

——— Tudományos Diákköri Dolgozat ———
——— XXXII. OTDK Biológia Szekció ———

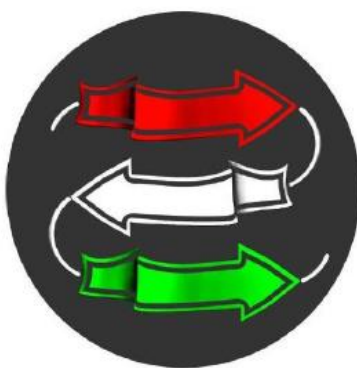
KOLTAI ANDRÁS

Vegyész mesterszakos hallgató

**Diszulfidhíd-stabilizált Trp-kalitka
minifehérjék vizsgálata
NMR spektroszkópiával**

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.....	5
II. Rövidítések jegyzéke	6
III. Bevezetés	7
IV. Irodalmi előzmények	8
1. Minifehérjék és a fehérjetervezés.....	8
2. Az Exendin-4 és a Trp-kalitka	9
V. Elméleti háttér.....	10
1. Fehérjék térszerkezet-vizsgálata	10
2. Fehérjék vizsgálata NMR spektroszkópiával	11
3. NMR spektrumok asszignációja.....	12
4. Fehérjék térszerkezetének vizsgálata NMR mérések alapján	13
5. Térszerkezet-számolás NMR mérések alapján	13
6. Dinamikai mérések.....	14
7. Makromolekulák méretének vizsgálata NMR spektroszkópiával.....	15
VI. Célkitűzés.....	15
VII. Alkalmazott módszerek	16
1. Vizsgált molekulák és NMR mérések	16
2. Tömegspektrometriás mérések.....	18
3. A spektrumok feldolgozása	18
4. A szerkezeti adatok elemzése.....	19
a) Másodlagos kémiai eltolódások összevetése	19
b) Másodlagos kémiai eltolódásokból meghatározott paraméterek	20
c) Szerkezetek elemzése iCING szoftvercsomag segítségével	22
d) NOE kényszerfeltételek összevetése.....	23
e) Oxidált és redukált szerkezetek összevetése	24
5. Dinamikai mérések feldolgozása	24
6. DOSY mérések feldolgozása	24
VIII. Eredmények	25
1. Előzetes célkitűzés	25
a) A H5 szerkezete	25
b) A H5_SS_ox szerkezetének vizsgálata	26
c) A H5_SS_red szerkezetének vizsgálata	27
2. Részeredmények.....	27
3. Célkitűzés bővítése: H2 származékok vizsgálata	28

a) A H2 szerkezete	29
b) A H2_SS_ox szerkezetének vizsgálata	29
c) A H2_SS_red szerkezetének vizsgálata	29
4. A H2 származékok vizsgálatának tapasztalatai	30
5. A redukált ciszteinek hatásának vizsgálata	30
a) A H2_A1C vizsgálata	31
6. A H5 származékok dinamikájának vizsgálata	31
7. A vizsgált molekulák összehasonlító elemzése	32
a) Előzetes várakozások	32
b) Szerkezetek „vizuális elemzése”	32
c) A Trp-kalitka és az α -hélix jellemzése	33
d) Tendenciák a CSD értékekben	34
e) Sóhidak	36
f) RMSD értékek	36
g) NOE kényszerfeltételek	37
h) Ser OH – látszik vagy nem látszik?	38
8. A molekulaméret-vizsgálatok eredményei	39
IX. Összegzés	40
X. Irodalomjegyzék	42
XI. Szerzői nyilatkozat	44

I. Összefoglaló

Diszulfidhíd-stabilizált Trp-kalitka minifehérjék vizsgálata NMR spektroszkópiával

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 mozgékonyság 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.

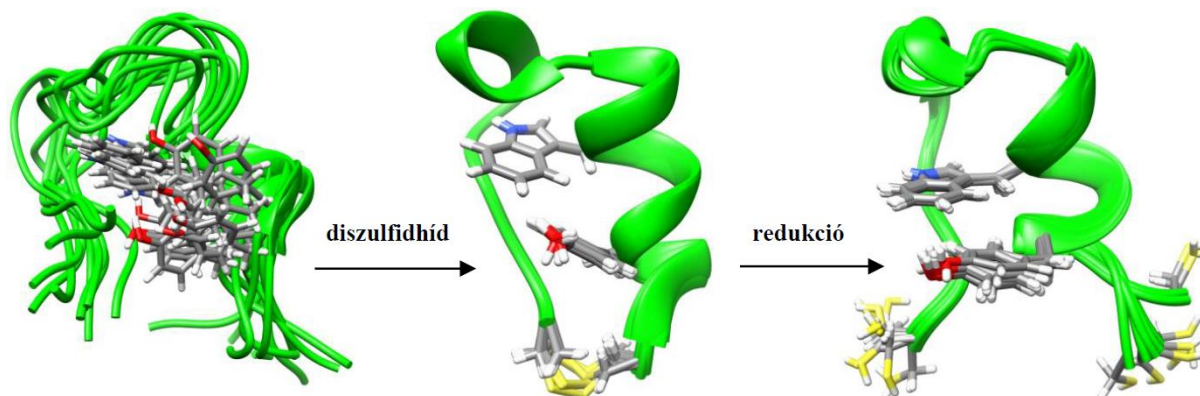
A vizsgált minifehérjék:

