



Pázmány Péter Katolikus Egyetem

Roska Tamás Műszaki és Természettudományi Doktori Iskola

**Globuláris és rendezetlen posztzinaptikus fehérjék szerkezetének és
kölsönhatásainak vizsgálata**

PhD Disszertáció

Farkas Fanni

Témavezető: Prof. Dr. Gáspári Zoltán, DSc

2026

Tartalomjegyzék

| | |
|---|----|
| 1. Irodalmi áttekintés | 1 |
| 1.1 A neurális szinapszis..... | 1 |
| 1.1.1 Idegsejtek szinapszison keresztül történő kommunikációja | 1 |
| 1.2 Posztzinaptikus denzitás és az azt felépítő fehérjék | 2 |
| 1.2.1 A Homer fehérjecsald | 7 |
| 1.2.1.1 A Homer1 patofiziológiája | 10 |
| 1.2.1.2 EVH1 domén család és mutációi..... | 11 |
| 1.2.2 A Shank fehérjecsald | 13 |
| 1.2.3 A GKAP fehérjecsald | 15 |
| 2. Célkitűzések..... | 17 |
| 3. Módszerek | 18 |
| 3.1 A Homer1 EVH1 domén és variánsai biotechnológiai előállítása | 19 |
| 3.1.1 Expressziós vektor és gazdaszervezet | 19 |
| 3.1.2 In vitro PCR mutagenézis..... | 20 |
| 3.2 A Homer1 EVH1 variánsok expressziója | 22 |
| 3.3 A Homer1 EVH1 variánsok tisztítása..... | 24 |
| 3.3.1 A sejtek feltárása ultrahangos homogenizálással | 24 |
| 3.3.2 Affinitás kromatográfia | 24 |
| 3.3.3 Ioncsere kromatográfia | 26 |
| 3.3.4 Méretkizárásos kromatográfia | 26 |
| 3.4 A Homer1 EVH1 variánsok szerkezetének, dinamikájának és hőstabilitásának vizsgálata | 27 |
| 3.4.1 Cirkuláris dikroizmus spektroszkópia (CD) | 27 |
| 3.4.2 Tömegspektrometria a fehérje molekulatömegének meghatározásához | 28 |
| 3.4.3 Nukleáris mágneses rezonancia (NMR) spektroszkópia..... | 29 |
| 3.4.4 Kiszögű röntgenszórás (SAXS) vizsgálatok | 34 |
| 3.4.5 Thermal shift olvadáspont vizsgálat | 35 |
| 3.4.6 Az EVH1 domén és variánsai számítógépes elemzése | 36 |
| 3.5 A Homer1 EVH1 variánsok partnerkötési vizsgálatai..... | 36 |
| 3.5.1 Biolayer interferometria interakció vizsgálat | 37 |
| 3.5.2 Partnerkötési vizsgálatok NMR spektroszkópiával..... | 38 |
| 3.6 A GBR1-3 konstrukció tisztítási protokolljának optimalizálása..... | 39 |
| 4. Eredmények..... | 43 |
| 4.1 ¹⁵ N- ¹³ C jelölt, NMR mérésre alkalmas EVH1 variánsok előállítása..... | 43 |
| 4.2 Tömegspektrometriás mérések | 45 |
| 4.3 A vad típusú Homer1 EVH1 szerkezetének elemzése..... | 45 |
| 4.3 A vad típusú EVH1 domén belső dinamikája | 51 |
| 4.5 Az M65I és S97L mutánsok HSQC spektrumának összevetése a vad típussal | 53 |
| 4.6 Kiszögű röntgenszórás (SAXS) eredmények | 58 |
| 4.7 Cirkuláris dikroizmus vizsgálat | 58 |
| 4.8 Hőstabilitás vizsgálat..... | 61 |

| | |
|---|----|
| 4.9 Biolayer Interferometria vizsgálat | 63 |
| 4.10 Interakcióvizsgálat NMR titrálással..... | 66 |
| 4. 11 A mutánsok belső dinamikája, összevetés a vad típussal | 71 |
| A 15N-relaxációs elemzés különböző, lassú időskálájú mozgások jelenlétét sugallja a variánsokban | 71 |
| A molekuláris dinamika elemzése alátámasztja a kísérleti megfigyeléseket | 72 |
| 4.12 Gaussian network model elemzés | 72 |
| 4.13 A GKAP fehérje rendezetlen GBR1-3 régiója kicsapódásra hajlamos | 74 |
| 5. Diskusszió..... | 76 |
| 6. Tézispontok | 79 |
| 1 Sikeresen előállítottam posztzinaptikus fehérjék szerkezeti és funkcionális vizsgálatára alkalmas konstrukcióit. | 79 |
| 1/a Az előállított Homer1 EVH1 domén 15N-13C jelölt formában is stabil, kicsapódásmentes marad, nagy töménységben is..... | 79 |
| 1/b Az előállított GKAP fehérje rendezetlen GBR1-3 régiója kicsapódásra hajlamos..... | 79 |
| 2 A Homer1 EVH1 domén oldatfázisú szerkezete funkcionálisan fontos aspektusokra világít rá..... | 79 |
| 3 A vizsgált mutációk nem változtatják meg érdemben az EVH1 domén globális és lokális szerkezetét..... | 80 |
| 4 Az egyes variánsok ligandumkötése minimálisan, hőstabilitása nagyobb mértékben különbözik..... | 80 |
| 5 Az EVH1 vizsgált mutációi a domén belső dinamikájának átrendeződését okozzák | 81 |
| 7. Köszönetnyilvánítás..... | 81 |
| 8. Publikációk..... | 82 |
| 8.1 Tézis alapjául szolgáló | 82 |
| 8.2 Tézissel kapcsolatos posztterek és szóbeli előadások..... | 83 |
| 8.3 A szerző további publikációi..... | 84 |
| 9. Irodalomjegyzék | 84 |

Rövidítésjegyzék

| Rövidítés | Angol megfelelő | Magyar megfelelő |
|--------------|--|---|
| ASD | Autism Spectrum Disorder | autizmus spektrum zavar |
| BLI | Bio-Layer Interferometry | biolayer interferometria |
| BSA | Bovine Serum Albumin | Tehén szérum albumin |
| DH5 α | Escherichia coli strain DH5 alpha | DH5 α törzs (E. coli tenyésztési törzs) |
| CRH1 | Conserved region of Homer1 | homer1 konzervált régiója |
| DLC | Dynein Light Chain | dinein könnyű lánc |
| DLGAP | Discs Large-Associated Protein | DLG-asszociált fehérje |
| DSS | 2,2-Dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate | 2,2-Dimetil-2-silapentán-5-sulfonát |
| DTT | Dithiothreitol | ditiotreitól |
| EVH1 | Enabled / Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein (Ena/VASP) Homology 1 domain | enabled/vazodilatátor-stimulált foszfofehérje (Ena/VASP) homology 1 |
| FPLC | Fast Protein Liquid Chromatography | gyors fehérje-folyadékromatográfia |
| GBR | GK binding region | GK kötő régió |
| GH1 | GKAP homology domain 1 | GKAP homológ domén 1 |
| GK | Guanylate Kinase | guanilát kináz |
| GKAP | Guanylate Kinase Associate protein | guanilát-kináz asszociált fehérje |
| GST | Glutathione S-Transferase | glutathion S-transzferáz |
| HSQC | Heteronuclear Single Quantum Coherence | Heteronukleáris egykvantumú koherencia |
| IEC | Ion Exchange Chromatography | ioncserés kromatográfia |
| IMAC | Immobilized Metal Affinity Chromatography | immobilizált fémion-affinitás kromatográfia |
| LB | Luria-Bertani medium | Luria-Bertani táptalaj |
| NMR | Nuclear Magnetic Resonance | nukleáris mágneses rezonancia |
| OD | Optical Density | optikai denzitás |
| PSD | Postsynaptic Density | posztzinaptikus denzitás |

| | | |
|----------|---|--|
| SAXS | Small-Angle X-ray Scattering | kisszögű röntgenszórás |
| SDS-PAGE | Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis | Nátrium-dodecil-szulfátos poliakrilamid gélelektroforézis |
| SEC | Size Exclusion Chromatography | méretkizárásos kromatográfia |
| TCEP | Tris(2-carboxyethyl)phosphine | - |
| TEV | Tobacco Etch Virus protease | tobacco Etch Vírus proteáz |
| TSA | Thermal Shift Assay | Termikus stabilitás vizsgálat |

Ábrajegyzék

Ábrák

1. ábra: Az idegsejtek kommunikációja és posztzinaptikus denzitást felépítő fehérjék.
2. ábra: A PSD-t felépítő állványfehérjék sematikus ábrázolása a főbb doménekkal, aminosav számozással és a kialakított interakciókkal.
3. ábra: Homer1 különböző izoformái. Az EVH1 domén konzervált mindhárom izoformába.
4. ábra: A Homer1 sematikus ábrázolása a főbb doménekkal és aminosav számozással a fenti ábrán.
5. ábra: A Shank3 fehérje sematikus ábrázolása a főbb doménekkal és aminosav számozással.
6. ábra: A GKAP fehérje sematikus ábrázolása a főbb doménekkal és aminosav számozással.
7. ábra: A Homer1 EVH1 domén szekvenciája a másodlagos kémiai elemek és a mutációs helyek feltüntetésével.
8. ábra: Az in vitro PCR mutagenézis lépései.
9. ábra: A Tev hasítás sikerességének ellenőrzése.
10. ábra: A Homer1 fehérje szerkezete.
11. ábra: Az EVH1 szerkezet lokális jellemzői.
12. ábra: Az EVH1 domén dinamikája.
13. ábra: SAXS és NMR minták ellenőrzése SDS-PAGE-n.
14. ábra: Az M65I és S97L mutánsok HSQC spektrumai.
15. ábra: A vad típusú EVH1 domén HSQC spektruma.
16. ábra: Amid N-H perturbációk, α és α másodlagos kémiai eltolódások.
17. ábra: SAXS eredmények.
18. ábra: CD spektrumok.
19. ábra: Az EVH1 variánsok hőstabilitása.
20. ábra: Biolayer interferometria vizsgálatok a Homer1 és Shank3 peptid között.
21. ábra: NMR titrálás Shank3 peptiddel (LVPPPEEFANG).
22. ábra: S^2 eredmények.

23. ábra: R_{ex} eredmények
24. ábra: S^2 rendparaméterek.
25. ábra: R_{ex} csere értékek.
26. ábra: R_{ex} -ek előfordulása.
27. ábra: Gauss-hálózati modell elemzése az EVH1 domén szerkezetéről.
28. ábra: A GBR1-3 dupla sávval jelenik meg az SDS-PAGE gélképen.

Táblázatok

Táblázatok

1. Táblázat: A mutáns EVH1 primer szekvenciái.
2. Táblázat: Adatbázisok.
3. Táblázat: Tömegspektrometria eredmények.
4. Táblázat: A Homer1 EVH1 domén oldatfázisú szerkezetének összefoglaló táblázata
5. Táblázat: Tm1 és Tm2 adatok táblázatos ábrázolása.
6. Táblázat: Biolayer Interferometria eredmények.

Absztrakt

A posztszinaptikus membrán alatt található, nagy fehérjekomplexekből felépülő struktúrát posztszinaptikus denzitásnak (postsynaptic density, PSD) nevezzük. A PSD kulcsszerepet játszik a szinaptikus jelátvitel szabályozásában, a memória kialakulásában és a tanulási folyamatokban. A struktúra fehérjéit érintő mutációk különböző neurodegeneratív és neurodevelopmentális rendellenességek kialakulásához vezethetnek. Ezek közé tartozik az autizmus spektrum zavar (Autism Spectrum Disorder, ASD), amelynek hátterében többek között a Homer1 fehérje EVH1 doménjében bekövetkező mutációkat is azonosították.

A Homer1 a PSD egyik állványfehérjéje, amely egy globuláris EVH1 domént, egy hosszú coiled-coil régiót, valamint a kettő között elhelyezkedő rendezetlen linkert tartalmaz. Az EVH1 domén felelős a célfehérjék felismeréséért és kötéséért, elsősorban prolinban gazdag motívumokon keresztül; ilyen kötőpartner például a Shank fehérje. Munkám célja a Homer1 EVH1 domén vad típusú és két ASD-hez köthető mutáns változatának szerkezeti, dinamikai és kölcsönhatási jellemzése volt, valamint a mutációk molekuláris következményeinek feltárása. Emellett foglalkoztam még egy másik állványfehérjé, a GKAP GBR régiójának előállításával.

A rekombináns fehérjéket bakteriális expressziós rendszerben állítottam elő és kromatográfiás módszerekkel tisztítottam. A szerkezet meghatározását oldatfázisú NMR spektroszkópiával végeztem, a jelhozzárendelést a CCPNMR szoftver segítségével készítettem el. A domén variánsok dinamikai tulajdonságait S^2 rendparaméterek és R_{ex} értékek meghatározásával vizsgáltam, amelyek rendre a gyors (pikoszekundum–nanomásodperc) és a lassabb (mikro–milliszekundum) időskálájú mozgásokról adnak információt. A globális szerkezeti jellemzők elemzésére kisszögű röntgenszórást (SAXS) és cirkuláris dikroizmus (CD) méréseket alkalmaztam. A fehérje–fehérje kölcsönhatások vizsgálatát biolayer interferometriával (BLI), valamint NMR titrálásos kísérletekkel végeztem, az adatok kiértékelését szintén CCPNMR-ben hajtottam végre. Kísérletes munkámat a belső dinamika számítógépes elemzésével egészítettem ki.

Eredményeim azt mutatják, hogy a vizsgált mutációk elsősorban az EVH1 domén stabilitását és dinamikai viselkedését befolyásolják, miközben a globális szerkezeti felépítés alapvetően megőrződik. A dinamikai analízis arra utal, hogy a mutációk a belső mozgások átrendeződését idézik elő, amelyek hatással lehetnek a partnerkötés egyes aspektusaira és a létrejövő nagyobb fehérjekomplexek stabilitására. A kombinált szerkezeti és biofizikai megközelítés átfogó képet adott a Homer1 EVH1 domén szerkezet–dinamika–funkció kapcsolatáról, hozzájárulva az ASD-hez kapcsolódó molekuláris mechanizmusok jobb megértéséhez.

Abstract

The structure located beneath the postsynaptic membrane and composed of large protein complexes is called the postsynaptic density (PSD). The PSD plays a key role in the regulation of synaptic transmission, memory formation, and learning processes. Mutations affecting PSD proteins may lead to the development of various neurodegenerative and neurodevelopmental disorders. Among these is Autism Spectrum Disorder (ASD), in which mutations occurring in the EVH1 domain of the Homer1 protein have been identified.

Homer1 is a scaffold protein of the PSD that contains a globular EVH1 domain, a long coiled-coil region, and an intrinsically disordered linker located between them. The EVH1 domain is responsible for the recognition and binding of target proteins, primarily through proline-rich motifs; one such binding partner is the Shank protein. The aim of my work was to characterize the structural, dynamic, and interaction properties of the wild-type Homer1 EVH1 domain and two ASD-associated mutant variants, and to explore the molecular consequences of these mutations. In addition, I worked on the production of the GBR region of another scaffold protein, GKAP.

Recombinant proteins were produced in a bacterial expression system and purified using chromatographic methods. Structural determination was carried out by solution-state NMR spectroscopy, and resonance assignment was performed using the CCPNMR software package. The dynamic properties of the domain variants were investigated by determining S^2 order parameters and R_{ex} values, which provide information on fast (picosecond–nanosecond) and slower (microsecond–millisecond) timescale motions, respectively. Global structural characteristics were analyzed using small-angle X-ray scattering (SAXS) and circular dichroism (CD) measurements. Protein–protein interactions were studied by bilayer interferometry (BLI) and NMR titration experiments, with data evaluation performed in CCPNMR. The experimental work was complemented by computational analysis of internal dynamics.

My results show that the investigated mutations primarily affect the stability and dynamic behavior of the EVH1 domain, while the overall global fold remains largely preserved. Dynamic analysis suggests that the mutations induce a rearrangement of internal motions, which may influence certain aspects of partner binding and the stability of larger protein complexes formed. The combined structural and biophysical approach provided a comprehensive view of the structure–dynamics–function relationship of the Homer1 EVH1 domain, contributing to a better understanding of the molecular mechanisms associated with ASD.

1. Irodalmi áttekintés

1.1 A neurális szinapszis

1.1.1 Idegsejtek szinapszison keresztül történő kommunikációja

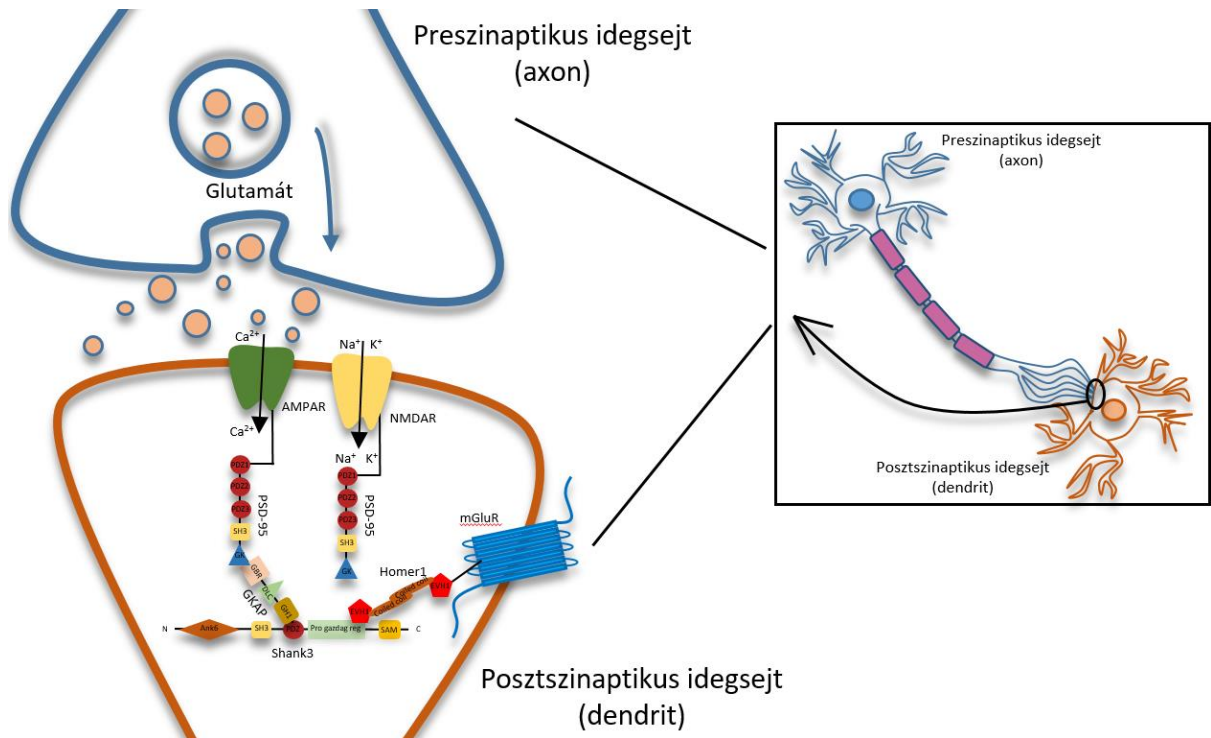
Az emlősök agyában található neurális hálózatot több milliárd idegsejt alkotja, melyek között az információ átadása, az idegsejtek kommunikációja szinapszisok segítségével valósul meg. A szinaptikus kapcsolatok kialakulása és fenntartása, valamint a szinaptikus plaszticitás alapvető tényezők a normális agyműködés és a homeosztázis szempontjából (Grabrucker et al., 2011). Egy szinapszis alapvetően két idegsejt találkozásánál teremt kapcsolatot, de egy adott idegsejt a néhánytól több százezerig terjedő számú kapcsolat kialakítására képes. Ezek megvalósulhatnak egy közeli idegsejttel vagy akár egy, az agy egészen más területén található neuronnal is. Megkülönböztethetünk elektromos és kémiai szinapszisokat. Elektromos szinapszis esetében a réskapcsolatok közvetlen, ionok áramlásán alapuló kommunikációt biztosítanak az idegsejtek között, ez egy gyors, egyszerűbb felépítésű jeltovábbító rendszer. Ezzel szemben kémiai szinapszis esetében az információ áramlása neurotranszmitterekkel történik, ez egy összetettebb, komplexebb, jobban szabályozható jelátadást valósít meg. A kémiai szinapszisnak több fajtája ismert, alapvető típusai a serkentő vagy gátló szinapszis. A szinapszisok alapvető jellemzője a felszabadult neurotransmitter típusa. A kémiai szinapszis általában egy idegsejt (jelet küldő neuron) axonja és egy másik idegsejt (a jelet fogadó neuron) dendritje között valósul meg. Az axon végén található a preszinaptikus terminál, ahová az axonon végig terjedő akciós potenciál elésekor létrejövő depolarizáció elindítja a preszinaptikus folyamatokat. Ezek során kinyílnak a Ca^{2+} csatornák, Ca^{2+} ionok áramlanak be a sejtbe. Ez a kalciumszint-emelkedés a szinaptikus vezikulák preszinaptikus membránnal történő összeolvadásához vezet. A vezikulák tartalma, a neurotranszmitterek ennek következtében a 10-20 nm-es szinaptikus részbe (preszinaptikus és posztzinaptikus sejt közötti terület) jutnak, majd hozzákötnek a posztzinaptikus membránba ágyazódó receptorokhoz, így adódik át az ingerület egyik idegsejtről a másikra (Caire et al., 2025) (Südhof, 2012) (Hammond & Esclapez, 2015) (Pereda, 2014). Mind a jelet leadó, mind az azt fogadó sejtek esetében fehérvék összetett, komplex hálózata vesz részt a jel továbbításában. Gerincesek esetében a serkentő szinapszisoknál, a központi idegrendszerben elsősorban a glutamát játszik szerepet, mint serkentő neurotransmitter, innen is kapta a nevét a serkentő glutamáterg szinapszis (Dosemeci et al., 2016). A preszinaptikus membránnal egybeolvadó vezikulákban megtalálható glutamát a dendritikus tüskék végén lévő, a posztzinaptikus

