

# Globuláris és rendezetlen fehérjék, fehérjemembránmimetikum kölcsönhatások szerkezeti és dinamikai jellemzése NMR spektroszkópiával

Doktori értekezés

**Dr. Sebák Fanni**

Semmelweis Egyetem  
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Bodor Andrea, Ph.D. Habil, egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Ambrus Attila, Ph.D., egyetemi docens  
Dr. Tőke Orsolya, Ph.D., laborvezető

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Antal István, Ph.D., egyetemi tanár

Tagok: Dr. Szigeti Krisztián, Ph.D., laborvezető

Dr. Kiss Éva, DSc., egyetemi tanár

Budapest  
2021

## Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke .....	4
1. Bevezetés .....	7
1.1. Rendezetlen fehérjék.....	8
1.1.1. Rendezetlen fehérjék szerkezetvizsgáló módszerei .....	10
1.1.2. Prolin <i>cisz-transz</i> izoméria vizsgálata .....	12
1.1.3. A p53 fehérje.....	14
1.2. Sejtpenetráló peptidek.....	16
1.2.1. Az ERD14 dehidrin fehérje.....	18
1.2.2. Az S100A4 fehérje .....	19
1.3. Membránmimetikumok .....	19
1.4. Szerin proteáz inhibitorok.....	21
2. Célkitűzések .....	24
3. Módszerek .....	26
3.1. Fehérjeexpresszió és mintaelőkészítés.....	26
3.1.1 p53 TAD <sup>1-60</sup> előállítása és foszforilációja .....	26
3.1.2. Lizin gazdag peptidek előállítása .....	27
3.1.3. Szerin proteáz inhibitorok előállítása.....	28
3.1.4. Membránmimetikumok előállítása.....	29
3.2. NMR mérések .....	30
3.3. Jelhozórendelés menete 3D spektrumokban .....	32
3.4 Fluorimetriás mérések.....	34
3.5. <i>In vitro</i> sejtpenetrációs mérések .....	34
4. Eredmények .....	36
4.1 p53TAD <sup>1-60</sup> NMR spektroszkópiai vizsgálata .....	36
4.1.1. Minor konformerek detektálása a p53TAD <sup>1-60</sup> fehérjében.....	36
4.2. Prolin izomerek azonosítása IDP-ben.....	38
4.2.1 Prolin szelektív pulzusszekvenciák.....	38
4.2.2 Prolin izomerek azonosítása a p53TAD <sup>1-60</sup> esetén .....	41
4.2.3. A p53 TAD fő komponensének és a minor konformerek szerkezeti jellemzése .....	44
4.2.4. Foszforiláció hatása a prolin <i>cisz-transz</i> egyensúlyra .....	45

4.2.5. Minoradatbázis .....	48
4.3. Lizin-gazdag peptidek.....	56
4.3.1. Lizin-gazdag peptidek és modellmembránok kölcsönhatásának jellemzése oldatfázisú NMR mérésekkel .....	56
4.3.2. Karbonsav-lakton átalakulás vizsgálata fluorimetriával és NMR spektroszkópiával .....	61
4.3.3. ERD és S100 peptidek sejtbejutásának vizsgálata áramlási citometriával ...	64
4.3.4. ERD és S100 peptidek intracelluláris lokalizációja .....	68
4.3.5. ERD és S100 peptidek sejtbejutási mechanizmusának vizsgálata .....	69
4.3.6. Peptidek és Cf-jelölt peptidek szerkezeti vizsgálata .....	70
4.4. Szerin proteáz inhibitorok vizsgálata.....	75
4.4.1. Konszenzus hurokszekvencia meghatározása .....	75
4.4.2. Szerin proteáz inhibitorok szerkezetvizsgálata .....	77
4.4.3. SPINK1 vázas variánsok dinamikai jellemzése .....	80
5. Megbeszélés .....	84
6. Következtetések.....	90
7. Összefoglalás .....	92
8. Summary.....	93
9. Irodalomjegyzék .....	94
10. Saját publikációk .....	109
11. Köszönetnyilvánítás .....	111

**Rövidítések jegyzéke**

BASEREX	sávselektív refókuszálás az X-magokra (band-selective refocusing on the X-nuclei)
BEST	sávselektív gerjesztés, rövid tranziens (band-selective excitation short transient)
5(6)-Cf	5(6)-karboxifluoreszcein
CK2	kazein kináz 2 (casein kinase 2)
CPP	sejtpenetráló peptid (cell penetrating peptide)
DCC	<i>N,N'</i> -diciklohexil-karbodiimid
DHPC	1,2- dihexanoil- <i>sn</i> -glicero-3-foszfokolin
DLS	dinamikus fényszórás (dynamic light scattering)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium sejtenyésztő oldat
DMF	<i>N,N</i> -dimetil-formamid
DMPC	1,2- dimirisztoil- <i>sn</i> -glicero-3-foszfokolin
DSS	3-(trimetilszilil)propán-1-szulfonsav nátrium sója
DTT	ditiotreitól
ERD	dehidrációs korai válasz fehérje (early response to dehydration)
EIPA	5-( <i>N</i> -etil- <i>N</i> -izopropil)-amilorid
FBS	magzati szarvasmarha szérum (fetal bovine serum)
GST	glutation- <i>S</i> -transzferáz
HEPES	4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetánszulfonsav
HOBT	hidroxi-benzo-triazol
HMBC	többkötéses heteronukleáris korreláció (heteronuclear multiple bond correlation)
HMQC	heteronukleáris többkvantum korreláció (heteronuclear multiple quantum correlation)
HOBT	1-hidroxi-benzotriazol
HSQC	heteronukleáris egykvantum korreláció (heteronuclear single quantum correlation)
ICM	szérumentes RPMI-1640 médium
IDP	rendezetlen fehérje (intrinsically disordered protein)
IDR	rendezetlen fehérjerégió (intrinsically disordered region)

IPAP	azonos fázisú – ellenfázisú (in-phase anti-phase)
IPTG	izopropil- $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozid
IUPred	Prediction of Intrinsically Unstructured Proteins algoritmus
NLS	nukleáris lokalizációs szignál (nuclear localization signal)
MDM2	mouse double minute-2 ubiquitin ligáz
MES	2-( <i>N</i> -morfolino)etánszulfonsav
NMR	mágneses magrezonancia (nuclear magnetic resonance)
NOESY	mag Overhauser-hatás spektroszkópia (nuclear Overhauser effect spectroscopy)
OPN	oszteopontin
PDB	Protein Data Bank adatbázis
PFG-NMR	térgradiens impulzus mágneses magrezonancia spektroszkópia (pulsed field gradient NMR)
Pin1	peptidil-prolil- <i>cis</i> - <i>transz</i> izomeráz, NIMA-kölcsönhatásba lépő 1 (Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1)
PMSF	fenilmetánszulfonil-fluorid
PONDR	Predictor of Natural Disordered Regions
PPII	poliprolin II
PPI	peptidil-prolil izomeráz
PSTI	hasnyálmirigy szekrécións tripszin inhibitor (pancreatic secretory trypsin inhibitor)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium sejtenyésztő oldat
SAXS	kisszögű röntgenszórás (Short Angle X-ray Scattering)
SGPI	sivatagi vándorsáska proteáz inhibitor ( <i>Schistocerca gregaria</i> protease inhibitor)
SHACA-HSQC	szelektív H <sup><math>\alpha</math></sup> , C <sup><math>\alpha</math></sup> -HSQC (selective H <sup><math>\alpha</math></sup> , C <sup><math>\alpha</math></sup> -HSQC)
SOFAST-HMQC	sávselektív optimalizált billentési szög rövid tranziens (band-selective optimized flip-angle short-transient)
SPINK	Kazal-típusú szerin proteáz inhibitor (serine protease inhibitor Kazal-type)
SSP	másodlagos szerkezeti hajlam (secondary structure propensity)
TAD	transzaktivációs domén (transactivation domain)

TCEP	trisz-(2-karboxietil)foszfin
TEV proteáz	Tobacco etch vírus proteáz
TFA	trifluorecetsav
TIS	triizopropilszilán
Tris	2-amino-2-(hidroximetil)propán-1,3-diol
TOCSY	teljes korrelációs spektroszkópia (total correlation spectroscopy)

## 1. Bevezetés

A modern gyógyszerkutatás fő iránya a célzott terápia, melynek fontos eleme a mellékhatások csökkentése a megfelelő szelektivitás és specificitás elérésével. A leggyakoribb gyógyszercélpontok fehérjék, melyek lehetnek enzimek, receptorok, ioncsatornák, transzporterek. Ezen biomolekulák 3D szerkezetének és oldatbeli mozgásainak ismerete kulcsfontosságú a fehérje-kismolekula, fehérje-fehérje, illetve fehérje-membrán kölcsönhatások szempontjából.

A biomolekulák szerkezeteit tartalmazó adatbázis, a Protein Data Bank (PDB) (Burley és mtsai 2021) jelenleg több, mint 180 000 fehérje/fehérjekomplex, nukleinsav vagy oligoszacharid szerkezetet tartalmaz, melyek 87,7%-át röntgenkristallográfia, 7,4%-át NMR spektroszkópia és 4,8%-át krio-elektronmikroszkópia segítségével határozták meg. Az esetek <1%-ban több módszer ötvözetét vagy egyéb módszert használtak. A felsoroltak közül oldatfázisban, atomi szinten egyedül az NMR spektroszkópia ad információt a szerkezeetről és az oldatbeli mozgásokról is. Így adatokat szerezhethetünk a globuláris fehérjéken kívül olyan rendkívül mozgékony biomolekulákról is, mint a rendezetlen fehérjék és fehérjeszakaszok (IDP/IDR, intrinsically disordered proteins/regions), melyeket a PDB adatbázis nem tartalmaz.

A doktori munkám során modern NMR spektroszkópai megközelítéseket alkalmaztam különböző biológiai rendszerek vizsgálatához. A választott rendszerek biológiailag releváns fehérjék, melyek átfogó jellemzése hozzájárul egyes betegségek kialakulásának megértéséhez, illetve potenciális hatóanyag hordozó peptidek.

A dolgozatom első részében a tumorszupresszor p53 fehérje rendezetlen transzaktivációs doménjének szerkezeti hajlamait és az NMR spektrumokon megjelenő minor konformerek vizsgálatát ismertetem, melyekhez új, általunk fejlesztett  $^1\text{H}^\alpha$ -detektált méréseket is alkalmaztam. A következő részben a rendezetlen ERD14 dehidrinből és a humán S100A4 fehérjéből származó 12-15 aminosav hosszú peptidek és fluoreszcens festékekkel jelölt konjugátumainak szerkezeti és sejtpenetrációs vizsgálatait tárgyalom. Az irodalomban a sejtpenetráló peptidek szerkezeti vizsgálatait membránmimetikumok jelenlétében végzik, oldatfázisú NMR vizsgálatokban a leggyakrabban bicellákat alkalmaznak. A fehérjékkel/peptidekkel való kölcsönhatás változást okozhat a bicella globális (méret, alak) paramétereiben, amely jellemzéséhez a

PFG-NMR módszer nyújt segítséget. Végül mutáció okozta szerkezeti és dinamikai változásokat mutatom be kis, globuláris szerin proteáz inhibitorok példáján keresztül.

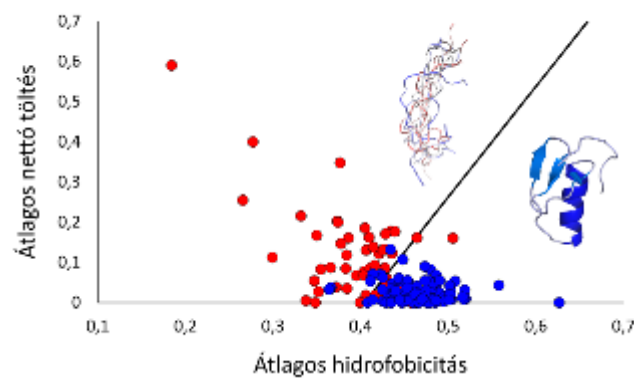
### 1.1. Rendezetlen fehérjék

A jól ismert, jól definiált 3D szerkezettel rendelkező, globuláris fehérjék mellett rendezetlen fehérjék, illetve rendezetlen fehérje régiók is előfordulnak. Az eukarióta fajokban a fehérjék 35-51%-ban, a prokarióta proteom 16-45%-ban tartalmaz legalább 1 db, 50 aminosavnál hosszabb rendezetlen szakaszt (Dunker és mtsai 2002, Dunker és mtsai 2000, Oldfield és mtsai 2005, Uversky 2015). Az IDP-ket tartalmazó adatbázis, a DisProt több, mint 2000 fehérjét nevesít (Hatos és mtsai 2020). Sok IDP kulcsfontosságú biokémiai folyamatokat szabályoz, ezáltal meghatározó szerepük van különböző betegségek kialakulásában, így a neurodegeneratív betegségek, Parkinson-kórnál az  $\alpha$ -szinuklein (Marsh és mtsai 2006, Meade és mtsai 2019), a tau fehérje a taupátiák, Alzheimer-kór esetén (Busche és Hyman 2020, Iqbal és mtsai 2010) felelős az amiloid plakkok létrejöttéért, a p53 transzaktivációs doménjének kóros működése a sejtciklus és apoptózis szabályozásával daganatos betegségek (karcinómák, szarkómák) kialakulásához vezethet (Olivier és mtsai 2003, Saha és mtsai 2015).

A rendezetlen fehérjék jellegzetessége, hogy a globuláris fehérjékkel szemben nem rendelkeznek stabil másodlagos ill. harmadlagos szerkezeti elemekkel. Az IDP-k az oldatban sokféle konformációs állapotban lehetnek jelen. Ez a nagyfokú szerkezeti heterogenitás hozzájárul ahhoz, hogy több, különböző célponthoz is tudnak kötődni. A stabil szerkezet helyett gyakran megjelennek bennük rövid, naszcens helikális vagy rövid turn szakaszok. Sok esetben a kötődés hatására létrejön az ún. „disorder-to-order” átmenet, ami azt jelenti, hogy a rendezetlen szakasz „rendeződik”, és stabil szerkezeti elemek alakulnak ki (Feng és mtsai 2009, Kussie és mtsai 1996, Lee és mtsai 2010). Az így létrejött szerkezeti elemek kötőpartnertől függően különbözőek lehetnek. Jó példa erre a p53 transzaktivációs domén (TAD), amelyben hélix alakul ki az S46-E51 régióban a HMGB1 (high mobility group B1) fehérjéhez kötődve (Rowell és mtsai 2012). A transzkripció faktor IIIH fehérjéhez kötődve hosszabb a helikális régió (S46-E56) (Di Lello és mtsai 2006), míg a p300 fehérjével kölcsönhatásban az előbb felsoroltakkal ellentétben a stabil hélix a TAD1 régióban alakul ki (Q16-L25) (Feng és mtsai 2009).



A rendezetlenség alapja a globuláris fehérjéktől eltérő aminosav összetétel: gyakori a „szerkeztörő” prolin, glutaminsav, lizin, szerin, glutamin, míg ritkák a másodlagos szerkezet kialakításában fontos szerepet játszó aromás (Trp, Phe, Tyr) és a hosszú alifás oldalláncú aminosavak (Leu, Ile, Val), ezenfelül a diszulfidhidakat létrehozó cisztein, továbbá az aszparagin (Theillet és mtsai 2013, Tompa 2002). A globuláris fehérjékhez képest az IDP-k általában kis hidrofobicitással (Kyte és Doolittle 1982) és nagy átlagos nettó töltéssel rendelkeznek (1. ábra) (Dunker és mtsai 2008, Uversky 2002).



**1. ábra** A PONDR CH-Plot algoritmusával készült egy aminosavra jutó átlagos nettó töltés-hidrofobicitás összefüggés globuláris (kék) és rendezetlen (piros) fehérjék esetén.

A rendezetlen fehérjék fő jellegzetessége, hogy prolin aminosavakban gazdagok. A nagy mennyiségű prolin miatt poliprolin II (PPII) és turn szerkezeti elemek jelennek meg. Ezen felül a prolin az egyetlen a 20 természetben előforduló aminosav közül, ahol a *cisz*-izomer is előfordul. Mivel a *cisz-transz* átalakulás lassú folyamat (Reimer és mtsai 1998), a sejtben peptidil-prolil-*cisz-transz* izomerázok (PPI, peptidil-prolil izomeráz) katalizálják ezt a folyamatot (Anchal és mtsai 2021, Fagiani és mtsai 2021, Olejnik és mtsai 2021). A leggyakrabban vizsgált izomeráz a Pin1, amely a *cisz-transz* konformációs egyensúlyt szabályozza kulcsfontosságú biokémiai útvonalakban. Ezáltal szerepet játszik az öregedési folyamatokban, tumorok és neurodegeneratív betegségek kialakulásában (Fujimoto és mtsai 2010, Lee és mtsai 2011, Magli és mtsai 2010, Pang és mtsai 2007, Stukenberg és Kirschner 2001).

Az Alzheimer-kórban *cisz*-p-tau a betegség korai fázisában jelenik meg, felhalmozódik a neuronokban és hozzájárul a betegség progressziójához. Pin1 a *cisz*-

*transz*-prolin átalakulást gyorsítva gátolja a patológias folyamatok kialakulását (Nakamura és mtsai 2012).

Az irodalomban leírták a *cisz-transz* konformációs egyensúly szabályozó funkcióját DNS károsító folyamatokban. Az ATR (ataxia telangiectasia and Rad3-related) fehérjében a P429 *transz* és *cisz* állapotban is előfordul (Makinwa és mtsai 2020). A *transz*-ATR a sejtmagban ATRIP fehérjéhez kötve található, a citoplazmában szabad formában *cisz* és *transz* P429 is előfordul. DNS károsodás esetén a *cisz*-ATR feldúsul a mitokondriumban, és anti-apoptotikus hatásával feladata a sejt életben tartása, amíg a DNS javítás befejeződik (Hilton és mtsai 2015, Makinwa és mtsai 2020).

A *cisz*-prolin a fehérje-fehérje kölcsönhatásokban is szerepet játszik: a p53 TAD E3 ubiquitin ligáz MDM2 (mouse double minute-2) fehérjével alkotott komplexének stabilitása csökken, ha a P27 *cisz*-konformerként van jelen (Zhan és Ytreberg 2015), illetve a BMAL TAD (brain and muscle ARNT-like 1) fehérje P625 *cisz-transz* átalakulása szerepet játszik a cirkadián ritmus szabályozásában (Gustafson és mtsai 2017).

Mivel a prolin *cisz-transz* izomerizáció kiemelt fontosságú biológiai folyamatokat szabályoz, ezért elengedhetetlen a pontos konformerek ismerete és oldatbeli eloszlásuk, ami atomi szintű vizsgálatokkal deríthető fel.

### 1.1.1. Rendezetlen fehérjék szerkezetvizsgáló módszerei

Az IDP-k szerkezeti jellemzése történhet globális, a teljes molekulát leíró (méret, alak stb.), illetve atomi szintű paraméterekről információt adó módszerekkel. Globális paraméterek meghatározhatók kisszögű röntgenszórás (SAXS), kisszögű neutronszerzés (SANS) cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia, méretkizárásos kromatográfia (Brusotti és mtsai 2018), SDS-PAGE gélelektroforézis (Örd és Loog 2020) vagy PFG-NMR (Dudás és Bodor 2019) módszerekkel. Az IDP-k mozgékonyága következtében a lokális, atomi szintű szerkezetvizsgáló módszerek gyakran nehézségekbe ütköznek: a röntgenkristallográfia esetén a rendezetlen fehérjék nem, vagy nehezen (például chaperon jelenlétében) kristályosíthatók (Ecsédi és mtsai 2020, Tompa 2002). Az utóbbi években jelentős fejlődést mutató krio-elektronmikroszkópia számára is a rendezetlenség okozza a legnagyobb problémát (Nwanochie és Uversky 2019), ezért az IDP-k atomi szinten kizárólag oldatfázisú NMR spektroszkópia segítségével vizsgálhatók.

Az NMR spektroszkópia használatával a rövid fehérjeszakaszok jellemezhetőek homonukleáris  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -TOCSY,  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -NOESY mérésekkel, a hosszabb szakaszok esetén a jelentős jelátfedés miatt szükséges  $^{15}\text{N}$ , illetve  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -jelölt mintát használni. A leggyakrabban klasszikus,  $^1\text{H}^{\text{N}}$ -detektált méréseket végzünk, azonban az IDP-k esetén nehézségeket tapasztalunk: a rendezetlen fehérjék gyakran nagy mennyiségű prolint tartalmaznak, amelyek nem rendelkeznek amid protonnal, ezért nem detektálhatók. Továbbá az amid jelek kiszélesedhetnek a protoncsere folyamatok miatt. Ez a folyamat nemcsak IDP-k esetén jelentős a fiziológiai körülmények közt ( $37^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH}=7,4$ ) végzett mérések esetén.

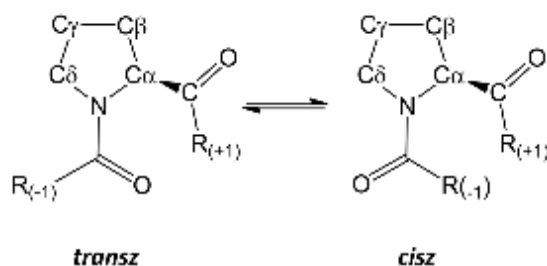
Napjainkban elérhetőek más típusú detektálási módszerek, melyekkel az  $^1\text{H}^{\text{N}}$  detektálásnál tapasztalt problémák elkerülhetők. Ezek a  $^{13}\text{C}$  (Bermel és mtsai 2006a, Bermel és mtsai 2006b, Murrall és mtsai 2018),  $^{15}\text{N}$  (Chhabra és mtsai 2018, Gal és mtsai 2011, Gibbs és Kriwacki 2018) ill.  $^1\text{H}^{\alpha}$  detektált mérések (Bottomley és mtsai 1999, Kanelis és mtsai 2000, Mantylahti és mtsai 2010). Mindhárom megközelítés előnye, hogy az amid protonnal nem rendelkező prolinokat is tudjuk detektálni. Továbbá a felsorolt atomok nem vesznek részt protoncsereben, ezért a méréseket fiziológiai körülmények közt is végezhetjük. Leggyakrabban használt 2D  $^{13}\text{C}$  vagy  $^{15}\text{N}$ -detektált mérés a CON, amely az  $i$ -edik aminosav amid nitrogénjét korreláltja az  $(i-1)$ -edik aminosav karbonil szén atomjával. A CON kedvező tulajdonsága a széles jeldiszperzió, a karbonil szén kb. 5 ppm (173-178 ppm), a nitrogén kb. 30 ppm (110-140 ppm) kémiai eltolódás tartományt ölel fel, ezért a jelátfedés ritka. Ezzel ellentétben, a klasszikus  $^1\text{H}^{\text{N}}$  detektálásnál a jeldiszperzió rendezetlen fehérjék esetében kb. 1 ppm. Mindkét módszer hátránya, hogy rendkívül érzéketlenek, ezért a megfelelő jel/zaj arány eléréséhez a tranziensek számát emelni kell, amely a mérési idő jelentős növekedésével jár. Léteznek speciális szénre, illetve nitrogénre érzékeny mérőfejek, de ezek költségesek és Magyarországon nem, illetve világszerte is csak néhány NMR laboratóriumban érhetőek el.

A korábban említett  $^1\text{H}^{\alpha}$  detektált mérések előnye, hogy érzékenyebb, mint a  $^{13}\text{C}$  és  $^{15}\text{N}$  detektálás. Hátránya, hogy a jeldiszperzió  $\sim 1$  ppm hasonlóan az amid protonhoz, illetve a jelentős jelszélesedés, amelyet a  $\text{H}^{\alpha}$  környezetében lévő atomokkal való csatolás okoz. Ennek kiküszöbölésére különböző lecsatolási módszereket használhatunk, melyek során a multiplettek szingulett jelekké alakíthatók. Így tiszta vagy valódi kémiai eltolódás (ún. „pure shift”) spektrumot kapunk. A dolgozatomban bemutatott 2D SHACA-HSQC

szelektív  $^1\text{H}^\alpha\text{-}^{13}\text{C}^\alpha$  korrelációs spektrumokban kiterjedt valós idejű homo- és heteronukleáris lecsatolást valósítunk meg, amivel jelentős felbontás- és érzékenységnövelés érhető el (Bodor és mtsai 2020).

### 1.1.2. Prolin *cisz-transz* izoméria vizsgálata

Egy peptidkötésben az  $i-1$ -edik aminosav karbonilcsoportja és az  $i$ -edik aminosav  $\text{H}^N$  által meghatározott  $\omega$  szög térállása kétféle lehet:  $180^\circ$  esetén a kötés *transz*,  $0^\circ$  esetén *cisz* (2. ábra). A *cisz* kötés kialakulása energetikailag kedvezőtlen az  $i$ -edik és  $i-1$ -edik aminosav  $\text{C}^\alpha$  atomjai között kialakuló sztérikus gát miatt, ezért a legtöbb aminosav esetén kizárólag a *transz* konformer fordul elő. A prolin esetén az energiagát kisebb, mint a többi aminosav esetén, ezért fehérjékben a *cisz*-kötés előfordulása  $\sim 0,03\%$  (Dugave és Demange 2003, Pal és Chakrabarti 1999, Weiss és mtsai 1998). A prolin globuláris fehérjékben szinte kizárólag a *transz* izomerként fordul elő, *cisz*-izomer leggyakrabban loop régiókban található (Merlino és mtsai 2012, Schultz és mtsai 2005, Svensson és mtsai 1992).



**2. ábra** A prolin *cisz-transz* izomerizáció. Rendezetlen fehérjékben egyensúlyi folyamat, az egyensúly a *transz* izomer irányába mutat.

Rendezetlen fehérjék esetén a két izomer egyensúlyban van, a *cisz*-izomer általában 5-15% mennyiségben is jelen lehet (Alderson és mtsai 2018). A nagyobb mennyiségű *cisz*-izomer oka, hogy a sokkal mozgékonyabb IDP-k esetén a sztérikus gát kisebb a Pro  $\text{C}^\delta$  és a megelőző aminosav  $\text{C}^\alpha$  atomja között.

Rendezetlen fehérjékben az aminosavösszetétel szerint a prolin előfordulása gyakoribb, és az egyensúly miatt oldatban mindkét konformer jelen lehet ( $N$  db prolin esetén elméletben  $2^N$  db konformer van az oldatban). Ebben az esetben az NMR spektrumokon ( $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC,  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC,  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -TOCSY stb.) jelkettőződést figyelhetünk meg a prolin és a környező aminosavak esetén: egy nagy intenzitású fő jelet, amely a *transz*-prolin és környezetében lévő aminosavakhoz tartozik, és egy kis

intenzitású minor jelet, amely a *cisz*-prolin jelenlétére utal. Ennek oka, hogy a prolin *cisz-transz* izoméria lassú időskálájú egyensúlyi folyamat, a sebességi állandó szobahőmérsékleten  $10^{-2}$  -  $10^{-3}$  s<sup>-1</sup> (Reimer és mtsai 1998). Sok esetben a fő konformer melletti minor formák detektálása és azonosítása nehézségekbe ütközik a választott megközelítés érzékenysége vagy jelátfedések miatt. Peptidek, kisméretű fehérjék esetén, a konformerek azonosítása 2D homonukleáris spektrumok alapján elvégezhető, mivel a *cisz* és *transz* izomer esetén a szekvenciális H<sup>α</sup>-H<sup>α</sup>, illetve H<sup>α</sup>-H<sup>δ</sup> NOE keresztcsúcsok intenzitása eltér (Wüthrich 1986).

Nagyobb fehérjék esetén a jelátfedések miatt szükséges izotópjelölt mintát használni (<sup>15</sup>N ill. <sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N), a jelkettőződést leggyakrabban <sup>1</sup>H,<sup>15</sup>N-HSQC spektrumon detektálják. A megjelenő minor jelek asszignációja általában <sup>1</sup>H<sup>N</sup> detektáláson alapuló mérésekkel nem lehetséges, mivel a prolinnak nincs detektálható amid protonja, ezért a prolint megelőző és követő aminosavak minor jeleit nem lehetséges összekötni. Erre a problémára megoldás lehet 4D HCOCANH spektrum (Wong és mtsai 2018), azonban ez a mérés nem elég érzékeny az alacsony koncentrációjú minor komponenshez, illetve Pro-Pro motívumok esetén nem alkalmazható.

Mivel az összekötés gyakran nem lehetséges (prolinok nem detektálhatók, csak közvetve lehet információ szerezni róluk), ezért alternatív technikákat alkalmaznak. Ilyen a prolin mutációja alaninra, ahol az adott *cisz*-prolinhoz tartozó minor jelek eltűnnek a <sup>1</sup>H,<sup>15</sup>N-HSQC spektrumról (Dujardin és mtsai 2019). A minorok azonosítása történhet úgy is, hogy a teljes fehérje helyett csak bizonyos aminosavakat jelölnek <sup>13</sup>C izotóppal. Ilyenkor általában nem <sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N-HSQC, hanem <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C-HSQC spektrumokat hasonlítanak össze (Urbanek és mtsai 2020).

A minor prolinok direkt detektálása az utóbbi években a korábban említett <sup>13</sup>C- és <sup>1</sup>H<sup>α</sup>-detektált mérésekkel történik (Ahuja és mtsai 2016, Chaves-Arquero és mtsai 2018, Urbanek és mtsai 2020). A <sup>13</sup>C detektált mérések nem olyan érzékenyek, mint az <sup>1</sup>H detektáltak, de a szénre érzékenyített mérőfejen kívül a nagyobb fehérjekoncentráció és a nagyobb térerőn mérés (1,2 GHz) esetén a minor jelekre is jól alkalmazhatók.

A kis koncentrációban jelen levő minor konformerek detektálását a prolin konformáció meghatározása követi. A prolin konformáció meghatározható a korábban említett NOE keresztcsúcsok mellett a C<sup>β</sup> és C<sup>γ</sup> kémiai eltolódások alapján (Schubert és mtsai 2002). A *transz*-prolin esetén  $\delta(C^{\beta})$  31-32 ppm és  $\delta(C^{\gamma}) \sim 27$  ppm, *cisz*-prolinnál

$\delta(C^\beta)$  33-34 ppm és  $\delta(C^\gamma) \sim 24$  ppm. Így a *transz* izomernél  $\delta(C^\beta) - \delta(C^\gamma) \sim 5$  ppm, a *cisz*-Pro esetén  $\sim 10$  ppm, ezért fontos, hogy a prolin oldallánc  $C^\beta$  és  $C^\gamma$  atomjait detektálni tudjuk.

A két izomer 2D  $^1H, ^{13}C$ -HSQC spektrumon is detektálható, de a kisméretű peptidek kivételével az alifás tartományban a jelátfedés jelentős, ezért gyakran 3D mérésekre van szükség. Az  $^1H^N$  detektáláson alapuló mérések közül CCCONH (Montelione és mtsai 1992) spektrumon detektáljuk az *i*-1-edik aminosav oldallánc összes  $^{13}C$  atomját, tehát a prolin oldalláncot is. Azonban meg kell jegyezni, hogy a Pro-Pro-X motívumok esetén információt csak az X aminosavat közvetlenül megelőző prolinról kapunk. A  $^{13}C$ -detektálás esetén az egyes prolin oldallánc  $^{13}C$  atomok kémiai eltolódását direkt módon, 3D (H)CCCON mérés segítségével lehet meghatározni (Bermel és mtsai 2006a, Mateos és mtsai 2020).

A  $C^\beta$  és  $C^\gamma$  kémiai eltolódás különbségen kívül *in silico* predikciós módszerek is alkalmazhatók a prolin izomer meghatározásához. Fontos megjegyezni, hogy ezek az algoritmusok gyakran nem jelzik csak a főkomponensben lévő prolin konformációját. A CISPEPred algoritmus BLAST keresést végez az aminosav szekvencia alapján (Song és mtsai 2006). Ennél pontosabb predikciót adnak azok a programok, melyek a szekvencia mellett különböző atomok kémiai eltolódásait is figyelembe veszik. Ilyen algoritmusok a POP (Schubert és mtsai 2002), a PREDITOR (Berjanskii és mtsai 2006) és a PROMEGA (Shen és Bax 2010). A POP és a PREDITOR a korábban említett  $C^\beta$ - $C^\gamma$  atomok kémiai eltolódás különbségét felhasználva határozzák meg a prolin izomert. A PROMEGA a prolin  $\delta(C^\beta)$  és  $\delta(C^\gamma)$  ismeretében 100% valószínűséggel képes a *cisz*-prolin valószínűségét jósolni, azonban a Pro és a környező aminosavak  $H^\alpha$ ,  $C^\alpha$ , N, HN kémiai eltolódások alapján is jó becslést ad.

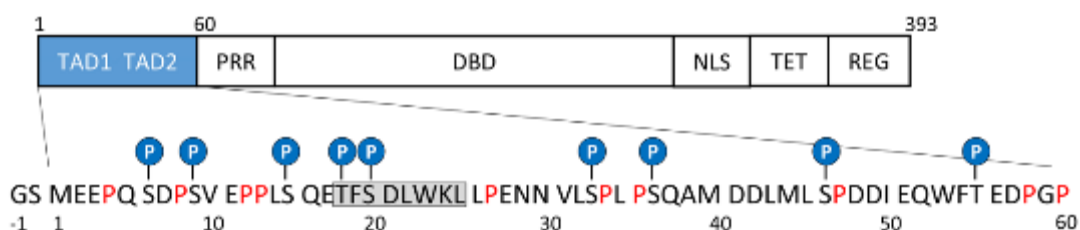
### 1.1.3. A p53 fehérje

A prolin *cisz-transz* izomerizáció jelenségét az egyik legismertebb rendezetlen fehérjén, a p53 transzaktivációs doménjén vizsgáltam.

A humán p53 (UniProt azonosító: P04637) biológiai szerepe szerint egy tumorszupresszor, kulcsfontosságú szereplő a sejtciklus szabályozásában, az apoptózisban és a DNS javító mechanizmusokban (Bulavin és mtsai 1999, Kruse és Gu

2009, Oda és mtsai 2000). A p53-DNS komplex stabilizálásában és a transzkripcióban a CBP (CREB-kötő fehérje) és p300 fehérjék játszanak fontos szerepet (Lee és mtsai 2010).

A p53 szerkezete szerint homotetramer, melyben a 393 aminosav hosszú alegységeket különböző szerkezeti egységekre bonthatjuk (3. ábra): a monomer áll egy rendezetlen N-terminális transzaktivációs doménből (TAD), egy prolin-gazdag régióból (PRR), ezt követi a DNS-kötő domén (DBD), a nukleáris lokalizációs szignál (NLS), a tetramerizációs domén (TET) és a C-terminális szabályozó domén (REG).



**3. ábra:** A p53 fehérje sematikus felépítése, alul a TAD régió aminosavszekvenciája, ahol a naszcens helikális régiót szürke téglalap jelzi. A foszforilációs helyeket kék kör, a prolinokat piros betű jelzi.

Az N-terminális TAD domén az egyik legismertebb rendezetlen fehérjeszakasz, amely gazdag negatív töltésű aminosavakban és prolinokban. A 60 aminosav hosszú TAD régiót két nagyobb egységre oszthatjuk: TAD (1-41. aminosav) és a TAD2 (42-60. aminosav) (Raj és Attardi 2017). A F19-L26, L43-F54 régiók hidrofób és aromás oldalláncú aminosavakat tartalmaznak, illetve tranzienst másodlagos szerkezeti elemek kialakítására képesek (F19-L25, P47-T53) (Borchers és Daughdrill 2018, Lee és mtsai 2000, Wells és mtsai 2008).

A p53 TAD funkciójának betöltésében fontos szerepet kap a nagyfokú szerkezeti heterogenitás, amely által többféle célfehérjéhez képes kötődni (Anil és mtsai 2013, Bochkareva és mtsai 2005, Feng és mtsai 2009, Krois és mtsai 2016, Kussie és mtsai 1996, Lee és Chen 2016, Okuda és Nishimura 2014, Popowicz és mtsai 2007, Rowell és mtsai 2012). A fehérje-fehérje komplexek közül leggyakrabban a p53-MDM-2 komplexet vizsgálták. Az MDM-2 egy ubiquitin ligáz, amely a p53 TAD1 régiójához kötődik, melynek következtében a p53 transzkripció aktivitása csökken, illetve az ubiquitin jelölés a p53 degradációját okozza (Chène 2003). Az így elindított folyamatok kontrollálatlan tumor proliferációhoz vezetnek (Grigorian és mtsai 2001, Orre és mtsai 2013).

A p53 TAD továbbá képes kölcsönhatásba lépni a metasztázisban részt vevő S100A4 fehérjével is (Garrett és mtsai 2006, Grigorian és mtsai 2001, Van Dieck és mtsai 2009). Az S100A4 az S100 fehérjék családjába tartozik, melyek közös tulajdonsága, hogy jól oldódnak telített ammónium-szulfát-oldatban és  $\text{Ca}^{2+}$  iont kötnek. Szerkezetük szerint homodimerek, és alegységeik egy pszeudo-EF-hand és egy EF-hand motívumból állnak. Az S100A4 fehérje a p53 TAD régió mellett képes a p53 C-terminális régiójához kapcsolódni.

A különböző fehérje-fehérje kölcsönhatásokat többek közt poszttranszlációs módosításokkal lehet szabályozni. A 7 darab szerint és 2 treonint tartalmazó p53 TAD esetén a foszforiláció a fő szabályozó mechanizmus, az irodalomban leírták különböző kinázok (HIPK4 mouse homeodomain-interacting protein kinase) (Arai és mtsai 2007), CDK5 (ciklin dependens kináz 5) (Lee és mtsai 2007), protein kináz C (Yoshida és mtsai 2006), AMPK-AMP-aktivált protein kináz (Jones és mtsai 2005) szerepét.

Enyhe DNS károsodás esetén S15 és S20 aminosavak foszforilálódnak, amely p53 stabilizációját követve célgénak transzkripcióját okozza. Az S15 és S20 foszforiláció kinetikája gyors, ellenben a sejtben az S46 foszforilációja órákkal a genotoxikus stressz után következik be (Oda és mtsai 2000). Az S46 foszforilációját okozza a súlyos DNS károsodás, melynek következtében sejthalál stimuláló célgénak kerülnek átírásra (BAX, p53AIP1, p53INP1, NOXA), illetve a mitokondrium külső membránjának dezintegrációjával jár (Liebl és Hofmann 2019).