H2	AV	RLYIQ	WLKEG	GPSSG	RPPPS
H2_SS	CV	RLYIQ	WLKEG	GPSSG	RPP P C
H5	EEEAV	RLYIQ	WLKEG	GPSSG	RPPPS
H5_SS	EEE CV	RLYIQ	WLKEG	GPSSG	RPP P C

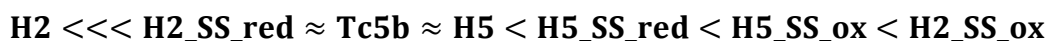
A H5 szerkezetének stabilizálása céljából, a konformáció megtartásával diszulfidhíd került beépítésre, ami várakozásunknak megfelelően stabilizálta a szerkezetet. Meglepő módon a diszulfidhíd redukciójával nem kaptuk vissza az eredeti H5 szerkezetét, hanem annál valamivel stabilabb molekulához jutottunk.

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 várakozásunk nem teljesült, ugyanis annál lényegesen stabilabb, kompaktabb molekulához jutottunk.



A szerkezetek elemzése során megállapítottam, hogy a Trp-kalitka-jelleg és a szerkezet rendezettsége, kompaktága 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 specifitást 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 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.

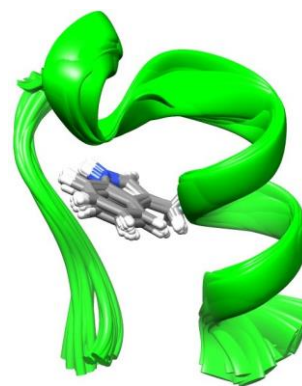
Ezeket a származékokat nevezzük Trp-kalitka minifehérjéknek.

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**EG** GPSSG RPPPS.



1. ábra: Az Exendin-4



2. ábra: A Tc5b

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 mini-fehérjék neve H1, H2, H3 ... H19 aszerint, hogy a Tc6b szekvenciájánál hány aminosavval hosszabb az adott molekula. [6]

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. [7]

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. [8] 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. [9] [10] [11]

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 jelentkezik, egymással nagymértékben átfednek, és így a jelhozzárendelés (asszignáció) lehetetlen. A fehérjék NMR spektroszkópiai 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 – $[^1\text{H}-^1\text{H}]$ -COSY, $[^1\text{H}-^1\text{H}]$ -TOCSY és $[^1\text{H}-^1\text{H}]$ -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 TOCSY- ^{15}N - ^1H -HSQC és NOESY- ^{15}N - ^1H -HSQC spektrumokat veszünk fel. A másik eset az, ha dinamikai vizsgálatokat szeretnénk végezni, akkor ^{15}N - ^1H -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.

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. [12] [13] [14] [15] [16]

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. [17] [18]

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 szén 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

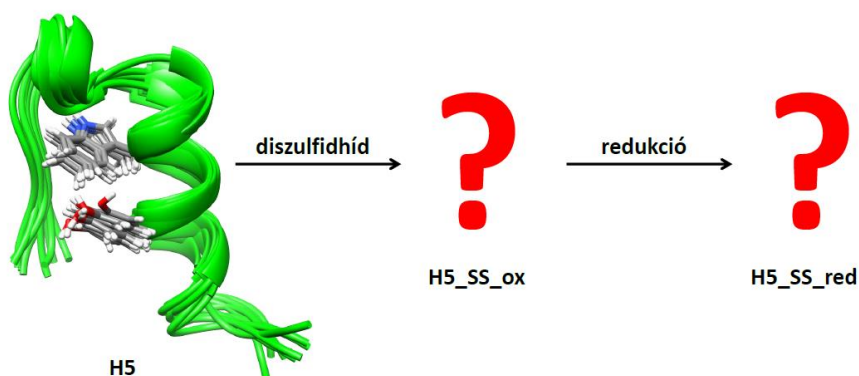
Makromolekulák méretének szakszerű vizsgálata alapvetően a kolloidika tárgya, lehetőségünk van azonban speciális NMR mérésekkel is képet alkotni az oldott molekulák hidrodinamikai sugaráról. Fontosnak tartom hangsúlyozni, hogy az NMR spektroszkópia igen korlátozottan alkalmazható, magam is számos elvi 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.

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.

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. 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. 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 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 Tc6b-alapú molekulák, 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 WLK DG GPSSG RPP PC
H2_SS (CEC)	CV RLYIQ WLKEG GPSSG RPP PC
H2_A1C	CV RLYIQ WLKEG GPSSG RPPPS
H5	EEEAV RLYIQ WLKEG GPSSG RPPPS
H5_SS (CDC)	EEE CV RLYIQ WLK DG GPSSG RPP PC
H5_SS (CEC)	EEE CV RLYIQ WLKEG GPSSG RPP PC
H5_A4C	EEE CV RLYIQ WLKEG GPSSG RPPPS
H5_S25C	EEEAV RLYIQ WLKEG GPSSG RPP PC

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 [¹⁵N-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

	¹ H- ¹ H (COSY, TOCSY, NOESY)	¹³ C HSQC	¹⁵ N HSQC	3D (TOCSY - ¹⁵ N HSQC, NOESY - ¹⁵ N HSQC)	dinamika (T ₁ , T ₂ , hetero)	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.

2. 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, másrészt 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 [19], és így már egyértelműen igazolható volt a tömegspektrum alapján a mintában a szabad SH-csoportok jelenléte, tehát a nemkívánatos diszulfidhidak képződését kizárhattuk.