membránba ágyazódott NMDA (N-metil-D-aszpartát) és AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazol-propionsav) ionotróp glutamát receptorokhoz kapcsolódik. Ez a glutamát-receptor kötődés aktiválja a receptorokat, melyek ennek hatására konformáció-változáson mennek keresztül. A glutamát és a receptorok között létrejövő interakció hatására a magnézium- és cinkionok, amik korábban megakadályozták az egyéb ionok áramlását, most szabaddá teszik a receptorokat és ezáltal a nátrium, kalcium és kálium ionok átáramlását is. A kalcium- és nátriumionok a posztszinaptikus sejt belsejébe áramolnak, míg a kálium a szinaptikus rés felé (Luo et al., 2011) (Lüscher & Malenka, 2012). A beáramló nátriumionok a posztszinaptikus területen akciós potenciált indukálnak. Fontos megjegyezni, hogy a kiváltott válasz pontos jellege függ a szinapszis aktuális felépítésétől és állapotától. A membránba ágyazódó receptorok mennyisége nem állandó, hanem egy úgynevezett kétirányú visszacsatolási mechanizmus határozza meg, amikor a szinapszis inaktív, akkor a receptorok az endoplazmatikus retikulum (ER) irányából a plazmamembránba szállítódnak, míg aktív szinapszis esetében endocitózis játszódik le, valamint lelassul az NMDA receptorok exportja az ER-ből (Rasmussen et al., 2017). Az AMPA receptorokat négy fő, a csatornát létrehozó alegység (GluA1-GluA4) alkotja, amelyhez egyéb kiegészítő alegységek csatlakoznak, pontos összetétele attól függően változik, hogy az agy mely területén fordul elő. Alegységeinek C-terminális része közvetlen kapcsolatot alakít ki a vázfehérjékkel (lásd alább), így játszva szerepet a jelátvitelben. Az NMDA receptorokat három alegység alkotja, az NR1, NR2 és az NR3 (Luo et al., 2011). A glutamát az NR2 alegységet aktiválja, ami a PSD-95 fehérje amino terminálisán megtalálható első és második PDZ doménjéhez kapcsolódik (Cousins et al., 2009). Ez a két PDZ domén a Stargazine transzmembrán fehérje C-terminális végéhez is kötődik, ennek az interakciónak a hatására az AMPA receptorok kihelyeződnek a sejt felszínére, aminek hatására még több glutamát megkötésére lesz képes a sejt, így erősebbé téve a szinapszist (Choi et al., 2002). Az NMDA és AMPA receptorok interakcióban állnak a posztszinaptikus denzitást (PSD) alkotó fehérjék sűrű, komplex hálózatával, elsősorban a PSD-95 fehérjén keresztül kötnek a mélyebb rétegek fehérjéivel, kialakítva egy a citoplazmáig átívelő kapcsolatrendszeret többszintű fehérjeinterakción keresztül (Sheng & Hoogenraad, 2007).

1.2 Posztszinaptikus denzitás és az azt felépítő fehérjék

A posztszinaptikus denzitás feladata a szomszédos idegsejtekből neurotranszmittereken keresztül érkező jel fogadása és továbbítása a mélyebb rétegek felé (Suzuki et al., 2018). Szerepe van a szinaptikus szerkezet fenntartásában, átrendeződésével kulcsszerepet tölt be a tanulás és a

memória molekuláris szintű folyamataiban. Elektronmikroszkópos vizsgálatok alapján a PSD a dendritikus tüskék végében, a posztszinaptikus membrán alatt található struktúra, melyet több ezer fehérje alkot (Sheng & Kim, 2011) (Sheng & Hoogenraad, 2007). A PSD elsősorban serkentő szinapszisokban kifejezett, elektrondenz képlet. A PSD-t alkotó fehérjék meghatározása azonban nem volt egyszerű folyamat, és részletes háromdimenziós szerveződése mai napig intenzív kutatás tárgyát képezi. Többféle módszerrel próbálták kideríteni a PSD-t alkotó fehérjék számát és típusát. Végeztek vizsgálatokat antitestekkel, alkalmazták az élesztő kéthibrid- és ko-immunoprecipitációs módszereket PSD fehérjékkel, emellett proteomikai technikák alkalmazására is sor került. SDS-PAGE elválasztás és MALDI-TOF tömegspektrometria segítségével például 30 PSD fehérjét azonosítottak, de emellett alkalmaztak neuronális szöveti frakcionálást is (Boeckers, 2006). Ami leginkább megnehezítette a PSD pontos feltérképezését és megértését, az az, hogy a PSD egy komplex fehérjehálózat, ami vízben oldhatatlan, sűrű, de ugyanakkor nem rendelkezik határozott sztöchiometriával és emellett a szerkezete is dinamikus (Zhu et al., 2016). A legújabb kutatások szerint egy körülbelül 30-50 nm vastag és 300-400 nm széles lemez alakú 1.1 ± 0.36 GDa tömegű fehérjehálózatról van szó (Chen et al., 2005) (W. Feng & Zhang, 2009) (Suzuki et al., 2018) (Boeckers, 2006). Ennek mérete és összetétele azonban nem állandó, dinamikus változhat attól függően, hogy mely agyterületen található meg, milyen a szinaptikus aktivitás, illetve különböző fajoknál is eltérő méreteket mutat (Sheng & Hoogenraad, 2007). Emellett az idegsejt típusától is függ (Luo et al., 2011) és a szinaptikus plaszticitás is befolyásolja a PSD felépítését (Zhu et al., 2016) (Suzuki et al., 2018). Intenzív szinaptikus aktivitás hatására például a PSD lentebb kifejtett 'pallium' rétege sűrűbbé válik (Dosemeci et al., 2016). Amikor mindkét idegsejt aktív, akkor a szinapszisok erősödhetnek (hosszú távú potenciáció vagy angolul long term potentiation, LTP), ilyenkor például nő az AMPA receptorok mennyisége a membránban. Amikor pedig az idegsejtek inaktívak, a szinapszis gyengül (hosszú távú depresszió vagy angolul long term depression, LDP), az AMPA receptorok száma is csökken. A szinaptikus plaszticitásnak jelentősége van a tanulás és a memória kialakulásában (Kennedy, 2013) (Sheng & Hoogenraad, 2007).



1. Ábra: Az idegsejtek kommunikációja és posztzinaptikus denzitást felépítő fehérjék. A preszinaptikus idegsejt (axon) és a posztzinaptikus idegsejt (dendrit) között kialakuló kémiai szinapszis neurotranszmitterekkel, elsősorban glutamáttal valósul meg. A posztzinaptikus denzitás a posztzinaptikus sejtmembrán alatt található komplex hálózat, amelyet különféle egymással interakcióban álló fehérjék alkotnak, köztük az általam is vizsgált Homer1, Shank3 és GKAP fehérjék.

A PSD-ben több ezer fehérje található meg. A PSD egyik különleges jellemzője, hogy csak egy oldalról van membránnal elhatárolva, a citoplazma felé nyitott, a posztzinaptikus membránhoz interakciókon keresztül kapcsolódik (1. ábra). Szerveződésében feltehetően kulcsszerepe van a folyadék-folyadék fáziszeperációknak (liquid-liquid phase separation, LLPS), ami lehetővé teszi, hogy a molekulák kondenzált állapotban maradjanak, együtt lokalizálódjanak és szabályozzák az interakciókat (Z. Feng et al., 2019). A PSD-ben megtalálható fehérjéket 13 különböző funkcionális csoportra oszthatjuk (ezek részét képezik például az állványfehérjék, receptorok, motor fehérjék, enzimek stb.) azon belül is körülbelül 400 fehérjetípust azonosítottak tömegspektrométer segítségével (Peng et al., 2004) (Sheng & Kim, 2011) (Cheng et al., 2006). Azonban a különböző vizsgálatok eltéréseket mutatnak a PSD-t alkotó fehérjék számával kapcsolatban (Sheng & Kim, 2011). A kvantitatív tömegspektrometria, illetve a különféle képalkotó technikák fejlődésének köszönhetően megbecsülhető az egyes PSD alkotók relatív mennyisége. A legnagyobb mennyiségben a CaMKII α fehérjét találták, ami körülbelül 4800 példányban van jelen a PSD-ben (Sheng & Kim, 2011). A PSD sűrűsége, illetve az azt alkotó fehérjék előfordulása nem egyenletes,

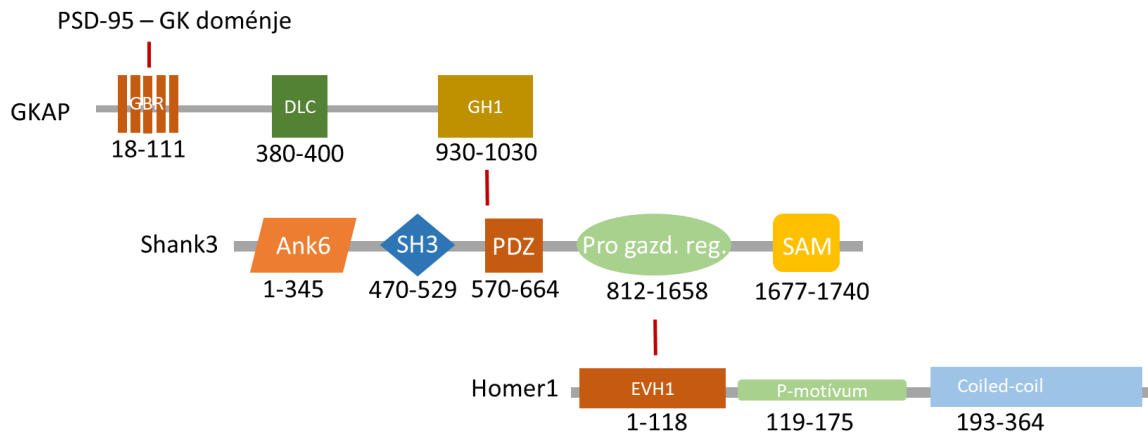
vertikálisan 2 különböző részre osztható a membránfehérjéken kívül; a 'core' és a 'pallium' rétegre (Dosemeci et al., 2016).

Az első réteg a PSD-ben az úgynevezett 'core' réteg, 30-50 nm-re található a plazmamembrántól, itt lelhető fel az állványfehérjéknek a nagy része (Suzuki et al., 2018). Az állványfehérjék hídként működnek a PSD-ben, a felsőbb (membránhoz közelebbi) szinteken elhelyezkedő glutamát receptorokat kötik össze az alsóbb szinteken megtalálható jeltovábbító komplexszel és a citoplazmatikus vázzal. Így tehát az állványfehérjék kulcsfontosságú szerepet töltenek be a szinaptikus jelátvitelben és plaszticitásban is (Zhu et al., 2017). A MAGUK (membrán asszociált guanilát kináz) fehérjék is az állványfehérjék közé tartoznak, ezek alkotják a PSD legnagyobb csoportját emlősökben, köztük tartozik például a PSD-95 fehérje (más néven DLG4, discs large homolog 4). De ide sorolható még a DLG1, a CASK (kalcium/kalmodulin függő szerin proteín kináz), a MAGI (membránhoz kötött guanilát-kináz inverted), MPP (palmitoilált membránfehérje), ZO (zonula occludens) fehérjecsald is. A CASK fehérje kináz mind a pre- mind a poszt-szinaptikus oldalon előfordul, a neurotranszmitterek felszabadulásában és a vezikulák szállításában, a jelátvitel szabályozásában játszik szerepet. A MAGI fehérjecsald a szövetek megfelelő fejlődésében és működésben kulcsszereplő. Az MPP család a sejtek polaritásának kialakításában, valamint fenntartásában vesz részt (Zhu et al., 2016). A MAGUK fehérjék minden esetben tartalmaznak PDZ domént, legtöbb esetben hármat, emellett rendelkeznek SH3 (Src homológ 3) és C-terminális, peptidkötő funkciójú guanilát kináz (GK) doménnel (Boeckers, 2006). Fentebb említett módon a PSD-95 N-terminális első és második PDZ doménjei interakcióba lépnek az NMDA és AMPA receptorokkal (Boeckers, 2006). A PDZ domének mellett a PSD-95 tartalmaz egy SH3 és egy GK domént a C-terminális végen, ez utóbbival alakít ki interakciót a GKAP (guanilát-kináz asszociált fehérje) fehérje, ami pedig a Shank fehérjével teremt kapcsolatot (Dosemeci et al., 2016) (Zhu et al., 2017). Ez a központi, vagy 'core' komplex mind a szinapszisok fejlődésében, mind a működésükben kulcsfontosságú szerepet tölt be (Zhu et al., 2017). Nem meglepő módon a fehérjéket kódoló mutációk összefüggésbe hozhatók számos pszichiátriai zavarral és idegrendszeri fejlődési betegséggel. Például a PSD-95-öt kódoló DLG4 gén hiányában egerekben megfigyelhető volt az ASD (Autism Spectrum Disorder) és a Williams-szindróma, a SAPAP2 és -3 gének törlése OCD-vel (Obsessive-Compulsive Disorder vagy kényszerbetegség), ASD-vel, valamint Tourette szindrómával is összefüggésbe került (Feyder et al., 2010). A PSD-95 fehérje a második PDZ doménjén keresztül a Shaker típusú K⁺ csatornával kapcsolódik, de emellett interakcióba lép az nNOS-sal (neuronal nitric oxide synthase), mely pedig a Kalirin7-tel kapcsolódik, ami egyben egy Rho-GFE (Rho-specifikus guanin nukleotid-exchange faktor) fehérje, a dendritek alakjának kialakításában és a PSD szabályozásában van szerepe. A PSD-95 harmadik PDZ doménjéhez a

neuroligin köt, ami egy sejtadhéziós fehérje, szerepe van a szinapszis létrejöttében és fenntartásában. Az EGFR (epidermális növekedési faktor receptor) és az ErbB4 tirozin kináz receptor az első és második PDZ doménnel lép kapcsolatba. Emellett fontos még kiemelni a Ras GTP-ázt aktiváló fehérje, a SynGAP kötődését, ez mindhárom PDZ doménnel interakcióba tud lépni (Boeckers, 2006). Ezek mellett számos más interakcióban is részt vesz a PSD-95.

A 'core' réteg alatt található meg a 'pallium' réteg, 50-60 nm-re a plazmamembrántól, ahol az általam vizsgált Homer és Shank fehérjék is előfordulnak (Dosemeci et al., 2016) (Suzuki et al., 2018). A 'core' és 'pallium' réteg között a GKAP teremt kapcsolatot azzal, hogy interakcióba lép többek között a Shank fehérjével. A Shank fehérje kapcsolatot alakít ki a Homer fehérjével. A PSD-95-GKAP-Shank-Homer interakció pedig a PSD egy fontos strukturális keretrendszerét alkotja (Shin et al., 2012) (Romorini et al., 2004) (Hayashi et al., 2009) (2. ábra). A Shank fehérje SAM doménjei egymással is asszociálhatnak és egy lapszerű szerkezetet alakítanak ki. Emellett a Homer fehérjék tetramer formában keresztkötéseket alakítanak ki a Shank fehérjékkel, így ezek a pallium réteg fő vázát alkotják (Dosemeci et al., 2016). A Shank fehérjék elősegítik a dendritikus tüskék érését és azok megnagyobbodását, ennek mechanizmusa még nem teljesen ismert, feltételezhetően az aktinnal való kölcsönhatásuk révén vesznek részt ezen folyamatok szabályozásában. A Shank fehérjék három aktin szabályozó fehérjével kölcsönhatásba tudnak lépni, ilyen az IRSp53 (Inzulin Receptor Szubsztrát Fehérje 53), az Apm1 és kortaktin, így teremtve kapcsolatot a PSD és a citoskeleton között (Dosemeci et al., 2016). Az aktin és az aktinkötő fehérjék fontos összetevői a PSD-nek, szerepük van a dinamikus átrendeződésben (Boeckers, 2006).

A PSD-ben megfigyelhető egy úgynevezett 'lattice' vagy rács struktúra, ami egy szálal hálózat, amely egy sokszögű struktúrákból álló (poligonális) lyukacsos réteg. Ezek a lyukak kb 20 nm átmérőjűek és körülbelül 5 nm vastag szálak alkotják őket. A 'lattice' réteg fő alkotóelemei a tubulin, aktin, CaMKII, kis mennyiségben PSD-95, Shank, Homer és GKAP fehérje is megtalálható benne. Ez a rács a posztzinaptikus membrán szerkezetének és funkciójának fenntartásában játszik fontos szerepet, fehérjéket, receptorokat és citoskeletonális elemeket köt valamint a neurotranszmitterek fogadásában, a jelátvitel továbbításában is szerepe van. A PSD architektúrájának feltérképezése hozzásegíthet a PSD dinamikus jellegét megalapozó molekuláris mechanizmusok megértéséhez (Suzuki et al., 2018).



2. **Ábra:** A PSD-t felépítő állványfehérjék sematikus ábrázolása a főbb doménekkal, aminosav számozással és a kialakított interakciókkal.

1.2.1 A Homer fehérjecsalád

A Homer fehérjecsalád, vagy más néven Vesl, Cupidin vagy PSD-Zip45 a posztszinaptikus állványfehérjék egyik kulcsfontosságú tagja, a szinapszis szervezésében van fontos szerepe. Ezen kívül a szinaptikus aktivitás által kiváltott plaszticitásban is részt vesz (Hayashi et al., 2006). Így a Homer fehérjének a tanulás és memória kialakulásának molekuláris mechanizmusában is szerepe van. Fokozott expresszáldást mutat szinaptikus aktivitás hatására, ennek megfelelően a Homer géneket korai géneknek is nevezzük (Dosemeci et al., 2016). Ezek mellett szerepük van még a Ca^{2+} szint szabályozásában. Közvetlenül szabályozzák az RyR1 (Ryanodine Receptor Type 1) fehérje működését, különösen annak Ca^{2+} érzékenységét, aktiválódási valószínűségét. Az adapterként működő Homer fehérjék fizikailag kötődnek más fehérjékhez és ezáltal funkcionális kapcsolatot létesítenek köztük.

A sejtbe való Ca^{2+} beáramlást a SOC (store-operated calcium channels) csatornák közvetítik. A TRPC csatornák a SOC alkotóelemei. A TRPC csatornák C-terminális végén található egy prolin gazdag régiót, a Homer1 ide, illetve az N-terminális végéhez is képes kötődni EVH1 doménjén keresztül. Nyugalmi állapotban a TRPC-Homer1b/c és IP3R komplex megakadályozza a TRPC aktiválódását, viszont, ha ez a kapcsolat megszakad, például az N- vagy C-terminális kötőhelyen lévő mutáció miatt, vagy ha a monomer Homer1a izoforma expresszáldik, az megszünteti a kapcsolatot és aktiválódni fog a TRPC. Tehát a Homer1-nek fontos szerepe van a TRPC-Homer1b/c-IP3R komplex kialakulásában és a TRPC csatornák membránba való jutásának szabályozásában is (Luo et al., 2012).