## 1.2. Sejtpenetráló peptidek

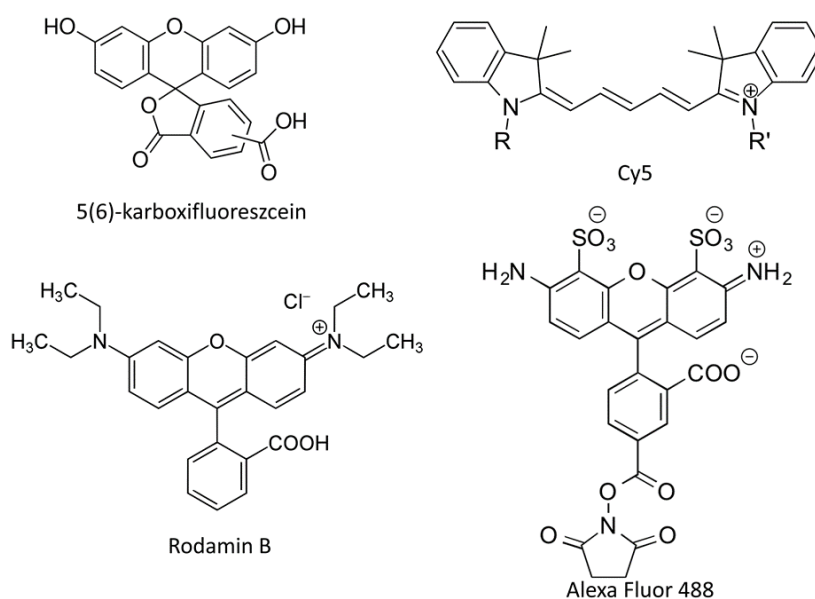
A célzott hatóanyag-szállítás kiemelt fontosságú a toxikus, tumorterápiában használt hatóanyagok célba juttatásához. A molekuláris gyógyszer technológia különböző nanohordozókat alkalmaznak a célszövet elérése érdekében: leggyakrabban liposzómákat, de különböző polimerek, dendrimerek, micellák, fémtartalmú nanorészecskék (nanodot, mágneses fémkomplexek stb.) is alkalmasak a feladatra (Yetisgin és mtsai 2020, Zhao és mtsai 2020). Kutatások folynak ezeken kívül sejtpenetráló peptidek felhasználhatóságáról is (Kurrikoff és mtsai 2021, Xie és mtsai 2020).

A sejtpenetráló peptidek (CPP, cell penetrating peptide) rövidek, általában kevesebb mint 30 aminosavból állnak. Az aminosavszekvencia alapján három nagy



csoportha oszthatók: kationos, amfipatikus és hidrofób. A CPP-k legnagyobb része, több mint 83%-a kationos (Milletti 2012), többek közt ide tartoznak az elsőként azonosított és leggyakrabban vizsgált sejtpenetráló peptidek, a HIV-1 TAT (Green és Loewenstein 1988, Vivès és mtsai 1997) és a penetratin (Derossi és mtsai 1996, Joliot és mtsai 1991). A kationos peptidek argininben és/vagy lizinben gazdagok, a pozitív töltéseket gyakran hidrofób aminosavak választják el.

Az *in vitro* sejtpenetrációs vizsgálatok (áramlási citometria, konfokális mikroszkópia) során a peptidekhez fluoreszcens kismolekulát kapcsolnak, amely elősegíti a fluorofór-peptid konjugátum detektálását (Sabnis 2015). A fluorofórok általában kiterjedt  $\pi$ -elektronrendszerrel rendelkeznek, gyakran több aromás gyűrűt tartalmaznak (4. ábra). A megfelelő fluoreszcens festék kiválasztásánál fontos szempontok a fotofizikai tulajdonságok: a gerjesztő és emissziós hullámhossz.



**4. ábra** *In vitro* sejtpenetrációs vizsgálatok során használt leggyakoribb fluorofórok szerkezeti képletei

Doktori munkám során az 5(6)-karboxifluoreszeint használtam, melynek előnyös tulajdonsága a kis citotoxicitás, illetve, hogy önmagában nem jut át a sejtmembránon. Hátránya az alacsony intracelluláris fluoreszcencia intenzitás, továbbá a pH-függő fluoreszcencia (Cavaco és mtsai 2020).

A dolgozatomban 4, az ERD14 dehidrinből és az S100A4 fehérjéből származó lizin-gazdag peptidek szerkezeti hajlamait és *in vitro* sejtpenetrációját vizsgáltam. A következő fejezetben ezen fehérjéket és funkcióját mutatom be.

### 1.2.1. Az ERD14 dehidrin fehérje

A dehidrinek a növényi stressz fehérjék közé tartoznak, melyek a LEA (Late Embryogenesis Abundant) fehérjecsalád részei. Fontos szerepük van a növényi mag fejlődésében és a növény abiotikus stressz (hideg, sótartalom, szárazság) elleni védekezésben.

A dehidrinek számos evolúciósan konzervált szegmenst tartalmaznak, ezek közül a leggyakoribb a lizin-gazdag K-szegmens, amely minden dehidrinben legalább egyszer megtalálható. A K-szegmens egy 15 aminosavból felépülő konzervált szakasz, melynek aminosavszekvenciája EKKGI MDKIK EKLPK (Close 1996, Graether és Boddington 2014) Az előforduló pontmutációk leginkább az N- és C-terminális szakaszt érintik, a KIKE szekvencia részlet a leginkább konzervált (Graether és Boddington 2014).

Irodalmi adatok alapján a dehidrinek képesek membránokkal kölcsönhatásba lépni: a homoki babból izolált (Ismail és mtsai 1999), illetve a kukoricából származó ZmDHN1 dehidrin (Koag és mtsai 2009) SDS micellákhoz kötődve helikális szerkezetűvé válik, ellenben a GmDHN1 (Soulages és mtsai 2003) DMPG liposzómához kötődve nem mutat szerkezeti változást. A vizsgálatokat a teljes hosszúságú dehidrineken és K-szegmens nélküli konstrukciókon végezték, melyek alapján a membránokhoz kötődéshez a K-szegmensek jelenléte szükséges. Munkám során ezért a K-szegmensek membránkölcönhatását és *in vitro* sejtbejutását vizsgáltam.

Dolgozatomban a választott lizin-gazdag peptidek a lúdfű (*Arabidopsis thaliana*) növényben található ERD14 dehidrinből származnak (Kovács és mtsai 2008).

Az ERD14 (UniProt azonosító: P42763) egy 185 aminosav hosszú, rendezetlen fehérje, amely chaperone-ként hozzájárul a sejt életképességének fenntartásához stressz körülmények közt. 3 K-szegmenst tartalmaz, melyekre a továbbiakban a következőként fogok hivatkozni: ERD-A (DRGLF DFLGK KK), ERD-B (EKKGF MECLK EKLPK) és ERD-C (EKKGI LEKIK EKLPK). Korábbi in-cell NMR mérések során a régióhoz tartozó jelek kiszélesednek, ez a jelenség a lehetséges membránkölcönhatásra utalhat (Murvai és mtsai 2021, Murvai és mtsai 2020)

### 1.2.2. Az S100A4 fehérje

A dolgozatomban vizsgált, gyógyszerhordozó-jelölt 4 peptid egyike a humán S100A4 fehérjéből (UniProt azonosító: P26447) származik. Az S100A4 a tumormetasztázisban résztvevő fehérje (Fei és mtsai 2017, Ismail és mtsai 2017). Emlő- (Pedersen és mtsai 2002), vastagbél- (Taylor és mtsai 2002), máj- (Taylor és mtsai 2002) és hasnyálmirigy-daganatokban (Tsukamoto és mtsai 2013) és nem kissejtes tüdőrák (Stewart és mtsai 2016) esetén a sejtekben az expressziója megnövekedett. Önmagában nem okoz tumort, azonban a metasztázis kialakulásának valószínűségét növeli (Ambartsumian és mtsai 2005).

Szerkezete alapján egy  $\text{Ca}^{2+}$ -ion kötő homodimer, 1 homodimer 4  $\text{Ca}^{2+}$ -iont képes megkötni (Bresnick és mtsai 2015). A monomer 101 aminosav hosszú, EF-hand (hélix–hurok–hélix) motívumot tartalmaz. Globuláris, szerkezetét 4 darab hélix építi fel, melyeket a rendezetlen C-terminális farokrégió követ. Dolgozatomban ezen régió sejtpenetrációs képességét vizsgáltam. A teljes hosszúságú S100A4 képes átjutni a sejtmembránon energiafüggő endocitózissal, de korábban nem vizsgálták melyik régió a felelős a sejtbejutásért. Irodalmi adatok a C-terminális farokrégió szerepét támasztják alá a metasztázis kialakulásáért és a sejt migrációért (Malashkevich és mtsai 2008, Zhang és mtsai 2005).

### 1.3. Membránmimetikumok

A sejtmembrán összetett rendszer, mely lipideket és fehérjéket tartalmaz. A membránfehérjék részt vesznek különböző biokémiai folyamatokban pl. szabályozás, jelátvitel stb. Szerkezeti vizsgálatuk kiemelt fontosságú, azonban membránmentes közegben szerkezetvizsgálatuk gyakran nem lehetséges, mert membránmentes közegben nem veszik fel a natív térszerkezetüket. Ezért fontos a membránok viselkedésének megértése, mert elkerülhetetlen a membránfehérjék vizsgálatához. A fehérje (peptid)-membrán kölcsönhatások gyakran a membrán fizikai-kémiai paramétereinek (folyékonyság, görbület, méret- és alak) változásával jár. Mivel a sejtmembrán komplex összetételű, ezért biofizikai-biokémiai vizsgálatoknál modellmembránokat használnak. A leggyakrabban használt membránmimetikumok a micellák, bicellák, vezikulumok, liposzómák, nanodiszkek (Warschawski és mtsai 2011). Az oldatfázisú NMR vizsgálatok

esetén figyelembe kell venni a részecskék méretét, így a felsoroltak közül a micellák, bicellák és nanodiszkeket lehet vizsgálni.

A legkisebbek és legegyszerűbben előállíthatók a micellák. Fő hátrányuk, hogy alakjuk eltér a sejtmembránétól, ugyanis a görbületük nagy. Előnyösebbek a bicellák, amelyek egy vízoldható, rövid szénláncú és egy vízoldhatatlan, hosszú szénláncú lipid keverékéből állnak. A hosszú szénláncú lipid a kettősréteget alkotja, a rövid szénláncú lipid pedig a korongalakú alakú bicella szegélyét. A bicella fiziko-kémiai tulajdonságait a  $q$  paraméter határozza meg, amely a két lipid koncentrációjának aránya ( $q = [\text{hosszú szénláncú lipid}]/[\text{rövid szénláncú lipid}]$ ).  $q > 2$  esetén keletkező, elnyújtott, korongszerű bicellák szilárd NMR segítségével vizsgálhatók. Oldatfázisú NMR vizsgálatokhoz a  $q < 1$  bicellák alkalmasak, ezek kisméretűek és gyors bukácsoló mozgást végeznek. A leggyakrabban  $q = 0,5$  bicellákat használnak, melyek DHPC és DMPC molekulákból állnak (továbbiakban PC bicella). Ebben az összetételben a bicella vastagsága megegyezik a sejtmembrán lipidkettősréteg vastagságával (Dudás és mtsai 2020, Dürr és mtsai 2013).

A szakirodalomban a bicellák méretének meghatározása különböző technikákkal lehetséges: SAXS, DLS, PFG-NMR. A DLS és PFG-NMR a részecskék translációs diffúziós együtthatójáról ad információt, amelyből a Stokes-Einstein egyenlet szerint merev, tökéletes gömb részecskékre folytonos közegben a hidrodinamikai sugár kiszámítható:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r_H f}$$

ahol  $D$  a translációs diffúziós együttható,  $k_B$  a Boltzmann-állandó,  $T$  a hőmérséklet K-ben,  $\eta$  a közeg viszkozitása,  $r_H$  a hidrodinamikai sugár,  $f$  az alakfaktor, ami gömbszerű részecskékre 1. Gyakorlatban a micellák és bicellákra nem teljesülnek ezek a feltételek.

A bicellák méretét korábban SAXS, MD, illetve NMR és SAXS mérések ötvözetével vizsgálták. Az irodalomban a bicella molekuláris összetételében nincs egyetértés:  $q \sim 0,5$  PC bicellák (50 mM DMPC-100 mM DHPC) esetén az aggregációs szám  $N(\text{DMPC})=15-68$  és  $N(\text{DHPC})=30-115$  között változik. A csoportunk korábbi kutatása alapján a PFG-NMR-SAXS módszer ötvözetével bicella-peptid modellrendszeren követték a globális paraméterek változását (Dudás és mtsai 2020). Ez alapján a korábban használt  $r_G/r_H$  alakfaktor nem alkalmazható bicellák esetén, hanem

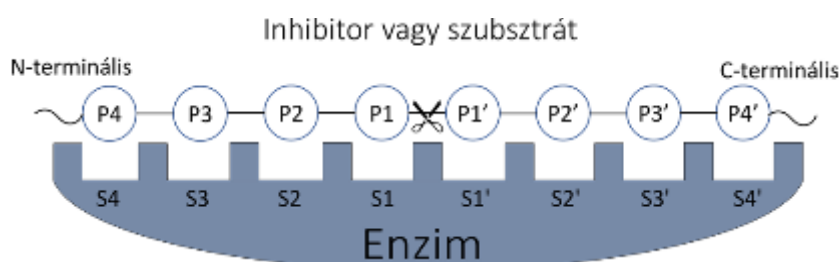
az  $r_H$  és a bicella ellipszoid alakját jellemző  $(b+t_b)$  paraméterek jellemzik a globális tulajdonságok megváltozását.

Doktori munkám során az ERD14 és S100A4 fehérjékből származó peptidok okozta lokális és globális paraméterek változását vizsgáltam  $q=0,5$  PC bicellák esetében.

#### 1.4. Szerin proteáz inhibitorok

A szerin proteázok a hidrolázok csoportjába tartozó enzimek, nevüket a katalitikus centrumban található kulcsfontosságú szerin aminosavról kapták. Peptidkötések hidrolízisével számos élettani folyamatban játszanak szerepet (emésztés, véralvadás, immunválasz stb.). A legismertebb szerin proteázok a tripszin, amely pozitív töltésű oldalláncú aminosavak után hasít, illetve a kimotripszin, amely a hidrofób, aromás aminosavak karboxilcsoportja után hidrolizálja a peptidkötést.

Dolgozatomban a Schechter-Berger nevezéktant használom, amely szerint P1-től számozzuk az enzim által elhasított kötéstől N-terminális, P1'-től C-terminális irányban található aminosavakat (5. ábra).



**5. ábra** A Schechter-Berger nevezéktan. A szubsztrát vagy inhibitor aminosavait a hasítás helyétől N-terminális irányban P1-től, C-terminális irányba P1'-től kezdve számozzuk. Az enzim kötőzsebeit S jelöli, sorszáma megegyezik a szubsztrát/inhibitor megfelelő aminosavának számozásával.

A szerin proteázok túlzott aktivitása súlyos betegségeket idézhet elő, ezért fontos működésük pontos szabályozása. A szabályozás leggyakrabban gátlómolekulákkal, inhibitorokkal történik.

A szerin proteáz inhibitorokat 3 fő csoportra oszthatjuk: a kanonikus, a nem-kanonikus inhibitorokra és szerpinekre. Dolgozatomban kanonikus inhibitorokat vizsgáltam. A kanonikus inhibitorok konvergens evolúcióval jöttek létre. Szerkezetük általánosan két részre osztható: vázra és az enzimhez kötődő hurokra. Változatos vázszerkezetük alapján 18 inhibitorcsaládba sorolhatók (Otlewski és mtsai 2005). A

különböző vázszerkezet ellenére az inhibitorok közös jellemzője, hogy szubsztrátszerűen reverzibilisen kötődnek az enzimhez, ahol a hurok konformációja megegyezik minden inhibitor esetén. A kanonikus inhibitorok működési mechanizmusát széleskörűen vizsgálták Laskowski és munkatársai (Laskowski és Qasim 2000). Az enzim specificitását elsősorban a P1 aminosavnak tulajdonították, későbbi kutatások alapján hosszabb régió (P3-P3') is részt vesz a kölcsönhatás kialakításában. Eredményeik alapján létrehozták a vázszerkezet függetlensége modellét, amely szerint az optimális hurokszekvenciák affinitásvesztés nélkül felcserélhető a különböző vázak között.

A vázszerkezet függetlensége modell ellenőrzésére a dolgozatomban vizsgált inhibitorok hurokrégióit kimotripszin kötődésre optimalták. A kimotripszint 2 darab, 6  $\beta$ -szálból álló  $\beta$ -hordó építi fel, melyek közti árokba képesek a szubsztrátok és inhibitorok kötődni. A peptidkötés hidrolízise az enzim aktív centrumában zajlik, kimotripszin esetén a katalitikus triádot három, szekvenciában távol található aminosav alkotja: szarvasmarha  $\alpha$ -kimotripszin (PDB-kód: 1YPH, P00766 Uniprot azonosító alapján számozva) esetén S195, H57 és D102.

A kimotripszin esetén a P4-P5 pozíció nem járul hozzá a kölcsönhatáshoz. A P3 pozícióban kötődő aminosav amidcsoportja H-hídat alakít ki a kimotripszin G216 oxigén atomjával, ezért prolin jelenléte ebben a pozícióban jelentősen csökkenti az enzimaffinitást. A P2 pozíció szerepe hasonló, itt a hidrogénhíd az enzim G216 amid- és a szubsztrát (inhibitor) karbonilcsoportja között alakul ki. Előnyösebbek a nagy térkitöltésű oldalláncok ebben a pozícióban. A kimotripszin esetén a legfontosabb kötőzsebbe, az S1 pozícióba aromás (Phe, Tyr, Trp) illetve nagy térkitöltésű alifás oldalláncú aminosavak képesek kötődni (Leu, Ile). A C-terminális felé haladva a kimotripszin esetén előnyt élveznek a pozitív töltésű oldalláncú aminosavak, melyek az enzim D64 oldalláncával ionos kölcsönhatásban lehetnek.

A kimotripszinhez való vázfűgést és kötődést az SGPI-2 (*Schistocerca gregaria* protease inhibitor 1) és SPINK1 (Serine protease inhibitor Kazal-type 1) vázakon vizsgáltuk. Az SGPI-2 a sivatagi vándorsáska (*Schistocerca gregaria*) hemolimfájából izolált inhibitor. A 35 aminosav hosszú minifehérje szerkezetét NMR spektroszkópia segítségével határozták meg (Gáspári és mtsai 2002). A vázszerkezetet 3 darab antiparallel  $\beta$ -szál alkotja, melyet 3 darab diszulfidhíd merevít. A kanonikus hurok a C-terminálison található.

A SPINK 1 humán eredetű inhibitor, a hasnyálmirigyben termelődő szerin proteázokat gátolja. A röntgenkristallográfiával meghatározott szerkezete szerint az N-terminális régió rendezetlen, melyet egy  $\alpha$ -hélix és 3 rövid  $\beta$ -szál követ. A váz szerkezetét 3 darab diszulfidhíd stabilizálja (Hecht és mtsai 1992).

## 2. Célkitűzések

A) Doktori munkám első részének célja a rendezetlen p53 TAD fehérje szerkezeti hajlamainak vizsgálata NMR spektroszkópiával, továbbá a prolin *cisz-transz* izomerizáció okozta minor konformerek azonosítása és szerkezeti vizsgálata klasszikus  $^1\text{H}^{\text{N}}$ -detektált és  $^1\text{H}^{\alpha}$ -detektált mérések segítségével. Ezen módszereknél a prolinok egyértelmű azonosítása nehézkes, ennek megkönnyítésére célozom új, BASEREX valós idejű homo- és heteronukleáris lecsatoláson alapuló  $\text{H}^{\alpha}$ -detektált pulzusszekvencia kidolgozása.

A p53 TAD biokémiai folyamatainak szabályozásában poszttranszlációs módosítások játszanak főszerepet. Dolgozatomban a CK2 kináz (kazein kináz) általi foszforiláció hatását követem a fő komponens és a prolin izomerizáció miatt megjelenő minor konformerek esetén. A foszforiláció hatását a másodlagos szerkezetre, illetve a *cisz*-prolinok mennyiségére  $\text{H}^{\text{N}}$  és  $\text{H}^{\alpha}$ -detektált NMR mérésekkel követem.

Rendezetlen fehérjékben a *cisz*-prolin aránya változó (5-20 % között), ezért irodalmi adatok statisztikai elemzésével vizsgálom milyen tényezőktől (környező aminosav típusa, hőmérséklet) függ a *cisz*-prolin aránya.

B) Dolgozatomban második részében gyógyszerhordozó-jelölt, az ERD14 dehidirin lizin gazdag szegmenseiből és az S100 C-terminális régiójából származó peptidek és fluoreszcens festék konjugátumainak szerkezeti hajlamait jellemzem NMR spektroszkópiával, továbbá vizsgálom a peptidek *in vitro* biológiai aktivitását. Részletesen tanulmányozom a kereskedelmi forgalomban izomerkeverékként kapható 5- és 6-karboxifluoreszcein festékekkel jelölt peptidkonjugátumok és a Cf szerkezetének és fluoreszcenciájának változását a pH függvényében fluorimetriával és NMR spektroszkópiával. Vizsgálom, okoz-e változásokat a sejtpenetrációs tulajdonságokban és szerkezetben a peptidekhez kapcsolt fluoreszcens festék. Célozom továbbá a hordozó jelölt Cf-peptidek *in vitro* biológiai aktivitás jellemzése citotoxicitás, citosztázis szempontjából MonoMac6 monocita és A431 laphámrák sejtvonalakon. Vizsgálom a fluoreszcens festékekkel jelölt peptidek sejten belüli lokalizációját mindkét sejtvonalon, illetve arra is keresem a választ, hogy a Cf-konjugátumok milyen mechanizmussal jutnak a sejtekbe.

Az ERD és S100 peptidek membránkötődését PC bicellák jelenlétében tanulmányozom.



C) Doktori munkám része továbbá globuláris, kanonikus, SGPI-2 és SPINK1-vázú szerin proteáz inhibitorok szerkezetvizsgálata. A Laskowski és munkatársai által létrehozott vázszerkezet-függetlenség-modell alkalmazhatóságát vizsgálom az SGPI-2 és SPINK1 variánsok esetében. Vizsgálom, hogy a hurokrégió cseréje hogyan változtatja meg a kimotripszinhez való affinitást, illetve van-e változás a vázszerkezetben. Az utóbbi kérdések megválaszolásához az SGPI-2 és SPINK1 kimotripszinhez optimált és hurokcserélt variánsok szerkezeti és dinamikai jellemzését végzem.

### 3. Módszerek

#### 3.1. Fehérjeexpresszió és mintaelőkészítés

A tanulmányozott fehérjék és peptidek előállítása tudományos együttműködések keretében történt, ezek a feladatok nem képezték doktori munkám részét, ezért a következő fejezetben csak röviden ismertetem leírásukat. A részletes előállítási protokollok megtalálhatók a hivatkozásoként megadott közleményekben.

##### 3.1.1 p53 TAD<sup>1-60</sup> előállítása és foszforilációja

A rendezetlen p53 TAD<sup>1-60</sup> és a CK2 fehérjéket Dr. Ecsédi Péter állította elő Dr. Nyitray László laboratóriumában az ELTE Biokémia Tanszékén. A fehérjék bakteriális expresszióval, *E. coli* BL21 (DE3) sejtekben készültek. A transzformált kultúrák 100 µg ml<sup>-1</sup> ampicillin tartalmú Luria-Bertani (LB) tápoldatban 37°C voltak növesztve, amíg az optikai denzitás elérte 600 nm hullámhosszon a 0,8 értéket. Az izotópjelölt (<sup>15</sup>N ill. <sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N) p53 TAD fragmensek előállításához a sejteket minimál tápoldatba helyezték át. A tápoldat összetétele a következő volt: 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8,5 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 18,7 mM <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl és 22,2 mM glükóz a <sup>15</sup>N-jelölt, illetve 22,2 mM <sup>13</sup>C-jelölt glükóz a <sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N-jelölt fehérjékhez. A sejteket 0,5 mM IPTG hozzáadásával indukálták 18°C-on 16 órán keresztül. A sejtelleket 20 mM Tris, 300 mM NaCl, 0,1 mM TCEP, 1 mM PMSF tartalmú, pH=8 oldattal vagy 20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0,1 mM TCEP és 100µg/ml DNáz tartalmú, pH=7,5 oldatban újrasszuszpendálták, majd feltárták. A sejtizátumokat centrifugálták (48 000 g, 20 perc, 4°C), majd GST-affinitás kromatográfiás oszlopon tisztították. A CK2 fehérjét dializálták 50 mM Tris, 100 mM NaCl és 0,1 mM TCEP tartalmú oldatból, majd felhasználásig -80°C-on tárolták. A p53 TAD esetén a GST-tag eltávolítása TEV proteázzal 16 óra alatt, szobahőmérsékleten történt, majd a fordított fázisú HPLC segítségével (Jupiter 300 C5 oszlop (Phenomenex)) tisztították, és -20°C-on tárolták.

A p53 TAD foszforilációja 20 mM HEPES, 50 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM TCEP tartalmú, pH=7,5-es oldatban történt. Az ATP-t ötszörös, a CK2 kinázt húszszoros feleslegben adtuk a fehérjéhez, majd 12-36 órán keresztül inkubáltuk. A minta fordított fázisú HPLC felhasználásával lett tisztítva.

Az NMR mérésekhez a következő összetételű mintákat készítettem: 1 mM  $^{15}\text{N}$ -vagy  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -jelölt p53 TAD<sup>1-60</sup>, 20 mM MES, 20 mM NaCl, 10 mM TCEP, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 3 mM NaN<sub>3</sub>, 10% D<sub>2</sub>O, 1% DSS, pH=6,0.

### 3.1.2. Lizin gazdag peptidek előállítása

A peptideket Dr. Tóth Gábor és munkatársai állították elő a Szegedi Tudományegyetem Orvosi Vegytani Intézetben szilárdfázisú peptidszintézissel, automata peptidszintetizátorral. Az előállított peptidek adatait az 1. táblázat tartalmazza.

**1.táblázat** A vizsgált peptidek és 5-, ill. 6- karboxifluoreszcein-jelölt konjugátumok adatai. A táblázat tartalmazza a számított monoizotópos és mért molekulatömeget és a RP-HPLC-n mért retenciós időt.

Kód	Szekvencia	$M_{\text{számított(mono)}}$	$M_{\text{mért}}$	$R_t / \text{min}$
ERD-A	DRGLF DFLGK KK	1422,787	1422,650	15,1
ERD-B	EKKGF MECLK EKLPG	1760,975	1760,933	14,4
ERD-C	EKKGI LEKIK EKLPG	1709,035	1709,060	14,9
S100	FFEGF PDKQP RKK	1622,846	1622,400	13,0
6-Cf-ERD-A	6-Cf-DRGLF DFLGK KK	1781,107	1781,013	18,1
6-Cf-ERD-B	6-Cf-EKKGF MECLK EKLPG	2119,295	2119,155	16,7
6-Cf-ERD-C	6-Cf-EKKGI LEKIK EKLPG	2067,355	2067,307	17,0
6-Cf-S100	6-Cf-FFEGF PDKQP RKK	1981,166	1981,277	17,9
5-Cf-ERD-A	5-Cf-DRGLF DFLGK KK	1781,107	1780,943	18,3
5-Cf-ERD-B	5-Cf-EKKGF MECLK EKLPG	2119,295	2119,500	16,9
5-Cf-ERD-C	5-Cf-EKKGI LEKIK EKLPG	2067,355	2067,453	17,2
5-Cf-S100	5-Cf-FFEGF PDKQP RKK	1981,166	1981,100	18,3

A kapcsoláshoz TentaGel S Ram gyantát használtak. Az 5(6)-karboxifluoreszceint (3 ekvivalens, 0,15 mmol, 56 mg) manuálisan a peptidek (0,05 mmol peptid, 297 mg gyanta) N-terminális végéhez kapcsolták HOBT (3 ekvivalens, 0,15 mmol, 22,9 mg) és DCC (3 ekvivalens, 0,15 mmol, 30,9 mg) felhasználásával DMF oldószerben. A peptideket a gyantáról 90% TFA, 5% víz, 2,5% DTT, 2,5% TIS eleggyel hasították le. A nyers Cf-peptideket fordított fázisú HPLC

segítségével tisztították PerfectSil 100 ODS-3 5 $\mu$ m (C18, 250 x10 mm) gradiens elúciós módszerrel acetonitril-víz 0,1%-os TFA-tartalmú elegyét használva. Az elúció során az 5- és 6-Cf-peptideket elválasztották, liofilizálást követve tisztaságukat tömegspektrumóval és NMR segítségével ellenőrizték. A tömegspektrumok és a HPLC kromatogramok minden peptid esetén megtalálhatók a doktori értekezés alapját képező publikációban. Az NMR mérések alapján az ERD-A, C és S100 peptidek 100%-ban az adott Cf-izomert tartalmazzák, míg az ERD-B esetén 4:1 keresztszennyezés mutatható ki mindkét Cf izomer esetén.

### 3.1.3. Szerin proteáz inhibitorok előállítása

Az SGPI-2 és SPINK1 variánsok expresszióját, stabilitásvizsgálatait Dr. Boros Eszter végezte Dr. Pál Gábor laboratóriumában, az ELTE Biokémia Tanszékén. A CD spektroszkópiai méréseket és értékeléseit Dr. Kardos József, az MD szimulációkat és értékelésüket Dr. Micsonai András (ELTE Biokémia Tanszék) végezte.

Az előállított fehérjék adatait a 2. táblázatban tüntettem fel. Az inhibitorok előállításának fő lépései megegyeznek a p53 TAD fehérje esetében leírtakkal. Eltérés, hogy az expresszióhoz más típusú *E. coli* sejteket (SHuffle T7 Express) használtak.

Az NMR méréseket az természetes izotóp előfordulású SGPI-2 fehérje mintákon végeztem. A minták összetétele a következő volt: 1 mM SG4, ill. SG5, 10 mM MES, 50 mM NaCl, 5  $\mu$ l DSS. Az oldatok pH-ja 6,5 volt.

A <sup>15</sup>N-jelölt SPINK1 variánst tartalmazó minták összetétele szintén 1 mM fehérje, 10 mM MES, 50 mM NaCl, 5  $\mu$ l DSS, 90% H<sub>2</sub>O-10% D<sub>2</sub>O volt. A vizsgált oldatok pH-ja 3,0 volt, mivel ennél magasabb pH-n a fehérje jelei kiszélesedtek. A <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N-jelölt SP5 és jelöletlen vad típusú SPINK1 fehérjét 50 mM foszfátpufferben vizsgáltam pH=3,0 ill. 3,5 oldatban. A végtérfogat 500  $\mu$ l volt, az oldószer 90% H<sub>2</sub>O-10% D<sub>2</sub>O volt.

**2. táblázat** A vizsgált szerin proteáz inhibitorok. A fágbemutatással készült mutánsok közül a kimotripszinhez kötődő variánsok esetén a konszenzus hurok az adott váz P4-P4' pozícióban a leggyakrabban előforduló aminosavakat tartalmazza. A hurokcsereált variáns a másik vázra jellemző konszenzus szekvenciát tartalmazza. Mindegyik inhibitor az N-terminálison GSG klónozási terméket tartalmaz. A hurokrégiót félkövér betűvel jelöltem.

<b>Minta</b>	<b>Kód</b>	<b>Izotópjelölés</b>	<b>Aminosav szekvencia</b>
SGPI-2 váz, konszenzus hurokszekvenciával	SG4	természetes előfordulás	<i>GSGEVTCEPGTTFKDKCNTCRCS</i> <b>DGKSACTMKMCKQ</b>
SGPI-2 váz, hurokcsereált variáns	SG5	természetes előfordulás	<i>GSGEVTCEPGTTFKDKCNTCRCS</i> <b>DGKSAGCTFILCPQ</b>
SPINK 1 váz, konszenzus hurokszekvencia	SP5	<sup>15</sup> N és <sup>13</sup> C, <sup>15</sup> N-jelölt	<i>GSGDSLGREAKCYNELNGCTFILK</i> <b>PVCGTDGNTYPNECVLCFENRKRQ</b> TSILIQKSGPC
SPINK 1 váz, hurokcsereált variáns	SP6	<sup>15</sup> N-jelölt	<i>GSGDSLGREAKCYNELNDCTMKM</i> <b>AKVCGTDGNTYPNECVLCFENRKR</b> QTSILIQKSGPC
vad típusú SPINK 1		természetes előfordulás	<i>GSGDSLGREAKCYNELNGCTKIYD</i> <b>PVCGTDGNTYPNECVLCFENRKRQ</b> TSILIQKSGPC

### 3.1.4. Membránmimetikumok előállítása

A lipideket (DHPC, 1,2- dihexanoil-sn-glicero-3-foszfokolin; DMPC, 1,2-dimirisztoil-sn-glicero-3-foszfokolin) >99%-os tisztaságú por formában szereztük be kereskedelmi forgalomból (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA), és további tisztítás nélkül kerültek felhasználásra.

A bicella mintákban a lipidek aránya  $q=[DMPC]/[DHPC]=0,5$  volt, a DHPC koncentráció 300 mM, a DMPC koncentráció 150 mM volt.

A bicella előállítás első lépésében minden mintához külön DHPC oldatot készítettem desztillált vízzel. Egy centrifuga csőbe bemértem a megfelelő mennyiségű DMPC-t, majd desztillált vízzel vortex-keverő segítségével szuszpenziót hoztam létre. A

szuszpenzióhoz részletekben, folyamatos rázatás közben hozzáadtam a DHPC-törzsoldatot. A DHPC hozzáadására színtelen oldatot kaptam. A mintát néhány percre állni hagytam, a habzás befejeződése után a minta végtérfogatát desztillált vízzel 500 µl térfogatra állítottam be. NMR minták esetén a pontos térfogatra állítás során 50 µl D<sub>2</sub>O-t is adtam az oldathoz. Ezt követően a mintákat 5 percre 70°C-os szárítószekrénybe tettem. Ezután az oldatot 5 percet jeges vízben hűtöttem. A folyamatot (melegítés-hűtés) háromszor ismételttem, majd a mintát szobahőmérsékleten legalább 12 órán át állni hagytam az egyensúly beállításáig.

A minták reprodukálhatóságát <sup>1</sup>H és <sup>31</sup>P NMR mérésekkel ellenőriztem.

### 3.2. NMR mérések

A dolgozatomban bemutatott <sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C NMR méréseket egy 16,4 T (<sup>1</sup>H: 700,05 MHz) Bruker Avance III 5mm-es szobahőmérsékletű, z-gradienssel ellátott TXI mérőfejjel, illetve egy 5mm-es Prodigy hűtött TCI H&F-C/N-D z-gradienssel ellátott mérőfejjel rendelkező készüléken végeztem. A <sup>31</sup>P méréseket egy 5.872 T (<sup>1</sup>H: 250,130 MHz, <sup>31</sup>P: 101,25 MHz) Bruker Avance készüléken végeztem.

A kiértékelések során a jelöletlen fehérjékről és peptidekről (SG4, SG5, vad típusú SPINK1, ERD-A, ERD-B, ERD-C, S100) 2D <sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H-TOCSY, <sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H-NOESY, illetve <sup>1</sup>H,<sup>15</sup>N-SOFAST-HMQC, <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C-HSQC spektrumokat vettem fel. Az <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H homonukleáris spektrumok tipikusan 2048 x 512 felbontás mellett készültek. A TOCSY felvételeket 80 ms keverési idővel, a NOESY felvételeket 120-300 ms keverési idővel futtattam, a tranziensek száma mintától függően 8, 16 vagy 32 volt. A jelöletlen fehérjékről a <sup>1</sup>H,<sup>15</sup>N-SOFAST-HMQC spektrumok tipikusan 1024 x 256 felbontással, 160-640 ismétléssel készültek, amelyek 1-4,5 óra mérési időt jelentettek. Az <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C-HSQC spektrumokat általában 1024 x 256 felbontással, 8, 16, 32 vagy 64 tranzienssel vettem fel, egy mérés hossza tipikusan 1,5-5 óra volt.

A <sup>15</sup>N-jelölt fehérjék (SP5, SP6 és p53 TAD) esetén 2D <sup>1</sup>H,<sup>15</sup>N-SOFAST-HMQC, <sup>1</sup>H,<sup>15</sup>N-HSQC, 3D <sup>15</sup>N-HSQC-TOCSY, 3D <sup>15</sup>N-HSQC-NOESY mérések készültek. A 2D mérések általában 1024 vagy 2048 x 256 felbontásúak, a tranziensek száma <sup>1</sup>H,<sup>15</sup>N-SOFAST-HMQC 2, <sup>1</sup>H,<sup>15</sup>N-HSQC spektrumok esetén 8 vagy 16 volt. A 3D <sup>15</sup>N-HSQC-TOCSY esetén 70 ms, 3D <sup>15</sup>N-HSQC-NOESY mérésnél 120 ms volt a keverési idő. Az utóbbi két esetben 8, 16 vagy 24 ismétléssel futtattam a méréseket.

$^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -jelölt SP5 és p53 TAD esetén  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC, BEST típusú 3D HNCA, HNCOCA, HNCACB, HNCOCACB, HNCO, HNCACO, illetve klasszikus CCONNH és 3D HNHA spektrumokat vettem fel. A rendezetlen, prolin-gazdag p53 TAD esetén  $^{13}\text{C}$ - és  $^1\text{H}^\alpha$ -detektált mérések segítettek a jelhozzárendelést. A  $^1\text{H}^\alpha$ - és  $^{13}\text{C}$ -detektált mérések adatait az 3. táblázat tartalmazza.

**3. táblázat**  $^1\text{H}^\alpha$ - és  $^{13}\text{C}$ -detektált mérések paraméterei

Mérés	Felbontás			tranziensek száma	Mérési idő
	F3	F2	F1		
2D SHACA-HSQC	-	4096 ( $\text{H}^\alpha$ )	1024 ( $\text{C}^\alpha$ )	2 8	36 min 2 h 25 min
3D HCAN	2048 ( $\text{H}^\alpha$ )	80 ( $\text{C}^\alpha$ )	64 (N)	8	14 h
3D HCACON	2048 ( $\text{H}^\alpha$ )	128 ( $\text{C}^\alpha$ )	80 (N)	8	21 h
3D HCANCO	2048 ( $\text{H}^\alpha$ )	128 ( $\text{C}^\alpha$ )	64 ( $\text{C}'$ )	16	37 h
3D Pro-(HCA)NCACBHA	4096 ( $\text{H}\alpha\delta$ )	128 (C)	64 (C)	8	29 h
3D Pro-(H)CGCBCAHA	4096 ( $\text{H}^\alpha$ )	512 ( $\text{C}^\alpha$ )	16 (C)	4	15 h
2D CACO*	-	4096 ( $\text{C}^\alpha$ )	1024 ( $\text{C}'$ )	32	8 h
3D HCANCAACO*	2048 ( $\text{C}^\alpha$ )	80 ( $\text{C}'$ )	128 (N)	16	50 h
2D CON*	-	2048 (C)	512 (N)	32	6 h 20 min
3D HACANCOCAH	2048 ( $\text{H}^\alpha$ )	64 (N)	80 ( $\text{C}'$ )	8	14 h 30 min

\*  $^{13}\text{C}$ -detektált mérések

A  $^{15}\text{N}$ -jelölt SP5 szerin proteáz inhibitor esetében a gerincdinamikai vizsgálatokat  $T_1$ ,  $T_2$  relaxációs mérésekkel és heteronukleáris NOE (HETNOE) mérésekkel végeztem. A  $T_1$  mérések esetén a késleltetési időt 11 lépésben változtattam 0,1 és 4,0 s között, míg a  $T_2$  mérésnél 12 lépésben 0,017 és 1,018 s között. A jelintenzitás-késleltetési idő összefüggésekre exponenciális görbe illesztésével a  $T_1$ ,  $T_2$  relaxációs idők meghatározhatók az egyes aminosavakra. A HETNOE mérés esetén a peptidgerinc

dinamikájáról az amid proton telítésével és anélküli felvett spektrumok az intenzitásaránya ad információt. Ebben az esetben a spektrumok között 7 s hosszú volt a várakozási idő.