3. 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 molekulakéval 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 [20] 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 [21], a szerkezeteimet pedig iCING szerkezetelemző-validáló szoftvercsomaggal [22] ellenőriztem. A kész szerkezetekről UCSF Chimera 1.7 segítségével [23] készítettem képeket.

4. 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 vettem össze (VIII.7. 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 [17], majd *Fesinmeyer és mts.* által módosított [18] random coil eltolódásokat, ^{15}N magok esetén pedig *Kjaergaard és mts.* adatait [24] 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 „jószágának”, tehát a molekula rendezettségének, stabilitásának jellemzésére szoktak megadni. Ezen paraméterek egy része irodalmi eredetű [25], de a csoportunkban zajló Trp-kalitka vizsgálatok során ezek kis mértékben módosultak, illetve újak kerültek bevezetésre *Rovó Petra* munkája nyomán. [11]

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 jelleget, 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 $X_f(cage)$ 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 [26]. 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 $X_f(helix)$ értéket is, amely mindazon eltolódásokat figyelembe veszi, mint a CSD_{helix} érték, de könnyebben összevethetővé teszi az adatokat.

Az $X_f(cage)$ és az $X_f(helix)$ 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 jelentése: nagyobb a feltekeredett populáció aránya.

Ezekén 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. [25]

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.7. fejezet, c) pont).

c) Szerkezetek elemzése iCING szoftvercsomag segítségével

Az iCING szoftvercsomag egy olyan, kifejezetten NMR spektroszkópai fehérjeszerkezetek elemzésre kifejlesztett felület, mely egy webszerveren számos ismert és széles körben alkalmazott szoftverrel vizsgálja a feltöltött szerkezetet. [22]

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 [27], 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.

A Ramachandran-grafikonokon 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.7. fejezet, a) 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.7. 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 azért több szempontból is szükséges árnyalni, és mivel ezt nem tudtam egzakt módon megoldani, az a véleményem, hogy az általam közölt szám adatok 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 függ az aminosavak számától, viszont nem lehet a kapott adatokat egyszerűen az aminosavak számával osztva normálni, hiszen a szekvencia hosszának növelésével 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 megszámláltam 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.

A szerkezet-meghatározás szempontjából jelentéktelen, vagy kevésbé 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.7. 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 jelentős különbség van az oxidált és a redukált szerkezetek között. Ebből jól látható volt, hogy a diszulfidhíd redukciója nem kizárólag a C-ek környezetében okoz változásokat, hanem a molekula egész szerkezetére hatással van.

5. 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 [28] segítségével Lipari-Szabó-féle analízist végeztem.

Mindhárom molekulára végeztünk CPMG méréseket, de ezek kvantitatív értékelésére még nem került sor.

Vizsgáltuk a molekulák [^{15}N - ^1H] HSQC spektrumainak hőmérsékletfüggését is (mivel a közelmúltban csoportunkban érdekes vizsgálatokat folytattak ennek értelmezésére vonatkozóan [29]), a kvantitatív értékelésre azonban még itt sem került sor.

6. 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 [30], 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.

VIII. Eredmények

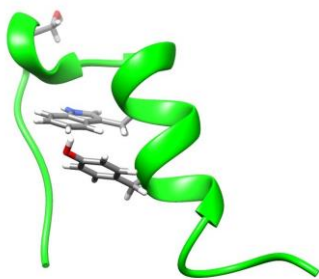
1. Előzetes célkitűzés

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.

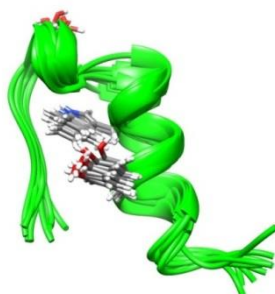
Arra számítottunk, hogy a diszulfidhíd beépítésével nagymértékben stabilizálódik a szerkezet - hiszen összekötjük a láncvégeket, megakadályozva ezzel a letekeredést - a redukcióval pedig szerkezeti szempontból visszkapjuk az eredeti, ciszteint nem tartalmazó molekulát.

a) A H5 szerkezete

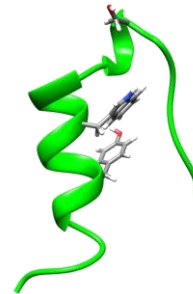
A szerkezet viszonylag jól definiált, de már a szerkezetsokaságot ábrázoló képen is jól látszik, hogy az egyes szerkezetek között van számottevő eltérés. A gerinc RMSD-je 0,78 Å, a teljes RMSD pedig 1,40 Å. A szerkezet a H5_SS molekulakéval összehasonlítva egyértelműen sokkal lazább. Ezt bizonyítja a 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