A Homer fehérjecsaldnak három tagja ismert (Homer1, Homer2 és Homer3), melyeket három gén kódol (W. Feng et al., 2002). Emlősök esetében a Homer fehérjét kódoló gének különböző kromoszómákon helyezkednek el; a Homer1 gén az 5q14.2, a Homer2 gén a 15q24.3, a Homer3 gén pedig a 19p13.11 lókuszon található (Shiraishi-Yamaguchi & Furuichi, 2007). Alternatív splicing következtében mindhárom tag több izoformával rendelkezik, megkülönböztethetünk rövid és hosszú variánsokat (Shiraishi-Yamaguchi & Furuichi, 2007). Mind a rövid, mind a hosszú Homer fehérjék megtalálhatóak a PSD-ben, ahol szerepet játszanak a jelátvitelben, illetve célfehérjék lokalizációját szabályozzák (Luo et al., 2011). Egy 2017-es tanulmányban arról számolnak be, hogy a Homer fehérje igen fontos szerepet tölt be az alvás alatti PSD átrendeződésben, így járul hozzá a tanulás és az emlékezés molekuláris szintű folyamataihoz. Alvás során a rövid izoforma, a Homer1a lesz a domináns, ami monomer szerkezetű, így megszakad a kapcsolat a membrán és az ER között azáltal, hogy megszűnik az mGluR1/5 - IP3R és mGluR1/5 – PKC komplex kialakulásának lehetősége. Ezeket a molekulákat ébrenléti állapotban a hosszú, tetramer architektúrájú, multivalens kötésre képes Homer izoforma köti össze. Ez az átrendeződés kulcsfontosságú a szinapszis újraskálázódásához, az idegsejt így tud másnap újra tanulási folyamatokban részt venni. Az újraskálázódás lényege, hogy a szinapszis megerősödésekor bekövetkezett méretnövekedés korlátok között maradjon, és a szinapszis megváltozott erőssége más molekuláris mechanizmusok által legyen hosszabb távon fenntartva. A Homer tartalmazó jelátviteli komplex lebontása emellett az AMPA receptorok eltávolításához, így a szinapszisok gyengüléséhez vezet (Diering et al., 2017).

A Homer fehérje elsősorban az idegrendszerben expresszálódik, azonban a test különböző részén is előfordul kisebb mennyiségben. Például a Homer1b/c megtalálható még a szívben, vesében, petefészekben, herékben és a vázizmokban is, a Homer2a/b szintén kimutatható a szívben és az izmokban, de emellett a májban és a bélrendszerben is. A Homer3a/b pedig a csecsemőmirigyben, tüdőben, vesékben és petefészekben lelhető fel. Az agyban is különböző eloszlást mutatnak térben és időben egyaránt. A hippokampuszt példának véve megállapítható, hogy a Homer1b/c elsősorban a CA1 régióban, míg a Homer2a/b a CA1-CA2 régióban, a Homer3a/b pedig a CA2-CA3 régiókban koncentrálódik (Shiraishi-Yamaguchi & Furuichi, 2007) (Irie et al., 2002). A rövid Homer változatok (például a 186 aminosav hosszú Homer1a) nem tartalmazzák a C-terminális domént, korai géntermékeként expresszálódnak. A Homer fehérjék szerepet játszanak a MAPK útvonal aktiválásában is (Luo et al., 2011).

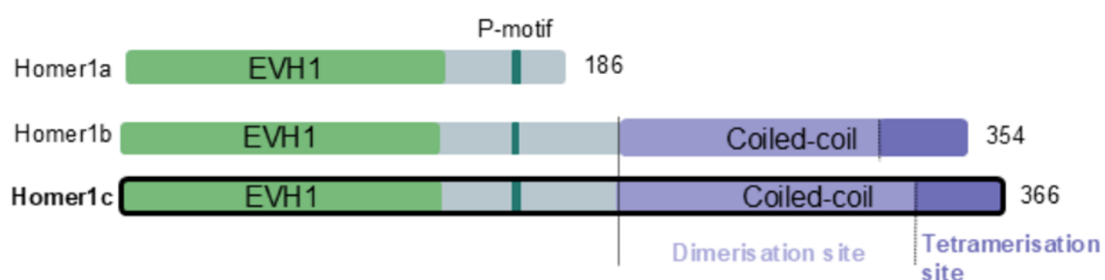
Többféle membránreceptor is kapcsolódik a PSD mélyebb rétegeihez a Homer fehérjén keresztül, mint az mGlu5 vagy IP3 receptorok (Diering et al., 2017). A Homer fehérje a Shankkal hálózatszerű

szerkezetet alakít ki és kapcsolódik az egyik legfontosabb állványfehérjéhez, a GKAP-hoz (Hayashi et al., 2009). A citoszkeletonhoz pedig az F-aktin és Drebrin kötődésén keresztül kapcsolódik (Shiraishi-Yamaguchi & Furuichi, 2007) (de Bartolomeis et al., 2022). A Homer fehérje EVH1 doménjén keresztül az interakciós partnerei prolingazdag régiójához köt, a fentebb említett interakcióin kívül kapcsolatot alakít ki többek között az Oscar vagy RYRI fehérjékkel is (Irie et al., 2002) (Luo et al., 2012) (Beneken et al., 2000) (Shiraishi-Yamaguchi & Furuichi, 2007). A Homer fehérje interakcióban áll a dynamin-3-mal is, hogy a PSD-t összekösse az endocitikus zonával, ez egy speciális régió, ahol endocitózis megy végbe, ez a PSD-n kívül helyezkedik el (Sheng & Kim, 2011).

A Homer fehérje hosszú izoformáinak (például Homer1c, Homer2a, Homer2b, Homer3a, Homer3b) amino-terminális végén található meg az EVH1/WH1 (Enabled/vázodilatátor-stimulált foszfofehérje (Ena/VASP) homology 1) domén, ami ligandumkötő funkcióval bír. Az N-terminális EVH1 domén kb. ~110 aminosava 80% szekvencia azonosságot mutat a Homer családon belül. A Homer1-ben szokásosan megkülönböztetnek egy konzervált CRH1 (conserved region of Homer1) régiót, ami az 1-175 aminosavak közötti szakasz, és az EVH1 domén (1-118), valamint az utána található ún. P motívum (138-Ser-Pro-Leu-Thr-Pro-142) alkotja. A közöttük lévő szakasz funkcionálisan rendezetlen. A fentebb említett P motívum a hosszú, rendezetlen "csuklópánt" régió része, ami elválasztja az EVH1 domént a coiled-coil szegmenstől (3. ábra). Egyes eredmények alapján úgy tűnik, hogy ez a P motívum gyenge interakcióba képes lépni az EVH1 doménnel, viszont ez a kapcsolat csak kristályszerkezetben jön létre, oldatfázisban nem detektálható, így a fiziológiás relevanciája máig nem tisztázott (Irie et al., 2002) (Shiraishi-Yamaguchi & Furuichi, 2007). Ismertek olyan fehérjék, amik a P motívummal alakítanak ki kapcsolatot, és ez a kölcsönhatás kizárja a homo-multimerizációt. A karboxi-terminális végen azonosítottak egy hosszú coiled-coil régiót, amely teljes hosszában mindössze 30% szekvencia azonosságot mutat a Homer családban. A Homer fehérjék hosszú izoformája a jelenlegi elképzelések szerint két dimerből összeálló tetramer formában van jelen, a tetramerizációt a coiled-coil régió C-terminális szakasza biztosítja, melyről kristályszerkezet is elérhető [3CVE, 3CVF] (Hayashi et al., 2009).

A fentebb említett módon a Homer1 fehérje a PSD váz egy kulcsfontosságú alkotója, az egyik legtöbbet tanulmányozott Homer fehérje (Luo et al., 2012). A Homer1 hosszú izoforma szerepet játszik abban, hogy a PSD membránfehérjéi és a citoszkeleton mélyebb rétegeinek összeköttetése megvalósuljon. A rövid izoforma, a Homer1a rendelkezik egy EVH1 doménnel és egy rövid rendezetlen C-terminális résszel. A hosszú izoforma (Homer1b és Homer1c) esetében megfigyelhetünk egy EVH1 domént, ami a hosszú C-terminális végi coiled-coilhoz kapcsolódik. A coiled-coil régió több Homer polipeptid lánc összeszerelődéséért is felelős. A Homer1c a

receptorok klaszterezésében, szállításában, sejten belüli komplexek kialakulásában, illetve a kalcium homeosztázis fenntartásában játszik kulcsszerepet (Luo et al., 2012). M. K. Hayashi és kollégái úgy vélték, hogy a coiled-coil régió két szegmensre osztható, egy rövid, dimer, párhuzamos coiled-coilra és egy második szegmensre, ami párhuzamos dimerként kezdődik, majd tetramerként folytatódik, a dimer C-terminális végei antiparallel módon kapcsolódnak össze (Hayashi et al., 2009).



3. Ábra: Homer1 különböző izoformái. Az EVH1 domén konzervált mindhárom izoformában.

1.2.1.1 A Homer1 patofiziológiája

A glutamát receptor jelátvitel rendellenes működése számos neurológiai betegséggel hozható kapcsolatba, ide tartozik például a tanulási és memóriazavarok, epilepszia és a skizofrénia. A különböző Homer fehérjék több központi idegrendszeri betegséggel is összefüggésbe hozhatók, valamint a kóros szinapszisfejlődés különböző rendellenességei kialakulásában játszik fontos szerepet, ilyen betegségek és rendellenességek a neuropátiás fájdalom, az Alzheimer-kór, skizofrénia vagy a fragilis X szindróma (Luo et al., 2011), vagy éppen az autizmus (Sheng & Hoogenraad, 2007).

A Homer fehérjék közül a Homer1 fehérje hiánya, funkciójának elvesztése összefüggésbe hozható skizofróniával, mentális retardációval, Alzheimer kórral, krónikus fájdalommal és autizmus spektrum zavarral is (Szumlinski et al., 2005), (Luo et al., 2012).

A krónikus fájdalom kialakulásában két kulcsfontosságú szereplő vesz részt, a glutamátreceptorok aktivációja és az intracelluláris kalciumraktárak változása. Az mGluR-IP3R útvonalon keresztül történő Ca^{2+} áramlást a Homer1 fehérje szabályozza. A Homer1a expresszációja meg fogja növelni a fájdalom és a gyulladás hatására, csökkenteni fogja a túlzott Ca^{2+} áramlást és így enyhíti a

fájdalmat. A Homer1b/c hosszabb távon fog aktiválódni és szintén hozzájárulni a fájdalomérzékenység szabályozásához. Ennek következtében tehát a Homer1 fehérje akár terápiás célra is ígéretes lehet krónikus fájdalom kezelésére (Luo et al., 2012).

A fragilis X szindróma az egyik leggyakoribb örökletes értelmi fogyatékoságot okozó hiba. Az FMR1 gén hiánya a szinaptikus fehérjeszintézist zavarja és ennek következtében a kialakuló dendrittüskék rendellenesek lesznek. FMR1 hiányos egerekben azt figyelték meg, hogy az mGluR5 receptor kapcsolódása a Homer1b/c-hez gyengül, inkább a Homer1a-hoz fog kötni, ami pedig fokozott mGluR5 aktivitáshoz, zavart viselkedéshez vezet. Megfigyelték, hogy ha kiütik a Homer1a gént, akkor a viselkedés javulni fog, de a helyes fehérjeszintézis nem áll vissza (Luo et al., 2012).

Fentebb említett módon a Homer fehérje az Alzheimer-kór kialakulásában is szerepet játszik. Az Alzheimer-kór az amiloid-béta fehérje agyi felhalmozódásának köszönhető. Ennek hatására memória és kognitív zavarok jelennek meg a betegeknél. A Homer1 a különböző védő szerepet tölt be, korai Alzheimer-kór fázisban védelmet tud nyújtani az amiloid béta toxicitásával szemben. Emellett képes serkenteni a BK-csatornákat, ezáltal csökkentve a túlingerelhetőséget. Megfigyelték, hogy a Homer1a mRNS szintje alacsonyabb volt, mint egészséges egyedeknél. Így tehát egy potenciális terápiás megközelítés lehet a Homer1a adása betegeknél (Luo et al., 2012).

A skizofrénia egy neuropszichiátriai, összetett betegség, aminek kialakulásában valószínűsíthetően mind genetikai, mind környezeti tényezők szerepet játszanak. Azonosításra került egy SNP a HOMER1 génben. Homer1-KO egerekben pedig glutamáterg zavart mutattak ki. A prefrontális kéregben megnövekedett a glutamát szint, ez hozzájárulhatott a glutamáterg transzmisszió diszregulációjához, így játszva szerepet a skizofrénia kialakulásában (Luo et al., 2012). Amikor pedig bejuttattak Homer1a és Homer1b/c fehérjéket, az részben képes volt visszaállítani a normális viselkedést. A Homer1a a stresszválaszt módosította, a Homer1b/c pedig a kognitív folyamatokat befolyásolta (Luo et al., 2012).

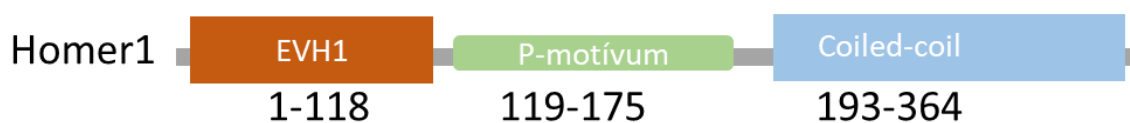
1.2.1.2 EVH1 domén család és mutációi

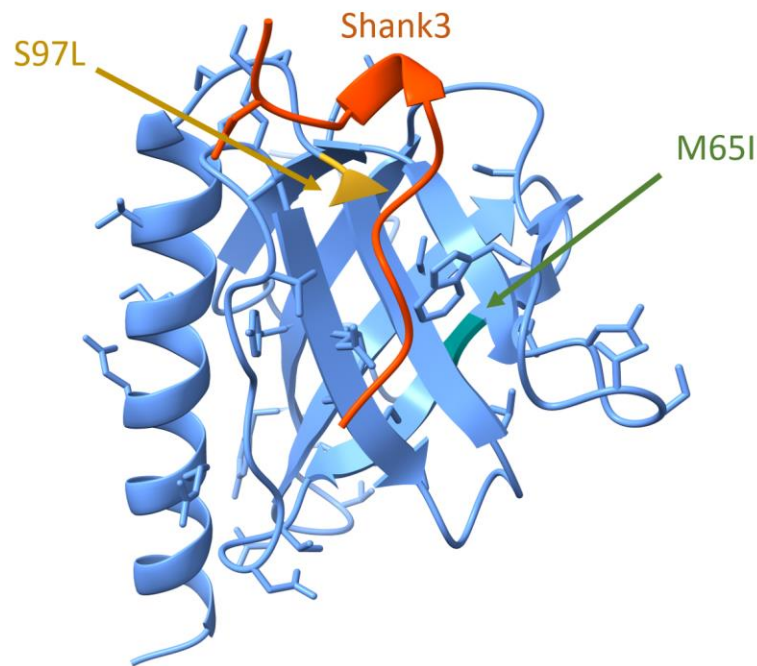
A Homer1 EVH1 domén térszerkezete ismert röntgendiffrakciós kísérletekből. Ez alapján az EVH1 doménben 7 antiparallel β redő és egy C-terminális végen található α -hélix található. Illetve az is kimutatásra került, hogy az EVH1 kötőpartnere egy erősen konzervált, prolingazdag lineáris motívum (short linear motifs, SLiM), melynek konszenzus szekvenciája PPxxF vagy FPxoP (ahol az x bármilyen aminosavnak felel meg, o pedig hidrofób részt jelent). Az EVH1 domén az ilyen motívumokat felismerve teremt kapcsolatot többek között az mGluR1, IP3R, Shank, Drebrin,

Dynamin3 vagy épp a Ryanodin receptor fehérjékkel (Beneken et al., 2000) (Shiraishi-Yamaguchi & Furuichi, 2007) (W. Feng et al., 2002) (Ball et al., 2002). Amennyiben ezekben a motívumokban a prolin vagy a fenilalanin aminosavakat lecseréljük, akkor az interakció is megszűnik (Beneken et al., 2000). Az EVH1 doménben a kötőzsebet a következő aminosavak alkotják: 24 Trp, 70 Thr, 74 Phe, 76 Gln, 85 Val és 89 Gly (UniProt: Q9Z2Y3) (Shiraishi-Yamaguchi & Furuichi, 2007).

Az EVH1 doménben több olyan pozícióba vittek be mutációt, melyek a ligandkötés szempontjából játszanak fontos szerepet. Ilyen volt a 89-es glicin mutációja, mely aminosavat alaninra és aszparaginra cserélték, mindkét esetben azt tapasztalták, hogy az interakció megszűnt a Homer EVH1 és a Shank3, valamint az mGluR1 között. Emellett a prolin érzékeny régiókat is vizsgálták, három módosítást hajtottak végre, mutációt vittek be a 24-es triptofánba, 70-es treoninba és a 74-es fenilalaninba. A 74-es és 24-es aminosavat alaninná mutálták, ennek hatására megszűnt mindkét ligandumhoz való kötődése. Amikor a 24-es triptofánt tirozinra cserélték, akkor a Shank3-hoz való kötődés nem változott, az mGluR1-hoz való kötődést viszont gyengítette. A 70-es treonin glutaminsavra való cseréje tönkretette a Shank3-hoz való interakciót, az mGluR1 interakciót nem befolyásolta, alaninra való mutációja viszont nem befolyásolta egyik esetben sem a kötődést. A kapott eredményekből azt a konklúziót vonták le, hogy az EVH1 domén egyes aminosavai különböző célfehérjéhez való kötődésben játszanak szerepet, a mutációk pedig minden ligandumra specifikus hatást váltanak ki. Megállapították, hogy rövidebb oldallánc esetében (pl. alaninra való csere esetén) kevésbé sérült, szűnt meg az interakció, mint amikor nagyobb oldalláncú aminosavra (pl. glutaminsavra) történt a csere, ennek okaként a térbeli torzulást hozták fel (Beneken et al., 2000).

Több pontmutációt (SNV - single nucleotide variant) azonosítottak, mint lehetséges autizmushoz köthető mutáció. Ebből kettőt találtak, melyek az EVH1 doménon helyezkednek el, ezek az 65-ös metionin cseréje izoleucinra, illetve a 97-es szerin cseréje leucinra (4. ábra). A harmadik lehetséges autizmus mutáció a 142-es prolin cseréje leucinra, ami a P motívum részét képezi. Emellett még két pontmutációt írtak le, az R323H-t és egy 3' UTR mutációt Homer1 fehérjékben (Kelleher et al., 2012). Kutatásaim során az M65I és S97L pontmutáció EVH1 szerkezetére és funkciójára gyakorolt hatását vizsgáltam.





4. **Ábra:** A Homer1 sematikus ábrázolása a főbb doménekkal és aminosav számozással a fenti ábrán. Az alsó ábrán az EVH1 domén szalagdiagramos (ChimeraX) ábrázolása látható. Zöld nyíl az M65I mutáció-, sárga nyíl pedig az S97L mutáció helyét jelzi. Emellett a Shank3 peptid kötődése is jelölve van.

1.2.2 A Shank fehérjecsald

A Shank (másnéven ProSAP, SSTRIP, Synamon, CortBP vagy Spank) fehérjecsald a központi idegrendszerben található PSD vázszerkezetének kialakításában játszik szerepet. A Shank az állványfehérjék közé tartozik (Luo et al., 2011) (Dosemeci et al., 2016), a posztszinaptikus membrán receptor komplexeit köti össze a citoskeletális elemekkel, ezzel a PSD szerkezetét létrehozva (Grabrucker et al., 2011). A Shank fehérje a szinapszisok kialakulásában, fejlődésében és működésében játszik szerepet (Sala et al., 2015). A Shank fehérjéket három gén kódolja, a SHANK1, SHANK2 és SHANK3 gének (Sala et al., 2015). Az agy különböző területein expresszálódnak a Shank gének, széles körben, beleértve a kérgi régiókat és a hippokampuszt (Grabrucker et al., 2011). A Shank1 fehérjét kódoló mRNS-ek megtalálhatóak a hippokampuszban, a kéregben, az amygdalában és a hipotalamuszban. A hippokampusz CA1 régiójában mindhárom Shank (Shank1, Shank2, Shank3) fehérje előfordul, azonban eltérő arányban. A Shank1 expressziója a legerősebb, ezt követi a Shank3 majd a Shank2. A Shank2 ezen kívül előfordul a

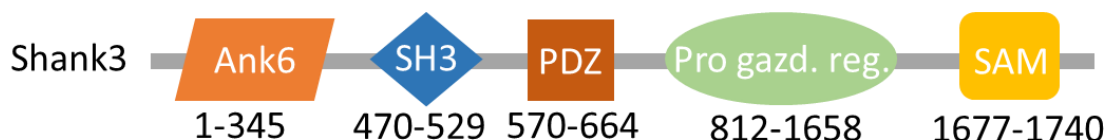
vesékben, a májban, a kéregben és a Purkinje-sejtekben. A Shank3 expressziója magas a hippocampuson kívül a szívben és a lépben (Sala et al., 2015).

