

SZAKMAI ZÁRÓJELENTÉS

Témavezető neve *Dr Batta Gyula*

A téma címe *Biomolekuláris NMR: Szerkezet, oligomerizáció, mozgás és molekuláris felismerési jelenségek glikopeptid antibiotikumokban, cukrokban és kalcium kötő fehérjékben*

A kutatás időtartama: 2003 - 2007

Új NMR metodikák fejlesztése és alkalmazásai:

Az NMR ^{15}N és ^1H kémiai eltolódás anizotrópia mérésére új, CSA/DD kereszt-korrelációs relaxáción alapuló módszereket dolgoztunk ki, amit egy modell peptid esetén az intermolekuláris H-híd kimutatására alkalmaztunk. A ciklosporin-A immunszuppresszív antibiotikum esetében összefüggést találtunk a peptid kötés síkjának torzultságát mutató ω szög és a ^{15}N kémiai eltolódás anizotrópia mértéke között. Intramolekuláris, fényel indukált, cikloaddíciós reakcióval nyert dihidro-orotidin analóg három új sztereocentrumának konfigurációját NOE mérésekkel állapítottuk meg, amit molekula-mechanika módszerekkel vetettünk össze. A metil- β -D-glükopiranozid hidroximetil csoportjának belső dinamikáját vizsgáltuk. Több mágneses téren mértük az auto és keresztrelaxációt, valamint laboratóriumi és forgó koordináta-rendszerben a DD/DD relaxációs interferenciát. A mérések értelmezésére egy „hibrid” módszert fejlesztettünk ki. Megállapítottuk, hogy a CH_2 belső mozgást legjobban a két hasonlóan populált gg-gt konformer közti átugrás modell írja le legjobban. A konformerek szögelfordulása $50\text{-}60^\circ$, a hőmérséklet csökkentésével az átugrás sebessége csökken. A hőmérséklet függvényében mért dinamikából megkaptuk a folyamat aktiválási energiáját. Eredményeink összhangban vannak mások ultrahang relaxációs méréseivel és *ab initio* kvantumkémiai számításokkal. Új TROSY módszert fejlesztettünk ki, amely a korábbinál is nagyobb felbontóképességet ad a távolható csatolások lecsatolása révén. A módszer alkalmas a duplán izotópjelzett fehérjékben a ^{15}N - ^{13}C csatolás mérésére is. Proton-detektáláson alapuló (DJM)-INEPT-INADEQUATE kísérletet fejlesztettünk ki egy- és többkötéses ^{13}C - ^{13}C $^1\text{J}(\text{CC})$ skaláris spin-spin csatolások meghatározására. A kapott ^{13}C - ^{13}C multiplettek számítógépes elemzésével 2 Hz-nél kisebb csatolási állandók is mérhetőek. A módszer előnye, hogy lehetővé teszi az egy- és több-kötéses csatolási állandók egyidejű meghatározását. Új, proton-detektáláson alapuló INADEQUATE-típusú kísérleteket - IPAP DEPT-INADEQUATE és IPAP RINEPT-INADEQUATE - fejlesztettünk ki többkötéses ^{13}C - ^{13}C $^n\text{J}(\text{CC})$ skaláris spin-spin csatolások meghatározására. Az irodalomban korábban leírt módszerekhez képest jelentős érzékenység növekedést értünk el az egy-kötéses ^1H - ^{13}C csatolási evolúció refókuszálásával valamint a többkötéses $^n\text{J}(\text{CC})$ -re csatolásra optimalizált hosszú evolúciós idő alatt proton-lecsatolás alkalmazásával. A kísérletek további módosításával azonos- valamint ellentétes-fázisú ^{13}C - ^{13}C F1-dubletteket kapunk, melyek számítógépes