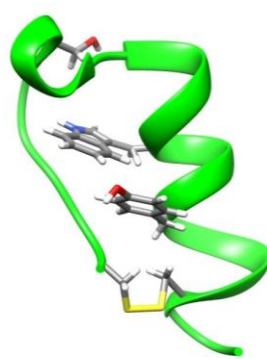


6. ábra: A S19 HG helyzete a H5-ben

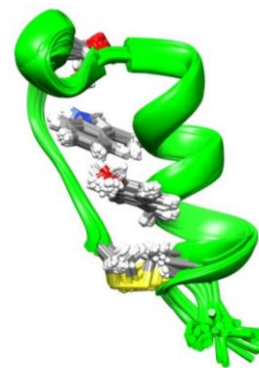
b) A H5_SS_ox szerkezetének vizsgálata

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

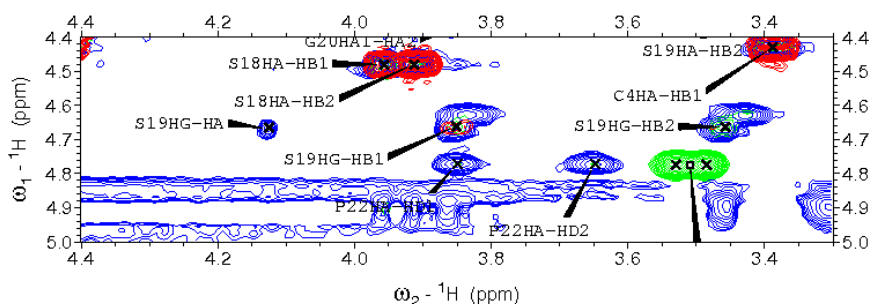


8. ábra: A H5_SS_ox 75 elemű szerkezetsokasága

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 ilyen még nem találtam, úgy tűnik, hogy minden eddiginél nagyobb hidrofóbicitású magot, tehát minden eddiginél nagyobb stabilitású Trp-kalitkát sikerült előállítani.

c) A H5_SS_red szerkezetének vizsgálata

A H5_SS_red 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 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. 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.

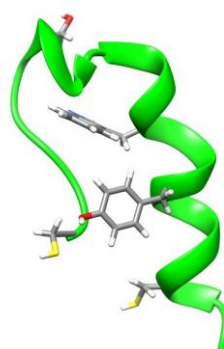
2. Részeredmények

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.

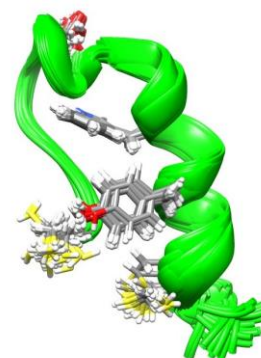
Ez egy közvetett, de igen egyértelmű bizonyítéka a diszulfidhíd szerkezetstabilizáló hatásának.



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

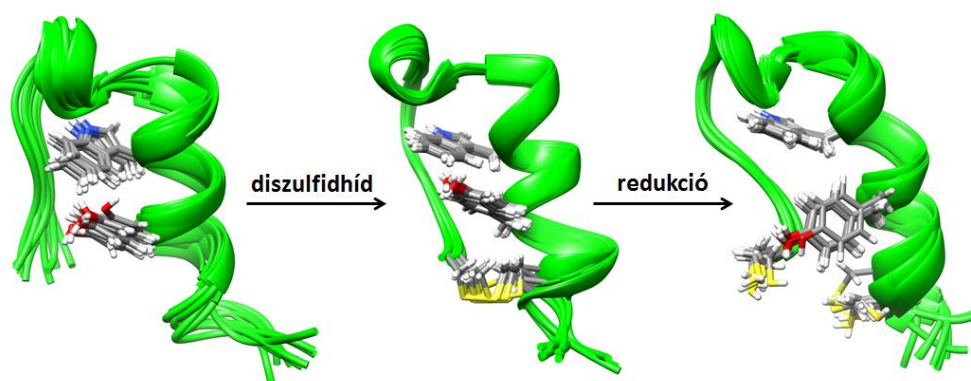


11. ábra: A H5_SS_red szerkezete



12. ábra: A H5_SS_red 53 elemű szerkezetsokasága

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.



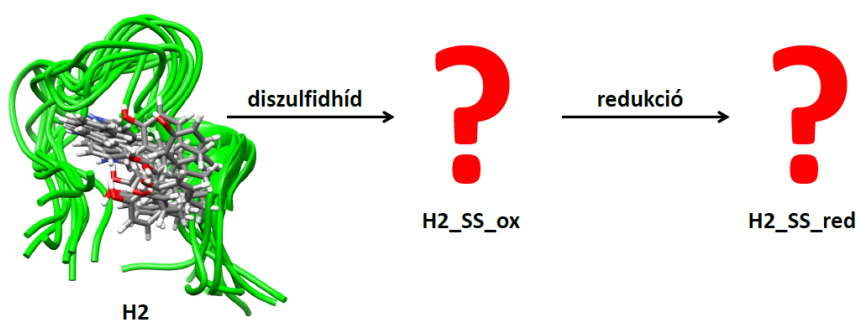
13. ábra: A H5 származékok 10 elemű szerkezetsokaságai

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.

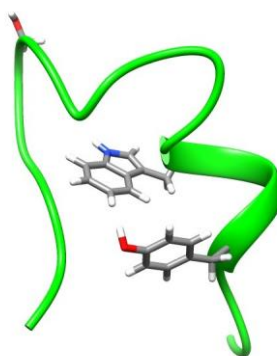
Kérdésünk ismételten az volt, hogy a diszulfidhíd beépítése és redukciója milyen hatással lesz a szerkezetre és stabilitásra



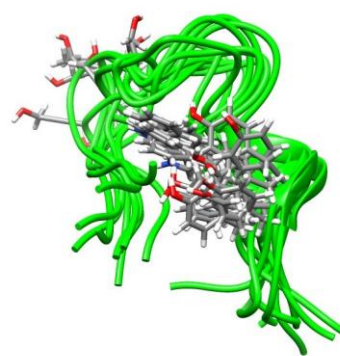
14. ábra: A H2 származékok vizsgálatának célja

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.



