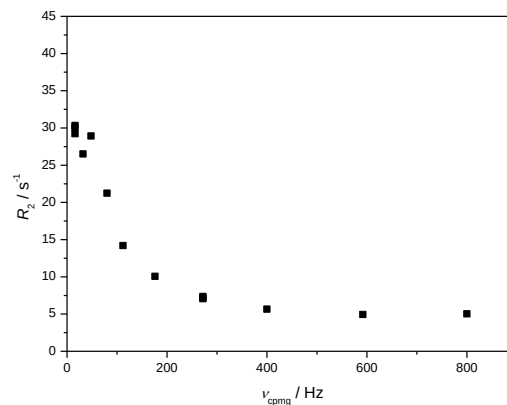
56. ábra: CPMG effektus: H5_SS_red, E3



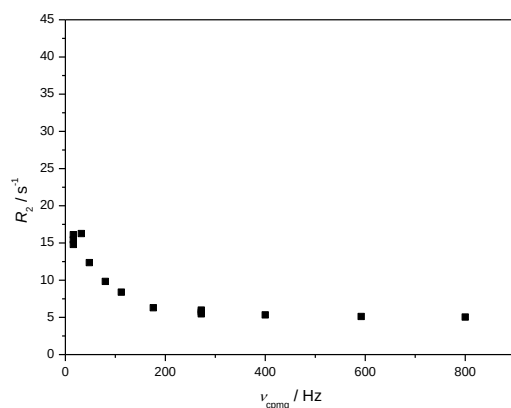
59. ábra: CPMG effektus: H5_SS_red, C4



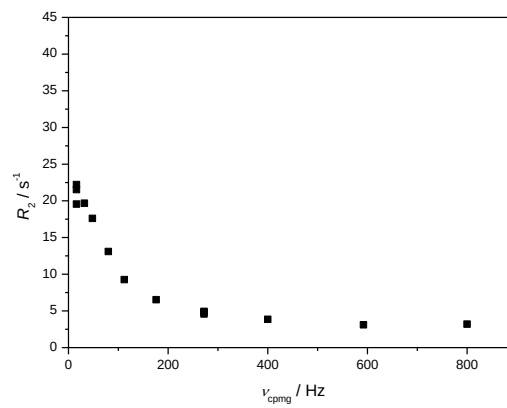
57. ábra: CPMG effektus: H5_SS_red, V5



60. ábra: CPMG effektus: H5_SS_red, R6



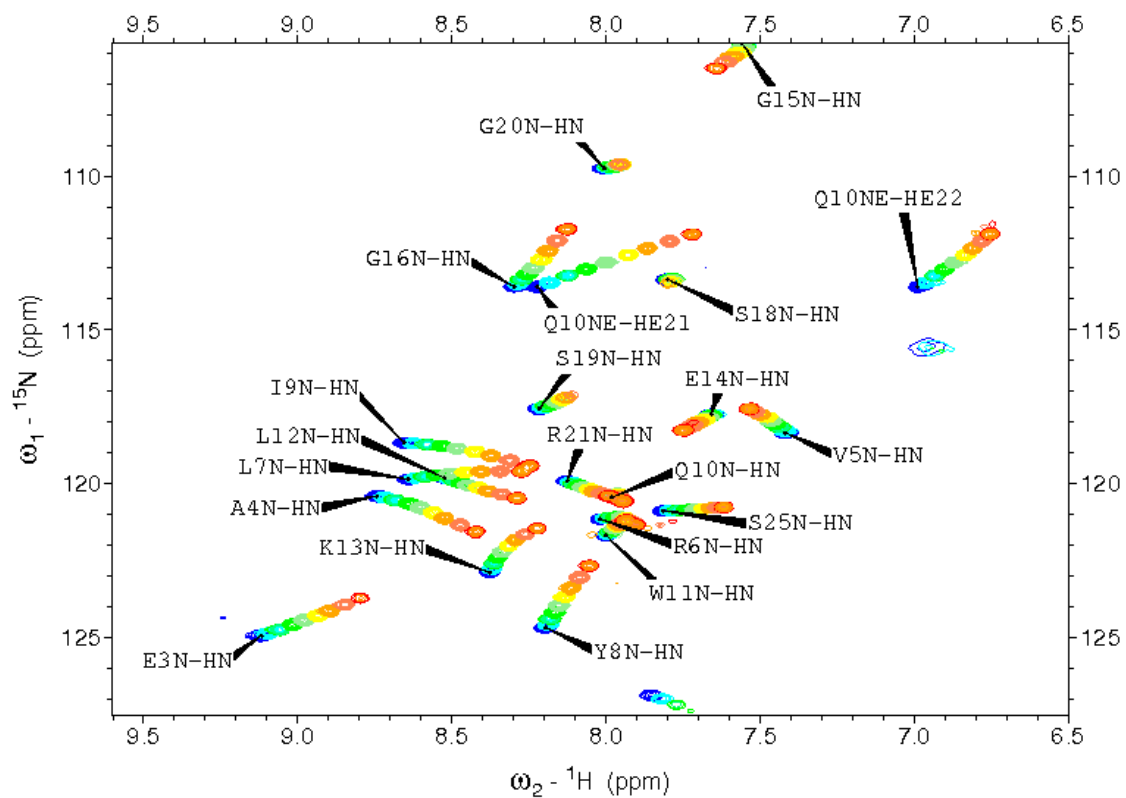
58. ábra: CPMG effektus: H5_SS_red, Y8



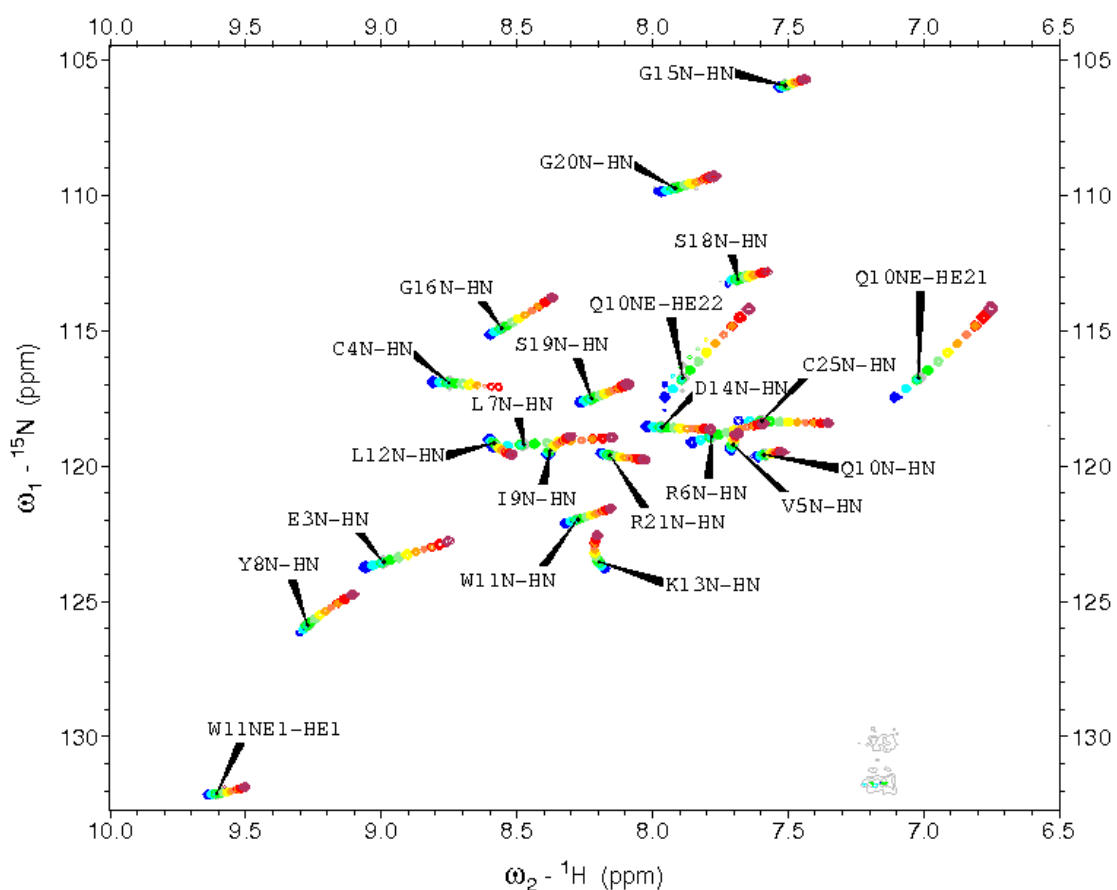
61. ábra: CPMG effektus: H5_SS_red, C25

d) [^{15}N - ^1H]-HSQC spektrumok hőmérsékletfüggése

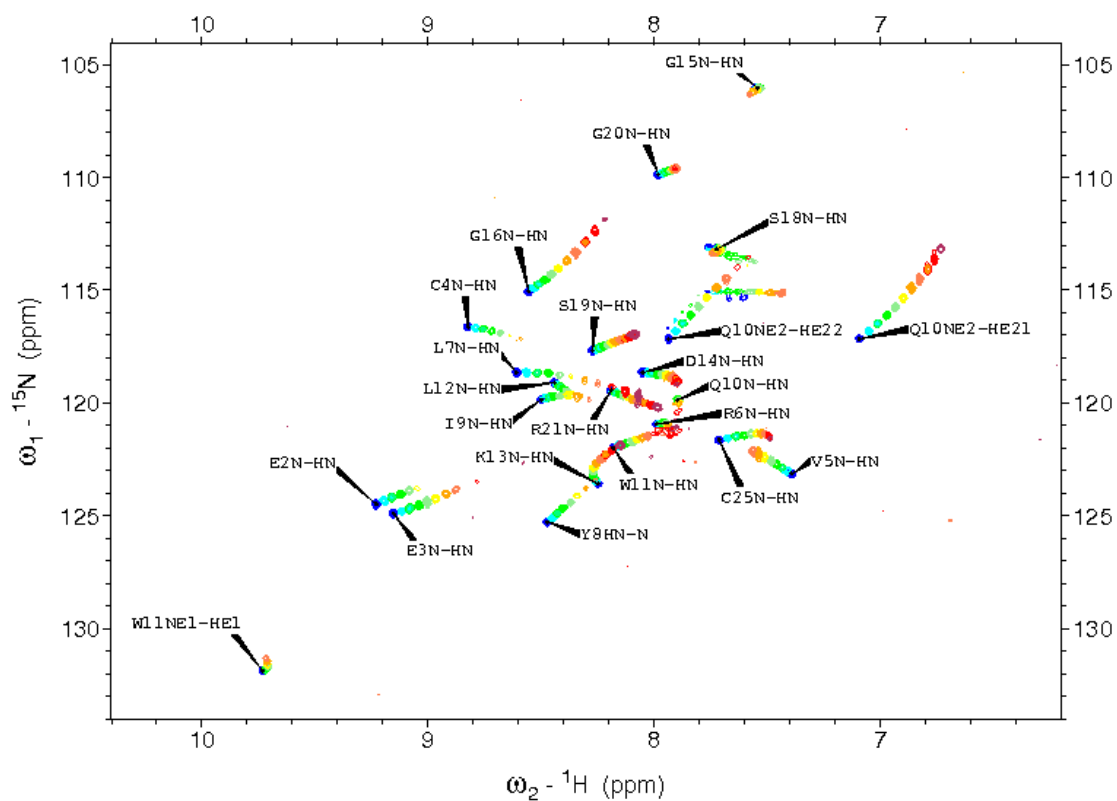
A hőmérsékletfüggő HSQC mérések kvantitatív elemzésére [31] még nem került sor, csupán a spektrumokat közlöm.



62. ábra: A H5 hőmérsékletfüggő [^{15}N - ^1H]-HSQC spektruma



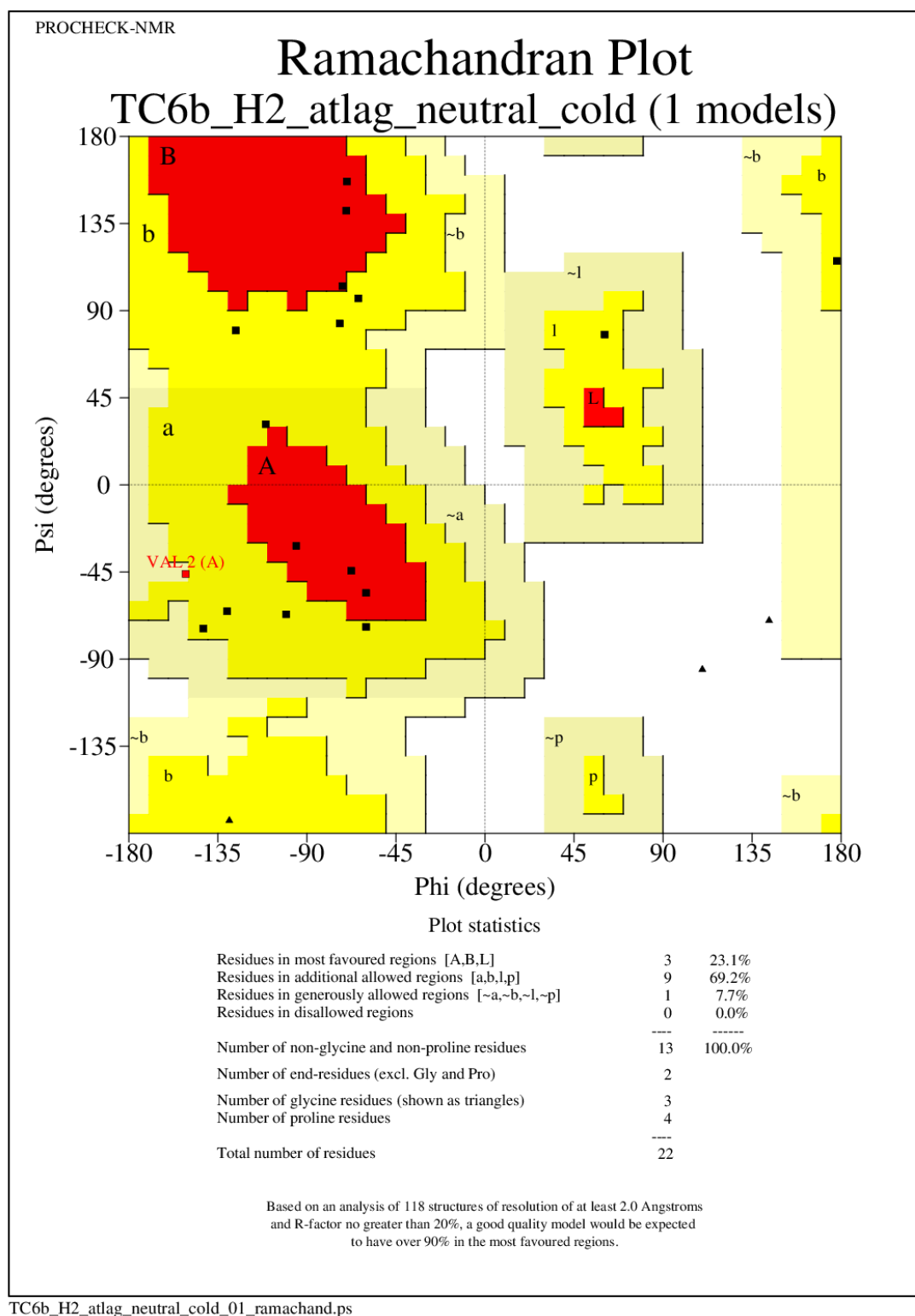
63. ábra: A H5_SS_ox hőmérsékletfüggő [^{15}N - ^1H]-HSQC spektruma



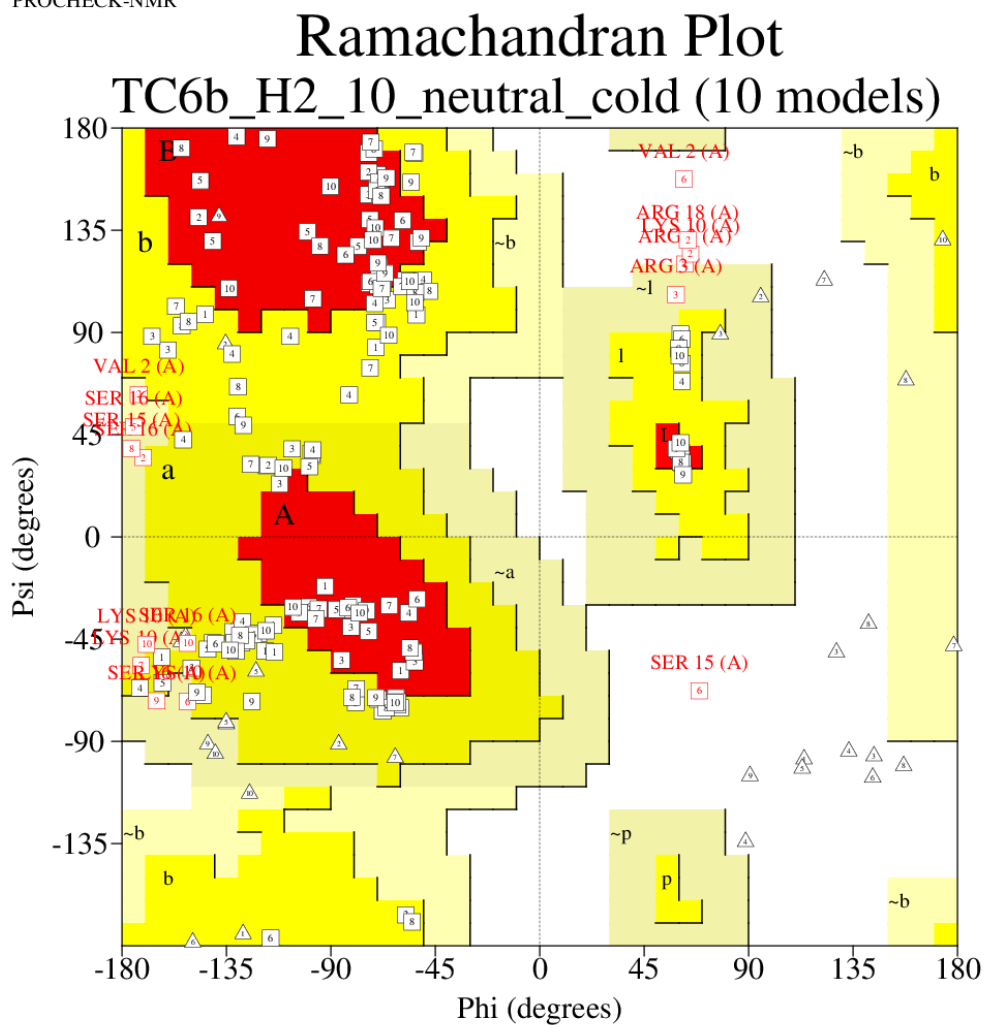
64. ábra: A H5_SS_red hőmérsékletfüggő [^{15}N - ^1H]-HSQC spektruma

4. A számolt szerkezetek Ramachandran-diagramjai

A számolt szerkezeteket a korábbi fejezetek tartalmazzák, a megfelelő Ramachandran-diagramokat itt gyűjtöttem össze. (Bővebben a Függelék XI.1. fejezet e) pontjában.)