A Shank fehérjékben 5 domén található, az N-terminális végen az ankyrin domén (vagy ANK ismétlődő régióknak is nevezik), majd ezt követi az SH3 (Src homológia 3) domén, a PDZ (PSD-95/DLG/ZO-1) domén, a prolin-gazdag régió, a ppl (kortaktin kötő) domén és végül a C-terminális végen a SAM (sterile alpha motif) domén (Boeckers et al., 2002) (5. ábra). A Shank fehérje PDZ doménjével interakciót alakít ki a GKAP fehérje QTRL motívumával. A Homer fehérjével is interakcióba lép a Shank (a Homer EVH1 kötődik a Shank prolin gazdag régiójához), vázkompleket alkotnak, és központi szerepet játszanak más PSD fehérjék összeállításában. Ebből következtethetően a Shank fehérjék befolyásolják a szinapszisok fejlődését és a jelátvitelt (Luo et al., 2011). A Shank a Homer EVH1 domén a PPxxF motívummal kerül interakcióba, ez a motívum azonban minden Shank konstrukcióban más. A Shank1 esetében: PLPPPLEFSN, Shank2-nél: PLPPPLEFAN vagy FLPPPEFDA, Shank3-nál pedig LVPPPEEFAN. Ez utóbbit (Shank3) használtam peptid formájában az interakció vizsgálatok során.

Több tanulmány alapján a Shank vázfehérjék kulcsfontosságúak olyan rendellenességek kialakulásában, mint a skizofrénia, autizmus vagy Alzheimer-kór, emellett azonosították a Phelan-McDermid szindróma (PMS) fő genetikai okaként is. Ez arra utal, hogy a Shank fehérje kulcsfontosságú a szinaptikus működés szabályozásában. Kutatások azt is bizonyították, hogy a PSD szerkezeti integritásához elengedhetetlenek a Shank fehérjék és a cink ionok. A Shank fehérjék SAM doménjükön keresztül kötnek a cink ionokhoz, ez alapján arra jutottak, hogy a cink külső adagolása fontos lehet abból a célból, hogy a Shank2 és Shank3 klaszterezését elősegítse (Grabrucker et al., 2011).

A Shank fehérje mutációit ASD-vel is kapcsolatba hozták (Zhu et al., 2017). Az autizmus egy komplex idegrendszer fejlődési rendellenesség, mely elsősorban társas interakciós zavarként jelentkezik (Sala et al., 2015) (Kelleher et al., 2012). Gyermekkorban, leggyakrabban három éves kor alatt kezdődik, körülbelül a gyerekek 1%-át érinti (Kelleher et al., 2012). Emellett az érzelmi és szociális hiányosságok, kapcsolati nehézségek, ismétlődő mozgások, valamint beszédminták is jellemzik. Az autista betegek általában széles spektrumú klinikai tünetet mutatnak, így a betegséget autizmus spektrum zavarnak hívjuk (ASD-Autism Spectrum Disorder) (Sala et al., 2015). Az ASD genetikai háttere heterogenitást mutat, azaz nincs egy meghatározható oka, többféle genetikai hiba is okozhatja. Több gént is azonosítottak, mint lehetséges ASD-t okozó gén, például FMR1, TSC1/2, NLG3, NLG4 és a Shank3 gént is. Ez alapján arra a következtetésre jutottak, hogy egy génten jelenlévő mutáció is szerepet játszhat a betegség kialakulásában. Az mGluR útvonalat

több bizonyíték alapján is fontos szereplő lehet az ASD kialakulásában. Az mGluR receptorok a Ras/ERK valamint PI3K/mTOR jelátviteli kaszkádokon keresztül szabályozzák egyes fehérjék szintézisét. Megfigyelték, hogy az ASD rendellenességek kialakulása összefüggésben áll olyan génmutációkkal, amelyek az ERK aktivitást, az mTOR aktivitást vagy magát az mRNS transzlációt szabályozó útvonalat érintik (Kelleher et al., 2012).



5. **Ábra:** A Shank3 fehérje sematikus ábrázolása a főbb doménekkal és aminosav számozással.

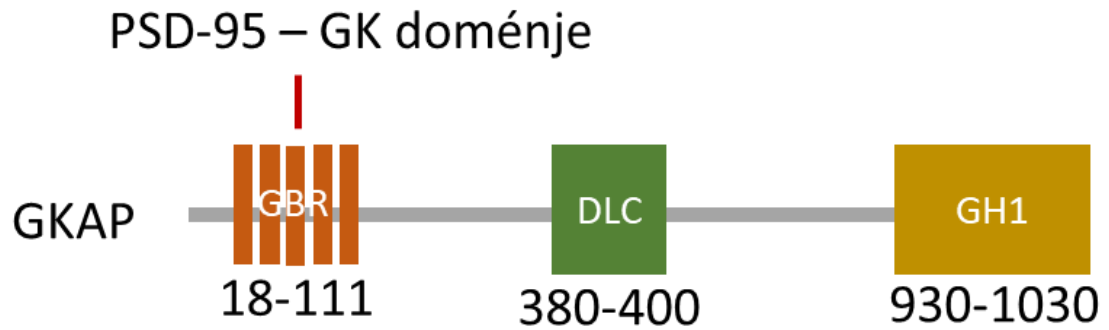
1.2.3 A GKAP fehérjecsalád

A GKAP (guanilát kináz-asszociált fehérje) vagy másnéven SAPAP (SAP90/PSD-95-associated protein) vagy DLGAP (Dlg-associated protein), egy a PSD core régiójában viszonylag nagy mennyiségben előforduló vázfehérje (Verpelli et al., 2012). A GKAP egy majdnem teljes egészében funkcionálisan rendezetlen fehérje, kötőhelyein is szerkezeti flexibilitást mutat (Droogers & MacGillavry, 2023). A rendezetlen fehérjék, vagy angolul intrinsically disordered proteins olyan teljes fehérjék vagy fehérje részek, melyek fiziológiás körülmények között nem rendelkeznek stabil, jól meghatározott térszerkezettel. Rendezetlenségükből adódóan több fehérjével is képesek interakciót kialakítani és így más-más funkciót ellátni. A GKAP négy izoformáját különböztethetjük meg (SAPAP1-4/DLGAP1-4) amelyet négy gén kódol. Mind a négy esetben eltérő expressziót figyelhetünk meg az agyban. A GKAP1 főleg a kéreg, hippokampusz, amigdala és kisagy területein expresszálódik magasan, a GKAP2 a hippokampuszban, a GKAP3 legnagyobb mennyiségben a striátumban és több talamikus magban a GKAP4 pedig pedig a kéregben, a kisagyban, a hippokampuszban és az amidalában expresszálódik. Összességében elmondható, hogy a GKAP fehérjék főleg a glutamáterg és a kolinerg szinapszisokban expresszálódnak, a glicinerg és GABAerg szinapszisokban nem fordulnak elő, azaz a serkentő szinapszisok alapvető komponensei (Bai et al., 2022). Az állványfehérjék csoportjába tartozik, legfőbb szerepe a szinapszisok méretének, jelátviteli működésének szabályozásában, módosításában, felerősítésében van, expresszióbeli változásuk, mutációjuk különböző betegségekhez vezethet, mint az ASD, Alzheimer-kór, skizofrénia vagy a kényszerbetegség (OCD) (Bai et al., 2022) (Zhu et al., 2017). Alzheimer-kór és skizofrénia esetében

a GKAP fehérje megváltozott expresszióját, illetve epigenetikai szabályozási zavarokat figyeltek meg.

A GKAP fehérjét négy főbb régió alkotja, az N-terminálison található GBR (GK binding region) régió, a C-terminálison helyet foglaló globuláris GH1 (GKAP homology domain1), a kettő között pedig a szintén rendezetlen dynein könnyű láncot kötő régió (DLC binding region) és egy prolingazdag domén található (6. ábra). A PSD-95 GK (peptidkötő funkciójú guanilát kináz) doménjével lép interakcióba a rendezetlen, öt darab 14 aminosavas ismétlődésből álló GBR régió. Ez az interakció foszforilációfüggő, Zhu et al. 2017-es közleményében kimutatták, hogy foszforiláció nélkül az interakció nagyon gyenge, nem stabil, viszont amennyiben az ismétlődésekben található 5 szerin foszforilálva van, erős kötés jön létre a két fehérje között. A foszforilálás nem csak az interakcióhoz, hanem a GKAP által közvetített szinaptogenezishez is szükséges (Zhu et al., 2017) (Droogers & MacGillavry, 2023). A GK domén több másik fehérjében is előfordul a PSD-95 mellett, mint például a SAP97, SAP102, chapsin-110/PSD-93 vagy ZO-1, ZO-2, CASK stb. Két-hibrid módszerrel vizsgálták a GKAP kötődését ezen fehérjék GK doménjéhez. Azt tapasztalták, hogy a PSD-95 alcsaládba tartozó MAGUK fehérjék esetében létrejött a GK-GKAP kötés, viszont például nem volt interakció a GKAP és ZO-1 fehérje között. Ez GK domének aminosavsorrendjének hasonlóságával is összhangban van. A chapsin fehérje GK doménje pl. 70% azonosságot mutatott a PSD-95 GK doménjével, míg a ZO-1 fehérje GK doménje mindössze 30%-os azonosságot mutat (Kim et al., 1997). A GKAP a DLC régiójával a DLC2 és DLC8 fehérjékhez köt. A GH1 domén interakciói jelenleg kutatás alatt állnak, nem teljesen tisztázottak. A GKAP fehérje C-terminális régiójával a Shank fehérje PDZ doménjéhez köt. A GKAP fehérje köti össze a PSD-95 fehérjét a Shank molekulákkal, így kialakítva a PSD központi komplexét. Összességében tehát a GKAP fehérjék fontos közvetlen vagy közvetett szerepet játszanak a sejten belüli jelátvitelben, összekötik többek között a PSD-95 és a Shank/Homer fehérjéket. De emellett kapcsolódnak a neuroligin nevű sejtadhéziós fehérjéhez, különböző ionotróp glutamát receptorhoz (NMDA, AMPA, kainát és Shaker-típusú káliumcsatorna), metabotróp glutamát receptortokkal (mGlu1/5) és további jelátviteli fehérjékkel. Összekötik a PSD-t az aktin citoskeletonnal és különböző útvonalakat kapcsolnak össze. A GKAP fehérjék szabályozása foszforiláción keresztül valósul meg, amelyet különböző kinázok végeznek, pl. CaMKII, PKA, PKC, AKT1. Fentebb említett módon a PSD-95-GKAP interakció is foszforilációfüggő. A GKAP fehérjék elengedhetetlenek a PSD fehérjehálózatának szervezésében és a szinaptikus struktúra fenntartásában. Ezt az is alátámasztja, hogy ha mutáció hatására gátlódik a GKAP fehérje lebomlása, akkor az aktivitásfüggő PSD-95, Shank átrendeződés gátlódik, az AMPA receptorok felszíni szabályozásában is zavar

keletkezik, így a GKAP lebomlásának zavarai nagy hatással lehetnek a szinaptikus plaszticitásra, abnormális viselkedési jelenségekhez vezetve (Bai et al., 2022).



6. **Ábra:** A GKAP fehérje sematikus ábrázolása a főbb doménekkal és aminosav számozással.

2. Célkitűzések

Munkám során célul tűztem ki a GKAP és Homer1 posztzinaptikus fehérjék szerkezetének, dinamikájának és partnerkötésének vizsgálatát, a GKAP GBR régiójára, valamint a Homer1 EVH1 doménjére, ezen belül annak adott mutáns változataira fókuszálva az alábbiak szerint:

-A Homer EVH1 oldatfázisú szerkezetének véglegesítése és összehasonlító szerkezeti-dinamikai elemzése

A Homer1 EVH1 domén mágneses magrezonanciával történő térszerkezet-meghatározásával Czajlik András és Maruzs Brigitta jelentős mértékben előrehaladt, azonban még nem volt publikálható állapotban. Célul tűztem ki az utolsó szerkezetfinomítási lépések elvégzését, ehhez kapcsolódóan a dinamikai mérések kiértékelésének véglegesítését, valamint a kapott eredmények összehasonlító elemzését és funkcionális értelmezését.

-A Homer EVH1 doménben előforduló két pontmutáció szerkezeti hatásának vizsgálata mágneses magrezonanciával

Célom volt az M65I és az S97L pontmutáns EVH1 domének expresszálása, tisztítása, NMR mérésekre alkalmas egyszeresen (^{15}N) és duplán izotópjelölt (^{15}N és ^{13}C) minták előállítása. Az NMR mérések során keletkezett spektrumok kiértékelése, ezen belül a jelhozzárendelés elvégzése, illetve a belső dinamika jellemzésére alkalmas mérések feldolgozása és kiértékelése, valamint a mutánsok globális szerkezetének, illetve stabilitásának vizsgálata SAXS és TSA mérésekkel. A kapott eredmények kiegészítése és értelmezése számítógépes elemzésekkel, illetve mutánsok összevetése a vad típusal és egymással.

-A két pontmutáció funkcionális hatásának vizsgálata Shank3 interakciós mérésekkel, illetve NMR titrálásokkal

A szerkezeti és dinamikai vizsgálatok mellett az is a célom volt, hogy megvizsgáljam az egyes pontmutációk hatását az EVH1 domén Shank3 peptiddel történő interakciójára. Ehhez mind az interakció erősségének meghatározására alkalmas BLI méréseket, mind a ligandummal kialakított kölcsönhatás részleteinek elemzésére alkalmas NMR vizsgálatokat kívántam elvégezni, kiegészítve a komplexek hőstabilitásának jellemzésével.

-A GBR1-3 fehérje tisztítási protokolljának beállítása, optimalizálása, a fehérje NMR vizsgálata

Célul tűztem ki GKAP fehérje funkcionálisan rendezetlen, az irodalom alapján korábban ilyen formában nem előállított és jellemzett GBR1-3 régiója termelési és tisztítási protokolljának kidolgozását és optimalizálását, valamint NMR vizsgálatra alkalmas minta előállítását. Céлом volt továbbá a GBR1-3 fehérje NMR mérése, majd a kapott spektrumok kiértékelése, a jelhozrendelés elvégzése, a fehérje rendezetlen jellegének részletes jellemzése céljából.

3. Módszerek

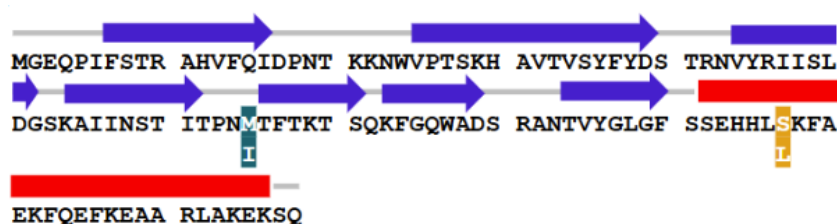
3.1 A Homer1 EVH1 domén és variánsai biotechnológiai előállítása

A fehérje expresszióhoz a BL21 (DE3) *Escherichia coli* baktériumokat használtam, a klónozásokhoz, illetve a plazmidok felszaporításához pedig a DH5 α nevű *E. Coli* törzset használtam. Az *E. coli* több mint egy évszázada szolgál úgynevezett modellorganizmusként különféle kísérletekben, mind genetikai, evolúciós, és molekuláris biológiai tekintetben (Cobo-Simón et al., 2023). Ezek a baktériumok képesek arra, hogy plazmidot vegyenek fel a citoplazmájukba. A plazmid egy kisméretű, kör alakú, kettős szálú extrakromozómális DNS molekula, mely különállóan replikálódik a kromozómális DNS-től (Esser, 1986), esetünkben a termeltetni kívánt fehérjéket kódoló DNS-szakasz hordozására szolgál.

3.1.1 Expressziós vektor és gazdaszervezet

A vad típusú Homer1 EVH1 konstrukció, valamint az M65I és az S97L pontmutánsok klónozását egy bakteriális expressziós vektorba, a plazmid előkészítését, majd a fehérjék tisztítási protokolljának alapvető beállítását laborunk egyik volt kollégája, Maruzs Brigitta végezte el. Expressziós vektorként a pEV2 nevű vektort használtuk, amely egy olyan genetikai elemeket tartalmazó plazmid, amely elősegíti a beinertált DNS szakasz expresszióját -esetemben a Homer1 fehérje EVH1 doménjét. Ezt a pEV2 vektort Süveges Dánieltől kaptuk, és valójában egy módosított pET-15b plazmid, amely a thrombin hasítóhely helyett TEV proteáz hasítóhelyet kódol a célfehérje és annak izolálását elősegítő peptidszakasz (expression tag) között. Ebbe az alapvektorba Papp István és Homonnay Csilla ligálta be a PCR-el előállított, vad típusú Homer1 EVH1 domént (a Q9Z2Y3 Uniprot azonosítójú szekvencia, 1-118 aminosavai) kódoló DNS szakaszt, melynek pontos

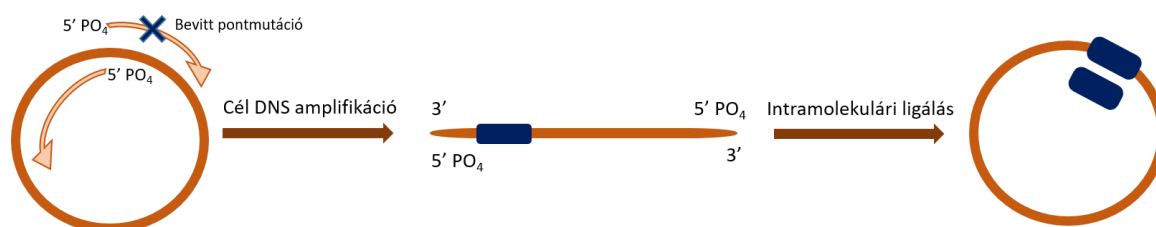
szekvenciája a 7. ábrán található. A ligálás az NdeI (5'...CA'TATG...3') és BamHI (5'...G'GATCC...3') restrikciós enzimek hasítóhelyei közé történt. A pEV2 expressziós vektor tartalmaz továbbá egy promotert és egy terminátor régiót az inzert előtt és után, egy ampicillin rezisztencia gént, amely szelekciós faktorként szolgál. Emellett egy replikációs origót is, azaz egy olyan DNS szekvenciát, ahová a DNS-polimeráz tud kapcsolódni, hogy elindítsa a replikációt. A beligált szakasz előtt található egy úgynevezett 6xHis-tag (peptid címke), amely a TEV proteázzal eltávolítható a fehérjéről az affinitás kromatográfiát követően. A vektor tartalmazott még egy lacI gént is, ez szabályozza a promotert és teszi lehetővé az indukciót IPTG segítségével.



7. **Ábra:** A Homer1 EVH1 domén szekvenciája a másodlagos kémiai elemek és a mutációs helyek feltüntetésével. Zölddel az M65I, sárgával az S92L mutáció helye vannak jelölve.

3.1.2 In vitro PCR mutagenézis

A M65I és az S97L pontmutáns EVH1 doméneket kódoló plazmid konstrukciókat Maruzs Brigitta hozta létre a vad típusú fehérje plazmidjának mutagenézisével. Az eljárás során a teljes plazmid lett amplifikálva olyan PCR primerekkel, melyek az adott mutációra lettek megtervezve (1. Táblázat), vagyis a mutációkat a PCR primerekkel vittük be a képződő lineáris termékekbe. A PCR termékeket ligálással cirkularizáltuk, ezáltal visszakaptuk az eredeti plazmidot, de immár a kívánt mutációval (8. ábra).



8. **Ábra:** Az *in vitro* PCR mutagenézis lépései. A két primer közül az egyik (forward) tartalmazta az M65I, illetve S97L pontmutációkat (az ábrán kék X-el jelölve). Mindkét primer tartalmazott 5' foszforilált véget, ami a két vég egymáshoz való ligálásához kellett az amplifikációt követően. A plazmid megsokszorozásához PCR-t használtunk, így keletkeztek a módosított szekvenciát

tartalmazó egyenes templátok. Ezt követően ezek az egyenes fragmentek cirkularizálódtak intramolekuláris ligálás hatására, az így keletkezett plazmidokat transzforáltuk baktérium sejtekbe.