15. ábra: A H2 szerkezete



16. ábra: A H2 10 elemű szerkezetsokasága

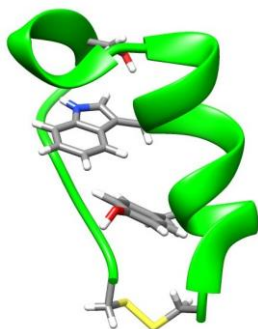
A molekula erősen destabilizált, ez a csupán 10 elemű szerkezetsokaságot ábrázoló képen is jól látszik. A gerinc RMSD-je 1,73 Å, a teljes RMSD pedig 2,31 Å.

b) A H2_SS_ox szerkezetének vizsgálata

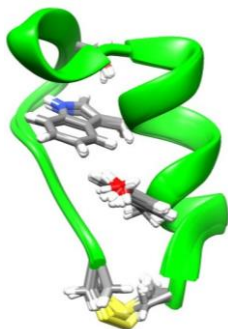
A H2_SS_ox szerkezetét homonukleáris spektrumok alapján határoztam meg.

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.



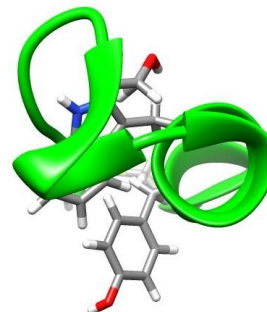
17. ábra: A H2_SS_ox szerkezete



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.

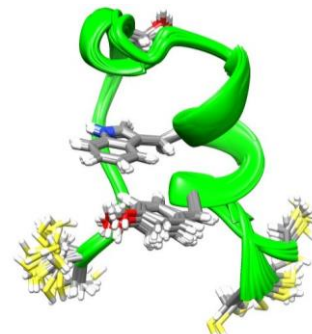
c) A H2_SS_red szerkezetének vizsgálata

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.



21. ábra: A H2_SS_red szerkezete

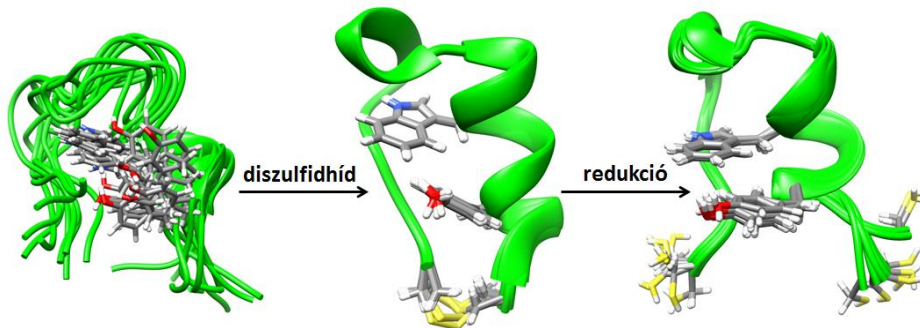


22. ábra: A H2_SS_red 36 elemű szerkezetsokasága

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 eddignél nagyobb stabilitású Trp-kalitrkához 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 részeredményekről beszámolni.

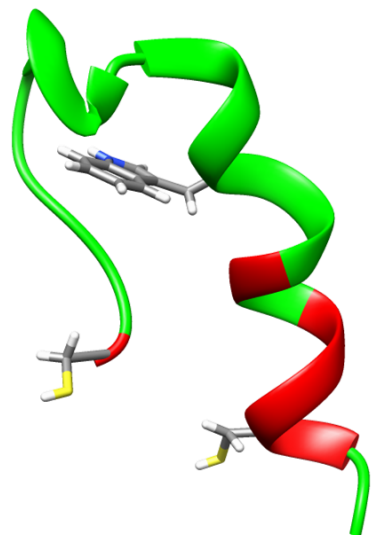
a) A H2_A1C vizsgálata

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, 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 mozgékonyág megszűnik a diszulfidhíd beépítésével, de már a redukált ciszteinek is nagymértékben csökkentik.



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

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).

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 feltételezhettünk, 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. [31]

a) Előzetes várákozások

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 kissé destabilizált az oxidált molekulához 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, mely a Trp-kalitka-jellegről ad információt, valamint a CSD_{helix} értékeket (2. táblázat), mely a helicitást jellemző szám. Minél nagyobbak ezek az értékek, annál stabilabb a Trp-kalitka, illetve a hélix.