65. ábra: A H2 átlagszerkezetének Ramachandran-diagramja

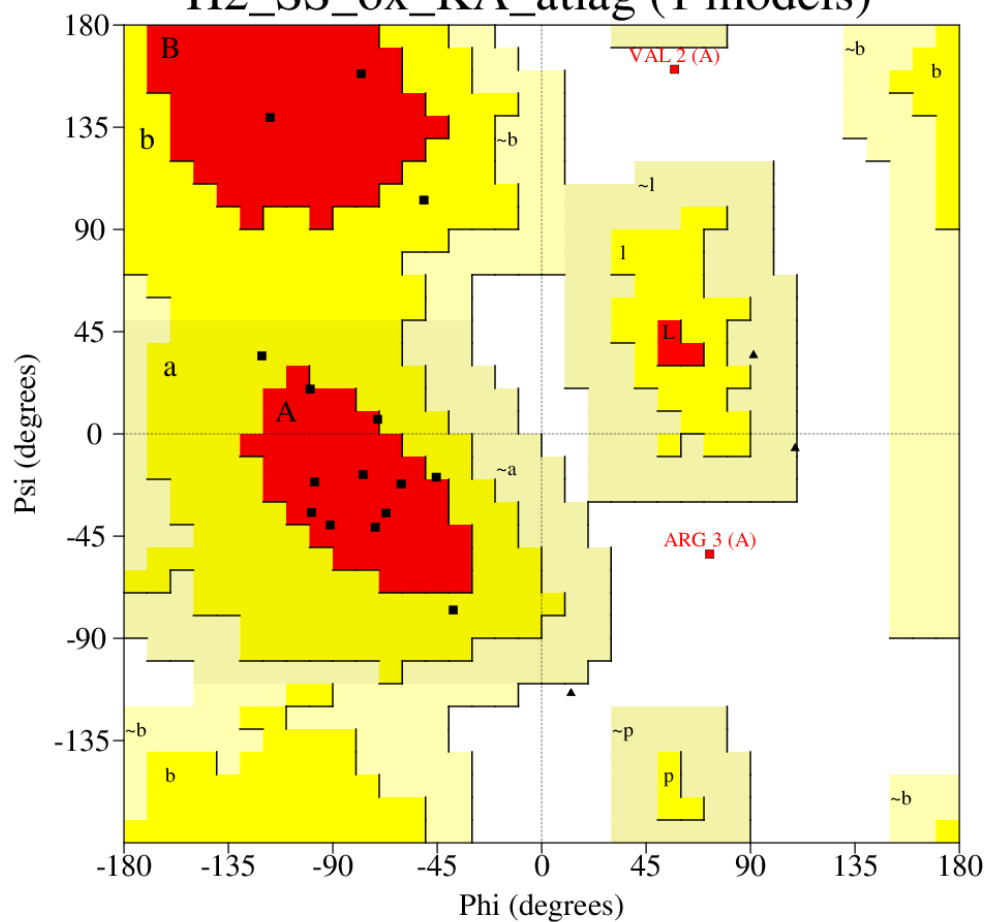


TC6b_H2_10_neutral_cold_01_ramachand.ps

66. ábra: A H2 szerkezetsokaságának Ramachandran-diagramja

Ramachandran Plot

H2_SS_ox_KA_atlag (1 models)



Plot statistics

Residues in most favoured regions [A,B,L]	10	76.9%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	1	7.7%
Residues in generously allowed regions [~a,~b,~l,~p]	0	0.0%
Residues in disallowed regions	2	15.4%

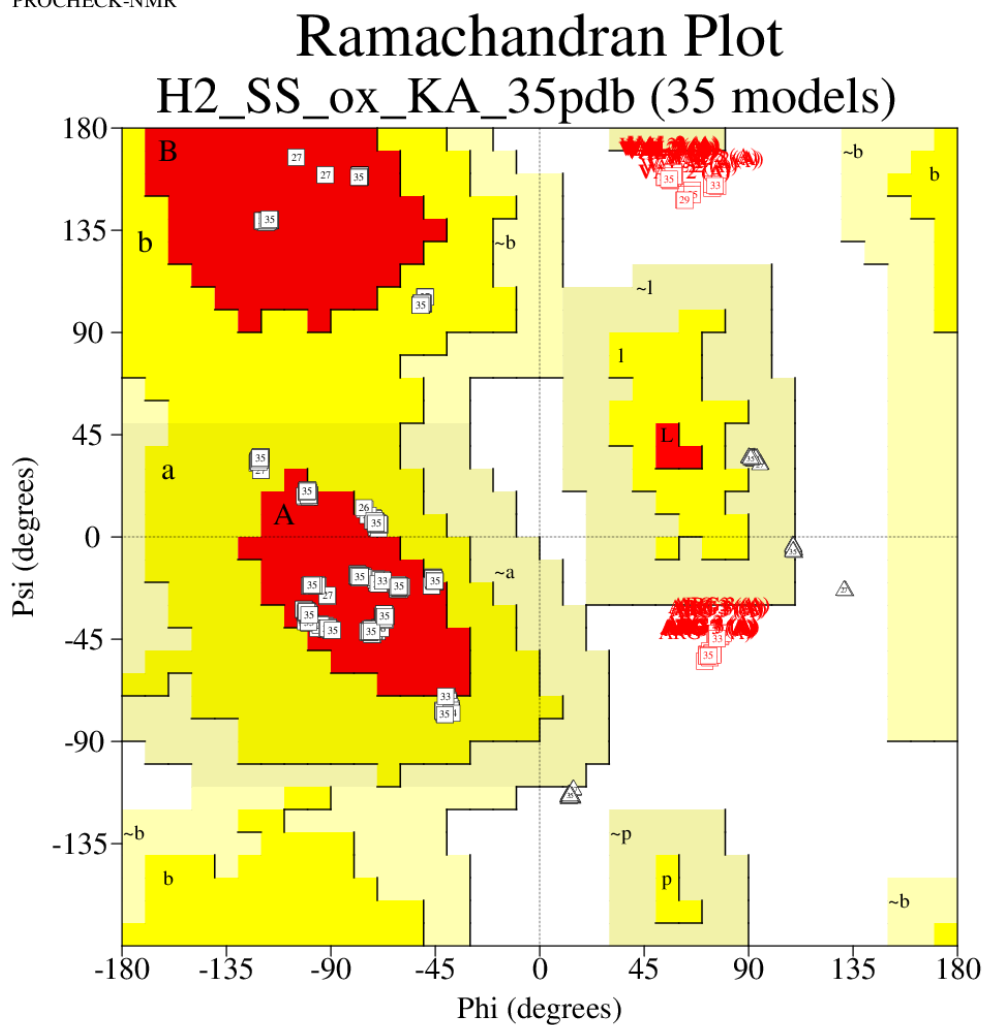
Number of non-glycine and non-proline residues	13	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	2	
Number of glycine residues (shown as triangles)	3	
Number of proline residues	4	

Total number of residues	22	

Based on an analysis of 118 structures of resolution of at least 2.0 Angstroms and R-factor no greater than 20%, a good quality model would be expected to have over 90% in the most favoured regions.