1. Táblázat: A mutáns EVH1 primer szekvenciái. A táblázatban a mutációt kialakító reverz és forward primerek szekvenciái láthatóak. Az első két sor primerei az M65I mutációt viszik be a H118 konstrukcióba, az utolsó két sor primerei pedig az S97L mutációt viszik be a H118 konstrukcióba. Pirossal az elmutált nukleotidok láthatóak.

| Oligo név | Szekvencia |
|--------------|-------------------------------------|
| H118- M65I_F | ATCACACCAAACAT T ACATTTACTAA |
| H118- M65I_R | GGTGCTATTATTATTGCCTTTGAG |
| H118- S97L_F | AGCATCATCTTT T AAAATTCGCAGA |
| H118- S97L_R | CAGAGGAGAATCCCAGTCCATAAAC |

A PCR (polimeráz-lánreakció) egy olyan molekuláris biológiai eljárás, amellyel DNS egy kis darabját tudjuk amplifikálni, ennek segítségével az adott protokollban a teljes, EVH1 domént kódoló plazmidot megsokszoroztuk. Ehhez a következő PCR keveréket használtuk: 0,2 µl Fusion High Fidelity Polimeráz (alacsony hibaarányú polimeráz), 0,4 µl 10 mM dNTP, 4 µl 5xHF puffer, 2 µl templát (5 ng/µl, vad típusú EVH1 plazmid), 0,5-0,5 µl forward és reverse primerek (10-10 µM, a primerek szekvenciáját ld. az 1. Táblázatban) a reakció végtérfogata 20 µl volt. A PCR reakciót a SimpliAmp Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific) készülékkel végeztem el a következő protokollt használva: 98 °C 1 perc denaturáció, majd 35 ciklus: 10 másodperc 98 °C denaturáció, 30 másodperc 60 °C anellálás, majd elongáció 72°C 3,5 perc. Az utolsó lépés pedig az úgynevezett lánczárás, ami 72°C-on történt 5 percen keresztül. Ennek a folyamatnak az eredményeképp egyenes, lineáris PCR terméket kapunk. Ahhoz, hogy kör alakú DNS legyen belőle foszforilálási és ligálási lépésekre is szükség van. Ehhez két enzimet használtunk, egy polinukleotid kinázt (PNK) és egy T4 DNS ligázt. Első lépésként 10 percig 70 °C-on denaturáltuk, majd rögtön jégre helyeztük a PCR terméket. Ezt követően a PCR termék 10-50 ng-ját (0,5 µl) kezeltünk 10 µl végtérfogatú PNK mixben (1x T4 ligáz Puffer, 1 mM ATP) 0,5 µl PNK enzim hozzáadásával. 10-15 perc 37°C inkubálás után következett a ligálás: a PNK reakció 10 µl-éhez 0,5 µl T4 DNS ligáz enzimet és 9 µl 1xT4 ligáz puffert adtunk, majd 22 °C-on 1-2 órán át ligáltunk. A cirkularizált PCR termékeket DH5α sejtekbe transzformáltuk, melyeket szelektív (ampicillines) lemezekre szélesztettünk. A ligálási reakció ellenőrzésére negatív kontroll reakciókat készítettünk, ennek során a ligáláshoz azonos

mennyiségű, de foszforilálatlan PCR terméket használtunk. A DNS végek foszforilációjának hiányában a negatív kontroll reakciókban nem történhetett meg a PCR termékek cirkularizációja, ezért ezekről nem kaptunk telepeket a transzformáció után.

A transzformálás után kinőtt telepekből plazmid klónokat izoláltunk, melyeket Sanger szekvenálással ellenőriztünk annak érdekében, hogy egyértelművé váljon, nem történt nemkívánt mutáció vagy hiba a plazmid megsokszorozása közben. A Sanger szekvenálást az Eurofins Genomics cég végezte el mind a vad típusú mind a mutáns EVH1 plazmidokon.

A hibátlan klónok közül egyet-egyét választottunk ki, a továbbiakban ezeket a klónokat használtuk a fehérjetermeléshez.

3.2 A Homer1 EVH1 variánsok expressziója

A transzformálás 5 µl (100 ng) - fentebb leírtak alapján előállított - plazmid felhasználásával történt 50 µl ultrakompetens BL21 (DE3) sejtekbe. Annak érdekében, hogy a baktériumokba a plazmid bejusson, hősokk kezelést végeztem. Ehhez a sejteket 1,5 percre 44 °C-os vízbe tettem, majd 5 percig jégen pihentettem (Inoue et al., 1990). Ezt követően 250 µl ampicillin mentes LB médiumot adtam a sejtekhez, majd 37 °C-os inkubátorba tettem 220 rpm-en 30 percig rázódni. Ezt követően 100 µl baktérium-médium keveréket szélesztettem ki ampicillin tartalmú táptalajra. Ezt szintén 37 °C-os inkubátorba tettem egy éjszakára, másnapra több telep is képződött. Először egy prekultúrát készítettem, amihez 7 ml ampicillin tartalmú LB médiumot használtam, ebbe oltottam át a táptalajról steril pipetta hegy segítségével 1-1 baktérium kolóniát. A prekultúra ezt követően egy éjszakára a 37 °C-os inkubátorban rázódott 190 rpm-en. Másnapra a prekultúra kellően zavarossá vált, azt jelezve, hogy a baktériumok sikeresen szaporodtak. A prekultúrát átöntöttem steril, 500 ml ampicillin tartalmú LB-be, majd 37 °C-os inkubátorba helyeztem 130 rpm-en rázatva addig, amíg a sejtek sűrűsége, denzitása el nem érte a kívánt 4-5 közötti McFarland unitot / egységet (MFU, ami megfelel 0,8 OD₆₀₀-nak). Amint a kellő denzitásukat elérték, a fehérje expresszió indukálása volt a következő lépés, ez 1 mM izopropil-β-D-tiogalaktozid (IPTG) hozzáadásával történt. IPTG hozzáadást követően, hogy a baktériumok osztódását minimalizáljam és a fehérje expresszióhoz szükséges körülményeket optimalizáljam, a kultúrák egy éjszakán át 20 °C-on 140 rpm-en voltak rázatva. Másnap a sejteket centrifugálással leüleptettem, hogy a médiumot és a sejteket külön válasszam. Ez 30 perces centrifugálást jelentett 4 °C-on és 4500 rpm-en. Ezt követően a felülúszót (médium) leöntöttem a sejtekről.

A fenti protokoll jelöletlen fehérjék termeléséhez volt használatos. Ezt olyan vizsgálatokhoz használtam, amelyekhez nem volt szükség az izotópos jelölésre, azaz például a Biolayer Interferometria vagy SAXS vizsgálatokhoz. NMR mérésekhez azonban izotóp jelölt mintára volt szükségem. Az NMR méréshez dupla jelölt (^{15}N és ^{13}C izotóppal), az NMR titráláshoz ^{15}N jelölt mintákat használtam. Ennek függvényben az expressziós protokoll is változott abból a szempontból, hogy nem LB médiumot, hanem M9 minimál médiumot adtam a sejtekhez (Marley et al., 2001), amelyben a kizárólagos nitrogénforrás az ammónium-klorid, a kizárólagos szén forrás pedig a glükóz. N jelölés esetében csak ^{15}N izotópos ammónium-kloridot (2.5 g/l $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ [Cambridge Isotope Laboratories, Cambridge, MA]) tartalmazott az M9 médium, míg duplán jelölt minta esetében ^{13}C jelölt glükózt és ^{15}N izotóp jelölt ammónium-kloridot (4g/l [^{13}C]-D-glükóz) egyaránt.

A ligandummal történő titráláshoz és a CEST mérésekhez csak ^{15}N jelölt mintákat alkalmaztam, ugyanis ezek a kísérletek a jelhozzárendeléshez szükséges méréseknél lényegesen később történtek, és az új mintáknál technikailag egyszerűbb, olcsóbb és a mérések szempontjából elegendő volt az ^{15}N jelölés alkalmazása.

3.3 A Homer1 EVH1 variánsok tisztítása

3.3.1 A sejtek feltárása ultrahangos homogenizálással

Mind a jelölt, mind a jelöletlen fehérjék esetében a további tisztítási protokoll ugyanazokat a lépéseket követte. A centrifugálást követően a sejteket lízispufferrel (300 mM NaCl, 50 mM foszfát puffer, késhegynyi lizozim enzim pH 7.4) tártam fel. A sejt-pelletek tömegét tizedgrammos pontossággal lemértem, majd ennek megfelelően 10%-os sejtszuszpenziót készítettem (1,5 g pallethez 15 ml lízispuffet adtam). Ezt követte a sejtek ultrahangos feltárása, a szonikálás. A szonikálás egy fizikai módszer, magas frekvenciájú hanghullámokat alkalmaz (20-50 kHz között általában). Ez a lépés ahhoz kellett, hogy a baktériumban lévő fehérjék hozzáférhető váljanak, azaz, hogy a baktérium sejtfa megnyíljon, felszakadjon. A szonikálás végig jégen történt, ez nagyon fontos abból a szempontból, hogy elkerüljük a fehérjék hő hatására történő denaturációját, illetve proteolízisét. A szonikálás 10-15 perces blokkokban, egyszerre kisebb, ~3 ml-es adagokban történt 30%-on pulzálassal 30%-os teljesítménnyel, valamint a későbbiekben kipróbáltuk a magasabb teljesítményen történő szonikálást is, ami szintén hatásos volt és gyorsabb is. Rövidebb idő alatt, kb 5-7 perc alatt sikerült a mintát (~5 ml) szonikálni 60%-os

teljesítménnyel. A szonikálást követően az volt a cél, hogy a baktérium sejtfalat, illetve a baktérium többi citoplazmatikus összetevőjét elválasszuk a fehérjéktől, ehhez a szonikált mintát 11000 rpm-en lecentrifugáltam 20 percig 4 °C-on. A pellet tartalmazta a sejtfalat és citoszolikus elemeket, a fehérje a felülúszóba került.

3.3.2 Affinitás kromatográfia

A centrifugálás során keletkező felülúszót átöntöttem egy másik edénybe, majd innen egy fecskendő segítségével injektáltam az első tisztítási lépés, az affinitás kromatográfia megfelelő oszlopára. Az FPLC készüléken történt a nikkelt-oszlop (Nuvia Bio-Scale Mini IMAC 5 ml, BioRad) ekvibrálása binding pufferrel. Ez a puffer azonos a lízis pufferrel, a lizozim kivételével. Az FPLC készülék számos előnnyel bír a manuális, gravitációs oszloppal való tisztítással szemben. Az FPLC szoftvere és detektorai lehetővé teszik, hogy vizuálisan is nyomon követhessük a tisztítás egyes fázisait, emellett lehetővé teszi a frakciók pontosabb begyűjtését, ezzel pedig azt, hogy tisztább mintához jussunk. A szonikált és lecentrifugált baktérium felülúszó frakciója nemcsak a célfehérjét, hanem a baktérium által termelt összes oldható fehérjét és nukleinsavat is tartalmazta. A sok fehérje közül azonban csak a célfehérje tartalmazta a His címkét, melynek segítségével interakcióba tudott lépni az oszlopban lévő szilárd fázissal, a nikkelezett gyöngyökkel. A tisztítás elején a fentebb említett binding puffert használtam, ennek segítségével az oszlopról lemosásra került az összes olyan fehérje és nukleinsav, ami nem kötődött az oszlophoz. Ez az úgynevezett átfolyó frakció. Ezt követően egy mosási lépést hajtottam végre, melynek célja, hogy lemossa az oszlopról az olyan gyengén kötött szennyező fehérjéket és nukleinsavakat, amelyek gyengébb, aspecifikus interakcióba kerültek az oszlop szilárd fázisával. Ehhez mosópuffert használtam, ez annyiban különbözött a binding puffertől, hogy 50 mM imidazolt is tartalmazott. Az imidazol molekula kémiaiilag hasonló a hisztidin aminosavak oldalláncához, ezáltal pedig úgymond verseng a His címkével a nikkelt gyöngyökhöz való kapcsolódásban. Miután megszabadultam az összes gyengén kötött fehérjétől, a cél az volt, hogy az interakciót megszüntessük a nikkelt gyöngyök és a célfehérje között. Ennek érdekében 250 mM imidazolt adtam a binding pufferhez. Így az oszlopról lejövő úgynevezett elúciós frakció begyűjtésre került. A fehérje His címkéje zavarhat egyes vizsgálatoknál, különösen NMR-nél, ezért a His címke eltávolításra került. Ehhez DTT-t (1 mM végkoncentrációban) és TEV proteázt (~0,3 mg/15 mg fehérje) adtam a mintához. A megfelelő levágódás eléréséhez a mintát 10 °C-on inkubáltam 16 órán át. A Tev hasítás sikerességét SDS-PAGE futtatással ellenőriztem.

Az SDS-PAGE eredményei alapján már az IMAC után kapott minták is 90% feletti tisztaságúak voltak, de egészen halványan látszott pár sáv a molekulalétra magasabb fokainál is, amiktől hogy

megszabaduljak, további tisztítási lépéseket végeztem el. Affinitás kromatográfia után maradhatnak a mintában nem specifikusan kötődött fehérjék, különböző oligomer állapotok és mivel az NMR-hez nem csak tiszta, hanem homogén minta is szükséges, így töltés alapú elválasztást is alkalmaztam. Ez volt az ioncsere kromatográfia, amellyel a töltésben eltérő szennyeződésektől tudtam megszabadulni. Legvégül pedig, hogy megszabaduljak az esetleges aggregátumoktól, oligomerektől stb. méretkizárásos kromatográfiát alkalmaztam, ez egyben ahhoz is kellett, hogy a fehérje puffertartalmát beállítsam az NMR méréshez szükségesre. A három tisztítási lépést követően SDS-PAGE nem mutatott szennyező sávokat, így közel 100%-os tisztaságú mintát kaptam.

3.3.3 Ioncsere kromatográfia

Második tisztítási lépésként az ioncsere kromatográfiát alkalmaztam. Ennek lényege, hogy a fehérjéket töltésük alapján választjuk szét. Azonban mielőtt nekifogtam volna ennek a tisztítási lépésnek, még egy nagyon fontos feladat várt rám, a puffer kicserélése alacsony sótartalmú pufferre. Az IMAC elúció 300 mM NaCl tartalmú pufferrel valósult meg, viszont a só megakadályozza a fehérje IEC oszlophoz való kötődését, így egy puffercsere oszlop (3 darab Sephadex G-25 Superfine tartalmú egymásba kötött HiTrap Desalting 5 ml oszlop) segítségével 20 mM NaCl tartalmú pufferre cseréltem az IMAC-nál használt puffert. Ehhez a puffercsere oszlopot ekvilibrálni kellett az alacsony sós 20 mM NaCl, 50 mM nátriumfoszfát, pH 7,4-es pufferrel, majd átfolyatni rajta az IMAC után kapott fehérjét. A folyamat lényege, hogy a fehérje gyorsabban fog eluálódni, mint a puffer (a kis molekulák, köztük a só is bejutnak az oszlopot alkotó gyanta pórusaiba, így később eluálódnak, míg a nagy molekulák, köztük a fehérjék nem férnek be ezekbe a pórusokba, így hamarabb fognak eluálódni, azaz lejönni az oszlopról, azaz a retenciós térfogatuk kisebb). Ezt követően az IEC oszlopot rácsatlakoztattam az FPLC készülékre. Az oszlop lehet kation vagy anion kicserélő. Az alapján, hogy a célfehérje milyen töltésű, választjuk ki a megfelelő IEC oszlopot. A Homer1 EVH1 fehérje pozitív töltésű 7,4-es pH-n, így egy negatívan töltött anion kicserélő oszlopot (5 ml-es Bio-Scale Mini Macro-Prep S Cartridge) használtam. A fehérje oszlopra injektálása után rögtön átfolytak azok a fehérjék, amelyek nem pozitív, hanem a célfehérjével ellentétes, negatív töltésűek, így további nemkívánatos fehérjéktől tudtam megszabadulni. A tisztítási protokoll beállításánál gradiens elúciót használtam, azaz 20 mM-ról 1000 mM-ra emeltem a sótartalmat egyenletesen, ám a minta elég tisztának bizonyult izokratikus elúciónál is, ezért a későbbiekben emellett döntöttem, vagyis egy lépésben emeltem 20 mM-ról 1000 mM

NaCl-re a sótartalmat, hogy megszakítsam a gyöngyök és a fehérje interakcióját és hozzájussak a célfehérjéhez.

A TEV hasítás során levágódott His címkéket is el kellett távolítani a levágódást követően. Ehhez az úgynevezett reverz IMAC tisztítási lépést végeztem el. A reverz IMAC lényege, hogy az IEC elúciós frakciójához 25 mM imidazolt és erre a pufferre ekvibrált IMAC gyöngyöket tettem (250 ml-t), hogy megkössék a levágott His címkét. Pár perc inkubáció után a mintát lecentrifugáltam, majd a felülúszót lepipettáztam. Ennek hatására a His címke elválasztásra került a Homer fehérjétől. A 9. ábrán látható SDS-PAGE alapján a TEV hasítás sikeres volt.

3.3.4 Méretkizárásos kromatográfia

Utolsó lépésként a méretkizárásos kromatográfiát alkalmaztam. Céloom ezzel az volt, hogy méretük alapján szabaduljak meg az esetlegesen még a mintában maradt szennyező fehérjéktől és egyidejűleg a magas sótartalmú puffert egy olyan pufferre cseréljem, ami kompatibilis az adott vizsgálattal, amit később szeretnénk elvégezni (ez alacsony sótartalmú puffer volt az NMR esetében). A SEC előtt még egy fontos lépés volt a minta koncentrációja, azaz a fehérje töményítése, minél több felesleges puffer eltávolítása. A koncentráció ultraszűrő oszlop (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filters, 3K) segítségével történt több 3-5 perces centrifugálási lépésben (4°C-on, 5000 rpm-en), az egyes lépések között a mintát pipetta segítségével kevertem meg. Ezeket a lépéseket addig ismételtam, amíg a minta hozzávetőlegesen 10 mg/ml fehérjekoncentrációt nem mutatott, kb. 1 ml térfogatban. A töményítési folyamatot NanoDrop 2000 készülék segítségével ellenőriztem. A kellően tömény mintából 600 µl-t az FPLC készülékre csatlakoztatott SEC oszlopra (SEC70 analitikai gélkromatográfiás oszlop, Bio-Rad) injektáltam. Az oszlopot az injektálást megelőzően alacsony sós foszfát pufferre (20 mM NaCl, 50 mM foszfát puffer, pH 7,4) ekvibráltam. A minta viszonylag nagy térfogatban jött le az oszlopról (kb 2-3 ml), így egy újabb koncentrációt kellett végrehajtanom, amíg a minta elérte a kívánt, NMR méréshez szükséges térfogatot és koncentrációt. A koncentrációt ez alkalommal is NanoDrop spektrofotométerrel mértem, majd utolsó lépésként SDS-PAGE vizsgálatra is sor került, hogy ellenőrizzem a minta állapotát (pl., hogy nem csapódott-e ki, aggregálódott-e) illetve, hogy lássam, kellően tiszta mintát kaptam-e, tartalmaz-e a minta más sávot a célfehérje sávján kívül. A Homer1 EVH1 esetében a várakozásoknak megfelelően 13 kDa környékén volt megfigyelhető ez a sáv (a fehérje tömege jelöletlen minta esetén, a szekvencia alapján 13718,37 Da). Az SDS-PAGE vizsgálat minden tisztítási lépés között elvégzésre került, így meggyőződhettem, hogy a fehérje stabil, a tisztítási lépések pedig működnek. Annak érdekében, hogy a minta hosszabb ideig használható legyen, tartósítószerrel, nátrium azidot adtam a mintához 0,02% koncentrációban.

