**Fehérjék alakja és kompaktsága az NMR-SAXS tükrében**

Oldatfázisú PFG 1H NMR mérésekből diffúziós együtthatót határoztunk meg, és származtattuk a fehérje vagy fehérje – lipid asszociátumok látszólagos hidrodinamikai sugarát (RH). Ugyanolyan körülmények mellett kisszögű röntgenszórási (SAXS) mérésekből a szórásgörbék kezdeti szakaszából az ún. girációs sugarat (RG) számítottuk ki. Az RH és RG paraméterek koncentráció, hőmérséklet és ionerősség függését tanulmányoztuk az alaktényezőt meghatározó RG/RH hányados változásának követésére.

Vizsgáltuk a kalmodulin fehérje apo- és Ca2+ kötött formáit, megállapítottuk, hogy a girációs sugár kis mértékben, a hidrodinamikai sugár gyakorlatilag nem változik a bekövetkező konformációs változás hatására.

Bizonyítottuk, hogy a DHPC micellák nyújtott alakúak, és tanulmányoztuk a semleges (DHPC/DMPC) és negatív töltésű (DHPC/DMPC+DMPG) bicellák méretének és alakjának hőmérséklet, ionerősség és puffer okozta változásait, illetve azt is, hogy milyen változásokat tapasztalunk, ha egy transzmembrán (mesterséges KALP23), vagy egy felülethez kötődő (melittin) peptiddel lép kölcsönhatásba. Szórási görbére alapozva megoldottuk a bicellák méret és alakmeghatározását.

Megmutattuk, hogy az általunk definiált alaktényező használata jogos és a fehérjék kompaktságának jellemzésére alkalmas paraméternek tűnik.

**Szinergia összegző űrlap**

**Fehérjék alakja és kompaktsága az NMR-SAXS tükrében**

**1. Bodor Andrea**, PhD, egyetemi adjunktus

ELTE TTK Kémiai Intézet, Szerkezeti Kémia és Biológia Laboratórium, abodor@chem.elte.hu

**2. Bóta Attila,** DSc,tudományos tanácsadó

MTA TTK, Anyag és Környezetkémiai Intézet, Biológiai Nanokémia Kutatócsoport,

bota.attila@ttk.mta.hu

1. Fejtsék ki pontosan, hogy a kutatási együttműködésük hogyan kapcsolódott az alább megadott MedinProt **fókuszpontok** legalább egyikéhez *(max. 300 szó)****.***

*Együttműködésünk két fókuszponthoz kapcsolódott: az „NMR és MRI adta lehetőségek a fehérjék feltekeredésével kapcsolatos betegségek molekuláris hátterének megértésében”, illetve az „Alkalmas nanorendszerek fejlesztése peptid- és fehérjealapú hatóanyagok stabilitásának és felszívódásának fokozása érdekében” tematikákhoz. Mindkét fókuszpont a fehérjék alakbeli változását és topológiájának az ismeretét szükségelteti.*

a) Legtöbb esetben a fehérje biológiai funkciójának változása összefüggésben áll a normális, illetve kóros folyamatokban felvett másodlagos, harmadlagos, illetve negyedleges szerkezeti formákkal. Ezen állapotok megkülönböztetése és szerkezeti jellemzése a legújabb és leghatékonyabb szerkezetvizsgálati módszerek alkalmazásával is nagy kihívást jelent. A fehérjéknek betegségekkel kapcsolatba hozható konformáció-változásaira az oldatfázisú (nem kristályosított állapotban történő) jellemzés az ideális.

b) A peptid- és fehérjealapú hatóanyagok becsomagolására alkalmas legelterjedtebb, leghatékonyabb, természetes nanorendszer a lipid kettősréteg, melynek konkrét formája a bicella. A bicella kiváló modellrendszer, amellyel a kettősrétegből felépülő hatékony nanohordozók, a vezikulák valamint a modellmembrán fehérjék lipidkörnyezete és kölcsönhatásai tanulmányozhatóak. Adott fehérje különféle módon tudja megváltoztatni a bicella alakját, illetve a membrán görbületét, ami a hatóanyag felszívódását is befolyásolhatja.

Mindezek tükrében a fehérjék alakjának, kompaktságának, illetve a membránok (bicellák) görbületének fiziko-kémiai jellemzése nagy jelentőségű, hiszen igen gyakran a laboratóriumi in vitro modellrendszerek szolgálnak a komplexebb, nagyobb horderejű vizsgálatok alapjául.

A kérdés tanulmányozásához szükséges legjobb módszerek közé tartozik az NMR spektroszkópia és a SAXS technikák ötvözete, mivel mindkettő biológiailag releváns környezetben szolgáltat információt. A módszerek ezen társítása hazai környezetben egyedülálló, elsősorban a nagy térerejű NMR és SAXS berendezések szomszéd épületekben való elhelyezése lehetővé teszi *ugyanazon minta ugyanazon kísérleti körülmények* mellett történő vizsgálatát. Így jó minőségű, megbízható adathalmaz elkészítésére adódik lehetőség. Vizsgálatainkhoz globuláris és rendezetlen modellfehérjéket; illetve bicella membránmimetikum ismert topológiájú (transzmembrán, illetve felülethez kötődő) peptiddel alkotott rendszerét használtuk.

Terveink szerint eredményeink sikeresen alkalmazhatókká válnak a szerkezeti biológiában, a kiszámított paraméterek konkrét biológiai rendszerek viselkedésének, működésének megértésénél kulcsszerepet játszhatnak.