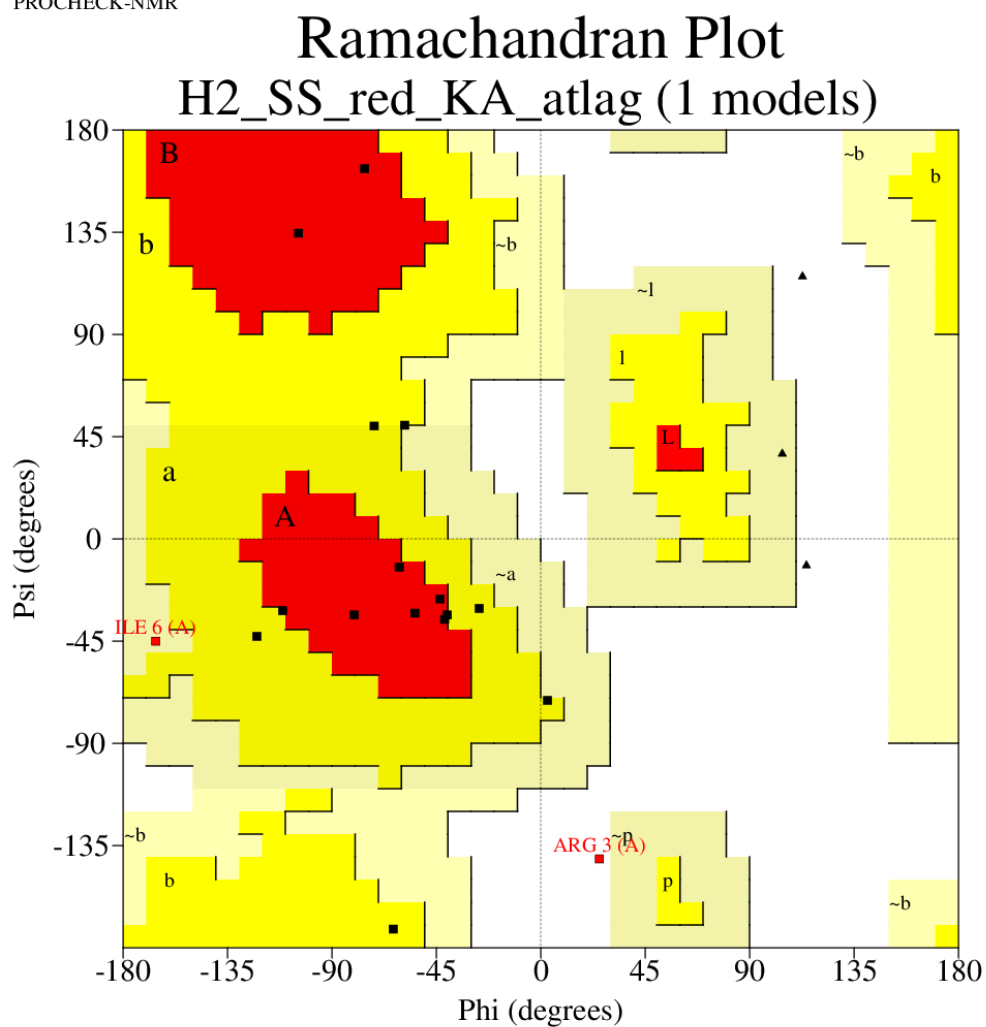
H2_SS_ox_KA_atlag_01_ramachand.ps

67. ábra: A H2_SS_ox átlagszerkezetének Ramachandran-diagramja



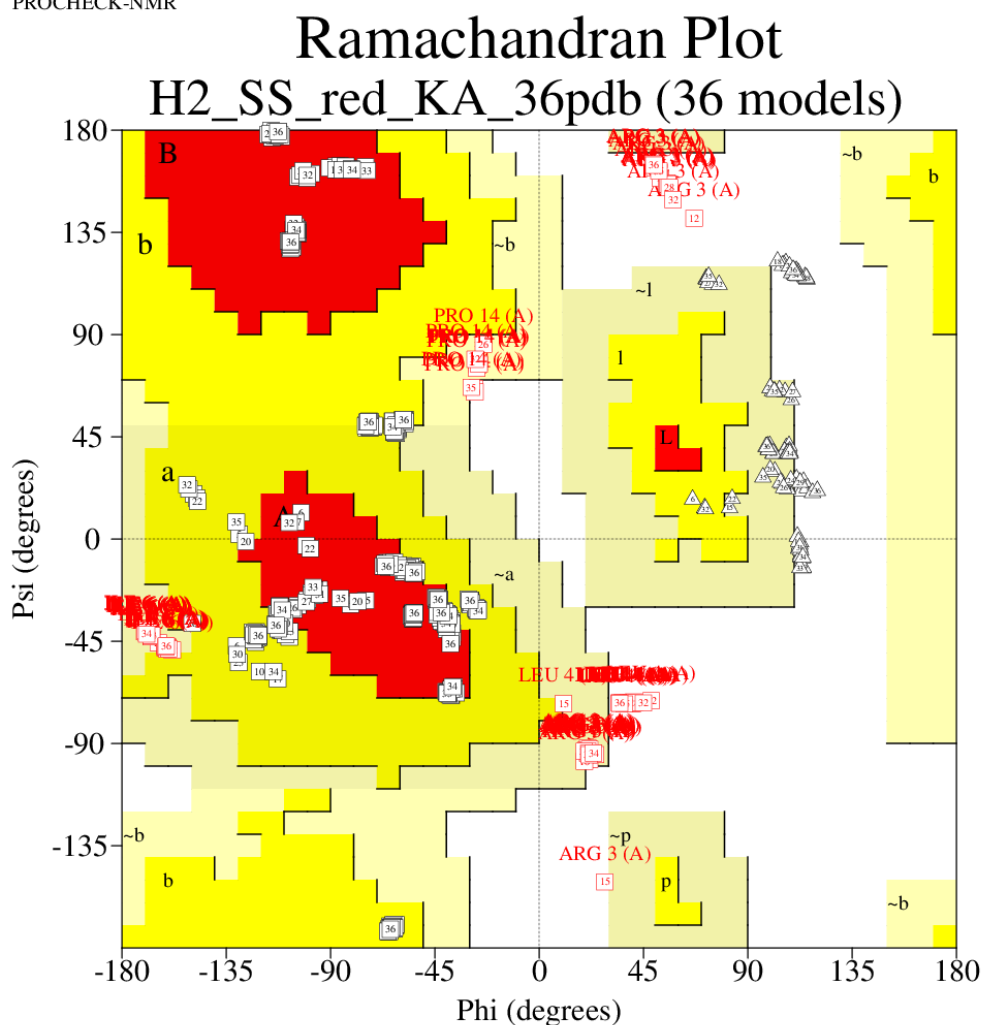
H2_SS_ox_KA_35pdb_01_ramachand.ps

68. ábra: A H2_SS_ox szerkezetsokaságának Ramachandran-diagramja



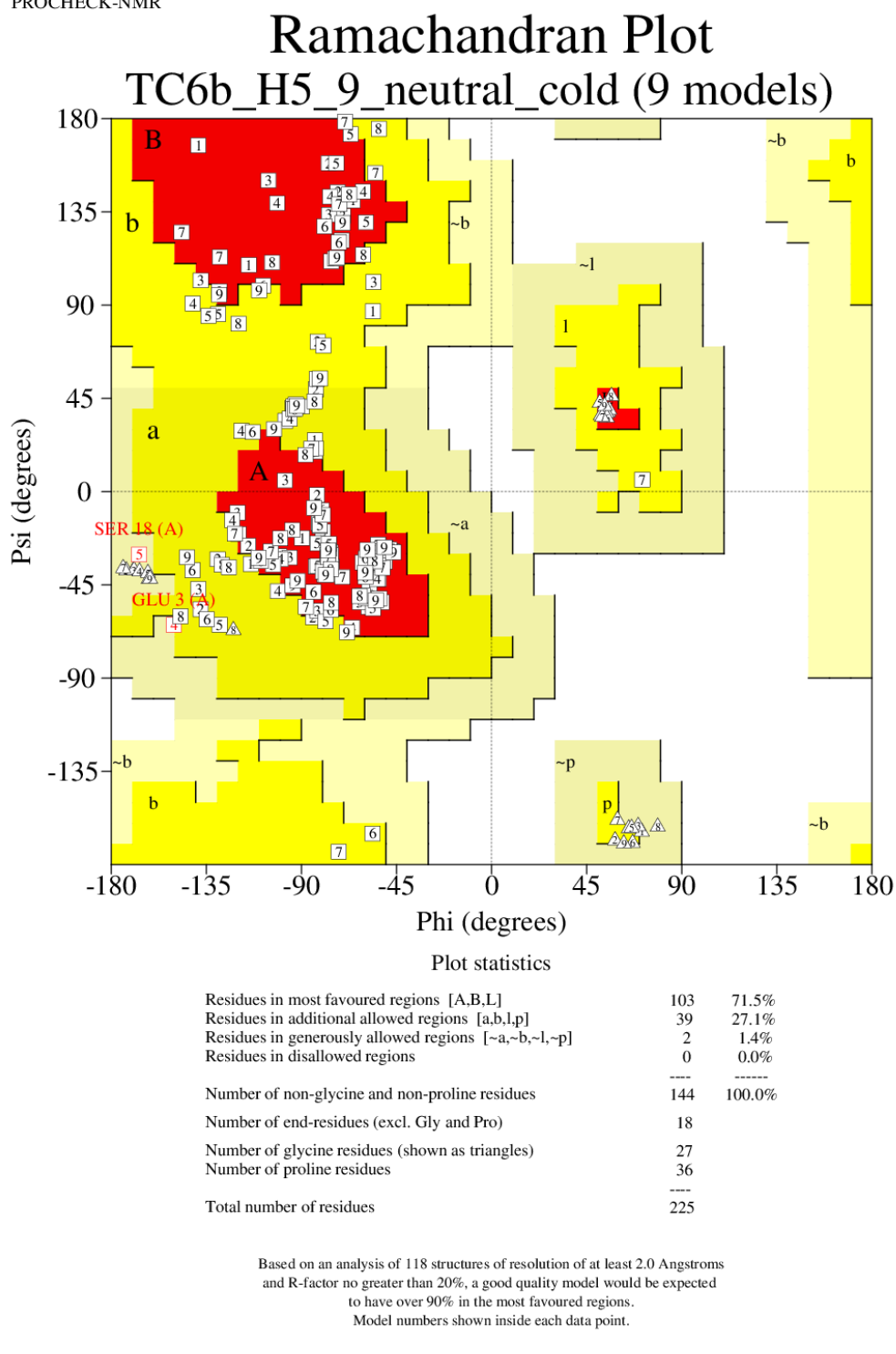
H2_SS_red_KA_atlag_01_ramachand.ps

69. ábra: A H2_SS_red átlagszerkezetének Ramachandran-diagramja



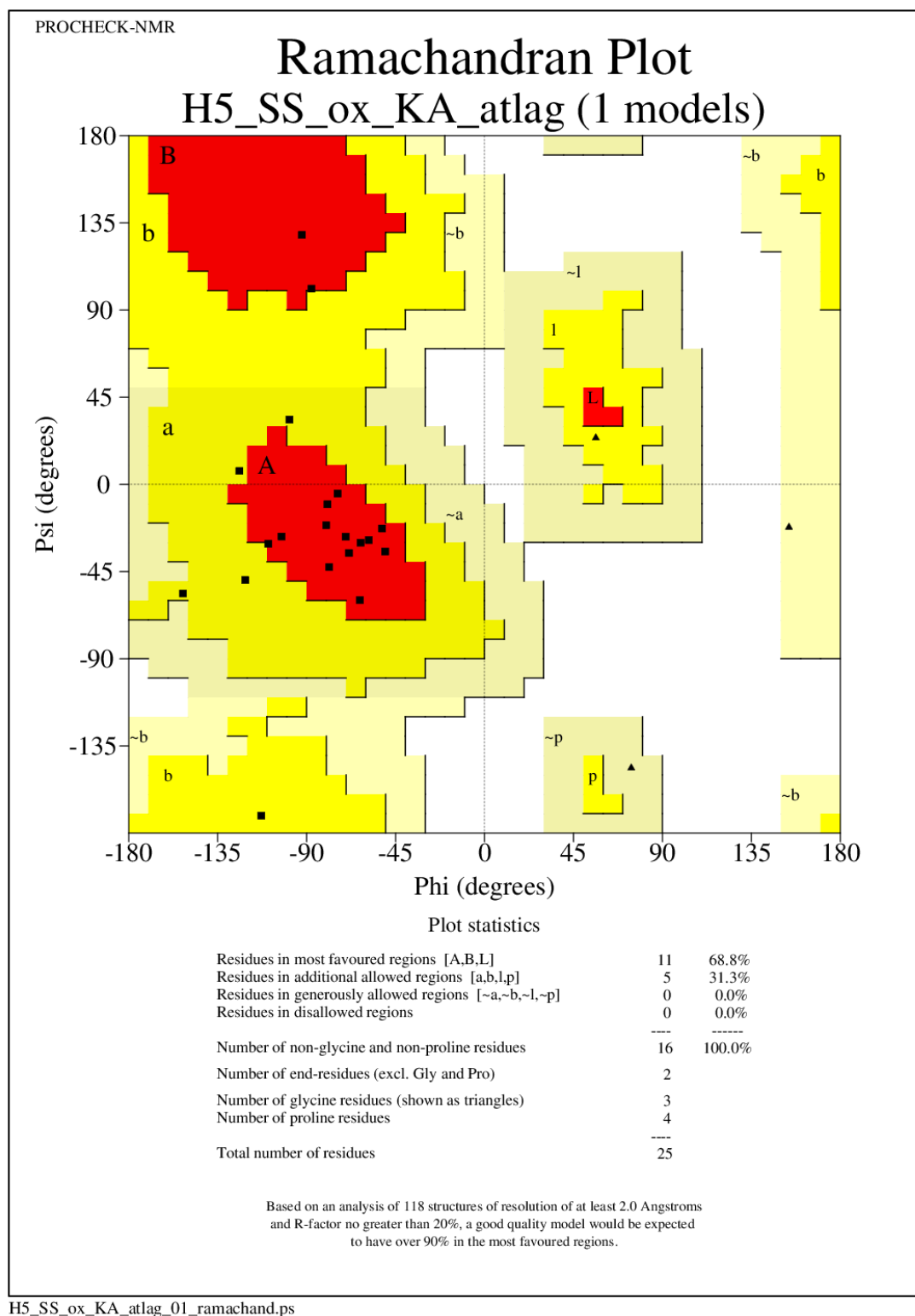
H2_SS_red_KA_36pdb_01_ramachand.ps

70. ábra: A H2_SS_red szerkezetsokaságának Ramachandran-diagramja

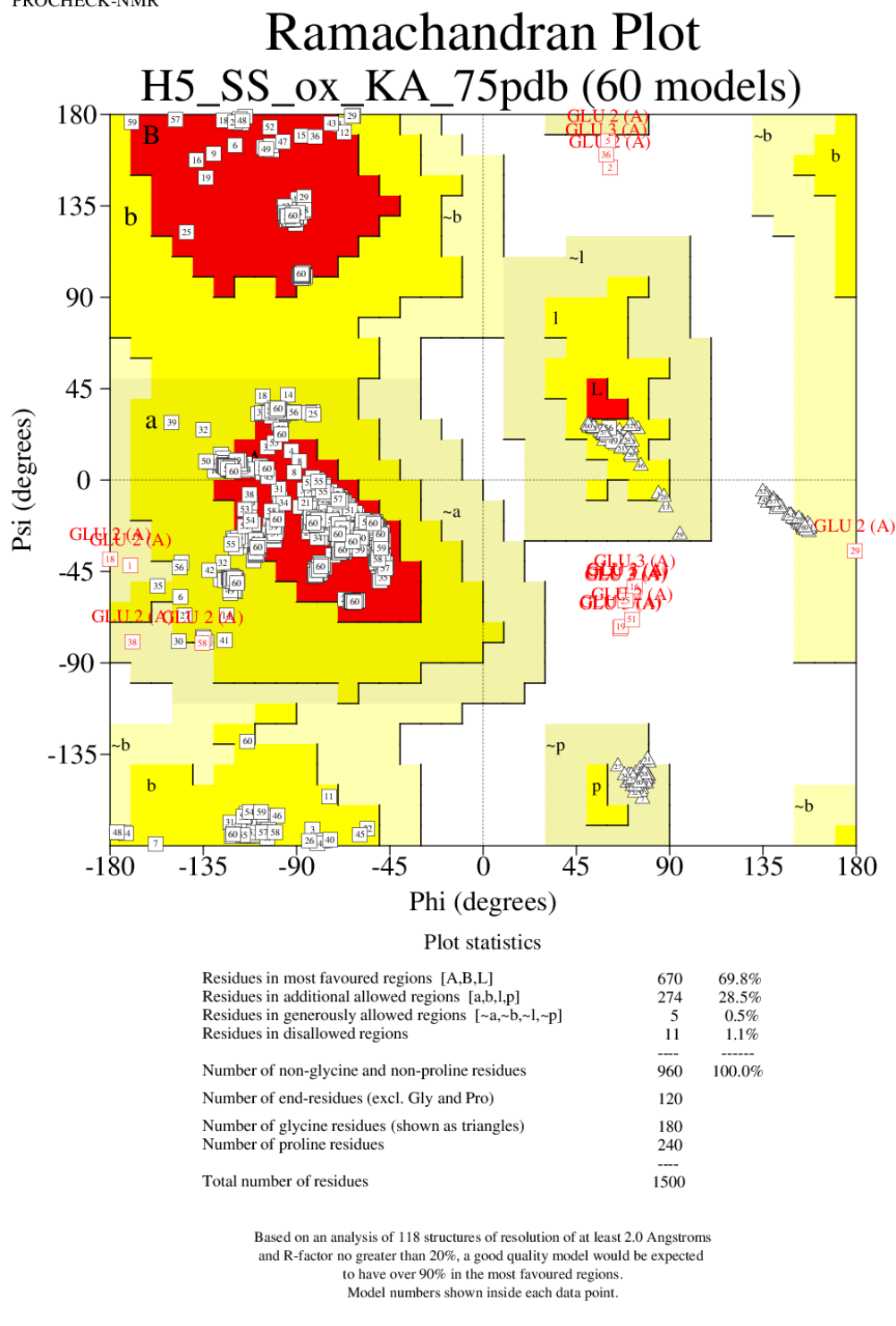


TC6b_H5_9_neutral_cold_01_ramachand.ps

72. ábra: A H5 szerkezetsokaságának Ramachandran-diagramja

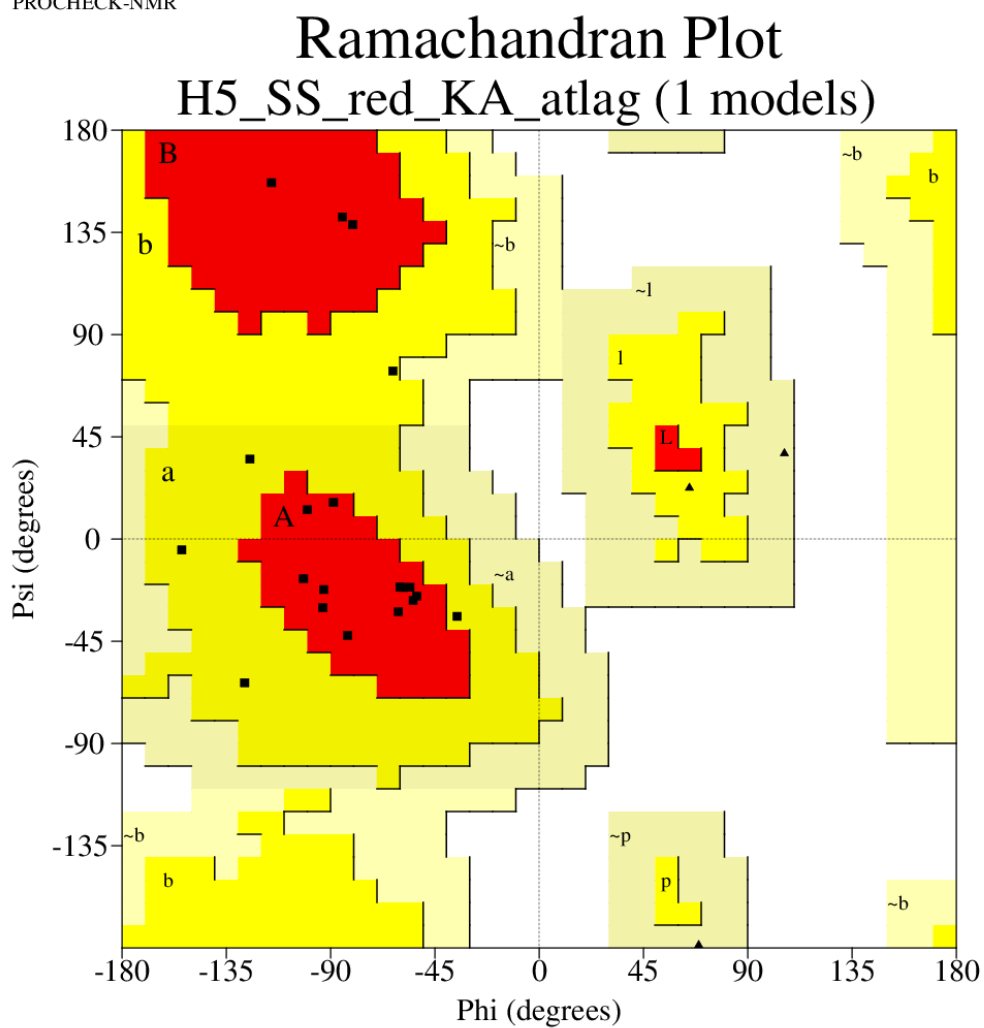


73. ábra: A H5_SS_ox átlagszerkezetének Ramachandran-diagramja



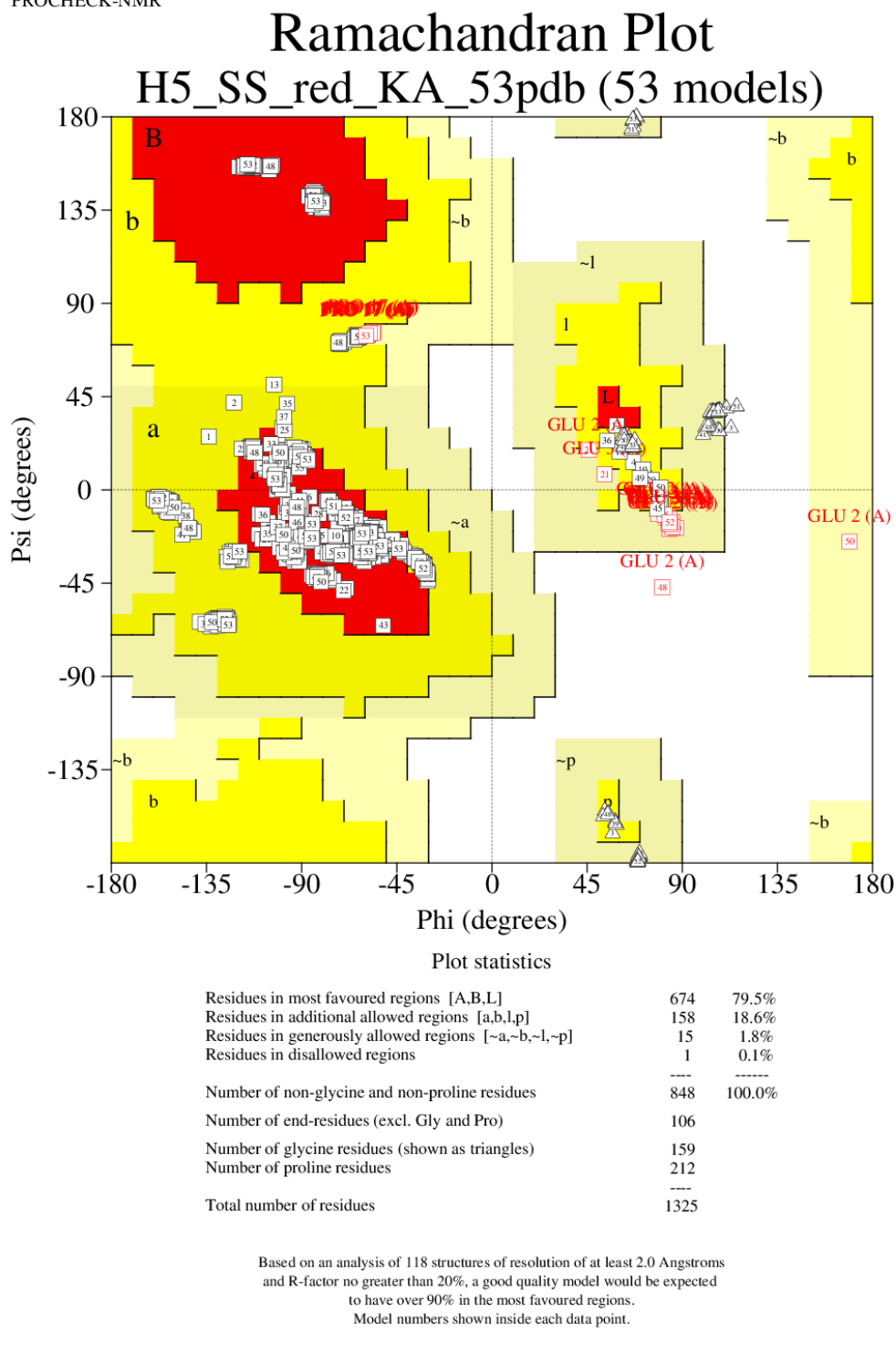
H5_SS_ox_KA_75pdb_01_ramachand.ps

74. ábra: A H5_SS_ox szerkezet sokaságának Ramachandran-diagramja



H5_SS_red_KA_atlag_01_ramachand.ps

75. ábra: A H5_SS_red átlagsszerkezetének Ramachandran-diagramja



H5_SS_red_KA_53pdb_01_ramachand.ps

76. ábra: A H5_SS_red szerkezetsokaságának Ramachandran-diagramja

5. Kémiai eltolódások

A vizsgált molekulák kémiai eltolódásait a 23. táblázat tartalmazza. A H2 származékokról csak homonukleáris spektrumok készültek, a H5 származékokról azonban ¹⁵N eltolódások is rendelkezésre állnak, ezeket a H5 esetében is magam határoztam meg.

23. táblázat: A vizsgált molekulák ¹H és ¹⁵N eltolódásai ppm-ben

H2 (irodalmi)			H2_SS_ox			H2_SS_red			H5 (irodalmi)			H5_SS_ox			H5_SS_red		
AS	Atom	Shift	AS	Atom	Shift	AS	Atom	Shift	AS	Atom	Shift	AS	Atom	Shift	AS	Atom	Shift
												E1	HA	3.954	E1	HA	4.121
												E1	HB1	2.102	E1	HB1	2.132
												E1	HB2	2.023	E1	HB2	2.084
												E1	HG#	2.348	E1	HG1	2.460
												E1	HG#	2.348	E1	HG2	2.372
									E2	HA	4.341	E2	HA	4.289	E2	HA	4.361
												E2	HB1	2.162	E2	HB#	2.009
												E2	HB2	2.007	E2	HB#	2.009
									E2	HG#	2.378	E2	HG#	2.347	E2	HG1	2.371
									E2	HG#	2.378	E2	HG#	2.347	E2	HG2	2.287
									E2	HN	9.268				E2	HN	9.212
															E2	N	124.174
									E3	HA	4.173	E3	HA	4.228	E3	HA	4.180
									E3	HB1	2.030	E3	HB#	2.098	E3	HB#	2.104
									E3	HB2	2.136	E3	HB#	2.098	E3	HB#	2.104
									E3	HG1	2.222	E3	HG#	2.326	E3	HG#	2.350
									E3	HG2	2.343	E3	HG#	2.326	E3	HG#	2.350
									E3	HN	9.130	E3	HN	8.986	E3	HN	9.098
									E3	N	124.750	E3	N	123.530	E3	N	124.649
A1	HA	4.053	C1	HA	3.943	C1	HA	4.056	A4	HA	4.086	C4	HA	4.430	C4	HA	4.274
A1	HB#	1.468	C1	HB1	3.310	C1	HB#	2.922	A4	HB#	1.462	C4	HB1	3.390	C4	HB#	3.054
A1	HB#	1.468	C1	HB2	3.000	C1	HB#	2.922	A4	HB#	1.462	C4	HB2	2.914	C4	HB#	3.054
									A4	HN	8.784	C4	HN	8.700	C4	HN	8.782
									A4	N	120.513	C4	N	116.923	C4	N	116.741
V2	HA	4.150	V2	HA	3.721	V2	HA	4.068	V5	HA	3.823	V5	HA	3.703	V5	HA	3.852
V2	HB	2.098	V2	HB	2.107	V2	HB	2.195	V5	HB	2.220	V5	HB	2.161	V5	HB	2.237
V2	HG#	0.973	V2	HG1#	1.059	V2	HG1#	1.053	V5	HG#	1.034	V5	HG1#	1.035	V5	HG1#	1.091
V2	HG#	0.973	V2	HG2#	0.984	V2	HG2#	1.006	V5	HG#	1.034	V5	HG2#	0.983	V5	HG2#	1.041
									V5	HN	7.410	V5	HN	7.802	V5	HN	7.382
									V5	N	118.205	V5	N	119.193	V5	N	122.831
R3	HA	4.282	R3	HA	4.070	R3	HA	4.140	R6	HA	4.008	R6	HA	4.050	R6	HA	4.040
R3	HB#	1.803	R3	HB#	1.851	R3	HB#	1.927	R6	HB1	1.916	R6	HB#	1.973	R6	HB1	1.977
R3	HB#	1.803	R3	HB#	1.851	R3	HB#	1.927	R6	HB2	2.011	R6	HB#	1.973	R6	HB2	1.950
			R3	HD#	3.237	R3	HD#	3.259	R6	HD1	3.179	R6	HD1	3.289	R6	HD1	3.298
			R3	HD#	3.237	R3	HD#	3.259	R6	HD2	3.316	R6	HD2	3.227	R6	HD2	3.208
									R6	HE	7.835						
			R3	HG1	1.781	R3	HG1	1.742	R6	HG1	1.569	R6	HG1	1.753	R6	HG1	1.732
			R3	HG2	1.646	R3	HG2	1.608	R6	HG2	1.725	R6	HG2	1.616	R6	HG2	1.586
R3	HN	8.714	R3	HN	8.613	R3	HN	8.727	R6	HN	8.014	R6	HN	7.811	R6	HN	7.959
									R6	N	121.107	R6	N	118.897	R6	N	120.905
L4	HA	4.323	L4	HA	4.206	L4	HA	4.247	L7	HA	4.120	L7	HA	4.145	L7	HA	4.139
L4	HB1	1.663	L4	HB1	1.955	L4	HB1	1.915	L7	HB1	1.857	L7	HB1	2.037	L7	HB1	1.954
L4	HB2	1.570	L4	HB2	1.398	L4	HB2	1.484	L7	HB2	1.939	L7	HB2	1.327	L7	HB2	1.370
L4	HD1#	0.944	L4	HD1#	1.016	L4	HD1#	1.003	L7	HD#	0.913	L7	HD1#	0.921	L7	HD1#	0.935
L4	HD2#	0.876	L4	HD2#	0.917	L4	HD2#	0.914	L7	HD#	0.913	L7	HD2#	0.908	L7	HD2#	0.908
L4	HG	1.501	L4	HG	1.774	L4	HG	1.795	L7	HG	1.381	L7	HG	1.882	L7	HG	1.858
L4	HN	8.508	L4	HN	7.700	L4	HN	8.218	L7	HN	8.630	L7	HN	8.438	L7	HN	8.536
									L7	N	119.779	L7	N	119.203	L7	N	118.675
Y5	HA	4.334	Y5	HA	3.947	Y5	HA	4.128	Y8	HA	4.126	Y8	HA	3.993	Y8	HA	4.063
Y5	HB#	3.046	Y5	HB1	3.267	Y5	HB1	3.191	Y8	HB1	3.267	Y8	HB#	3.250	Y8	HB1	3.213
Y5	HB#	3.046	Y5	HB2	3.147	Y5	HB2	3.106	Y8	HB2	3.160	Y8	HB#	3.250	Y8	HB2	3.155
Y5	HD#	7.054	Y5	HD#	6.949	Y5	HD#	7.000	Y8	HD#	6.986	Y8	HD#	7.009	Y8	HD#	6.912
Y5	HE#	6.813	Y5	HE#	6.835	Y5	HE#	6.832	Y8	HE#	6.791	Y8	HE#	6.827	Y8	HE#	6.760
Y5	HN	8.517	Y5	HN	9.207	Y5	HN	8.460	Y8	HN	8.190	Y8	HN	9.381	Y8	HN	8.453
									Y8	N	124.429	Y8	N	125.877	Y8	N	124.858
I6	HA	3.898	I6	HA	3.784	I6	HA	3.758	I9	HA	3.673	I9	HA	3.773	I9	HA	3.678
I6	HB	1.870	I6	HB	2.012	I6	HB	2.020	I9	HB	2.038	I9	HB	2.033	I9	HB	2.031
I6	HD1#	0.829	I6	HD#	0.927	I6	HD#	0.919	I9	HD1#	0.919	I9	HD1#	0.939	I9	HD1#	0.990
I6	HG11	1.248	I6	HG11	1.930	I6	HG11	1.794	I9	HG11	1.350	I9	HG11	1.963	I9	HG11	1.910
I6	HG12	1.531	I6	HG12	1.363	I6	HG12	1.386	I9	HG12	1.937	I9	HG12	1.325	I9	HG12	1.355
I6	HG2#	0.880	I6	HG2#	0.963	I6	HG2#	0.959	I9	HG2#	0.992	I9	HG2#	0.947	I9	HG2#	0.943
I6	HN	8.137	I6	HN	8.694	I6	HN	8.455	I9	HN	8.669	I9	HN	8.497	I9	HN	8.540
									I9	N	118.719	I9	N	119.430	I9	N	119.751

Q7	HA	4.120	Q7	HA	3.917	Q7	HA	3.933	Q10	HA	4.047	Q10	HA	3.912	Q10	HA	3.903
Q7	HB#	2.042	Q7	HB1	2.258	Q7	HB1	2.215	Q10	HB#	2.128	Q10	HB1	2.156	Q10	HB1	2.229
Q7	HB#	2.042	Q7	HB2	2.148	Q7	HB2	2.111	Q10	HB#	2.128	Q10	HB2	2.243	Q10	HB2	2.123
Q7	HE21	6.989	Q7	HE21	7.922	Q7	HE21	7.854	Q10	HE21	7.221	Q10	HE21	7.037	Q10	HE21	7.016
Q7	HE22	7.885	Q7	HE22	7.044	Q7	HE22	6.997	Q10	HE22	7.652	Q10	HE22	7.881	Q10	HE22	7.872
Q7	HG#	2.317	Q7	HG1	2.466	Q7	HG#	2.403	Q10	HG#	2.419	Q10	HG1	2.384	Q10	HG1	2.433
Q7	HG#	2.317	Q7	HG2	2.399	Q7	HG#	2.403	Q10	HG#	2.419	Q10	HG2	2.455	Q10	HG2	2.392
Q7	HN	8.102	Q7	HN	7.512	Q7	HN	7.786	Q10	HN	7.973	Q10	HN	7.589	Q10	HN	7.892
									Q10	N	120.380	Q10	N	119.588	Q10	N	119.819
									Q10	NE	113.306	Q10	NE	116.741	Q10	NE	116.427
W8	HA	4.424	W8	HA	4.242	W8	HA	4.277	W11	HA	4.194	W11	HA	4.239	W11	HA	4.238
W8	HB1	3.399	W8	HB1	3.534	W8	HB1	3.566	W11	HB1	3.577	W11	HB1	3.524	W11	HB1	3.594
W8	HB2	3.171	W8	HB2	3.099	W8	HB2	3.173	W11	HB2	3.132	W11	HB2	3.094	W11	HB2	3.143
W8	HD1	7.141	W8	HD1	6.961	W8	HD1	7.014	W11	HD1	7.012	W11	HD1	6.954	W11	HD1	6.980
W8	HE1	9.965	W8	HE1	9.637	W8	HE1	9.739	W11	HE1	9.659	W11	HE1	9.601	W11	HE1	9.715
W8	HE3	7.327	W8	HE3	6.878	W8	HE3	7.069	W11	HE3	7.036	W11	HE3	6.908	W11	HE3	7.011
W8	HH2	7.227	W8	HH2	7.204				W11	HH2	7.099	W11	HH2	7.202	W11	HH2	7.182
W8	HN	8.094	W8	HN	8.204	W8	HN	8.047	W11	HN	8.002	W11	HN	8.268	W11	HN	8.121
W8	HZ2	7.355	W8	HZ2	7.160	W8	HZ2	7.218	W11	HZ2	7.208	W11	HZ2	7.156	W11	HZ2	7.165
W8	HZ3	7.127	W8	HZ3	7.080	W8	HZ3	7.127				W11	HZ3	7.092	W11	HZ3	7.107
									W11	N	121.587	W11	N	121.970	W11	N	121.816
									W11	NE1	109.629	W11	NE1	132.112	W11	NE1	131.802
L9	HA	3.823	L9	HA	3.416	L9	HA	3.451	L12	HA	3.344	L12	HA	3.410	L12	HA	3.386
L9	HB1	1.680	L9	HB1	2.109	L9	HB1	1.947	L12	HB1	1.983	L12	HB1	2.076	L12	HB1	1.998
L9	HB2	1.516	L9	HB2	1.361	L9	HB2	1.357	L12	HB2	1.620	L12	HB2	1.354	L12	HB2	1.319
L9	HD1#	0.910	L9	HD1#	1.078	L9	HD1#	0.954	L12	HD1#	0.941	L12	HD1#	1.058	L12	HD1#	0.937
L9	HD2#	0.839	L9	HD2#	0.898	L9	HD2#	0.851	L12	HD2#	0.823	L12	HD2#	0.864	L12	HD2#	0.841
L9	HG	1.450	L9	HG	1.888	L9	HG	1.622	L12	HG	1.326	L12	HG	1.878	L12	HG	1.645
L9	HN	8.276	L9	HN	8.528	L9	HN	8.347	L12	HN	8.523	L12	HN	8.607	L12	HN	8.417
									L12	N	119.884	L12	N	119.160	L12	N	119.284
K10	HA	4.076	K10	HA	3.935	K10	HA	3.939	K13	HA	3.955	K13	HA	3.927	K13	HA	3.909
K10	HB#	1.863	K10	HB#	1.968	K10	HB#	1.927	K13	HB#	1.997	K13	HB#	1.953	K13	HB#	1.941
K10	HB#	1.863	K10	HB#	1.968	K10	HB#	1.927	K13	HB#	1.997	K13	HB#	1.953	K13	HB#	1.941
K10	HD#	1.686	K10	HD#	1.645	K10	HD#	1.639	K13	HD1	1.588	K13	HD#	1.627	K13	HD#	1.633
K10	HD#	1.686	K10	HD#	1.645	K10	HD#	1.639	K13	HD2	1.675	K13	HD#	1.627	K13	HD#	1.633
K10	HE#	2.963	K10	HE#	2.972	K10	HE#	2.953	K13	HE#	2.951	K13	HE#	2.937	K13	HE#	2.933
K10	HG#	1.421	K10	HG1	1.600	K10	HG1	1.555	K13	HG1	1.324	K13	HG1	1.583	K13	HG1	1.577
K10	HG#	1.421	K10	HG2	1.461	K10	HG2	1.442	K13	HG2	1.428	K13	HG2	1.437	K13	HG2	1.430
K10	HN	8.187	K10	HN	8.327	K10	HN	8.266	K13	HN	8.358	K13	HN	8.294	K13	HN	8.316
									K13	N	122.639	K13	N	123.537	K13	N	123.292
E11	HA	4.220	D11	HA	4.535	D11	HA	4.533	E14	HA	4.161	D14	HA	4.534	D14	HA	4.523
E11	HB1	2.135	D11	HB1	2.948	D11	HB1	2.905	E14	HB1	1.991	D14	HB1	2.930	D14	HB1	2.926
E11	HB2	1.972	D11	HB2	2.750	D11	HB2	2.721	E14	HB2	2.242	D14	HB2	2.749	D14	HB2	2.730
E11	HG1	2.390							E14	HG#	2.573						
E11	HG2	2.275							E14	HG#	2.573						
E11	HN	8.137	D11	HN	7.998	D11	HN	8.005	E14	HN	7.658	D14	HN	7.968	D14	HN	7.997
									E14	N	117.771	D14	N	118.562	D14	N	118.692
G12	HA1	4.080	G12	HA1	4.198	G12	HA1	4.155	G15	HA1	4.176	G15	HA1	4.176	G15	HA1	4.161
G12	HA2	3.722	G12	HA2	3.448	G12	HA2	3.492	G15	HA2	3.471	G15	HA2	3.445	G15	HA2	3.457
G12	HN	8.056	G12	HN	7.534	G12	HN	7.575	G15	HN	7.555	G15	HN	7.534	G15	HN	7.534
									G15	N	105.732	G15	N	105.923	G15	N	106.022
G13	HA1	3.539	G13	HA1	3.107	G13	HA1	3.167	G16	HA1	3.021	G16	HA1	3.091	G16	HA1	3.129
			G13	HA2	0.567				G16	HA2	0.849	G16	HA2	0.588	G16	HA2	0.650
G13	HN	8.239	G13	HN	8.593	G13	HN	8.465	G16	HN	8.291	G16	HN	8.590	G16	HN	8.528
									G16	N	113.390	G16	N	114.923	G16	N	114.686
P14	HA	4.518	P14	HA	4.652	P14	HA	4.621	P17	HA	4.607	P17	HA	4.632	P17	HA	4.639
P14	HB1	2.390	P14	HB1	2.551	P14	HB1	2.517	P17	HB1	2.515	P17	HB1	2.540	P17	HB1	2.527
P14	HB2	2.003	P14	HB2	2.081	P14	HB2	2.076	P17	HB2	2.148	P17	HB2	2.071	P17	HB2	2.074
P14	HD1	3.685	P14	HD1	3.848	P14	HD1	3.810	P17	HD1	3.795	P17	HD1	3.833	P17	HD1	3.846
P14	HD2	3.440	P14	HD2	3.450	P14	HD2	3.454	P17	HD2	3.351	P17	HD2	3.425	P17	HD2	3.460
P14	HG#	2.068	P14	HG#	2.191	P14	HG#	2.162	P17	HG#	2.064	P17	HG#	2.183	P17	HG#	2.174
S15	HA	4.453	S15	HA	4.500	S15	HA	4.472	S18	HA	4.457	S18	HA	4.480	S18	HA	4.481
S15	HB#	3.912	S15	HB#	3.940	S15	HB#	3.930	S18	HB#	3.928	S18	HB1	3.957	S18	HB1	3.948
S15	HB#	3.912	S15	HB#	3.940	S15	HB#	3.930	S18	HB#	3.928	S18	HB2	3.913	S18	HB2	3.914
									S18	HG	5.947						
S15	HN	8.260	S15	HN	7.672	S15	HN	7.763	S18	HN	7.797	S18	HN	7.681	S18	HN	7.699
									S18	N	113.362	S18	N	113.089	S18	N	113.176
S16	HA	4.340	S16	HA	4.135	S16	HA	4.155	S19	HA	4.213	S19	HA	4.136	S19	HA	4.133
S16	HB1	3.933	S16	HB1	3.858	S16	HB1	3.867				S19	HB1	3.847	S19	HB1	3.841
S16	HB2	3.746	S16	HB2	3.463	S16	HB2	3.509				S19	HB2	3.463	S19	HB2	3.466
			S16	HG	4.654							S19	HG	4.663	S19	HG	4.654
S16	HN	8.285	S16	HN	8.231	S16	HN	8.232	S19	HN	8.200	S19	HN	8.232	S19	HN	8.236
									S19	N	117.478	S19	N	117.494	S19	N	117.541

