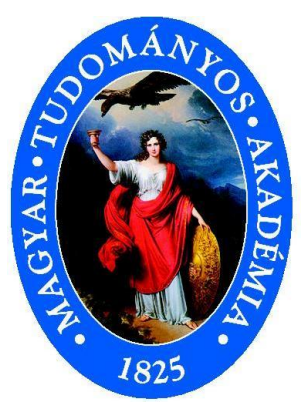


Fehérje kölcsönhatások vizsgálata NMR spektroszkópiával



Tőke Orsolya^{a*}, Oláh Judit^b, Ovádi Judit^b



^aMTA TTK SZKI NMR Kutatócsoport, ^bMTA TTK EI Sejtarchitektúra Kutatócsoport

Az NMR spektroszkópia a fehérje kölcsönhatások vizsgálatának hatékony eszköze. Előnye, hogy a molekuláris kölcsönhatásoknak mind a szerkezeti, mind a dinamikai aspektusát képes megvilágítani. Szintén fontos szempont, hogy segítségével molekuláris mozgások rendkívül széles időskálán tanulmányozhatók, és az általa nyert atomi-szintű információ összefüggésbe hozható makroszkopikusan mérhető termodinamikai és kinetikai paraméterekkel. A jelen pályázat keretében két rendszert, a neurodegeneratív megbetegedésekkel összefüggésbe hozható alfa-szinuklein, valamint a koleszterinszint szabályozásában szerepet játszó humán epesav-kötő fehérje kölcsönhatásait tanulmányozzuk.



**SEJTBIOLÓGIA
GYÓGYSZERKUTATÁS**

Ovádi Judit, Ph.D., D.Sc.
MTA TTK EI

- neurológiai betegségek pathomechanizmusa
- ultrastruktúrák szerkezeti és funkcionális vizsgálata molekuláris és sejt szinten