Munkám során a bicellák és peptidek translációs diffúziós együtthatóit PFG-NMR mérések alapján a Stejskal-Tanner-egyenlet szerint határoztam meg. Az egyenlet szerint a jelintenzitás ( $I$ ) a gradienserősség ( $G$ ) függvényében csökken

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

ahol  $I_0$  a kezdeti jelintenzitás,  $D$  a translációs diffúziós együttható,  $\gamma$  a giromágneses együttható,  $\delta$  gradiens időtartama,  $G$  gradienserősség,  $\Delta$  a diffúziós idő. A mérés során a  $\delta$  és  $\Delta$  paramétereket állandó értéken tartjuk, a gradienserősséget több lépésben változtatjuk.

A mérések során a standard stimulált echo pulzusszekvenciát használtam bipoláris gradiens pulzusokkal, WATERGATE vízelnyomás alkalmazásával. A gradiens pulzus hosszát és a diffúziós időt minden mintára külön-külön optimalizáltam. A gradienserősséget 5-95% között 16 vagy 64 pontban lineárisan változtattam. A megfelelő jel/zaj viszony eléréséhez az ismétlések száma tipikusan 8 volt. A bicella lipidkomponenseire optimált paraméterek  $\delta=4$  ms,  $\Delta=250-600$  ms voltak, az ismétlések közötti várakozási idő ( $D1$ ) 1,5 s volt.

Az NMR mérések során a processzálást, az 1D és a PFG-NMR mérések kiértékelését TopSpin 3.6.0 programmal végeztem. A 2D spektrumokat a Sparky, a 3D spektrumokat a CARA 1.8.4.2 programmal értékeltem. A  $T_1$ ,  $T_2$  és HETNOE mérések elemzését a Bruker Dynamics Center programmal végeztem.

### 3.3. Jelhozárrendelés menete 3D spektrumokban

Az  $^1\text{H}^{\text{N}}$ -detektált mérések esetén a 2D alapspektrum egy  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC volt, amelyek az amid H és N korrelációját tartalmazzák. A 3.D dimenzióban  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -jelölt minta esetén az adott amidhoz rendelhető  $^{13}\text{C}$  környezeteket detektálhatjuk. A leggyakrabban használt spektrumok és komplementer méréseik (HNCA és komplementer mérése a HNCOCA, a HNCACB és a HNCOCACB, illetve a HNCO és HNCACO) segítségével a spinrendszerek azonosíthatók (6. ábra)

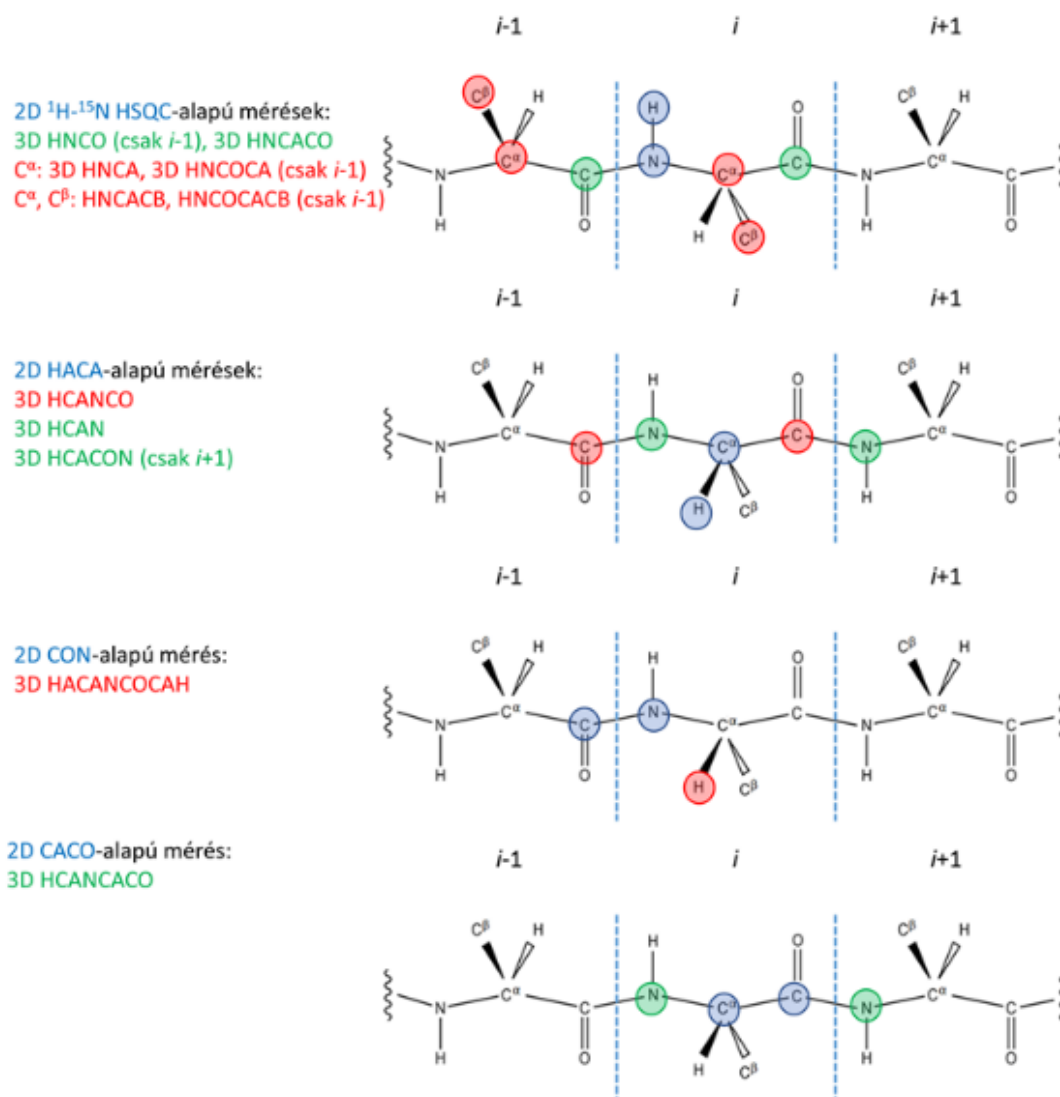
$^1\text{H}^{\alpha}$ -detektált NMR mérések esetén a 2D alapspektrum SHACA-HSQC volt, amely a  $\text{H}^{\alpha}\text{-C}^{\alpha}$  korrelációkat mutatja. A jelazonosításhoz a 3D HCAN, HCANCO,



HCACON spektrumokat használtam. HCAN esetén a 3. dimenzióban adott aminosavhoz tartozó N és az  $(i+1)$ -edik N jeleit, a komplementer HCACON esetén csak  $(i+1)$ -edik N jelet detektáljuk. A HCANCO spektrumon az  $i$ -edik és  $(i-1)$ -edik C' jelek azonosíthatók (6. ábra).

A széndetektált 2D CON spektrum az  $i$ -edik aminosavhoz tartozó N és az  $(i-1)$ -edik C' atomok korrelációját mutatja. A 3D HACANCOAH esetén az  $i$ -edik H $^{\alpha}$  atomot detektáljuk (6. ábra)

A szintén széndetektált 2D CACO mérés esetén az összetartozó C $^{\alpha}$  és C' atomok korrelációját detektáljuk. A szekvenciális sorba rendezést 3D HCANCACO spektrum segítségével végeztem, ahol a 3. dimenzióban az  $i$ -edik és az  $(i+1)$ -edik atomhoz tartozó N atomokat detektáljuk (6. ábra)



6. ábra A jelhozrendelés menete az eltérő detektálási módszerek esetén.

### 3.4 Fluorimetriás mérések

A fluorimetriás méréseket Dr. Bősze Szilvia és Horváth Lilla segítségével a ELKH-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportban végeztük.

Az 5- és 6-Cf-peptid konjugátumokat DMSO-ban oldottuk, majd desztillált vízzel hígítva 625  $\mu\text{M}$  koncentrációjú törzsoldatot készítettünk. Párhuzamosan 0,1 M citromsav és 0,2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -oldatok felhasználásával a következő pH-jú puffereket állítottuk elő: 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 7,6. A Cf-peptid-törzsoldatokból 30  $\mu\text{l}$ -t adtunk 2970  $\mu\text{l}$  pufferoldathoz, így a végső peptidkoncentráció 6,25  $\mu\text{M}$  lett.

A fluoreszcencia intenzitást Varian Cary Eclipse spektrofluoriméteren (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) mértük. A gerjesztő hullámhossz 488 nm volt, a detektált emissziós spektrumot 490-700 nm között vettük fel. A detektor feszültség 450 V volt (6-Cf-ERD-C esetén 400 V volt).

### 3.5. *In vitro* sejtpenetrációs mérések

A lizin-gazdag peptidek és Cf-peptid-konjugátumok *in vitro* sejtbefutási vizsgálatait Dr. Bősze Szilvia és Horváth Lilla segítségével a ELKH-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportban végeztük, ebben a munkában én is aktívan részt vettem. A konfokális lézer-pásztázó mikroszkóp felvételeit Babiczky Ákos a ELKH-TTK, Kognitív Idegtudományi és Pszichológiai Intézetből készítette.

A vizsgálatokhoz MonoMac6 humán monocita leukémia (Ziegler-Heitbrock és mtsai 1988) és A431 humán laphám karcinóma sejtvonalakat (Giard és mtsai 1973) használtam.

Az *in vitro* sejtpenetrációs hatás meghatározásához az A431 és MonoMac6 sejtek az exponenciális növekedési fázisban 24-lyukú szövettenyésztő lemezre kerültek, a sejtszám  $10^5$  sejt/1 ml/lyuk volt. A peptidekből szérumentes RPMI-1640 médium (ICM) és 10% desztillált víz vagy DMEM felhasználásával hígítási sort készítettünk 6,25 - 50 vagy 0,2 – 25  $\mu\text{M}$  koncentrációtartományban. A sejteket 0,5, 1,5 és 3 órán át kezeltük a peptidtartalmú oldatokkal. Kontrollként a peptidet nem tartalmazó oldószert használtuk. A membránkötött és nem internalizálódott peptidek eltávolítására a sejteket 100  $\mu\text{l}$  tripszinnek kezeltük. A tripszin aktivitását 800  $\mu\text{l}$  10% FBS tartalmú HPMI segítségével állítottuk meg. A sejtek FACS csövekbe tettük át, centrifugáltuk (5 perc, 1000

fordulat/perc), majd a felülúszó eltávolítása után 300 µl HPMI-t adtunk a sejtekhez. Az intracelluláris fluoreszcencia intenzitást BD LSR II áramlási citométerrel mértük meg.

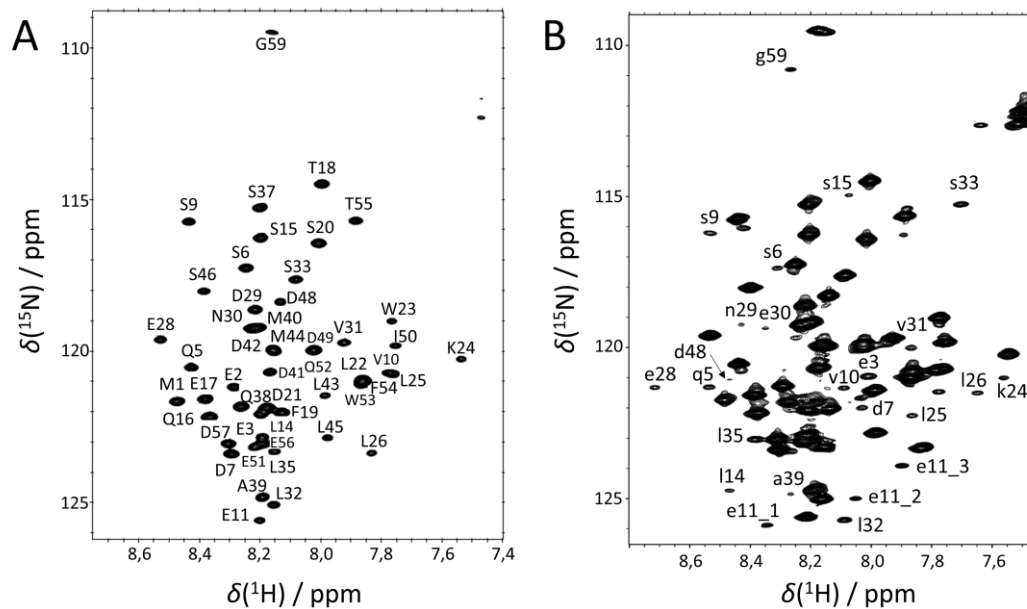
A mikroszkópos mérésekhez a sejtek 24-lyukú szövettenyésztő lemezre osztása 24 órával a kezelés előtt történt ( $10^5$  sejt/lyuk). Másnap a sejteket a peptidek 25 µM-os oldatával (oldószer: 90 V/V% DMEM ICM-10 V/V % desztillált víz) 90 percig kezeltük. A lizozómákat LysoTracker Deep Red festékkal, a sejtmagot Hoechst 33342 festékkal festettük, majd a festések után a sejteket ICM oldattal mostuk. A sejteket 4 %-os paraformaldehid oldattal 20 percen keresztül fixáltuk. Ezt követően háromszor PBS oldattal mostuk őket. Végül Mowiol 4-88 oldattal rögzítettük őket a tárgylemezre. A felvételek egy Zeiss LSM-710 konfokális mikroszkóppal (40×/1.4 Plan-Apochromat olajimmerziós objektív) készültek.

## 4. Eredmények

### 4.1 p53TAD<sup>1-60</sup> NMR spektroszkópai vizsgálata

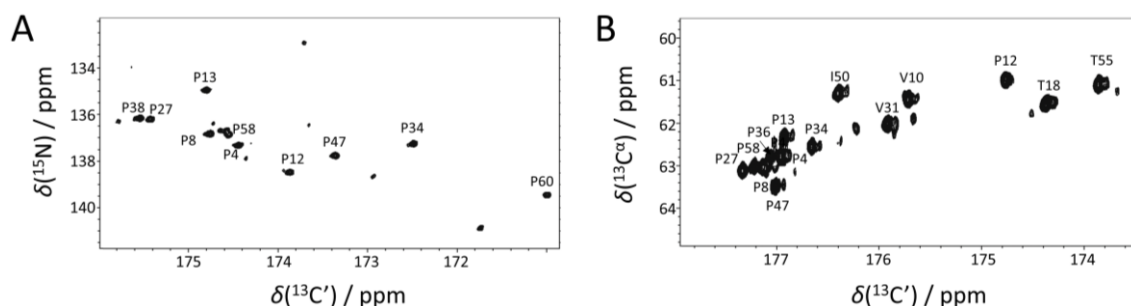
#### 4.1.1. Minor konformerek detektálása a p53TAD<sup>1-60</sup> fehérjében

A prolin *cisz-transz* izomerizáció jelenség tanulmányozásához a modellrendszer a rendezetlen p53 TAD<sup>1-60</sup> fehérje volt. A TAD domén 60 aminosav hosszú, 10 darab prolint tartalmaz (3. ábra). A <sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N-jelölt mintán a főkomponens esetén (a nem detektálható prolinok kivételével) a jelhozzárendelés 100%-ban megvalósult <sup>1</sup>H<sup>N</sup>-detektált mérésekkel. A <sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N-HSQC spektrumon, a főjelek mellett 30 darab minor jelet detektáltam, melyek közül 20 darabot azonosítottam (7. ábra). A 3D spektrumok analizálásával megállapítottam, hogy a minor jelek a prolinok környezetében található aminosavakhoz tartoztak. Azokban a régiókban, ahol a prolinok egymáshoz közel találhatók, egy aminosavhoz több minor jel is rendelhető. Például a G59-hez (P58, P60) 2 darab, az E13-hoz (P8, P12, P13) pedig 3 darab kis intenzitású jel tartozik. A legnagyobb nehézséget az okozza az amid detektálás esetén, hogy a prolinok nem jelennek meg, ezért a különböző minorok nem köthetők össze sem a többi minorral, sem a főkomponenssel.



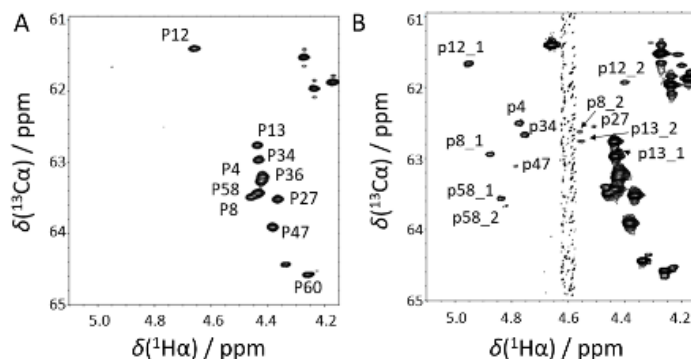
7. ábra A p53 TAD fehérje <sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N-HSQC spektruma: a főkomponens jelei (A) és a minor konformerek jelei ugyanezen spektrumrészleten nagyítva (B).

A prolinok jelei azonosításához és szekvenciális sorba rendezéséhez  $^{13}\text{C}$  és  $^1\text{H}^\alpha$ -detektált megközelítéseket alkalmaztam. A  $^{13}\text{C}$ -detektált 2D CON és 2D CACO alapú spektrumokat vettem fel (8. ábra). A fő komponens esetén a jelhozrendelés 100%-os volt mindkét megközelítés esetén. A minor konformerek esetén a széndetektált mérésekkel a P4, P8, P12, P13, P34 és P60 aminosavakhoz tartozó minor jeleket sikerült detektálni. A jelhozrendelés azonban nem volt lehetséges kizárólag a szén-detektált spektrumok alapján. Ennek fő okai azok voltak, hogy a CON és CACO mérések (8. ábra) esetén a megfelelő jel/zaj eléréséhez a mérési idő jelentősen megnőtt. Egyes 3D mérések esetén többnapos mérési idő sem szolgáltatott megfelelő jel/zaj viszonyt. Továbbá a minor jelek azonosítását nehezítette, hogy a CON spektrumon a nem tökéletes virtuális IPAP lecsatolás miatt kis jelek jelentek meg.



**8. ábra** A prolin régió a 2D CON (A) és a 2D CACO (B) spektrumok részletein. A 2D CON spektrumon a keresztcsúcs az  $i$ -edik aminosav  $^{15}\text{N}$  és az  $(i-1)$ -edik aminosav  $^{13}\text{C}'$  atomjának kémiai eltolódását mutatja.

A  $^1\text{H}^\alpha$  detektált SHACA spektrumon a fő komponensre nézve a jelazonosítás 100%-os volt. Ezen felül 13 minor prolin jelét azonosítottam (9. ábra). Néhány prolinhoz (P8, P12, P13) több minor jel is tartozott.



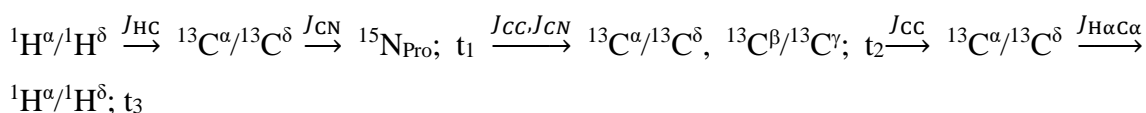
**9. ábra** A SHACA-HSQC spektrum prolin régiója a fő komponens (A) és a minor komponens esetén (B).

## 4.2. Prolin izomerek azonosítása IDP-ben

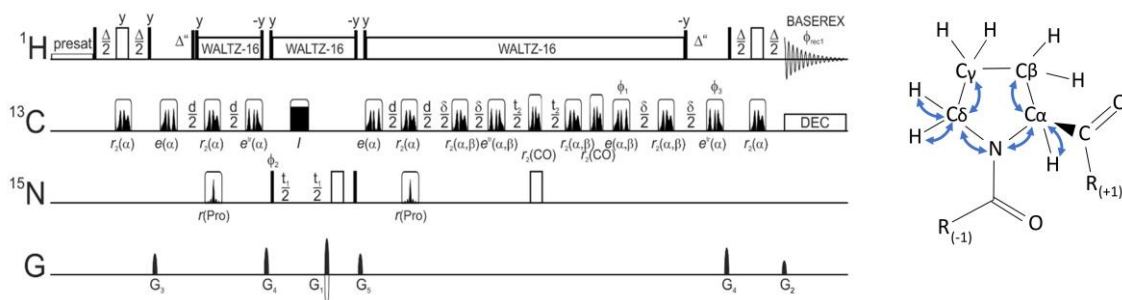
### 4.2.1 Prolin szelektív pulzusszekvenciák

A kis koncentrációban előforduló minor prolinok konformációjának meghatározásához két darab prolin szelektív,  $^1\text{H}^\alpha$ -detektált pulzusszekvenciát dolgoztunk ki. A pulzusszekvenciák a Pro oldallánc  $\text{C}^\beta$  és  $\text{C}^\gamma$  atomjainak szelektív detektálásán alapulnak. Mindkét pulzusszekvenciát a p53 TAD fehérjén teszteltük.

A Pro-(HCA)NCACBHA pulzusszekvencia sematikus ábrázolása az 10. ábrán látható. A HACAN szekvencia módosításával létrehozott szekvenciában a mágnesezettség útja a következő:



$^1\text{H}^\alpha/^1\text{H}^\delta; t_3$

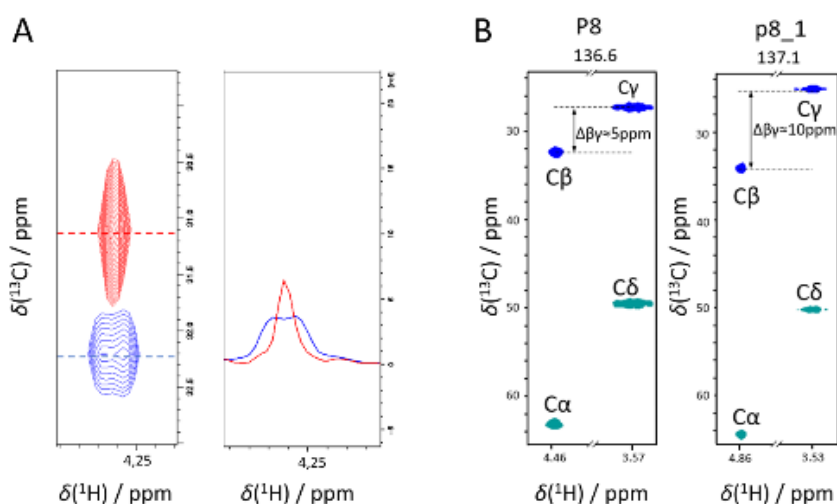


**10. ábra** A Pro-(HCA)NCACBHA pulzusszekvencia sematikus ábrázolása. Jobb oldalon a mágnesezettség útját tüntettem fel. A pulzusszekvenciában a vékony, fekete téglalapok a  $90^\circ$ , a széles, fehér téglalapok a  $180^\circ$ -os kemény pulzusokat jelölik. Az impulzusok fázisai:  $\phi_1=X, -X$ ;  $\phi_2=X, X, -X, -X$ ;  $\phi_3=X, -X, X, -X, -X, X, -X, X$ ;  $\phi_{\text{rec1}}=X, -X, -X, X, -X, X, X, -X$ . A pulzusok közti időintervallumok:  $\Delta=1/(2 \ ^1J_{\text{CH}})$ ,  $\Delta''=1/(3 \ ^1J_{\text{CH}})$ ;  $d=1/(2 \ ^nJ_{\text{CN}})$ ;  $\delta=1/(2 \ ^1J_{\text{CC}})$ .

A  $\text{H}^\alpha$ , illetve a hasonló kémiai eltolódású  $\text{H}^\delta$  atomról indulva a mágnesezettséget sáv szelektív pulzusokkal a  $\text{C}^\alpha$ , illetve a  $\text{C}^\delta$  atomokra, majd a N atomra visszük át. A szekvencia prolin szelektivitásának alapja, hogy kizárólag a prolin  $^{15}\text{N}$  atomja detektálható a 130-145 ppm tartományban. A  $t_1$  evolúciós időt követve a mágnesezettség visszakerül a  $\text{C}^\alpha$ , illetve a  $\text{C}^\delta$  atomra, valamint ezután átvisszük a  $\text{C}^\beta$ , illetve a  $\text{C}^\gamma$  atomra. A  $t_2$  evolúciós idő alatt a két  $^{13}\text{C}$  atompár ( $\text{C}^\alpha$ - $\text{C}^\beta$ , illetve  $\text{C}^\delta$ - $\text{C}^\gamma$ ) közti korreláció fejlődik ki. Ezt követi a mágnesezettség átvitele a  $\text{H}^\alpha$ , illetve  $\text{H}^\delta$  atomra, melyet detektálás követ.

Valós idejű BASEREX lecsatolás során a FID-et 12 darabra csonkoljuk, egy csonk tipikus hossza 10 ms. A két csonk közé beépített szelektív inverziós elem a BIRD<sup>d</sup>. A BASEREX homonukleáris lecsatolás eredményeképpen a jelintenzitás ~1,8-szorosára nő (11/A. ábra).

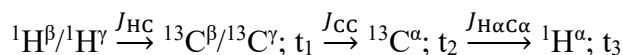
A Pro-(HCA)NCACBHA spektrum 2D alapja <sup>1</sup>H és <sup>15</sup>N dimenziót tartalmaz, ahol a proton dimenzióban egy prolin esetén (egy <sup>15</sup>N kémiai eltolódásnál) a H<sup>α</sup>, illetve H<sup>δ</sup> atomok kémiai eltolódásánál az összetartozó C<sup>α</sup>-C<sup>β</sup> illetve C<sup>δ</sup>-C<sup>γ</sup> atomokhoz tartozó csúcsok jelennek meg (11/B. ábra). Az új szekvencia segítségével nemcsak a főkomponenshez, hanem a minor formákhoz tartozó jelek is detektálhatók.



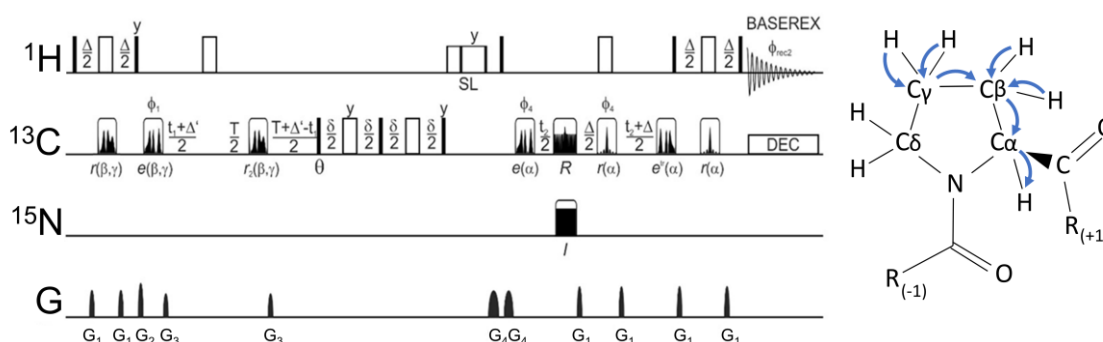
**11. ábra** A Pro-(HCA)NCACBHA mérés első 2D síkja (A) homonukleáris lecsatolás nélkül (kék) és BASEREX beépítésével (piros, 2 ppm-mel elcsúsztatva) és a kiválasztott csúcs 1D szelete (A, jobb) illetve a 3D spektrum részlete egy major (P8) és minor (p8\_1) prolin esetén (B).

A Pro-(HCA)NCACBHA mérés egyik hátránya, hogy a <sup>15</sup>N atomra történő mágnesezettség-átviteli lépés hosszú, ezért a relaxációs folyamatok miatt mágnesezettségvesztés következik be, illetve a prolin konformáció meghatározásához szükséges C<sup>β</sup> és C<sup>γ</sup> kémiai eltolódások különbsége csak közvetetten meghatározható. Ezek a problémák kiküszöbölhetők a Pro-(H)CBCGCAHA kísérlet használatával.

A Pro-(H)CBCGCAHA pulzusszekvencia minimális mágnesezettségátviteli lépést tartalmaz, és direkt korrelációt hoz létre a prolin C<sup>β</sup> és C<sup>γ</sup> atomjai között. A mágnesezettség átviteli lépések a következők:



A prolin oldallánc  $\text{H}^\beta$ ,  $\text{H}^\gamma$  atomok szelektív besugárzását követően a mágneszettség átvitele történik a  $\text{C}^\beta$  és  $\text{C}^\gamma$  atomokra. Konstans idejű  $t_1$  evolúciós idő után a mágneszettséget optimalizált pulzusokkal a  $\text{C}^\alpha$  atomra visszük át. Ha  $\theta=45^\circ$ , akkor a  $\text{C}^\beta$  és  $\text{C}^\gamma$  atomokat detektáljuk. Amennyiben  $\theta=0^\circ$  csak  $\text{C}^\beta$ ,  $\theta=90^\circ$  esetén pedig csak  $\text{C}^\gamma$  detektálható. A  $t_2$  evolúciós idő alatt  $\text{C}^\alpha$  kémiai eltolódás evolúció történik. Ez a szakasz gyakorlatilag egy SHACA-HSQC, és előnye, hogy nagy felbontással futtatható. Ezt követi a mágneszettség átvitele a  $\text{H}^\alpha$  atomra, majd a valós idejű BASEREX homonukleáris lecsatolást tartalmazó adatgyűjtés (12. ábra).

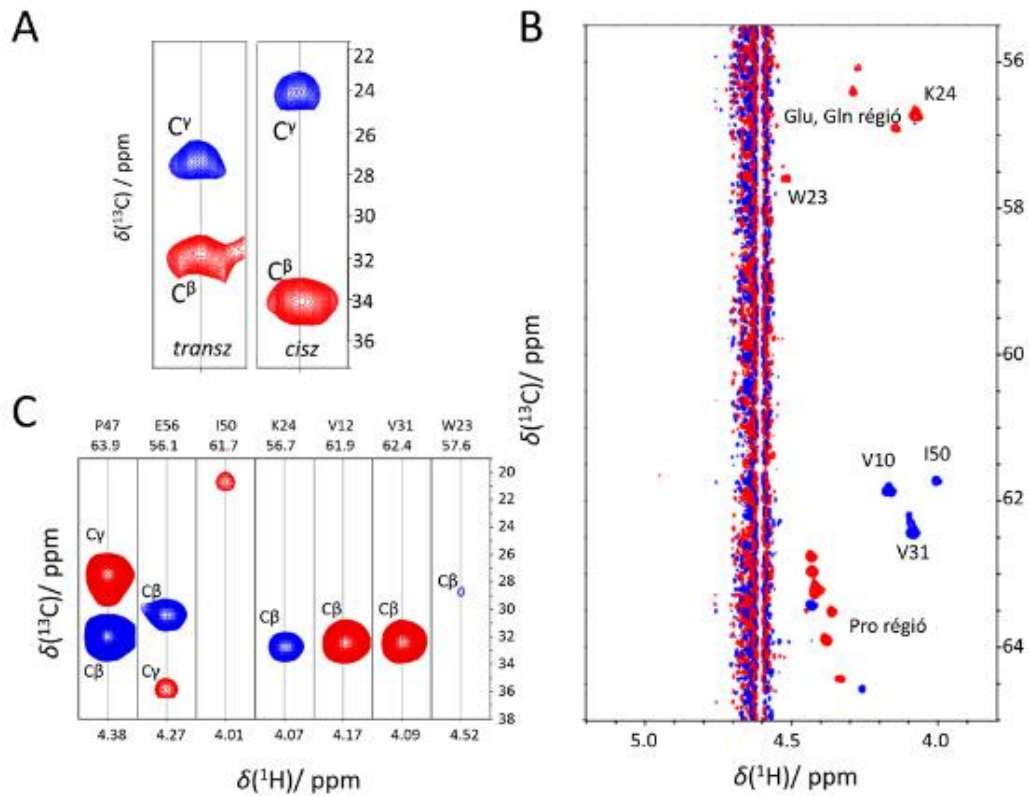


**12. ábra** A Pro-(H)CBCGCAHA pulzusszekvencia a mágneszettség útvonalának jelölésével. A pulzusszekvenciában a vékony, fekete téglalapok a  $90^\circ$ , a széles, fehér téglalapok a  $180^\circ$ -os kemény pulzusokat jelölik. Az impulzusok fázisai:  $\phi_1=x, -x$ ;  $\phi_4=y, -y$ ;  $\phi_{\text{rec}2}=x, -x, -x, x$ . A pulzusok közti időintervallumok:  $\Delta=1/(2 \ ^1J_{\text{CH}})$ ,  $\Delta'=1/(4 \ ^1J_{\text{CH}})$ ,  $\delta=1/(2 \ ^1J_{\text{CC}})$ .

A Pro-(H)CBCGCAHA mérés prolinra szelektív, a 2D alapja SHACA-HSQC ( $\text{H}^\alpha\text{-C}^\alpha$  korreláció), a 3. dimenzióban a prolin  $\text{C}^\beta$  és  $\text{C}^\gamma$  atomját detektáljuk, ellentétes előjellel (13/A. ábra). A pulzusszekvencia érzékeny, a kb. 40-150  $\mu\text{M}$  koncentrációban jelen lévő minor konformerek is detektálhatók.

A Pro-(H)CBCGCAHA nem tartalmaz mágneszettség-átviteli lépést a N atomra, ezért érzékenyebb és gyorsabb. Hátránya, hogy több aminosav oldallánc is tartalmaz atomokat a gerjesztett régióban (ezek a Glu, Gln, Ile, Leu, Lys, Met, Trp, Val). A prolintól eltérő aminosavak oldallánc jelei kis intenzitású, torzult jelként megjelenhetnek a prolinoktól eltérő  $\text{H}^\alpha\text{-C}^\alpha$  tartományban (13/B, C. ábra). Ez a prolin  $\text{C}^\beta$ ,  $\text{C}^\gamma$  azonosítását nem zavarja.





**13. ábra** Sematikus Pro-(H)CBCGCAHA spektrumrészlet *transz* és *cisz*-prolin esetén (A). Szelektivitás Pro-(H)CBCGCAHA spektrumon: első 2D sík (B) és az itt megjelenő aminosavak a 3D spektrum részletei (C). A C ábrán csak olyan aminosavak szerepelnek, ahol a 3. dimenzióban detektálható jel.

#### 4.2.2 Prolin izomerek azonosítása a p53TAD<sup>1-60</sup> esetén

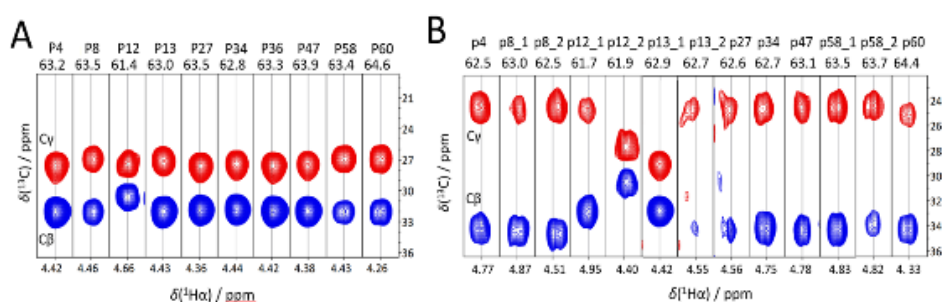
A SHACA-HSQC spektrumon több minor prolin jelet azonosítottam, a jelazonosítás a HCAN és HCANCO spektrumok alapján történt. A minor konformer arányának meghatározásához a SHACA-HSQC és a  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC spektrumból származó major és minor jelek integrálását a TopSpin programmal végeztem. A 2D síkból származó 1D spektrumból integráltam a prolin és nem prolin aminosavakhoz tartozó főkomponenshez és minor konformerhez tartozó csúcsokat. A minor konformer arányát a  $\text{minor}(\%) = \frac{[cisz]}{([cisz] + [transz])} \cdot 100\%$  egyenletből határoztam meg. Az eredményeket a 4. táblázatban tüntettem fel. Az eredményeket összevetve azt tapasztaljuk, hogy a prolin, illetve a környező aminosavak minor jelei közt nincs jelentős eltérés, és a *cisz*-prolin hatása a prolintól távolodva csökken.

4. táblázat A detektált minor jelek kémiai eltolódása és a minor konformer aránya.

Aminosav	Kémiai eltolódás		Minor%	
	C <sup>α</sup>	H <sup>α</sup>	SHACA-HSQC	<sup>1</sup> H, <sup>15</sup> N-HSQC
E3	53,78	4,43		7,3
P4	62,48	4,77	11,7	
Q5	56,13	4,33		9,2
S6	57,54	4,18		10,8
D7	51,89	4,7		8,7
P8_1	62,92	4,88	8,9	
_2	62,63	4,56	9,7	
S9	58,57	4,53		11,1*
V10	61,79	4,19		5,4
E11_1	53,01	4,43	8,9	7,1
_2	53,67	4,69	4,5*	8,6
_3	53,88	4,61	*	7,0
P12_1	61,69	4,96	13,1	
_2	62,75	4,55	8,1	
P13_1	62,93	4,42	*	
_2	61,93	4,40		
L14	55,73			7,6
K24	56,63	4,13		8,9
L25	54,86	4,20		
L26	52,58	4,37		7,0
P27	62,54	4,51	5,4	
E28	57,03	4,25		6,7
N29	52,98	4,63		7,8
N30	53,23	4,42		4,8
V31	61,34	4,04		7,8
L32	55,53	4,32		13,7
S33	55,81	4,37		8,6
P34	62,68	4,75	12,4	
L35	53,39			17,9*
P36			nem detektálható	
A39	52,60	4,29		6,4
P47	63,11	4,78	4,7	
D48	54,56			4,6
P58_1	63,56	4,84	6,8	
_2	63,66	4,82	5,7	
G59_1	44,49	4,03		6,6
_2	44,19	3,75		3,2
P60	64,43	4,43	34,4	

\*jelátfedés

A prolin *cisz-transz* izomerek azonosításához a fő komponensben és a minor formák esetén a 2 új pulzusszekvenciát használtam (Pro-(HCA)NCACBHA és Pro-(H)CBCGCAHA). Az adott prolinokhoz tartozó spektrumrészletek az 14. ábrán láthatók, a  $C^\beta$  és  $C^\gamma$  atomok kémiai eltolódás különbsége ( $\Delta\beta\gamma$ ) alapján határoztam meg a prolinok konformációját (5. táblázat). A mérések alapján a fő komponensben a prolinok a vártnak megfelelően *transz* térállásúak, míg a 13 detektált minor prolinból 11 *cisz* és 2 *transz*. A *transz*-prolinok a P12-P13 esetén jelennek meg, a 3D HCAN és 3D HCANCO spektrumok alapján a minor *cisz*-P12-*transz*-P13 (p12\_1 és p13\_1) és *transz*-P12-*cisz*-P13 (p12\_2 és p13\_2) aminosavak köthetőik össze.