elemzésével - a multiplettek összeadásával ill. kivonásával – a dublett vonalai külön-külön spektrumban szerkeszthetők, így akár 1-2 Hz-nél kisebb csatolási állandók is pontosan mérhetők. A módszerek teljesítőképességét jól jellemzi, hogy 20-25 mg-os monoszacharid ill. diszacharid mintán, 24 óra alatt (600 MHz-es kriomérőfej alkalmazásával) az összes többkötéses ^{13}C - ^{13}C csatolási állandót meghatároztuk. A távolható heteronukleáris spin-spin csatolások mérésének eddiginél pontosabb módszerét dolgoztuk ki, az ún. CPMG-HSQMBC technikát. A módszer azon alapul, hogy a zavaró homonukleáris csatolások által okozott modulációt a kísérlet elején beiktatott, összetett impulzusokból felépített CPMG szekvenciával elimináljuk. Így a 2D NMR spektrumban nyert multiplettek tiszta fázisúak lesznek, és az antifázisú részből a heteronukleáris csatolás pontosan megállapítható. A kísérlet hasznát szénhidrátokon és glikopeptid antibiotikumon demonstráltuk a ^{13}C - ^1H illetve ^{15}N - ^1H csatolások meghatározásával. A mérési eredmények szerves molekulák térszerkezetének vizsgálatára általában is jól hasznosíthatók. Spanyol együttműködés keretében DOSY- transzlációs diffúziós NMR módszereket fejlesztettünk biopolimerek oligomerizációjának és konformációjának vizsgálatára könnyűvízes közegben. A módszereket kiterjesztettük ^{13}C , ^{15}N editált és szűrt változatokra. Telítés átvitel különbség (STD) kísérleteket fejlesztettünk fehérje-ligandum interakciók kimutatására könnyűvízes közegben. Kidolgoztuk a ^{15}N csoport-szelektív telítés módszerét, amely akkor is lehetővé teszi a fontos STD módszer alkalmazását, amikor a gazdamolekula és a ligandum NMR jelei átfednek. Példaként a ^{15}N jelzett glikopeptid antibiotikum / sejtfa - analóg peptid rendszerben igazoltuk a kötődést.

Fehérjék vizsgálata:

A 2002-ben lezárt T 029089 pályázatunkban hivatkozott és a Protein Science-ben 2003-ban megjelent munkánk szerint a calretinin (CR) kalcium kötő fehérjére a homológia modellezés azt jósolja, hogy a hat "EF-hand" szerkezeti egysége egyetlen doménban rendeződik. NMR módszerekkel bizonyítottuk, hogy a CR I-II (1-100) és a CR III-VI (100-271) - a várakozással ellentétben- független doménokat alkot. Ez a különbség a rokon Calbindin D28k fehérjéhez képest magyarázhatja, hogy a CR nem mutat kölcsönhatást a programozott sejtfa szerepet játszó caspase-3-al, egyúttal felhívja a figyelmet a homológia modellezés potenciális veszélyeire. A korábban általunk NMR módszerekkel karakterizált (BMRB 5156) calretinin kalcium kötő fehérje N-terminális CR I-II doménját vizsgáltuk a pH 5.2-8.5 tartományban. A ^{15}N - ^1H korrelációs HSQC spektrumok elemzéséből azt kaptuk, hogy az első EF-Hand modul His12 és His27 egységeinek környezetében a legnagyobbak a változások, pH 7.0 ± 0.2 értéknél. A másodlagos struktúrában a pH nem okozott változást. Adataink azt a modellt támogatják, miszerint az érintett hisztidinek protonálódásának hatására elsősorban az N-terminális hurok és az A hélix átmenete továbbá a B hélix közepe változhat. Hidrofób hely alakul ki a fehérje globális hidrofób sajátságainak jelentősebb változása nélkül. További vizsgálatok lehetségesek a hipotetikus pH kapcsoló (Ca^{2+} , H^+) funkció vizsgálatára. A ^{15}N jelzett CR fragmensek előállításához használt *Pichia pastoris* élesztőgombák mannóz tartalmú poliszacharidot is termelnek. Ennek a zavaró terméknek a

konkanavalin agarózzal történő eltávolítására NMR-el kontrollált módszert vezettünk be. Fehérje standardok alkalmazásával az NMR diffúziós (DOSY) módszer molekulásúly kalibrálásához fejlesztettünk ki módszert. Ez alkalmas globuláris fehérjék oligomerizációs állapotának meghatározására. Öt különböző fehérje/ligandum rendszeren végzett szaturáció-transzfer differencia kísérletekben igazoltuk, hogy ezekben az interakciókban a mérési hőmérséklet befolyásolhatja a kötés erősségét, a kinetikát és a fontos oldalláncok dinamikáját. Ezért a mérések sikeres megvalósításához fontos a hőmérséklet optimalizálása.

Oligopeptidek, antibiotikumok és más bioaktív molekulák NMR vizsgálata :

Szelektív/Gradiens NMR technikákkal (COSY, TOCSY, NOESY) azonosítottuk a stigmasterol szteroid vázának és oldalláncainak összes jelét, valamint a csatolási állandókat. Ezekkel a módszerekkel a bonyolult spektrumú szteroidok szerkezete meghatározható. Az újonnan szintetizált, potenciálisan enzimgátló dihidrooritidin három új sztereocentrumának határoztuk meg a konfigurációját NOESY és molekula-mechanika módszerekkel.

