

Lokális kölcsönhatások által modulált belső  
dinamika mint biológiai szabályozó  
mechanizmus vizsgálata globuláris fehérjékben



## Tézisfüzet

Kovács Bertalan  
2019

Pázmány Péter Katolikus Egyetem  
Roska Tamás Műszaki és Természettudományi Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Gáspári Zoltán

# 1 Bevezetés

## 1.1 A PSD-95 fehérje N-terminális PDZ1-2 tandemje

A PSD-95 fehérje igen sokrétű biológiai funkciót lát el: szerepet játszik a posztzinaptikus denzitásban található membránreceptorok klaszterezésében, a jelátviteli folyamatokban adaptorfehérjeként viselkedik, valamint szabályozza a hosszútávú potenciáció és depresszió kiváltásához szükséges küszöbpotenciált (Kim & Sheng, 2004; Lee & Zheng, 2010; Sheng & Sala, 2001). Az N-terminális két PDZ doménje egy független szerkezeti és dinamikai alegységet alkot, amit PDZ tandemnek hívunk.

A PSD-95 kötőpartnereinek sokfélesége zavarba ejtő. Nem világos, hogy milyen módon diszkriminál a lehetséges ligandumok között és hogy hogyan szabályozódik a PDZ1-2 tandem szupramoduláris reorientációja, amely lehetővé teszi, hogy a posztzinaptikus denzitás különböző rétegeiben lokalizálódó partnerekkel alakítson ki kölcsönhatást.

Mindemellett egyre részletesebb képünk alakult ki a PDZ domén ligandumspecificitásáról. Világossá vált, hogy a kanonikus, hagyományosan három osztályba sorolható kötési mód nem magyarázza kellő részletességgel sok PDZ domén finomhangolt affinitását a többféle lehetséges ligandum felé. A GLGF-kötőmotívumon és a C-terminális hidrofób aminosavat (legtöbbször valint) stabilizáló hidrofób zseben kívül egyre nagyobb jelentőséget tulajdonítanak a  $\beta$ 2- $\beta$ 3 huroknak, amely a ligandum felsőbb aminosavjaival alakít ki kölcsönhatást (Mostarda et al., 2012). Erről a régióról az is bebizonyosodott, hogy mind a gyors, mind a lassú időskálán lecsökken a belső dinamikája a ligandumkötés hatására (Fuentes et al., 2004).

Általánosságban igaz, hogy a PDZ tandem funkciója eltér az azt alkotó domének funkciójának egyszerű összegétől, de a PSD-95 PDZ1-2 tandemje esetén a két domén kölcsönhatásának mértéke, amely a köztük lévő szinergiára utalna, alig detektálható. NMR-es kísérletekkel megállapították, hogy a komplexált PDZ1-2 tandem sokkal nagyobb interdomén dinamikát mutat, mint a szabad forma (Wang et al., 2009). Ezenkívül több tanulmány igyekezett meghatározni a PDZ1-2 tandem szupramoduláris szerkezetét, ám ezek egymásnak részben ellentmondó következtetésekre jutottak mind a két domén relatív orientációját, mind pedig a kötőpartnereknek a fehérjéhez viszonyított

lehetséges elhelyezkedését tekintve. Mindezek alapján nyitott kérdés marad, hogy melyek a szupramoduláris szerkezetet stabilizáló, meghatározó interdomén kölcsönhatások, és ezek milyen összefüggésben vannak a kötőpartner jelenlétével.

## 1.2 A parvulin-típusú peptidil-prolil cisz-transz izomerázok

A peptidil-prolil cisz-transz izomerázok (PPIázok) vagy rotamázok a peptidláncban egy prolin előtti peptidkötés cisz-transz izomerizációját katalizálják (Hanes, 2015). A PPIáz enzimek minden egyes sejtalkotóban jelen vannak és igen sokféle biológiai folyamatban vesznek részt: például a fehérjefeltekeredésben, a sejtciklus szabályozásában, az apoptózisban vagy a transzkripcióban. Számos betegség kezeléséhez terápiás célpontot jelenthetnek, ugyanis sok kórosan elváltozott sejtben túlexpresszálódnak, akár olyannyira, hogy a betegség markerének tekinthetők. Mindezek a biológiai funkciók a PPIáz enzimeket a sejtbiológia egyik központi szereplőjévé teszik (Göthel & Marahiel, 1999; Lu et al., 2007).

Bár egy viszonylag egyszerű kémiai átalakulást katalizálnak, az enzim működésének pontos mechanizmusa nem ismert. Általánosan elfogadott, hogy a katalízis során nem bomlik fel a peptidkötés, hanem a reakció egy csavart átmeneti állapoton keresztül játszódik le.

A ligandumkötő zsebet a parvulin-típusú rotamázokban a kis és nagy lebeny fogja közre. Számos jel arra utal, hogy a nagy lebenyben található két konzervált hisztidin, illetve az öt aminosav által – beleértve e két hisztidint, továbbá két szerint és egy ciszteint is – kialakított hidrogénkötés-hálózatnak fontos szerep jut a katalízisben. Kiderült azonban, hogy a kettős hisztidin-mutáns és a cisztein pontmutáns is katalitikusan aktív marad, valamint hogy a ligandumkötéskor a hisztidinek kémiai eltolódása csak minimálisan változik meg, tehát nem lépnek közvetlen kölcsönhatásba a ligandummal (Bailey et al., 2008; Terada et al., 2001). Ezek az eredmények azt sejtetik, hogy mind a konzervált hisztidineknek, mind pedig a hidrogénkötés-hálózatot kialakító aminosavaknak inkább szerkezeti és dinamika szerepük van, és nem vesznek részt közvetlenül a katalitikus mechanizmusban.