**NMR
SPEKTROSZKÓPIA**

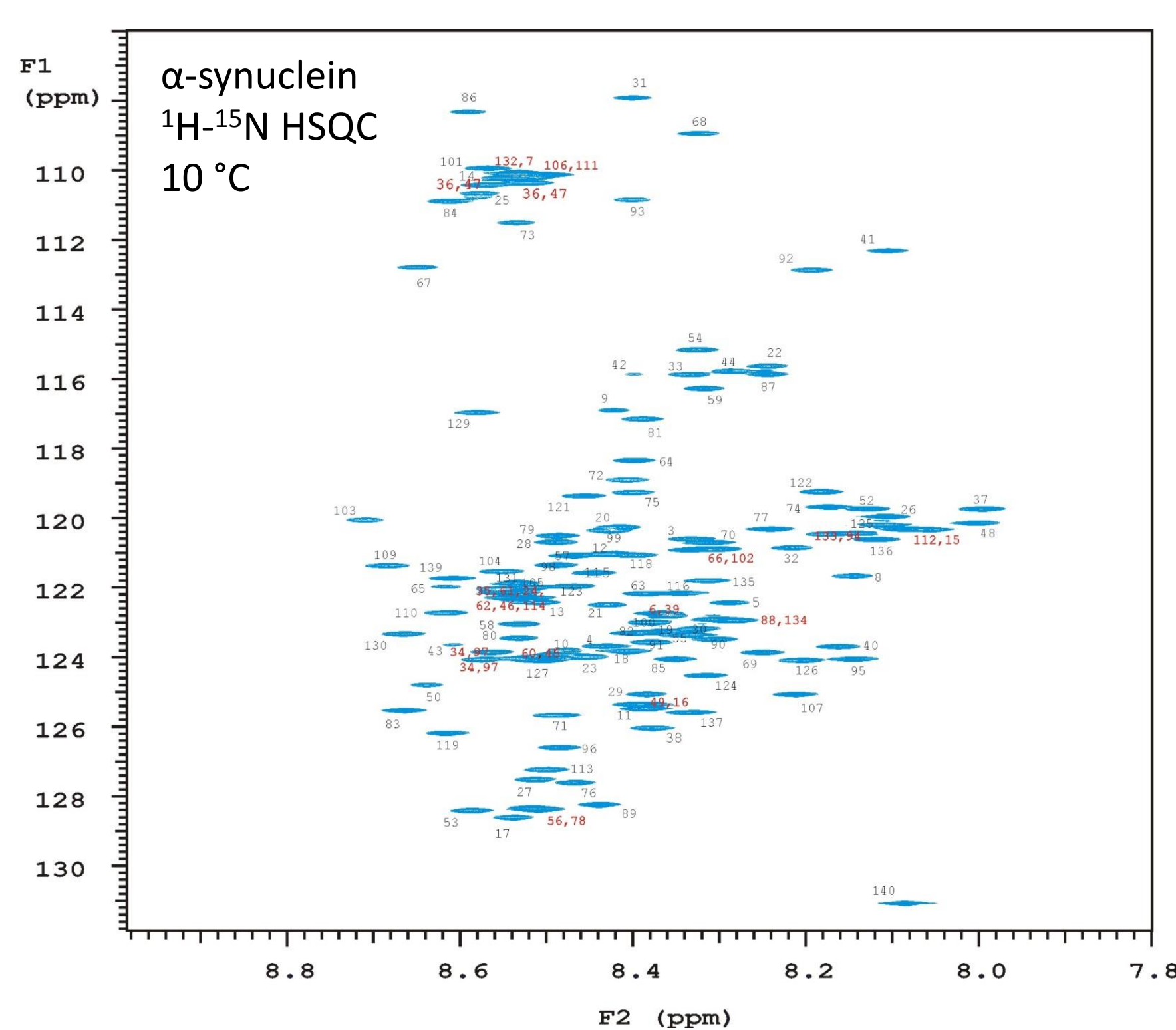
Tőke Orsolya, Ph.D.
MTA TTK SZKI

- fehérje-ligandum, fehérje/peptid-membrán kölcsönhatások
- lipidkötő fehérjék
- belső molekuláris mozgások NMR spektroszkópiai és biofizikai vizsgálata

ALFA-SZINUKLEIN-TPPP/p25 kölcsönhatás

- TPPP/p25 (tubulin polymerization promoting protein): patológiás körülmények között kölcsönhat az alfa-szinukleinnel, ami zárványtestek képződéséhez vezet
- humán agyszövetben a két fehérje kolokalizációt mutat, amely karakterisztikus a Parkinson-kórra és más synucleinopátiákra

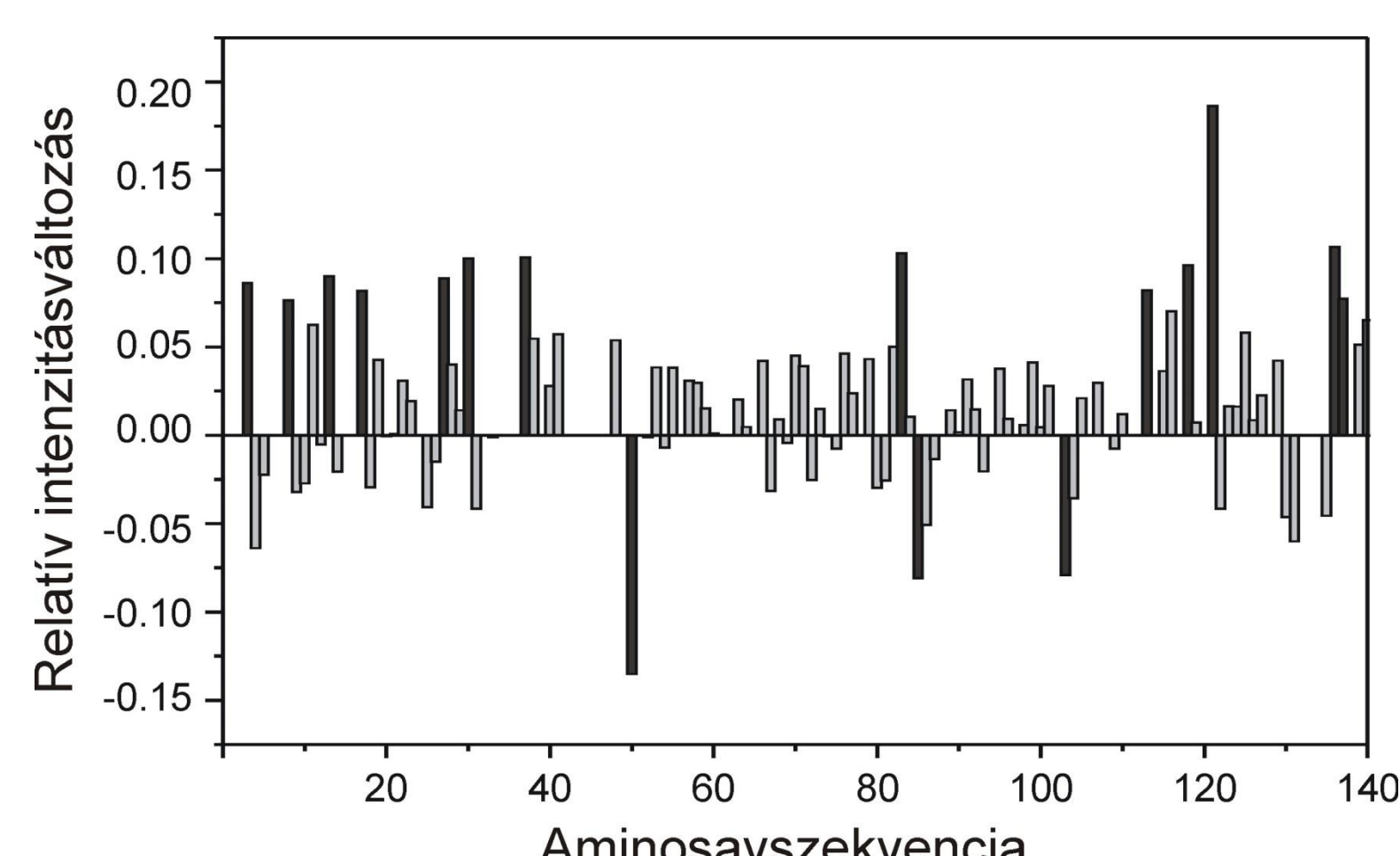
Cél: kontaktfelszín jellemzése, lehetséges konformációs állapot(ok) azonosítása