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

		Chemical Shift Deviations									CSD _{cage}	Chemical Shift Deviations				CSD _{helix}
	Szekvencia	12α	16α2	17β1	21α	23α	23β2	24δ1	24δ2	11ε1		8α	10α	11α	13α	
Random coil referencia		4.385	3.972	2.295	4.396	4.471	1.981	3.653	3.653	10.220		4.604	4.373	4.702	4.358	
Tc5b	NLYIQWLKDGGPSSGRPPPS	-0.929	-3.033	-0.223	0.632	-1.840	-1.540	-0.482	-0.667	-0.484	9.83	-0.457	-0.456	-0.429	-0.429	1.771
H2	AVRLYIQWLKEGGPSSGRPPPS	-0.561		0.093	0.368	-0.507	-1.303	-0.160	-0.344	-0.254		-0.269	-0.255	-0.278	-0.283	1.085
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	-0.657	-0.456	-0.460	-0.423	1.996
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	-0.476	-0.440	-0.425	-0.419	1.760
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	-0.634	-0.322	-0.506	-0.377	1.839
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	-0.456	-0.323	-0.459	-0.362	1.600
H2_A1C	CVRLYIQWLKEGGPSSGRPPPS	-0.921	-2.679	0.194	0.535	-2.156	-1.342	-0.466	-0.640	-0.524	9.46	-0.448	-0.319	-0.450	-0.356	1.573
H5	EEEAVRLYIEWLKEGGPSSGRPPPS	-1.041	-3.123	0.220	0.578	-1.972	-1.597	-0.541	-0.698	-0.561	10.33	-0.478	-0.326	-0.508	-0.403	1.715
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	-0.611	-0.461	-0.463	-0.431	1.966
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	-0.541	-0.470	-0.464	-0.449	1.924
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	-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 $X_f(cage)$ 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-kalitkát. Az $X_f(helix)$ érték hasonló módon jellemzi a helicitást. (3. táblázat)

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

	Szekvencia	$X_f(cage)$	$X_f(helix)$
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 $H\alpha$ -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.

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

4. 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	

5. 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	

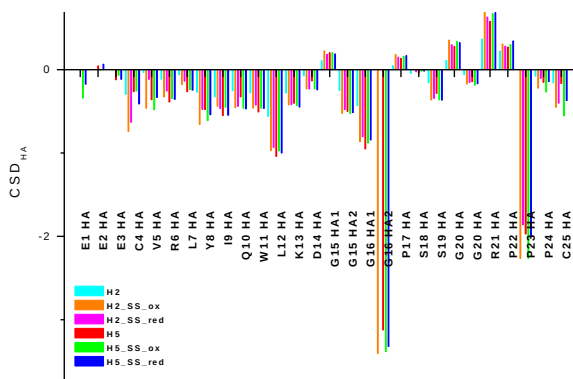
Ennek oka még nem teljesen tisztázott. Feltételeztem, hogy a hélix elejének az oxidált szerkezetekben megfigyelhető torzulásával hozható összefüggésbe. Ezt a feltételezést támasztja alá, hogy a H2 származékokban kisebb az eltolódás-különbség, mint a H5 származékokban. Szemre egyértelműen utóbbiban torzul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

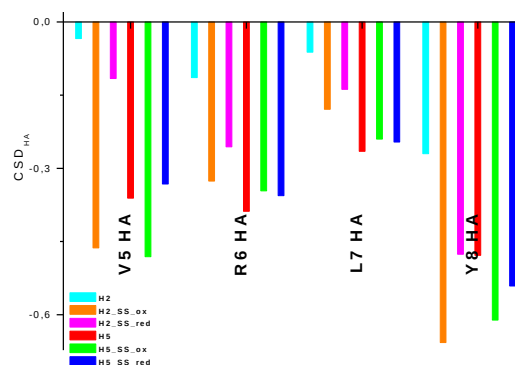
d) Tendenciák a CSD értékekben

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

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



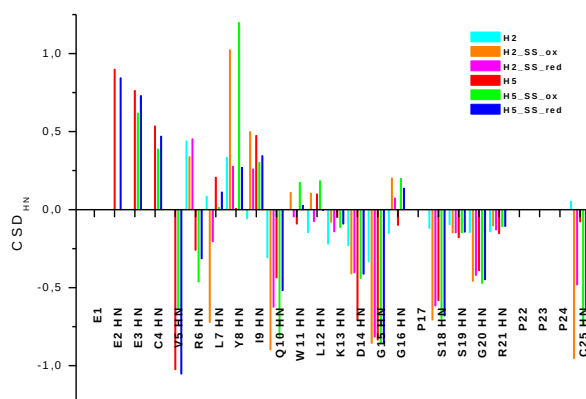
25. ábra: A HA eltolódások CSD értékei



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

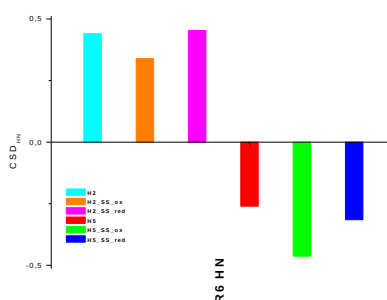
A 25. ábra szemléletesen mutatja a G16 H α 1 és H α 2 eltolódások közötti különbséget, melynek okát fentebb részleteztem. A másodlagos kémiai eltolódásokban jól megfigyelhető, hogy

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 lát-szik, hogy az oxidált szerkezetekben mind-két 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).

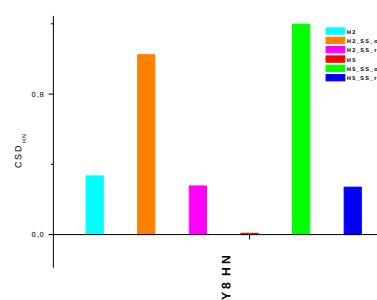


27. ábra: A HN eltolódások CSD értékei

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

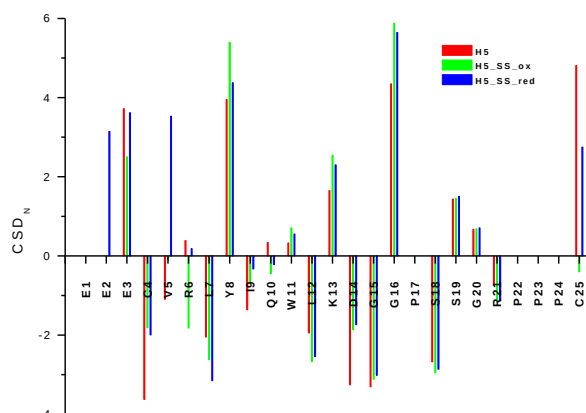


29. ábra: Az Y8 CSD_{HN} értékei

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. 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.