A Pin1-típusú parvulinok foszforilációfüggő mechanizmust követnek: a prolin előtti aminosav csak foszforilált treonin vagy szerin lehet. Ezek a parvulinok a katalitikus domén mellett tartalmazznak egy N-terminális WW

domént, amelynek szerepe szintén nem teljesen felderített. Mivel azok a pontmutánsok, amelyekben a mutáció megbontja a két domén közötti kölcsönhatást, inaktívak, arra következtettek, hogy a WW domén allosztérikus módon szabályozza a katalitikus domén dinamikáját (Olsson et al., 2016).

### 1.3 Dinamikus fehérjeszerkezeti sokaságok

Az elmúlt két évtizedben egyre inkább tért hódított, s végül általánosan elfogadottá vált a szerkezeti biológiában az a szemléletmód, amely szerint a fehérjék biológiai funkciójában meghatározó szerepet játszik azok dinamikus volta.

Az atomi felbontású szerkezetvizsgáló módszerek közül a mágneses magrezonancia (NMR) spektroszkópia a legszélesebb körben alkalmazott eljárás a fehérjemolekula különböző időskálán történő belső mozgásainak vizsgálatára. A gyors (ps-ns) mozgások közé tartozik az oldalláncok rotációja és a gerincdinamika. Ezek közvetett megfigyelésére a legelterjedtebb megoldás az amid  $^{15}\text{N}$ -relaxációs idők mérése. A relaxációs adatokból a Lipari-Szabó modellfüggetlen formalizmus segítségével meghatározható az általános rendparaméter ( $S^2$ ). Ez fejezi ki, hogy a relaxációs vektor mozgása mennyire korlátozott, vagy szemléletes képpel élve: mekkora az amid N–H kötésvektor által bejárt kúp szélessége.  $S^2 = 1$  esetén egyáltalán nincs belső mozgás, míg  $S^2 = 0$  esetén a kötésvektor egyforma valószínűséggel mutat a tér bármely irányába.

A fehérjemolekulákat merev, háromdimenziós szerkezettel jellemző modelleket szép lassan kiegészítették, sőt felváltották a dinamikus fehérjeszerkezeti sokaságok, melyek számot vetnek a belső mozgásaival. Külön-külön egyik szerkezettől sem várjuk el, hogy megfeleljen a kísérletes paramétereknek, hanem az egész sokaság kell, hogy tükrözze azokat. Ezt a legtöbb – bár nem mindegyik – paraméter esetén úgy alkalmazzuk, hogy a sokaságban lévő egyes szerkezetekre visszazámolt paraméterek átlagát igyekszünk megfeleltetni a kísérletes értékeknek, ezzel is tükrözve, hogy a mért értékek minden esetben sokaság- és időátlagra vonatkoznak. Ennek megfelelően a relaxációs időkből kinyert  $S^2$  rendparamétereken túl gyakorlatilag bármely mért NMR-es paramétert lehet sokaság-alapon értelmezni.

## 2 Alkalmazott módszerek

A kísérletes paraméterekkel jó egyezést mutató szerkezeti sokaságok létrehozására külső kényszerfeltételekkel megkötött molekuladinamikai (MD) szimulációt használtam. Ennek során a vizsgált molekulákat egy extra energiattal rákényszerítjük, hogy tükrözzék a megfigyelt paramétereket:

$$E_{tot} = E_{FF} + E_{restr}$$

ahol  $E_{FF}$  az erőtérből,  $E_{restr}$  pedig a kényszerfeltételekből származó büntető energia.

Az MD szimuláció során  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOE távolság- és  $\text{S}^2$ -kényszerfeltételeket alkalmaztam a MUMO (*minimal under-restraining, minimal over-restraining*) algoritmus alapján (Best & Vendruscolo, 2004; Richter et al., 2007). Ennek során a túlillesztés elkerülése érdekében a rendparamétereket a teljes sokaságra, az NOE-kat pedig párosával átlagoljuk. A kísérletes kémiai eltolódásokat a szimulációban nem, csak a szerkezeti sokaságok validációjához használtam.

A PDZ1-2 tandem szimulációjához felhasznált kényszerfeltételek csak az intradomén gyors mozgásokra jelentettek megkötést. Ezért az  $\text{S}^2$ -megkötéseket lokális illesztési algoritmussal alkalmaztam az egyes doménekre, ami nem befolyásolta a két domén független reorientációját. A felhasznált kísérletes  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOE-kényszerfeltételek sem tartalmaztak interdomén távolságot.

A parvulin-típusú cisz-transz izomerázok vizsgálatához három parvulin (SaPrsA, a TbPin1 és a CsPinA) fehérjéről a MUMO algoritmussal,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOE távolság- és  $\text{S}^2$ -kényszerfeltételek alkalmazásával korábban elkészített szerkezeti sokaságok elemzését végeztem el.

A leghangsúlyosabb belső mozgások azonosítását főkomponens-elemzéssel (PCA) végeztem. A parvulinok esetén ehhez a három vizsgált fehérje 89 aminosavból álló konszenzus szekvenciáját, valamint a későbbi elemzés során a kísérletes szerkezetek illesztésekor adódó 53 aminosavból álló konszenzus szekvenciát használtam. A PDZ1-2 tandemben elvégeztem egy-egy főkomponens-elemzést az doménhatárokon belül eső régiókra, valamint a teljes sokaságnak egy közös PDZ1 templátra való illesztését követően a PDZ2 doménre. Ez utóbbi elemzés a két domén relatív mozgásáról ad információt.

### 3 Új tudományos eredmények

#### 3.1 Első téziscsoport: a PDZ1-2 tandem vizsgálata

*1.1. tézis: Előállítottam a PSD-95 PDZ1-2 tandemjének kísérletileg mért dinamikai viselkedését tükröző szerkezeti sokaságot.*

A PDZ1-2 tandemről három sokaságot állítottam elő: egyet a szabad és kettőt a komplex formáról (1. táblázat). Mindhárom sokaság előállításakor NOE kényszerfeltételeket használtam az intradomén <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H távolságok megkötésére, és az egyik komplex sokaságnál lokális illesztéssel az intradomén mozgásokra vonatkozó S<sup>2</sup>-megkötéseket is alkalmaztam. Az előállított sokaságokat összevettem az eredeti, PDB sokasággal.