**14. ábra** A p53 TAD prolin jeleihez tartozó 3D Pro-(H)CBCGCAHA spektrumrészletek: fő komponens (A) és a minor konformerek esetén (B). A spektrumszeletek az összetartozó  $C^\beta$  és  $C^\gamma$  atomokat mutatják.

**5. táblázat** Prolin izomerek a p53 TAD főkomponensében és a minor konformerek esetén. A prolin konformációt  $\Delta\beta\gamma$  alapján határoztam meg, a minor konformerek arányát 0,5%-ra kerekítve adtam meg.

Prolin	Major		Minor		
	$\Delta\beta\gamma$ / ppm	prolin konformáció	$\Delta\beta\gamma$ / ppm	prolin konformáció	Minor %
P4	4,7	<i>transz</i>	9,6	<i>cisz</i>	11,5
P8	5,0	<i>transz</i>	9,4	<i>cisz</i>	9,0
			9,7	<i>cisz</i>	10,0
P12	3,1	<i>transz</i>	8,2	<i>cisz</i>	13,0
			2,9	<i>transz</i>	8,0
P13	4,7	<i>transz</i>	4,6	<i>transz</i>	*
			9,7	<i>cisz</i>	*
P27	4,6	<i>transz</i>	10,0	<i>cisz</i>	5,5
P34	5	<i>transz</i>	9,5	<i>cisz</i>	12,5
P36	4,7	<i>transz</i>	nem detektálható		
P47	4,7	<i>transz</i>	9,6	<i>cisz</i>	4,5
P58	5,3	<i>transz</i>	9,6	<i>cisz</i>	7,0
			9,5	<i>cisz</i>	6,0
P60	5,1	<i>transz</i>	9,1	<i>cisz</i>	34,5

\*jelátfedés

#### 4.2.3. A p53 TAD fő komponensének és a minor konformerek szerkezeti jellemzése

A p53 TAD szerkezeti hajlamainak jellemzéséhez másodlagos kémiai eltolódásokat (SCS, secondary chemical shift) számoltam a következő egyenlet alapján:

$$SCS = \delta_{\text{mért}} - \delta_{\text{rc}}$$

ahol  $\delta_{\text{rc}}$  a random coil állapothoz tartozó kémiai eltolódás. A számolásokhoz a Kjaergaard és munkatársai által meghatározott random coil kémiai eltolódásokat használtam (Kjaergaard és mtsai 2011, Kjaergaard és Poulsen 2011), amelyek a szekvencia-korrekción kívül figyelembe veszik a pH és a hőmérséklet hatását is. Dolgozatomban a  $C^{\alpha}$  és  $C^{\beta}$  SCS értékeinek különbségét számoltam, ahol a pozitív tendencia helikális hajlamra, a negatív értékek  $\beta$ -turn jelenlétére utalnak.

A 15. ábrán látható, hogy a fő komponens rendezetlen, de gyenge helikális hajlam detektálható a TAD1 régióban (19-25). Ez megegyezik az irodalmi megfigyelésekkel (Wells és mtsai 2008). A minor komponensek SCS értékei szintén 0-hoz közeli, ezért ebben az esetben sem alakulnak ki stabil másodlagos elemek. Az SCS értékek negatív tendenciája a *cis*-prolin okozta kanyarok megjelenésére utal.

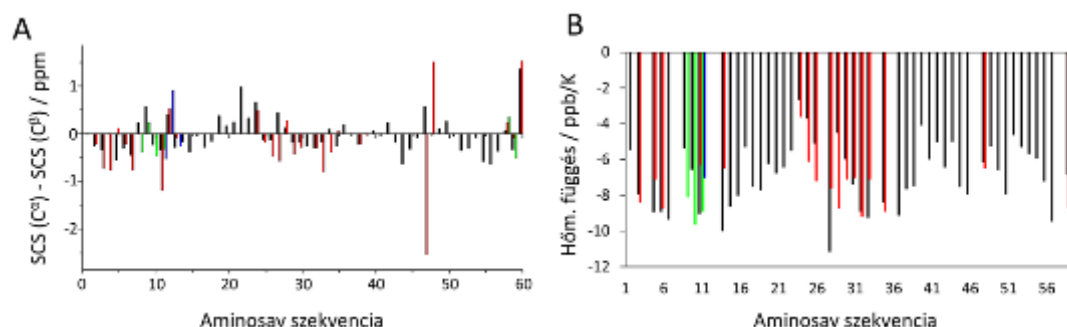
A másodlagos kémiai eltolódás mellett a szerkezetre, illetve a H-hidak megjelenésére következtethetünk az  $^1\text{H}^{\text{N}}$  hőmérsékletfüggéséből. IDP-k esetén a hőmérséklet növelésével az amid proton kisebb kémiai eltolódások irányába tolódik el, a kémiai eltolódások a hőmérséklet függvényében egy egyenesre esnek. Globuláris fehérjék esetén szerkezeti átrendeződés, letekeredés következhet be, ilyenkor az  $^1\text{H}^{\text{N}}$  jelek kémiai eltolódás-hőmérséklet függvényei „elgörbülnek”.

A hőmérséklet-kémiai eltolódás függvény meredeksége alapján következtethetünk a H-hidak, illetve a másodlagos szerkezeti elemek jelenlétére. -4,5 és -10 ppb/K között találhatók a rendezetlen régióhoz tartozó értékek, -4,6 ppb/K-nél nagyobb értékek hidrogénhíd jelenlétére utalnak, -10 ppb/K-nél alacsonyabb értékek esetén pedig általában nincs H-híd, de a protoncsere jelentős (Baxter és Williamson 1997).

A p53 TAD esetén 278-328K tartományban vizsgáltam az amid  $^1\text{H}$  hőmérsékletfüggését. A p53 TAD régióban a főkomponens hőmérsékleti koefficiensei

nagyrészt az IDP-knek megfelelően a -4,5- (-10) ppb/K tartományba esnek. Kivétel a naszcens helikális régióba tartozó K24 és L25, N29, illetve M40 a TAD2 régióból. A gyors csere tartományban található E28 hőmérsékleti együtthatója (-11,2 ppb/K).

A minor jelek hőmérsékletioefficiense hasonló volt, mint a megfelelő aminosavnak a főkomponensben. Az értékek itt is a rendezetlen fehérjékhez tartozó régióba kerültek, ami arra utal, hogy a *cisz*-prolin környezetében kialakuló kanyarok mozgékonyak, nem stabilak.



**15. ábra** A p53 TAD esetén számított másodlagos kémiai eltolódások (A) és a 278-323 K között meghatározott <sup>1</sup>H<sup>N</sup> kémiai eltolódások hőmérsékletfüggése (B). A fő komponens fekete szín jelöli, míg a minor konformerek színesek.

#### 4.2.4. Foszforiláció hatása a prolin *cisz-transz* egyensúlyra

A poszttranszlációs módosulások hatással lehetnek a környező prolinok *cisz-transz* egyensúlyára, mivel funkcionálisan fontos foszforiláció gyakran Ser/Thr-Pro motívumok esetén következik be. A p53 TAD 7 szerint és 2 treonint tartalmaz (+1 szerint a klónozási termékben is található), ezek közül több (S9, S33, S37, S46) található közvetlenül Pro mellett. Az apoptózisban jelentős szerepe miatt (Liebl és Hofmann 2019) az S46 foszforilációját követtük.

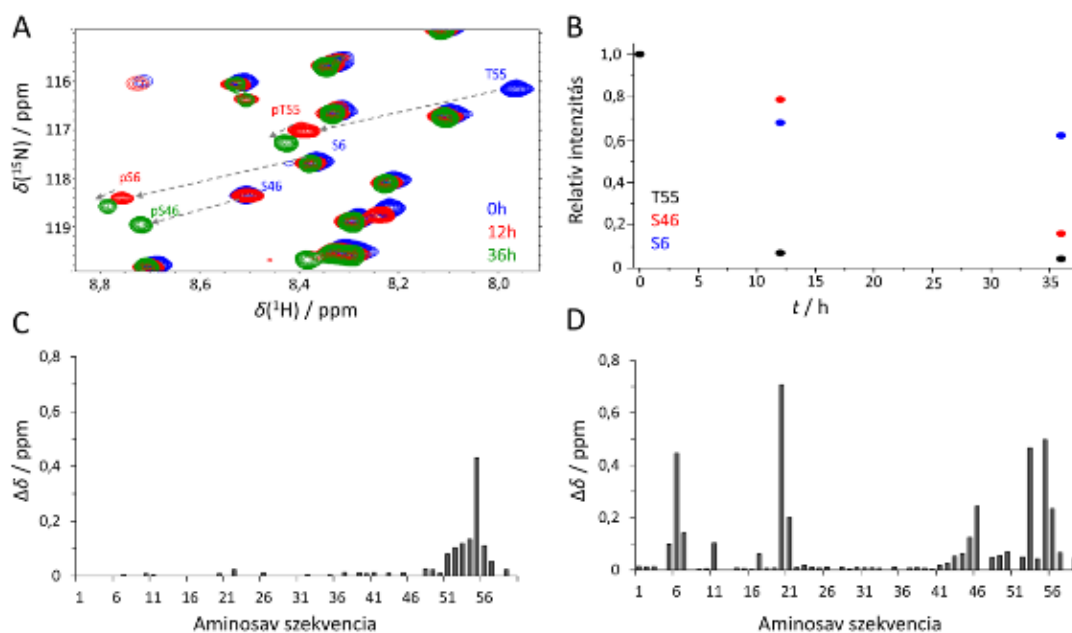
A megfelelő kináz kiválasztásához a NetPhos 3.1 szervert használtam (Blom és mtsai 2004). A predikció 4 féle kinázt talált az S46 foszforilációjához, ezek közül a CK2 kinázt választottuk. A CK2 konszezus szekvenciája S/T-X-X-D/E, fontos pozíció a +3-as, ahol előnyösebb a glutaminsav, mint az aszparaginsav. Az ionos kölcsönhatás miatt előnyösebb a több negatív töltésű aminosav. A foszforilációt gátolják a nagy, hidrofób oldalláncú aminosavak és főleg a prolin. A CK2 kináz a predikció alapján p53 TAD

esetén a következő aminosavakat képes foszforilálni (csökkenő valószínűséggel): T55, S46, S6.

A foszforilációt először  $^{15}\text{N}$ -jelölt p53 TAD peptiden követtük (16. ábra). Az  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC spektrum alapján a predikciónak megfelelően, 12 órát követően T55 100%-ban foszforilálódott. A többi szerin és treonin közül S46 12 óra után ~20%-ban, 36 óra elteltével ~85%-ban, S6 12 óra után ~35%-ban, 36 óra elteltével ~40%-ban foszforilálódott.

12 óra elteltével bekövetkező T55 foszforilációja a E51-D57 amid régiójára van hatással. Az érintett régióban a  $^1\text{H}^\alpha$  kémiai eltolódások nem változtak, tehát nem történt szerkezeti átalakulás, egyedül T55 esetén tapasztalható eltérés a kémiai eltolódásokban ( $\Delta\delta_{\text{HN}}$ : 0,4 ppm a kevésbé árnyékolt irányba,  $\Delta\delta_{\text{N}}$ : 0,6 ppm,  $\Delta\delta_{\text{H}\alpha}$ : 0,1 ppm,  $\Delta\delta_{\text{H}\gamma}$ : 0,1 ppm). Ez megegyezik az irodalomban leírt foszforiláció hatására bekövetkező random coil érték változásával (Conibear és mtsai 2019).

A S46 foszforilációja 12 óra alatt nem következett be, ezért az inkubációs időt növeltük. 36 óra inkubációs idő után és további kináz hozzáadására a következő aminosavak foszforilálódtak: T55 100%, S46 85%, S6 45%, S20 <10%-ban.

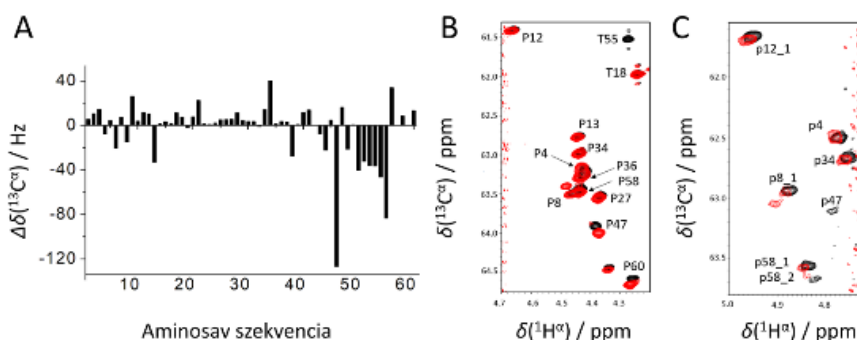


**16. ábra** A foszforiláció követése  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC spektrumon (A) és a foszforilálódó aminosavak jelintenzitás-változása az idő függvényében (B). Számolt  $\Delta\delta$  értékek 12 óra (C) és 36 óra elteltével (D). A B) ábrán relatív csúcshintenzitás az adott időpontban és a nem foszforilált állapotban mért intenzitás hányadosa.

Az  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC spektrum alapján meghatározott  $\Delta\delta$  értékekből látszik, hogy a foszforiláció a pS és pT  $\pm 3$  aminosavas környezetében okoz változást. Továbbá a SHACA-HSQC spektrumon az aminosavak  $\text{H}^\alpha$  és  $\text{C}^\alpha$  környezetei nem, vagy csak kismértékben változtak. Az SCS értékek alapján kimutatható, hogy a foszforiláció csak lokális különbségeket eredményez, nincs hatással a másodlagos szerkezetre (17/A. ábra).

A foszforiláció hatását a SHACA-HSQC spektrumon követtük a foszforilálódó szerin/treonin aminosavak környezetében lévő prolinok esetén is (17/B. ábra). A fő jelek esetén megfigyelhető, hogy P47 és P8 esetén két-két jelet detektáltunk: a két jel aránya a foszforiláció arányát tükrözi. Az S46 esetén 85%-os foszforiláció esetén a két jel közül a nagyobb intenzitású jel (85%) pS46-P47, a kisebb (15%) a S46-P47 környezethez tartozik. S6 kb. 45%-ban foszforilálódott, itt a két jel aránya: pS6-D7-P8 45%, S6-D7-P8 55%. A 100%-ban foszforilálódott T55-höz legközelebbi prolin +3 pozícióban található (P58), itt nem figyelhető meg jelduplázódás.

A minor jelek esetén (17/C. ábra) a foszforilációs helytől távolság több aminosavnyi távolságra lévő prolinok jeleinél (P4, P8 és P58) nem tapasztalható változás, a *cisz-transz* izomerek arányára nincs hatással a foszforiláció. Az S46 mellett található P47 esetén azonban sem a p47 minor jelet nem tudtuk detektálni a SHACA-HSQC, sem d48 jelét az  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC spektrumokon. Ez arra utal, hogy a foszforilációt követően a *cisz-transz* egyensúly eltolódott a *transz* izomer irányába. Ennek oka a megnövekedett számú negatív töltés megjelenése az adott régióban, amely energetikailag és szterikusan kedvezőtlen a *cisz*-izomer kialakulásának.



**17. ábra** A foszforiláció hatására 36 óra elteltével bekövetkező kémiai eltolódás-változás (A), valamint a SHACA-HSQC prolin régiója a major (B) és a minor prolinok esetén (C) (natív p53 TAD: fekete, foszforilált: piros). Az A. ábrán a különbséget Hz-ben adtam meg, 700 MHz-es készüléken mért spektrumok esetén 1 ppm  $\sim 176$  Hz.

#### 4.2.5. Minoradatbázis

Korábbi irodalmi adatok alapján rendezetlen fehérjékben a *cisz*-prolin előfordulása általában 5-20 % között változik (Ahuja és mtsai 2016, Alderson és mtsai 2018, Dujardin és mtsai 2019, Gógl és mtsai 2018, Mateos és mtsai 2020). Mateos és munkatársai kimutatták, hogy a *cisz*-prolin aránya jelentősen nagyobb (>10%), ha a prolint megelőző ( $i-1$ ), illetve az őt követő ( $i+1$ ) pozícióban aromás aminosav (leggyakrabban triptofán) található (Mateos és mtsai 2020). A p53 TAD esetében több helyen 10%-nál több a *cisz*-prolin aránya, de a környező régiókban nem található aromás aminosav. Annak vizsgálatára, hogy a prolinok környezetében lévő aminosavak hogyan befolyásolják a *cisz*-prolin mennyiségét, létrehoztam egy adatbázist az irodalomban található adatokból (6. táblázat).



6. táblázat Igazoltan *cisz*-prolint tartalmazó IDP-k az irodalomban\*

IDP	Aminosav tagszám	Aminosav szekvencia	Prolinok száma	Mérés típusa
p53 TAD	60	MEEPQSDPSVEPPLSQETFSDLWKLLPENNVLSPLPSQAMDDLMLSPD DIEQWFTEDPGP	10	<sup>1</sup> H <sup>α</sup> -detektált <sup>1</sup> H <sup>N</sup> - detektált
RSK1 CTT (Gógl és mtsai 2018)	40	GAMAATYSALNSSKPTPQLKPIESSILAQRRVRKLPSTTL	4	<sup>1</sup> H <sup>N</sup> - detektált
EZH2 hurok	106	MDAERIKTPPKRPGGRRRGRLPNNSSRPSTPTINVLESKDTDSREAGT ETGGENNDKEEEEKKDETSSSSEANSRCQTPIKMKPNIEPPENVEWSG ALEHHHHHH	10	<sup>1</sup> H <sup>α</sup> -detektált
Tau F4 (Ahuja és mtsai 2016)	117	SRSRTPSLPTPPTREPKKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPLKN VKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPPG GSVQIVYKPVLDLSKVTSKSGS	14	<sup>1</sup> H <sup>α</sup> -detektált
NS5A-D2 (Dujardin és mtsai 2019)	95	NTYDVDMVDANLLMEGGVAQTEPESRVPVLDLFLEPMAEEESDLEPSIP SECMLPRSGFPRALPAWARPDYNPPLVESWRRPDYQPPTVAGCALPP	16	<sup>1</sup> H <sup>N</sup> - detektált

OPN (Mateos és mtsai 2020)	220	MHQDHVDSQSQEHLQQTQNDLASLQQTHYSSEENADVPEQPDFPDVPSKSQETVDDDDDDNDSNDTDESDEVFTDFPTEAPVAPFNRRGNAGRGDSVAYGFRAKAHVVKASKIRKAARKLIEDDATTEDGDSQPAGLWWPKESREQNSREL PQHQSVENDSRPKFDSREVDGGDSKASAGVDSRESQGSVPAVDASNQTLESAEDAEDRHSIENNEVTR	12	<sup>13</sup> C- detektált
α-szinuklein (Alderson és mtsai 2018)	140	MDVFMKGLSKAKEGVVAAAETKQGVAAEAGKTKEGVLYVGSKTKEGVVHGVATVAEKTKEQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGSIAAATGFVKKDQLGKNEEGAPQEGILEDMPVDPDNEAYEMPSEEGYQDYEP EA	5	<sup>1</sup> H <sup>N</sup> - detektált
hiszton H1.0 (Chaves- Arquero és mtsai 2018)	97	MDEPKRSVAFKKTKEVKKVATPKKAAKPKKAASKAPSKKPKATPVKKAKKKPAATPKKAKKPKVVKVKPVKASKPKKAKTVKPKAKSSAKR ASKKK	12	<sup>1</sup> H <sup>N</sup> - detektált <sup>13</sup> C- detektált
EspFU (Aitio és mtsai 2012)	47	LPDVAQRLMQHLAEHGIQPARNMAEHIPPAPNWPAPTPPVQNEQSRP	10	<sup>1</sup> H <sup>N</sup> - detektált
huntingtin exon 1 (Urbanek és mtsai 2020)	83	MATLEKLMKAFESLKSF(Q) <sub>16</sub> P(P) <sub>10</sub> QLPQPPPQAQPLLQPQP(P) <sub>9</sub> GPA VAEEPLHRP	31**	<sup>13</sup> C- detektált

KKT4*** (Ludzia és mtsai 2020)	110	TAVCANNVGGGNSVSTTSGQPLSNTVNHTRGLTTSSGSGPNQPYTLP HPDGNAWMSATTSDDRSAPVTTKNSHSVKREREGTVSTTPTRPLKKR NPRTPSYTVADRISE	10	<sup>1</sup> H <sup>N</sup> - detektált
--------------------------------------	-----	---	----	---

\* Az 5% feletti *cis*-izomert mutató prolinokat félkövér betűvel jelöltem. Abban az esetben, ahol nincs detektálható *cis*-izomer vagy az aránya 5% alatt van, dőlt betűvel emeltem ki.

\*\*A huntingtin exon 1 esetén csak 9 Pro környezetet használtam fel az adatbázisban, a repetitív, poliprolin szekvencia torzítja az eredményeket.

\*\*\*Ludzia és mtsai 231 aminosav hosszú szekvenciát vizsgáltak, azonban az N-terminális régióban jelszélesedés miatt csak a 110 aminosav hosszú C-terminális régiót vizsgáltuk (BMRB azonosító: 50229)

Mivel az irodalomban a rendezetlen fehérjéket különböző detektálási módszerekkel, és eltérő körülmények között vizsgálták, ezért az eredmények összevethetősége érdekében megvizsgáltam változik-e a minor konformerek aránya eltérő hőmérséklet és detektálás mód esetén a p53 TAD fehérjében. Azt tapasztaltam, hogy nincs jelentős különbség az  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC spektrumon detektált minor jelek és a velük összeköthető prolinok arányában a SHACA-HSQC spektrumon, az eltérés általában 2% alatti (4. táblázat).

A hőmérséklet hatását a  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC spektrumon követtem, mivel a SHACA-HSQC spektrumon a hőmérséklet változtatásával a minor prolinok jelei gyakran átfedésbe kerülnek a vízzel (a víz  $^1\text{H}$  kémiai eltolódása jobban változik a hőmérséklettel, mint a peptid jelei). Azt tapasztaltam, hogy az eltérés itt is 2% alatti, a *cisz*-izomer aránya nem változik 278 és 328 K között (4. táblázat). Hasonló megfigyeléseket írtak le Ahuja és munkatársai a Tau F4 fragmens esetében (Ahuja és mtsai 2016). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a különböző hőmérsékleten mért adatok összevethetőek.

Az adatbázis elkészítésénél figyelembe vettem azt a megfigyelést, hogy a *cisz*-Pro hatása távolságfüggő: jelkettőződés okoz 2-4 aminosav távolságon belül detektálható, nagyobb távolság esetén a *cisz*-prolin hatása nem érvényesül. Ezért a továbbiakban a prolin környezetében lévő aminosavakat ( $i\pm 3$ , ahol  $i$  a Pro pozíciója) vizsgáltam.

A létrehozott adatbázisban található IDP-kből (6. táblázat)  $N^{\text{tot}}=101$  szekvenciárészletet és  $n^{\text{tot}}=595$  aminosavat vizsgáltam. A 101 szekvenciából néhány az N- vagy C-terminális régióhoz tartozik, ezért  $n^{\text{tot}}=595$  kisebb, mint az elméleti maximum ( $101\cdot 6=606$ ). Az aminosavakat az oldallánc típusa alapján 7 csoportra osztottam:

1. Gly
2. alifás oldalláncú (Ala, Ile, Leu, Met, Val)
3. poláris oldalláncú (Ser, Thr, Cys, Asn, Gln)
4. pozitív töltésű oldallánc (Arg, Lys, His)
5. negatív töltésű oldallánc (Asp, Glu)
6. aromás (Phe, Tyr, Trp)
7. Pro.

Az aminosavtípusok százalékos előfordulása az adatkészletben és a DisProt adatbázisban az 18/A. ábrán látható. A statisztikai analízis során az egyes

aminosavtípusok előfordulási gyakoriságaira binomiális próbát végeztem. Ennek során a tapasztalt előfordulási gyakoriságokat olyan  $p$  valószínűség paraméterű binomiális eloszlásokhoz hasonlítottam, amelyekre  $p$  az adott aminosavtípus DisProt-beli előfordulási gyakorisága. A szignifikanciaszintet 0,1-nek választottam. A 6. táblázatban szereplő IDP-k prolin környező ( $\pm 3$ ) aminosavainak előfordulási gyakoriságai a következő esetekben térnek el a DisProt adatbázistól (7. táblázat): szignifikánsan kevesebb glicin, negatív oldalláncú, illetve aromás aminosavat tartalmaznak, ellenben a prolin mennyisége szignifikánsan több.

**7. táblázat**  $i\pm 3$  prolin környezetek aminosavtípus darabszámainak összehasonlítása a DisProt adatbázissal (binomiális eloszlás, 0,1 szignifikanciaszint)

Aminosav-típus	Előfordulás a DisProt adatbázisban	Összes aminosav ( $n^{\text{tot}}=595$ )		
		várható értéktartomány	előfordulás (db)	Összehasonlítás DisProt adatbázissal
Glicin	7,7	38-54	22	szignifikánsan kevesebb
Alifás	24,8	134-161	144	nincs szignifikáns eltérés
Poláris	24,1	130-157	157	nincs szignifikáns eltérés
Pozitív töltésű	14,6	76-98	98	nincs szignifikáns eltérés
Negatív töltésű	15,7	82-105	64	szignifikánsan kevesebb
Aromás	5,2	24-38	20	szignifikánsan kevesebb
Prolin	8,1	40-57	90	szignifikánsan több

A 6. táblázatban található IDP-k 7 aminosavas szekvenciáit ( $i-3\dots\text{Pro}\dots i+3$ ) csoportosítottam aszerint, hogy hány százalék a *cisz*-prolin előfordulása. Az összesen 101 db szekvenciát 3 csoportra oszthatjuk: a)  $>5\%$  ( $N=51$ ), b)  $>10\%$  ( $N=23$ ) és  $<5\%$  ( $N=50$ ). Az aminosavtípus-előfordulást mindhárom kategória esetén összevettem a referenciával (8-10. táblázat).

Megfigyelhető, hogy az aminosavtípusok előfordulása alapján csak néhány helyen tapasztalunk eltérést: leggyakrabban a glicinek és a prolinok száma tér el, illetve az összes kategóriát figyelembe véve a negatív töltésű és aromás aminosavakból is kevesebb található az adatkészletben. Ha ezeket az aminosavakat nem vesszük figyelembe, akkor  $>5\%$  feletti *cisz*-prolin előfordulásnál szignifikánsan több poláris,  $>10\%$  felett

szignifikánsan kevesebb pozitív töltésű, illetve <5% *cisz*-prolin esetén szignifikánsan több pozitív töltésű aminosavat találunk.

**8. táblázat** Aminosavtípus előfordulás >5% *cisz*-prolin tartalmú szekvenciák esetén.

A statisztikai elemzés binomiális eloszlást feltételezve 0,1 szignifikanciaszinten történt.

A referencia a DisProt adatbázisban megfelelő aminosavtípus előfordulása volt.

Aminosav-típus	Előfordulás a DisProt adatbázisban	>5% <i>cisz</i> -prolin tartalmú szekvenciák (N=51; n=296)		
		várható értéktartomány	előfordulás (db)	Összehasonlítás DisProt adatbázissal
Gly	7,7	17-29	13	szignifikánsan kevesebb
Alifás	24,8	64-83	68	nincs szignifikáns eltérés
Poláris	24,1	62-81	85	szignifikánsan több
Pozitív töltésű	14,6	35-51	30	szignifikánsan kevesebb
Negatív töltésű	15,7	39-55	33	szignifikánsan kevesebb
Aromás	5,2	11-21	14	nincs szignifikáns eltérés
Pro	8,1	18-30	53	szignifikánsan több

**9. táblázat** Aminosavtípus előfordulás >10% *cisz*-prolin tartalmú szekvenciák esetén.

A statisztikai elemzés binomiális eloszlást feltételezve 0,1 szignifikanciaszinten történt.

A referencia a DisProt adatbázisban megfelelő aminosavtípus előfordulása volt.

Aminosav-típus	Előfordulás a DisProt adatbázisban	>10% <i>cisz</i> -prolin tartalmú szekvenciák (N=23; n=137)		
		várható értéktartomány	előfordulás (db)	Összehasonlítás DisProt adatbázissal
Gly	7,7	7-15	4	szignifikánsan kevesebb
Alifás	24,8	28-41	34	nincs szignifikáns eltérés
Poláris	24,1	27-39	36	nincs szignifikáns eltérés
Pozitív töltésű	14,6	15-25	12	szignifikánsan kevesebb
Negatív töltésű	15,7	16-27	19	nincs szignifikáns eltérés
Aromás	5,2	4-11	8	nincs szignifikáns eltérés
Pro	8,1	7-15	24	szignifikánsan több

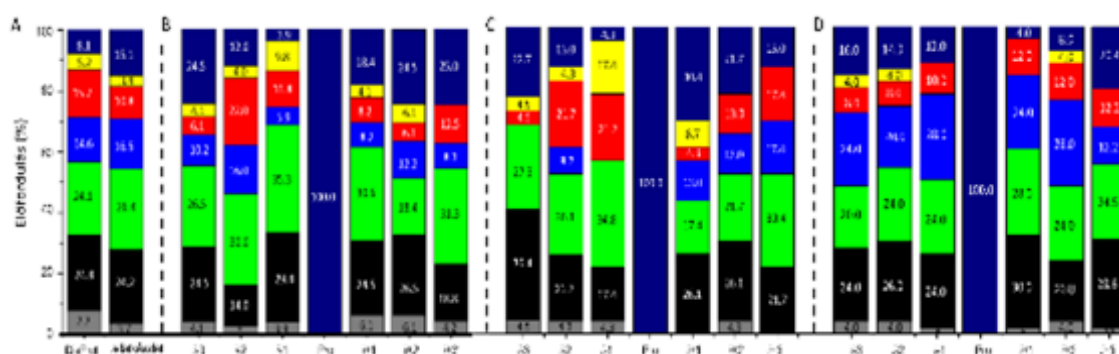
**10. táblázat** Aminosavtípus előfordulás <5% *cisz*-prolin tartalmú szekvenciák esetén. A statisztikai elemzés binomiális eloszlást feltételezve 0,1 szignifikanciaszinten történt. A referenciaelőfordulás a DisProt adatbázisban megfelelő aminosavtípus előfordulása volt.

Aminosav-típus	Előfordulás a DisProt adatbázisban	<5% <i>cisz</i> -prolin tartalmú szekvenciák ( <i>N</i> =50; <i>n</i> =299)		
		várható értéktartomány	előfordulás (db)	Összehasonlítás DisProt adatbázissal
Gly	7,7	17-29	9	szignifikánsan kevesebb
Alifás	24,8	65-84	76	nincs szignifikáns eltérés
Poláris	24,1	63-82	72	nincs szignifikáns eltérés
Pozitív töltésű	14,6	36-51	68	szignifikánsan több
Negatív töltésű	15,7	39-55	31	szignifikánsan kevesebb
Aromás	5,2	11-21	6	szignifikánsan kevesebb
Pro	8,1	18-30	37	szignifikánsan több

A továbbiakban binomiális próbát végeztem az aminosavtípus-előfordulási gyakoriságaira az egyes pozíciókban (*i*-3-tól *i*+3-ig) a különböző mennyiségű *cisz*-Pro kategóriák esetén (18/B-D. ábra). Ennek során a „binomiális kísérletek” száma az egy pozíciókban lévő aminosavak száma volt, a viszonyítási eloszlás valószínűség paraméterének pedig az adott aminosavnak a teljes adatkészletbeli előfordulási gyakoriságát tekintettük, a szignifikanciaszint 0,1 volt. A korábban említett eltérések miatt az egyes aminosavtípusok esetén a referencia az adatkészletben lévő összes szekvenciából származó százalékos előfordulás volt, nem a DisProt előfordulás.

>5% *cisz*-prolint tartalmazó szekvenciákban (*N*=51 esetben) prolin gyakorisága szignifikánsan nagyobb *i*-3, *i*+2 és *i*+3 pozíciókban (18/B. ábra). Ez azzal magyarázható, hogy poliprolin II szerkezeti elemekben gyakoriak a P-X-X-P és P-X-P motívumok, tehát a ±3 pozíciókban lévő prolinok stabilizálják a PPII struktúrákat. A prolinok mellett az elektronban gazdag oldalláncok gyakorisága szignifikánsan nagyobb: *i*-2 pozícióban a negatív, *i*-1-ben a poláris és az aromás, *i*+2-ben szintén az aromás oldalláncok, ellenben a pozitív töltésű oldalláncú aminosavakból szignifikánsan kevesebb található *i*-1, *i*+1 és *i*+3 pozíciókban.

>10% *cisz*-prolin tartalmú szekvenciákban ( $N=23$ ) az elektronban gazdag oldalláncok jelentősége szintén megfigyelhető: a negatív töltésű aszparaginsavak és glutaminsavak szignifikánsabban többször fordulnak elő az  $i-2$ ,  $i-1$  és  $i+3$  pozíciókban, az aromások az  $i-1$  és  $i+1$  pozíciókban szignifikánsan gyakoribbak. Ennek megfelelően a pozitív aminosavak előfordulása az  $i-3$  és  $i-1$  pozíciókban szignifikánsan kisebb. Az arginin és lizin aminosavak ellenben szignifikánsan többször fordulnak elő ( $i-3$ ,  $i-1$ ,  $i+1$  és  $i+2$  pozíciókban), ha a *cisz*-Pro tartalom <5%. Ebben a kategóriában más aminosavtípusok előfordulása nem tér el a referenciától 0,1 szignifikanciaszinten.



**18. ábra** A különböző aminosavtípusok előfordulása a DisProt és a saját adatkészletben (A), illetve a prolint környező pozíciókban: >5% *cisz*-Pro (B), >10% *cisz*-Pro (C), illetve <5% *cisz*-Pro tartalmú szekvenciák esetén (D). (Gly: szürke, alifás: fekete, poláris: zöld, pozitív töltésű: kék, negatív töltésű: piros, aromás oldalláncú: sárga, Pro: sötétkék)

### 4.3. Lizin-gazdag peptidek

#### 4.3.1. Lizin-gazdag peptidek és modellmembránok kölcsönhatásának jellemzése oldatfázisú NMR mérésekkel

Az ERD14 és S100A4 fehérjéből származó peptidek (11. táblázat) kölcsönhatását  $q=0,5$  PC bicella modellmembránok jelenlétében elemeztem. A peptiddel való kölcsönhatás eltéréseket okozhat a bicella és a peptid globális és lokális paramétereiben, ezért első lépésben a peptidet nem tartalmazó bicellát vizsgáltam oldatfázisú NMR mérésekkel.

A 150 mM DMPC- 300 mM DHPC tartalmú bicella oldat 1D  $^1\text{H}$  és 1D  $^{31}\text{P}$  spektrumát a 19/A-B. ábrán tüntettem fel. A bicella esetében a DHPC és DMPC jelei a metilrégió kivételével nem megkülönböztethetők. A két lipid metil-jelei egymástól jól elkülönülő kémiai eltolódásoknál jelennek meg, és megfigyelhető, hogy a multiplicitásuk



nem egy triplett (a szomszédos metilén protonok miatti felhasadás miatt), hanem két, kissé átfedő triplett, és mindkét esetben a  $^3J_{\text{HH}}$  értékek azonosak ( $\sim 7$  Hz). Ez arra utal, hogy bicellában egy DHPC, (ill. egy DMPC) molekulán belül a két zsírsavoldallánc nem egyenértékű.

**11. táblázat** A vizsgált peptidek adatai: kód, pI és töltés adott pH értékeknél.

Peptid	Kód	Szekvencia	pI	Töltés adott pH-n		
				3,0	5,0	7,0
ERD K A	ERD-A	DRGLF DFLGK KK	9,7	+4,5	+2,4	+1,9
ERD K B	ERD-B	EKKGF MEKLG EKLPK	9,4	+5,4	+2,6	+1,9
ERD K C	ERD-C	EKKGI LEKIK EKLPK	9,4	+5,4	+2,6	+1,9
S100A4 C-terminális	S100	FFEGF PDKQP RKK	9,7	+4,5	+2,4	+1,9

Az  $^1\text{H}$  spektrumok mellett a bicella összetételére és a minta állapotára a  $^{31}\text{P}$  spektrumokból következtethetünk (19/B. ábra). Az 1D  $^{31}\text{P}$  spektrumban 2 jel detektálható, ezek a DMPC és a DHPC lipid fejcsoportokhoz tartozó foszfor környezetéhez rendelhetőek. A két jel integráljának aránya ( $[\text{DHPC}]/[\text{DMPC}]=2:1=1/q$ ), amely a minta lipidkomponenseinek összetételét és az oldat helyes elkészítését jellemzi.

A peptidek és bicellák kölcsönhatására utal a transzlációs diffúziós együttható megváltozása is, melyet PFG-NMR mérésekkel követtem.

A 700 MHz-es NMR készüléken a két lipid komponens, a DHPC és a DMPC komponens transzlációs diffúziós együtthatója külön értékelhető, mivel metil-jeleik megkülönböztethetők az 1D  $^1\text{H}$  spektrumokon (19/C-D. ábra). A DMPC vízben oldhatatlan, DHPC jelenlétében kizárólag a bicellában található meg, ezért jó közelítéssel mondhatjuk, hogy  $D_{\text{DMPC}}=D_{\text{bicella}}$ .