30. ábra: Az N eltolódások CSD értékei

e) Sóhidak

Az iCING szoftvercsomag [22] 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.

6. 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 %	

7. 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 megfigyelhetőek, 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.

8. táblázat: A vizsgált molekulák szerkezetsokaságainak RMSD értékei

	Szekvencia	RMSD (gerinc)	RMSD (teljes)	Szerkezetsokaság elemeinek száma
H2	AVRLYI QWLKEGGPSSGRPPPS	1.73	2.31	10
H2_SS_ox	CVRLYI QWLKGGPSSGRPPPC	0.11	0.44	35
H2_SS_red	CVRLYI QWLKGGPSSGRPPPC	0.50	0.91	36
H5	EEEAVRLYI EWLKEGGPSSGRPPPS	0.78	1.40	9
H5_SS_ox	EEECVRLYI QWLKGGPSSGRPPPC	0.56	1.24	75
H5_SS_red	EEECVRLYI QWLKGGPSSGRPPPC	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.

9. 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 9. 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 egzaktaknak a vizsgált molekulák aminosavszámának különbsége miatt, a megállapításaimmal jól korreláló számokkal alátámasztottam a szerkezetek elemzése során tett megállapításaimat.

A 9. táblázat könnyen értelmezhető, szemléletes adatait külön feltüntettem a 10. táblázatban.

A 10. 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.

10. táblázat: A NOE kényszerfeltételek könnyen értelmezhető számadatai

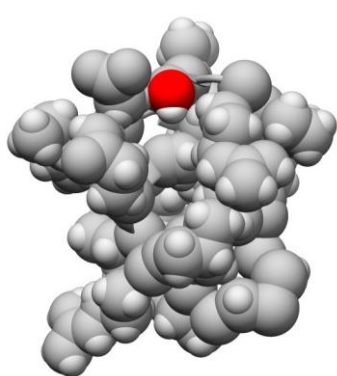
	i+3	Σ (kivéve i+0)
Tc5b	18	126
H2	4	67
H2_SS_ox	64	397
H2_SS_red	32	236
H5	29	208
H5_SS_ox	53	335
H5_SS_red	59	316

h) Ser OH – látszik vagy nem látszik?

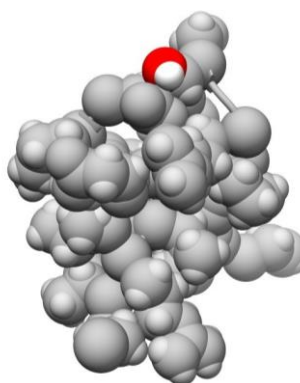
A disszociálisan protonok protikus oldószerekben általában nem adnak jelet, ugyanis az oldószer protonjaival folyamatos cserereakcióban vesznek részt. Ennek megfelelően fehérjékben, közel semleges pH-n nem látszanak sem COOH, sem OH hidrogének.

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.

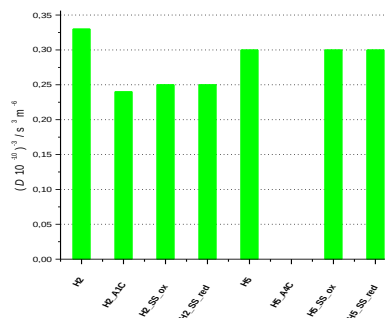
Ez a jelenség indirekt bizonyítéka annak, hogy a vizsgált molekulák közül a H2_SS_ox és a H5_SS_ox/red molekulák a legstabilabbak, hiszen ezekben alakult ki olyan stabilitású hidrofób mag, amely még a kérdéses Ser OH csoportját is képes eltemetni, és megakadályozni az oldószer hozzáférését.

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 (11. táblázat és 33. ábra).

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

	$D 10^{-10} / \text{m}^2 \text{s}^{-1}$	$(D 10^{-10})^{-3} / \text{s}^3 \text{m}^{-6}$
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 méréseket 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.6. fejezet).