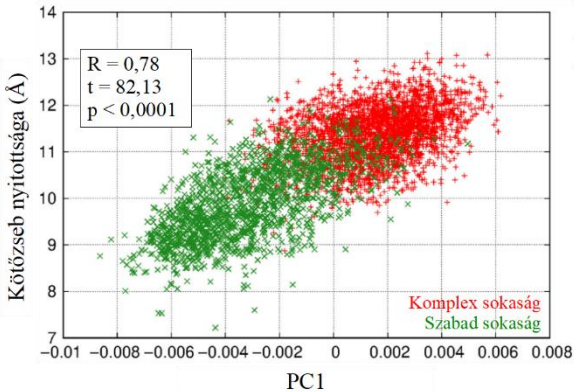
*1. táblázat: az előállított PDZ1-2 tandem sokaságokból visszszámolt paraméterek korrelációja a kísérletes értékekkel, valamint a sokaságokban található PDZ domének intradomén gerinc RMSD-je.*

Sokaság	Méret	Kémiai eltolódás korrel.		S <sup>2</sup> korrel.	RMSD	
		N	H		PDZ1	PDZ2
<i>Eredeti (PDB)</i>	20	0,83	0,41	0,10	0,57 ± 0,01	0,62 ± 0,04
<i>Szabad</i>	1448	0,85	0,55	0,22	0,73 ± 0,01	0,66 ± 0,01
<i>Komplex</i>	1448	0,85	0,55	0,16	0,75 ± 0,02	0,58 ± 0,01
<i>Megkötött (S<sup>2</sup>)</i>	1448	0,85	0,55	0,88	0,67 ± 0,01	0,63 ± 0,02

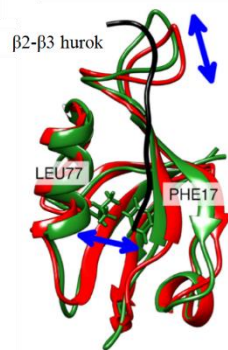
Az S<sup>2</sup>-megkötések alkalmazásával a kísérletes paramétereknek való megfelelés ugrásszerű növekedését sikerült elérni anélkül, hogy eközben az amid N és H kémiai eltolódásoknak való megfelelés romlott volna az eredeti sokasághoz képest. A sokaságokra meghatározott intradomén globális RMSD értékek megfelelnek egy globuláris, megfelelően feltekeredett fehérjéjű elvárhatóknak.

1.2. tézis: Főkomponens elemzés segítségével megállapítottam, hogy a ligandumkötés hatására megváltozik a PDZ domén kötőzsebének kinyíló-becsukódó mozgása.

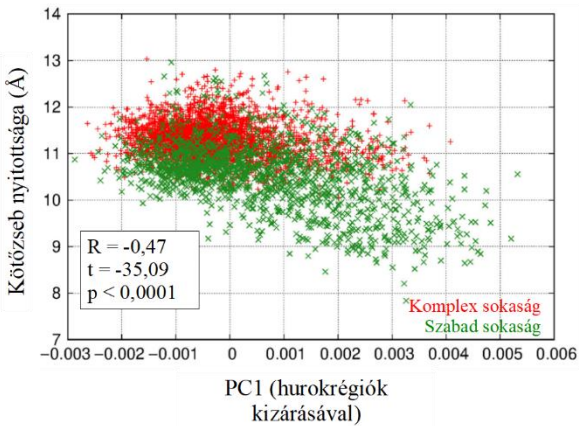
**A PDZ1**



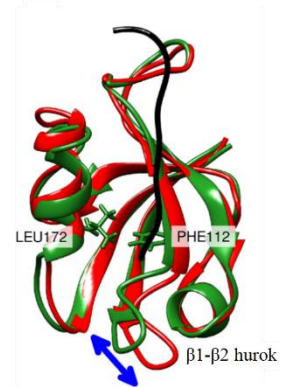
**B**



**C PDZ2**



**D**



1. ábra: intradomén mozgások vizsgálata a PDZ1-2 tandemben. A kötőzseb nyitottságát a Leu77 és Phe17, valamint a Leu172 és Phe112 aminosavak Ca atomjai közötti távolsággal mértem. **A,C**: a szabad és a komplex sokaság eloszlása az első főkomponens és a kötőzseb nyitottság mentén, feltüntetve a korrelációt. **B,D**: az első főkomponens által reprezentált mozgás két extrém konformációja, a legjobban elmozduló régiók jelölésével.

Az intradomén mozgások főkomponens-elemzése során bebizonyosodott, hogy a ligandummal kialakított kölcsönhatás befolyásolja a sokaság eloszlását az első főkomponens mentén, amely mindkét doménben a hidrofób kötőzseb kinyílását-becsukódását és a  $\beta 1$ - $\beta 2$  hurok mozgását, a PDZ1 doménben pedig ezenkívül a  $\beta 2$ - $\beta 3$  hurok mozgását reprezentálja (1. ábra). Ez a mozgás egyformán jelen van a szabad és a komplexált PDZ doménekben, de a komplex sokaság szignifikánsan kisebb régiót jár be e mozgás mentén, mint a szabad sokaság. Az effektus valamivel hangsúlyosabban van jelen a PDZ1, mint a PDZ2 doménben. Ez az eredmény összhangban van azzal a megállapítással, amely szerint ligandumkötéskor a  $\beta 2$ - $\beta 3$  hurok megmerevedése figyelhető meg mind a gyors, mind a lassú időskálán (Fuentes et al., 2004).