G17	HA1	4.084	G17	HA1	4.327	G17	HA1	4.271	G20	HA1	4.252	G20	HA1	4.312	G20	HA1	4.296
G17	HA2	3.911	G17	HA2	3.800	G17	HA2	3.820	G20	HA2	3.828	G20	HA2	3.786	G20	HA2	3.803
G17	HN	8.245	G17	HN	7.932	G17	HN	7.970	G20	HN	8.000	G20	HN	7.919	G20	HN	7.941
									G20	N	109.708	G20	N	109.724	G20	N	109.750
R18	HA	4.763	R18	HA	5.091	R18	HA	5.028	R21	HA	4.974	R21	HA	5.067	R21	HA	5.080
R18	HB1	1.855	R18	HB1	1.915	R18	HB1	1.895	R21	HB1	1.876	R21	HB1	1.909	R21	HB1	1.922
R18	HB2	1.761	R18	HB2	1.815	R18	HB2	1.812	R21	HB2	1.782	R21	HB2	1.808	R21	HB2	1.812
R18	HD#	3.212	R18	HD1	3.332	R18	HD1	3.321	R21	HD#	3.271	R21	HD1	3.318	R21	HD1	3.318
R18	HD#	3.212	R18	HD2	3.232	R18	HD2	3.231	R21	HD#	3.271	R21	HD2	3.229	R21	HD2	3.228
									R21	HE	7.725						
R18	HG#	1.672	R18	HG#	1.661	R18	HG#	1.660	R21	HG#	1.664	R21	HG#	1.646	R21	HG#	1.650
									R21	HH11	7.159						
									R21	HH12	6.799						
R18	HN	8.134	R18	HN	8.169	R18	HN	8.144	R21	HN	8.120	R21	HN	8.165	R21	HN	8.167
									R21	N	119.978	R21	N	119.602	R21	N	119.581
P19	HA	4.695	P19	HA	4.779	P19	HA	4.753	P22	HA	4.741	P22	HA	4.773	P22	HA	4.815
P19	HB1	2.312	P19	HB1	2.353	P19	HB1	2.334	P22	HB1	2.328	P22	HB1	2.338	P22	HB1	2.366
P19	HB2	1.837	P19	HB2	1.766	P19	HB2	1.806	P22	HB2	2.007	P22	HB2	1.786	P22	HB2	1.812
P19	HD1	3.840	P19	HD1	3.870	P19	HD1	3.868	P22	HD1	3.883	P22	HD1	3.855	P22	HD1	3.867
P19	HD2	3.625	P19	HD2	3.669	P19	HD2	3.670	P22	HD2	3.668	P22	HD2	3.653	P22	HD2	3.677
P19	HG#	2.010	P19	HG1	2.013	P19	HG#	2.005	P22	HG#	1.797	P22	HG1	1.997	P22	HG#	2.006
P19	HG#	2.010	P19	HG2	1.951	P19	HG#	2.005	P22	HG#	1.797	P22	HG2	1.928	P22	HG#	2.006
			P20	HA	2.207	P20	HA	2.612	P23	HA	2.499	P23	HA	2.205	P23	HA	2.473
			P20	HB1	1.453	P20	HB1	1.389	P23	HB1	0.384	P23	HB1	1.425	P23	HB1	1.386
P20	HB2	1.626	P20	HB2	0.385	P20	HB2	0.461	P23	HB2	1.306	P23	HB2	0.499	P23	HB2	0.274
P20	HD1	3.648	P20	HD#	3.529	P20	HD#	3.546	P23	HD#	3.495	P23	HD#	3.508	P23	HD#	3.539
P20	HD2	3.560	P20	HD#	3.529	P20	HD#	3.546	P23	HD#	3.495	P23	HD#	3.508	P23	HD#	3.539
P20	HG#	1.856	P20	HG#	1.760	P20	HG1	1.795	P23	HG1	1.616	P23	HG1	1.773	P23	HG1	1.795
P20	HG#	1.856	P20	HG#	1.760	P20	HG2	1.704	P23	HG2	1.700	P23	HG2	1.686	P23	HG2	1.656
P21	HA	4.391	P21	HA	4.249	P21	HA	4.367	P24	HA	4.320	P24	HA	4.202	P24	HA	4.329
P21	HB1	2.276	P21	HB1	2.248	P21	HB1	2.213	P24	HB1	2.263	P24	HB1	2.244	P24	HB1	2.228
			P21	HB2	2.004	P21	HB2	2.000	P24	HB2	2.010	P24	HB2	1.940	P24	HB2	2.041
P21	HD1	3.494	P21	HD1	2.996	P21	HD1	3.184	P24	HD1	3.112	P24	HD1	2.943	P24	HD1	3.134
P21	HD2	3.310	P21	HD2	2.781	P21	HD2	2.962	P24	HD2	2.955	P24	HD2	2.764	P24	HD2	2.927
P21	HG#	1.926	P21	HG1	1.923	P21	HG1	1.902	P24	HG#	1.848	P24	HG1	1.858	P24	HG1	1.957
P21	HG#	1.926	P21	HG2	1.780	P21	HG2	1.838	P24	HG#	1.848	P24	HG2	1.790	P24	HG2	1.821
S22	HA	4.338	C22	HA	4.236	C22	HA	4.285	S25	HA	4.331	C25	HA	4.132	C25	HA	4.315
S22	HB#	3.843	C22	HB1	3.513	C22	HB#	2.882	S25	HB1	3.795	C25	HB1	3.744	C25	HB#	2.927
S22	HB#	3.843	C22	HB2	3.189	C22	HB#	2.882	S25	HB2	3.842	C25	HB2	3.310	C25	HB#	2.927
S22	HN	8.434	C22	HN	7.358	C22	HN	7.829	S25	HN	8.302	C25	HN	7.576	C25	HN	7.671
									S25	N	120.851	C25	N	118.337	C25	N	121.491

6. NOE kényszerfeltételek

A vizsgált molekulák NOE kényszerfeltételeit a 24. táblázat tartalmazza. Az utolsó oszlopban szereplő szám az érintett aminosavak szekvenciális távolságát adja meg.

24. táblázat: NOE kényszerfeltételek

H2 (Irodalmi)				H2_SS_ox				H2_SS_red				H5 (Irodalmi)				H5_SS_ox				H5_SS_red				
AS	Atom	AS	Atom	AS	Atom	AS	Atom	AS	Atom	AS	Atom	AS	Atom	AS	Atom	AS	Atom	AS	Atom	AS	Atom	AS	Atom	
1	HA)	1	HB#)	1	HA)	1	HB1)	1	HA)	1	HB#)	2	HA)	2	HG#)	1	HA)	1	HB1)	1	HA)	1	HB1)	0
2	HA)	2	HB)	1	HA)	1	HB2)	2	HA)	2	HB)	2	HA)	2	HN)	1	HA)	1	HB2)	1	HA)	1	HB2)	0
2	HA)	2	HG#)	1	HB1)	1	HB2)	2	HA)	2	HG1#)	3	HA)	3	HB1)	1	HA)	1	HG#)	1	HA)	1	HG2)	0
3	HA)	3	HB#)	2	HA)	2	HB)	2	HA)	2	HG2#)	3	HA)	3	HB2)	2	HA)	2	HB1)	2	HA)	2	HB#)	0
3	HA)	3	HN)	2	HA)	2	HG1#)	2	HB)	2	HG1#)	3	HA)	3	HN)	2	HA)	2	HB2)	2	HA)	2	HG1)	0
3	HB#)	3	HN)	2	HA)	2	HG2#)	2	HB)	2	HG2#)	3	HB1)	3	HN)	2	HA)	2	HG#)	2	HA)	2	HG2)	0
4	HA)	4	HB1)	2	HB)	2	HG1#)	3	HA)	3	HB#)	3	HB2)	3	HN)	2	HB1)	2	HB2)	2	HA)	2	HN)	0
4	HA)	4	HD1#)	2	HB)	2	HG2#)	3	HA)	3	HD#)	3	HG1)	3	HN)	2	HG#)	2	HB2)	2	HB#)	2	HN)	0
4	HA)	4	HD2#)	3	HA)	3	HB#)	3	HA)	3	HG1)	3	HG2)	3	HN)	3	HA)	3	HB#)	2	HG1)	2	HN)	0
4	HA)	4	HG)	3	HA)	3	HD#)	3	HA)	3	HG2)	4	HA)	4	HB#)	3	HA)	3	HG#)	2	HG2)	2	HB#)	0
4	HB1)	4	HN)	3	HA)	3	HG1)	3	HA)	3	HN)	4	HA)	4	HN)	3	HA)	3	HN)	2	HG2)	2	HN)	0
4	HG)	4	HN)	3	HA)	3	HG2)	3	HB#)	3	HG1)	4	HA)	4	HN)	3	HB#)	3	HN)	3	HA)	3	HB#)	0
5	HA)	5	HB#)	3	HA)	3	HN)	3	HB#)	3	HG2)	4	HB#)	4	HN)	3	HG#)	3	HB#)	3	HA)	3	HG#)	0
5	HA)	5	HD#)	3	HB#)	3	HN)	3	HB#)	3	HN)	5	HA)	5	HG#)	3	HG#)	3	HN)	3	HA)	3	HN)	0
5	HA)	5	HE#)	3	HD#)	3	HB#)	3	HD#)	3	HB#)	5	HA)	5	HN)	4	HA)	4	HB1)	3	HB#)	3	HN)	0
5	HA)	5	HN)	3	HD#)	3	HG2)	3	HD#)	3	HG1)	5	HB)	5	HN)	4	HA)	4	HB2)	3	HG#)	3	HN)	0
5	HB#)	5	HD#)	3	HD#)	3	HN)	3	HD#)	3	HG2)	5	HG#)	5	HN)	4	HA)	4	HN)	4	HA)	4	HB#)	0
5	HB#)	5	HE#)	3	HG1)	3	HN)	3	HD#)	3	HN)	6	HA)	6	HB1)	4	HB1)	4	HB2)	4	HA)	4	HN)	0
5	HB#)	5	HN)	3	HG2)	3	HN)	3	HG1)	3	HG2)	6	HA)	6	HB2)	4	HB1)	4	HN)	4	HB#)	4	HN)	0
6	HA)	6	HB)	4	HA)	4	HB1)	3	HG1)	3	HN)	6	HA)	6	HG1)	4	HB2)	4	HN)	5	HA)	5	HB)	0
6	HA)	6	HD1#)	4	HA)	4	HB2)	3	HG2)	3	HN)	6	HA)	6	HG2)	5	HA)	5	HB)	5	HA)	5	HG1#)	0
6	HA)	6	HG11)	4	HA)	4	HD1#)	4	HA)	4	HB1)	6	HA)	6	HN)	5	HA)	5	HG1#)	5	HA)	5	HG2#)	0
6	HA)	6	HG12)	4	HA)	4	HD2#)	4	HA)	4	HB2)	6	HB1)	6	HN)	5	HA)	5	HG2#)	5	HA)	5	HN)	0
6	HA)	6	HG2#)	4	HA)	4	HG)	4	HA)	4	HD1#)	6	HB2)	6	HN)	5	HA)	5	HN)	5	HB)	5	HG1#)	0
6	HA)	6	HN)	4	HA)	4	HN)	4	HA)	4	HD2#)	6	HD1)	6	HG1)	5	HB)	5	HG1#)	5	HB)	5	HG2#)	0
6	HB)	6	HN)	4	HB1)	4	HB2)	4	HA)	4	HG)	6	HD1)	6	HG2)	5	HB)	5	HG2#)	5	HB)	5	HN)	0
6	HD1#)	6	HN)	4	HB1)	4	HN)	4	HA)	4	HN)	6	HD2)	6	HE#)	5	HG1#)	5	HN)	5	HG1#)	5	HN)	0
6	HG11)	6	HN)	4	HB2)	4	HD1#)	4	HB1)	4	HB2)	6	HG1)	6	HN)	6	HA)	6	HB#)	5	HG2#)	5	HN)	0
6	HG12)	6	HN)	4	HB2)	4	HD2#)	4	HB1)	4	HD1#)	6	HG2)	6	HE#)	6	HA)	6	HD1)	6	HA)	6	HB2)	0
6	HG2#)	6	HN)	4	HB2)	4	HN)	4	HB1)	4	HD2#)	6	HG2)	6	HN)	6	HA)	6	HG1)	6	HA)	6	HD1)	0
7	HA)	7	HB#)	4	HD1#)	4	HD2#)	4	HB1)	4	HN)	7	HA)	7	HB1)	6	HA)	6	HG2)	6	HA)	6	HD2)	0
7	HA)	7	HG#)	4	HD1#)	4	HN)	4	HB2)	4	HN)	7	HA)	7	HB2)	6	HA)	6	HN)	6	HA)	6	HG1)	0
7	HA)	7	HN)	4	HD2#)	4	HN)	4	HD1#)	4	HD2#)	7	HA)	7	HD#)	6	HB#)	6	HG1)	6	HA)	6	HG2)	0
7	HB#)	7	HN)	4	HG)	4	HB2)	4	HD1#)	4	HN)	7	HA)	7	HN)	6	HB#)	6	HG2)	6	HA)	6	HN)	0
7	HE21)	7	HE22)	4	HG)	4	HD1#)	4	HD2#)	4	HN)	7	HB1)	7	HN)	6	HB#)	6	HN)	6	HB1)	6	HG1)	0
7	HG#)	7	HE21)	4	HG)	4	HD2#)	4	HG)	4	HB2)	7	HB2)	7	HN)	6	HD1)	6	HB#)	6	HB1)	6	HN)	0
7	HG#)	7	HE22)	4	HG)	4	HN)	4	HG)	4	HD1#)	7	HD#)	7	HN)	6	HD1)	6	HG1)	6	HB2)	6	HG2)	0
7	HG#)	7	HN)	5	HA)	5	HB1)	4	HG)	4	HD2#)	7	HG)	7	HN)	6	HD1)	6	HG2)	6	HB2)	6	HN)	0
8	HA)	8	HB1)	5	HA)	5	HB2)	4	HG)	4	HN)	8	HA)	8	HB1)	6	HD1)	6	HN)	6	HD1)	6	HB1)	0
8	HA)	8	HB2)	5	HA)	5	HD#)	5	HA)	5	HB1)	8	HA)	8	HD#)	6	HD2)	6	HB#)	6	HD1)	6	HD2)	0
8	HA)	8	HD1)	5	HA)	5	HE#)	5	HA)	5	HB2)	8	HA)	8	HE#)	6	HD2)	6	HG1)	6	HD1)	6	HG1)	0
8	HA)	8	HE3)	5	HA)	5	HN)	5	HA)	5	HD#)	8	HA)	8	HN)	6	HD2)	6	HG2)	6	HD1)	6	HG2)	0
8	HA)	8	HN)	5	HB1)	5	HB2)	5	HA)	5	HE#)	8	HB1)	8	HD#)	6	HD2)	6	HN)	6	HD2)	6	HB1)	0
8	HB1)	8	HD1)	5	HB1)	5	HN)	5	HA)	5	HN)	8	HB1)	8	HE#)	6	HG1)	6	HG2)	6	HD2)	6	HG1)	0
8	HB1)	8	HE3)	5	HB2)	5	HD#)	5	HB1)	5	HB2)	8	HB1)	8	HN)	6	HG1)	6	HN)	6	HD2)	6	HG2)	0
8	HB1)	8	HN)	5	HB2)	5	HE#)	5	HB1)	5	HE#)	8	HB2)	8	HD#)	6	HG2)	6	HN)	6	HG1)	6	HG2)	0
8	HB2)	8	HD1)	5	HB2)	5	HN)	5	HB1)	5	HN)	8	HB2)	8	HE#)	7	HA)	7	HB1)	6	HG1)	6	HN)	0
8	HB2)	8	HE3)	5	HD#)	5	HN)	5	HB2)	5	HD#)	8	HB2)	8	HN)	7	HA)	7	HB2)	6	HG2)	6	HN)	0
8	HB2)	8	HN)	5	HE#)	5	HD#)	5	HB2)	5	HE#)	8	HD#)	8	HN)	7	HA)	7	HD1#)	7	HA)	7	HB1)	0
8	HD1)	8	HE1)	6	HA)	6	HB)	5	HB2)	5	HN)	9	HA)	9	HD1#)	7	HA)	7	HD2#)	7	HA)	7	HB2)	0
8	HD1)	8	HE1)	6	HA)	6	HD#)	5	HE#)	5	HD#)	9	HA)	9	HG11)	7	HA)	7	HG)	7	HA)	7	HD1#)	0
8	HD1)	8	HN)	6	HA)	6	HG11)	6	HA)	6	HB)	9	HA)	9	HG2#)	7	HA)	7	HN)	7	HA)	7	HD2#)	0
8	HE3)	8	HN)	6	HA)	6	HG12)	6	HA)	6	HD#)	9	HA)	9	HN)	7	HB1)	7	HB2)	7	HA)	7	HG)	0
8	H22)	8	HE1)	6	HA)	6	HG2#)	6	HA)	6	HG11)	9	HB)	9	HN)	7	HB1)	7	HG)	7	HA)	7	HN)	0
9	HA)	9	HB1)	6	HA)	6	HN)	6	HA)	6	HG12)	9	HD1#)	9	HN)	7	HB1)	7	HN)	7	HB1)	7	HB2)	0
9	HA)	9	HB2)	6	HB)	6	HD#)	6	HA)	6	HG2#)	9	HG11)	9	HN)	7	HB2)	7	HN)	7	HB1)	7	HD1#)	0
9	HA)	9	HD1#)	6	HB)	6	HG12)	6	HA)	6	HN)	9	HG12)	9	HN)	7	HD1#)	7	HN)	7	HB1)	7	HN)	0