3.4 A Homer1 EVH1 variánsok szerkezetének, dinamikájának és hőstabilitásának vizsgálata

3.4.1 Cirkuláris dikroizmus spektroszkópia (CD)

Az Elektronikus Cirkuláris Dikroizmus spektroszkópiával, vagy röviden ECD-vel különböző molekulák (pl. poliszacharidok, polipeptidek és fehérjék stb.) konformációját, konformáció változását vizsgálhatjuk. Ahhoz, hogy az ECD sikeres legyen, kromofór jelenléte szükséges (fehérjék esetében ez általában a fehérjegerinc a királis α -szénatomokkal), amely - kémiai környezetének függvényében - különböző mértékben képes elnyelni a polarizált fényt. Fontos, hogy a kromofór egy optikailag aszimmetrikus környezetben legyen, azaz egy királis molekulán (Pain, 2005). Az ECD méréssel a fehérjék másodlagos szerkezeti elemei, mint az α -hélix, β -redő vagy random coil előfordulása és aránya mutatható ki. Mindhárom szerkezeti elem különböző CD görbét rajzol ki optikai tulajdonsága alapján. A CD egy érzékeny módszernek tekinthető másodlagos szerkezeti elemekre nézve, így tehát arra is használható módszer, hogy ellenőrizzük az előállított rekombináns fehérje minőségét. A spektrum mérése általában 180 és 260 nm-es UV tartományban történik. Amennyiben egy fehérje kizárólag α -hélixekkel rendelkezik, 210 és 222 nm között láthatunk egy lokális minimumot és negatív csúcsot 193 nm-nél. β -redő esetében a negatív csúcs 218 nm-nél, pozitív csúcs pedig 195 nm-nél figyelhető meg. Random coil szerkezet pedig 198 nm-nél mutat negatív- és 218 nm-nél pozitív csúcsot. A módszer arra is alkalmas, hogy meghatározzuk a feltekeredést illetve a konformációs stabilitást (Wei et al., 2014). Az ECD spektroszkópiás vizsgálat a JASCO J-1500 CD spektrométerrel (JASCO Corporation, Tokyo, Japan) került elvégzésre az Eötvös Loránd Tudományegyetem Fehérjemodellező Kutatócsoportjában, Farkas Viktorral együttműködve. A méréshez 1 cm úthosszú kvarc küvettát használtunk (J/21, Jasco). A mérés 195-250 nm intervallumban történt, 50 nm/perc szkennelési sebességgel, 1 nm sávszélességen, 0,2 nm lépésmérettel, 0,5 másodperces válaszüddel és 3 felvétel akkumulációval és alapvonal-korrektcióval. A mérésekhez 10 μ M töménységű mintát használtam. A minta 50 mM nátrium-foszfát puffert, 20 mM NaCl-t tartalmazott 7,4-es pH-n. Különböző hőmérsékleteken is végeztünk el méréseket 20 °C-tól 60 °C-ig, 10 °C-os emeléssel. A másodlagos szerkezeti elemek meghatározása és az adatok kiértékelése a BeStSel nevű szoftverrel történt: <https://bestsel.elte.hu> (Micsonai et al., 2022).

3.4.2 Tömegspektrometria a fehérje molekulatömegének meghatározásához

A tömegspektrometria (MS) egy olyan érzékeny, analitikai módszer, amellyel meghatározhatjuk molekulák tömegét, illetve, akár ismeretlen vegyület beazonosításában is tud segíteni. A módszer előnye, hogy kis mennyiségű minta is elegendő. Az MS első lépése a molekulák ionizálása, majd ezek elválasztása tömegük és töltésük szerint. Majd következik a detektálás, az eredményül kapott spektrumok a detektált ion jelintenzitását mutatják a töltés/tömeg arány függvényében. MS méréshez TEV hasított, jelöletlen és jelölt fehérje mintákra volt szükség, mindhárom (vad típus, M65I és S97L) EVH1 domén változat vizsgálata megtörtént, a pontos molekulatömeg meghatározásra került. A mérések elvégzését Pap Istvánnak köszönhetjük. A HPLC-MS méréseket egy Shimadzu LC-MS-2020 készülékkel végeztük el Reprospher-100 C18 oszloppal, pozitív-negatív kettős ionforrással (DUIS±) és kvadrupól MS analizátorral m/z 50-1000 tartományban. Gradiens elúciót alkalmaztunk a következő eluensok felhasználásával: A eluens (0,1% hangyasav vízben) és B eluens (0,1% hangyasav acetonitrilben). Mindhárom fehérje molekulatömege megegyezett a várttal. ¹⁵N jelölt minta esetén a jelölés hatékonysága 98%-osnak, a ¹³C jelölés esetében pedig 98%-osnak bizonyult.

3.4.3 Nukleáris mágneses rezonancia (NMR) spektroszkópia

Az NMR egy olyan kémiai szerkezetvizsgáló módszer, amellyel molekulák háromdimenziós térszerkezetét, kölcsönhatásait, interakcióit, valamint dinamikáját határozhatjuk meg. Egyaránt alkalmas rendezett, globuláris és rendezetlen fehérjék vizsgálatára, ez azért is jelentős, mert a hagyományosan legelterjedtebb szerkezetvizsgáló módszer, a röntgenkristallográfia szinte kizárólag rendezett fehérjék vizsgálatára alkalmas, és az újabban előretörő krio-elektronmikroszkópia is elsősorban ezek esetében használható. Így nagy előrelépés volt fehérjék szerkezetvizsgálata terén az NMR készülékek és módszerek elterjedése. A folyamatosan fejlődő, egyre újabb mérési technikákat felvonultató NMR egyik nagy előnye a röntgendiffrakcióval és a krio-EM módszerekkel szemben, hogy a molekuláris mozgások széles időskálán történő, atomi szintű vizsgálatára is alkalmas. Az NMR vizsgálat történhet szilárd vagy oldott állapotban lévő mintán is. Utóbbi esetben fontos további előny, hogy a fehérje a vizsgálat során natív vagy közel natív állapotban marad. Az NMR által mért adatok segítségével információhoz juthatunk a mért minta szerkezetét illetően, feltérképezhetjük a kémiai kötések, és még az egyes atommagok térbeli elhelyezkedéséről is kaphatunk információt.

Az NMR mérések alapja, hogy a megfelelő mágneses tulajdonságokkal rendelkező atommagok (a gyakorlatban $\frac{1}{2}$ spin, ilyen mag pl. az ^1H , a ^{13}C és a ^{15}N) mágneses térbe helyezve diszkrét energiaállapotokat vesznek fel, melyek közötti átmenet adott módon gerjeszthető. Minden atommag környezete sajátos, a körülötte lévő elektroneloszlás a lokális és a globális szerkezet függvénye, és egyedi módon módosítja a külső mágneses teret az atommag közvetlen környezetében. Ezek az egyedi különbségek okozzák a gerjesztési energiák piciny eltéréseit, mely a kémiai eltolódás jelensége, amely a gyakorlatban azt okozza, hogy az egyes atommagok jelei a spektrumokban eltérő pozícióban jelennek meg.

A makromolekuláris NMR vizsgálatok esetében – az NMR-aktív magok alacsony természetes gyakorisága és az alkalmazható mintakonzentrációk miatt – a mintákat sokszor izotópjelölt formában kell előállítanunk. Attól függően, hogy milyen jelölést használunk, más-más információkhoz juthatunk a különböző atomokról. Amennyiben mind nitrogén (^{15}N) és szén (^{13}C) jelölést is alkalmazunk, úgy a fehérje csaknem minden atomjáról közvetlen jelet kaphatunk, ami pedig többféle információt hordoz a molekula dinamikájáról és szerkezetéről. Fontos, hogy a jelölés legalább 90%-ot meghaladó arányban legyen a természetben előforduló ^{12}C és ^{14}N gyakoriságok helyett, ahhoz hogy a méréskor kapott eredmények használhatóak legyenek.

Az izotóppal jelölt mintákon sokféle mérést lehet elvégezni, a jelátfedések elkerülésére és adott kémiai kapcsolatok feltérképezése céljából a fehérjék esetében általában legalább kétdimenziósak, pl. ^1H - ^{13}C vagy ^1H - ^{15}N korrelációs HSQC (heteronuclear single-quantum coherence¹) spektrumok. A mágneses magrezonancia mérések egyik elsődleges célja az adott atommagok kémiai eltolódásának meghatározása, azaz a jelhozzárendelés vagy asszignáció. Ehhez tipikusan 3D spektrumokat veszünk fel, amelyek a fehérjék adott atomjai közötti kapcsolatok feltérképezésére szolgálnak, ezáltal azonosíthatóak az ugyanazon aminosavakhoz tartozó, egymáshoz kapcsolódó atomok, valamint a szekvenciában egymás után következő aminosavak is. A jelhozzárendelés során a felvett különböző spektrumok (HNCA, HN(CO)CA, HN(CA)CO, HNCO stb., a nevek azokra az atomokra utalnak, amelyek között az adott mérés kapcsolatot mutat ki) egyidejű használatával, az aminosavszekvencia ismeretében a spektrumokban fellelhető atomi kapcsolatokon „végiglépkedve” tudjuk az egyes atomok kémiai eltolódását meghatározni. A gyakorlatban ehhez többféle szoftver áll rendelkezésünkre, melyek a spektrumok megjelenítése mellett a kapcsolatok, ill. a hozzárendelés kapcsán szóba jöhető

¹, a név az atommagok közötti mágnesezettség átadásának módjára utal, itt tovább ezt nem részletezem

aminosavak és szekvenciárszletek megmutatásával is segítik a feladat elvégzését. Én a munkám során a CCPNMR szoftvert használtam Windows környezetben.

Az egyik legfontosabb spektrum típus a ^1H - ^{15}N HSQC, ez az egymással közvetlen kötésben lévő protonok és nitrogénatomok közötti korreláción alapul, ezáltal minden amid N-H csoporthoz tartozik egy jel, amelyek így egy-egy aminosavat jelentenek. Bizonyos nitrogéntartalmú oldalláncok is jelet adnak a spektrumban (pl. Trp, Arg, Gln, Asn, Lys), viszont az amid protonnal nem rendelkező prolinok, illetve a protonálható és emiatt sokszor az oldószerrel gyors cserében lévő terminális aminocsoport nem jelenik meg. A HSQC spektrumot a fehérje ujjlenyomatának is lehet tekinteni, amely minden fehérjére nézve egyedi, ugyanis nagyon érzékeny az egyes aminosavak lokális kémiai környezetére. A HSQC spektrum arra is kiváló, hogy segítségével megmondjuk, hogy a mért fehérje globuláris vagy rendezetlen. Rendezett fehérjék esetében a jeldiszperzió sokkal szélesebb skálán mozog, a jelintenzitás azonban gyengébb, míg rendezetlen fehérjéknél ez a tartomány sokkal szűkebb. Ez azért van, mert nincs stabil szerkezetük, konformációjuk változik, ennek a mozgásnak köszönhetően sok aminosav egy kiátlagolt, hasonló környezetben van. A rendezetlen fehérjék esetében a szűk spektrumtartomány miatt a jelátfedés is nagyobb, viszont fehérje dinamikája miatt a jelek intenzitása tipikusan erősebb. A HSQC spektrumok fontos felhasználási területe pl. mutációk hatására bekövetkező változások vizsgálata a mutáns és a vad típusú fehérje spektrumának összevetésével, illetve a ligandumkötés hatására bekövetkező változások követése. Mindkét esetben fontos, hogy a módszer érzékenysége miatt információt kaphatunk nem csupán a mutáció vagy a ligandum által közvetlenül érintett régiókról, hanem a fehérje távolabbi részein bekövetkező szerkezeti és/vagy dinamikai változásokról is. Bár a ligandumkötés esetében azt várjuk, hogy elsősorban a partnerrel közvetlenül érintkező aminosavak jelei változnak, a kötőhelytől távolabb lévő atomok érintettsége allosztérikus hatásokra utalhat.

A kémiai eltolódásokból a fehérjék lokális szerkezetére is következtethetünk. Elsősorban a $\text{C}\alpha$ és $\text{H}\alpha$ atomok esetében lehet az ún. másodlagos kémiai eltolódásokat a fehérjék másodlagos szerkezeti elemeivel összefüggésbe hozni. A másodlagos kémiai eltolódásokat úgy kapjuk, hogy a mért értékeket egy általános, „szerkezetnélküli” szakaszra becsült ún. random coil kémiai eltolódáshoz viszonyítjuk. A random coil eltolódások számítására számos módszer létezik, amelyek figyelembe veszik az aminosav szomszédságokat is (Kovács & Bodor, 2023).

A fehérjék mágneses magrezonanciával történő szerkezetmeghatározása hagyományosan az ^1H - ^1H távolságokon alapul. Ez főleg olyan molekuláknál fontos, amelyek nem kristályosíthatóak (Frueh, 2014) (Bax & Clore, 2019) (Marion, 2013). Ezeket a távolságokat az ún. nukleáris

Overhauser effektus (NOE) segítségével tudjuk meghatározni, mely a térben egymáshoz közeli ^1H atommagokról ad információt. Elegendő ilyen közeli atom-atom távolság segítségével a fehérje térszerkezete megfelelő programok (pl. Cyana, XPLOR-NIH) segítségével kiszámítható. A szerkezetmeghatározás hosszadalmas, iteratív folyamat, ugyanis az egyes kémiai eltolódások adott atomhoz, és emiatt az egyes távolságok atompárokhoz rendelése nem mindig egyértelmű, és valamennyi zajjal is terhelt. A gyakorlatban a számítás a programok sokszor egymás után történő futtatását igényli különböző beállításokkal és a jelhozzárendelés folyamatos javításával. Az ^1H - ^1H távolságok mellett a szerkezetszámolás adott stádiumában a másodlagos eltolódásokból becsült, a lokális szerkezetre vonatkozó torziós szögek is felhasználhatóak.

A mágneses magrezonancia legnagyobb erőssége, hogy képes információt szolgáltatni a fehérjék belső dinamikájáról több időskálán is, atomi szinten. A gyors, ps-ns időskálájú dinamika globuláris fehérjék esetében leginkább az ún. Lipari-Szabó-féle modellfüggetlen (model-free) elemzéssel vizsgálható, melyhez ^{15}N T1 és T2 relaxációs, valamint ^1H - ^{15}N heteronukleáris NOE paraméterek szükségesek. Ezek a paraméterek megfelelő spektrumok, ill. spektrumsorozatok segítségével kaphatóak meg, és összefüggést mutatnak mind a molekula globális mozgásával, mind az egyes aminosavak molekulán belüli mozgékonyásával. A model-free elemzés a gyakorlatban egy két lépésből álló matematikai illesztési folyamat, az első lépésben a molekula ún. globális rotációs korrelációs idejét (τ_c) becsüljük meg a T1 és T2 relaxációs paraméterek segítségével. Ez az idő azt mutatja meg, hogy átlagosan mennyi idő alatt fordul el a molekula az oldatban 1 radiánnak megfelelő mértékben. A globuláris fehérjéket első körben merev testként közelítve ez képet ad a molekula méretéről is. Az illesztés második lépése a τ_c ismeretében az egyes aminosavak, pontosabban a gerinc amid N-H csoportjainak lokális mozgása, melyet különböző paraméterkészletekkel írhatunk le a mozgás összetettségének függvényében - a bonyolultabb modelleket akkor alkalmazzuk, amikor az egyszerűbbek nem adnak megfelelő illeszkedést a kísérleti paraméterekhez. Az én munkám során alkalmazott két legfontosabb paraméter az S^2 rendparaméter (order parameter) és a kémiai kicserélődésre utaló R_{ex} hozzájárulás. Előbbi a gyors, ps-ns időskálájú mozgásokat amplitúdóját jellemzi, értéke 0-1 között lehet, az 1 azt jelenti, hogy az adott amid N-H teljesen együtt mozog a molekula egészével, ahhoz képest (molecular reference frame) nem flexibilis. Alacsonyabb értékek az adott aminosav, amid NH nagyobb mértékű molekulán belüli flexibilitására utal. Az R_{ex} értékek az illesztés során akkor szükségesek, amikor a T2 relaxációs idők alacsonyak (vagy máshogy fogalmazva, az $R_2=1/T_2$ relaxációs ráták magasak), ami tipikusan arra utal, hogy az adott amid N atom kémiai környezete a μs -ms időskálán változik. A gyakorlatban adott értéknél (pl. 2,5 1/s) magasabb R_{ex} értékeket arra utaló jelként tekintük, hogy az adott aminosav valamilyen lassú időskálájú mozgásformában érintett.

Az NMR időskáláján lassú (μs - ms) belső elmozdulások részletes jellemzésére többféle mágneses magrezonancia eljárás létezik, ilyenek a relaxáció diszperziós, $R_{1\rho}$ és CEST módszerek. Ezek képesek az adott időskálájú belső mozgás rátáját, illetve a közvetlenül nem észlelhető, alacsony populáltságú, a fő konformerrel kicserélődésben lévő állapotra jellemző kémiai eltolódásra is becslést adni. A munkám során is alkalmazott CEST (chemical exchange saturation transfer) mérés azon alapul, hogy az éppen rejtett állapotban lévő atom gerjesztése a fő állapot jelén is észlelhető, ha a két forma közötti konformációs csere sebessége a mérés időskálájára esik.

Az NMR méréseket a Debreceni Egyetemen végezte el Dr. Batta Gyula a Bruker Avance NEO 700 MHz spektrométerrel 298 K hőmérsékleten. Az M65I és S97L mutánsok esetében rezonancia vizsgálathoz 500 μl mintát használtunk, amelyek tartalmaztak 50 mM nátrium-foszfát puffert, 20 mM NaCl-t, 0,02% NaN_3 -at 7,4-es pH-n, valamint 6% D_2O -t. Az M65I fehérje koncentrációja 491 μM , az S97L fehérje koncentrációja pedig 560 μM volt. A következő spektrumok felvétele történt meg. 2 dimenziós: ^1H - ^{15}N HSQC, ^1H - ^{13}C HSQC, 3 dimenziós: HNCO, HNCA, HNCACB, HN(CO)CACB, HN(CA)CO, HN(CO)CA. Emellett készültek HCCCONH (S97L esetében), HCCH-TOCSY és TOCSY-HSQC spektrumok is. A nyers mérések feldolgozása, valamint a spektrumok előzetes vizsgálata a Bruker TopSpin szoftverrel történt. A processzált spektrumok részletes elemzéséhez és a jelhozzárendeléshez a CCPNMR v3.2.3 szoftvert (Vranken et al., 2005) és az NMRFAM Sparky programokat használtuk (Lee et al., 2015). A másodlagos kémiai eltolódásokat a Tamiola et. al (Tamiola et al., 2010) által leírt módszerrel számoltuk a CoNSENsX⁺ szerver segítségével (Dudola et al., 2017).

A szerkezetfinomításhoz kiindulásként a Czajlik András kollégám által az ATNOS/Candid/Cyana eljárás segítségével, ^1H - ^1H távolságokat és a TALOS-N program segítségével a kémiai eltolódások alapján becsült torziós szögekre vonatkozó kényszerfeltételeket is használó protokollal kapott kiindulási szerkezeteket használtam. A számolásokhoz az XPLOR-NIH programot használtam, kizárólag az előzetes protokoll által a szerkezet mellé kimenetként kiadott ^1H - ^1H kényszerfeltételek listáját használva. A finomítás előtt a NOE kényszerfeltételeket kézzel ellenőriztük, hogy kizárjuk a fennmaradó nem triviális redundanciákat, például a geminális protonok esetében az ugyanazon partneratomhoz való közelség sztereospecifikus és összevont definiálását. A Cyana formátumú listát XPLOR formátumra kellett konvertálnom az atomi nevezéktan különbségeit is figyelembe véve, ehhez a csoportunkban írt Perl nyelvű szkripteket használtam. Ennek során a kezdeti protokoll kimenetként kapott sztereospecifikus kényszerfeltételeket megtartottuk. A finomításhoz az XPLOR-NIH „refine.py” protokolljának módosított változatát használtam, ez egy ún, szimulált hőkezeléses (simulated annealing) eljárás, amelyben a felső hőmérsékletet jelentősen, 150 °C-ra csökkentettem, hogy a kiindulási geometria

ne változzon túlságosan. A protokollt a kiindulásként használt, 20 tagot tartalmazó sokaság minden konformerére egyesével lefuttattam, és mindegyik esetében a kapott legalacsonyabb energiájú konformert megtartva állítottam elő a finomított 20 tagú sokaságot, melyet beküldtünk a PDB adatbázisba. A validálást az RCSB szabványos validációs szolgáltatásával (RCSB validation server), valamint a PSVS 1.5 verziójával (Bhattacharya et al., 2007) végezték. A szerkezet vizualizálása a MOLMOL (Koradi et al., 1996) és a Chimera (Pettersen et al., 2004) segítségével történt. Az elektrosztatikus felszámolást az ABPS segítségével számították ki, amely elérhető a <https://server.poissonboltzmann.org/> oldalon (Jurru et al., 2018).