A humán nyál-amiláz enzim katalizálja bizonyos galaktozil-maltozidok hidrolízisét, amit pl. a tannin gátolhat és így szerepe lehet a fogszuvasodás megelőzésében. Az általunk vizsgált galotannin szerkezetazonosításához NMR módszereket használtunk. Spiro-hidantoidin egységet tartalmazó akarbóz analóg pszeudotetraszacharidot állítottak elő Kandra és munkatársai, amely az α -amiláz hatásos inhibitora. Teljes $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ jelhozzárendelést követően igazoltuk hogy a tio-hidantoidin előtti új glikozidos kötés típusa 1>6. ROESY mérésekből azt kaptuk, hogy az akarbózhoz képest a gyűrűkonformációk nem változtak. Kisebb különbségek ellenére az akarbózzal megegyező A, B, C gyűrűk interglikozidos konformációja is hasonlít az akarbózhoz, és elkülönült hidrofil és hidrofób felületeket kínál fel a target fehérje számára. Az új, 1>6 interglikozidos kötés flexibilitása esetleg magyarázhatja a mért nagyobb aktivitást. Herczegh és munkatársai D-glükálból 2,3 telítetlen hexapiranóz egységekből álló poliszacharidokat állítottak elő, amelyek az α -amiláz inhibitorai. Az elválasztott di-és triszacharidok szerkezetét teljes $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ jelhozzárendeléssel igazoltuk, míg a nyert polimer keverékben NMR alapján csak 10% β izomert találtunk, ami a poli-glikozilezés jó sztereoszelektivitását igazolja. MALDI-TOF tömegspektrometriás mérések szerint a kovalens polimerek mintegy 5.5 kDa (30 egység) mérethatárig képződnek, míg az NMR diffúziós mérések alapján 30 kDa móltömegű aggregátumok jelennek meg CDCl_3 oldatban. Bisz-(alfa-béta-D-glükopiranozil)-poli-izobutilén CDCl_3 oldószerben lejátszódó (koncentrációtól függő) önasszociálódását diffúziós (DOSY) módszerrel figyeltük meg mintegy 65 kDa mérethatárig. A NOESY mérések tanúsága szerint az aggregátumok „belső” PIB része flexibilis, míg a külső szénhidrát rész ($^4\text{C}_1$ konformáció) a merevebb a reverz micellaképződés során. Egyéb módszerekkel összhangban (CD, transzmissziós elektronmikroszkóp, kvantum-kémiai számítások) diffúziós NMR vizsgálatok során igazoltuk, hogy az izopropilidén-guanozin polietilén-glikollal (PEG) kialakított telekelikus dimerje K^+ ion jelenlétében ún. G4 kvadruplexeket alkot CDCl_3 oldószerben. A

képződő gyöngyfüzér-szerű szupramolekuláris polimerek (20 kDa - 10 MDa tömegtartomány, kísérleti körülményektől függően) makromonomerje G4-(PEG)4-G4 szerkezetű, amely képes kisméretű hidrofób ligandum (pl. TMS) „becsomagolására”. Bár a jelen vegyületek nem mutattak telomeráz enzim gátlást, ilyen jellegű potenciális aktivitás nem kizárható, miként kisméretű gyógyszer-molekulák célbajuttatása sem.

Főleg alaninból álló, de tirozint is tartalmazó, helikális modell peptideket használva, kombinált NOE és molekula-dinamikai módszerekkel aromás oldalláncok és a váz között észleltünk kölcsönhatásokat. Ez a megfigyelés valószínűsíti az aromás-főlánc kölcsönhatások gyakoriságát helikális fehérjékben. Antraciklin-glikozid antibiotikumok új, biológiailag hatásos, négyszögsavval képzett származékait (pl. kovalens dimereket) teljes $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ NMR jelhozarárendeléssel karakterizáltuk. Egyes származékok daganatellenes hatást mutattak. A glikopeptid antibiotikumok ligandumfüggő oligomerizációs sajátosságait hazai és külföldi konferenciákon ismertettük, közlemények előkészületben. A négy alapvető glikopeptid antibiotikum heptapeptid aglikonjainak teljes ^1H , ^{13}C , ^{15}N NMR jelhozarárendelését követően biológiailag hatásos négyszögsav származékaik szerkezetét is igazoltuk.