1. Foglalják össze **közérthetően** szinergia programjuk, és közös munkájuk eredményeit *(max. 300 szó).*

Pályázatunkban arra vállalkoztunk, hogy NMR spektroszkópiai és SAXS módszerek ötvözésével olyan szerkezeti biológiában hasznos paramétereket határozzunk meg, mint a fehérjék alaktényezője és kompaktsági faktora. A kompaktságot befolyásolja a fehérje oldószer által elérhető felülete, valamint alakja. Az oldószer által elérhető felület számolható, az alak jellemzésére a girációs (RG) és hidrodinamikai (RH) sugarak hányadosával értelmezett alaktényező szolgál. Jelenleg erre az arányra az irodalom a 0.77 (gömb), 0.8 (nyújtott), 1.77 (fonál) értékeket közli. Oldatfázisú NMR vizsgálatokból adott fehérjére megmért *D transzlációs diffúziós együttható* értékéből meghatároztuk a *hidrodinamikai sugarat* (*RH*). *Pontosan ugyanebből* az oldatból SAXS méréssel az *RG girációs sugár* értékét számítottuk ki, és a szórási görbéből a fehérje *alakját* (durvaszemcsés közelítéssel) is megadtuk.

Első lépésként jól ismert fehérjéket alapul véve (lizozim, kalmodulin) megbízhatóbb alaktényezők meghatározását és/vagy ellenőrzését céloztuk és sikerrel validáltuk módszerünket. Vizsgáltuk a kalmodulin fehérje apo- és Ca2+ kötött formáit, megállapítottuk, hogy a girációs sugár enyhén, a hidrodinamikai sugár gyakorlatilag nem változik a bekövetkező konformációs változás hatására. Megállapításaink más, friss irodalmi adatok is igazolják (Panjkovich, Svergun, *PhysChemChemPhys*, 2016).

Ezt követően micellák, bicellák és fehérjék kölcsönhatásainak tanulmányozására is alkalmaztunk módszerünket. Ennek jelentőségét az is indokolja, hogy az irodalomban a hidrodinamikai sugár hőmérséklet, vagy fehérje kötődés okozta növekedését a bicella méretváltozásával hozzák összefüggésbe, holott ezt az alak változása is okozhatja. Méréseink során megállapítottuk, hogy a DHPC micella nem gömbszimmetrikus, hanem lapított alakot eredményez, ami egybecseng korábbi irodalmi megállapításokkal (Lin *et al*, *JACS*, 1986). Tanulmányoztuk a semleges (DHPC/DMPC) és negatív töltésű (DHPC/DMPC+DMPG) bicellák méretének és alakjának hőmérséklet, ionerősség és puffer okozta változásait, illetve azt is, hogy milyen változásokat tapasztalunk, ha egy transzmembrán (mesterséges KALP23), vagy egy felülethez kötődő (melittin) peptiddel lép kölcsönhatásba. Sikerrel megoldottuk a membránmimetikumok esetében is a szórási görbére történő alakmeghatározást.

1. Értékeljék és véleményezzék közös munkájukat (sikereiket, nehézségeiket, illetve azon ötleteiket, javaslataikat, amelyeknek köszönhetően a következő programok hatékonysága javulhat) *(max. 200 szó).*

Közös munkánkat gördülékenyen tudtuk folytatni; nehézségek és időveszteség leginkább a két készülék szabad kapacitásának összehangolása során adódott. Sikernek értékeljük, hogy sikerült egy validált, egyszerű módszert kidolgozni alakmeghatározásra. Kimutattuk, az ionerősség és a puffer természete milyen mértékben befolyásol, ilyen eredmények korábban nem álltak rendelkezésre. Örvendetes, hogy a nem szokványos bicella rendszerek esetében is megoldódott a szórási görbe illesztése. Néhány kísérlet még folyamatban van, ezt követően eredményeink közölni fogjuk, elsődlegesen a *Langmuir* folyóiratot vettük célba.

1. Szabadon fogalmazzák meg a MedInProt kapcsán támogató és/vagy kritikus észrevételeiket. *(max. 200 szó)*

A MedInProt anyagi és erkölcsi támogatást nyújtott, és ez a pozitív visszacsatolás motiváló erővel bírt – ez a mai magyar tudományos életben egy fehér holló.

**Melléklet:**

*Kutatási eredményeink bemutatása:*

1. Dudás E., Wacha A., Bányai I., Bóta A., Bodor A.: Mit mondhat el egy fehérjéről az NMR, SAXS, krioporozimetria együttese?; NMR MB, Debrecen, 2016.05.21., *előadás*

2. E. Dudás, A. Wacha, A. Bóta, A. Bodor: Characterization of molecular size and shape by NMR and SAXS methods; Chianti Workshop on Magnetic Resonance for Cellular Structural Biology, 2016.06.5-10., Principina Terra, Grossetto, Olaszország, *poszter*

3. E. Dudás, A. Wacha, A. Bóta, A. Bodor: Proteins – as seen by a combined NMR, SAXS approach ; Alpine NMR Workshop: Frontiers of Magnetic Resonance: Applications to Nano- and Microscopically Structured Systems, 2016.23-25., Cluj/Kolozsvár, Románia, *előadás*

4. E. Dudás, A. Wacha, A. Bóta, A. Bodor: Morphological characterization of bicelles by a combined NMR-SAXS approach; MMCE17, 2016.03.08-12., Budapest, *elfogadott poszter.*

5. András Ferenc Wacha: Nanostructure Research by Small-Angle X-Ray Scattering: From Instrument Design to New Insights in Materials Sciences, *Ph.D. Thesis*, Budapest University of Technology and Economics, 2016.