9	HA)	9	HG)	6	HB)	6	HN)	6	HB)	6	HG11)	10	HA)	10	HB1)	7	HG)	7	HB2)	7	HB2)	7	HD2#)	0
9	HA)	9	HN)	6	HD#)	6	HN)	6	HB)	6	HG12)	10	HA)	10	HB2)	7	HG)	7	HD1#)	7	HB2)	7	HN)	0
9	HB1)	9	HN)	6	HG11)	6	HD#)	6	HB)	6	HG2#)	10	HA)	10	HG#)	7	HG)	7	HD2#)	7	HD1#)	7	HN)	0
9	HB2)	9	HN)	6	HG11)	6	HG12)	6	HB)	6	HN)	10	HA)	10	HN)	7	HG)	7	HN)	7	HD2#)	7	HN)	0
9	HD1#)	9	HN)	6	HG11)	6	HG2#)	6	HD#)	6	HN)	10	HB1)	10	HN)	8	HA)	8	HB#)	7	HG)	7	HD1#)	0
9	HD2#)	9	HN)	6	HG11)	6	HN)	6	HG11)	6	HG12)	10	HB2)	10	HE21)	8	HA)	8	HD#)	7	HG)	7	HD2#)	0
9	HG)	9	HN)	6	HG12)	6	HD#)	6	HG11)	6	HG2#)	10	HB2)	10	HE22)	8	HA)	8	HE#)	7	HG)	7	HD2#)	0
10	HA)	10	HB#)	6	HG12)	6	HG2#)	6	HG11)	6	HN)	10	HB2)	10	HN)	8	HA)	8	HN)	7	HG)	7	HN)	0
10	HA)	10	HD#)	6	HG12)	6	HN)	6	HG12)	6	HG2#)	10	HE21)	10	HE22)	8	HB#)	8	HD#)	8	HA)	8	HB1)	0
10	HA)	10	HG#)	6	HG2#)	6	HN)	6	HG12)	6	HN)	10	HE21)	10	HE22)	8	HB#)	8	HE#)	8	HA)	8	HB2)	0
10	HA)	10	HN)	7	HA)	7	HB1)	7	HA)	7	HB1)	10	HG#)	10	HE21)	8	HB#)	8	HN)	8	HA)	8	HD#)	0
10	HB#)	10	HN)	7	HA)	7	HB2)	7	HA)	7	HB2)	10	HG#)	10	HE22)	8	HD#)	8	HN)	8	HA)	8	HE#)	0
10	HD#)	10	HN)	7	HA)	7	HE21)	7	HA)	7	HE21)	10	HG#)	10	HN)	8	HE#)	8	HD#)	8	HA)	8	HN)	0
10	HE#)	10	HD#)	7	HA)	7	HE22)	7	HA)	7	HE22)	11	HA)	11	HB1)	9	HA)	9	HB)	8	HB1)	8	HD#)	0
10	HE#)	10	HG#)	7	HA)	7	HG1)	7	HA)	7	HG#)	11	HA)	11	HB2)	9	HA)	9	HD1#)	8	HB1)	8	HE#)	0
11	HA)	11	HB1)	7	HA)	7	HG2)	7	HA)	7	HN)	11	HA)	11	HE1)	9	HA)	9	HG11)	8	HB1)	8	HN)	0
11	HA)	11	HB2)	7	HA)	7	HN)	7	HB1)	7	HE21)	11	HA)	11	HE3)	9	HA)	9	HG12)	8	HB2)	8	HD#)	0
11	HA)	11	HG1)	7	HB1)	7	HB2)	7	HB1)	7	HN)	11	HB1)	11	HB2)	9	HA)	9	HG2#)	8	HB2)	8	HE#)	0
11	HA)	11	HG2)	7	HB1)	7	HE21)	7	HB2)	7	HE21)	11	HB1)	11	HD1)	9	HA)	9	HN)	8	HB2)	8	HN)	0
11	HA)	11	HN)	7	HB1)	7	HE22)	7	HB2)	7	HE22)	11	HB1)	11	HE1)	9	HB)	9	HG12)	8	HD#)	8	HN)	0
11	HB1)	11	HN)	7	HB1)	7	HN)	7	HB2)	7	HN)	11	HB1)	11	HE3)	9	HB)	9	HG2#)	8	HE#)	8	HD#)	0
11	HB2)	11	HN)	7	HB2)	7	HE21)	7	HE22)	7	HE21)	11	HB1)	11	HN)	9	HB)	9	HN)	9	HA)	9	HB)	0
11	HG1)	11	HN)	7	HB2)	7	HE22)	7	HG#)	7	HE21)	11	HB2)	11	HD1)	9	HD1#)	9	HN)	9	HA)	9	HD1#)	0
12	HA1)	12	HA2)	7	HB2)	7	HN)	7	HG#)	7	HE22)	11	HB2)	11	HE1)	9	HG11)	9	HD1#)	9	HA)	9	HD1#)	0
12	HA1)	12	HN)	7	HE22)	7	HE21)	7	HG#)	7	HN)	11	HB2)	11	HN)	9	HG11)	9	HN)	9	HA)	9	HG11)	0
12	HA2)	12	HN)	7	HG1)	7	HB1)	8	HA)	8	HB1)	11	HD1)	11	HE1)	9	HG12)	9	HD1#)	9	HA)	9	HG12)	0
13	HA1)	13	HN)	7	HG1)	7	HB2)	8	HA)	8	HB2)	11	HD1)	11	HN)	9	HG12)	9	HN)	9	HA)	9	HN)	0
14	HA)	14	HB1)	7	HG1)	7	HE21)	8	HA)	8	HD1)	11	HZ2)	11	HE1)	9	HG2#)	9	HN)	9	HB)	9	HG2#)	0
14	HA)	14	HB2)	7	HG1)	7	HE22)	8	HA)	8	HE3)	12	HA)	12	HB2)	10	HA)	10	HB1)	9	HB)	9	HN)	0
14	HA)	14	HG#)	7	HG1)	7	HG2)	8	HA)	8	HN)	12	HA)	12	HD1#)	10	HA)	10	HB2)	9	HG12)	9	HN)	0
14	HD1)	14	HB1)	7	HG1)	7	HN)	8	HB1)	8	HB2)	12	HA)	12	HD2#)	10	HA)	10	HE21)	10	HA)	10	HB1)	0
14	HD1)	14	HD2)	7	HG2)	7	HB1)	8	HB1)	8	HD1)	12	HA)	12	HG)	10	HA)	10	HE22)	10	HA)	10	HB2)	0
14	HD1)	14	HG#)	7	HG2)	7	HB2)	8	HB1)	8	HE3)	12	HA)	12	HN)	10	HA)	10	HG1)	10	HA)	10	HE21)	0
14	HD2)	14	HB1)	7	HG2)	7	HE21)	8	HB1)	8	HN)	12	HB1)	12	HN)	10	HA)	10	HG2)	10	HA)	10	HE22)	0
14	HD2)	14	HG#)	7	HG2)	7	HE22)	8	HB1)	8	HZ3)	12	HB2)	12	HN)	10	HA)	10	HN)	10	HA)	10	HG1)	0
15	HA)	15	HB#)	7	HG2)	7	HN)	8	HB2)	8	HD1)	12	HD1#)	12	HN)	10	HB1)	10	HE22)	10	HA)	10	HN)	0
15	HB#)	15	HN)	7	HN)	7	HE21)	8	HB2)	8	HE1)	12	HD2#)	12	HN)	10	HB1)	10	HN)	10	HB1)	10	HE21)	0
16	HA)	16	HB1)	8	HA)	8	HB1)	8	HB2)	8	HE3)	12	HG)	12	HD2#)	10	HB2)	10	HB1)	10	HB1)	10	HN)	0
16	HA)	16	HB2)	8	HA)	8	HB2)	8	HB2)	8	HN)	12	HG)	12	HN)	10	HB2)	10	HE22)	10	HB2)	10	HE21)	0
16	HA)	16	HN)	8	HA)	8	HD1)	8	HD1)	8	HE1)	13	HA)	13	HD2)	10	HB2)	10	HN)	10	HB2)	10	HN)	0
16	HB1)	16	HB2)	8	HA)	8	HE1)	8	HD1)	8	HN)	13	HA)	13	HN)	10	HE21)	10	HE22)	10	HE21)	10	HE22)	0
16	HB1)	16	HN)	8	HA)	8	HE3)	8	HD1)	8	HZ2)	13	HB#)	13	HN)	10	HG1)	10	HB1)	10	HG1)	10	HN)	0
16	HB2)	16	HN)	8	HA)	8	HN)	8	HE3)	8	HN)	13	HD1)	13	HN)	10	HG1)	10	HB2)	10	HG2)	10	HE21)	0
17	HA1)	17	HA2)	8	HB1)	8	HB2)	8	HE3)	8	HZ3)	13	HD2)	13	HN)	10	HG1)	10	HE21)	10	HG2)	10	HE22)	0
17	HA1)	17	HN)	8	HB1)	8	HD1)	8	HZ2)	8	HE1)	13	HE#)	13	HD1)	10	HG1)	10	HE22)	10	HG2)	10	HN)	0
17	HA2)	17	HN)	8	HB1)	8	HE1)	8	HZ3)	8	HZ2)	13	HE#)	13	HD2)	10	HG1)	10	HN)	11	HA)	11	HB1)	0
18	HA)	18	HB1)	8	HB1)	8	HE3)	9	HA)	9	HB1)	13	HG1)	13	HN)	10	HG2)	10	HB1)	11	HA)	11	HB2)	0
18	HA)	18	HB2)	8	HB1)	8	HN)	9	HA)	9	HB2)	13	HG2)	13	HN)	10	HG2)	10	HB2)	11	HA)	11	HD1)	0
18	HA)	18	HD#)	8	HB1)	8	HZ3)	9	HA)	9	HD1#)	14	HA)	14	HB2)	10	HG2)	10	HE21)	11	HA)	11	HE1)	0
18	HA)	18	HG#)	8	HB2)	8	HE3)	9	HA)	9	HD2#)	14	HA)	14	HG#)	10	HG2)	10	HE22)	11	HA)	11	HE3)	0
18	HA)	18	HN)	8	HB2)	8	HN)	9	HA)	9	HG)	14	HA)	14	HN)	10	HG2)	10	HG1)	11	HA)	11	HN)	0
18	HD#)	18	HB#)	8	HD1)	8	HE1)	9	HA)	9	HN)	14	HB1)	14	HN)	10	HG2)	10	HN)	11	HB1)	11	HB2)	0
18	HD#)	18	HE)	8	HD1)	8	HN)	9	HB1)	9	HB2)	14	HG#)	14	HN)	11	HA)	11	HB1)	11	HB1)	11	HD1)	0
18	HD#)	18	HG#)	8	HD1)	8	HZ2)	9	HB1)	9	HD1#)	15	HA1)	15	HA2)	11	HA)	11	HB2)	11	HB1)	11	HE3)	0
18	HD#)	18	HN)	8	HE3)	8	HE1)	9	HB1)	9	HD2#)	15	HA1)	15	HN)	11	HA)	11	HD1)	11	HB1)	11	HN)	0
18	HG#)	18	HN)	8	HE3)	8	HH2)	9	HB1)	9	HN)	15	HA2)	15	HN)	11	HA)	11	HE3)	11	HB1)	11	HZ3)	0
19	HA)	19	HB1)	8	HE3)	8	HN)	9	HB2)	9	HD1#)	16	HA1)	16	HA2)	11	HA)	11	HN)	11	HB2)	11	HD1)	0
19	HA)	19	HB2)	8	HE3)	8	HZ2)	9	HB2)	9	HD2#)	16	HA1)	16	HN)	11	HB1)	11	HB2)	11	HB2)	11	HN)	0
19	HA)	19	HG#)	8	HE3)	8	HZ3)	9	HB2)	9	HN)	16	HA2)	16	HN)	11	HB1)	11	HD1)	11	HD1)	11	HE1)	0
19	HD1)	19	HB1)	8	HZ2)	8	HE1)	9	HD1#)	9	HD2#)	17	HA)	17	HB1)	11	HB1)	11	HE1)	11	HE3)	11	HH2)	0
19	HD1)	19	HB2)	8	HZ3)	8	HH2)	9	HD1#)	9	HN)	17	HA)	17	HB2)	11	HB1)	11	HE3)	11	HE3)	11	HN)	0
19	HD1)	19	HD2)	8	HZ3)	8	HZ2)	9	HD2#)	9	HN)	17	HA)	17	HD2)	11	HB1)	11	HN)	11	HE3)	11	HZ3)	0
19	HD1)	19	HG#)	9	HA)	9	HB1)	9	HG)	9	HB2)	17	HA)	17	HG#)	11	HB1)	11	HZ3)	11	HH2)	11	HE1)	0
19	HD2)	19	HB1)	9	HA)	9	HB2)	9	HG)	9	HD1#)	17	HD1)	17	HB1)	11	HB2)	11	HD1)	11	HZ2)	11	HE1)	0
19	HD2)	19	HG#)	9	HA)	9	HD1#)	9	HG)	9	HD2#)	17	HD1)	17	HB2)	11	HB2)	11	HE1)	11	HZ3)	11	HH2)	0
20	HD1)	20	HB2)	9	HA)	9	HD2#)	9	HG)	9	HN)	17	HD1)	17	HD2)	11	HB2)	11	HE3)	12	HA)	12	HB1)	0
20	HD1)	20	HG#)	9	HA)	9	HG)	10	HA)	10	HB#)	17	HD2)	17	HB1)	11	HB2)	11	HN)	12	HA)	12	HB2)	0
20	HD2)	20	HB2)	9	HA)	9	HN)	10	HA)	10	HD#)	18	HA)	18	HB#)	11	HD1)	11	HE1)	12	HA)	12	HD1#)	0
20	HD2)	20	HG#)	9	HB1)	9	HB2)	10	HA)	10	HE#)	18	HA)	18	HN)	11	HD1)	11	HZ2)	12	HA)	12	HD2#)	0

21	HA)	21	HB1)	9	HB1)	9	HD1#)	10	HA)	10	HG1)	18	HB#)	18	HN)	11	HE3)	11	HH2)	12	HA)	12	HG)	0
21	HA)	21	HG#)	9	HB1)	9	HD2#)	10	HA)	10	HG2)	19	HA)	19	HB1)	11	HE3)	11	HN)	12	HA)	12	HN)	0
21	HD1)	21	HB1)	9	HB1)	9	HG)	10	HA)	10	HN)	19	HA)	19	HN)	11	HE3)	11	HZ2)	12	HB1)	12	HB2)	0
21	HD1)	21	HD2)	9	HB1)	9	HN)	10	HB#)	10	HD#)	20	HA1)	20	HN)	11	HE3)	11	HZ3)	12	HB1)	12	HD2#)	0
21	HD1)	21	HG#)	9	HB2)	9	HN)	10	HB#)	10	HG1)	20	HA2)	20	HN)	11	HZ2)	11	HE1)	12	HB1)	12	HG)	0
21	HD2)	21	HB1)	9	HD1#)	9	HD2#)	10	HB#)	10	HG2)	21	HB1)	21	HE)	11	HZ3)	11	HH2)	12	HB1)	12	HN)	0
21	HD2)	21	HG#)	9	HD1#)	9	HN)	10	HB#)	10	HN)	21	HB1)	21	HN)	12	HA)	12	HB1)	12	HB2)	12	HD2#)	0
22	HA)	22	HB#)	9	HD2#)	9	HN)	10	HD#)	10	HG1)	21	HB2)	21	HN)	12	HA)	12	HB2)	12	HB2)	12	HN)	0
22	HA)	22	HN)	9	HG)	9	HD1#)	10	HD#)	10	HG2)	21	HD#)	21	HB2)	12	HA)	12	HD1#)	12	HD1#)	12	HD2#)	0
				9	HG)	9	HD2#)	10	HD#)	10	HN)	21	HD#)	21	HE)	12	HA)	12	HD2#)	12	HD1#)	12	HN)	0
				9	HG)	9	HN)	10	HE#)	10	HD#)	21	HD#)	21	HG#)	12	HA)	12	HG)	12	HD2#)	12	HN)	0
				10	HA)	10	HB#)	10	HE#)	10	HG1)	21	HD#)	21	HH11)	12	HA)	12	HN)	12	HG)	12	HB2)	0
				10	HA)	10	HD#)	10	HE#)	10	HG2)	21	HD#)	21	HN)	12	HB1)	12	HD1#)	12	HG)	12	HD1#)	0
				10	HA)	10	HG1)	10	HE#)	10	HN)	21	HG#)	21	HE)	12	HB1)	12	HD2#)	12	HG)	12	HD2#)	0
				10	HA)	10	HG2)	10	HG1)	10	HG2)	21	HG#)	21	HN)	12	HB1)	12	HN)	12	HG)	12	HN)	0
				10	HA)	10	HN)	10	HG1)	10	HN)	21	HH12)	21	HE)	12	HB2)	12	HD1#)	13	HA)	13	HB#)	0
				10	HB#)	10	HD#)	10	HG2)	10	HN)	21	HH12)	21	HH11)	12	HB2)	12	HD2#)	13	HA)	13	HD#)	0
				10	HB#)	10	HG1)	11	HA)	11	HB1)	22	HA)	22	HB1)	12	HB2)	12	HN)	13	HA)	13	HG1)	0
				10	HB#)	10	HG2)	11	HA)	11	HB2)	22	HA)	22	HB2)	12	HD1#)	12	HD2#)	13	HA)	13	HG2)	0
				10	HB#)	10	HN)	11	HA)	11	HN)	22	HA)	22	HG#)	12	HD1#)	12	HN)	13	HA)	13	HN)	0
				10	HD#)	10	HG2)	11	HB1)	11	HB2)	22	HD1)	22	HB2)	12	HD2#)	12	HN)	13	HB#)	13	HD#)	0
				10	HD#)	10	HN)	11	HB1)	11	HN)	22	HD1)	22	HD2)	12	HG)	12	HD1#)	13	HB#)	13	HG1)	0
				10	HE#)	10	HB#)	11	HB2)	11	HN)	22	HD1)	22	HG#)	12	HG)	12	HD2#)	13	HB#)	13	HG2)	0
				10	HE#)	10	HG2)	12	HA1)	12	HA2)	22	HD2)	22	HB1)	12	HG)	12	HN)	13	HB#)	13	HN)	0
				10	HG1)	10	HN)	12	HA1)	12	HN)	22	HD2)	22	HG#)	13	HA)	13	HB#)	13	HD#)	13	HN)	0
				10	HG2)	10	HN)	12	HA2)	12	HN)	23	HA)	23	HB1)	13	HA)	13	HD#)	13	HE#)	13	HD#)	0
				11	HA)	11	HB1)	13	HA1)	13	HN)	23	HA)	23	HB2)	13	HA)	13	HG1)	13	HE#)	13	HG1)	0
				11	HA)	11	HB2)	14	HA)	14	HB1)	23	HB2)	23	HB1)	13	HA)	13	HG2)	13	HE#)	13	HG2)	0
				11	HA)	11	HN)	14	HA)	14	HB2)	23	HD#)	23	HA)	13	HA)	13	HN)	13	HG1)	13	HG2)	0
				11	HB1)	11	HB2)	14	HA)	14	HD1)	23	HD#)	23	HB1)	13	HB#)	13	HD#)	13	HG1)	13	HN)	0
				11	HB1)	11	HN)	14	HA)	14	HD2)	23	HD#)	23	HB2)	13	HB#)	13	HG2)	13	HG2)	13	HN)	0
				11	HB2)	11	HN)	14	HA)	14	HG#)	23	HD#)	23	HG1)	13	HB#)	13	HN)	14	HA)	14	HB1)	0
				12	HA1)	12	HA2)	14	HD1)	14	HB1)	23	HD#)	23	HG2)	13	HD#)	13	HN)	14	HA)	14	HB2)	0
				12	HA1)	12	HN)	14	HD1)	14	HB2)	23	HG1)	23	HB1)	13	HE#)	13	HD#)	14	HA)	14	HN)	0
				12	HA2)	12	HN)	14	HD1)	14	HD2)	23	HG2)	23	HB1)	13	HE#)	13	HG2)	14	HB1)	14	HB2)	0
				13	HA1)	13	HA2)	14	HD1)	14	HG#)	24	HA)	24	HB1)	13	HG1)	13	HG2)	14	HB1)	14	HN)	0
				13	HA1)	13	HN)	14	HD2)	14	HB1)	24	HA)	24	HB2)	13	HG1)	13	HN)	14	HB2)	14	HN)	0
				13	HA2)	13	HN)	14	HD2)	14	HB2)	24	HA)	24	HD1)	13	HG2)	13	HN)	15	HA1)	15	HA2)	0
				14	HA)	14	HB1)	14	HD2)	14	HG#)	24	HA)	24	HG#)	14	HA)	14	HB1)	15	HA1)	15	HN)	0
				14	HA)	14	HB2)	15	HA)	15	HB#)	24	HD1)	24	HB1)	14	HA)	14	HB2)	15	HA2)	15	HN)	0
				14	HA)	14	HG#)	15	HA)	15	HN)	24	HD1)	24	HD2)	14	HA)	14	HN)	16	HA1)	16	HA2)	0
				14	HB1)	14	HB2)	15	HB#)	15	HN)	24	HD2)	24	HB1)	14	HB1)	14	HB2)	16	HA1)	16	HN)	0
				14	HB1)	14	HG#)	16	HA)	16	HB1)	24	HD2)	24	HB2)	14	HB1)	14	HN)	16	HA2)	16	HN)	0
				14	HD1)	14	HB1)	16	HA)	16	HB2)	24	HD2)	24	HG#)	14	HB2)	14	HN)	17	HA)	17	HB1)	0
				14	HD1)	14	HB2)	16	HA)	16	HN)	25	HA)	25	HB1)	15	HA1)	15	HA2)	17	HA)	17	HB2)	0
				14	HD1)	14	HG#)	16	HB1)	16	HB2)	25	HA)	25	HB2)	15	HA1)	15	HN)	17	HA)	17	HB2)	0
				14	HD2)	14	HB1)	16	HB1)	16	HN)	25	HA)	25	HN)	15	HA2)	15	HN)	17	HA)	17	HD1)	0
				14	HD2)	14	HB2)	16	HB2)	16	HN)	25	HB1)	25	HN)	16	HA1)	16	HA2)	17	HA)	17	HD2)	0
				14	HD2)	14	HG#)	17	HA1)	17	HA2)	25	HB2)	25	HN)	16	HA1)	16	HN)	17	HA)	17	HG#)	0
				15	HA)	15	HB#)	17	HA1)	17	HN)					16	HA2)	16	HN)	17	HB1)	17	HB2)	0
				15	HA)	15	HN)	17	HA2)	17	HN)					17	HA)	17	HB1)	17	HD1)	17	HB1)	0
				15	HB#)	15	HN)	18	HA)	18	HB1)					17	HA)	17	HB2)	17	HD1)	17	HB2)	0
				16	HA)	16	HB1)	18	HA)	18	HB2)					17	HA)	17	HG#)	17	HD1)	17	HG#)	0
				16	HA)	16	HB2)	18	HA)	18	HD1)					17	HB1)	17	HB2)	17	HD2)	17	HB1)	0
				16	HA)	16	HN)	18	HA)	18	HD2)					17	HB1)	17	HG#)	17	HD2)	17	HB2)	0
				16	HB1)	16	HB2)	18	HA)	18	HG#)					17	HD1)	17	HB1)	17	HD2)	17	HG#)	0
				16	HB1)	16	HN)	18	HA)	18	HN)					17	HD1)	17	HB2)	18	HA)	18	HB1)	0
				16	HB2)	16	HN)	18	HB1)	18	HN)					17	HD1)	17	HD2)	18	HA)	18	HB2)	0
				16	HG)	16	HA)	18	HB2)	18	HN)					17	HD1)	17	HG#)	18	HA)	18	HN)	0
				16	HG)	16	HB1)	18	HD1)	18	HB1)					17	HD2)	17	HB1)	18	HB1)	18	HN)	0
				16	HG)	16	HB2)	18	HD1)	18	HB2)					17	HD2)	17	HB2)	18	HB2)	18	HN)	0
				16	HG)	16	HN)	18	HD1)	18	HD2)					17	HD2)	17	HG#)	19	HA)	19	HB1)	0
				17	HA1)	17	HA2)	18	HD1)	18	HG#)					18	HA)	18	HB1)	19	HA)	19	HB2)	0
				17	HA1)	17	HN)	18	HD1)	18	HN)					18	HA)	18	HB2)	19	HA)	19	HN)	0
				17	HA2)	17	HN)	18	HD2)	18	HG#)					18	HA)	18	HN)	19	HB1)	19	HB2)	0
				18	HA)	18	HB1)	18	HD2)	18	HN)					18	HB1)	18	HB2)	19	HB1)	19	HN)	0
				18	HA)	18	HB2)	18	HG#)	18	HN)					18	HB1)	18	HN)	19	HB2)	19	HN)	0
				18	HA)	18	HD1)	19	HA)	19	HB1)					18	HB2)	18	HN)	19	HG)	19	HA)	0