α-synuclein rezonanciajeleinek assignációja

rezonanciajelek intenzitásának változása csonkolt TPPP/p25 jelenlétében:

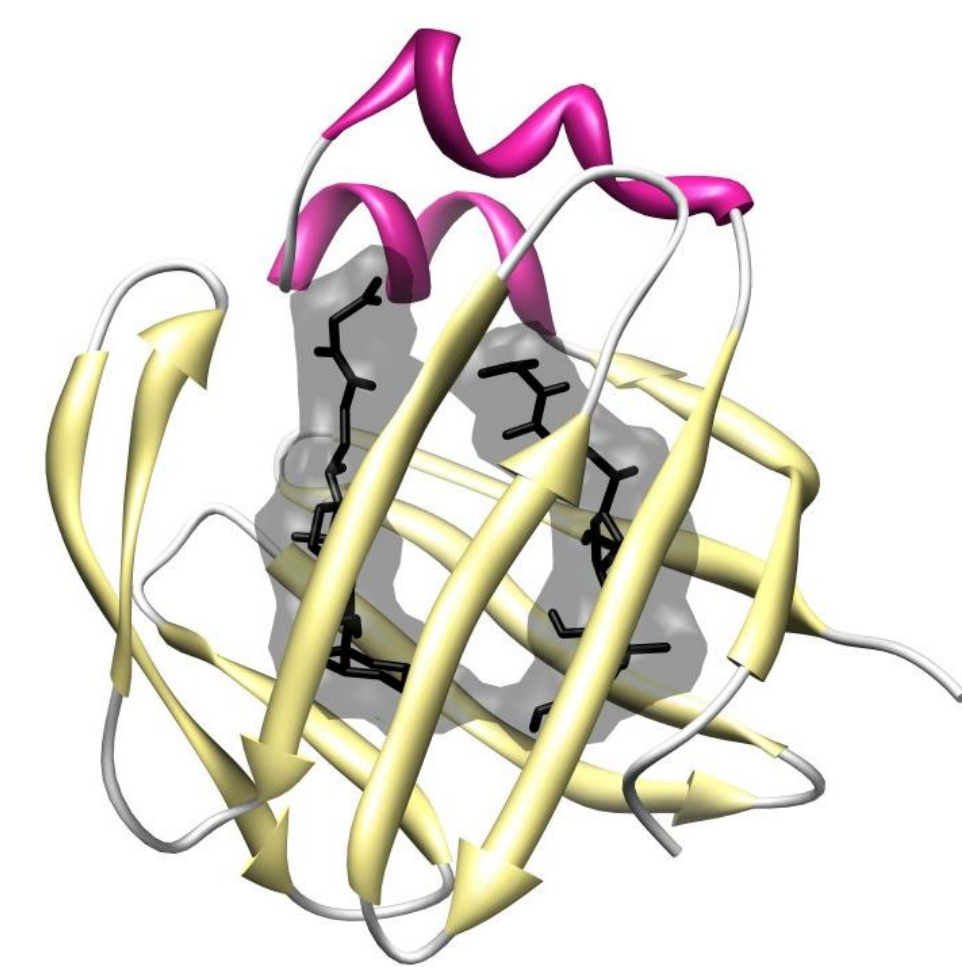
kezdeti eredmények



Folyamatban: kísérleti körülmények optimalizálása a kölcsönhatás tanulmányozásához