*1.3. tézis: Az általam előállított PDZ1-2 sokaságok lefedik a teljes szupramoduláris konformációs teret, amelyben a komplexált forma korlátozott dinamikára képes a szabad formához képest. A lehetséges szoros illeszkedésű szupramoduláris orientációkat 7 klaszterre osztottam, amelyek egyedi interdomén interfészt alakítanak ki.*

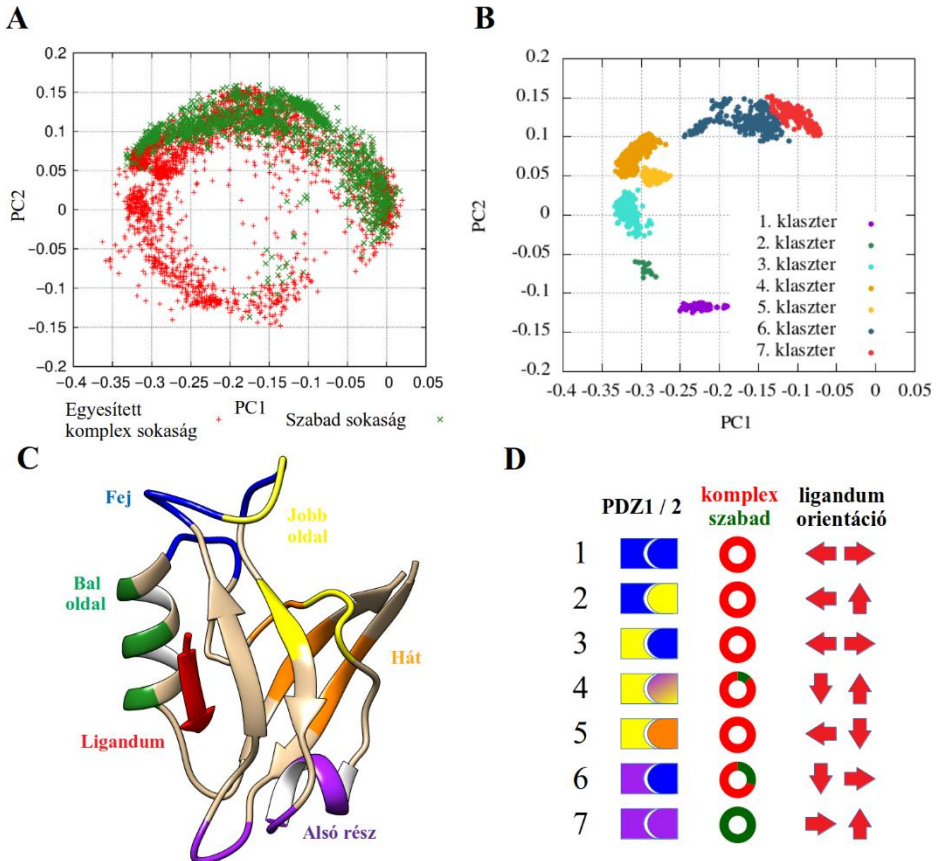
A közös PDZ1 templátra illesztett sokaság PDZ2 doménjén elvégzett főkomponens-elemzés információt ad a két domén relatív mozgásairól. Az első két főkomponens átszámítható polárkoordinátákká, amelyek szögkomponense az interdomén torziós szögnek, sugárkomponense a két domén távolságának feleltethető meg.

A ligandum jelenléte jelentősen megnöveli a sokaság által bejárt interdomén konformációs teret, ezzel gyakorlatilag lehetőséget adva egy nagyobb amplitúdójú szupramoduláris átrendeződésre (2.A ábra). Ezzel lényegében sikerült egy atomi szintű modellt alkotnom az elemzés kiindulópontjául szolgáló kísérletes megfigyelés magyarázatára, amely szerint a komplexált PDZ1-2 tandem jelentősen megnövekedett interdomén dinamikát mutat a szabad formához képest.

Azok a szupramoduláris konformerek, amelyek között jelentős interdomén kölcsönhatás alakul ki (szoros illeszkedésű szerkezetek), 7 klaszterre oszthatók, amelyek egymástól jól elkülönülő régiót fednek le az első két interdomén főkomponens mentén (2.B ábra). Mivel ezekben más a két



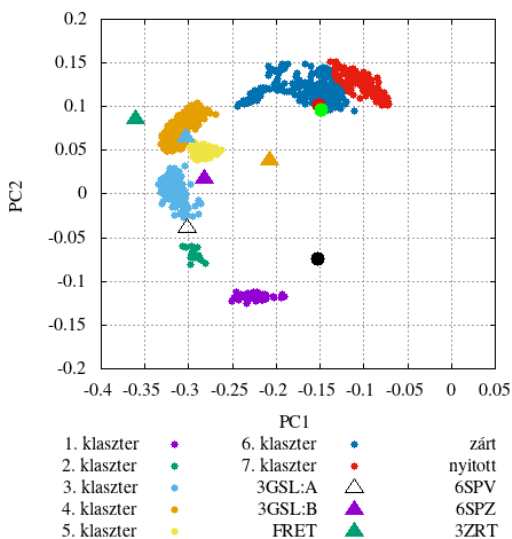
domén egymáshoz viszonyított orientációja, ezért más az interdomén kölcsönhatási interfész is. A PDZ1 doménnek 3, a PDZ2 doménnek 4 régiója vesz részt a kölcsönhatás kialakításában a különböző klaszterekben (2.C,D ábra). A matematikailag lehetséges interfész-kombinációknak csak egy része valósulhat meg a – részben a linker rövidegéből adódó – szterikus és geometriai megkötések miatt.



2. ábra: interdomén mozgások vizsgálata a PDZ1-2 tandemben. **A:** a PDZ1 domének közös templátra való illesztését követő, PDZ2 doméneken elvégzett főkomponens-elemzés ábrázolása az első két főkomponens mentén. **B:** a szoros szerkezetekből előállított klaszterek. **C:** a PDZ domén felületének felosztása öt különböző régióra. **D:** az interdomén interfész kialakulása az egyes klaszterekben, valamint a ligandumok egymáshoz viszonyított orientációja.