				18	HA)	18	HB2)	18	HG#)	18	HN)					18	HB1)	18	HN)	19	HB2)	19	HN)	0
				18	HA)	18	HD1)	19	HA)	19	HB1)					18	HB2)	18	HN)	19	HG)	19	HA)	0
				18	HA)	18	HD2)	19	HA)	19	HB2)					19	HA)	19	HB1)	19	HG)	19	HB1)	0
				18	HA)	18	HG#)	19	HA)	19	HD1)					19	HA)	19	HB2)	19	HG)	19	HB2)	0
				18	HA)	18	HN)	19	HA)	19	HD2)					19	HA)	19	HN)	19	HG)	19	HN)	0
				18	HB1)	18	HB2)	19	HA)	19	HG#)					19	HB1)	19	HB2)	20	HA1)	20	HA2)	0
				18	HB1)	18	HN)	19	HD1)	19	HB1)					19	HB1)	19	HN)	20	HA1)	20	HN)	0
				18	HB2)	18	HG#)	19	HD1)	19	HB2)					19	HB2)	19	HN)	20	HA2)	20	HN)	0
				18	HB2)	18	HN)	19	HD1)	19	HD2)					19	HG)	19	HA)	21	HA)	21	HB1)	0
				18	HD1)	18	HB1)	19	HD1)	19	HG#)					19	HG)	19	HB1)	21	HA)	21	HB2)	0
				18	HD1)	18	HB2)	19	HD2)	19	HB1)					19	HG)	19	HB2)	21	HA)	21	HD1)	0
				18	HD1)	18	HD2)	19	HD2)	19	HB2)					19	HG)	19	HN)	21	HA)	21	HD2)	0
				18	HD1)	18	HG#)	19	HD2)	19	HG#)					20	HA1)	20	HA2)	21	HA)	21	HG#)	0
				18	HD1)	18	HN)	20	HA)	20	HB1)					20	HA1)	20	HN)	21	HA)	21	HN)	0
				18	HD2)	18	HB1)	20	HA)	20	HB2)					20	HA2)	20	HN)	21	HB1)	21	HB2)	0
				18	HD2)	18	HN)	20	HA)	20	HG1)					21	HA)	21	HB1)	21	HB1)	21	HN)	0
				18	HG#)	18	HN)	20	HA)	20	HG2)					21	HA)	21	HB2)	21	HB2)	21	HG#)	0
				19	HA)	19	HB1)	20	HB1)	20	HB2)					21	HA)	21	HB1)	21	HB2)	21	HN)	0
				19	HA)	19	HB2)	20	HD#)	20	HA)					21	HA)	21	HD2)	21	HD1)	21	HB1)	0
				19	HA)	19	HD1)	20	HD#)	20	HB1)					21	HA)	21	HG#)	21	HD1)	21	HB2)	0
				19	HA)	19	HD2)	20	HD#)	20	HB2)					21	HA)	21	HN)	21	HD1)	21	HG#)	0
				19	HA)	19	HG1)	20	HD#)	20	HG1)					21	HB1)	21	HB2)	21	HD1)	21	HN)	0
				19	HA)	19	HG2)	20	HD#)	20	HG2)					21	HB1)	21	HN)	21	HD2)	21	HB1)	0
				19	HB1)	19	HB2)	20	HG1)	20	HB2)					21	HB2)	21	HN)	21	HD2)	21	HB2)	0
				19	HB1)	19	HG1)	20	HG2)	20	HB1)					21	HD1)	21	HB1)	21	HD2)	21	HG#)	0
				19	HB1)	19	HG2)	20	HG2)	20	HB2)					21	HD1)	21	HB2)	21	HD2)	21	HN)	0
				19	HD1)	19	HB1)	21	HA)	21	HB1)					21	HD1)	21	HN)	21	HG#)	21	HN)	0
				19	HD1)	19	HB2)	21	HA)	21	HB2)					21	HD2)	21	HB1)	22	HA)	22	HB1)	0
				19	HD1)	19	HD2)	21	HA)	21	HD1)					21	HD2)	21	HB2)	22	HA)	22	HB2)	0
				19	HD1)	19	HG1)	21	HA)	21	HD2)					21	HD2)	21	HN)	22	HA)	22	HD1)	0
				19	HD2)	19	HB1)	21	HA)	21	HG1)					21	HG#)	21	HN)	22	HA)	22	HD2)	0
				19	HD2)	19	HB2)	21	HA)	21	HG2)					22	HA)	22	HB1)	22	HA)	22	HG#)	0
				19	HD2)	19	HG1)	21	HB1)	21	HB2)					22	HA)	22	HB2)	22	HB1)	22	HB2)	0
				19	HD2)	19	HG2)	21	HB1)	21	HG1)					22	HA)	22	HD1)	22	HB1)	22	HB2)	0
				20	HA)	20	HB1)	21	HB1)	21	HG2)					22	HA)	22	HD2)	22	HD1)	22	HB1)	0
				20	HA)	20	HB2)	21	HB2)	21	HG2)					22	HA)	22	HG1)	22	HD1)	22	HB2)	0
				20	HB1)	20	HB2)	21	HD1)	21	HB1)					22	HA)	22	HG2)	22	HD1)	22	HD2)	0
				20	HD#)	20	HA)	21	HD1)	21	HB2)					22	HB1)	22	HB2)	22	HD1)	22	HG#)	0
				20	HD#)	20	HB1)	21	HD1)	21	HD2)					22	HB1)	22	HG2)	22	HD2)	22	HB1)	0
				20	HD#)	20	HB2)	21	HD1)	21	HG1)					22	HD1)	22	HB1)	22	HD2)	22	HB2)	0
				20	HD#)	20	HG#)	21	HD1)	21	HG2)					22	HD1)	22	HB2)	22	HD2)	22	HG#)	0
				20	HG#)	20	HB1)	21	HD2)	21	HB1)					22	HD1)	22	HD2)	23	HA)	23	HB1)	0
				20	HG#)	20	HB2)	21	HD2)	21	HB2)					22	HD1)	22	HG1)	23	HA)	23	HB2)	0
				21	HA)	21	HB1)	21	HD2)	21	HG1)					22	HD1)	22	HG2)	23	HB1)	23	HB2)	0
				21	HA)	21	HB2)	21	HD2)	21	HG2)					22	HD2)	22	HB1)	23	HD#)	23	HB1)	0
				21	HA)	21	HD1)	22	HA)	22	HB#)					22	HD2)	22	HB2)	23	HD#)	23	HB2)	0
				21	HA)	21	HG1)	22	HA)	22	HN)					22	HD2)	22	HG1)	23	HD#)	23	HG1)	0
				21	HA)	21	HG2)	22	HB#)	22	HN)					22	HD2)	22	HG2)	23	HD#)	23	HG2)	0
				21	HB1)	21	HB2)									23	HA)	23	HB1)	23	HG1)	23	HB1)	0
				21	HB1)	21	HG1)									23	HA)	23	HB2)	23	HG1)	23	HB2)	0
				21	HB1)	21	HG2)									23	HA)	23	HG2)	23	HG2)	23	HB1)	0
				21	HD1)	21	HB1)									23	HB1)	23	HB2)	23	HG2)	23	HB2)	0
				21	HD1)	21	HB2)									23	HD#)	23	HB1)	24	HA)	24	HB1)	0
				21	HD1)	21	HD2)									23	HD#)	23	HB2)	24	HA)	24	HB2)	0
				21	HD1)	21	HG1)									23	HD#)	23	HG1)	24	HA)	24	HD1)	0
				21	HD1)	21	HG2)									23	HD#)	23	HG2)	24	HA)	24	HG1)	0
				21	HD2)	21	HB1)									23	HG1)	23	HB1)	24	HA)	24	HG2)	0
				21	HD2)	21	HB2)									23	HG1)	23	HB2)	24	HB1)	24	HG1)	0
				21	HD2)	21	HG1)									23	HG1)	23	HG2)	24	HB1)	24	HG2)	0
				21	HD2)	21	HG2)									23	HG2)	23	HB2)	24	HD1)	24	HB1)	0
				22	HA)	22	HB1)									24	HA)	24	HB1)	24	HD1)	24	HB2)	0
				22	HA)	22	HB2)									24	HA)	24	HB2)	24	HD1)	24	HD2)	0
				22	HA)	22	HN)									24	HA)	24	HG1)	24	HD1)	24	HG1)	0
				22	HB1)	22	HB2)									24	HA)	24	HG2)	24	HD1)	24	HG2)	0
				22	HB1)	22	HN)									24	HB1)	24	HB2)	24	HD2)	24	HB1)	0
				22	HB2)	22	HN)									24	HB1)	24	HG1)	24	HD2)	24	HB2)	0
																24	HB1)	24	HG2)	24	HD2)	24	HG1)	0
																24	HD1)	24	HB1)	24	HD2)	24	HG2)	0

				9 HG)	8 HH2)	14 HD1)	13 HA1)	14 HA)	13 HN)	11 HB1)	12 HN)	12 HB2)	13 HN)	1
				9 HG)	8 HZ3)	14 HD2)	13 HA1)	14 HN)	13 HN)	11 HE3)	12 HN)	12 HD1#)	13 HN)	1
				9 HA)	10 HN)	14 HD2)	13 HN)	14 HB1)	15 HN)	11 HN)	12 HN)	12 HD2#)	13 HN)	1
				9 HB1)	10 HN)	14 HA)	15 HN)	15 HA1)	16 HN)	12 HA)	11 HE3)	13 HA)	12 HN)	1
				9 HB2)	10 HN)	14 HD1)	15 HN)	15 HA2)	16 HN)	12 HA)	11 HN)	13 HN)	12 HN)	1
				9 HD1#)	10 HN)	15 HA)	16 HN)	15 HN)	16 HN)	12 HB1)	11 HE3)	13 HA)	14 HN)	1
				9 HD2#)	10 HN)	15 HB#)	16 HN)	16 HA1)	15 HN)	12 HB2)	11 HE3)	13 HB#)	14 HN)	1
				10 HA)	9 HB2)	15 HN)	16 HN)	16 HA2)	15 HN)	12 HD1#)	11 HE3)	13 HD#)	14 HN)	1
				10 HA)	9 HN)	16 HA)	17 HN)	17 HD1)	16 HA1)	12 HD1#)	11 HZ3)	14 HA)	13 HB#)	1
				10 HD#)	9 HN)	17 HN)	16 HN)	17 HD2)	16 HA1)	12 HD2#)	11 HE3)	14 HB1)	13 HN)	1
				10 HN)	9 HN)	17 HA1)	18 HN)	17 HD2)	16 HN)	12 HD2#)	11 HH2)	14 HN)	13 HN)	1
				10 HA)	11 HN)	17 HA2)	18 HN)	17 HA)	18 HN)	12 HD2#)	11 HZ2)	14 HA)	15 HA2)	1
				10 HB#)	11 HN)	17 HN)	18 HN)	17 HB2)	18 HN)	12 HD2#)	11 HZ3)	14 HA)	15 HN)	1
				10 HD#)	11 HN)	18 HA)	19 HD1)	17 HG#)	18 HN)	12 HG)	11 HE3)	14 HB1)	15 HN)	1
				10 HG2)	11 HN)	18 HA)	19 HD2)	18 HA)	19 HN)	12 HG)	11 HN)	14 HB2)	15 HN)	1
				11 HA)	10 HB#)	18 HA)	19 HG#)	18 HN)	19 HN)	12 HG)	11 HZ3)	15 HA2)	14 HN)	1
				11 HB1)	10 HD#)	19 HD1)	18 HB1)	20 HA2)	19 HN)	12 HA)	13 HN)	15 HN)	14 HN)	1
				11 HB1)	10 HN)	19 HD2)	18 HB1)	20 HN)	19 HN)	12 HB1)	13 HN)	15 HA2)	16 HA1)	1
				11 HB2)	10 HN)	19 HD2)	18 HG#)	20 HA1)	21 HN)	12 HB2)	13 HN)	15 HA2)	16 HN)	1
				11 HN)	10 HN)	19 HA)	20 HD#)	20 HA2)	21 HN)	12 HD1#)	13 HN)	15 HN)	16 HN)	1
				11 HA)	12 HN)	19 HA)	20 HG2)	20 HN)	21 HN)	12 HD2#)	13 HN)	16 HA1)	15 HN)	1
				11 HB1)	12 HN)	20 HD#)	19 HB1)	22 HD1)	21 HB1)	12 HG)	13 HN)	16 HA2)	15 HN)	1
				11 HB2)	12 HN)	20 HD#)	19 HG#)	22 HD2)	21 HN)	13 HA)	12 HN)	17 HD1)	16 HA1)	1
				12 HA2)	11 HN)	20 HD#)	21 HD2)	22 HA)	23 HD#)	13 HB#)	12 HN)	17 HD1)	16 HA1)	1
				12 HN)	11 HN)	21 HD1)	20 HA)	22 HA)	23 HG1)	13 HN)	12 HN)	17 HD1)	16 HA2)	1
				12 HA1)	13 HN)	21 HD1)	20 HB1)	22 HA)	23 HG2)	13 HA)	14 HN)	17 HD1)	16 HN)	1
				12 HA2)	13 HN)	21 HD2)	20 HA)	23 HD#)	22 HB1)	13 HB#)	14 HN)	17 HD2)	16 HA2)	1
				12 HN)	13 HN)	21 HD2)	20 HB1)	23 HD#)	22 HG#)	13 HD#)	14 HN)	17 HA)	18 HN)	1
				13 HA1)	12 HN)	21 HA)	22 HN)	24 HD1)	23 HA)	14 HN)	13 HN)	17 HB2)	18 HN)	1
				13 HA2)	12 HN)	21 HB1)	22 HN)	24 HD1)	23 HB1)	14 HA)	15 HN)	17 HD1)	18 HN)	1
				13 HA1)	14 HB1)	21 HD1)	22 HN)	24 HD1)	23 HB2)	14 HB1)	15 HN)	17 HD2)	18 HN)	1
				13 HA1)	14 HG#)	21 HD1)	22 HN)	24 HD2)	23 HA)	14 HB2)	15 HN)	17 HG#)	18 HN)	1
				14 HA)	13 HA1)	21 HG1)	22 HN)	24 HD2)	23 HB1)	15 HA2)	14 HN)	18 HA)	19 HN)	1
				14 HA)	13 HA2)			24 HD2)	23 HB2)	15 HN)	14 HN)	18 HB2)	19 HN)	1
				14 HD1)	13 HA1)			24 HB1)	25 HN)	15 HA1)	16 HN)	18 HN)	19 HN)	1
				14 HD1)	13 HA2)			24 HG#)	25 HN)	15 HA2)	16 HN)	19 HA)	20 HN)	1
				14 HD2)	13 HA1)					15 HN)	16 HN)	19 HB2)	20 HN)	1
				14 HD2)	13 HA2)					16 HA1)	15 HN)	20 HA1)	19 HN)	1
				14 HG#)	13 HA2)					16 HA2)	15 HN)	20 HN)	19 HN)	1
				14 HA)	15 HN)					16 HA1)	17 HG#)	20 HA1)	21 HN)	1
				14 HB2)	15 HN)					17 HD1)	16 HA1)	20 HA2)	21 HN)	1
				14 HG#)	15 HN)					17 HD1)	16 HA1)	20 HN)	21 HN)	1
				15 HA)	14 HB2)					17 HD1)	16 HA2)	21 HA)	20 HN)	1
				15 HA)	16 HA)					17 HD1)	16 HN)	21 HB2)	20 HN)	1
				15 HA)	16 HN)					17 HD2)	16 HA1)	21 HA)	22 HD1)	1
				15 HN)	16 HN)					17 HD2)	16 HA2)	21 HA)	22 HD2)	1
				16 HB1)	15 HN)					17 HD2)	16 HN)	22 HD2)	21 HG#)	1
				16 HA)	17 HN)					18 HA)	19 HN)	22 HA)	23 HD#)	1
				16 HB2)	17 HN)					18 HN)	19 HN)	22 HA)	23 HG2)	1
				17 HA1)	16 HA)					19 HA)	20 HN)	23 HD#)	22 HB1)	1
				17 HA1)	16 HN)					20 HN)	19 HN)	23 HD#)	22 HG#)	1
				17 HN)	16 HN)					20 HA1)	21 HN)	24 HD1)	23 HB1)	1
				17 HA1)	18 HN)					20 HA2)	21 HN)	24 HD1)	23 HB2)	1
				17 HA2)	18 HN)					20 HN)	21 HN)	24 HB1)	25 HN)	1
				17 HN)	18 HN)					21 HA)	22 HD1)	24 HB2)	25 HN)	1
				18 HA)	17 HA2)					21 HA)	22 HD2)	24 HG1)	25 HN)	1
				18 HA)	17 HN)					21 HA)	22 HG1)	24 HG1)	25 HN)	1
				18 HB2)	17 HN)					22 HD2)	21 HG#)	24 HG2)	25 HN)	1
				18 HA)	19 HB1)					22 HD2)	21 HN)			1
				18 HA)	19 HD1)					22 HA)	23 HD#)			1
				18 HA)	19 HD2)					22 HA)	23 HG2)			1
				18 HA)	19 HG1)					23 HD#)	22 HB1)			1
				19 HD1)	18 HB2)					24 HD1)	23 HA)			1
				19 HD2)	18 HB2)					24 HD1)	23 HB2)			1
				19 HD2)	18 HG#)					24 HD2)	23 HA)			1
				19 HD2)	18 HN)					24 HD2)	23 HB1)			1
				19 HA)	20 HA)					24 HD2)	23 HB2)			1
				19 HA)	20 HD#)					24 HD1)	25 HN)			1
				20 HD#)	19 HB1)					24 HD2)	25 HN)			1

[illegible]