Az EVH1 domén és variánsai belső dinamikájának meghatározásához a ma már hagyományosnak tekinthető, Lipari-Szabó féle modellfüggetlen (model-free) eljárást használtam. Az NMR-mérések a standard Bruker könyvtár pszeudo-3D T1, T2 és heteronukleáris NOE spektrumai voltak. A vad típus esetében a szerkezetmeghatározáshoz is alkalmazott duplán (^{13}C , ^{15}N) jelölt, a mutánsok esetében egyszeresen (^{15}N) jelölt mintákat használtunk a dinamikai mérésekhez. A késleltetési idők a T1 méréshez 40, 80, 120, 160, 200, 300, 400, 600, 1200 és 2400 ms voltak, a T2 méréshez pedig egy 16,96 ms-os ciklus (a Bruker pulzusszekvencia p30 és d21 paramétereiből számolva) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 12, 15, 18 ismétlésével. A ^1H - ^{15}N heteronukleáris NOE-t váltakozó módon mértük 7s (vad típus), illetve 8s (mutánsok) késleltetési idővel. A méréseket a Topspin programmal dolgoztam fel, melynek része volt a pszeudo-3D spektrumsorozatok szétválasztása egyedi spektrumokra. A Sparky formátumba konvertált egyedi spektrumokat az NMRFAM-Sparky program 1.413 verziójával (Lee et al., 2015) elemeztem, a csúcsok intenzitását és azok alapján a T1 és T2 relaxációs idők illesztését is ezzel a programmal végeztem. A model-free elemzést a kapott paraméterek alapján a Tensor2 programmal (Dossset et al., 2000), a vad típusú EVH1 domén szerkezetét felhasználva végeztem el. Az elemzésnél hangsúlyt fektettem arra, hogy az egyes variánsok esetében konzisztensen járnak el. Az elemzésekhez nem használtam fel azon aminosavak adatait, amelyekhez tartozó amid NH keresztcsúcsok jelentős átfedést mutattak egymással. A rotációs korrelációs idő (τ_c) illesztésekor kizártam az elemzésből azokat az aminosavakat, amelyek T1/T2 hányadosa az összes érték átlagától legalább az adatok szórásának megfelelő mértékben eltért (bármely irányban). A model-free illesztéshez nem használtam fel az 1-nél nagyobb, illetve nagy negatív heteronukleáris NOE értéket mutató aminosavakat. A végső diszkusszióban nem vettem figyelembe az irreális paraméterekkel (pl. 1-nél nagyobb S^2 rendparaméter) jellemezhető aminosavakat.

A ^{15}N jelölt mintákon elvégzett CEST mérések kiértékelését a ColmarVista (D. Li & Brüscheiler, 2025) programmal végeztem. Mivel az ezzel kapott adatokban nem észleltünk a kémiai cserére utaló utaló egyértelmű jelet, az adatok matematikai illesztését nem végeztem el.

3.4.4 Kiszögű röntgenszórás (SAXS) vizsgálatok

A SAXS adatokat a Rigaku BioSAXS-2000 készülékkel mértük le a CEITEC intézetben (Csehország, Brno) Tomas Klumpler segítségével. A készülék egy HyPix-3000 nevű detektorral van felszerelve 0,48 m-es minta-detektor távolságban. A szórásintenzitást 0,008-0,65 1/Å intervallumban mértük le, ahol $q = 4\pi \sin \theta / \lambda$; 2θ a szórási szög és $\lambda = 0,154$ nm. Hat darab 10 perces mérés adatait gyűjtöttük be 25 °C-os mintahőmérsékleten. Az adatok a beeső sugár intenzitásához lettek normalizálva, majd radiálisan átlagolva. Az egyes mérések szórási görbéi sugárzási károsodás szempontjából is ellenőrizve és átlagolva lettek. Az oldószer blankból származó szórás is levonásra került, így határoztuk meg a végső szórási profilt. A SAXS görbék szerkezetalapú számítását a Pepsi-SAXS programmal (Grudin et al., 2017) végeztük, a szerkezeti modellek tartalmazták az N-terminálison lévő expressziós címkéket (GSH), hogy a mérések során ténylegesen használt konstrukciókat modellezzük.

A SAXS méréshez a mintákat az NMR-hez hasonlóan állítottam elő. Először baktérium sejtekbe megtörtént a fehérje expressziója, termelése, majd a 3 lépéses fehérjetisztítási protokoll következett IMAC, IEC és SEC lépésekkel. SAXS méréshez jelöletlen mintára volt szükségem. A minta előállítása a jelölésen kívül még abban különbözött az NMR mintához képest, hogy utólag nem lett semmi hozzáadva a pufferhez, például az azid is már az utolsó tisztítási lépésnél, a SEC oszlop ekvibrálásánál a pufferhez volt adva (20 mM NaCl, 50 mM nátrium-foszfát, 0,02% azid 7,4-es pH). Ez azért fontos, mert a minták és a minták higításához használt pufferek törésmutatójában a legkisebb eltérés is jelentős műtermék képződéshez vezethet a SAXS mérés során. Többféle töménységű minta lett lemérve; 8-, 4-, 2- és 1 mg/ml-esek. Natív PAGE is elvégzésre került a minták esetleges dimerizálódásának kizárására. A SAXS nagyon érzékeny a molekulaméretre, nagyobb molekulákat nagyságrendekkel nagyobb érzékenységgel tud detektálni, ezért rendkívül fontos a vizsgálandó fehérje dimer illetve aggregált formáitól megszabadulni, illetve minden nagyobb szennyező fehérjétől is.

3.4.5 Thermal shift olvadáspont vizsgálat

A Thermal Shift Assay-t fehérjék olvadáspontjának meghatározására, ezen felül akár fehérje-ligandum interakciók vagy fehérjeszerkezet stabilitásának meghatározásához is használjuk. A módszer lényege, hogy egy real-time PCR készülékben a fehérjét lassan melegítjük egyenletesen, miközben egy fluoreszcens festék, esetemben a SYPRO Orange (SYPRO Protein Gel Stains, Thermo Scientific), hozzá tud kötődni a fehérje felszíni hidrofób részeihez, ezáltal megnő

fluoreszcenciájának intenzitása. A hőmérséklet emelkedésével eljutunk addig a pontig, ahol a fehérje denaturálódik, így a hidrofób részek a fehérje felszínére kerülnek, és ezért a festék fluoreszcenciája hirtelen megnő. Ezt az intenzitásnövekedést detektáljuk, és a kapott olvadási görbén az inflexiós pont jelzi a fehérje denaturációs hőmérsékletét. Szokásosan a görbe deriváltját elemezzük a fehérje olvadáspontjának meghatározásához. A fehérjék olvadási hőmérséklete arányos azok stabilitásával. Amennyiben egy ligandum kötés hatására nő a fehérje denaturálási hőmérséklete, az azt jelzi, hogy a ligandum kötés stabilizálja a fehérjét (Huynh & Partch, 2015). A mérés kis mennyiségű minta felhasználásával történik, a módszer nem igényel jelölést. Az általam végzett mérések valós idejű PCR (Thermo Scientific PikoReal) készülékkel történtek. A fehérje mintákból 10 µg/µl mennyiséget használtam, míg a SyproOrange festéket 5x-ös végkoncentrációban. A méréseknél 20 µl-es fehérje-peptid-festék mixet készítettem majd töltöttem be a PCR stripekbe. A fehérje koncentrációja 0,375 mg/ml volt mindhárom esetben, a Shank3 peptidé pedig 186 mM. A qPCR gép programját úgy állítottam be, hogy a hőmérséklet 25 °C-ról 90 °C-ra nőjön 0,3 °C-os lépésekben, minden lépés között 15 másodperces várakozással és természetesen fluoreszcencia detektálással. A fehérjéket önmagukban és Shank3 peptid interakciós partner hozzáadásával is lemértem.

3.4.6 Az EVH1 domén és variánsai számítógépes elemzése

A vad típusú domén Gauss hálózati modell (Gaussian Network Model, GNM) elemzését a ProDy programcsomag segítségével végeztük el egy olyan szerkezeti modellen, amely csak a natív domén szekvenciáját tartalmazta az N-terminális expressziós szekvencia (GSH) nélkül. A modellt ennek megfelelően újraszámítottuk. A szerkezet megjelenítését a ChimeraX-szel végeztük.

A vad típusú és mutáns EVH1 doméneken hagyományos molekuladinamikai számításokat is végeztünk az általunk meghatározott oldatfázisú NMR szerkezet reprezentatív modelljéből kiindulva. Ezekhez a számításokhoz a teljes, expressziós szakaszt is tartalmazó modellt használtuk. A mutációkat tartalmazó modelleket a FoldX program segítségével állítottuk elő. Mindhárom variáns esetében 3-3 párhuzamos számítást végeztünk a GROMACS programcsomag Komondor szuperszámítógépen elérhető 2023.2 változatát használva. Az alkalmazott erőter az AMBER99SB-ILDN volt, a szimulációs környezet olyan téglatest, amelynek a falai a molekulától legalább 1 nm távolságra voltak. A szimulációkat explicit vizes környezetben, a szerkezet neutralizálása után, 1 ns NVT, majd 1 ns NPT, a nehéz atomokra pozicionális megkötéseket (position restraints) alkalmazó egyensúlyi állapot után futtattuk 1 ms szimulációs idővel, abból egyenesen 500 szerkezet mintavételezésével. A futások elemzése standard GROMACS eszközökkel, illetve a RING

(Clementel et al., 2022) eljárással történt, a megjelenítéshez a ChimeraX (Meng et al., 2023) programot használtuk.

Az ortológ szekvenciákat az OMA adatbázisból töltöttük le, illesztésüket a ClustalO eljárással végeztük a Jalview programmal. A humán EVH1 szekvenciákat az InterPro adatbázisból gyűjtöttük ki.

3.5 A Homer1 EVH1 variánsok partnerkötési vizsgálatai

3.5.1 Biolayer interferometria interakció vizsgálat

A Biolayer Interferometria (BLI) egy optikai analitikai technika, amellyel különböző molekulák közötti interakciókat vizsgálhatunk, információt kaphatunk mind nukleinsavak, peptidek, lipidek, kis molekulák vagy akár fehérjék között kialakuló interakciókról. Előnye, hogy a vizsgált molekulák nem szorulnak izotóp jelölésre. A méréseim során a FORTÉBIO cég BLItz nevű eszközét használtam. Laboratóriumunkban ez az egycsatornás készülék érhető el, ez azt jelenti, hogy egyszerre egy mintát képes vizsgálni, míg létezik ennek többcsatornás változata is, ami akár 96 vagy 384-es lemezek vizsgálatára is alkalmas egyidőben, ezt a készüléket Octetnek hívják. A készülékek egyik nagy előnye, hogy vizuálisan megjelenített, valós időben történő adatokkal szolgál, így már a mérés közben kiderül, hogy működik-e az interakció, megfelelő-e a használt puffer vagy kell esetleg valamin változtatni. A BLItz használata során szükségem volt bioszenzorra. A Homer-Shank interakció vizsgálatához a Streptavidin bioszenzort (Sartorius) használtam. De emellett többféle bioszenzor is használható attól függően, hogy a vizsgálni kívánt molekulán milyen címke van. Így tehát bioszenzor lehet anti-Fc, ami antitesthez köz, Ni-NTA, ami a His címkét-, anti-GST, ami a GST címkét- vagy anti-FLAG, ami pedig a FLAG címkét köti. A bioszenzoron kívül szükségem volt még kinetikai pufferre, egy csaliként használt molekulára, ami tartalmazza azt a címkét (esetemben a Shank3 peptid biotinált volt, melynek segítségével a streptavidinnel tudott kapcsolódni), amivel a bioszenzorhoz köt, illetve szükségünk van még egy úgynevezett analit molekulára, más néven csali molekulára, amely interakciós partnereként szolgál. Amennyiben az interakció létrejön, biolayer megvastagodást tudunk detektálni a szenzor felületén. A biolayer vastagságának real-time mérése a szenzorban levetített fehér, és a szenzor- illetve a bioréteg felületéről visszaverődött fény interferencia mintázatának elemzésével történik. A molekula kötődése során megváltozik az optikai vastagság a bioszenzor kötő részén, ezzel a visszavert fény interferencia mintázata eltolódik. A BLI módszer hatalmas előnye, hogy mindössze nagyon kevés mintára van szükségünk (4-5 µl-re). Használható még akár baktérium felülúszóból való célfehérje koncentráció meghatározására is, mivel a mintában található egyéb szennyező fehérjék nem befolyásolják az

eredményt jelentősen. Az interakció kinetikai konstansa tisztított fehérje mintából állapítható meg, kötési és disszociációs sebességek meghatározására is alkalmas. Hátrányai közé azt sorolhatjuk, hogy az eszköz szobahőmérsékleten mér, így hőérékeny minták esetében nem, vagy nehezen kivitelezhető a mérés, valamint, hogy a minta mérete, a molekulatömeg nem lehet kisebb 10 kDa-nál analit molekula esetében. Fontos, hogy a minta stabil legyen, kicsapódástól / aggregációtól mentes. A mérés kiértékeléséhez alap kinetika vagy haladó kinetikai beállítások is használhatóak, mindkettőt használtam. Alapbeállításoknál a csali már rögzítve van a szenzorhoz, így az analit minta asszociációját és disszociációját tudjuk vizsgálni. Haladó beállítások esetében a csali fehérje a mérés során kötődik a bioszenzorhoz. A mérés előtt a bioszenzort az előre elkészített pufferben kell ekvilibrálni legalább 10 percig, illetve a mérés első lépése a bioszenzor pufferbe mártása, azaz az alapvonal felvétele. Ezt követi a lépés, amely során a csali fehérjét adjuk a bioszenzorhoz, majd újabb alapvonal felvétel történik. Majd az analit minta hozzáadása következik. Amennyiben az interakció létrejött, rétegmegvastagodást láthatunk, ez az asszociációs szakasz. Utolsó lépésként a disszociációhoz újra pufferbe mártjuk a szenzort. A BLI mérések során a kiértékelést követően kapunk egy K_d értéket, ez egy disszociációs állandó, amely két molekula között kialakuló kötődés erősségét írja le. Ennek kiszámítása az asszociációs ráta (k_s) és a disszociációs ráta (k_d) hányados ($K_d = k_d/k_a$). A BLI esetében még egy fontos paramétert kell figyelembe venni, ez az R^2 , ami azt jelzi, hogy milyen az illeszkedés mértéke. $R^2=1$ jelenti a tökéletes illeszkedést (Sultana & Lee, 2015) (Müller-Esparza et al., 2020).

A BLI mérésekhez a Streptavidin bioszenzort használtam, amit használat előtt közvetlenül 10 percig szobahőmérsékleten (25°C) hidratáltam a kinetikai pufferben, ami tartalmazott 50 mM foszfát puffert, 20 mM NaCl-t, 1% BSA-t és 0,1% Tween 20-at 7,4-es pH-n. Eredetileg alacsonyabb koncentrációjú BSA-t és Tween20-at használtam, viszont ez erős aspecifikus kötődést eredményezett Homer fehérje esetében a bioszenzorhoz. Ez az aspecifikus kötődés megnehezítette volna a mérést, fals eredményeket okozhatott volna, így ennek a problémának a megoldása volt az első lépés. Az aspecifikus kötődést megnövelt BSA (1%-ra) és Tween20 (0,1%-re) segítségével sikerült nullához közelre csökkenteni, mindössze minimális, körülbelül 0,05 nM-re ($K_d=20,5$). A kinetikai assay a BLItz (ForteBio, USA) készülékkel történt meghatározásra. A Homer interakciós partnere a biotinált Shank3 peptid volt (*LVPPPEEFANG*). A Shank3 peptidet 2 mM-os koncentrációban használtam és mártottam bele a bioszenzort 60 másodpercen keresztül. Ezt követően a kinetikai pufferbe merítés következett 30 másodpercig, majd az analitot (a Homer1 EVH1 domén vad típusú és mutáns változatait) öt különböző koncentrációban (10-, 5-, 2,5-, 1.25- és 0 μM) használtam, a bioszenzort 30 másodpercig tartottuk a mintákban. A 0 mM-os mérést használtuk referenciának, ehhez lett illesztve az összes többi görbe, tehát az úgynevezett globális

illesztési módszert használtam, hogy meghatározzam az egyes mérési sorozatok során keletkezett Kd-t a BLI szoftverének segítségével.

3.5.2 Partnerkötési vizsgálatok NMR spektroszkópiával

Az NMR spektroszkópia alkalmas arra is, hogy egy fehérje partnerkötés hatására bekövetkező változásait is jellemezzük és nyomon kövessük. Az NMR titrálás során egy konkrét mennyiségű és koncentrációjú fehérje és egy másik, hozzá kapcsolódó fehérje/peptid különböző, egyre növekvő koncentrációban való hozzáadását és az így változó kémiai eltolódásokat rögzítjük. A kémiai eltolódások megváltozása aminosavspecifikus módon szolgáltat információt a partnerkötés hatására bekövetkező szerkezeti-dinamikai változásokról. A módszer előnye, hogy oldatfázisban történik és nagyon pontos, atomi szintű eredményeket biztosít, hátránya, hogy a kémiai eltolódások megváltozásának közvetlen kiváltó oka - ami lehet a partner molekulával való közvetlen kölcsönhatás vagy allosztérikus hatás - további elemzéseket igényel.

A kémiai eltolódás perturbációk (chemical shift perturbation, CSP) a következő képlettel lettek kiszámolva: $\Delta ppm = \sqrt{0.14 * \Delta \delta N^2 + \Delta \delta H^2}$. A kémiai eltolódás perturbáció a vizsgált fehérje eltolódásainak változását követi nyomon ligandum hozzáadása során. Kémiai perturbáció változások elemzésével meghatározhatjuk a kötőhely fehérjén való elhelyezkedését, a ligandum kötése erősségét, affinitását, illetve felhasználhatjuk olyan modellezési eljárásokban, amelyekkel a kialakuló komplex szerkezetét vizsgáljuk. Adott esetben változások a közvetlen kötőhelytől távolabbi aminosavak esetében is előfordulhatnak, ez az adott fehérje nagyobb szerkezeti és/vagy dinamikai átrendeződésére utalhat. Ilyen például a kötőhelyek közötti allosztérikus kommunikáció megléte. A vizsgálathoz ^{15}N jelölt fehérjét és izotópjelölést nem tartalmazó ligandumot, esetemben peptidet használunk. A csúcsok megváltozásának pontos mikéntjét - lassú „vándorlás” vagy új pozícióban történő megjelenés - a 2D ^1H - ^{15}N -HSQC spektrumokon a szabad és kötött állapot közötti kicserélődés sebessége határozza meg, ami lehet gyors vagy lassú (Williamson, 2013).

Titráláshoz mind a vad típus, mind a két mutáns EVH1 fehérjék előállítottam ^{15}N jelölt formában, majd a már fentebb említett tisztítási protokollt követve NMR tisztaságú és nagy koncentrációjú mintákhoz jutottam. Vad típus esetében 571 μM , M65I esetében 509 μM , S97L esetében pedig 352 μM koncentrációjú minta került egy-egy 500 μl -es csőbe, majd az NMR készülékbe. A minták le lettek mérve önmagukban is, majd A Shank3 peptid (*LVPPPEEFANG*), 4500 μM koncentrációban, 10 μl -enként lett hozzáadagolva a fehérjékhez 10 titrálási ponton keresztül. Összesen tehát 11 mérési pont eredményei kerültek meghatározásra, egy interakciós partner nélkül, majd 10 titrálási

pont folyamatosan növelve az interakciós partner koncentrációját a csőben. A kiértékelést hasonlóan a CCPNMR v3.2.3 szoftverrel végeztem el. Azokat a titrálási pontokat hasonlítottam össze, ahol a fehérje:peptid aránya kb. ugyanaz volt mindhárom esetben.

3.6 A GBR1-3 konstrukció tisztítási protokolljának optimalizálása

A GBR1-3 fehérje (a használt GBR1-3 aminosavszekvencia: ghhhhhhdyppttenlyfqGSHMGKDDEIPCRMRSGSYIKAMGDEDSGSDTSPKPSPKVAARRESYLKATQP SLTELTTLKISNEHSPKLQIRSHSYLRVAVSEVSINRSLDLD) tisztítási protokolljának beállításában rengeteg munkám van, ugyanis a fehérje erősen hajlamos kicsapódásra, így több módszer, különböző pufferek, többféle adalék hozzáadásával kísérleteztem, míg végül sikerült egy viszonylag stabil mintát kapni. A mintán NMR vizsgálat is történt, azonban az asszignálási folyamatok során kiderült, hogy a spektrumok nem voltak alkalmasak arra, hogy megbízhatóan azonosítsuk a kémiai eltolódások jelentős részét. Annak érdekében, hogy új módszereket, látásmódot tanuljak és annak reményében, hogy a GBR1-3 projekt sikeres lesz, néhány hónapot Jyväskyläben töltöttem együttműködő partnerünk, Prof. Perttu Permi laboratóriumában Erasmus program keretein belül. Az ottani tapasztalatokat is integrálva kisebb előrelépéseket sikerült tennem, de a végleges megoldás még várat magára.