HUMÁN EPESAV-KÖTŐ FEHÉRJE

- 14.2 kDa
- β-hordó szerkezet
- ~1000 Å³ kötőüreg a „hordó” belsejében
- sztöchiometria: 1:2
- pozitív kooperativitás a kötőhelyek között
- kötőhely szelektivitás
- ms konformációs mozgás az apo fehérjében, amely ligandumkötődés hatására megszűnik

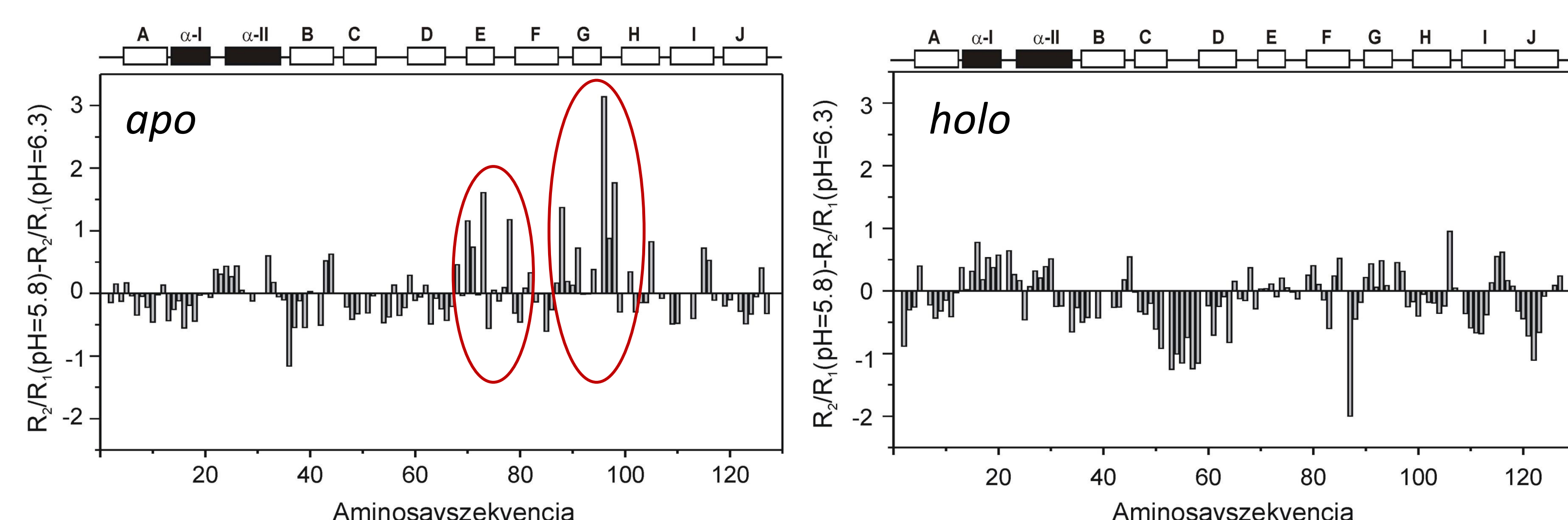


Ligandumkötődés pH-függése

pH csökkenésével

- a kumulatív affinitás kismértékben nő, a pozitív kooperativitás csökken (ITC)
- a kötődés első kinetikai lépésének sebességi állandója nő (stopped-flow)

¹⁵N R₁, R₂ NMR relaxációs sebességek tanulmányozása



A ¹⁵N relaxációs sebességek μs-ms konformációs mozgás jelenlétére utaló R₂/R₁ hányadosa az EFGH portál régióban pH csökkenés hatására az apo fehérjében szignifikánsan emelkedik.

Összhangban a korábban találtakkal (*Biochemistry* 51:1848 (2012), 53:5186 (2014)) az EFGH béta-szalakban legintenzívebb ms konformációs mozgás segíti a ligandumok kötőüregbe jutását. A nyitott és zárt konformációs állapot közötti egyensúlyt a pH csökkenése a kötődésnek kedvező nyitott állapot irányába tolja el.

Folyamatban: a kis populációban jelen levő nyitott konformációs állapot szerkezeti jellemzése