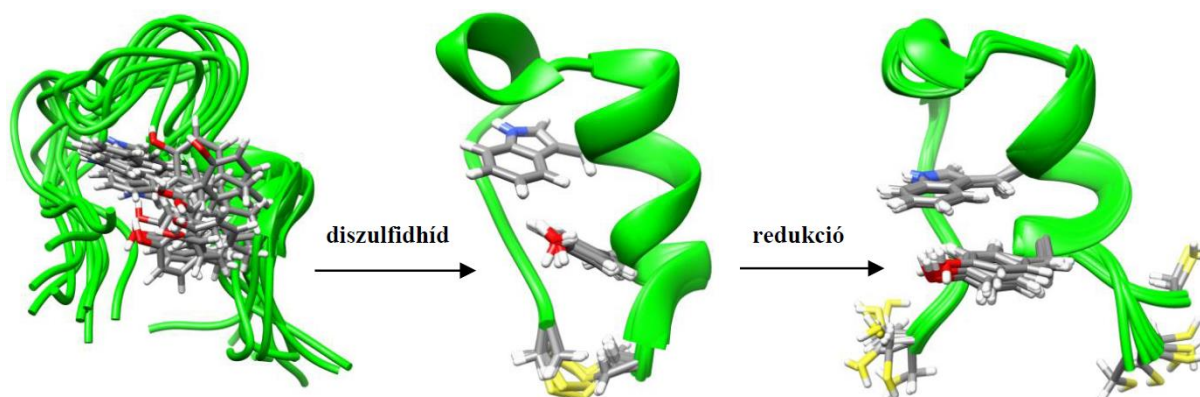
IX. Összegzés

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 várakozásunknak 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 várakozásunk 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 12. 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.

12. 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 12. 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. 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] Perczel András, Laczkó Ilona, Hollósi Miklós, *Peptidek térszerkezet-vizsgálata*, Akadémiai Kiadó, Budapest, 1994.
- [8] Hore, P. J., *Mágneses magrezonancia*, Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest, 2004.
- [9] Gáspári Zoltán, *Kisméretű szerinproteáz-inhibitorok vizsgálata NMR spektroszkópiai és bioinformatikai módszerekkel*, Doktori értekezés, ELTE Szerves Kémiai Tanszék, 2003.
- [10] Láng András, *Komplement kontroll modulok vizsgálata NMR spektroszkópiával*, Doktori Értekezés, ELTE Szerves Kémiai Tanszék, 2010.
- [11] Rovó Petra, *Minifehérjék szerkezetvizsgálata*, Szakdolgozat, ELTE, Szerves Kémiai Tanszék, 2009.
- [12] Volk, J., Herrmann, T., Wüthrich, K., *J. Biomol.NMR*, vol. 41, pp. 127-138, 2008.
- [13] Fiorito, F., Herrmann, T., Damberger, F. F., Wüthrich, K., *J. Biomol. NMR*, vol. 42, pp. 23-33, 2008.
- [14] Herrmann, T., Güntert, P., Wüthrich, K., *J. Biomol. NMR*, vol. 24, pp. 171-189, 2002.
- [15] Herrmann, T., Güntert, P., Wüthrich, K., *J. Mol. Biol.*, vol. 319, pp. 209-227, 2002.
- [16] Herrmann, T., *Encycl. Magn. Res.*, 2010.
- [17] Bundi, A., Wüthrich, K., *Biopolymers*, vol. 18, pp. 285-297, 1979.
- [18] Fesinmeyer, R. M., Hudson, F. M., Andersen, N. H., *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, pp. 7238-7243, 2004.
- [19] Horváti, K., Bösze, Sz., Hudecz, F., Medzihradszky-Schweiger, H., *J. Peptide Sci.*, vol. 14, pp. 838-844, 2008.
- [20] Goddard, T. D., Kneller, D. G., SPARKY 3, University of California, San Francisco.
- [21] 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.
- [22] „<https://nmr.cmbi.ru.nl/icing/iCing.html?locale=de#file>,” [Online]. [Hozzáférés dátuma: 2013. 05. 12.].
- [23] 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.
- [24] Kjaergaard, M., Brander, S., Poulsen, F. M., *J. Biomol. NMR*, vol. 49, pp. 139-149, 2011.
- [25] 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.

- [26] Rovó Petra, Doktori értekezés, előkészületben.
- [27] Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., Thornton, J. M., "procheck," *J. Appl. Cryst.*, vol. 26, pp. 283-291, 1993.
- [28] „http://rmni.iqfr.csic.es/HTML-manuals/TENSORV2_DOC/theory.html,” [Online]. [Hozzáférés dátuma: 2013.11.11.].
- [29] Povó, P., Stráner, P., Láng, A., Bartha, I., Huszár, K., Nyitray, L., Perczel, A., *Chem. Eur. J.*, vol. 19, pp. 2628-2640, 2013.
- [30] Yao, S., Howlett, G. J., Norton, R. S., *J. Biomol. NMR*, vol. 16, pp. 109-119, 2000.
- [31] „<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1l2y>,” [Online]. [Hozzáférés dátuma: 2013. 05. 12.].
- [32] Wüthrich, K., *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, John Wiley & Sons, 1986.
- [33] „<http://www.pymol.org/>,” [Online]. [Hozzáférés dátuma: 2013. 05. 12.].
- [34] Farkas, V., Csordás, B., Hegyi, O., Tóth, G. K., Perczel, A., *Eur. J. Org. Chem.*, 2013.
- [35] Anfinsen, C. B., *Science*, vol. 181, pp. 223-230, 1973.
- [36] 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.
- [37] Dosset, P., Hus, J.-C., Blackledge, M., Marion, D., *J. Biomol. NMR*, vol. 16, pp. 23-28, 2000.
- [38] 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.
- [39] Jarymowycz, V. A., Stone, M. J., *Chem. Rev.*, vol. 106, pp. 1624-1671, 2006.

XI. Szerzői nyilatkozat

Név: Koltai András
ELTE Természettudományi Kar, Vegyész mesterszak

Dolgozat címe: Diszulfidhíd-stabilizált Trp-kalitka minifehérjék vizsgálata
NMR spektroszkópiával

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 ké-szülékein, 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