*1.4. tézis: Az előállított sokaságot összevettem a nyilvános adatbázisban elérhető kísérletesen meghatározott PDZ1-2 szerkezetekkel. A lefedett konformációs tér magában foglalja a kísérletes szerkezeteket. Az szoros illeszkedésű konformerekből készült klaszterek valószínűsítik a még nem megfigyelt, de geometriai szempontból lehetséges szupramoduláris szerkezetek létezését.*

Olyan sokaságot hoztam létre, amely magába foglalja a korábbi, egymásnak látszólag ellentmondó szerkezetek szinte mindegyikét: a FRET-szerkezet kivételével (amelyen egy későbbi tanulmányban további finomításokat végeztek) mindegyik kísérletes szerkezetet tartalmazza a sokaságaink által bejárt interdomén konformációs tér, valamint a szoros illeszkedésű kísérletes szerkezetek mindegyike hozzárendelhető az általunk meghatározott 7 klaszter valamelyikéhez (3. ábra).



3. ábra: az elérhető kísérletes PDZ1-2 tandem szerkezetek és az általunk előállított klaszterek közös interdomén PCA-ábrán ábrázolva.

Különös figyelmet érdemel az egyik kísérletes PDZ1-2 kristályszerkezet, amely az itt bemutatott elemzés publikálása után született meg (PDB: 6SPV a szabad, 6SPZ a komplex formára). Bár az általa felvett szupramoduláris

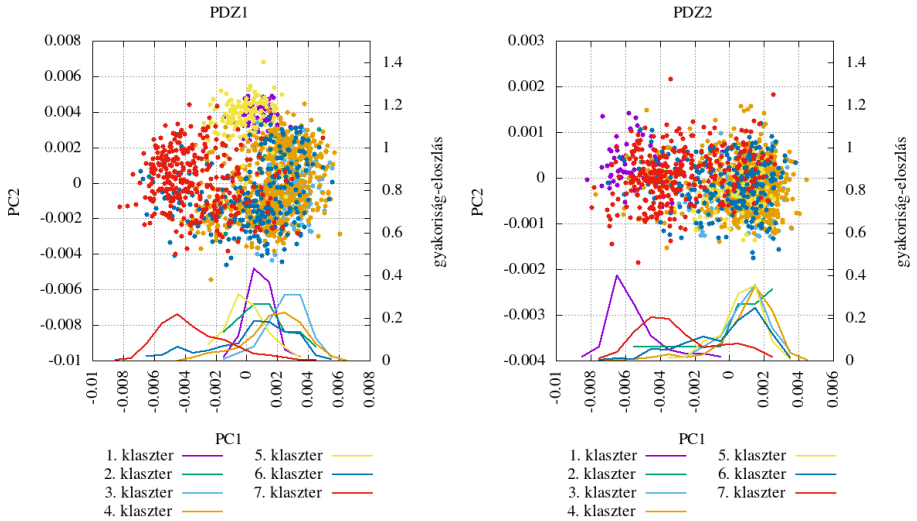
konformáció nem egyezett meg semelyik korábban megfigyelt szerkezettel, az általam előállított sokaságnak mégis megfelelt: mind az interdomén orientáció, mind az interdomén interfész alapján a 6. klaszter tagjai lett. Hasonló megfontolással valószínűsíthető, hogy a PDZ1-2 tandemnek más elérhető szupramoduláris szerkezetei is vannak, amelyeket a sokaságban tapasztalt kisebb súlyuk miatt nehéz kísérletesen is megfigyelni (pl. 1. és 7. klaszter), ám a dinamikai egyensúlyban betöltött szerepüknel fogva biológiailag is releváns formák lehetnek.

*1.5. tézis: A sokaság elemzéséből levont következtetések alapján javaslatot tettem a PDZ1-2 tandem kötőpartnereinek a szupramoduláris dinamikára gyakorolt szabályozó mechanizmusára. A kötőpartnereknek a  $\beta$ 2- $\beta$ 3 hurokrégióval kialakuló lokális kölcsönhatások által modulálják az interdomén orientációt, amely régió a lehetséges szupramoduláris konformerek többségében szerepet játszik az interdomén interfész kialakításában.*

A sokaságok elemzésekor azonosítottam a két PDZ domén azon régióit, amelyek a leggyakrabban vesznek részt az interdomén interfész kialakításában. Szembetűnő, hogy ezek jelentős részben egybeesnek a fehérje azon régióival, amelyek belső dinamikájára leginkább hatással van a ligandummal létrejövő kölcsönhatás: a  $\beta$ 1- $\beta$ 2 és  $\beta$ 2- $\beta$ 3 hurok a PDZ1, valamint a  $\beta$ 1- $\beta$ 2 hurok a PDZ2 doménben. Megvizsgálva a szoros illeszkedésű klasztereket, azt tapasztaltam, hogy egy kivétellel mindegyik klaszterben e régiók valamelyike részt vesz az interdomén interfész kialakításában.

Az interdomén és intradomén főkomponensek egymástól nem függetlenek. A szoros illeszkedésű klaszterek, amelyek implicit módon magukban hordozzák az interdomén főkomponensek szerinti függést, nem egyenletesen oszlanak el az első intradomén főkomponens mentén (4. ábra).

Az egyes klaszterekben más-más hidrogénkötés-mintázat jön létre a ligandum felső (-3 – -7) aminosavjai és a PDZ domén  $\beta$ 2- $\beta$ 3 hurokrégiója között. Mivel pedig a klaszterek különböző interdomén-orientációkat képviselnek, ezzel a megállapítással összefüggést teremtettem a szupramoduláris dinamika és a ligandummal kialakított kölcsönhatás között.