A DHPC vízdoldható, DMPC jelenlétében szabad, monomer és bicella-asszociált formában van jelen az oldatban (Björnerås és mtsai 2015, Dudás és mtsai 2020). Ennek alátámasztására a szabad DHPC koncentrációját határoztam meg. Ha  $c_{\text{DHPC, szabad}} < \text{cmc}$  (critical micelle concentration, kritikus micellaképződési koncentráció), akkor nincs micella az oldatban. A szabad DHPC mennyisége a következő egyenlet alapján számítható (Björnerås és mtsai 2015):

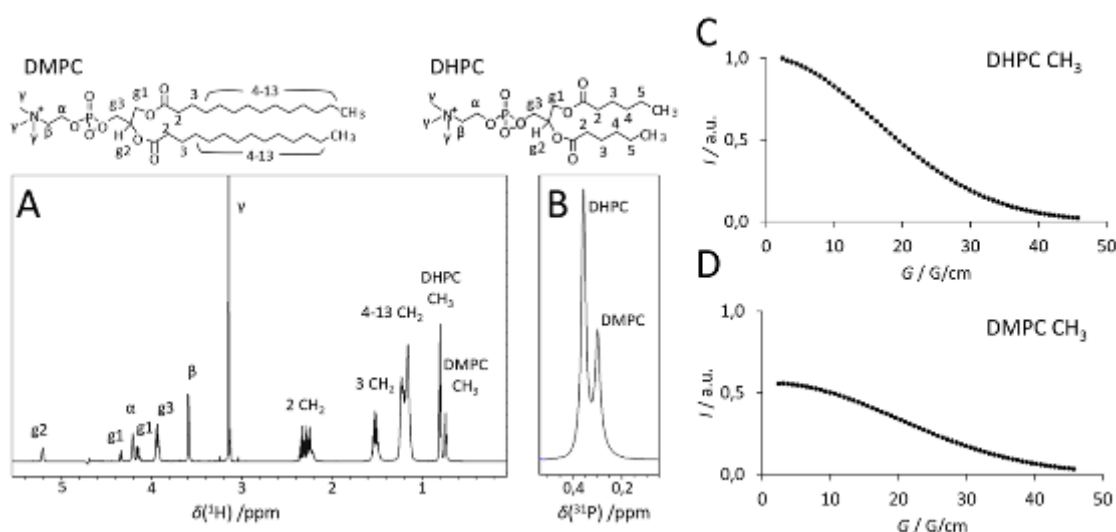
$$D_{\text{DHPC}} = x_{\text{szabad}}(D_{\text{szabad}}^{\text{mért}} - D_{\text{bicella}}) + D_{\text{bicella}}$$

ahol  $D_{\text{DHPC}}$  a DHPC mért transzlációs diffúziós együtthatója,  $D_{\text{szabad}}^{\text{mért}}$  a szabad DHPC diffúziós együtthatója, melyet egy párhuzamos mérésből határoztam meg, ahol

DHPC monomerként van jelen,  $D_{bicella}$  a bicella diffúziós együtthatója, és  $x_{szabad}$  a szabad DHPC móltörtje:

$$x_{szabad} = \frac{c_{szabad}^{DHPC}}{c_{DHPC}}$$

A fenti egyenletek alapján a bicella-oldatban a szabad DHPC koncentráció 8,7 mM. Ez az érték kisebb, mint a DHPC kritikus micellaképződési koncentrációja (14mM) (Chou és mtsai 2004), ezért az oldatban a DHPC monomerként és bicella-asszociált formában van jelen.



**19. ábra** 150 mM DHPC és 300 mM DMPC tartalmú bicella-oldat 1D  $^1\text{H}$  (A) és 1D  $^{31}\text{P}$  NMR spektruma (B), illetve a PFG-NMR mérések értékelésénél illesztett lecsengő görbe a DHPC és a DMPC metil-jelintenzitásaira a gradiensereőség függvényében. A DHPC és DMPC metil-jelei megkülönböztethetők az 1D  $^1\text{H}$  spektrumon, ezért külön számítható a translációs diffúziós együttható a Stejskal-Tanner egyenlet alapján.

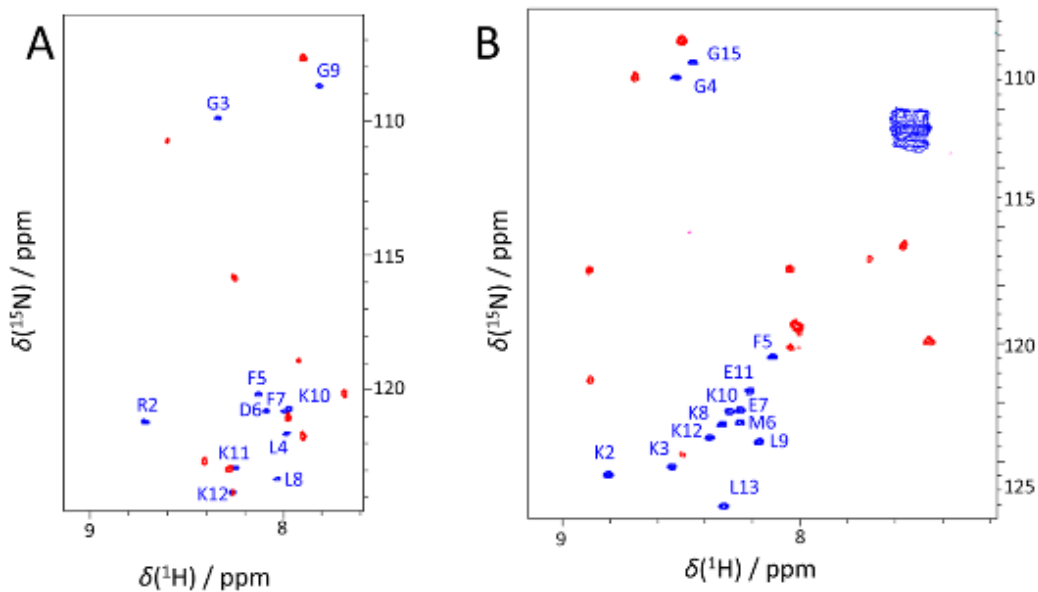
A lizinben gazdag peptidekkel való kölcsönhatás vizsgálatánál fontos volt, hogy a bicellák mennyisége feleslegben legyen a peptidhez képest. A dolgozatomban bemutatott méréseknél a lipidkoncentrációhoz (összesen 450 mM) képest a peptidkoncentráció kicsi (1 mM), ezért a bicella  $^1\text{H}$  spektrumain nem okoz jelentős változást a peptid jelenléte. Az  $^1\text{H}$  spektrumok mellett  $^{31}\text{P}$  mérések alkalmasak a bicellákban található foszfolipidek fejcsoportjában történő változások követésére. Az 1D  $^{31}\text{P}$  spektrumokon jelszéledést tapasztalunk, ami arra utal, hogy a foszforatomok kémiai környezetében változás következik be. A peptidek jelenléte elsősorban a DMPC fejcsoporra van hatással, itt a jelszélesség-változás  $\sim 1$  Hz (2,9 Hz-ről 4,0 Hz-re nő), a

DHPC  $^{31}\text{P}$  jele esetén  $\sim 0,5$  Hz (2,1 Hz-ről 2,6 Hz-re) a különbség. Ez arra utal, hogy az ERD és S100 peptidek elsősorban a bicella lipidkettősrétegének fejcsoportjainak környezetére vannak hatással.

A peptid-bicella kölcsönhatás során a translációs diffúziós együtthatók is megváltozhatnak. A peptidet tartalmazó bicella-minták a peptidek translációs diffúziós együtthatója kisebb lesz a szabad peptidhez képest, megközelíti  $D_{\text{bicella}}$  értékét. Ez arra utal, hogy az oldatban „együtt mozognak”, a peptid kötődik a bicellához. Továbbá a szabad DHPC koncentrációja is megnő: az ERD-B és S100 esetén 12,4, illetve 13,1 mM, tehát a peptidek DHPC molekulákat szorítanak ki a bicellából. Az eredmények arra utalnak, hogy az ERD és S100 peptidek képesek kölcsönhatásba lépni PC bicellákkal.

Az interakciót a peptidek oldaláról 2D homo- és heteronukleáris NMR mérésekkel jellemeztem. A homonukleáris 2D  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -TOCSY és  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -NOESY spektrumokban a jelhozrendelést nehezítették a nagy feleslegben lévő lipid jelek, melyek az alifás régióban a peptid jeleivel is átfedtek, ezért a peptidek jelazonosítása nem kivitelezhető, és nem lehetett a másodlagos szerkezeti változásokra fényt deríteni.

A jelátfedésből eredő problémák ellenére természetes izotóp-előfordulás mellett a szabad és a bicellával kölcsönható peptidek esetén a  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -SOFAS-HMQC spektrumon azonosítani tudtam a bicellával kölcsönható régiókat, amiket az amid jelek jelentős eltolódása és kiszélesedése jelzett. Az ERD-A esetén a peptid hidrofób G3-K10 régió amid jeleinek kémiai eltolódása változott meg. Az aminosav szekvenciában hasonló ERD-B és C esetén jelentős különbséget okoz a bicella a peptidek  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -SOFAS-HMQC spektrumán. Ezekben az esetekben a kölcsönhatásban az N- és C-terminális aminosavak kivételével a teljes peptid érintett. Az S100 esetén az F5-Q9 régió amid környezetei változtak meg jelentősen (20.ábra).



**20.ábra** Bicellák hatása a peptidek amid régiójára: a peptidek  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ - SOFAST-HMQC spektrumai vizes oldatban (kék) és bicella tartalmú oldatban (piros) az ERD-A (A) és ERD-B (B) esetén. Az asszignáció a vizes oldatban mért spektrumra vonatkozik.

Összefoglalva a mérési eredményeket, elmondható, hogy az ERD és S100 peptidek képesek kölcsönhatásba lépni bicella modellmembránokkal és azonosítottam az interakcióban résztvevő környezeteket a bicella és a peptidek részéről is. A bicellák esetén a kizárólag lipidfejcsoportok atomjainak kémiai környezete változik, ez arra utal, hogy a peptidek a bicella felszínéhez kötődnek. A peptidek esetén a terminális aminosavak kivételével a többi aminosav vesz részt a kölcsönhatásban. Ahhoz, hogy a peptid-bicella rendszerben a peptidről szerkezeti információkat nyerjünk, legalább  $^{15}\text{N}$ -jelölt mintára lett volna szükség, azonban a kölcsönhatás tényét természetes izotópeloszlás mellett is igazolni lehetett.

A bicella membránmimetikum egy leegyszerűsített modell, ezért azt is vizsgáltuk, hogy ez a kölcsönhatás létezik-e valódi membránok esetében, mi több, történik-e és ha igen, akkor milyen módon valósul meg ezen peptidek sejtpenetrációja. Ezenfelül, azt is tanulmányozni akartuk, hogy ezek a jó vízoldhatóságú peptidek lehetnek-e gyógszerhordozó jelöltek.

#### 4.3.2. Karbonsav-lakton átalakulás vizsgálata fluorimetriával és NMR spektroszkópiával

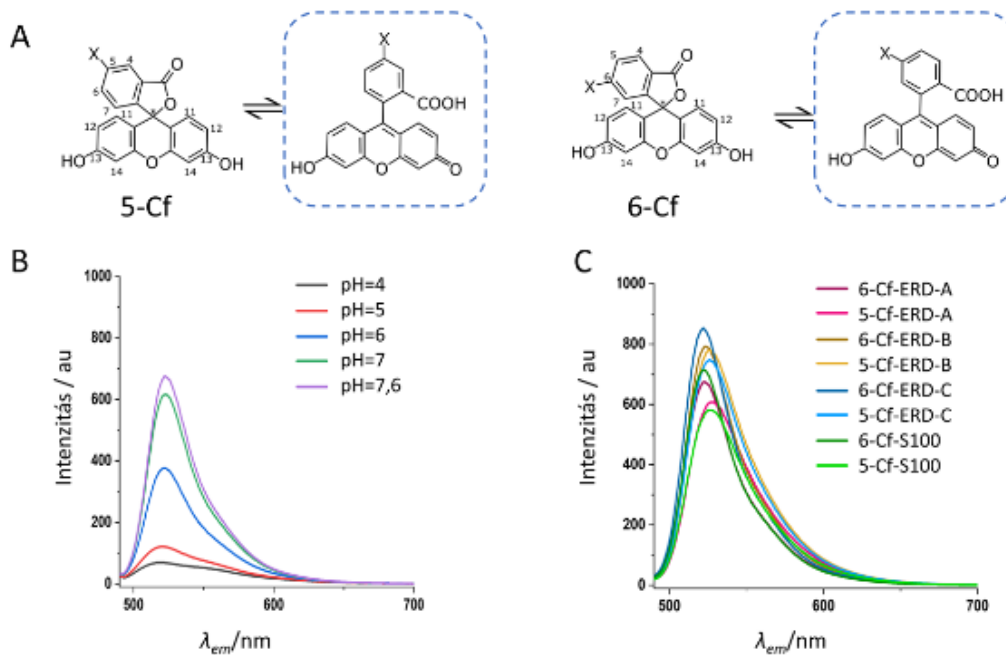
A sejtpenetráló peptidek alkalmasak arra, hogy kismolekulákat a célszövetekbe juttassanak. A megfelelő szelektivitás és toxicitás elérésnek érdekében szükség van új peptidekre. Dolgozatomban 4 lizin gazdag peptidet vizsgáltam, melyek az irodalomban vizsgált penetratinhoz és TAT-hoz hasonlóan fiziológiás körülmények között pozitív töltéssel rendelkeznek. A kísérletekben használt peptideket adatait a 11. táblázatban tüntettem fel.

A fluorfórként használt 5(6)-karboxifluoreszcein legnagyobb hátránya a pH-függő fluoreszcencia, melynek oka a lakton-karbonsav átalakulás (21/A. ábra). Savas és aprotikus közegben a nemfluoreszcens lakton, míg semleges és lúgos közegben a karbonsav forma a domináns. A karbonsav esetén a kiterjedt  $\pi$ -elektron rendszer okozza a megnövekedett fluoreszcencia intenzitást. A pH, illetve a Cf-hez kapcsolt peptid is hatással van a tautomer egyensúlyra, így ennek következtében a fluoreszcencia intenzitásra is. Ezért érdemes a fluoreszcens tulajdonságok vizsgálatát elvégezni a peptidek sejtbejutásának összehasonlításához, az intracelluláris fluoreszcencia intenzitások szerkezeti okainak felderítésére. In-cell környezetek modellezésére a fluoreszcencia pH függését fluorimetriával és az atomi szinten NMR spektroszkópiával vizsgáltuk. Az összefoglaló fluorimetriás eredmények az 21/B és C ábrán láthatók.

A Cf-konjugátumok esetén (a 21. ábrán az 6-Cf-ERD-A példáján) az emissziós spektrumokon megfigyelhető, hogy az irodalmi adatoknak megfelelően a pH növelésével a fluoreszcencia intenzitás nő, illetve adott pH-n nincs jelentős eltérés az egyes peptidek, illetve az 5- és 6-Cf-konjugátumok között (21/C. ábra).

A fluoreszcencia szerkezeti magyarázatához a lakton-karbonsav átalakulás atomi szintű jellemzését NMR spektroszkópiával végeztem. A tautomer forma modellezéséhez a szabad 5(6)-karboxifluoreszceint vizsgáltam. A lakton detektálásához aprotikus közegként a DMSO- $d_6$  oldószert alkalmaztunk, a karbonsav azonosításához az 5(6)-Cf keveréket 25mM NaOH-ban oldottuk.

A lakton-karbonsav átalakulás során a gyűrű felnyílik, ezért az atomok számozása az IUPAC nevezéktan szerint megváltozik, a követhetőség érdekében 21/A.ábrán látható nevezéktant követtem.



**21. ábra** Lakton-karbonsav átalakulás 5- és 6-Cf esetén (A). Semleges és gyengén lúgos közegben a főként karbonsav forma van jelen az oldatban. A Cf-peptid konjugátumok fluoreszcens emissziós spektrumai: 6-Cf-ERD-A pH függő spektruma (B) és az 5- és 6-Cf-konjugátumok spektrumai pH=7.6 esetén (C) (Gerjesztési hullámhossz:  $\lambda = 488$  nm, emisszió:  $\lambda = 490-700$  nm, detektor feszültség: 450 V, peptid koncentráció: 6.25  $\mu$ M).

A lakton-karbonsav átalakulásra a C\*, C12 és C13 atomok a legérzékenyebbek. C\* a lakton forma esetén  $sp^3$  hibridizációs állapotban van. Ennek megfelelően DMSO- $d_6$ -ban 86,6 ppm kémiai eltolódásnál detektálható H11-C\* korrelációban az  $^1H,^{13}C$ -HMBC spektrumon az 5- és 6-Cf izomerek esetén. 25mM NaOH közegben ez a jel nem detektálható, ugyanis a karbonsav esetén C\*  $sp^2$  hibridizációjú és az aromás régióban található. Az aromás régióban a jelátfedés jelentős, ezért egyértelmű asszignációt nem lehet megadni.

Jelentős kémiai eltolódás különbség figyelhető meg a DMSO- $d_6$  és a 25mM NaOH oldatok közt a C13 (H11-C13 korreláció az  $^1H,^{13}C$ -HMBC spektrumon) és a C12 atom (H12-C12 korreláció  $^1H,^{13}C$ -HSQC spektrumon). DMSO-ban a C13 környezet 162 ppm eltolódásnál jelenik meg, ez lúgos közegben 184 ppm-nél detektálható. Ugyanakkor a C12 jele a gyűrű felnyílásával 115,0 ppm-ről 125,6 ppm-re tolódik. Ugyan a C12 és C13 atomok nem közvetlenül a gyűrűfelnyílásnál helyezkednek el, viszont a

C13-hoz a lakton esetén egy fenolos -OH, míg a karbonsav esetén egy karbonil-csoport kapcsolódik.

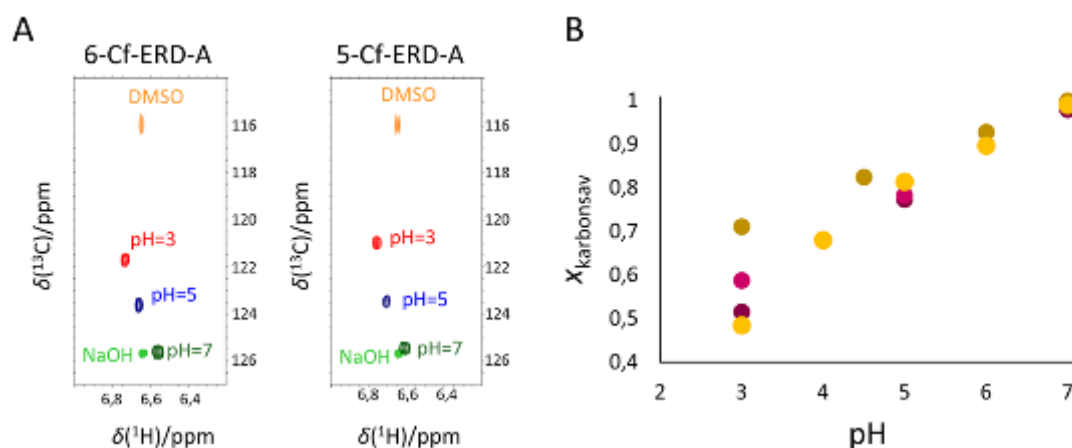
A következő lépésben vizsgáltam a Cf viselkedését a Cf-peptid-konjugátumokban. A peptidek esetén az 5(6)-Cf izomer keveréket szétválasztottuk. A karbonsav-lakton tautomerizációt a jelöletlen ERD-A és B peptidek esetén követtem a pH=3,0 – 7,0 tartományban. Mivel a C\* detektálásához  $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HMBC spektrum érzéketlen, ezért hosszabb mérési időt igényel, illetve a karbonsav forma esetén jele átfedne az aromás oldalláncok jeleivel, ezért az  $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC spektrumon a H12-C12 korreláció segítségével (22. ábra) határoztam meg a Cf-peptid konjugátumok esetén a lakton és a felnyílt gyűrűs forma arányát.

A tisztán lakton és karbonsav formát tartalmazó spektrumok C12 kémiai eltolódásából meghatároztam a karbonsav arányát az egyes pH-kon. Az átalakulás gyors egyensúlyi folyamat, ezért

$$\delta(\text{C12})_{\text{mért}} = x \cdot \delta(\text{C12})_{\text{NaOH}} + (1 - x) \delta(\text{C12})_{\text{DMSO}}$$

egyenletből meghatározható az egyes formák aránya.

A pH növelésével a  $\delta(\text{C12})$  a 25mM NaOH-ban detektált csúcs irányába tolódik (22/A. ábra), ennek megfelelően a felnyílt gyűrűs forma mennyisége nő (22/B. ábra). Kis pH-n a lakton és a karbonsav aránya közel 1:1. Fiziológiás, az *in vitro* sejtpenetrációs méréseknek megfelelő pH értékeken gyakorlatilag csak a karbonsav forma van jelen az oldatban mind az ERD-A és B esetében. A legtöbb pH-n nincs jelentős különbség a két Cf-izomer között (kivéve ERD-B pH=3,0 oldatban).

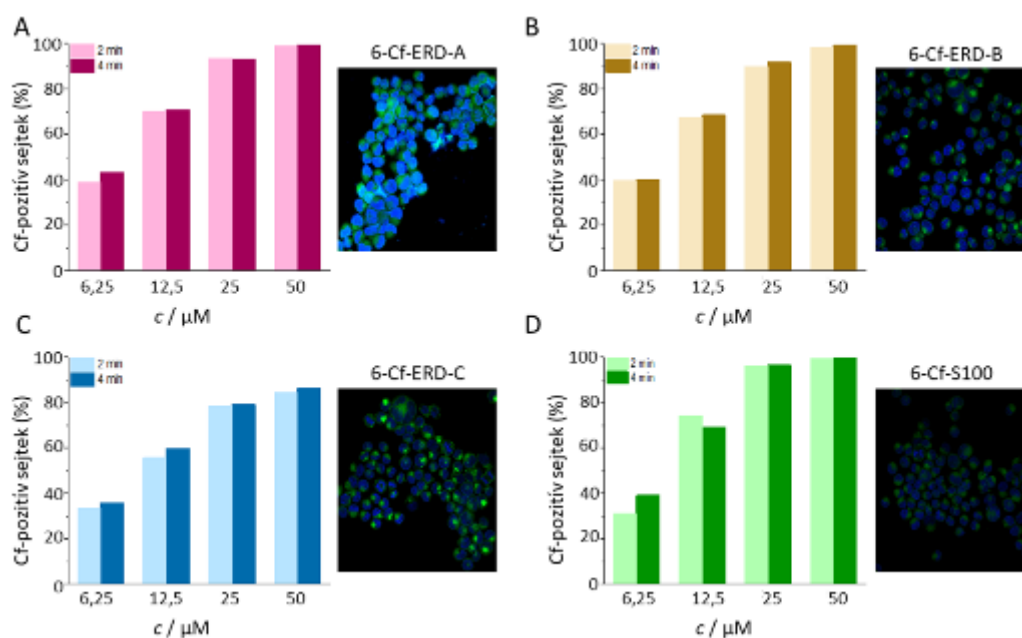


**22. ábra** Karbonsav-lakton egyensúly Cf-peptid konjugátumok esetén: H12-C12 keresztcsúcs követése 5- és 6-Cf-ERD-A esetén  $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC spektrumon (A). Az 5(6)-Cf keverék aprotikus közegben (DMSO- $d_6$ , sárga) felvett spektrumán lakton formához

tartozó jel 116 ppm-nél, míg a tisztán karbonsav a 25mM NaOH-ban (világoszöld) 125,6 ppm-nél detektálható. A Cf-ERD-A konjugátumok H12-C12 jelei a különböző pH értékeken a kettő között helyezkednek el (piros, kék, sötétzöld). Számolt karbonsav mennyiség  $\delta(C12)$  alapján (B). (6-Cf-ERD-A: bordó, 5-Cf-ERD-A: rózsaszín, 6-Cf-ERD-B: barna, 5-Cf-ERD-B: sárga)

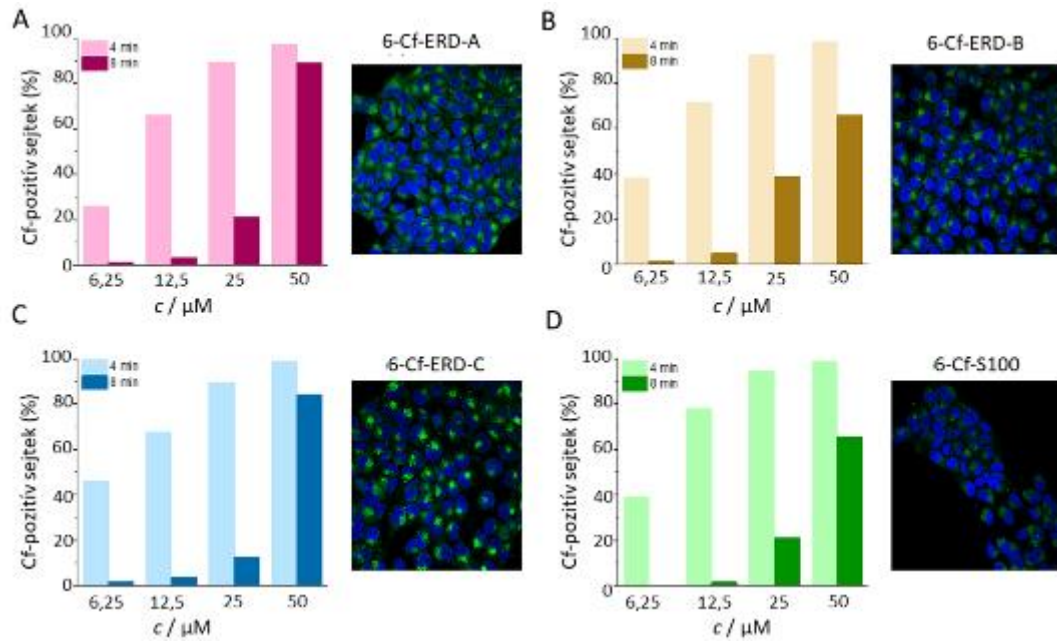
#### 4.3.3. ERD és S100 peptidek sejtbejutásának vizsgálata áramlási citometriával

Az ERD és S100 peptidek *in vitro* sejtpenetrációs vizsgálatait kétféle modellrendszeren, A431 humán laphámrák és MonoMac6 humán monocita sejtvonalakon áramlási citométerrel végeztük. Az elővizsgálatok során mindkét sejtvonal esetén 6,25-50  $\mu\text{M}$  koncentrációtartományban kezeltük a sejteket a 6-Cf-peptid konjugátumokkal 3 órán keresztül. A membránhoz kötődő, nem internalizálódó peptidek eltávolításához szükséges megfelelő tripszinezési idő meghatározásához 2-2 párhuzamos mérést végeztünk: a MonoMac6 esetén 2 ill. 4 perc, az A431 sejtvonal esetén 4 ill. 8 perc. Minden kísérletből 3 párhuzamos mérést végeztünk. Mindkét sejtvonal esetén a sejten belüli lokalizáció vizsgálatához konfokális lézer pásztázó mikroszkópos mintákat készítettünk, ahol a sejtmagot Hoechst 33342 festékkel kékre festettük. Az eredmények a 23 és 24. ábrán láthatók:



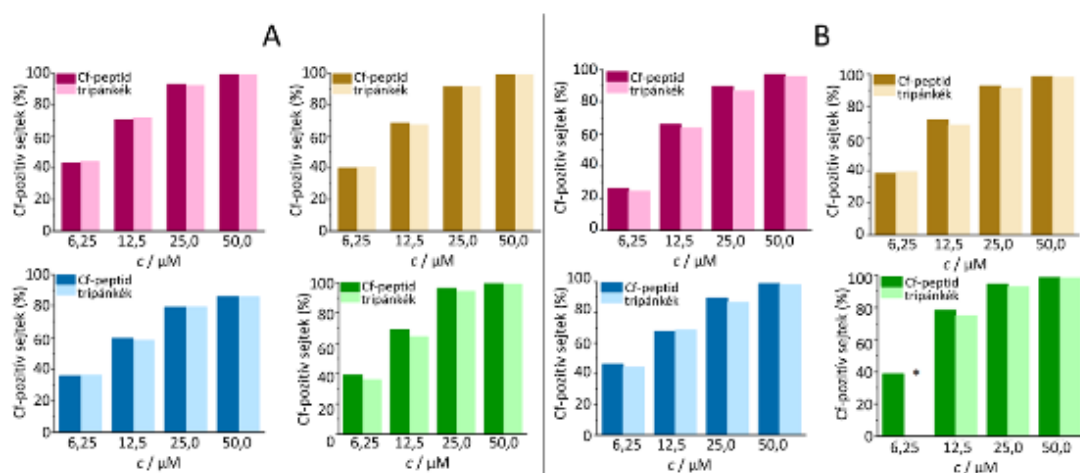
**23. ábra** Cf-peptidek *in vitro* sejtpenetráció vizsgálata MonoMac6 sejtekben különböző tripszinezési idő esetén (2 perc: világos szín, 4 perc sötét szín) áramlási citométerrel és intracelluláris lokalizációja konfokális lézer-pásztázó mikroszkóppal.





**24. ábra** Cf-peptidek *in vitro* sejtpenetráció vizsgálata A431 sejtvonal esetén áramlási citométerrel különböző tripszinezési idő esetén (4 perc: világos szín, 8 perc sötét szín) és intracelluláris lokalizáció konfokális lézertesztáló mikroszkóppal. A mikroszkópos képeken a sejtmagot Hoechst 33342 festékkel kékre festettük, a Cf-peptid konjugátum zöld színű.

A tripszinezési idő változtatásával a membránkötött peptidek jelenlétére következtethetünk. Megfigyelhető, hogy a MonoMac6 sejtek esetén a Cf-pozitív sejtek aránya nem változik a tripszinezési idő növelésével. Az A431 sejtvonal esetén jelentős csökkenést tapasztaltunk a fluoreszcencia intenzitást tekintve. A sejtmembránhoz kötött Cf-peptidekre következtethetünk a tripánkék festék alkalmazásával, mivel képes az extracelluláris fluoreszcencia kioltására, illetve a tripánkék segítségével a sejtek életképességére következtethetünk, ugyanis ez a festék az élő sejtek membránján nem, kizárólag az elpusztult sejtek membránján jut át és a citoplazmában található fehérjékhez kötődik (Nuutila és Lilius 2005). Az A431 sejtvonal esetén, a tripszinezési idővel jelentős fluoreszcencia intenzitást tapasztaltunk, a tripánkéssel való kezelés csak kis mértékben csökkentette a fluoreszcencia intenzitást az ERD és S100 peptidek esetében (25. ábra). A MonoMac6 sejtek esetén nincs különbség a tripánkék-oldattal kezelt és kezeletlen Cf-pozitív sejtek száma között, ebből arra következtethetünk, hogy a peptidek főleg a sejten belül helyezkedtek el.



**25. ábra** Tripánkék-oldatos kezelés hatása a MonoMac6 (A) és az A431 (B) sejtvonalakra. A peptidek színekódja a következő: ERD-A: rózsaszín, ERD-B: barna, ERD-C: kék, S100: zöld. A tripánkék oldattal kezelt Cf-pozitív sejteket világosabb színnel jelöltem.

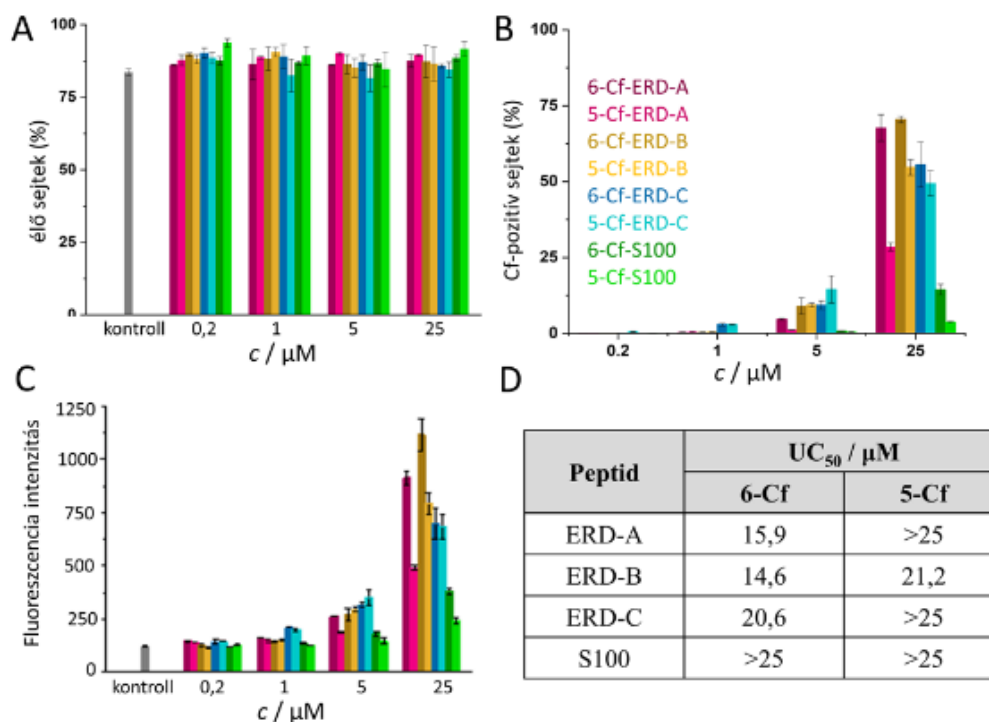
Az ERD és S100 peptidek esetén koncentrációfüggő sejtbejutást mutattak a MonoMac6 és A431 sejtvonala esetén (26. ábra): minden koncentráció esetén a legalacsonyabb sejtbejutás az S100 peptidek esetén figyelhető meg. 1 és 5 µM esetén az ERD-C, 25 µM esetén az ERD-B mutatja a legnagyobb sejtbejutást. A tendenciát alátámasztja a Cf-pozitív sejtek száma és az intracelluláris fluoreszcencia intenzitás is.

Az 5-Cf és 6-Cf konjugátumok több peptid esetén sejtbejutást tekintve jelentős eltérést mutatnak: általánosan elmondható, hogy a 6-Cf konjugátumok nagyobb arányban jutnak be a sejtbe, az eltérés mértéke függ a hordozó-peptid szekvenciájától. Míg a 6-Cf-ERD-A peptid esetén kb. 2-szer több peptid jut be a sejtbe, mint a 5-Cf-ERD-A konjugátumból 25µM peptidkoncentrációnál. Jelentős különbség figyelhető meg 6- és 5-Cf-S100 esetén. ERD-B az 5- és 6-Cf izomer sejtbejutása között kisebb különbség figyelhető meg. Az ERD-C peptid esetén nincs különbség az intracelluláris fluoreszcencia intenzitásában a két izomer közt egyik vizsgált koncentráció esetén sem.

A különböző konjugátumok sejtbejutásának összehasonlításához  $UC_{50}$  értéket határoztunk meg (26/D. ábra), amely annak a peptidkoncentrációnak felel meg, ahol a sejtek 50%-a Cf pozitív. Megfigyelhető, hogy a 6-Cf izomerek esetén az  $UC_{50}$  érték minden esetben kisebb, mint az 5-Cf-konjugátumok esetén, tehát a sejtbejutás nagyobb mértékű. A peptideket összehasonlítva látható, hogy a legkisebb  $UC_{50}$  értékkel rendelkezik az ERD-B peptid mindkét Cf-konformer esetén. A sorrendben ERD-A és C

következik, hasonló sejtpenetrációs képességekkel. A legnagyobb  $UC_{50}$  értékekkel az S100 peptidok rendelkeznek az A431 sejtek esetén.

Az eredmények tükrében elmondható, hogy a vizsgált peptidok képesek bejutni az A431 és MonoMac6 sejtekbe. Közepesen jól penetrálnak a membránon, és a szekvenciában lévő kisebb eltérések miatt a peptidok penetrációja eltérő.

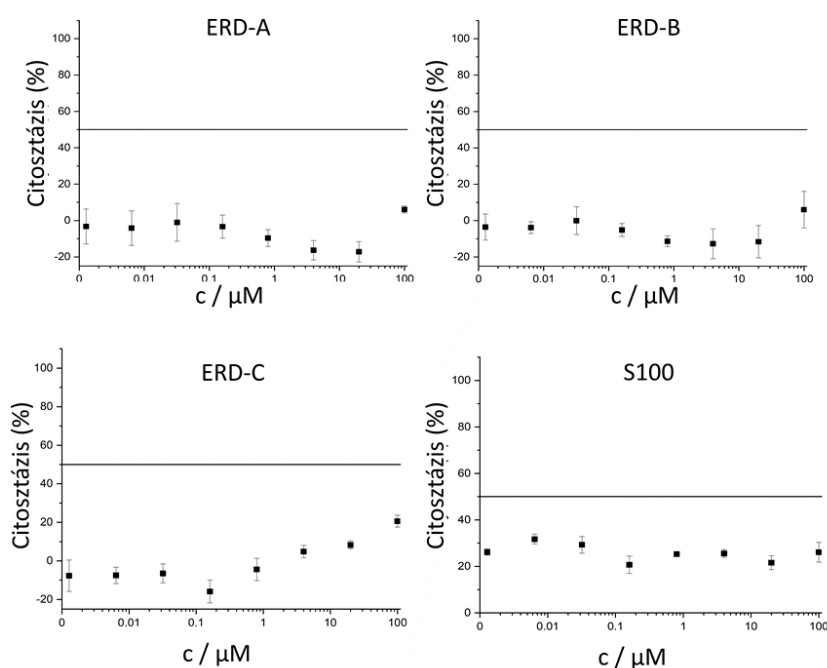


**26. ábra** *In vitro* sejtpenetráció A431 sejtvonalon: élő sejtek aránya (A), Cf-pozitív sejtek aránya (B), intracelluláris fluoreszcencia intenzitás (C) és  $UC_{50}$  értékek (D). A peptidok színkódja a B.ábrán látható.

Az *in vitro* sejtpenetrációs vizsgálatok során ellenőriztük az 5- és 6-Cf-konjugátumok citotoxikus és citosztatikus hatását. Az áramlási citométerrel mért élő sejtek száma alapján az A431 sejtekre nézve sem az 5-, sem a 6-Cf-peptid konjugátumok nem voltak toxikusak a vizsgált koncentrációtartományban, a relatív életképesség minden konjugátum esetén hasonló a kezeletlen sejtekhez. A relatív életképesség minden esetben meghaladta a 80%-ot (26/A. ábra).

A Cf-peptidok *in vitro* citosztatikus és citotoxikus hatását továbbá kolorimetriás tetrazólium (MTT) módszerrel is vizsgáltuk a fluorofórral nem jelölt peptideken. A módszer alapja, hogy az MTT-t (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium)-

bromid, amely egy sárga vízoldható tertazólium só, az élő sejtek mitokondriális szukcinát dehidrogenáz enzimeje átalakítja formazán származékká. A formazán származék lila színű csapadék. A keletkezett kristályok kolometriásan mérhetők, az abszorbancia élő sejtek számával arányosan kisebb. Az MTT-teszt előnye, hogy gyors, könnyen kivitelezhető, jól reprodukálható és nagy átérzékenységgel (Fotakis és Timbrell 2006). A mérés során az A431 sejteket 20-24 órán kezeltük az ERD és S100 peptidekkel ( $1,28 \cdot 10^{-3}$  –  $100 \mu\text{M}$  koncentráció tartományban). A sejteket mosás után 72 órán keresztül inkubáltuk az MTT-tesztet megelőzően. Méréseink alapján sem az ERD, sem az S100 peptidek nem toxikusak a sejtekre a vizsgált koncentrációtartományban (27. ábra).