				5 HB2)	2 HG2#)	8 HA)	11 HB2)	11 HB1)	8 HN)	8 HB#)	11 HN)	5 HG2#)	8 HN)	3
				5 HA)	8 HB1)	8 HA)	11 HN)	12 HA)	15 HN)	8 HE#)	11 HE3)	6 HA)	9 HG2#)	3
				5 HA)	8 HB2)	10 HB#)	7 HE21)	15 HA1)	18 HN)	8 HE#)	11 HH2)	7 HD1#)	4 HN)	3
				5 HA)	8 HE3)	10 HB#)	7 HN)	18 HA)	21 HN)	8 HE#)	11 HZ2)	7 HN)	4 HN)	3
				5 HA)	8 HN)	10 HD#)	7 HE21)			8 HE#)	11 HZ3)	7 HA)	10 HB1)	3
				5 HA)	8 HZ3)	11 HB2)	8 HD1)			9 HA)	12 HD1#)	7 HA)	10 HN)	3
				6 HG2#)	3 HN)	19 HG#)	22 HN)			9 HA)	12 HD2#)	8 HB1)	5 HG2#)	3
				6 HA)	9 HD1#)					9 HA)	12 HG)	8 HB2)	5 HG1#)	3
				6 HA)	9 HN)					9 HA)	12 HN)	8 HA)	11 HB1)	3
				6 HG2#)	9 HN)					9 HG2#)	12 HN)	8 HA)	11 HE3)	3
				7 HB1)	4 HD2#)					10 HB1)	7 HN)	8 HA)	11 HN)	3
				7 HB1)	4 HN)					10 HB2)	7 HB2)	8 HE#)	11 HE3)	3
				7 HG1)	4 HD2#)					10 HB2)	7 HD1#)	8 HE#)	11 HZ3)	3
				7 HG2)	4 HD2#)					11 HB1)	8 HB#)	9 HA)	12 HD2#)	3
				7 HN)	4 HN)					11 HB1)	8 HD#)	9 HA)	12 HN)	3
				7 HB1)	10 HN)					11 HB2)	8 HD#)	10 HB1)	7 HB2)	3
				8 HB1)	5 HN)					11 HA)	14 HB1)	10 HB1)	7 HD1#)	3
				8 HA)	11 HB1)					11 HA)	14 HB2)	10 HB1)	7 HN)	3
				8 HA)	11 HB2)					11 HA)	14 HN)	10 HE21)	13 HN)	3
				8 HA)	11 HN)					12 HD1#)	9 HN)	10 HE22)	13 HN)	3
				8 HB1)	11 HN)					13 HB#)	10 HE21)	11 HB1)	8 HD#)	3
				9 HN)	6 HN)					13 HB#)	10 HE22)	11 HA)	14 HB2)	3
				10 HB#)	7 HE21)					13 HB#)	10 HN)	11 HA)	14 HN)	3
				10 HB#)	7 HE22)					13 HD#)	10 HE21)	12 HD1#)	15 HN)	3
				10 HD#)	7 HE21)					13 HD#)	10 HE22)	12 HD2#)	15 HN)	3
				10 HD#)	7 HE22)					14 HB2)	11 HN)	13 HB#)	10 HE21)	3
				10 HD#)	7 HN)					15 HA1)	18 HB1)	13 HB#)	10 HE22)	3
				10 HG2)	7 HE22)					15 HA1)	18 HB2)	13 HB#)	10 HN)	3
				10 HA)	13 HN)							13 HD#)	10 HE21)	3
				10 HN)	13 HN)							13 HD#)	10 HE22)	3
				11 HN)	8 HN)							14 HB1)	11 HD1)	3
				12 HA2)	15 HN)							14 HB2)	11 HZ2)	3
				13 HA1)	10 HN)							15 HA1)	18 HN)	3
				13 HA2)	16 HN)							17 HA)	20 HN)	3
				14 HA)	17 HN)									3
				16 HB1)	13 HN)									3
				16 HG)	13 HN)									3
				16 HN)	13 HN)									3
9 HB2)	5 HD#)	2 HA)	6 HN)	2 HB)	6 HG2#)	2 HG#)	6 HN)	1 HA)	5 HG1#)	3 HG#)	7 HD1#)			4
9 HD1#)	5 HD#)	2 HB)	6 HN)	3 HA)	7 HN)	10 HE21)	6 HE#)	3 HA)	7 HN)	3 HG#)	7 HD2#)			4
9 HD1#)	5 HE#)	2 HG1#)	6 HN)	5 HA)	9 HN)	12 HD1#)	8 HD#)	3 HG#)	7 HD1#)	4 HB#)	8 HE#)			4
9 HD2#)	5 HE#)	3 HA)	7 HN)	6 HA)	10 HN)	12 HD1#)	8 HE#)	3 HG#)	7 HN)	5 HG2#)	9 HN)			4
9 HA)	13 HN)	4 HD2#)	8 HN)	7 HB2)	11 HN)	12 HD2#)	8 HD#)	4 HA)	8 HN)	7 HA)	11 HN)			4
13 HA1)	9 HD2#)	5 HA)	9 HD1#)	7 HE21)	11 HN)	12 HD2#)	8 HE#)	5 HA)	9 HD1#)	7 HD1#)	11 HN)			4
				5 HD#)	9 HN)	7 HE22)	11 HN)	12 HG)	8 HD#)	5 HA)	9 HN)	9 HB)	5 HG2#)	4
				6 HA)	10 HN)	8 HB2)	4 HD2#)	12 HB1)	16 HN)	6 HA)	10 HB1)	9 HG11)	5 HG2#)	4
				6 HG2#)	10 HN)	9 HD1#)	5 HD#)	13 HE#)	9 HD1#)	6 HA)	10 HN)	9 HG12)	5 HG1#)	4
				7 HE22)	11 HN)	9 HD1#)	5 HE#)	13 HE#)	9 HG2#)	7 HA)	11 HN)	9 HG12)	5 HG2#)	4
				9 HA)	5 HE#)	9 HD2#)	5 HD#)	14 HB2)	10 HE21)	8 HA)	12 HN)	9 HA)	13 HN)	4
				9 HB2)	5 HE#)	9 HD2#)	5 HE#)	14 HB2)	10 HE22)	8 HB#)	12 HD1#)	10 HE21)	14 HN)	4
				9 HD1#)	5 HD#)	9 HG)	5 HD#)	14 HG#)	10 HE21)	8 HB#)	12 HD2#)	12 HD1#)	8 HD#)	4
				9 HD1#)	5 HE#)	9 HG)	5 HE#)	14 HG#)	10 HE22)	8 HD#)	12 HN)	12 HD1#)	8 HE#)	4
				9 HD2#)	5 HE#)	10 HA)	6 HD#)	14 HN)	10 HE22)	9 HA)	13 HN)	12 HD2#)	8 HD#)	4
				9 HG)	5 HE#)			19 HB1)	15 HA2)	9 HG2#)	13 HN)	12 HD2#)	8 HE#)	4
				9 HB2)	13 HA2)					10 HE22)	14 HN)	12 HG)	8 HD#)	4
				9 HB2)	13 HN)					12 HB1)	8 HE#)	12 HA)	16 HA1)	4
				9 HD1#)	13 HA2)					12 HB2)	8 HE#)	12 HA)	16 HA1)	4
				9 HD1#)	13 HN)					12 HD1#)	8 HD#)	12 HA)	16 HA2)	4
				9 HD2#)	13 HA2)					12 HD1#)	8 HE#)	12 HA)	16 HN)	4
				9 HD2#)	13 HN)					12 HD2#)	8 HD#)	12 HD2#)	16 HN)	4
				11 HB1)	7 HE21)					12 HD2#)	8 HE#)	14 HA)	10 HE22)	4
				11 HB1)	7 HE22)					12 HG)	8 HE#)	14 HB1)	10 HE21)	4
				11 HB1)	7 HG1)					12 HD2#)	16 HA2)	14 HB1)	10 HE22)	4
				11 HB2)	7 HE21)					13 HD#)	9 HG2#)			4
				11 HB2)	7 HG1)					13 HG2)	9 HG2#)			4
				11 HB2)	7 HG2)					16 HA1)	12 HD2#)			4
				13 HA1)	9 HD2#)									4
				13 HA2)	9 HN)									4

13	HA1)	8	HH2)	11	HA)	16	HB2)	14	HD1)	9	HD2#)	11	HB1)	16	HN)	4	HB2)	9	HD1#)	14	HB1)	19	HN)	5
				11	HB1)	16	HN)	14	HG#)	9	HD2#)	11	HB2)	16	HN)	16	HA1)	11	HH2)	16	HA1)	11	HH2)	5
				13	HA1)	8	HE1)	16	HA)	11	HB2)	16	HA1)	11	HE1)	16	HA1)	11	HZ2)	16	HA2)	11	HE3)	5
				13	HA1)	8	HH2)	16	HB1)	11	HB1)	16	HA1)	11	HH2)	16	HA1)	11	HZ3)	16	HA2)	11	HH2)	5
				13	HA1)	8	HZ2)	16	HB1)	11	HB2)	16	HA1)	11	HZ2)	16	HA2)	11	HE3)	16	HA2)	11	HZ3)	5
				13	HA1)	8	HZ3)	16	HB2)	11	HB1)	17	HD1)	12	HD2#)	16	HA2)	11	HH2)	17	HD1)	12	HD2#)	5
				13	HA2)	8	HD1)	16	HB2)	11	HB2)					16	HA2)	11	HZ2)	17	HD2)	12	HD2#)	5
				13	HA2)	8	HE1)	16	HB2)	11	HN)					16	HA2)	11	HZ3)	19	HB1)	14	HB1)	5
				13	HA2)	8	HE3)									17	HD1)	12	HD2#)	19	HB1)	14	HB2)	5
				13	HA2)	8	HH2)									17	HG#)	12	HD2#)	19	HB2)	14	HB2)	5
				13	HA2)	8	HZ2)									19	HA)	14	HB1)					5
				13	HA2)	8	HZ3)									19	HB1)	14	HB1)					5
				16	HA)	11	HB1)									19	HB1)	14	HB2)					5
				16	HA)	11	HB1)									19	HB2)	14	HB1)					5
				16	HA)	11	HB2)									19	HB2)	14	HB2)					5
				16	HB1)	11	HB1)																	5
				16	HB1)	11	HB2)																	5
				16	HB2)	11	HB1)																	5
				16	HB2)	11	HB2)																	5
				16	HG)	11	HB1)																	5
14	HA)	8	HH2)	14	HA)	8	HH2)	8	HB2)	14	HG#)	17	HA)	11	HE1)	17	HA)	11	HE1)	17	HA)	11	HE1)	6
14	HA)	8	HZ2)	14	HA)	8	HZ2)	14	HA)	8	HE1)	17	HA)	11	HZ2)	17	HA)	11	HH2)	17	HA)	11	HH2)	6
14	HD1)	8	HH2)	14	HA)	8	HZ3)	14	HA)	8	HZ2)	17	HB2)	11	HZ2)	17	HA)	11	HZ2)	17	HB1)	11	HH2)	6
14	HD2)	8	HH2)	14	HB1)	8	HH2)	14	HB1)	8	HZ2)	17	HD1)	11	HH2)	17	HB1)	11	HH2)	17	HB2)	11	HH2)	6
14	HD2)	8	HZ2)	14	HB1)	8	HZ2)	14	HB2)	8	HZ2)	17	HD1)	11	HZ2)	17	HB1)	11	HZ2)	17	HD1)	11	HH2)	6
14	HG#)	8	HH2)	14	HB2)	8	HH2)	14	HD1)	8	HZ2)	17	HD2)	11	HH2)	17	HB2)	11	HH2)	17	HD2)	11	HH2)	6
14	HG#)	8	HZ2)	14	HB2)	8	HZ2)	14	HD1)	8	HZ3)	17	HD2)	11	HZ2)	17	HB2)	11	HZ2)	17	HD2)	11	HZ3)	6
				14	HD1)	8	HH2)	14	HD2)	8	HE3)	17	HG#)	11	HZ2)	17	HD1)	11	HH2)	17	HG#)	11	HH2)	6
				14	HD1)	8	HZ2)	14	HD2)	8	HZ2)					17	HD1)	11	HZ2)	17	HG#)	11	HZ3)	6
				14	HD1)	8	HZ3)	14	HD2)	8	HZ3)					17	HD1)	11	HZ3)					6
				14	HD2)	8	HH2)	14	HG#)	8	HZ2)					17	HD2)	11	HH2)					6
				14	HD2)	8	HZ2)	14	HG#)	8	HZ3)					17	HD2)	11	HZ2)					6
				14	HD2)	8	HZ3)									17	HD2)	11	HZ3)					6
				14	HG#)	8	HH2)									17	HG#)	11	HH2)					6
				14	HG#)	8	HZ2)									17	HG#)	11	HZ2)					6
				14	HG#)	8	HZ3)									17	HG#)	11	HZ3)					6
												25	HB1)	18	HN)					18	HN)	11	HE1)	7
				16	HB1)	8	HD1)	16	HB1)	8	HD1)					19	HB1)	11	HD1)	19	HB2)	11	HE1)	8
				16	HB1)	8	HE1)									19	HB1)	11	HE1)	19	HN)	11	HE1)	8
				16	HB2)	8	HE1)									19	HB2)	11	HD1)					8
				16	HG)	8	HB2)									19	HB2)	11	HE1)					8
				16	HG)	8	HD1)									19	HG)	11	HD1)					8
				16	HG)	8	HE1)									19	HG)	11	HE1)					8
				16	HN)	8	HE1)																	8
				17	HA1)	8	HD1)																	9
18	HB1)	8	HD1)	8	HD1)	18	HN)	8	HD1)	18	HN)	11	HB1)	21	HN)	21	HA)	11	HD1)	21	HA)	11	HE1)	10
18	HB2)	8	HD1)	8	HZ2)	18	HN)	18	HA)	8	HE1)	11	HD1)	21	HE)	21	HB1)	11	HD1)	21	HB1)	11	HD1)	10
18	HB2)	8	HE1)	18	HA)	8	HD1)	18	HB1)	8	HD1)	11	HZ2)	21	HN)	21	HB1)	11	HE1)	21	HB1)	11	HE1)	10
18	HG#)	8	HD1)	18	HA)	8	HE1)	18	HB1)	8	HE1)	21	HB1)	11	HD1)	21	HB2)	11	HD1)	21	HB2)	11	HE1)	10
				18	HB1)	8	HD1)	18	HD1)	8	HD1)	21	HB1)	11	HE1)	21	HB2)	11	HE1)	21	HB2)	11	HZ2)	10
				18	HB1)	8	HE1)	18	HG#)	8	HD1)	21	HB2)	11	HD1)	21	HD2)	11	HD1)	21	HD1)	11	HD1)	10
				18	HB1)	8	HZ2)	18	HG#)	8	HE1)	21	HB2)	11	HE1)	21	HG#)	11	HD1)	21	HD1)	11	HZ2)	10
				18	HB2)	8	HD1)	18	HN)	8	HE1)	21	HD#)	11	HD1)	21	HG#)	11	HE1)	21	HD2)	11	HD1)	10
				18	HB2)	8	HE1)					21	HG#)	11	HD1)	21	HN)	11	HE1)	21	HD2)	11	HZ2)	10
				18	HD2)	8	HE1)					21	HG#)	11	HE1)					21	HG#)	11	HD1)	10
				18	HD2)	8	HE3)					21	HN)	11	HE1)					21	HG#)	11	HE1)	10
				18	HD2)	8	HN)													21	HN)	11	HE1)	10
				18	HG#)	8	HD1)																	10
				18	HG#)	8	HE1)																	10
				18	HN)	8	HE1)																	10
				18	HD2)	7	HN)	19	HA)	8	HE1)	22	HA)	11	HE1)	11	HB1)	22	HG2)	22	HA)	11	HE1)	11
				19	HA)	8	HD1)	19	HA)	8	HZ2)					22	HA)	11	HE1)	22	HB2)	11	HD1)	11
				19	HA)	8	HE1)	19	HB2)	8	HD1)					22	HA)	11	HZ2)	22	HD1)	11	HD1)	11
				19	HA)	8	HH2)	19	HB2)	8	HE1)									22	HD1)	11	HE1)	11
				19	HA)	8	HZ2)	20	HD#)	9	HD2#)									22	HD2)	11	HE1)	11
				19	HB1)	8	HZ2)																	11
				19	HB2)	8	HZ2)																	11
				19	HD2)	8	HE1)																	11

20	HD1)	8	HZ2)	20	HA)	8	HD1)	20	HA)	8	HD1)	23	HA)	11	HD1)	11	HB1)	23	HA)	23	HA)	11	HD1)	12	
20	HD2)	8	HZ2)	20	HA)	8	HE1)	20	HA)	8	HE1)	23	HA)	11	HE1)	23	HA)	11	HD1)	23	HA)	11	HE1)	12	
				20	HA)	8	HE3)	20	HA)	8	HZ2)	23	HA)	11	HZ2)	23	HA)	11	HE1)	23	HB1)	11	HH2)	12	
				20	HB1)	8	HE3)	20	HB1)	8	HZ2)	23	HB1)	11	HZ2)	23	HA)	11	HE3)	23	HB1)	11	HZ3)	12	
				20	HB1)	8	HH2)	20	HB1)	8	HZ3)	23	HB2)	11	HZ2)	23	HB2)	11	HE3)	23	HB2)	11	HE3)	12	
				20	HB1)	8	HZ2)	20	HB2)	8	HZ2)	23	HD#)	11	HE1)	23	HB2)	11	HH2)	23	HB2)	11	HH2)	12	
				20	HB1)	8	HZ3)	20	HD#)	8	HE1)	23	HD#)	11	HZ2)	23	HB2)	11	HZ2)	23	HB2)	11	HZ3)	12	
				20	HB2)	8	HE3)	20	HD#)	8	HZ2)	23	HG1)	11	HH2)	23	HB2)	11	HZ3)	23	HB2)	11	HZ3)	12	
				20	HB2)	8	HH2)	20	HG1)	8	HZ2)	23	HG1)	11	HZ2)	23	HD#)	11	HH2)	23	HD#)	11	HE1)	12	
				20	HB2)	8	HZ2)	20	HG1)	8	HZ3)	23	HG2)	11	HZ2)	23	HD#)	11	HZ2)	23	HD#)	11	HH2)	12	
				20	HB2)	8	HZ3)	20	HG2)	8	HZ2)						23	HG1)	11	HH2)	23	HG2)	11	HH2)	12
				20	HD#)	8	HH2)										23	HG1)	11	HZ2)	24	HD2)	12	HD2#)	12
				20	HD#)	8	HZ2)										23	HG2)	11	HH2)	24	HD2)	12	HN)	12
				20	HG#)	8	HH2)										23	HG2)	11	HZ2)	24	HG2)	12	HN)	12
				20	HG#)	8	HZ3)																		12
				21	HD1)	9	HD2#)																		12
21	HD2)	8	HZ3)	8	HB1)	21	HD1)	21	HD1)	8	HZ2)						11	HA)	24	HD1)	11	HB1)	24	HD2)	13
				8	HB1)	21	HD2)	21	HD1)	8	HZ3)						11	HB1)	24	HD2)	24	HD1)	11	HE1)	13
				8	HB2)	21	HD2)	21	HD2)	8	HE3)						11	HB1)	24	HG1)	24	HD1)	11	HZ3)	13
				21	HD1)	8	HD1)										11	HB2)	24	HD1)	24	HD2)	11	HN)	13
				21	HD1)	8	HE1)										11	HB2)	24	HD2)	24	HD2)	11	HZ2)	13
				21	HD1)	8	HE3)										11	HB2)	24	HG1)	24	HD2)	11	HZ3)	13
				21	HD1)	8	HN)										11	HB2)	24	HG2)	24	HG1)	11	HN)	13
				21	HD1)	8	HZ2)										24	HD1)	11	HD1)	24	HG2)	11	HE3)	13
				21	HD2)	8	HE1)										24	HD1)	11	HE1)	24	HG2)	11	HN)	13
				21	HD2)	8	HE3)										24	HD1)	11	HE3)					13
				21	HD2)	8	HH2)										24	HD1)	11	HN)					13
				21	HD2)	8	HN)										24	HD2)	11	HD1)					13
				21	HD2)	8	HZ2)										24	HD2)	11	HE3)					13
				21	HG2)	8	HE3)										24	HG2)	11	HN)					13
				21	HG2)	8	HN)																		13
				21	HG2)	7	HN)																		14
20	HB2)	5	HE#)	20	HA)	5	HE#)	5	HA)	20	HB1)	23	HB1)	8	HE#)	23	HA)	8	HD#)	23	HB1)	8	HD#)	15	
				20	HB1)	5	HD#)	19	HA)	4	HB1)	23	HB2)	8	HE#)	23	HA)	8	HE#)	23	HB1)	8	HE#)	15	
				20	HB1)	5	HE#)	19	HB1)	4	HD1#)	23	HG1)	8	HD#)	23	HB1)	8	HD#)	23	HB2)	8	HD#)	15	
				20	HB2)	5	HD#)	20	HB1)	5	HD#)	23	HG1)	8	HE#)	23	HB1)	8	HE#)	23	HB2)	8	HE#)	15	
				20	HB2)	5	HE#)	20	HB1)	5	HE#)	25	HA)	10	HE21)	23	HB2)	8	HD#)	23	HG2)	8	HE#)	15	
				20	HD#)	5	HE#)	20	HB2)	5	HD#)	25	HA)	10	HE22)	23	HB2)	8	HE#)					15	
				20	HG#)	5	HE#)	20	HB2)	5	HE#)	25	HB1)	10	HE22)	23	HG1)	8	HE#)					15	
								20	HD#)	5	HE#)	25	HB2)	10	HE22)	23	HG2)	8	HE#)					15	
								20	HG1)	5	HE#)													15	
								20	HG2)	5	HE#)													15	
21	HD2)	5	HD#)	5	HA)	21	HD2)	5	HA)	21	HD2)	24	HD2)	8	HD#)	8	HA)	24	HD1)	8	HA)	24	HD2)	16	
21	HG#)	5	HD#)	5	HB2)	21	HG1)	5	HA)	21	HG2)						8	HA)	24	HD2)	8	HA)	24	HG2)	16
				21	HB1)	5	HN)	21	HB1)	5	HD#)						8	HA)	24	HG1)	24	HB1)	8	HD#)	16
				21	HB2)	5	HD#)	21	HB2)	5	HD#)						8	HA)	24	HG2)	24	HG1)	8	HD#)	16
				21	HB2)	5	HE#)	21	HD2)	5	HD#)						8	HB#)	24	HD2)	24	HG1)	8	HE#)	16
				21	HD1)	5	HE#)	21	HD2)	5	HE#)						24	HD1)	8	HD#)	24	HG1)	8	HN)	16
				21	HD2)	5	HD#)										24	HD1)	8	HE#)	24	HG2)	8	HD#)	16
				21	HD2)	5	HE#)										24	HD2)	8	HD#)	24	HG2)	8	HE#)	16
				21	HG2)	5	HN)										24	HD2)	8	HE#)	24	HG2)	8	HN)	16
																	24	HG1)	8	HD#)					16
																	24	HG2)	8	HD#)					16
																	24	HG2)	8	HN)					16
				5	HA)	22	HN)	21	HB1)	4	HB2)						8	HD#)	25	HN)	8	HD#)	25	HN)	17
				5	HD#)	22	HN)										8	HE#)	25	HN)	24	HB1)	7	HD2#)	17
				5	HE#)	22	HN)										24	HG2)	7	HB2)	24	HD1)	7	HD2#)	17
				22	HA)	5	HE#)										25	HB1)	8	HE#)	24	HD2)	7	HD2#)	17
																				25	HB#)	8	HD#)	17	
				4	HD2#)	22	HN)																		18
				4	HG)	22	HN)																		18
				2	HG2#)	22	HN)																		20
				1	HB1)	22	HN)																		21
				1	HB2)	22	HN)																		21