4. ábra: az intra- és interdomén mozgások közötti összefüggés vizsgálata a PDZ1-2 tandemben: az általam előállított klaszterek adatpontjai a PDZ1- és PDZ2-intradomén mozgásaira meghatározott főkomponensek szerint, valamint az egyes klaszterek eloszlása az első főkomponens mentén.

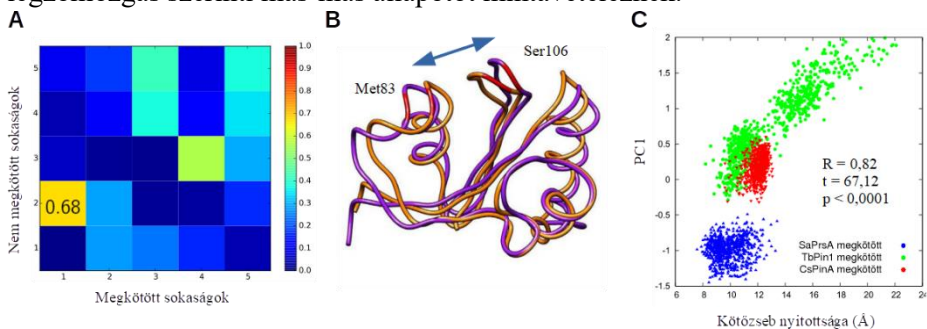
## 3.2 Második téziscsoport: a parvulin-típusú rotamázok vizsgálata

*2.1. tézis: Főkomponens elemzés segítségével megállapítottam, hogy a parvulin-típusú rotamázokra jellemző a kötőszeg kinyíló-becsukódó mozgása. E mozgás mentén a három vizsgált fehérje más-más állapotot mintavételez.*

A parvulin-sokaságok elemzésekor adódó első főkomponens által reprezentált leghangsúlyosabb belső mozgás megfeleltethető a kötőszeg kinyíló-becsukódó mozgásának, amelyet légző mozgásnak hívtam. A három fehérjéről előállított sokaság más-más régiót fed le az első főkomponens mentén (5. ábra).

A légző mozgás egyaránt jelen van a nem megkötött sokaságokban is, ám az ezeken végzett főkomponens-elemzés alapján ez csak a második leghangsúlyosabb belső mozgás (5.A ábra).

A légző mozgás csak a három megkötött sokaság uniójából adódó sokaságban volt a leghangsúlyosabb. Ez arra utal, hogy valóban jelen van a parvulinokban, ám a gyors dinamikát tükröző sokaságok ezt a mozgást nem tudják önmagukban visszaadni, hanem a lassabb időskálán várható légzőmozgás szerinti más-más állapotot mintavételeznek.

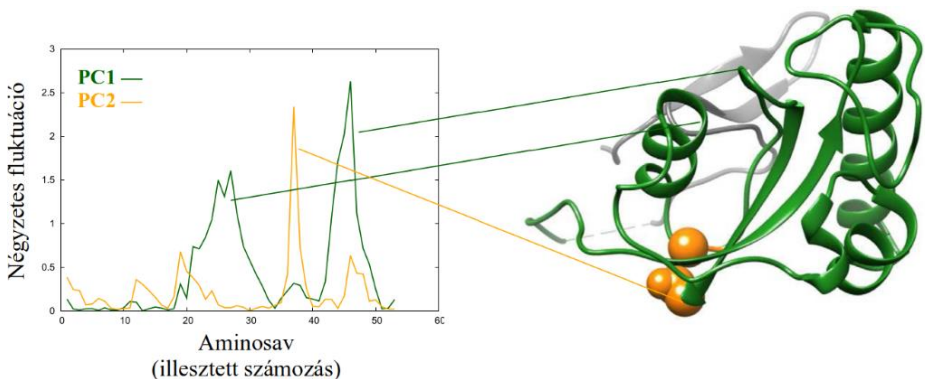


5. ábra: a megkötött parvulin-sokaságokra meghatározott első főkomponens és a kötőszeg nyitottsága közötti összefüggés. **A:** a három sokaság eloszlása a kötőszeg nyitottsága és az első főkomponens szerint. **B:** az első főkomponens által reprezentált leghangsúlyosabb mozgás. A két szerkezet a két extrém konformációnak felel meg. **C:** a megkötött és nem megkötött sokaságok első öt főkomponense közötti átfedés.

2.2. tézis: Az előállított sokaságokat összevettem nyilvános adatbázisban elérhető kísérletes szerkezetekkel. A konszenzus szekvencián elvégzett főkomponens elemzés segítségével megállapítottam, hogy a parvulin-típusú rotamázokra szintén jellemző a kis és nagy lebenyt összekötő könyökrégió elmozdulása, amely egyúttal a WW doménnal rendelkező parvulinokban a két domén közötti kölcsönhatásért felelős.

A sokaságainkat többszörös szerkezet-illesztéssel összevettem további száz, kísérletes parvulin-szerkezettel és az így létrejövő kombinált sokaságon főkomponens-elemzést végeztem. Ennek során az derült ki, hogy a második leghangsúlyosabb belső mozgás a légző mozgást lehetővé tévő könyökrégió (a nagy és kis lebeny csatlakozási pontjának) elmozdulását reprezentálja (6. ábra).