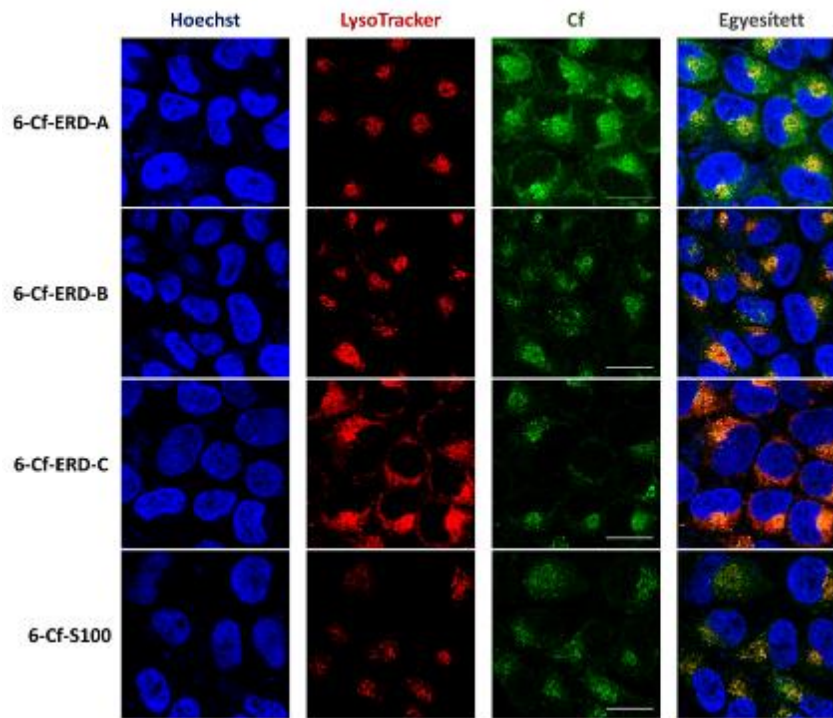


**27. ábra** Citosztázis vizsgálat MTT-teszt alapján A431 sejtvonalon. Az ERD és S100 peptidek  $\text{IC}_{50}$  értéke nagyobb, mint  $100 \mu\text{M}$ .

#### 4.3.4. ERD és S100 peptidek intracelluláris lokalizációja

A sejtben belüli lokalizáció felderítését konfokális lézer-pásztázó mikroszkóp (confocal laser scanning microscopy, CLSM) segítségével végeztük.  $25 \mu\text{M}$  Cf-jelölt peptidekkel A431 sejteket 90 percen keresztül inkubáltuk. A Hoechst 33342 sejtmagfestést és LysoTracker Deep Red lizoszómafestést alkalmaztunk. A mikroszkópos képek a 28. ábrán láthatók. Megfigyelhető, hogy a peptidek nem jutnak a sejtmagba, nem mutatnak kolokalizációt a sejtmagfestéssel. 6-Cf-ERD-A főleg a citoplazmában, 6-Cf-

ERD-B és 6-Cf-S100 részben a citoplazmában és részben lizoszómákban, 6-Cf-ERD-C főleg lizoszómákban lokalizálódik. Az 5-Cf-peptidek lokalizációja megegyezik a 6-Cf konjugátumokéval. A lizoszóma festéssel való ko-lokalizáció a Cf-peptidek vezikuláris transzporttal való felvételére utalhat.



**28. ábra** Konfokális lézer-pásztázó mikroszkópos képek 6-Cf-peptid konjugátumok esetén. A sejtmagot Hoechst 33342 festéssel kékre, a lizoszómákat LysoTracker DeepRed festéssel pirosra festettük.

#### 4.3.5. ERD és S100 peptidek sejtbejutási mechanizmusának vizsgálata

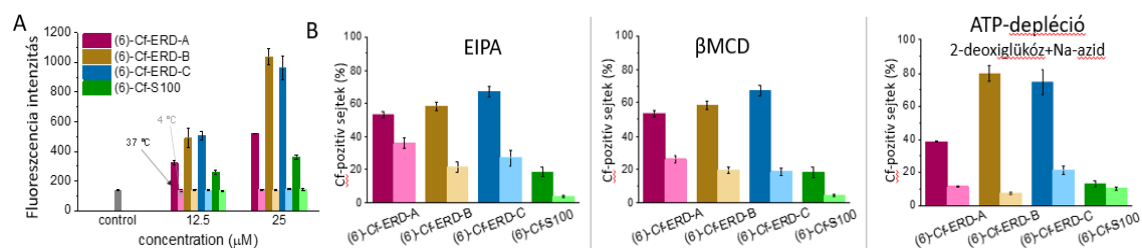
A sejtbejutás általánosan két fő útvonalon valósulhat meg: endocitózis és direkt transzlokáció. A Cf-konjugátumok internalizációs mechanizmusának felderítéséhez különböző gátlószereket, ill. inkubációs körülményt alkalmaztunk: ATP depléción, endocitózis inhibitorok és alacsony hőmérséklet. Az inkubációs hőmérséklet 4°C-ra csökkentésével előtérbe kerül az alternatív útvonal, a direkt transzlokáció, amely például a penetratin feltételezett internalizációs mechanizmusa (Conner és Schmid 2003, Trabulo és mtsai 2010).

Az ATP depléción az energiafüggő útvonalakat gátolja, ehhez az antimetabolit 2-deoxiglükózt és az oxidatív foszforilációt gátló nátrium-azidot használtunk (Schwoebel és mtsai 2002). Továbbá a következő inhibitorokat alkalmaztuk:

- 5-(N-etil-N-izopropil)-amilorid (EIPA), amely egy amilorid analóg makropinocitózis inhibitor (Meier és mtsai 2002, Swanson és Watts 1995).
- $\beta$ -metilciklodextrin ( $\beta$ MCD), amely a kaveola és lipid raft internalizációs útvonalakat gátolja, azáltal, hogy szelektíven kivonja a koleszterint a plazma membránból (Rodal és mtsai 1999).

Az alacsony inkubációs hőmérséklet jelentős csökkenést okozott a peptid-konjugátumok fluoreszcencia intenzitásában, amely arra utal, hogy a direkt transzlokáció nem jelentős az 6-Cf-ERD és 6-Cf-S100 peptidek bejutásában (29/A ábra).

Az inhibitorokkal végzett kísérletekben (EIPA,  $\beta$ MCD, ATP depléción) a Cf-pozitív sejtek számának jelentős csökkenését tapasztaltuk (29/B-D. ábra). Ez alapján arra következtetünk, hogy a vizsgált peptidek endocitózis és makropinocitózis útján jutnak az intracelluláris térbe, nem direkt transzlokációval mint a penetratin.



**29. ábra** Alacsony hőmérséklet (4°C, A ábra) és gátlószerek (B) hatása a sejtpenetrációra.

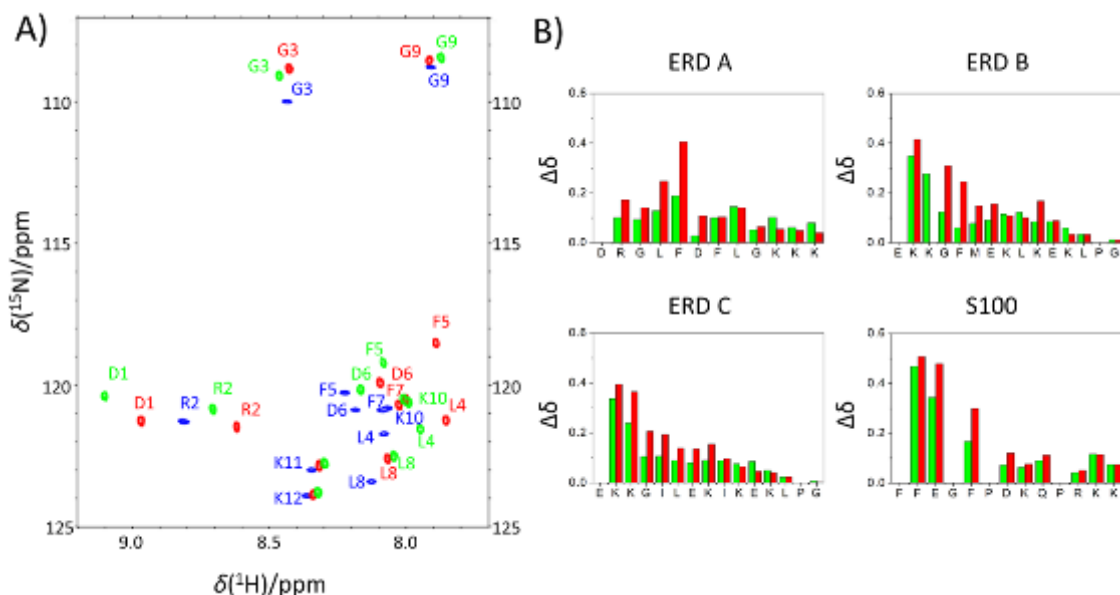
#### 4.3.6. Peptidek és Cf-jelölt peptidek szerkezeti vizsgálata

Az *in vitro* sejtpenetrációs vizsgálatok alapján megállapítható, hogy az 5- és 6-Cf-jelölt peptidek sejtbefutása eltérő. Ennek szerkezeti okait és a Cf-jelölés esetleges kölcsönhatását a peptiddel NMR spektroszkópia segítségével vizsgáltam. Az atomi szintű jellemzéshez homo- és heteronukleáris méréseket végeztem különböző pH értékeknél (tipikusan pH 3,0; 5,0 és 7,0) természetes izotópeloszlású peptidek és Cf-konjugátumok esetén.

A Cf hatását az amid környezetekre  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -SOFAST-HMQC spektrumon követtem (30. ábra) A változás kvantitatív jellemzésére  $\Delta\delta$  értékeket számítottam az egyes aminosavakra a következő egyenlet alapján:

$$\Delta\delta = \sqrt{(\delta_{H_1} - \delta_{H_2})^2 + (0.1(\delta_{N_1} - \delta_{N_2}))^2}$$

ahol 1-es indexszel a peptid, 2-es indexszel a Cf-konjugátumhoz tartozó kémiai eltolódásokat jelöltem (30. ábra).



**30. ábra** ERD-A és Cf-konjugátumainak  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -SOFAST-HMQC spektruma (pH=3,0),  $\Delta\delta$  értékek pH=3,0-on (B) (ERD-A: kék, 5-Cf-ERD-A: zöld, 6-Cf-ERD-A: piros)

Megfigyelhető az 5- és 6-Cf-konjugátumok esetén, hogy a fő változások a peptid N-terminális régióját érintik. Ebben a régióban a  $\Delta\delta$  érték általában 0,4 körüli. A C-terminális felé haladva a Cf hatása csökken, de minimum 5-7 aminosav NH környezetét jelentősen megváltoztatja ( $\Delta\delta > 0,1$ ). A peptideket összehasonlítva láthatjuk, hogy az ERD-A peptid esetén a tendencia eltér a többi peptidhez képest: az N-terminális aminosavak  $\Delta\delta$  értékei nem kiugróan nagyok, ellenben jelentősen eltér az F5 aminosav esetén, amely kölcsönhatásra utal a fluorofór és az aromás oldallánc közt.

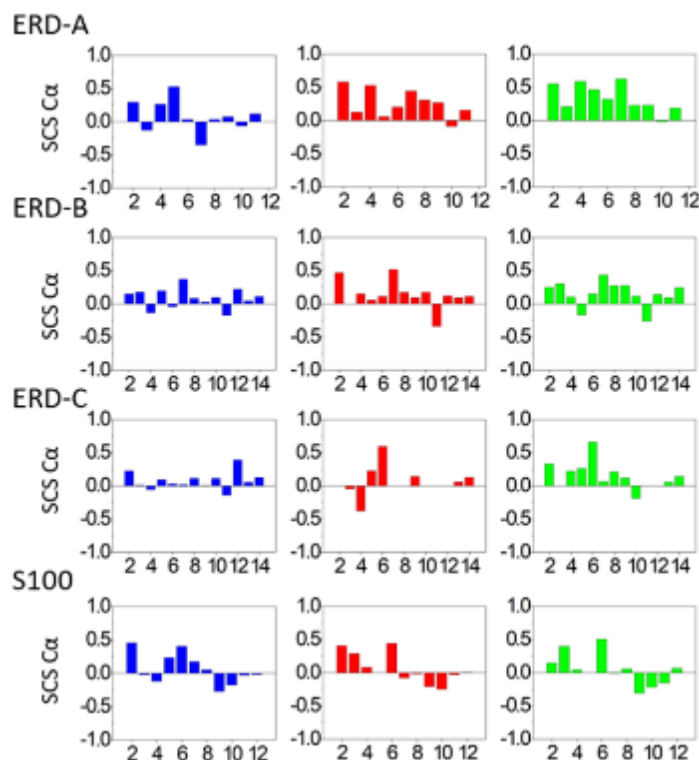
Általánosan elmondható, hogy a 6-Cf nagyobb perturbációt okoz az egyes aminosav NH környezetekre, mint az 5-Cf.

A  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  és  $^{15}\text{N}$  atomok kémiai eltolódásai alapján következtethetünk a szerkezetben bekövetkező változásokra. A  $^1\text{H}^\alpha$  és  $^{13}\text{C}^\alpha$  atomokra másodlagos kémiai eltolódást számoltam (31. ábra):

$$\text{SCS} = \delta_{\text{mért}} - \delta_{\text{rc}}$$

ahol  $\delta_{rc}$  az adott atom random coil szerkezetéhez tartozó kémiai eltolódása. Ebben az esetben a random coil kémiai eltolódások meghatározásához a POTENCI webszertvert (Nielsen és Mulder 2018) használtam, amely figyelembe veszi a pH, hőmérséklet és a környező aminosavak hatását az adott atomra.

A Cf-konjugáció hatására minden esetben a szerkezeti hajlam enyhén helikális lesz, de az SCS értékek minden esetben 0 körüliek, ezért csupán helikális hajlamról beszélhetünk. A legnagyobb változás 5- ill. 6-Cf-ERD-A esetén tapasztalható.

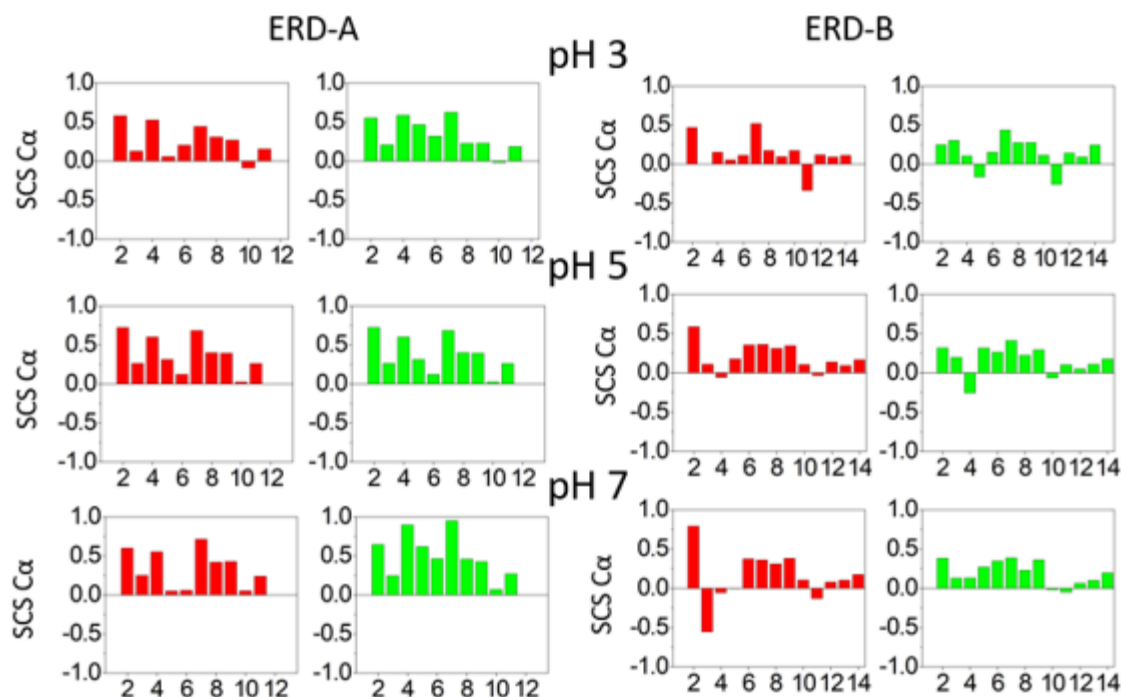


**31. ábra** Az ERD és S100 peptidek másodlagos kémiai eltolódásai: peptid (kék), 6-Cf-konjugátum (piros), 5-Cf-konjugátum (zöld)

A sejten belüli környezetek modellezésére különböző pH értékeknél (pH=5,0; 7,0) is megvizsgáltam az 5- ill. 6-Cf-jelölés szerkezetre gyakorolt hatását. Az ERD-A és B peptideket vizsgáltam, amelyeknél 5- és 6-Cf konjugátumok jelentős sejtpenetrációs különbségeket mutattak. A  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -SOFAS-T-HMQC spektrumokon a jelek szélesedtek a gyors protoncsere folyamatok miatt az amid NH és a víz molekulák között. A legtöbb aminosav esetén az amid régió kémiai eltolódásai nem változnak a pH-val, kivéve a pH-ra érzékeny glutaminsavak esetén, ahol az oldallánc  $\text{pK}_a=4,07$ .



Az SCS értékek alapján sem az 5- és 6-Cf-ERD-A, sem az 5- és 6-Cf-ERD-B peptidek szerkezeti hajlamai nem változnak, pH=5,0 és 7,0 oldatban rendezetlenek maradnak (32. ábra).

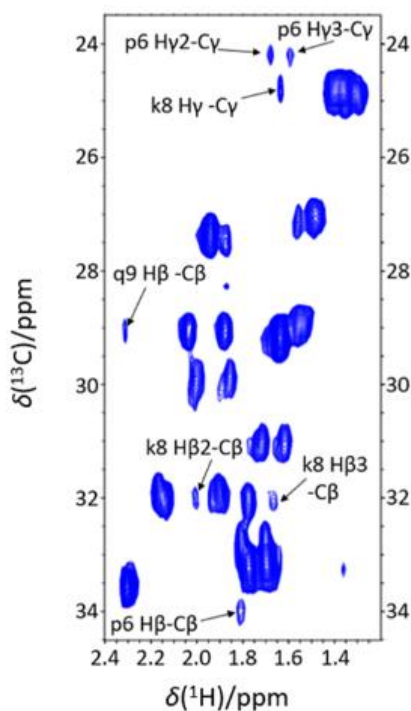


**32. ábra** A pH hatása a másodlagos kémiai eltolódásra ERD-A és B konjugátumok esetén (6-Cf-: piros, 5-Cf-konjugátumok: zöld)

A térben közeli ( $< 5 \text{ \AA}$ ) atomok azonosítását  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY spektrum segítségével végeztem. Mivel a peptidek rendezetlenek, ezért főleg szekvenciális ( $i, i-1$ ) NOE jeleket detektáltam. A karboxifluoreszcein főleg az N-terminálison található első és második aminosavval ad keresztcsúcsot, azonban néhány esetben a Cf és a távolabbi aminosavak között is azonosíthatók NOE keresztcsúcsok: 6-Cf-ERD-A esetén Cf H7 és H14 keresztcsúcsot adnak F5 oldallánc HD és HE, illetve Cf H7 F7 HZ protonnal. Hasonló tendencia figyelhető meg 5-Cf-ERD-A, az 5- és 6-Cf-ERD-B esetén: gyenge NOE detektálható F5 aromás oldallánca és az 5/6-Cf protonjai között. Fő különbség az 5- és 6-Cf-konjugátumok közt, hogy a 6-Cf nagyobb intenzitású NOE keresztcsúcsot a fenilalanin oldallánccal, amely arra utal, hogy térben közelebb vannak egymáshoz, mint az 5-Cf az F5 aromás gyűrűjéhez. Az F5 aromás oldallánca ezért „eltémetettebb” a 6-Cf-variánsok esetében, amely hidrofobicitás csökkenéssel jár. A hidrofobicitásbeli eltérés megfigyelhető a HPLC-kromatogramokon tapasztalt retenciós időkben, ahol a 6-Cf

variánsok a fordított fázisú HPLC-s oszlopon kisebb retenciós idővel rendelkeznek, mint az 5-Cf-variánsok. Például  $t_r(\text{ERD-A})= 15,1$  perc,  $t_r(6\text{-Cf-ERD-A})= 18,1$  perc,  $t_r(5\text{-Cf-ERD-A})=18,3$  perc.

Az S100 peptidok esetében fontos megjegyezni, hogy aminosavösszetételben hasonlít ERD-A peptidhez: 4 pozitív töltésű aminosav, 2 negatív, az aminosaveloszlás eltérő. Ezenfelül az S100 két darab prolint tartalmaz: 6. és 10. pozícióban. A prolinok korábbiak már tárgyalt *cisz-transz* izomériája (33. ábra) az S100 peptidnél is detektálható: 25%-ban a *cisz*-konformer is előfordul az oldatban. A *cisz*-izomer azonosítása az  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HQSC spektrumon detektált prolin oldallánchoz tartozó jelek alapján történt (33. ábra) A minor prolin oldallánchoz tartozó  $\text{C}^\beta$ ,  $\text{C}^\gamma$  kémiai eltolódás különbség a *cisz*-izomerre jellemző, 10 ppm körüli ( $\delta(\text{C}^\beta)=33,93$  ppm,  $\delta(\text{C}^\gamma)=24,18$  ppm). A prolin szerkezeti változásokat okoz: hélix-törő sajátságú, ezenfelül a *cisz*-konformer esetén a konformációs sokaság egy részében egy merev turn alakul ki, amely hátrányos lehet a receptor-/membránkötődés szempontjából. ERD-B és C esetén a prolin a C-terminális végen található, amely kevésbé befolyásolhatja a sejtpenetrációs tulajdonságokat.



**33. ábra** A *cisz-transz* prolin izoméria detektálása az S100 peptid esetén a  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC spektrumon (1mM 6-Cf-S100, pH=7,0, NS=120)

#### 4.4. Szerin proteáz inhibitorok vizsgálata

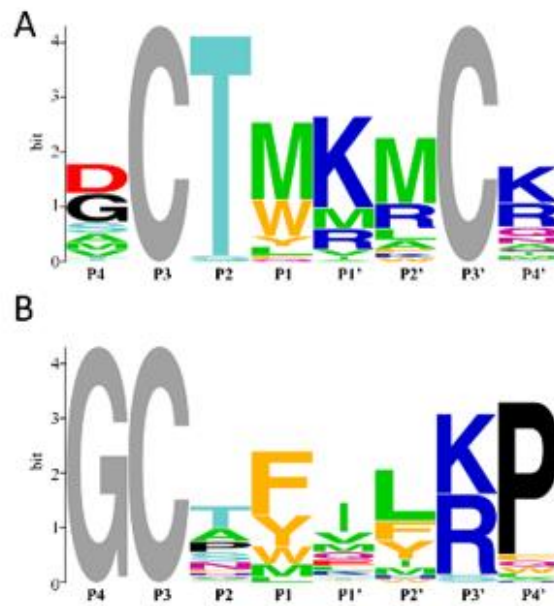
##### 4.4.1. Konszenzus hurokszekvencia meghatározása

Doktori munkám az SGPI-2 és SPINK1 inhibitorok esetén vizsgáltam a Laskowski és munkatársai munkája nyomán létrehozott vázszerkezet-függetlenség modell alkalmazhatóságát. Az elmélet szerint az optimált enzimhez kötődő hurok felcserélhető a két váz között, és a hurokcserélt variánsok jelentős affinitásvesztés nélkül tudnak az enzimhez kötődni. Az optimális hurokszekvencia létrehozására Pál Gábor és kutatócsoportja fágbemutatással előállította az összes lehetséges hurokszekvenciájú variánst. Ehhez első lépésben egy inhibitor könyvtár készült, ahol a P4-P4' pozíciókban randomizálták az aminosavakat. Az inhibitorok funkciójának megtartásához bizonyos pozíciók változatlanok maradtak: az SGPI-2 esetén a P3 és P3' pozíciókban diszulfidhidakat kialakító ciszteinek találhatóak, melyek szükségesek az inhibitor stabil szerkezetének kialakításában, ezért ezeket nem változtatták. Tehát az SGPI-2 hurokszekvenciája a P4, P2, P1, P1', P2' és P4' pozíciókban változott. A SPINK1 esetén a P3 pozícióban hasonlóan SGPI-2-höz cisztein található, ennek megváltoztatása a szerkezet szétesésével jár, ezért P2-P4' pozíciókat randomizálták. Mindkét váz esetén fágbemutatással elkészült az összes lehetséges hurokszekvenciát tartalmazó inhibitorvariáns, amely összesen  $7,00 \cdot 10^8$  SGPI-2 és  $6,25 \cdot 10^8$  SPINK1 klónt jelent.

A következő lépés a kimotripszinhez kötődni képes variánsok kiválogatása volt a könyvtárakból. A gyengén, illetve nem kötődő klónok mosással eltávolításra kerültek. A többi, nagy affinitással kötődő klónokat baktériumsejtekben felszaporították. Ezt követően, meghatározták a kimotripszinhez kötődő klónok szekvenciáit. Az 52 db SGPI-2 és 56 db SPINK1 klón DNS-ének szekvenálásával megállapítható, hogy a kötőhurok melyik pozícióban milyen aminosavakat tartalmaz. Az aminosavak gyakoriságát a WebLogo programmal ábrázolták. (34. ábra) Az egyes pozíciókban lévő aminosav gyakoriságok alapján az SGPI-2 váz esetén a P4-P4' pozíciókban a DCTMKMCK, a SPINK1 esetén a GCTFYILKP az „ideális”, azaz konszenzus szekvencia.

Megfigyelhető, hogy a két váz esetében a konszenzus hurokszekvencia jelentősen eltér. SPINK1 váz esetén kimotripszin szubsztrát specificitásának megfelelően a P1 pozícióban aromás aminosavak találhatóak, míg az SGPI-2 váz esetén a térkitöltésű oldallánccal rendelkező metionin a gyakori. P2 pozícióban mindkét váz esetén treonin

fordul elő legtöbbször, azonban míg az SGPI-2 váz esetében ez kizárólagos, addig a SPINK1-nél más, kis térkitöltésű oldalláncú aminosavak (alanin, prolin, szerin) is előfordulnak. A hasítási helytől C-terminális irányban lévő pozíciókban mindkét vázon megfigyelhető a pozitív töltésű aminosav megjelenése: az SGPI-2 esetén P1', P2', illetve P4' pozícióban is előfordulhatnak, SPINK1 esetén kizárólag P3' pozícióban található lizin és/vagy arginin. SPINK1 P4' helyzetben a Kazal típusú inhibitor családra jellemző prolin áll.



**34. ábra** A kimotripszenen szelektált SGPI-2 (A) és SPINK1 (B) szekvencialógói. Szürke színűek a nem randomizált pozíciók. Az aminosavak egy betűs kódjaiban a betűk magassága az adott pozícióban való gyakoriságra utal.

A vázszerkezet függetlenségi modell ellenőrzéséhez mindkét váz esetén a következő variánsokat állították elő: az ideális, konszenzus szekvenciát tartalmazó, illetve hurokcsereált variánsokat. A hurokcsereált variáns a másik váz konszenzus szekvenciáját tartalmazza. Az elnevezéseket és szekvenciákat a 12. táblázat tartalmazza.

A különböző variánsok esetén az inhibíciós állandó (12. táblázat) alapján megállapítható, hogy a hurokcsere mindkét váz esetén csökkentette az enzimaffinitást: az SGPI-2 esetén kb. ötszörös, míg a SPINK1 váznál több nagyságrendű változást tapasztaltunk. Ez a megfigyelés cáfolja, hogy az ideális hurokrégió független a váztól.

**12. táblázat.** Az előállított SGPI-2 és SPINK1 vázas variánsok szekvenciái és inhibíciós állandói.

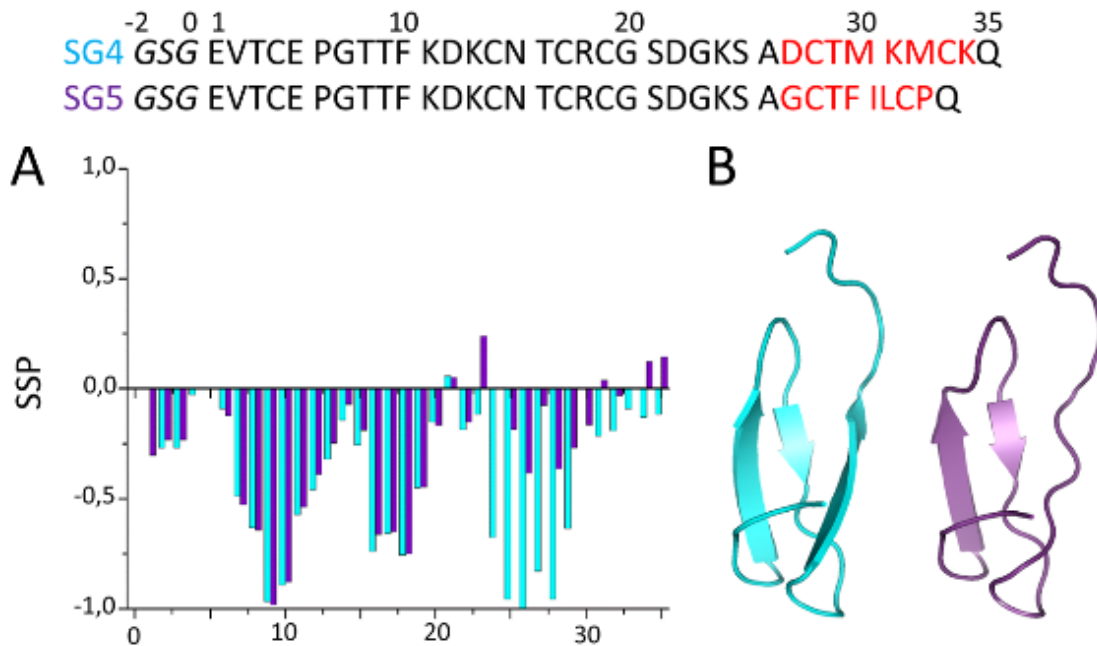
Variáns		Szekvencia	K <sub>i</sub> /nM
		P4-P3-P2-P1-P1'-P2'-P3'-P4'	
wt SGPI-2	vad típusú SGPI-2	A-C-T-L-K-A-C-P	0,027
SG4	konszenzus szekvencia	D-C-T-M-K-M-C-K	0,022
SG5	hurokcsereált variáns	G-C-T-F-I-L-C-P	0,101
wt SPINK1	vad típusú SPINK1	G-C-T-K-I-Y-D-P	nincs adat
SP5	konszenzus szekvencia	G-C-T-F-I-L-K-P	0,0005
SP6	hurokcsereált variáns	D-C-T-M-K-M-A-K	15

#### 4.4.2. Szerin proteáz inhibitorok szerkezetvizsgálata

A kimotripszin kötődéshez optimált hurokszekvenciával rendelkező és a hurokcsereált variánsok szerkezetvizsgálatát NMR spektroszkópiával követtem. Doktori munkám során 5 variáns (SG4, SG5, SP5, SP6 és vad típusú SPINK 1) esetén végeztem el a jelhozzárendelést. A természetes izotópeloszlású SGPI-2 vázas variánsok assignációja homonukleáris spektrumok alapján készült. A SPINK1 mutánsok esetén rendelkezésre állt <sup>15</sup>N, illetve az SP5 esetében <sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N jelölt fehérje is. A meghatározott kémiai eltolódások a következő BMRB azonosítók alatt érhetők el: 27491 (SG4), 27492 (SG5), 27500 (SP5), 27501 (SP6) és 12020 (vad típusú SPINK1).

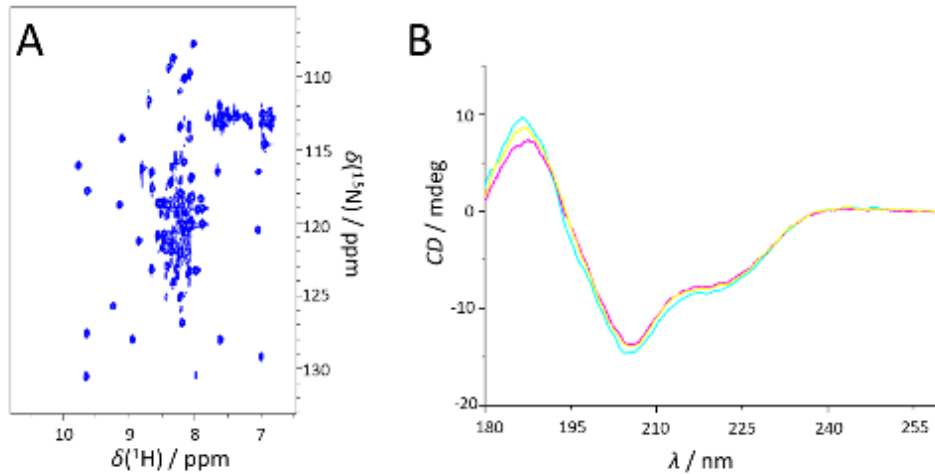
Az inhibitorok másodlagos szerkezetének jellemzéséhez a <sup>1</sup>H<sup>α</sup> kémiai eltolódásokból SSP (Secondary structure propensity) értékeket számoltam (35. ábra). Az SSP értékek esetén a 0,5 feletti pozitív tendencia helikális régiókra utal, -0,5-nél kisebb értékeknél β-szálak, 0 körül rendezetlen régiók találhatóak. Az irodalomban publikált SGCI inhibitor szerkezete (PDB ID: 1KGM) (Gáspári és mtsai 2002) 3 rövid β-szálból és az őket összekötő loopokból áll, a C-terminálison található hurok rendezetlen. A szerkezetet 3 diszulfidhíd merevíti (C4-C19, C14-C33, C17-C28). A β-szálak az F10-K11, T16-C19 és A26-C28 régiókban találhatóak. A konszenzus variáns SG4 szerkezete jelentősen nem tér el az irodalmi SGCI variánstól. Az SG4 szerkezetében megtalálható a 3 β-szál (G7-D12, T16-R18, K24-T29) és az őket összekötő turn-ök (K13-N15, S21-G23). A SPINK1 konszenzus szekvencia az SGPI-2 vázon a másodlagos szerkezet

változását okozza. A hurokcsereált SG5 variáns esetében a huroktól távolabb eső, N-terminális 2  $\beta$ -szál nem változik, azonban C-terminális 3.  $\beta$ -szál rendezetlenné válik. (35. ábra) Az S25-T29 régió gyenge, naszcens  $\beta$ -hajlamot mutat. Az NMR spektroszkópiai eredmények rámutatnak arra, hogy az SGPI-2 inhibitorok esetén tapasztalt hurokcsere okozta szerkezeti változás a kimotripszinhez való affinitás csökkenését vonja maga után.



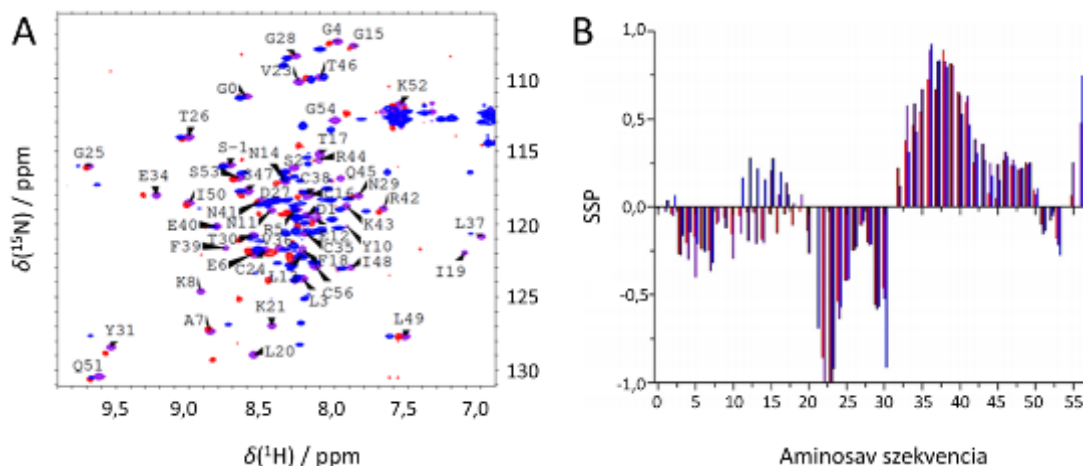
**35. ábra** A vizsgált SGPI-2 vázas inhibitorok SSP értékei (A) és az értékek alapján jóslott szerkezetek (B). A hurokrégiót pirossal jelöltem a szekvenciában. (világos kék: SG4, lila: SG5)

Az SPINK1 vázas variánsok 56 aminosavból állnak, a jelentős jelátfedések miatt az NMR spektroszkópiai vizsgálatokhoz  $^{15}\text{N}$ , ill.  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  jelölt fehérjemintákat használtam. A jelhozzárendelést pH=3,0 közegben felvett spektrumokon végeztem, ugyanis az SGPI-2 vázas variánsok esetében használt közel semleges pH-n a jelek nagyrésze kiszélesedett (36. ábra). Korábbi CD spektroszkópiai vizsgálatok során megállapítottuk, hogy a SPINK1 variánsok szerkezete stabil pH=3 és 7 között (36/B. ábra). Az alacsonyabb pH-n a protoncsere lassú, így a vad típusú és az SP5 variáns esetében a jelazonosítást el lehetett végezni. Az SP6 variáns esetében a hurok amid jelei alacsony pH-n is kiszélesedtek, a jelhozzárendelés ~80%-ban volt elvégezhető.



**36. ábra** Az SP6 variáns  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC spektruma pH=6,5-ös közegben (A). A vad típusú SPINK1 CD spektruma eltérő pH-jú oldatokban (pH=3,0: kék, pH=4,0 rózsaszín, pH=5,0: sárga)

A SPINK1 mutánsok  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC spektrumain megfigyelhető, hogy a három variáns esetén a váz amid jelei hasonló kémiai eltolódásnál jelennek meg. Eltérés a hurokrégió amid környezetében mutatkozik (37. ábra). Ez a megfigyelés összhangban van a három variáns (vad típusú SPINK1, az SP5 és SP6) esetén számolt SSP értékekkel, melyek nem mutatnak eltérést a másodlagos szerkezeti elemekben (37/B. ábra). Mindhárom variáns N-terminális régiója rendezetlen (D1-P22), melyben L3-A7 esetén enyhe turn hajlam jelentkezik. A rendezetlen régiót 2 darab rövid  $\beta$ -szál (V23-G25, N29-T30) és egy  $\alpha$ -hélix (N33-N41) követi A hurokcsereált SP6 variáns esetén a jelzéselés miatt a jelhozzárendelés nem teljes, azonban nincs jelentős különbség a másodlagos szerkezetben a vadtypushoz és konszenzus SP5 variánshoz képest. A rendezetlen N-terminálist P22-V23 régióban egy  $\beta$ -szál követi, amely után egy rövid loop található. A 2.  $\beta$ -szál a G28-Y31 régióban van. V36-N41 régió helikális.



**37. ábra** SPINK1 variánsok  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC spektrumai (A) és SSP értékek az aminosavszekvencia mentén (B): vadtypus (piros), SP5 (lila), SP6 (kék). A spektrumon az SP5 mutánsához tartozó asszignáció van feltüntetve. Az N-terminálison lévő klónozási termék (GSG) aminosavait -2, -1, 0 sorszámmal jelöltem.