XII. Ábrák és táblázatok jegyzéke

1. ÁBRA: AZ EXENDIN-4	10
2. ÁBRA: A Tc5b	10
3. ÁBRA: CÉLKITŰZÉS	18
4. ÁBRA: A H5 SZERKEZETE	30
5. ÁBRA: A H5 9 ELEMŰ SZERKEZETSOKASÁGA	30
6. ÁBRA: A S19 HG HELYZETE A H5-BEN	30
7. ÁBRA: A H5_SS_OX SZERKEZETE	31
8. ÁBRA: A H5_SS_OX 75 ELEMŰ SZERKEZETSOKASÁGA	31
9. ÁBRA: A S19 HG JELEI A H5_SS_OX SPEKTRUMÁBAN	31
10. ÁBRA: A S19 HG HELYZETE A H5_SS_OX-BAN	32
11. ÁBRA: A H5_SS_RED SZERKEZETE	33
12. ÁBRA: A H5_SS_RED 53 ELEMŰ SZERKEZETSOKASÁGA	33
13. ÁBRA: A H5 SZÁRMAZÉKOK 10 ELEMŰ SZERKEZETSOKASÁGAI	33
14. ÁBRA: A H2 SZÁRMAZÉKOK VIZSGÁLATÁNAK CÉLJA	34
15. ÁBRA: A H2 SZERKEZETE	34
16. ÁBRA: A H2 10 ELEMŰ SZERKEZETSOKASÁGA	34
17. ÁBRA: A H2_SS_OX SZERKEZETE	35
18. ÁBRA: A H2_SS_OX 35 ELEMŰ SZERKEZETSOKASÁGA	35
19. ÁBRA: A S16 HG HELYZETE A H2_SS_OX-BAN	35
20. ÁBRA: A S16 HG HELYZETE A H2_SS_OX-BAN	35
21. ÁBRA: A H2_SS_RED SZERKEZETE	36
22. ÁBRA: A H2_SS_RED 36 ELEMŰ SZERKEZETSOKASÁGA	36
23. ÁBRA: A H2 SZÁRMAZÉKOK 10 ELEMŰ SZERKEZETSOKASÁGAI	36
24. ÁBRA: LASSÚ CSERÉT (μ S-MS) MUTATÓ AMINOSAVAK (PIROS) A H5_SS_RED MOLEKULÁBAN	38
25. ÁBRA: A HA ELTOLÓDÁSOK CSD ÉRTÉKEI	43
26. ÁBRA: A V5 ÉS A Y8 CSD _{HA} ÉRTÉKEI	44
27. ÁBRA: A HN ELTOLÓDÁSOK CSD ÉRTÉKEI	44
28. ÁBRA: AZ R6 CSD _{HN} ÉRTÉKEI	45
29. ÁBRA: AZ Y8 CSD _{HN} ÉRTÉKEI	45
30. ÁBRA: AZ N ELTOLÓDÁSOK CSD ÉRTÉKEI	45
31. ÁBRA: A S16 ELTETETETT OH CSOPORTJA A H2_SS_OX SZERKEZETÉBEN	48
32. ÁBRA: A S16 OH CSOPORTJA A H2_SS_RED SZERKEZETÉBEN	48
12. TÁBLÁZAT: A DOSY MÉRÉSEK ALAPJÁN MEGHATÁROZOTT DIFFÚZIÓS ÁLLANDÓK, VALAMINT A MOLEKULÁK MÉRETÉT JELLEMZŐ ÉRTÉKEK	49
33. ÁBRA: A MOLEKULÁK MÉRETÉNEK ÖSSZEVETÉSE	49
34. ÁBRA: ÖSSZEGZÉS	50
35. ÁBRA: AZ INTENZITÁS - ATOM-ATOM TÁVOLSÁG FÜGGVÉNY A Tc5b_S20E ESETÉBEN	61
36. ÁBRA: AZ INTEGRÁL - ATOM-ATOM TÁVOLSÁG FÜGGVÉNY A Tc5b_S20E ESETÉBEN	61
37. ÁBRA: AZ INTENZITÁS - ATOM-ATOM TÁVOLSÁG FÜGGVÉNY A H5_SS_OX ESETÉBEN	61
38. ÁBRA: AZ INTEGRÁL - ATOM-ATOM TÁVOLSÁG FÜGGVÉNY A H5_SS_OX ESETÉBEN	61
39. ÁBRA: A H5_SS_OX SZERKEZETE	62
40. ÁBRA: A H5_SS_RED SZERKEZETE	62
41. ÁBRA: A H5_SS_RED MAGASABB (KÉK) ILLETVE ALACSONYABB (ZÖLD) ENERGIAJÚ ÁTLAGSZERKEZETE	63
42. ÁBRA: A TYR-OLDALLÁNC JELEI [9]	63
43. ÁBRA: AZ <i>IN SITU</i> REDUKCIÓ KÖVETÉSE	64
44. ÁBRA: R_1 RELAXÁCIÓS PARAMÉTEREK	69
45. ÁBRA: HETNOE PARAMÉTEREK	69
46. ÁBRA: $J(\Omega_N)$ ÉRTÉKEK	69
47. ÁBRA: R_2 RELAXÁCIÓS PARAMÉTEREK	69
48. ÁBRA: $J(0)$ ÉRTÉKEK	69
49. ÁBRA: $J(\Omega_H)$ ÉRTÉKEK	69
50. ÁBRA: A TENSOR ÁLTAL ALKALMAZOTT MODELLEK	70
51. ÁBRA: R_{ex} RELAXÁCIÓS PARAMÉTEREK	70
52. ÁBRA: S^2 REND PARAMÉTEREK	70
53. ÁBRA: CHI^2 ÉRTÉKEK	70

54. ÁBRA: S_F^2 PARAMÉTEREK.....	70
55. ÁBRA: T_1 PARAMÉTEREK.....	70
56. ÁBRA: CPMG EFFEKTUS: H5_SS_RED, E3.....	71
57. ÁBRA: CPMG EFFEKTUS: H5_SS_RED, V5	71
58. ÁBRA: CPMG EFFEKTUS: H5_SS_RED, Y8.....	71
59. ÁBRA: CPMG EFFEKTUS: H5_SS_RED, C4	71
60. ÁBRA: CPMG EFFEKTUS: H5_SS_RED, R6	71
61. ÁBRA: CPMG EFFEKTUS: H5_SS_RED, C25	71
62. ÁBRA: A H5 HŐMÉRSÉKLETFÜGGŐ [^{15}N - ^1H]-HSQC SPEKTRUMA	72
63. ÁBRA: A H5_SS_OX HŐMÉRSÉKLETFÜGGŐ [^{15}N - ^1H]-HSQC SPEKTRUMA	73
64. ÁBRA: A H5_SS_RED HŐMÉRSÉKLETFÜGGŐ [^{15}N - ^1H]-HSQC SPEKTRUMA	73
65. ÁBRA: A H2 ÁTLAGSZERKEZETÉNEK RAMACHANDRAN-DIAGRAMJA.....	74
66. ÁBRA: A H2 SZERKEZETSOKASÁGÁNAK RAMACHANDRAN-DIAGRAMJA.....	75
67. ÁBRA: A H2_SS_OX ÁTLAGSZERKEZETÉNEK RAMACHANDRAN-DIAGRAMJA.....	76
68. ÁBRA: A H2_SS_OX SZERKEZETSOKASÁGÁNAK RAMACHANDRAN-DIAGRAMJA	77
69. ÁBRA: A H2_SS_RED ÁTLAGSZERKEZETÉNEK RAMACHANDRAN-DIAGRAMJA	78
70. ÁBRA: A H2_SS_RED SZERKEZETSOKASÁGÁNAK RAMACHANDRAN-DIAGRAMJA.....	79
71. ÁBRA: A H5 ÁTLAGSZERKEZETÉNEK RAMACHANDRAN-DIAGRAMJA.....	80
72. ÁBRA: A H5 SZERKEZETSOKASÁGÁNAK RAMACHANDRAN-DIAGRAMJA.....	81
73. ÁBRA: A H5_SS_OX ÁTLAGSZERKEZETÉNEK RAMACHANDRAN-DIAGRAMJA.....	82
74. ÁBRA: A H5_SS_OX SZERKEZETSOKASÁGÁNAK RAMACHANDRAN-DIAGRAMJA	83
75. ÁBRA: A H5_SS_RED ÁTLAGSZERKEZETÉNEK RAMACHANDRAN-DIAGRAMJA	84
76. ÁBRA: A H5_SS_RED SZERKEZETSOKASÁGÁNAK RAMACHANDRAN-DIAGRAMJA.....	85
1. TÁBLÁZAT: A MÉRÉSEK ÖSSZESÍTÉSE	21
2. TÁBLÁZAT: A TRP-KALITKÁK ÖSSZEHASONLÍTÁSA A CSD_{CAGE} ÉRTÉK ALAPJÁN	41
3. TÁBLÁZAT: A HELICITÁS ÖSSZEHASONLÍTÁSA A $\text{CSD}_{\text{HELIX}}$ ÉRTÉK ALAPJÁN.....	41
4. TÁBLÁZAT: A VIZSGÁLT MOLEKULÁK KALITKA-, ÉS HÉLIX-JELLEGÉNEK ÖSSZEVETÉSE	42
5. TÁBLÁZAT: A G16 HA JELEINEK ELTOLÓDÁS-KÜLÖNBSEGE AZ EGYES SZERKEZETEKBEIN	42
6. TÁBLÁZAT: A Y8 HN ELTOLÓDÁSA AZ EGYES MOLEKULÁKBAN	43
7. TÁBLÁZAT: SÓHIDAK A H2 SZÁRMAZÉKOKBAN	46
8. TÁBLÁZAT: SÓHIDAK A H5 SZÁRMAZÉKOKBAN	46
9. TÁBLÁZAT: A VIZSGÁLT MOLEKULÁK SZERKEZETSOKASÁGAINAK RMSD ÉRTÉKEI.....	47
10. TÁBLÁZAT: NOE KÉNYSZERFELTÉTELEK SZÁMA A VIZSGÁLT MOLEKULÁKBAN.....	47
11. TÁBLÁZAT: A NOE KÉNYSZERFELTÉTELEK KÖNNYEN ÉRTELMEZHETŐ SZÁMADATAI.....	47
13. TÁBLÁZAT: A SZERKEZETEKET JELLEMZŐ ADATOK	51
14. TÁBLÁZAT: A HŐMÉRSÉKLETFÜGGŐ HSQC SZÍNEZÉSE	59
15. TÁBLÁZAT: VIZSGÁLT ADATOK A Tc5b_S20E ESETÉBEN	61
16. TÁBLÁZAT: VIZSGÁLT ADATOK A H5_SS_OX ESETÉBEN.....	61
17. TÁBLÁZAT: AZ <i>IN SITU</i> REDUKCIÓ KÖVETÉSÉRE ALKALMAS JELEK.....	64
18. TÁBLÁZAT: A DISZULFIDHÍD REDUKCIÓJÁT BIZONYÍTÓ ELTOLÓDÁS-VÁLTOZÁSOK	65
19. TÁBLÁZAT: HA ELTOLÓDÁSOK ÉS CSD ÉRTÉKEK.....	66
20. TÁBLÁZAT: HN ELTOLÓDÁSOK ÉS CSD ÉRTÉKEK	67
21. TÁBLÁZAT: N ELTOLÓDÁSOK ÉS CSD ÉRTÉKEK.....	67
22. TÁBLÁZAT: A REDUKCIÓ HATÁSÁRA SZIGNIFIKÁNSAN VÁLTOZÓ ^1H ELTOLÓDÁSOK	68
23. TÁBLÁZAT: A VIZSGÁLT MOLEKULÁK ^1H ÉS ^{15}N ELTOLÓDÁSAI PPM-BEN.....	86
24. TÁBLÁZAT: NOE KÉNYSZERFELTÉTELEK.....	89

XIII. Irodalomjegyzék

- [1] Neidigh, J. W., Fesinmeyer, R. M., Prickett, K. S., Andersen, N. H., *Biochemistry*, vol. 40, pp. 13188-13200, 2001.
- [2] Neidigh, J. W., Fesinmeyer, R. M., Andersen, N. H., *Nat. Struct. Biol.*, vol. 9, pp. 425-430, 2002.
- [3] Huyghues-Despointes, B. M. P., Klinger, T. M., Baldwin, R. L., *Biochemistry*, vol. 34, pp. 13267-13271, 1995.
- [4] Hudáky, P., Stráner, P., Farkas, V., Váradi, Gy., Tóth, G. K., Perczel, A., *Biochemistry*, vol. 47, pp. 1007-1016, 2008.
- [5] Rovó, P., Farkas, V., Hegyi, O., Szolomájer-Csikós, O., Tóth, G. K., Perczel, A., *J. Pept. Sci.*, vol. 17, pp. 610-619, 2011.
- [6] Rovó, P. és mts., előkészületben.
- [7] Farkas, V., Csordás, B., Hegyi, O., Tóth, G. K., Perczel, A., *Eur. J. Org. Chem.*, 2013.
- [8] Perczel András, Laczkó Ilona, Hollósi Miklós, *Peptidek térszerkezet-vizsgálata*, Akadémiai Kiadó, Budapest, 1994.
- [9] Hore, P. J., *Mágneses magrezonancia*, Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest, 2004.
- [10] Gáspári Zoltán, *Kisméretű szerinproteáz-inhibitorok vizsgálata NMR spektroszkópiai és bioinformatikai módszerekkel*, Doktori értekezés, ELTE Szerves Kémiai Tanszék, 2003.
- [11] Láng András, *Komplement kontroll modulok vizsgálata NMR spektroszkópiával*, Doktori Értekezés, ELTE Szerves Kémiai Tanszék, 2010.
- [12] Rovó Petra, *Minifehérjék szerkezetvizsgálata*, Szakdolgozat, ELTE, Szerves Kémiai Tanszék, 2009.
- [13] Volk, J., Herrmann, T., Wüthrich, K., *J. Biomol.NMR*, vol. 41, pp. 127-138, 2008.
- [14] Fiorito, F., Herrmann, T., Damberger, F. F., Wüthrich, K., *J. Biomol. NMR*, vol. 42, pp. 23-33, 2008.
- [15] Herrmann, T., Güntert, P., Wüthrich, K., *J. Biomol. NMR*, vol. 24, pp. 171-189, 2002.
- [16] Herrmann, T., Güntert, P., Wüthrich, K., *J. Mol. Biol.*, vol. 319, pp. 209-227, 2002.
- [17] Herrmann, T., *Encycl. Magn. Res.*, 2010.
- [18] Bundi, A., Wüthrich, K., *Biopolymers*, vol. 18, pp. 285-297, 1979.
- [19] Fesinmeyer, R. M., Hudson, F. M., Andersen, N. H., *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, pp. 7238-7243, 2004.
- [20] Yao, S., Howlett, G. J., Norton, R. S., *J. Biomol. NMR*, vol. 16, pp. 109-119, 2000.
- [21] Horváti, K., Bösze, Sz., Hudecz, F., Medzihradsky-Schweiger, H., *J. Peptide Sci.*, vol. 14, pp. 838-844, 2008.
- [22] Goddard, T. D., Kneller, D. G., SPARKY 3, University of California, San Francisco.
- [23] Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, N., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T., Warren, G. L., *Acta Cryst.*, vol. D54, pp. 905-921, 1998.
- [24] „<https://nmr.cmbi.ru.nl/icing/iCing.html?locale=de#file>,” [Online]. [Hozzáférés dátuma: 2013. 05. 12.].
- [25] Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., Ferrin T. E., *J. Comput. Chem.*, vol. 25, pp. 1605-1612, 2004.
- [26] Kjaergaard, M., Brander, S., Poulsen, F. M., *J. Biomol. NMR*, vol. 49, pp. 139-149, 2011.

- [27] Barua B., Lin J. C., Williams V. D., Kummeler P., Neidigh J. W., Andersen N. H., *Protein Eng. Des. Sel.*, vol. 21, pp. 171-185, 2008.
- [28] Rovó Petra, Doktori értekezés, előkészületben.
- [29] Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., Thornton, J. M., "procheck," *J. Appl. Cryst.*, vol. 26, pp. 283-291, 1993.
- [30] „http://rmni.iqfr.csic.es/HTML-manuals/TENSORV2_DOC/theory.html,” [Online]. [Hozzáférés dátuma: 2013.11.11.].
- [31] Povó, P., Stráner, P., Láng, A., Bartha, I., Huszár, K., Nyitray, L., Perczel, A., *Chem. Eur. J.*, vol. 19, pp. 2628-2640, 2013.
- [32] „<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=112y>,” [Online]. [Hozzáférés dátuma: 2013. 05. 12.].
- [33] Jarymowycz, V. A., Stone, M. J., *Chem.Rev.*, vol. 106, pp. 1624-1671, 2006.
- [34] Tollinger M., Skrinnikov, N. R., Mulder, F. A. A., Forman-Kay, J. D., Kay, L. E., *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 123, pp. 11341-11352, 2001.
- [35] „<http://www.pymol.org/>,” [Online]. [Hozzáférés dátuma: 2013. 05. 12.].
- [36] Wüthrich, K., *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, John Wiley & Sons, 1986.
- [37] Anfinsen, C. B., *Science*, vol. 181, pp. 223-230, 1973.
- [38] Ernst, R. R., Bodenhausen, G., Wokaun, A., *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions*, International Series of Monographs on Chemistry, Oxford Science Press, 1990.
- [39] Dosset, P., Hus, J.-C., Blackledge, M., Marion, D., *J.Biomol.NMR*, vol. 16, pp. 23-28, 2000.

XIV. Szerzői nyilatkozat

Név: Koltai András
ELTE Természettudományi Kar, Vegyész mesterszak

Dolgozat címe: Ciszteinek szerkezetstabilizáló hatásának vizsgálata minifehérjékben

A dolgozat szerzőjeként fegyelmi felelősségem tudatában kijelentem, hogy a dolgozatom önálló munkám eredménye, saját szellemi termékem, abban a hivatkozások és idézések standard szabályait következetesen alkalmaztam, mások által írt részeket a megfelelő idézés nélkül nem használtam fel.

A csoportunkban folyó kutatás komplexitásából eredően munkámhoz szükséges volt a csoport tagjaival, és néhány esetben külső partnerekkel való együttműködés.

Ennek eredményeképp a dolgozatomban szereplő eredmények nem kizárólag az én munkámon alapulnak.

Az általam vizsgált fehérjék előállítását és tisztítását részben *Szabó Mária*, *Stráner Pál* és *Taricska Nóra* végezte csoportunk expressziós laborjában, részben pedig *Tóth Gábor* kutatócsoportja a Szegedi Tudományegyetem Orvosi Vegytani Intézetében. A kiegészítő tömegspektrometriás méréseket *Kapros Anita* végezte. A CD spektroszkópiai mérések elvégzése és értékelése *Farkas Viktor* munkája. Az NMR spektroszkópiai méréseket részben *Láng András*, *Perczel András* és *Rovó Petra* végezték a Kémiai Intézet, illetve a Kar készülékein, részben pedig *Frank Löhr*, a frankfurti Zentrum für Biomolekulare Magnetische Resonanz munkatársa végezte. Az NMR vizsgálatokat kiegészítő MD szimulációk *Karancsiné Menyhárd Dóra* munkái.

Magam végeztem az NMR spektrumok asszignációját és a dolgozatban szereplő valamennyi, NMR spektroszkópián alapuló szerkezet-meghatározást és szerkezeti, valamint dinamikai elemzést. A saját munkámat mutatom be részletesen, de értelemszerűen megemlítek olyan eredményeket is, melyek mások munkáját dicsérik.

1. Az általam vizsgált négy minifehérje (H2_SS_ox, H2_SS_red, H5_SS_ox, H5_SS_red) homonukleáris 2D NMR spektrumainak teljes asszignációját elvégeztem, és ennek alapján meghatároztam a molekulák térszerkezetét, valamint szerkezeti adatait.
2. Az irodalomban más hőmérsékleten szereplő H2 és H5 méréseit 288 K-en megismételttem, illetve elvégeztem a CEC variánsok és a H2_A1C méréseit. Ezen molekulák esetében az NMR mintát magam készítettem elő, és a méréseket is magam végeztem, *Rovó Petra* segítségével.
3. Az általam meghatározott szerkezeteket és szerkezeti adatokat, valamint a H2 és a H5 szerkezeteit és szerkezeti adatait (ezeket kutatócsoportunkban korábban *Rovó Petra* határozta meg [Rovó és mts., előkészületben]) felhasználva elkészítettem a hat molekula összehasonlító szerkezeti elemzését.
4. A H5, H5_SS_ox és a H5_SS_red heteronukleáris 2D és 3D spektrumainak asszignációját elvégeztem, és ennek alapján elkészítettem a három molekula dinamikai elemzését és összevetését.
5. Valamennyi, a dolgozatomban szereplő DOSY mérést elvégeztem, feldolgoztam, és a kapott eredményeket értékeltem.

Budapest, 2014. április 30.

.....

Koltai András