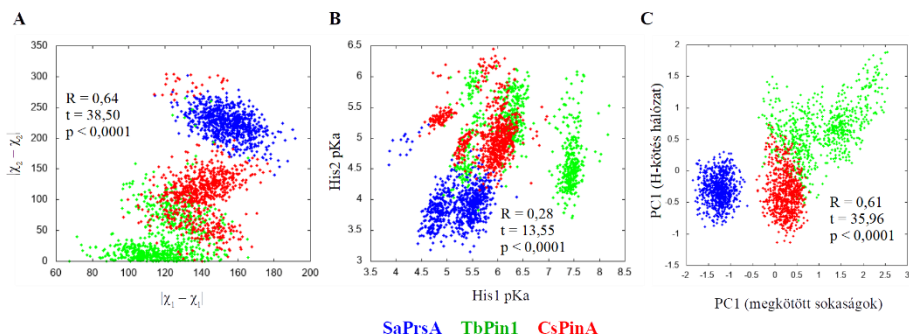
A három előállított sokaság az ilyen módon adódó második főkomponens mentén is viszonylag jól szeparálódik, tehát nemcsak a légzőmozgás, hanem a könyökrégió elmozdulása mentén is más-más állapotot mintavételeznek. Ebből az következik, hogy e két mozgás egymással összefüggésben van. A WW domént tartalmazó és nem tartalmazó parvulinok valamelyest szeparálódnak a könyökrégió mozgását reprezentáló főkomponens mentén, azzal összhangban, hogy épp ez a régió alakít ki közvetlen kölcsönhatást a szomszédos WW doménnal.



6. ábra: a vizsgált sokaságokra, valamint 100 kísérletes rotamáz doménre végzett főkomponens-elemzésből adódó első két főkomponens négyzetes fluktuációja a konszenzus aminosavsorszám függvényében. A jobb oldali ábrán a Pin1 fehérje azon régiói vannak jelölve, amelyek az első két főkomponens által reprezentált belső mozgásban a legnagyobb fluktuációt mutatják.

*2.3. tézis: Megállapítottam, hogy a hidrogénkötés-hálózat protonáltsági állapota befolyásolja nagy lebeny belső dinamikáját a parvulin-típusú rotamázokban.*

A két konzervált hisztidin, amely része a hidrogénkötés-hálózatnak, egymással valamelyest összefüggő módon reorientálódik, ahogy erre mind a prediktált pKa értékekből, mind pedig az oldallánc-torziósszögek változásából következtettem (7.A-B ábra). Ezenkívül észrevettem, hogy az öt, hidrogénkötés-hálózatot kialakító aminosavon elvégzett főkomponens-elemzés során adódó leghangsúlyosabb belső mozgás korrelál a légzőmozgással (7.C ábra). A korreláció önmagában nem jelent ok-okozati összefüggést, azonban az előállított sokaságok észrevehetően szeparálódnak mind e főkomponens mentén, mind pedig a hisztidinek oldallánc-orientációja szerint, amely megmagyarázható az eltérő protonáltsági állapotokkal. A SaPrsA fehérjében lévő hisztidinek egyszeresen protonáltak, ami a teljes hidrogénkötés-hálózat létrejöttét lehetővé teszi, a másik két fehérjében azonban a hisztidinek kétszeres protonációja a hálózatnak csak részleges létrejöttét engedi meg. Ezzel összhangban a három vizsgált fehérje közül a SaPrsA fehérjére meghatározott hisztidin oldalláncok és az első főkomponens mutatja a legkisebb variabilitást.



7. ábra: **A:** a két hisztidinhez tartozó  $\chi_1$  és  $\chi_2$  torziós szögek közötti különbségek abszolút értékei, egymás függvényében ábrázolva. **B:** a két hisztidin pKa értéke, egymás függvényében ábrázolva. **C:** a hidrogénkötés-hálózatra meghatározott első főkomponens és a három megtörtött sokaságra meghatározott első főkomponens egymás függvényében ábrázolva.

*2.4. tézis: A szerkezeti sokaságok elemzéséből levont következtetések alapján egy általános modellt javasoltam a parvulin-típusú rotamázok szabályozására. A kötőseb kinyíló-becsukódó mozgásának dinamikáját és amplitúdóját egyrészt a hidrogénkötés-hálózat protonáltsági állapota, másrészt a WW domén (amennyiben jelen van) a könyökrégió mozgásán keresztül modulálja. A különböző parvulinok közötti eltérő aktivitás a kötőseb eltérően modulált kinyíló-becsukódó dinamikájával magyarázható.*

A bemutatott eredmények alapján egy általános modellt javaslok a parvulin-típusú típusú rotamázok működésére, amelyben a légző mozgás amplitúdója és dinamikája határozza meg a ligandum-szelektivitást és szabályozza a katalízist. A légzőmozgást két további faktor modulálja: nevezetesen a WW doménnel való kölcsönhatás a könyökrégió mozgásának szabályozásán keresztül, és a nagy lebenyben található hidrogénkötés-hálózat protonáltsági állapota.

Ez a modell összhangban van számos korábbi eredménnyel. A Pin1 molekuladinamikai szimulációi is azt mutatták, hogy a kötősebet körülvevő hurkok mozgása a katalitikus és WW domén közötti kölcsönhatástól, valamint a mind a katalitikus, mind a WW doménnek a ligandummal kialakított kölcsönhatásától is függ (Guo et al., 2015; Olsson et al., 2016). A hidrogénkötés-hálózatról tett megállapításaink megfeleltethetők a Barman és Hamelberg által javasolt, a két konzervált hisztidin között létrejövő dinamikus hidrogénkötésnek, amely a nagy lebeny dinamikáját modulálja (Barman & Hamelberg, 2014). A miénkhez hasonló eredményekre jutottak az egyik FKBP-típusú rotamáz vizsgálatakor: a kötőseb dinamikája itt is meghatározó szerepet tölt be a ligandumkötésben és a katalízisben (Quistgaard et al., 2016). Mindezek alapján valószínűsíthető, hogy ez egy általános mechanizmus a fehérjék működésének finomhangolására.