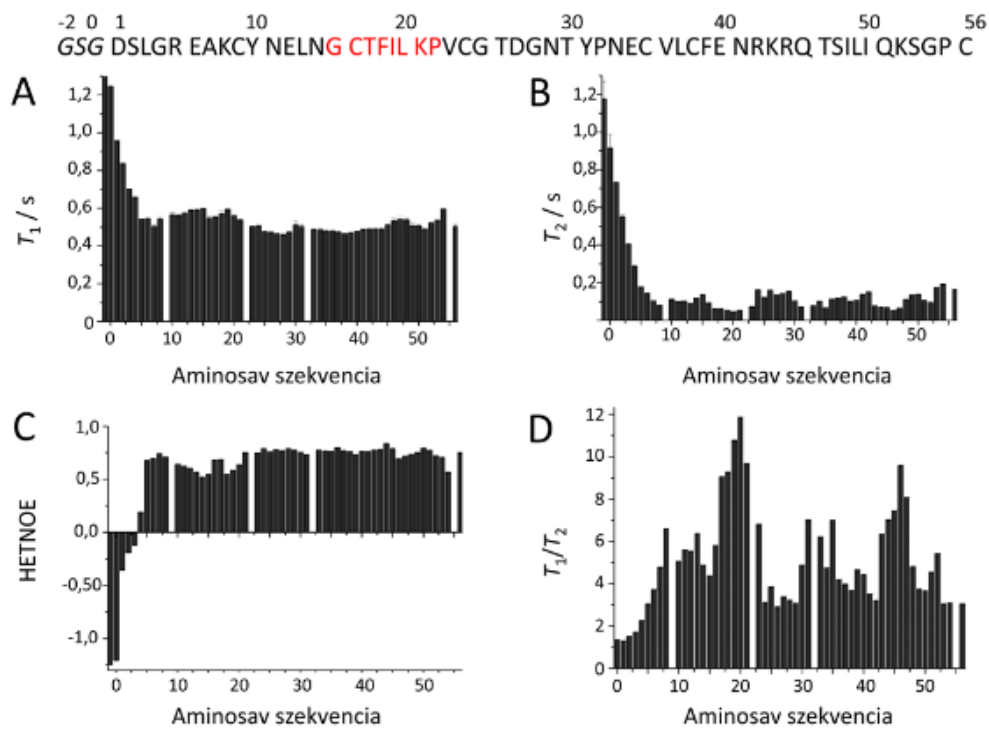
A vizsgált inhibitorok szerkezeteit összevettem az irodalomban már publikált adatokkal. Az irodalomban két SPINK1 fehérje szerkezetét írták le: a PSTI-3 variánsét röntgenkristallográfia (Hecht és mtsai 1992) és PSTI-7 variánsét NMR spektroszkópia segítségével (Klaus és Schomburg 1993). Ezekben a szerkezetekben egy további, 3.  $\beta$ -szál jelenlétét is leírják I50-S53 régióban. Ez a régió mobilis, amire a PSTI-3 röntgenszerkezetében a kicsi elektronsűrűség utal. Az NMR segítségével meghatározott PSTI-7 variáns a kémiai eltolódásaiból is számoltam SSP értékeket. Az adatok szintén arra utalnak, hogy szerint ez a régió gyenge  $\beta$ -hajlammal rendelkezik, azonban a 3.  $\beta$ -szál nem stabil. Az általam vizsgált variánsok Q51-S53 régiójában hasonló tendencia figyelhető meg. Összességében megállapítható, hogy a hurokcseré nem okoz jelentős változást a szerkezetben a SPINK1 váz esetében.

#### 4.4.3. SPINK1 váz variánsok dinamikai jellemzése

A SPINK1 variánsok esetén a hurokcseré nem okoz szerkezeti változást, amely alátámasztaná a jelentős enzimaaffinitás-csökkenést, ezért vizsgáltam, hogy történik-e változás az inhibitorok dinamikai tulajdonságaiban. Ezt  $^1\text{H},^{15}\text{N}$  gerincdinamikai mérésekkel valósítottam meg, ahol a  $T_1$  és hetNOE mérések a gyors (ps-ns) mozgásokról adnak információt, míg a  $T_2$  mérések a lassú konformációs mozgásokat jellemzi.



A konszenzus hurokszekvenciát tartalmazó SP5 inhibitor esetén az egyes aminosavak  $T_1$  relaxációs idejei hasonlóak (38/A. ábra), az átlaguk 0,52 s. Ennek oka, hogy a SPINK vázát 3 diszulfidhíd merevíti. A  $T_1$  relaxációs időkben eltérések egyedül a mozgékony N-terminális régióban megfigyelhetők. Hasonló tendenciák figyelhetők meg a  $T_2$  és hetNOE mérések esetén is (38/B-C. ábra). A hetNOE értékekben a hurokrégióban csökkenést tapasztalunk a vázhoz képest, amely a hurok mozgékonyaságára utal. A mozgási anizotrópia kiküszöbölésére a  $T_1/T_2$  relaxációs idők arányát vizsgálva (38/D. ábra) két régió mutat jelentős eltérést az átlagértéktől: a kötőhurok és az  $\alpha$ -hélix K43–S47 közti szakasza. Ez az eltérés kémiai vagy konformációs cserét jelez az adott régiókban.



**38. ábra** Az SP5 inhibitor relaxációs méréseinek eredményei. A szekvenciában (felül) pirossal jelöltem a hurokrégiót.

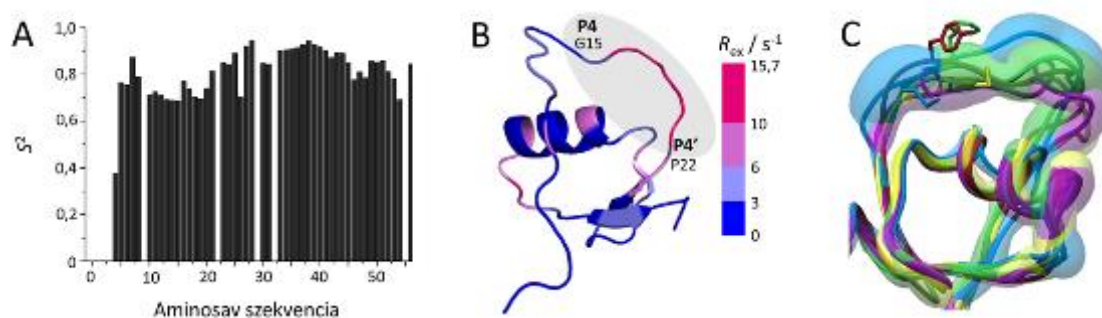
A mért relaxációs paramétereiből Lipari-Szabó modellfüggetlen analízist végeztem axiálisan anizotróp megközelítéssel. Az  $S^2$  rendparaméter meghatározásához az 1HPT PDB azonosítójú SPINK1 röntgenszerkezetet használtam, mivel a SPINK1 variánsok szerkezetében nincs jelentős eltérés.

Az illesztett  $S^2$  rendparaméterek a globuláris fehérjének megfelelően 0,8 körüli/feletti értékek (39/A. ábra), ami arra utal, hogy a legtöbb N-H kötésvektor mozgása korrelál az inhibitor globális mozgásával. Egyedül az N-terminális aminosavak esetén 0 körüli az érték, ami a globálistól független mozgásokra jellemző. A kötőhurok  $S^2$  rendparaméterei 0,7 körüliek, tehát a hurokrégió is merev, ellenben a környező régiókhoz képest kisebb, ami a hurok viszonylagos mozgékonyására utal.

A rendparaméterek mellett Lipari-Szabó modellfüggetlen analízis során illesztett  $R_{ex}$  (1/s) paraméterek lassú konformációs mozgások jelenlétét jelzi a hurokrégióban (17-23), illetve az  $\alpha$ -hélix C-terminális szakaszán (39/B. ábra).

Az SP5 variáns gerincdinamikai vizsgálatai során a hurokrégió esetén lassú konformációs mozgások detektálhatók, melyek magyarázatul szolgálnak a jelszélesedésnek pH=3,0-nál magasabb értékeknél. Mivel az SP6 variáns esetén a hurokrégió pH=3,0 közegben sem volt detektálható, ezért gerincdinamikai mérések nem készültek.

A két SPINK1 vázas variáns közti dinamikai eltéréseket a továbbiakban molekuladinamikai szimulációkkal vizsgáltuk. A SPINK1 variánsok molekuladinamikai szimulációit és a kapott adatok kiértékelését Micsonai András és Kardos József végezte. Az MD szimuláció eredményei összhangban vannak az NMR relaxációs mérések eredményeivel. A konszenzus és a hurokcsereült variáns esetén is a hurokrégió és a hélix mozgékonyága nagyobb, mint a környező régióké. A kötőhurok a két variáns esetén eltérően viselkedik. Az SP6 esetén a hurokrégió torzult, a P1 az ideálishoz képest térben távol, a P1' pozícióba kerül. Ez a változás okozhatja a több nagyságrendű affinitáscsökkenést.



**39. ábra** A Lipari-Szabó modellfüggetlen analízis során illesztett  $S^2$  rendparaméter (A) és a lassú konformációs mozgásokat jellemző  $R_{ex}$  értékek (B) az SP5 variáns esetében, illetve a SPINK1 variánsok szerkezete az MD szimulációk alapján (C). (SP5: kék, SP6: lila, a többi szín a dolgozatomban nem vizsgált variánsokat jelöl) Az  $R_{ex}$  értékeket az 1HPT PDB azonosítójú SPINK1 szerkezeten ábrázoltam, a hurokrégiót szürke háttérrel jelöltem. A C. ábrát Micsonai András készítette.

## 5. Megbeszélés

A modern gyógyszerkutatás során elengedhetetlen a gyógyszercélpont fehérjék szerkezetének atomi szintű ismerete, illetve gyakran a fehérjék belső mozgásai is szerepet játszanak a gyógyszerhatóanyag-fehérje vagy fehérje-fehérje kölcsönhatásokban.

A rendezetlen fehérjék a gyógyszerkutatás szempontjából még kiaknázatlan terület, annak ellenére, hogy ezek a fehérjék fontos biokémiai útvonalakat szabályoznak. Szerkezetük natív formában és a kölcsönhatásban nehezen vizsgálható a megfelelő, nagy érzékenységgű, atomi szintű mérési módszerek hiányában. Az NMR spektroszkópia alkalmas IDP-k jellemzésére, de a jelenleg használt  $^1\text{H}^{\text{N}}$ -detektálás során a protoncsere nem teszi lehetővé, hogy fiziológias hőmérsékleten és pH-n is információt szerezzünk a szerkezeti hajlamaikról, vagy az IDP-kben kiemelt fontosságú prolinokról. A dolgozatomban bemutatott  $^1\text{H}^{\alpha}$ -detektált módszerek érzékenyek (2D SHACA-HSQC, 3D Pro-(H)CGCBCAHA, 3D Pro-(HCA)NCACBHA). Összehasonlítva  $^{13}\text{C}$ -detektálással, a  $^1\text{H}^{\alpha}$ -detektált mérések ( $^1\text{H}_{\text{start}}$ ,  $^1\text{H}_{\text{detektált}}$ ) 8-szor érzékenyebbek, mint a  $^1\text{H}_{\text{start}}$ ,  $^{13}\text{C}_{\text{detektált}}$  megközelítések ( $\gamma_{\text{start}} \cdot (\gamma_{\text{detektált}})^{3/2}$  alapján). Előnyük, hogy 7-10%  $\text{D}_2\text{O}$  alkalmazásával a víz jele nem zavarja a  $\text{H}^{\alpha}\text{-C}^{\alpha}$  tartományt. Továbbá alkalmasak kis koncentrációban jelen lévő fehérjék vagy konformerek kimutatására.

A) Doktori munkám során a p53 TAD fehérjén végzett vizsgálatok alapján egyértelműen azonosítottam 13 minor prolin jelet a SHACA-HSQC spektrumon. Az új pulzusszekvenciák (3D Pro-(H)CGCBCAHA, és 3D Pro-(HCA)NCACBHA) segítségével meghatároztam az adott izomert, többek közt a p53 biológiai funkciójában szerepet játszó P47 esetében is. Irodalmi adatok alapján a *cisz*-p47 képes közvetlenül a BAX fehérjéhez kötődni, ezáltal apoptózist indukálni (Follis és mtsai 2015). A többi *cisz*-prolin biológiai szerepe egyelőre nem tisztázott, funkcióik feltárásához ezért további kutatások szükségesek.

A SHACA-HSQC alapján követhető poszttranszlációs módosulás is, mely gyakran a fő szabályozó lépés az IDP-k biokémiai feladatainak ellátására. Gibbs és munkatársai a CTD2 repetitív motívumokat tartalmazó fehérje esetén igazolták, hogy a foszforiláció hatására a környező prolin esetén a *cisz-transz* egyensúly eltolódik (Gibbs és mtsai 2017). A CTD2 fehérjében található YSPTpSPC motívum esetén 3-szoros, a YSPTpSPN szakasz esetén 6-szorosára nőtt a *cisz*-prolin aránya.

A p53 TAD<sup>1-60</sup> esetén a foszforiláció hatását a környezetében lévő prolinok *cisz-transz* egyensúlyára a CK2 kináz segítségével vizsgáltam. Első lépésben a kináz főkomponensben található foszforilációs helyeket azonosítottam. A CK2 kináz a T55, S46 és S6 aminosavakat foszforilálta eltérő mértékben. A foszforiláció hatására szerkezeti változás nem történt, csak a lokális atomi környezetek változtak. A foszforiláció helyétől  $\pm 3$  aminosav távolságban az NH régió érintett, illetve a foszforilált treonin/szerin C <sup>$\beta$</sup>  kémiai eltolódása változott. Továbbá a foszforiláció érintette a szerin és treonin környezetében lévő prolinokat is. A foszforilációtól +2, ill. +3 aminosav távolságra lévő prolinok esetén a C <sup>$\alpha$</sup>  és H <sup>$\alpha$</sup>  atomok kémiai eltolódása változott, de a *cisz*-prolin aránya nem változott. A beépült foszfát csoport hatására az S46 melletti P47 esetében a *cisz-transz* egyensúly eltolódik a *transz*-prolin irányába. Ennek oka az lehet, hogy a P47-et szekvenciában követő további negatív töltésű aminosavak követik, és egy plusz negatív töltés kedvezőtlen a *cisz*-prolin esetén. Az érintett régióban a *cisz*-prolin hatására egy merev turn alakul ki, ezáltal a negatív töltések térben közelebb lesznek egymáshoz, mint az elnyújtott *transz*-prolin esetén.

A p53 TAD több prolin esetén a minor prolin mennyisége 4,5-13,0% között változik, több *cisz*-prolin mennyisége is 10% feletti. Az irodalomban az  $i\pm 1$  környezetben található aromás aminosavakkal, kiemelten a triptofánnal való kölcsönhatást teszik ezért felelőssé, mivel egy  $\pi\cdot\text{CH}_2$  kölcsönhatás alakul ki a prolin és a triptofán aromás gyűrűje között (Mateos és mtsai 2020). Mivel a p53 TAD prolin környezetei nem tartalmaznak aromás aminosavakat, ezért az irodalomban elérhető adatok statisztikai elemzésével az egyes aminosav típusok hatását vizsgáltam, hogy melyik pozícióban milyen gyakorisággal fordulnak elő.

A statisztikai adatok elemzésével kapott következő megfigyelések segítséget adhatnak ismeretlen szekvenciák *cisz*-prolin tartalmának predikciójához:

- a) >10%-nál több a *cisz*-Pro aránya, ha az  $i-1$  vagy az  $i+1$  pozíciókban aromás oldalláncú aminosav található. Ez megegyezik Mateos és munkatársai megfigyelésével (Mateos és mtsai 2020). Ennek oka, hogy  $\pi\cdot\text{CH}_2$  stacking kölcsönhatás alakul ki, amely hatására egy rigid szerkezet alakul ki a prolin és az aromás aminosav között. A többi pozícióban az aromás aminosavak előfordulása nem tér el szignifikánsan a referenciától, tehát feltételezhetően nem járulnak hozzá a megnövekedett *cisz*-izomer tartalomhoz. Fontos megjegyezni, hogy a

<5%-nál kisebb *cisz*-prolin arányánál nem található aromás aminosav az  $i\pm 1$  pozíciókban.

- b) Negatív töltésű aminosavak szignifikánsan gyakoribbak az  $i-2$ ,  $i-1$ ,  $i+3$  pozíciókban >10% *cisz*-prolin esetén. Irodalmi adatok alapján az aromás és elektronban gazdag (negatív töltésű és poláris) aminosavak stabilizálhatják a *cisz*-prolin által kialakított kanyart, míg az elektronban szegény (pozitív töltésű) aminosavak destabilizálják azt (Reimer és mtsai 1998).
- c) Az előző megfigyeléssel reflektál, hogy a pozitív töltésű oldalláncok csökkent (<5%) *cisz*-prolin konformerre utalnak az  $i-3$  és  $i-1$  pozíciókban. A többi pozícióban (főleg az  $i+1-i+3$ ) az arginin és lizin előfordulása nem tér el a referenciától az adott szignifikanciaszinten.
- d)  $i+1$  pozícióban a Pro jelenléte >10% *cisz*-prolin arányt jelez. Ez a megfigyelés arra is utal, hogy a *cisz*-Pro-*transz*-Pro motívumok gyakoribbak IDP-k esetén, mint a *transz*-Pro-*cisz*-Pro.

A következő megfigyelés nem minden esetben teljesül:

- e)  $i-3$  pozícióban lévő nagy térkitöltésű alifás oldalláncok (Val, Ile, Leu) esetén a *cisz*-Pro tartalom >5%

A megfigyeléseket összevettem a p53TAD<sup>1-60</sup>-ban található *cisz*-prolin tartalommal. A szekvenciában található 10 prolin közül P4, P8, P12, P34 és P58 a >10% *cisz*-izomert tartalmaznak. A környező aminosavakat nézve megállapítható, hogy a P34 kivételével mindegyik negatív töltésű aminosavat tartalmaz az  $i-1$  pozícióban. P34 esetén egy poláris aminosav található az  $i-1$  pozícióban. Ezen felül több esetben az  $i-2$  vagy  $i+3$  pozícióban is negatív töltésű aminosavakat találunk (P4, P13, P58, ill. P4, P8). Az  $i-3$  pozícióban P13 és P34 esetén is alifás oldalláncú valin található. A prolin  $\pm 3$  régió P27 kivételével nem tartalmaz pozitív töltésű aminosavat. Azok a prolinok, ahol 5% alatti vagy nem detektálható *cisz*-prolin (P27, P47 és P36) nem teljesülnek sem a felsorolt feltételek. P36 esetén a *cisz*-izomer kialakulását sztérikusan gátolja a szekvenciában közel lévő aminosavak hosszú oldalláncai. P27 és P47 a másodlagos szerkezeti hajlammal rendelkező régiók (TAD1 és TAD2) terminális részén található, ahol a *cisz*-prolin okozta turn kialakulása energetikailag kedvezőtlen.

B) Doktori munkám részét képezték gyógyszerhordozó-jelölt sejtpenetráló peptidek vizsgálata, melyek felhasználhatók szelektív célbajuttatás érdekében akár a liposzómába csomagolt hatóanyag esetén a külső lipidréteghez kötötten, akár közvetlen hatóanyagszállító rendszerként. Továbbá a kis molekulatömegű hatóanyagok jelentős része rosszul oldódik vízben, ezért a biofarmáciai osztályozási rendszer II. és IV. csoportjába tartoznak (Amidon és mtsai 1995). Peptidhez kapcsolva a vízoldhatóság is növelhető a szelektív célba juttatás mellett. A peptidhez kapcsolt gyógyszerhatóanyagok hasonlóan a fluoreszcens festékekhez általában hidrofób kismolekulák, ezért előfordulhat kölcsönhatás a peptid aromás oldalláncai és a fluorofór vagy a hatóanyag között.

A vizsgált ERD14 és S100 peptidek NMR spektroszkópiai vizsgálatai rávilágítottak arra, hogy az általánosan használt 5- és 6-karboxifluoreszcein képes kölcsönhatásba lépni a peptidek aromás oldalláncaival, és ezáltal befolyásolni az *in vitro* sejtpenetrációt. A Cf hatását követtem az NH régió és a C $\alpha$  kémiai eltolódások alapján, továbbá a térben közeli atomok közelségét az NOE keresztcsúcsok alapján. A  $\Delta\delta$  értékek arra utalnak, hogy mindkét Cf-izomer hatással van a peptidek NH régiójára, de a 6-Cf hatása jelentősebb, nagyobb kémiai eltolódás-változást okoz. Az SCS értékek alapján nem történik jelentős szerkezeti változás egyik Cf-peptid konjugátum esetén sem. Az aminosav szekvencia tervezésénél ügyelni kell a prolinokra az aromás aminosavakra. A prolinok hélix törő sajátságuknak köszönhetően nem teszik lehetővé hélixek kialakulását. Az aromás aminosavak képesek  $\pi$ - $\pi$  kölcsönhatást kialakítani a karboxifluoreszceinnel. Az új, előnyösebb fotokémiai tulajdonságokkal rendelkező fluoreszcens festékek kiterjedt, több gyűrűből álló aromás rendszerek, ezért ott jelentősebb lehet a kölcsönhatás a hordozó peptid aromás oldalláncaival.

NMR spektroszkópia segítségével ERD és S100 peptidek kölcsönhatását vizsgáltam  $q=0,5$  PC bicellák jelenlétében. A peptidek amid jelei kiszélesedtek, ezáltal megállapítható volt, hogy melyik aminosavak vesznek részt a membránkölcsönhatásban. A peptid hatására a bicellában lévő DMPC  $^{31}\text{P}$  jele szélesedett, továbbá nőtt a szabad DHPC koncentrációja az oldatban.

*In vitro* sejtpenetrációs mérésekkel igazoltam, hogy az ERD és S100 peptidek képesek átjutni az A431 laphámrák és MonoMac6 monocita sejtek membránján. *In vitro* citotoxicitás vizsgálataik alapján nem toxikusak a vizsgált sejtvonalakra nézve. Az ERD és S100 peptidek az irodalomban gyakran vizsgált penetratinhoz képest kevésbé jutottak

be a sejtekbe, ellenben a penetratin toxikus az A431 sejtvonagra nézve. 12,5  $\mu\text{M}$  penetratin koncentrációban a sejtek 50%-a elpusztult.

Az intracelluláris lokalizáció nem különbözött az 5- és 6-Cf-peptid-konjugátumok esetén. Az ERD-A a citoplazmában, az ERD-B és S100 a citoplazmában és lizoszómákban, az ERD-C lizoszómákba lokalizálódik.

A bejutás mechanizmusát gátlószerekkel vizsgáltuk. Az EIPA, a  $\beta\text{MCD}$  és az ATP-depléción is csökkentette a Cf-pozitív sejtek számát mind a négy peptid esetén, ebből arra következtethetünk, hogy a peptidek endocitózissal és makropinocitózissal jutnak be a sejtekbe, nem direkt transzlokációval mint a penetratin.

Az *in vitro* sejtpenetrációs vizsgálatok alapján az ERD14 K-szegmensei és az S100A4-ből származó peptidek képesek átjutni a sejtmembránon. Az  $\text{UC}_{50}$  és a Cf-pozitív sejtek aránya alapján az ERD peptidek alkalmasak gyógyszerhordozónak, az S100 peptid a szekvenciájában található prolinok miatt a nehezebben jut át a sejtmembránon, ezért nem jó hordozójelölt. Az ERD-B, ERD-A és ERD-C jó vízoldhatóságuknak köszönhetően kismolekulák szállítására is alkalmasak lehetnek, ezt további vizsgálatokkal kell bizonyítani.

C) Kanonikus szerin proteáz inhibitorok szerkezeti és dinamikai jellemzését végeztem. A Laskowski-modell alapján azonos/hasonló hurokrégió ideális a különböző vázszerkezetek esetén. 5 minifehérje (SGPI-2 konszenzus és hurokcsereált variáns, illetve SPINK1 konszenzus, hurokcsereált variáns és vad típus) szerkezetét vizsgáltam. A konszenzus hurokrégiót tartalmazó SGPI-2 (SG4) szerkezete megegyezik a vad típusú variánséval (3  $\beta$ -szál, köztük rendezetlen szakaszok, a szerkezetet 3 diszulfidhíd merevíti) (Gáspári és mtsai 2002). A hurokcsereált SG5 variáns esetén a 3.  $\beta$ -szál rendezetlenné válik, ennek hatására a kimotripsinhez való affinitása csökken.

A SPINK1 vázas inhibitorok szerkezetében megtalálhatók a röntgenszerkezetben meghatározott szerkezeti elemek (Hecht és mtsai 1992):  $\alpha$ -hélix (T35-R44) és a 3  $\beta$ -szál (22-25, 28-30, 51-53) stabilabb, szerkezeti változás nem következik be a hurokcsere hatására.

Az SP5 (konszenzus) variáns esetén a gerincdinamikai mérések a hurokrégió mozgékony, és a Lipari-Szabó modellfüggetlen analízis alapján az  $S^2$  rendparaméter kisebb, mint a környező aminosavaké, hogy a hurokrégió a vázhoz képest független



mozgást végez. Továbbá a lassú időskálájú konformációs mozgásokat jellemző  $R_{ex}$  paraméterek megjelennek a hurokrégió és az  $\alpha$ -hélix aminosavai esetén.

A hurokcsereált SP6 variáns esetén a hurokrégió HN jelei még pH=3,0-as közegben is kiszélesedtek. Ez arra utal, hogy a konformációs mozgások erőteljesebbé válnak az SGPI-2 konszenzus hurok esetén, ezt MD szimulációk is alátámasztják.

## 6. Következtetések

A) A doktori munkám első részében a rendezetlen p53 TAD<sup>1-60</sup> fehérje szerkezeti hajlamait vizsgáltam. Az irodalomban először mutattam ki és azonosítottam a prolin *cisz-transz* izoméria következtében kialakuló minor konformereket. A minor formák detektálására <sup>1</sup>H<sup>α</sup>-detektált méréseket használtam. A prolin izomer meghatározásához két, új BASEREX valós idejű homo- és heteronukleáris lecsatoláson alapuló <sup>1</sup>H<sup>α</sup>-detektált pulzusszekvenciát dolgoztunk ki. Az új mérések lehetővé teszik kis koncentrációban jelen lévő (40-150 μM) konformerek kimutatását is.

A p53 TAD biokémiai folyamatainak szabályozásában poszttranszlációs módosítások játszanak főszerepet. A CK2 kináz általi foszforilációt vizsgálva azonosítottam a foszforilációs helyeket (T55, S46, S6). A TAD2 régióba tartozó T55 12 óra alatt 100%-ban foszforilálódott, a CK2 kináz számára kevésbé ideális, prolinhoz közeli aminosavak (S46, S6) esetén 36 óra elteltével sem ment végbe 100%-ban a folyamat (85%, ill. 45%). A foszforiláció csak a lokális, elektrosztatikus változásokat okozott T55 és S46 főjeleiben, jelentős szerkezeti változás nem következett be. Az S46 aminosavat követő P47 esetén a foszforiláció következtében a *cisz-transz* egyensúly eltolódott, a nem foszforilált mintában 4,5%-ban jelenlévő *cisz*-prolint nem lehetett detektálni. A foszforiláció helyétől távolodva a bevitt foszfátcsoport nem volt hatással a prolin *cisz-transz* egyensúlyra.

A rendezetlen fehérjékben jelenlévő *cisz*-prolin aránya 5-20% között változik. A p53 TAD esetén és irodalmi adatok alapján igazoltam, hogy a tipikus NMR mérési hőmérsékleteken, 278 és 328 K között a *cisz*-prolin aránya a detektálás és integrálás hibáján belül nem változik. Irodalmi adatok statisztikai elemzésével megállapítottam, hogy a prolin környezetében (*i*-3 és *i*+3 között) melyik pozícióban és milyen típusú aminosav van hatással a *cisz*-prolin arányra. A >10% *cisz*-prolin tartalmazó szekvenciák esetén az aromás (*i*-1 és *i*+1 pozíciókban) és negatív töltésű oldalláncok (*i*-2, *i*-1, *i*+3 pozíciókban) gyakorisága nagyobb, illetve a pozitív töltésű lizin és arginin előfordulása szignifikánsan kisebb.

B) A dolgozatom második részében a gyógyszerhordozó-jelölt ERD14 és S100 peptidek NMR spektroszkópiái és *in vitro* sejtpenetrációs vizsgálatait során megállapítottam, hogy a vizsgált koncentrációterületben mind a négy peptid képes

átjutni az A431 és MonoMac6 sejtek membránján, továbbá nem toxikusak a vizsgált sejtvonalakra nézve. Az inhibitorokkal végzett kísérletek alapján a bejutás energiafüggő, endocitózissal és makropinocitózissal valósul meg. A bejutást követve az ERD-A citoplazma, ERD-B és S100 citoplazma és lizoszóma, ERD-C főleg lizoszomális lokalizációt mutat. *In vitro* sejtpenetrációs profil alapján az ERD-A, B és C jó hordozójelöltek lehetnek célzott hatóanyag-szállításhoz.

A fluoreszcens festék-peptid kölcsönhatás jelentős különbségeket okoz az ERD-A, ERD-B és S100 peptidek internalizációjában: a 6-Cf peptidek nagyobb arányban jutottak be a sejtekbe. Az 5- és 6-Cf-peptid-konjugátumok NMR spektroszkópiai vizsgálatai során megállapítottam, hogy a 6-Cf-peptid konjugátumok esetén az 5. pozícióban lévő fenilalanin oldallánc protonok és a Cf aromás protonjai között több és intenzívebb NOE keresztcsúcsok detektálhatók, melyek a térközelségre utalnak.

Az ERD és S100 peptidek képesek kölcsönhatásba lépni PC bicellákkal, melyet oldatfázisú NMR vizsgálatokkal igazoltam.

C) A hurokrégió mutációjának szerkezeti hatását, illetve a Laskowski-modell érvényességét vizsgáltam SGPI-2 és SPINK1 vázú szerin proteáz inhibitorok esetén. Elvégeztem 5 inhibitor esetén a  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , és  $^{15}\text{N}$  környezetekre a jelazonosítást. Megállapítható, hogy a két váz során eltérő hurokszekvencia az ideális, továbbá a hurokcseré jelentősen csökkenti a kimotripsinhez az affinitást. A kevésbé stabil SGPI-2 esetén a hurokcseré megváltoztatja az inhibitorváz szerkezetét. A 3.  $\beta$ -szál rendezetlenné válik, ami előnytelen az enzimkötődés létrejöttéhez. A stabil SPINK1 váz esetén hurokcseré esetén nem mutat szerkezeti változást. A Lipari-Szabó modellfüggetlen analízis alapján a hurokra és az  $\alpha$ -hélixre lassú konformációs mozgások jellemzők ( $R_{\text{ex}}$ ,  $S^2$ ), melyek a hurokcseré hatására felerősödnek. Továbbá MD szimulációk alapján a hurokrégió torzul, ami jelentős affinitásvesztéssel jár.

## 7. Összefoglalás

Doktori munkám során az NMR spektroszkópia sokrétű alkalmazásával különböző rendszerek (rendezetlen fehérjék, peptidek, globuláris fehérjék, membránmimetikumok) szerkezeti és dinamikai vizsgálatát végeztem.

A rendezetlen fehérjék nagy mennyiségben tartalmaznak prolin aminosavakat, melyek oldatban *transz* és *cisz* izomerként is előfordulhatnak. A p53 TAD modellrendszeren a *cisz*-prolin hatására létrejött minor konformereket, illetve a prolin izomereket azonosítottam a kidolgozott, nagy érzékenységgű  $^1\text{H}^\alpha$ -detektált módszerek segítségével. A CK2 kinázzal történt foszforiláció során a p53 TAD doménjében a P47 esetén a *cisz-transz* egyensúly eltolódását tapasztaltuk. A rendezetlen fehérjékben jelen lévő *cisz*-prolin mennyisége a prolin környezetében lévő aminosavak típusától függ. Statisztikai elemzés lehetővé teszi a *cisz-transz* egyensúly szabályozását pontmutációk beépítésével.

Az ERD14 dehidrinből és az S100A4 fehérjéből származó peptidek esetén a szerkezeti hajlamokat és fluoreszcens festék hatását vizsgáltam NMR spektroszkópiával. A peptidek rendezetlenek, a karboxifluoreszcein jelölés nem változtat jelentősen a szerkezeten, ellenben térközelbe kerül a peptid fenilalanin oldalláncához, amely hatással van a sejtpenetrációs képességére. A fenilalanint tartalmazó ERD-A, ERD-B és S100 esetén jelentős eltérés van az 5- és 6-karboxifluoreszcein tartalmú peptidek intracelluláris fluoreszcencia intenzitásában, mely az eltérő bejutási képességre utal. A peptidek  $\text{IC}_{50}$  értékei alapján a 6-Cf peptidek sejtbejutási képessége jobb, illetve a peptidek közt is különbség figyelhető meg, sorrend a következő: ERD-B > ERD-A > ERD-C > S100. A sejtbejutás mellett a sejten belüli lokalizáció is eltér. A bejutás mechanizmusa a gátlószerekkel végzett kísérletek alapján endocitózis és makropinocitózis.

A dolgozatomban vizsgált SGPI-2 és SPINK1 vázú szerin proteáz inhibitorok esetén a Laskowski-modell által feltételezett vázfüggetlenség nem teljesül. A két váz során eltérő hurokszekvencia az ideális, továbbá a hurokcsere jelentősen csökkenti a kimotripszinhez az affinitást. A kevésbé stabil SGPI-2 esetén a hurokcsere megváltoztatja az inhibitorváz szerkezetét. A 3.  $\beta$ -szál rendezetlenné válik, amely előnytelen az enzimkötődés létrejöttéhez. A stabil SPINK1 váz a hurokcsere esetén nem mutat szerkezeti változást, ellenben a hurokrégió torzul, amely jelentős affinitásvesztést okoz.

## 8. Summary

During my PhD I work, I performed the structural and dynamic analysis of different biosystems (disordered proteins, peptides, globular proteins, membrane mimetics) using NMR spectroscopy.

Disordered proteins contain large amounts of proline amino acids, which can occur in solution as both *trans* and *cis* isomers. In the p53 TAD model system, minor conformers were detected, and the proline isomers identified by the newly developed high-sensitivity  $^1\text{H}^\alpha$ -detected methods. During phosphorylation by CK2 kinase, a shift in the *cis-trans* equilibrium in the TAD domain of p53 was observed for P47. The amount of *cis*-proline present in disordered proteins depends on the type of amino acids in the proline environment. Statistical analysis allows the regulation of *cis-trans* equilibrium by incorporating point mutations.

For peptides derived from ERD14 dehydrin and S100A4 protein, structural tendencies and the effect of fluorescent dye were examined by NMR spectroscopy. The peptides are disordered, and the carboxyfluorescein labelling does not significantly change the structure but is spatially close to the phenylalanine side chain of the peptide, which affects its ability to penetrate the cell. For phenylalanine-containing ERD-A, ERD-B, and S100, there is a significant difference in the intracellular fluorescence intensity of 5- and 6-carboxyfluorescein-containing peptides, suggesting different ability to enter. Based on the  $\text{UC}_{50}$  values of the peptides, the cell penetration ability of the 6-Cf peptides is better and there is a difference between the peptides, the order is as follows: ERD-B > ERD-A > ERD-C > S100. In addition to cell entry, intracellular localization also differs. The mechanism of entry based on experiments with inhibitors is endocytosis and macropinocytosis.

In the case of the SGPI-2 and SPINK1 skeletal serine protease inhibitors examined in my dissertation, the skeletal independence assumed by the Laskowski model is not satisfied. A different loop sequence between the two backbones is ideal, and loop replacement significantly reduces the affinity for chymotrypsin. In the case of less stable SGPI-2, loop replacement alters the structure of the inhibitor backbone. The 3rd  $\beta$ -strand becomes disordered, which is disadvantageous for the formation of enzyme binding. The stable SPINK1 backbone shows no structural change in the case of loop replacement, whereas the loop region is distorted, causing a significant loss of affinity.

## 9. Irodalomjegyzék

Ahuja P, Cantrelle FX, Huvent I, Hanouille X, Lopez J, Smet C, Wieruszeski JM, Landrieu I, Lippens G. (2016) Proline Conformation in a Functional Tau Fragment. *J Mol Biol*, 428: 79-91.

Aitio O, Hellman M, Skehan B, Kesti T, Leong JM, Saksela K, Permi P. (2012) Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* exploits a tryptophan switch to hijack host f-actin assembly. *Structure*, 20: 1692-1703.

Alderson TR, Lee JH, Charlier C, Ying JF, Bax A. (2018) Propensity for cis-Proline Formation in Unfolded Proteins. *Chembiochem*, 19: 37-42.

Ambartsumian N, Grigorian M, Lukanidin E. (2005) Genetically modified mouse models to study the role of metastasis-promoting S100A4(mts1) protein in metastatic mammary cancer. *J Dairy Res*, 72 Spec No: 27-33.

Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP, Crison JR. (1995) A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res*, 12: 413-420.

Anchal, Kaushik V, Goel M. (2021) Distribution of Peptidyl-Prolyl Isomerase (PPIase) in the Archaea. *Front Microbiol*, 12: 751049.

Anil B, Riedinger C, Endicott JA, Noble ME. (2013) The structure of an MDM2-Nutlin-3a complex solved by the use of a validated MDM2 surface-entropy reduction mutant. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 69: 1358-1366.

Arai S, Matsushita A, Du K, Yagi K, Okazaki Y, Kurokawa R. (2007) Novel homeodomain-interacting protein kinase family member, HIPK4, phosphorylates human p53 at serine 9. *FEBS Lett*, 581: 5649-5657.

Baxter NJ, Williamson MP. (1997) Temperature dependence of H-1 chemical shifts in proteins. *J Biomol NMR*, 9: 359-369.

Berjanskii MV, Neal S, Wishart DS. (2006) PREDITOR: a web server for predicting protein torsion angle restraints. *Nucleic Acids Res*, 34: W63-69.

Bermel W, Bertini I, Felli IC, Kummerle R, Pierattelli R. (2006a) Novel C-13 direct detection experiments, including extension to the third dimension, to perform the complete assignment of proteins. *J Magn Reson*, 178: 56-64.

Bermel W, Bertini I, Felli IC, Piccioli M, Pierattelli R. (2006b) C-13-detected protonless NMR spectroscopy of proteins in solution. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*, 48: 25-45.

Björnerås J, Nilsson M, Mäler L. (2015) Analysing DHPC/DMPC bicelles by diffusion NMR and multivariate decomposition. *Biochim Biophys Acta*, 1848: 2910-2917.

Blom N, Sicheritz-Ponten T, Gupta R, Gammeltoft S, Brunak S. (2004) Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics*, 4: 1633-1649.