## 4 Publikációs jegyzék

### 4.1 Az értekezés alapjául szolgáló folyóiratcikkek

Kovács Bertalan, Zajácz-Epresi Nóra, Gáspári Zoltán (2020): “Ligand-dependent Intra- and Interdomain Motions in the PDZ12 Tandem Regulate Binding Interfaces in Postsynaptic Density Protein-95.” *FEBS Letters* 594(5):887–902.  
<https://doi.org/10.1002/1873-3468.13626>

Czajlik András\*, Kovács Bertalan\*, Perttu Permi, Gáspári Zoltán (2017): “Fine-Tuning the Extent and Dynamics of Binding Cleft Opening as a Potential General Regulatory Mechanism in Parvulin-Type Peptidyl Prolyl Isomerases.” *Scientific Reports* 7. 44504.  
<https://doi.org/10.1038/srep44504>  
\* *megosztott első szerzők*

### 4.2 További közlemények

Dudola Dániel, Kovács Bertalan, Gáspári Zoltán (2017): “CoNSEnsX+ Webserver for the Analysis of Protein Structural Ensembles Reflecting Experimentally Determined Internal Dynamics.” *Journal of Chemical Information and Modeling*, 57(8), 1728–1734.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jcim.7b00066>

Dudola Dániel, Kovács Bertalan, Gáspári Zoltán (2020): “Evaluation and Selection of Dynamic Protein Structural Ensembles with CoNSEnsX+.” In: *Structural Bioinformatics*, (Gáspári Zoltán szerk.) New York (NY), Amerikai Egyesült Államok : Springer US, (2020) pp. 241-254.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0270-6\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0270-6_16) ISBN: 978-1-0716-0270-6

Továbbá 8 hazai és 8 nemzetközi konferenciamegjelenés.

## 5 Irodalomjegyzék

- Bailey, M. L., Shilton, B. H., Brandl, C. J., & Litchfield, D. W. (2008). The dual histidine motif in the active site of Pin1 has a structural rather than catalytic role. *Biochemistry*, *47*(44), 11481–11489. <https://doi.org/10.1021/bi800964q>
- Barman, A., & Hamelberg, D. (2014). Cysteine-mediated dynamic hydrogen-bonding network in the active site of Pin1. *Biochemistry*, *53*(23), 3839–3850. <https://doi.org/10.1021/bi5000977>
- Best, R. B., & Vendruscolo, M. (2004). Determination of protein structures consistent with NMR order parameters. *Journal of the American Chemical Society*, *126*(26), 8090–8091. <https://doi.org/10.1021/ja0396955>
- Fuentes, E. J., Der, C. J., & Lee, A. L. (2004). Ligand-dependent Dynamics and Intramolecular Signaling in a PDZ Domain. *Journal of Molecular Biology*, *335*(4), 1105–1115. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2003.11.010>
- Göthel, S. F., & Marahiel, M. A. (1999). Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 55, Issue 3, pp. 423–436). <https://doi.org/10.1007/s000180050299>
- Guo, J., Pang, X., & Zhou, H.-X. X. (2015). Two pathways mediate interdomain allosteric regulation in Pin1. *Structure*, *23*(1), 237–247. <https://doi.org/10.1016/j.str.2014.11.009>
- Hanes, S. D. (2015). Prolyl isomerases in gene transcription. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1850*(10), 2017–2034. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.10.028>
- Kim, E., & Sheng, M. (2004). PDZ domain proteins of synapses. *Nature Reviews Neuroscience*, *5*(10), 771–781. <https://doi.org/10.1038/nrn1517>
- Lee, H.-J., & Zheng, J. J. (2010). PDZ domains and their binding partners: structure, specificity, and modification. *Cell Communication and Signaling : CCS*, *8*, 8. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-8-8>
- Lu, K. P., Finn, G., Lee, T. H., & Nicholson, L. K. (2007). Prolyl cis-trans isomerization as a molecular timer. *Nature Chemical Biology*, *3*(10), 619–629. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2007.35>
- Mostarda, S., Gfeller, D., & Rao, F. (2012). Beyond the binding site: The role of the  $\beta 2$  -  $\beta 3$  loop and extra-domain structures in PDZ domains. *PLoS Computational Biology*, *8*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002429>
- Olsson, S., Strotz, D., Vögeli, B., Riek, R., & Cavalli, A. (2016). The

- Dynamic Basis for Signal Propagation in Human Pin1-WW. *Structure (London, England : 1993)*, 24(9), 1464–1475.  
<https://doi.org/10.1016/j.str.2016.06.013>
- Quistgaard, E. M., Weininger, U., Ural-Blimke, Y., Modig, K., Nordlund, P., Akke, M., & Löw, C. (2016). Molecular insights into substrate recognition and catalytic mechanism of the chaperone and FKBP peptidyl-prolyl isomerase SlyD. *BMC Biology*, 14(1), 82.  
<https://doi.org/10.1186/s12915-016-0300-3>
- Richter, B., Gsponer, J., Várnai, P., Salvatella, X., & Vendruscolo, M. (2007). The MUMO (minimal under-restraining minimal over-restraining) method for the determination of native state ensembles of proteins. *Journal of Biomolecular NMR*, 37(2), 117–135.  
<https://doi.org/10.1007/s10858-006-9117-7>
- Sheng, M., & Sala, C. (2001). PDZ Domains and the Organization of Supramolecular Complexes. *Annual Review of Neuroscience*, 24(1), 1–29. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.1>
- Terada, T., Shirouzu, M., Fukumori, Y., Fujimori, F., Ito, Y., Kigawa, T., Yokoyama, S., & Uchida, T. (2001). Solution structure of the human parvulin-like peptidyl prolyl cis/trans isomerase, hPar14. *Journal of Molecular Biology*, 305(4), 917–926.  
<https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4293>
- Wang, W., Weng, J., Zhang, X., Liu, M., & Zhang, M. (2009). Creating conformational entropy by increasing interdomain mobility in ligand binding regulation: a revisit to N-terminal tandem PDZ domains of PSD-95. *Journal of the American Chemical Society*, 131(2), 787–796.  
<https://doi.org/10.1021/ja8076022>