Bochkareva E, Kaustov L, Ayed A, Yi GS, Lu Y, Pineda-Lucena A, Liao JCC, Okorokov AL, Milner J, Arrowsmith CH, Bochkarev A. (2005) Single-stranded DNA mimicry in the p53 transactivation domain interaction with replication protein A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 15412-15417.

Bodor A, Haller JD, Bouguechtouli C, Theillet FX, Nyitray L, Luy B. (2020) Power of Pure Shift  $^1\text{H}$   $^13\text{C}$  Correlations: A Way to Characterize Biomolecules under Physiological Conditions. *Anal Chem*, 92: 12423-12428.

Borcherds WM, Daughdrill GW. (2018) Using NMR Chemical Shifts to Determine Residue-Specific Secondary Structure Populations for Intrinsically Disordered Proteins. *Intrinsically Disord Proteins*, 611: 101-136.

Bottomley MJ, Macias MJ, Liu Z, Sattler M. (1999) A novel NMR experiment for the sequential assignment of proline residues and proline stretches in C-13/N-15-labeled proteins. *J Biomol NMR*, 13: 381-385.

Bresnick AR, Weber DJ, Zimmer DB. (2015) S100 proteins in cancer. *Nat Rev Cancer*, 15: 96-109.

Brusotti G, Calleri E, Colombo R, Massolini G, Rinaldi F, Temporini C. (2018) Advances on Size Exclusion Chromatography and Applications on the Analysis of Protein Biopharmaceuticals and Protein Aggregates: A Mini Review. *Chromatographia*, 81: 3-23.

Bulavin DV, Saito S, Hollander MC, Sakaguchi K, Anderson CW, Appella E, Fornace AJ. (1999) Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation. *EMBO J*, 18: 6845-6854.

Burley SK, Bhikadiya C, Bi C, Bittrich S, Chen L, Crichlow GV, Duarte JM, Dutta S, Fayazi M, Feng Z, Flatt JW, Ganesan SJ, Goodsell DS, Ghosh S, Kramer Green R, Guranovic V, Henry J, Hudson BP, Lawson CL, Liang Y, Lowe R, Peisach E, Persikova I, Piehl DW, Rose Y, Sali A, Segura J, Sekharan M, Shao C, Vallat B, Voigt M, Westbrook JD, Whetstone S, Young JY, Zardecki C. (2021) RCSB Protein Data Bank: Celebrating 50 years of the PDB with new tools for understanding and visualizing biological macromolecules in 3D. *Protein Sci*, doi:10.1002/pro.4213.

Busche MA, Hyman BT. (2020) Synergy between amyloid- $\beta$  and tau in Alzheimer's disease. *Nature Neuroscience*, 23: 1183-1193.

Cavaco M, Pérez-Peinado C, Valle J, Silva RDM, Correia JDG, Andreu D, Castanho M, Neves V. (2020) To What Extent Do Fluorophores Bias the Biological Activity of Peptides? A Practical Approach Using Membrane-Active Peptides as Models. *Front Bioeng Biotechnol*, 8: 552035.

Chaves-Arquero B, Pantoja-Uceda D, Roque A, Ponte I, Suau P, Jiménez MA. (2018) A CON-based NMR assignment strategy for pro-rich intrinsically disordered proteins with low signal dispersion: the C-terminal domain of histone H1.0 as a case study. *J Biomol NMR*, 72: 139-148.

Chène P. (2003) Inhibiting the p53–MDM2 interaction: an important target for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 3: 102-109.

Chhabra S, Fischer P, Takeuchi K, Dubey A, Ziarek JJ, Boeszoermyeni A, Mathieu D, Bermel W, Davey NE, Wagner G, Arthanari H. (2018) N-15 detection harnesses the slow relaxation property of nitrogen: Delivering enhanced resolution for intrinsically disordered proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115: E1710-E1719.

Chou JJ, Baber JL, Bax A. (2004) Characterization of phospholipid mixed micelles by translational diffusion. *J Biomol NMR*, 29: 299-308.

Close TJ. (1996) Dehydrins: Emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiologia Plantarum*, 97: 795-803.

Conibear AC, Rosengren KJ, Becker CFW, Kaehlig H. (2019) Random coil shifts of posttranslationally modified amino acids. *J Biomol NMR*, 73: 587-599.

Conner SD, Schmid SL. (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature*, 422: 37-44.



Derossi D, Calvet S, Trembleau A, Brunissen A, Chassaing G, Prochiantz A. (1996) Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent. *J Biol Chem*, 271: 18188-18193.

Di Lello P, Jenkins LMM, Jones TN, Nguyen BD, Hara T, Yamaguchi H, Dikeakos JD, Appella E, Legault P, Omichinski JG. (2006) Structure of the Tfb1/p53 complex: Insights into the interaction between the p62/Tfb1 subunit of TFIID and the activation domain of p53. *Mol Cell*, 22: 731-740.

Dudás EF, Bodor A. (2019) Quantitative, Diffusion NMR Based Analytical Tool To Distinguish Folded, Disordered, and Denatured Biomolecules. *Anal Chem*, 91: 4929–4933.

Dudás EF, Wacha A, Bóta A, Bodor A. (2020) Peptide-bicelle interaction: Following variations in size and morphology by a combined NMR-SAXS approach. *Biochim Biophys Acta*, 1862.

Dugave C, Demange L. (2003) Cis-trans isomerization of organic molecules and biomolecules: Implications and applications. *Chem Rev*, 103: 2475-2532.

Dujardin M, Madan V, Gandhi NS, Cantrelle FX, Launay H, Huvent I, Bartenschlager R, Lippens G, Hanouille X. (2019) Cyclophilin A allows the allosteric regulation of a structural motif in the disordered domain 2 of NS5A and thereby fine-tunes HCV RNA replication. *J Biol Chem*, 294: 13171-13185.

Dunker AK, Brown CJ, Lawson JD, Iakoucheva LM, Obradović Z. (2002) Intrinsic disorder and protein function. *Biochemistry*, 41: 6573-6582.

Dunker AK, Obradovic Z, Romero P, Garner EC, Brown CJ. (2000) Intrinsic protein disorder in complete genomes. *Genome Inform Ser Workshop Genome Inform*, 11: 161-171.

Dunker AK, Oldfield CJ, Meng J, Romero P, Yang JY, Chen JW, Vacic V, Obradovic Z, Uversky VN. (2008) The unfoldomics decade: an update on intrinsically disordered proteins. *BMC Genomics*, 9 Suppl 2: S1.

Dürr UH, Soong R, Ramamoorthy A. (2013) When detergent meets bilayer: birth and coming of age of lipid bicelles. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*, 69: 1-22.

Ecsédi P, Gógl G, Hóf H, Kiss B, Harmat V, Nyitray L. (2020) Structure Determination of the Transactivation Domain of p53 in Complex with S100A4 Using Annexin A2 as a Crystallization Chaperone. *Structure*, 28: 943-953.e944.

Fagiani F, Govoni S, Racchi M, Lanni C. (2021) The Peptidyl-prolyl Isomerase Pin1 in Neuronal Signaling: from Neurodevelopment to Neurodegeneration. *Mol Neurobiol*, 58: 1062-1073.

Fei F, Qu J, Zhang M, Li Y, Zhang S. (2017) S100A4 in cancer progression and metastasis: A systematic review. *Oncotarget*, 8: 73219-73239.

Feng H, Jenkins LMM, Durell SR, Hayashi R, Mazur SJ, Cherry S, Tropea JE, Miller M, Wlodawer A, Appella E, Bai Y. (2009) Structural Basis for p300 Taz2-p53 TAD1 Binding and Modulation by Phosphorylation. *Structure*, 17: 202-210.

Follis AV, Llambi F, Merritt P, Chipuk JE, Green DR, Kriwacki RW. (2015) Pin1-Induced Proline Isomerization in Cytosolic p53 Mediates BAX Activation and Apoptosis. *Mol Cell*, 59: 677-684.

Fotakis G, Timbrell JA. (2006) In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett*, 160: 171-177.

Fujimoto Y, Shiraki T, Horiuchi Y, Waku T, Shigenaga A, Otaka A, Ikura T, Igarashi K, Aimoto S, Tate S, Morikawa K. (2010) Proline cis/trans-isomerase Pin1 regulates peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity through the direct binding to the activation function-1 domain. *J Biol Chem*, 285: 3126-3132.

Gal M, Edmonds KA, Milbradt AG, Takeuchi K, Wagner G. (2011) Speeding up direct <sup>15</sup>N detection: HCaN 2D NMR experiment. *J Biomol NMR*, 51: 497-504.

Garrett SC, Varney KM, Weber DJ, Bresnick AR. (2006) S100A4, a mediator of metastasis. *J Biol Chem*, 281: 677-680.

Gáspári Z, Patthy A, Gráf L, Perczel A. (2002) Comparative structure analysis of proteinase inhibitors from the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Eur J Biochem*, 269: 527-537.

Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP. (1973) In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst*, 51: 1417-1423.

Gibbs EB, Kriwacki RW. (2018) Direct detection of carbon and nitrogen nuclei for high-resolution analysis of intrinsically disordered proteins using NMR spectroscopy. *Methods*, 138: 39-46.

Gibbs EB, Lu F, Portz B, Fisher MJ, Medellin BP, Laremore TN, Zhang YJ, Gilmour DS, Showalter SA. (2017) Phosphorylation induces sequence-specific conformational switches in the RNA polymerase II C-terminal domain. *Nat Commun*, 8: 15233.

Gógl G, Biri-Kovacs B, Poti AL, Vadaszi H, Szeder B, Bodor A, Schlosser G, Acs A, Turiak L, Buday L, Alexa A, Nyitray L, Remenyi A. (2018) Dynamic control of RSK complexes by phosphoswitch-based regulation. *FEBS J*, 285: 46-71.

Graether SP, Boddington KF. (2014) Disorder and function: a review of the dehydrin protein family. *Front Plant Sci*, 5: 576.

Green M, Loewenstein PM. (1988) Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell*, 55: 1179-1188.

Grigorian M, Andresen S, Tulchinsky E, Kriajevska M, Carlberg C, Kruse C, Cohn M, Ambartsumian N, Christensen A, Selivanova G, Lukanidin E. (2001) Tumor suppressor p53 protein is a new target for the metastasis-associated Mts1/S100A4 protein - Functional consequences of their interaction. *J Biol Chem*, 276: 22699-22708.

Gustafson CL, Parsley NC, Asimgil H, Lee HW, Ahlback C, Michael AK, Xu H, Williams OL, Davis TL, Liu AC, Partch CL. (2017) A Slow Conformational Switch in the BMAL1 Transactivation Domain Modulates Circadian Rhythms. *Mol Cell*, 66: 447-457.e447.

Hatos A, Hajdu-Soltesz B, Monzon AM, Palopoli N, Alvarez L, Aykac-Fas B, Bassot C, Benitez GI, Bevilacqua M, Chasapi A, Chemes L, Davey NE, Davidovic R, Dunker AK, Elofsson A, Gobeill J, Foutel NSG, Sudha G, Guharoy M, Horvath T, Iglesias V, Kajava AV, Kovacs OP, Lamb J, Lambrughli M, Lazar T, Leclercq JY, Leonardi E, Macedo-Ribeiro S, Macossay-Castillo M, Maiani E, Manso JA, Marino-Buslje C, Martinez-Perez E, Meszaros B, Micetic I, Minervini G, Murvai N, Necci M, Ouzounis CA, Pajkos M, Paladin L, Pancsa R, Papaleo E, Parisi G, Pasche E, Pereira PJB, Promponas VJ, Pujols J, Quaglia F, Ruch P, Salvatore M, Schad E, Szabo B, Szaniszló T, Tamana S, Tantos A, Veljkovic N, Ventura S, Vranken W, Dosztanyi Z, Tompa P, Tosatto SCE, Piovesan D. (2020) DisProt: intrinsic protein disorder annotation in 2020. *Nucleic Acids Res*, 48: D269-D276.

Hecht HJ, Szardenings M, Collins J, Schomburg D. (1992) 3-Dimensional Structure of a Recombinant Variant of Human Pancreatic Secretory Trypsin-Inhibitor (Kazal Type). *J Mol Biol*, 225: 1095-1103.

Hilton BA, Li Z, Musich PR, Wang H, Cartwright BM, Serrano M, Zhou XZ, Lu KP, Zou Y. (2015) ATR Plays a Direct Antiapoptotic Role at Mitochondria, which Is Regulated by Prolyl Isomerase Pin1. *Mol Cell*, 60: 35-46.

Iqbal K, Liu F, Gong CX, Grundke-Iqbal I. (2010) Tau in Alzheimer disease and related tauopathies. *Curr Alzheimer Res*, 7: 656-664.

Ismail AM, Hall AE, Close TJ. (1999) Purification and partial characterization of a dehydrin involved in chilling tolerance during seedling emergence of cowpea. *Plant Physiol*, 120: 237-244.

Ismail TM, Bennett D, Platt-Higgins AM, Al-Medhity M, Barraclough R, Rudland PS. (2017) S100A4 Elevation Empowers Expression of Metastasis Effector Molecules in Human Breast Cancer. *Cancer Res*, 77: 780-789.

Joliot A, Pernelle C, Deagostini-Bazin H, Prochiantz A. (1991) Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88: 1864-1868.

Jones RG, Plas DR, Kubek S, Buzzai M, Mu J, Xu Y, Birnbaum MJ, Thompson CB. (2005) AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol Cell*, 18: 283-293.

Kanelis V, Donaldson L, Muhandiram DR, Rotin D, Forman-Kay JD, Kay LE. (2000) Sequential assignment of proline-rich regions in proteins: Application to modular binding domain complexes. *J Biomol NMR*, 16: 253-259.

Kjaergaard M, Brander S, Poulsen FM. (2011) Random coil chemical shift for intrinsically disordered proteins: effects of temperature and pH. *J Biomol NMR*, 49: 139-149.

Kjaergaard M, Poulsen FM. (2011) Sequence correction of random coil chemical shifts: correlation between neighbor correction factors and changes in the Ramachandran distribution. *J Biomol NMR*, 50: 157-165.

Klaus W, Schomburg D. (1993) Solution Structure of a Variant of Human Pancreatic Secretory Trypsin-Inhibitor Determined by Nuclear-Magnetic-Resonance Spectroscopy. *J Mol Biol*, 229: 695-706.

Koag MC, Wilkens S, Fenton RD, Resnik J, Vo E, Close TJ. (2009) The K-segment of maize DHN1 mediates binding to anionic phospholipid vesicles and concomitant structural changes. *Plant Physiol*, 150: 1503-1514.

Kovács D, Kalmár E, Török Z, Tompa P. (2008) Chaperone activity of ERD10 and ERD14, two disordered stress-related plant proteins. *Plant Physiol*, 147: 381-390.

Krois AS, Ferreón JC, Martínez-Yamout MA, Dyson HJ, Wright PE. (2016) Recognition of the disordered p53 transactivation domain by the transcriptional adapter zinc finger domains of CREB-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113: E1853-E1862.

Kruse JP, Gu W. (2009) Modes of p53 regulation. *Cell*, 137: 609-622.

Kurrikoff K, Vunk B, Langel Ü. (2021) Status update in the use of cell-penetrating peptides for the delivery of macromolecular therapeutics. *Expert Opin Biol Ther*, 21: 361-370.

Kussie PH, Gorina S, Marechal V, Elenbaas B, Moreau J, Levine AJ, Pavletich NP. (1996) Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science*, 274: 948-953.

Kyte J, Doolittle RF. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol*, 157: 105-132.

Laskowski M, Qasim MA. (2000) What can the structures of enzyme-inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme substrate complexes? *Biochim Biophys Acta*, 1477: 324-337.

Lee CW, Martínez-Yamout MA, Dyson HJ, Wright PE. (2010) Structure of the p53 Transactivation Domain in Complex with the Nuclear Receptor Coactivator Binding Domain of CREB Binding Protein. *Biochemistry*, 49: 9964-9971.

Lee H, Mok KH, Muhandiram R, Park KH, Suk JE, Kim DH, Chang J, Sung YC, Choi KY, Han KH. (2000) Local structural elements in the mostly unstructured transcriptional activation domain of human p53. *J Biol Chem*, 275: 29426-29432.

Lee JH, Kim HS, Lee SJ, Kim KT. (2007) Stabilization and activation of p53 induced by Cdk5 contributes to neuronal cell death. *J Cell Sci*, 120: 2259-2271.

Lee KH, Chen JH. (2016) Multiscale Enhanced Sampling of Intrinsically Disordered Protein Conformations. *J Comput Chem*, 37: 550-557.

Lee TH, Pastorino L, Lu KP. (2011) Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase Pin1 in ageing, cancer and Alzheimer disease. *Expert Rev Mol Med*, 13: e21.

Liebl MC, Hofmann TG. (2019) Cell Fate Regulation upon DNA Damage: p53 Serine 46 Kinases Pave the Cell Death Road. *Bioessays*, 41: e1900127.

Ludzia P, Akiyoshi B, Redfield C. (2020) (1)H, (13)C and (15)N resonance assignments for the microtubule-binding domain of the kinetoplastid kinetochore protein KKT4 from *Trypanosoma brucei*. *Biomol NMR Assign*, 14: 309-315.

Magli A, Angelelli C, Ganassi M, Baruffaldi F, Matafora V, Battini R, Bachi A, Messina G, Rustighi A, Del Sal G, Ferrari S, Molinari S. (2010) Proline isomerase Pin1 represses terminal differentiation and myocyte enhancer factor 2C function in skeletal muscle cells. *J Biol Chem*, 285: 34518-34527.

Makinwa Y, Musich PR, Zou Y. (2020) Phosphorylation-Dependent Pin1 Isomerization of ATR: Its Role in Regulating ATR's Anti-apoptotic Function at Mitochondria, and the Implications in Cancer. *Front Cell Dev Biol*, 8.

Malashkevich VN, Varney KM, Garrett SC, Wilder PT, Knight D, Charpentier TH, Ramagopal UA, Almo SC, Weber DJ, Bresnick AR. (2008) Structure of Ca<sup>2+</sup>-bound S100A4 and its interaction with peptides derived from nonmuscle myosin-IIA. *Biochemistry*, 47: 5111-5126.

Mantylahti S, Aitio O, Hellman M, Permi P. (2010) HA-detected experiments for the backbone assignment of intrinsically disordered proteins. *J Biomol NMR*, 47: 171-181.

Marsh JA, Singh VK, Jia ZC, Forman-Kay JD. (2006) Sensitivity of secondary structure propensities to sequence differences between alpha- and gamma-synuclein: Implications for fibrillation. *Protein Science*, 15: 2795-2804.

Mateos B, Conrad-Billroth C, Schiavina M, Beier A, Kontaxis G, Konrat R, Felli IC, Pierattelli R. (2020) The Ambivalent Role of Proline Residues in an Intrinsically Disordered Protein: From Disorder Promoters to Compaction Facilitators. *J Mol Biol*, 432: 3093-3111.

Meade RM, Fairlie DP, Mason JM. (2019) Alpha-synuclein structure and Parkinson's disease – lessons and emerging principles. *Mol Neurodegen*, 14: 29.

Meier O, Boucke K, Hammer SV, Keller S, Stidwill RP, Hemmi S, Greber UF. (2002) Adenovirus triggers macropinocytosis and endosomal leakage together with its clathrin-mediated uptake. *J Cell Biol*, 158: 1119-1131.

Merlino A, Picone D, Ercole C, Balsamo A, Sica F. (2012) Chain termini cross-talk in the swapping process of bovine pancreatic ribonuclease. *Biochimie*, 94: 1108-1118.

Milletti F. (2012) Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. *Drug Discov Today*, 17: 850-860.

Montelione GT, Lyons BA, Emerson SD, Tashiro M. (1992) An Efficient Triple Resonance Experiment Using C-13 Isotropic Mixing for Determining Sequence-specific Resonance Assignments of Isotopically-enriched Proteins. *J Am Chem Soc*, 114: 10974-10975.

Murrall MG, Piai A, Bermel W, Felli IC, Pierattelli R. (2018) Proline Fingerprint in Intrinsically Disordered Proteins. *Chembiochem*, 19: 1625-1629.

Murvai N, Kalmár L, Szabó B, Schad E, Micsonai A, Kardos J, Buday L, Han KH, Tompa P, Tantos Á. (2021) Cellular Chaperone Function of Intrinsically Disordered Dehydrin ERD14. *Int J Mol Sci*, 22.

Murvai N, Kalmár L, Szalainé Ágoston B, Szabó B, Tantos Á, Csikos G, Micsonai A, Kardos J, Vertommen D, Nguyen PN, Hristozova N, Láng A, Kovács D, Buday L, Han KH, Perczel A, Tompa P. (2020) Interplay of Structural Disorder and Short Binding Elements in the Cellular Chaperone Function of Plant Dehydrin ERD14. *Cells*, 9.

Nakamura K, Greenwood A, Binder L, Bigio EH, Denial S, Nicholson L, Zhou XZ, Lu KP. (2012) Proline Isomer-Specific Antibodies Reveal the Early Pathogenic Tau Conformation in Alzheimer's Disease. *Cell*, 149: 232-244.

Nielsen JT, Mulder FAA. (2018) POTENCI: prediction of temperature, neighbor and pH-corrected chemical shifts for intrinsically disordered proteins. *J Biomol NMR*, 70: 141-165.

Nuutila J, Lilius EM. (2005) Flow cytometric quantitative determination of ingestion by phagocytes needs the distinguishing of overlapping populations of binding and ingesting cells. *Cytometry A*, 65: 93-102.

Nwanochie E, Uversky VN. (2019) Structure Determination by Single-Particle Cryo-Electron Microscopy: Only the Sky (and Intrinsic Disorder) is the Limit. *Int J Mol Sci*, 20.

Oda K, Arakawa H, Tanaka T, Matsuda K, Tanikawa C, Mori T, Nishimori H, Tamai K, Tokino T, Nakamura Y, Taya Y. (2000) p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell*, 102: 849-862.

Okuda M, Nishimura Y. (2014) Extended string binding mode of the phosphorylated transactivation domain of tumor suppressor p53. *Journal of the American Chemical Society*, 136: 14143-14152.

Oldfield CJ, Cheng Y, Cortese MS, Brown CJ, Uversky VN, Dunker AK. (2005) Comparing and combining predictors of mostly disordered proteins. *Biochemistry*, 44: 1989-2000.

Olejnik P, Małdrzak CJ, Nuc K. (2021) Cyclophilins and Their Functions in Abiotic Stress and Plant-Microbe Interactions. *Biomolecules*, 11.

Olivier M, Goldgar DE, Sodha N, Ohgaki H, Kleihues P, Hainaut P, Eeles RA. (2003) Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype. *Cancer Res*, 63: 6643-6650.

Orre LM, Panizza E, Kaminsky VO, Vernet E, Graslund T, Zhivotovsky B, Lehtio J. (2013) S100A4 interacts with p53 in the nucleus and promotes p53 degradation. *Oncogene*, 32: 5531-5540.

Otlewski J, Jelen F, Zakrzewska M, Oleksy A. (2005) The many faces of protease-protein inhibitor interaction. *EMBO J*, 24: 1303-1310.

Örd M, Loog M. (2020) Detection of Multisite Phosphorylation of Intrinsically Disordered Proteins Using Phos-tag SDS-PAGE. *Methods Mol Biol*, 2141: 779-792.

Pal D, Chakrabarti P. (1999) Cis peptide bonds in proteins: residues involved, their conformations, interactions and locations. *J Mol Biol*, 294: 271-288.

Pang R, Lee TK, Poon RT, Fan ST, Wong KB, Kwong YL, Tse E. (2007) Pin1 interacts with a specific serine-proline motif of hepatitis B virus X-protein to enhance hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology*, 132: 1088-1103.



Pedersen KB, Nesland JM, Fodstad Ø, Maeldandsmo GM. (2002) Expression of S100A4, E-cadherin, alpha- and beta-catenin in breast cancer biopsies. *Br J Cancer*, 87: 1281-1286.

Popowicz GM, Czarna A, Rothweiler U, Szwagierczak A, Krajewski M, Weber L, Holak TA. (2007) Molecular basis for the inhibition of p53 by Mdmx. *Cell Cycle*, 6: 2386-2392.

Raj N, Attardi LD. (2017) The Transactivation Domains of the p53 Protein. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 7.

Reimer U, Scherer G, Drewello M, Kruber S, Schutkowski M, Fischer G. (1998) Side-chain effects on peptidyl-prolyl cis/trans isomerisation. *J Mol Biol*, 279: 449-460.

Rodal SK, Skretting G, Garred O, Vilhardt F, van Deurs B, Sandvig K. (1999) Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Mol Biol Cell*, 10: 961-974.

Rowell JP, Simpson KL, Stott K, Watson M, Thomas JO. (2012) HMGB1-facilitated p53 DNA binding occurs via HMG-Box/p53 transactivation domain interaction, regulated by the acidic tail. *Structure*, 20: 2014-2024.

Sabnis RW. *Handbook of fluorescent dyes and probes*. Wiley, Hoboken, 2015: 20-388.

Saha T, Kar RK, Sa G. (2015) Structural and sequential context of p53: A review of experimental and theoretical evidence. *Prog Biophys Mol Biol*, 117: 250-263.

Schubert M, Labudde D, Oschkinat H, Schmieder P. (2002) A software tool for the prediction of Xaa-Pro peptide bond conformations in proteins based on C-13 chemical shift statistics. *J Biomol NMR*, 24: 149-154.

Schultz DA, Friedman AM, White MA, Fox RO. (2005) The crystal structure of the cis-proline to glycine variant (P114G) of ribonuclease A. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 14: 2862-2870.

Schwoebel ED, Ho TH, Moore MS. (2002) The mechanism of inhibition of Ran-dependent nuclear transport by cellular ATP depletion. *J Cell Biol*, 157: 963-974.

Shen Y, Bax A. (2010) Prediction of Xaa-Pro peptide bond conformation from sequence and chemical shifts. *J Biomol NMR*, 46: 199-204.

Song J, Burrage K, Yuan Z, Huber T. (2006) Prediction of cis/trans isomerization in proteins using PSI-BLAST profiles and secondary structure information. *BMC Bioinformatics*, 7: 124-124.

Soulages JL, Kim K, Arrese EL, Walters C, Cushman JC. (2003) Conformation of a group 2 late embryogenesis abundant protein from soybean. Evidence of poly (L-proline)-type II structure. *Plant Physiol*, 131: 963-975.

Stewart RL, Carpenter BL, West DS, Knifley T, Liu L, Wang C, Weiss HL, Gal TS, Durbin EB, Arnold SM, O'Connor KL, Chen M. (2016) S100A4 drives non-small cell lung cancer invasion, associates with poor prognosis, and is effectively targeted by the FDA-approved anti-helminthic agent niclosamide. *Oncotarget*, 7: 34630-34642.

Stukenberg PT, Kirschner MW. (2001) Pin1 acts catalytically to promote a conformational change in Cdc25. *Mol Cell*, 7: 1071-1083.

Svensson LA, Thulin E, Forsén S. (1992) Proline cis-trans isomers in calbindin D9k observed by X-ray crystallography. *J Mol Biol*, 223: 601-606.

Swanson JA, Watts C. (1995) Macropinocytosis. *Trends Cell Biol*, 5: 424-428.

Taylor S, Herrington S, Prime W, Rudland PS, Barraclough R. (2002) S100A4 (p9Ka) protein in colon carcinoma and liver metastases: association with carcinoma cells and T-lymphocytes. *Br J Cancer*, 86: 409-416.

Theillet FX, Kalmar L, Tompa P, Han KH, Selenko P, Dunker AK, Daughdrill GW, Uversky VN. (2013) The alphabet of intrinsic disorder: I. Act like a Pro: On the abundance and roles of proline residues in intrinsically disordered proteins. *Intrinsically Disord Proteins*, 1: e24360.

Tompa P. (2002) Intrinsically unstructured proteins. *Trends Biochem Sci*, 27: 527-533.

Trabulo S, Cardoso AL, Mano M, De Lima MC. (2010) Cell-Penetrating Peptides-Mechanisms of Cellular Uptake and Generation of Delivery Systems. *Pharmaceuticals*, 3: 961-993.

Tsukamoto N, Egawa S, Akada M, Abe K, Saiki Y, Kaneko N, Yokoyama S, Shima K, Yamamura A, Motoi F, Abe H, Hayashi H, Ishida K, Moriya T, Tabata T, Kondo E, Kanai N, Gu Z, Sunamura M, Unno M, Horii A. (2013) The expression of S100A4 in human pancreatic cancer is associated with invasion. *Pancreas*, 42: 1027-1033.

Urbanek A, Popovic M, Elena-Real CA, Morato A, Estana A, Fournet A, Allemand F, Gil AM, Cativiela C, Cortes J, Jimenez AI, Sibille N, Bernado P. (2020) Evidence of the Reduced Abundance of Proline cis Conformation in Protein Poly Proline Tracts. *J Am Chem Soc*, 142: 7976-7986.

Uversky VN. (2002) Natively unfolded proteins: A point where biology waits for physics. *Prot Sci*, 11: 739-756.

Uversky VN. (2015) Paradoxes and wonders of intrinsic disorder: Prevalence of exceptionality. *Intrinsically Disord Proteins*, 3: e1065029.

van Dieck J, Teufel DP, Jaulent AM, Fernandez-Fernandez MR, Rutherford TJ, Wyslouch-Cieszynska A, Fersht AR. (2009) Posttranslational Modifications Affect the Interaction of S100 Proteins with Tumor Suppressor p53. *J Mol Biol*, 394: 922-930.

Vivès E, Brodin P, Lebleu B. (1997) A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem*, 272: 16010-16017.

Warschawski DE, Arnold AA, Beaugrand M, Gravel A, Chartrand É, Marcotte I. (2011) Choosing membrane mimetics for NMR structural studies of transmembrane proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1808: 1957-1974.

Weiss MS, Jabs A, Hilgenfeld R. (1998) Peptide bonds revisited. *Nat Struct Biol*, 5: 676-676.

Wells M, Tidow H, Rutherford TJ, Markwick P, Jensen MR, Mylonas E, Svergun DI, Blackledge M, Fersht AR. (2008) Structure of tumor suppressor p53 and its intrinsically disordered N-terminal transactivation domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 5762-5767.

Wong LE, Maier J, Wienands J, Becker S, Griesinger C. (2018) Sensitivity-Enhanced Four-Dimensional Amide-Amide Correlation NMR Experiments for Sequential Assignment of Proline-Rich Disordered Proteins. *J Am Chem Soc*, 140: 3518-3522.

Wüthrich K. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*. Wiley, USA, 1986

Xie J, Bi Y, Zhang H, Dong S, Teng L, Lee RJ, Yang Z. (2020) Cell-Penetrating Peptides in Diagnosis and Treatment of Human Diseases: From Preclinical Research to Clinical Application. *Front Pharmacol*, 11: 697.

Yetisgin AA, Cetinel S, Zuvin M, Kosar A, Kutlu O. (2020) Therapeutic Nanoparticles and Their Targeted Delivery Applications. *Molecules*, 25.

Yoshida K, Liu H, Miki Y. (2006) Protein kinase C delta regulates Ser46 phosphorylation of p53 tumor suppressor in the apoptotic response to DNA damage. *J Biol Chem*, 281: 5734-5740.

Zhan YA, Ytreberg FM. (2015) The cis conformation of proline leads to weaker binding of a p53 peptide to MDM2 compared to trans. *Arch Biochem Biophys*, 575: 22-29.

Zhang S, Wang G, Liu D, Bao Z, Fernig DG, Rudland PS, Barraclough R. (2005) The C-terminal region of S100A4 is important for its metastasis-inducing properties. *Oncogene*, 24: 4401-4411.

Zhao Z, Ukidve A, Kim J, Mitragotri S. (2020) Targeting Strategies for Tissue-Specific Drug Delivery. *Cell*, 181: 151-167.

Ziegler-Heitbrock HW, Thiel E, Futterer A, Herzog V, Wirtz A, Riethmuller G. (1988) Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes. *Int J Cancer*, 41: 456-461.

## 10. Saját publikációk

### Az értekezés alapját képező közlemények:

1. **Sebák F**, Ecsédi P, Bermel W, Luy B, Nyitray L, Bodor A. (2021) Selective, sensitive  $^1\text{H}^\alpha$  NMR methods to reveal functionally relevant proline *cis/trans* isomers in IDPs: characterization of minor forms, effects of phosphorylation and occurrence in proteome. *Angew Chem Int Ed*, IF:15,336
2. Dudás EF, Pálffy Gy, Menyhárd DK, **Sebák F**, Ecsédi P, Nyitray L, Bodor A. (2020) Tumor-Suppressor p53TAD(1-60) Forms a Fuzzy Complex with Metastasis-Associated S100A4: Structural Insights and Dynamics by an NMR/MD Approach. *Chembiochem*, 21: 3087-3095. IF: 3,164
3. Boros E, **Sebák F**, Héja D, Szakács D, Zboray K, Schlosser G, Micsonai A, Kardos J, Bodor A, Pál G. (2019) Directed Evolution of Canonical Loops and Their Swapping between Unrelated Serine Proteinase Inhibitors Disprove the Interscaffolding Additivity Model. *J Mol Biol*, 431: 557-575. IF: 4,760

### Az értekezés témájában elfogadott kézirat

**Sebák F**, Horváth LB, Kovács D, Szolomájer J, Tóth GK, Babiczky Á, Bősze Sz, Bodor A. (2021) Novel, lysine-rich delivery peptides of plant origin ERD and human S100: the effect of carboxyfluorescein conjugation, influence of aromatic and proline residues, cellular internalization and penetration ability. *ACS Omega*, IF: 3,512

### Disszertációhoz nem kötődő publikációk

1. Ricci M, Horváti K, Juhász T, Szigyártó I, Török G, **Sebák F**, Bodor A, Homolya L, Henczkó J, Pályi B, Mlinkó T, Mihály J, Nizami B, Yang ZHY, Lin FM, Lu XL, Romanszki L, Bóta A, Varga Z, Bősze Sz, Zsila F, Beke-Somfai T. (2020) Anionic food color tartrazine enhances antibacterial efficacy of histatin-derived peptide DHVAR4 by fine-tuning its membrane activity. *Q Rev Biophys* 53: 1-11. IF:5,318

### Előadások

1. **Sebák F**, Horváth LB, Kovács, Szolomájer J, Tóth GK, Babiczky Á, Bősze Sz, Bodor A. 5- és 6-karboxifluoreszcein hatása peptidek szerkezeti hajlamaira és a sejtpenetrációra. Peptidkémiai Munkabizottság ülése, Balatonszemes, 2021.

2. **Sebák F**, Horváth, LB, Kovács D, Szolomájer J, Tóth GK, Babiczky Á, Bősze Sz, Bodor A. Fluoreszcens festék-peptid konjugátumok: 5- és 6-karboxifluoreszcein hatása peptidek szerkezeti hajlamaira és a sejtpenetrációra; Magyar NMR Munkabizottsági ülés, Mád, 2021.
3. **Sebák F**, Bermel W, Nyitray L, Luy B, Bodor A. Functionally important Pro conformations in proteins: how to determine them? Magyar NMR Munkabizottsági ülés, Balatonszemes, 2019.
4. **Sebák F**, Dudás EF, Pálfy Gy, Ecsédi P, Menyhárd DK, Nyitray L, Bodor A. Characterization of the TAD domain of p53 in free form and in fuzzy complex with S100A4; Chemistry towards Biology (CTB9) Conference, Budapest, 2018.
5. **Sebák F**, Boros E, Pál G, Bodor A. A hurokcsere hatásának vizsgálata kanonikus szerin proteáz inhibitorok esetében; Magyar NMR Munkabizottsági ülés, Balatonszemes, 2018
6. **Sebák F**, Boros E, Pál G, Bodor A. Role and structure of scaffolds in canonical serine protease inhibitor variants: an NMR spectroscopic view; Semmelweis Egyetem PhD Tudományos Napok, Budapest, 2018.

#### **Poszterek**

1. **Sebák F**, Wacha A, Bóta A, Bodor A. Bicelle-Peptide Interactions: Combined NMR-SAXS Approach to Characterize Global and Local Parameters; ENC on-line meeting, 2021.
2. **Sebák F**, Wacha A, Bóta A, Bodor A. Characterizing Bicelle Size Using a Combined NMR-SAXS Method; EUROMAR on-line meeting, 2020.
3. **Sebák F**, Dudás EF, Wacha A, Bóta A, Bodor A. Global and local parameters to characterize peptide-membrane mimetics interaction; EUROISMAR 2019 Konferencia, Berlin, Németország, 2019.
4. **Sebák F**, Bermel W, Nyitray L, Luy B, Bodor A. Determination of functionally important proline conformations in proteins; EUROISMAR 2019 Konferencia, Berlin, Németország, 2019.
5. **Sebák F**, Dudás EF, Nyitray L, Bodor A. Characterization of the p53 TAD domain; EUROMAR 2018 Konferencia, Nantes, Franciaország, 2018.

## 11. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Bodor Andrea egyetemi docensnek a türelméért, a munkám során nyújtott rengeteg segítségért és tanácsért.

Köszönettel tartozom PhD-hallgatótársaimnak baráti munkahelyi légkörért, ezenfelül Dr. Földes Dr. Dudás Erikának az NMR spektroszkópiai mérések terén adott tanácsaiért, Szabó Csenge Lillának, hogy bármilyen kéréssel fordulhattam hozzá és Kovács Dánielnek a statisztikai kérdésekben nyújtott segítségéért.

Köszönöm a szakmai együttműködő felek munkáját, nélkülük a publikációk nem készülhettek volna el.

Köszönettel tartozom az ELTE Biokémiai Tanszékről Dr. Nyitray László egyetemi tanárnak és Dr. Ecsédi Péternek a p53 TAD fehérjedomén és Dr. Pál Gábor és Dr. Boros Eszternek a szerin proteáz inhibitorok előállításáért.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Burkhard Luynak a Karlsruher Institut für Technologie (KIT) egyetemről és Dr. Wolfgang Bermelnek a Bruker cégtől a  $^1\text{H}^\alpha$ -detektált pulzusszekvenciák elkészítésében nyújtott segítségükért.

Köszönettel tartozom az ELKH-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportból Dr. Bősze Szilviának és Horváth Lillának az *in vitro* sejtpenetrációs mérésekért, továbbá Babiczky Ákosnak a konfokális mikroszkópos felvételekért.

Köszönöm az előállított peptid és fluorofór-peptid-konjugátumokat Szegedi Tudományegyetemről Dr. Tóth Gábor egyetemi tanárnak és Dr. Szolomájer János egyetemi adjunktusnak.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Bóta Attilának és Dr. Wacha Andrásnak a bicellák szerkezeti jellemzése során nyújtott segítségükért.

Köszönöm az ELTE Szerkezeti Kémia és Biológia Kutatócsoport és az MTA ELTE Fehérjemodellező Kutatócsoport tagjainak a doktori munkám során nyújtott segítséget.

Köszönöm a Semmelweis Egyetem Predoktori Ösztöndíj (EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009) és az Alapítvány a Magyar Peptid és Fehérjekutatásért anyagi támogatását. Végül, szeretnék köszönetet mondani a családomnak és a barátaimnak, hogy mindvégig mellettem álltak és támogattak.