A GBR1-3 plazmid már rendelkezésemre állt, Nagy-Kanta Eszter tervezte, klónozte és tisztította. A fehérje termeléshez az első lépés a plazmid *E. Coli* sejtekbe történő transzformálása volt. Ehhez 70 ng/μl plazmidot adtam 20 μl kompetens BL21 sejtekhez. A plazmid sejtekhez adása jégén történt. Ezt követte egy hősokk, ez 42 °C-os vízfürdőben történt 1,5 percig. A hősokkot követően úgynevezett SOC médiumot (20 g tripton (enzimesen emésztett kazein), 5 g élesztő kivonat, 0,5 g NaCl, dH₂O-ban feloldott 0,19 g KCl, kiegészítve 1000 ml-re majd autoklávval sterilizálva. Majd hozzáadva 10 mM MgCl₂ and 10 mM MgSO₄ használat előtt. Illetve további 20 mM steril glükóz hozzáadása) adtam a baktériumokhoz majd inkubátorba helyeztem 37 °C-ra 45 percig 250 rpm-en rázatva. Az inkubációt követően ampicillin tartalmú Petri lemezekre szélesztettem ki 50 μl-t a transzformált baktériumokból. Ismét inkubátorba tettem 37 °C-ra, majd másnapra körülbelül 100 db kolónia nőtt ki a lemezen. A kolóniákból először prekultúrát készítettem, ami azt jelentette, hogy egy napig kisebb mennyiségű médiumban rázattam és növesztettem a sejteket 37 °C-on. Ezt követően 4 darab 500 ml-es minimál médiához (200 ml 10xM9, 2 ml 1 M MgSO₄, 2 ml 0,1 M CaCl₂, 2 ml 10 mM FeCl₃, 2 ml 1% tiamin, 2 ml 1000x trace elements, 10 ml 40% glükóz, 2 g NH₄Cl, 2 ml ampicillin) adtam 30 ml a prekultúrából és növesztettem (37 °C-on, 250 rpm-en rázatva) addig, amíg az OD₆₀₀ el nem érte a 0,6-ot. Majd a hőmérsékletet lejjebb állítottam 25 °C-ra, amíg el nem

érte a 0,8-as OD₆₀₀-at. Tapasztalatom alapján a minimál médiumban termelt GBR1-3-hoz tisztább formában tudtam hozzájutni az LB médiumban termelhez képest. Izotópjelölt formában is termelésre került a GBR1-3, ¹⁵N izotóp jelölésnél például az egyetlen nitrogén forrás az NH₄Cl volt. A megfelelő denzitás elérését követően 1 mM IPTG-t adtam a sejtekhez és 20 °C-on rázattam 20 órán keresztül. Másnap következett a baktériumok szüretelése, ehhez 6000g-n 30 percig centrifugáltam a sejteket, hogy leülepedjenek az edény aljára és elválaszthatóak legyenek a médiumtól. A leülepedett sejteket jéghideg 1x-es PBS-el (25 ml) oldottam fel, majd ismét lecentrifugáltam, ezúttal 20 percig 4000 rpm-en és 10 ml PBS-el oldottam fel, ezzel együtt lettek lefagyasztva -80 °C-ra további használatig. A tisztítási lépések elkezdésekor ezt a -80 °C-os baktérium szuszpenziót 42 °C-os vízfürdőben felolvasztottam, majd GndHCl-t (guanidium hidrogénklorid) adtam hozzá (1:1 arányban) és az így kapott mixet folytattam át emulziflexen, ami egy magas nyomáson működő homogenizáló, melynek segítségével a sejtfal eltörik és hozzáférhetővé válik a baktérium által megtermelt összes fehérje, köztük a célfehérje. Emulziflexen 3 alkalommal folytattam át a mintát, majd 30 percig 2000 rpm-en lecentrifugáltam, annak érdekében, hogy a sejtfal és alkotói leülepedjenek, míg a könnyebb fehérjék a felülúszóban maradjanak, tehát, elválasztásra kerüljenek. A GBR1-3 ennek ellenére is kis számban a pellet frakcióba is került, ezt az SDS-PAGE egyértelműen kimutatta. A pellet frakciót így GndHCl hozzáadásával feloldotta, újra centrifugáltam, és az így keletkező felülúszót hozzáadtam a korábbi felülúszóhoz. Így az összes megtermelt fehérje egy helyre került. Első tisztítási lépés az IMAC volt. A tisztítást manuálisan végeztem, nagyobb méretű üvegcsőbe/polyprep oszlopba töltöttem 3 ml nikkal gyöngyöket, majd hozzáadtam a mintát, amiben a célfehérje tartalmazta a nikkal gyöngyökkel interakciót kialakítani képes 6x His címkét. Egy órán keresztül rázattam a mintát a gyöngyökkel, hogy minél hatékonyabban kötődjenek. Az egy óra letelte után két mosási lépést végeztem el, először 25 mM foszfát puffer, 150 mM NaCl-t, 20 mM imidazol és 3 M GndHCl-ot tartalmazó pufferrel mostam, majd 50 mM foszfát puffer, 300 mM NaCl és 10 mM imidazol-os mosás következett. Végül az elúció 50 mM foszfát puffer, 300 mM NaCl and 250 mM imidazol-os pufferrel történt. A GndHCl azért volt szükséges, mert a GBR1-3 kicsapódásra hajlamos, denaturált állapotban jobban megmarad, viszont NMR vizsgálathoz el kell távolítani, ugyanis natív formában szeretnénk a mérést elvégezni, így a második mosási lépés valamint az elúció már nem tartalmazott GndHCl-t. Ez a lassú, több lépéses tisztítás hozzájárult ahhoz, hogy a lehető legtöbb fehérjéhez jussunk hozzá kicsapódásmentesen. Majd, hogy megszabaduljak az imidazoltól, puffercserét alkalmaztam, ami a Sephadex tartalmú PS-10 oszloppal történt. Majd a címke eltávolítása érdekében egy dialízist állítottam össze, 2 liter folyadékban történt, 50 mM KH₂PO₄, 100 mM KCl, 1 mM DTT-t és glicerint tartalmazott, valamint a TEV enzimet. A dialízis során kis

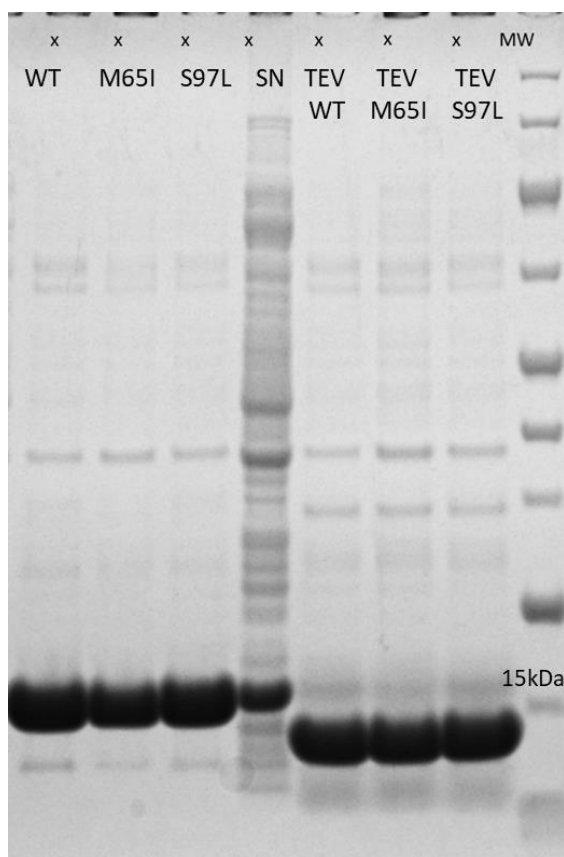
molekuláktól tudunk megszabadulni (pl. sók, reagensek). A fehérje mintát egy féligáteresztő membránnal ellátott úgynevezett dialízis tasakba tesszük, ezt pedig a 2 literes pufferoldatba. A membrán csak a kis molekulákat, így az imidazolt és a levágott címkét engedi át. A dialízis végére sajnos a minta nagy része kicsapódott, de így is maradt annyi minta, amennyivel tovább tudtam dolgozni. Ez kb. 20 mg fehérje volt NanoDrop szerint, viszont nagyon híg formában, így koncentrálni kellett a mintát. Koncentrálnál arra figyeltem, hogy nagyon lassan történjen, elkerülve a további kicsapódást. Az utolsó tisztítási lépés a SEC volt, a koncentrált minta 2 injektálás során került az oszlopra. Az oszlop 50 mM KH_2PO_4 , 50mM KCl, 1 mM DTT, pH 6,5 pufferre volt ekvilibrálva. Ez a puffer megfelelő NMR vizsgálathoz. A SEC-et az Äkta nevű géppel végeztem el hasonlóan a fentebb említett FPLC-hez, itt is valós időben látszódnak a tisztítás lépései. A tisztítást követően, amennyiben szinte azonnal megtörtént az NMR mérés, megelőzhető volt a minta kicsapódása, ha már hagytam állni, akkor sajnos a minta már nem volt használható a kicsapódások miatt. NMR-hez 196 μl (450 μM) mintát 4 μl DSS-el készítettem elő vékony NMR csövekben majd vittem el az NMR készülékhez mérésre. A kapott spektrumot elkezdtem kielemezni a CCPNMR szoftver segítségével, azonban rövid időn belül beláttam, hogy a kapott spektrumok nem elég jó minőségűek egy teljes asszignálás elvégzésére, illetve a mintában történt változások (egy, a szekvenciával triviálisan nem összeegyeztethető C-terminális fragmens jelenléte) megértése, így azok kiküszöbölése is hosszas további erőfeszítéseket igényelne. Valószínűleg speciálisabb spektrumok felvételére és stabilabb minta előállítására lenne szükség az asszignáció elvégzésére.

A GBR1-3 rendezetlen mivolta miatt kicsapódásra nagyon hajlamos fehérje, több féle módszert, puffert használtam az évek során, hogy stabil maradjon. A fentebb részletezett protokoll az, amivel a legközelebb kerültem a célhoz, de további optimalizálásra még így is szükség van. A kicsapódás elkerülése céljából a tisztításokat elvégeztem Tris-HCl pufferben, foszfátpufferben, TritonX-100, EDTA, DTT, TCEP, NaCl különböző kombinációiban és különböző koncentrációiban.

4. Eredmények

4.1 ^{15}N - ^{13}C jelölt, NMR mérésre alkalmas EVH1 variánsok előállítása

Az EVH1 domén jellemzéséhez a *Mus musculus* Homer1 fehérje (UniProt ID: Q9Z2Y3) 1-118 aminosavig terjedő szakaszát választottuk ki. Az egér, patkány és ember szekvencia 100% azonosságot mutat a Homer1 fehérje ezen szakaszán.



9. **Ábra:** A Tev hasítás sikerességének ellenőrzése. Affinitás kromatográfiát követően. Az ábra bal oldalán az IMAC után kapott mintákat látjuk. Rendkívül tömény és jó tisztaságú minták. SN alatt a tisztítást megelőzően szonikálást követő felülúszóból vett minta látható, ez még az IMAC előtti állapotot mutatja, sok egyéb fehérjét is tartalmaz a célfehérjén kívül. Jobb oldalt a Tev hasítás eredményei láthatóak, a His címke lehasítás után jól láthatóan csökkent a molekula mérete. MW alatt a méretek beazonosításához használt fehérjelétra látható.

A minta előállítása több lépésből állt, kezdve a transzformálással, aminek a sikerességét az mutatta, hogy az ampicillint tartalmazó szélesztett lemezekon több baktérium kolónia is kinőtt és telepet alkotott. A transzformálást a baktériumok felszaporítása, majd a fehérje expressziója követte. A felszaporított baktériumokból vett minta SDS-PAGE elemzése alátámasztotta a

termelni kívánt Homer1 EVH1 fehérje jelenlétét azzal, hogy a várt kb. 13 kDa helyen intenzív sávot detektáltam. A fehérjetisztítás mindhárom lépése után készült ellenőrző SDS-PAGE, hogy ellenőrizzem a fehérje meglétét, illetve azt, hogy körülbelül milyen koncentrációban van jelen. Emellett arról is információhoz jutottam általa, hogy tartalmaz-e a minta más, szennyező anyagokat, egyéb fehérjéket. A minta koncentrációját NanoDrop2000 műszerrel is ellenőriztem. NMR méréshez dupla izotóp jelölt (^{13}C és ^{15}N), nagy tisztaságú és nagy mennyiségű mintára volt szükségem. Az M65I mutáns EVH1 esetében 6,39 mg/ml (0,474 mM), S97L esetében pedig 7,29 mg/ml (0,539 mM) töménységű mintát állítottam elő sikeresen. A puffer NMR kompatibilis volt, alacsony sótartalmú, 50 mM foszfát puffert, 20 mM NaCl-t, 0,02% NaN_3 -at tartalmazott pH 7,4-en.

Mindhárom variáns esetében a kapott NMR jelhozrendelés, illetve kisszögű röntgenszórás eredményeket beküldtük a BMRB, illetve SASDB adatbázisba. A vad típusú domén térszerkezetét a PDB adatbázisba küldtük be. Az azonosítókat az 2. összefoglaló táblázat tartalmazza, az ezekhez tartozó eredmények részletezésére az egyes variánsok egyedi, ill. összehasonlító elemzése során térek ki.

2. Táblázat: Adatbázisok. Az általam vizsgált EVH1 variánsokhoz tartozó egyes kísérleti adatsorok adatbázis azonosítónak összefoglalása. A dolgozat írásakor már közzétett rekordok a beágyazott linkekre kattintva elérhetők

| Variáns | BMRB | SASDB | PDB |
|-----------|-----------------------|-------------------------|----------------------|
| vad típus | 34990 | SASDXK2 | 9QUX |
| M65I | 53479 | SASDYW3 | - |
| S97L | 53480 | SASDYX3 | - |

4.2 Tömegspektrometriás mérések

A jelöletlen EVH1 domén molekulatömegét 13,7 kDa-nak (13736,38 Da) becsültük a fehérje aminosav összetétele alapján. Tömegspektrometriás (MS) méréseink alátámasztották a becsült értéket, vad típus esetén ez 13718,37 Da lett. A vad típusú domén esetében a jelöletlenül kívül a ^{15}N és $^{15}\text{N},^{13}\text{C}$ jelölt mintákat is megvizsgáltuk tömegspektrometriával, míg a mutánsok esetében a ^{15}N izotóppal jelölt minták kerültek lemérésre. A kapott eredmények itt is összhangban voltak a becsültekkel. Az M65I mutáns esetében a becsült 13888,1 Da volt, a mért 13889,19 Da, míg a S97L

variáns esetében a becsült 13932,21 Da, a mért pedig 13944,1 Da lett. Ezek összefoglalva láthatók az *3. Táblázatban*. A helyes molekulaméreteket az SDS-PAGE vizsgálat is alátámasztotta, a várttal megegyező helyen keletkeztek sávok. A tömegspektrometriai mérések esetében a várt molekulatömegektől való eltérések részletes elemzését sajnos nem tudtuk elvégezni, mert nem állnak rendelkezésünkre részletesebb adatok a mérések pontos körülményeiről ill. a kapott spektrumokról. Mivel a minták szerkezeti (NMR, SAXS, CD) ill. funkcionális elemzése során semmilyen olyan aspektus nem merült fel, amely kétségbe vonta volna a minták integritását, az MS mérések eredményét közelítő eredményként fogadjuk el, melyek, bár ha a vártnál nagyobb hibával is, de alapvetően konzisztensek a várakozásainkkal.

3. Táblázat: Tömegspektrometria eredmények. A táblázat a szekvencia és jelölés alapján számított és tömegspektrometriával meghatározott tömegeket tartalmazza.

| | Várt tömeg a Protein Calculator alapján | Tömegspektrometriával meghatározott tömeg |
|------------------------------------|---|---|
| WT jelöletlen | 13736,38 Da | 13718,37 Da |
| ¹⁵ N WT | 13906,13 Da | 13888,11 Da |
| ¹⁵ N ¹³ C WT | 14517,6 Da | 14499,59 Da |
| ¹⁵ N M65I | 13888,1 Da | 13889,19 Da |
| ¹⁵ N S97L | 13932,21 Da | 13944,10 Da |

4.3 A vad típusú Homer1 EVH1 szerkezetének elemzése

Az ¹H-¹⁵N HSQC spektrum alapján egyértelműen megállapítható, hogy az EVH1 konstrukció jól feltekeredett szerkezetű, globuláris fehérje. Nagyfokú jeldiszperzió és elkülönülő jelek jellemzik. Az EVH1₁₋₁₁₈ domén asszignálása során a teljes gerinc- és részleges oldallánc kémiai eltolódás hozzárendelés megtörtént. A szerkezet gerincének C és N atomjai esetében az asszignáció teljessége 99%, a H atomok esetében pedig 95%. Az oldalláncok esetén a C atomok 86, a H atomok 88 százalékánál sikerült a hozzárendelés.

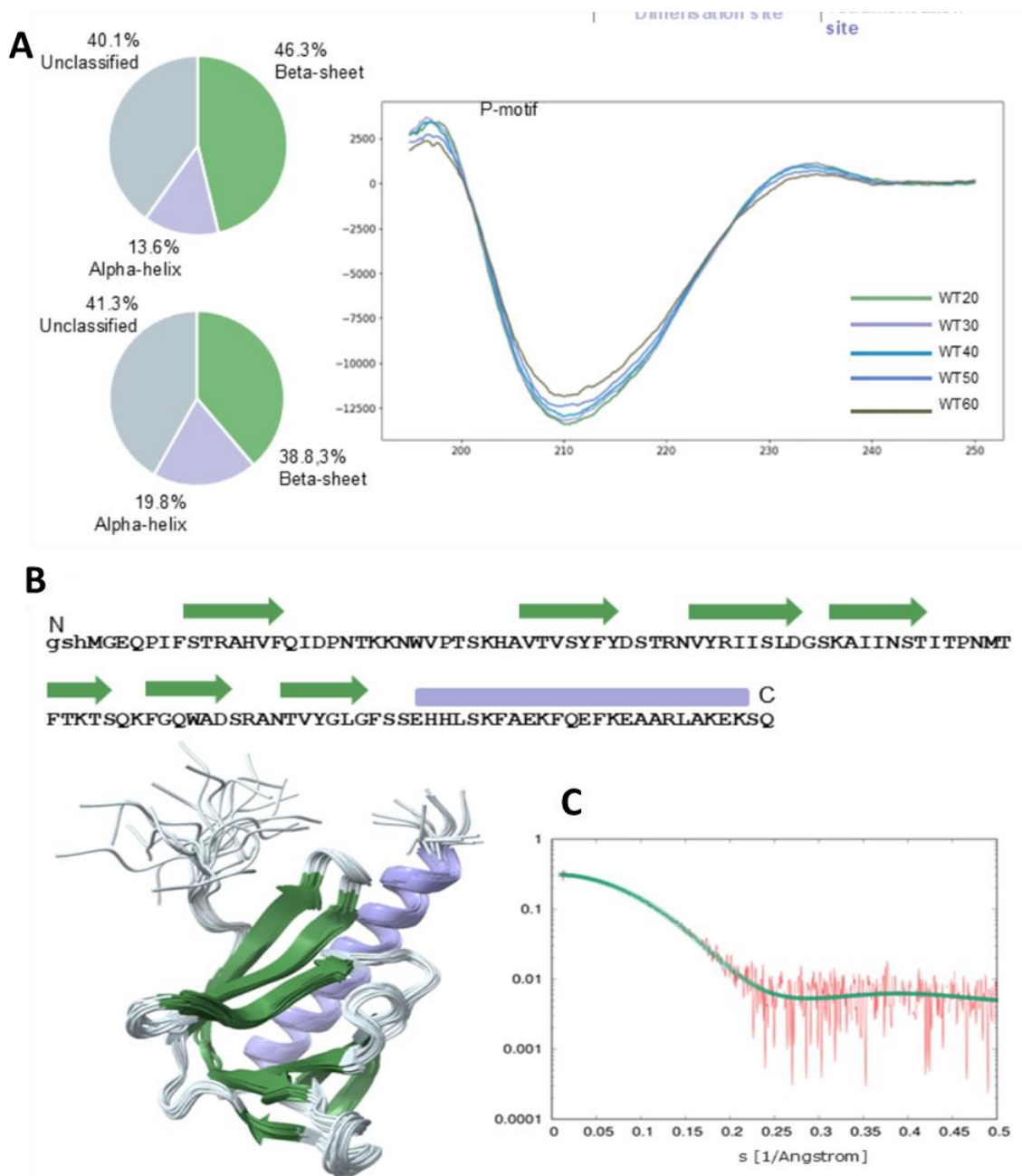
4. Táblázat: A Homer1 EVH1 domén oldatfázisú szerkezetének összefoglaló táblázata (1. közlemény).

| Asszignálás teljessége (%) | | Modell minősége ^a | |
|--|-------|--|-------------|
| Főlánc | 96 | RMSD molekulagerinc ^b (Å) | 0,3 |
| Oldallánc | 85 | RMSD molekulagerinc (összes aminosavra, Å) | 1,5 |
| Aromás | 74 | RMSD nehéz atomok ^b (Å) | 0,7 |
| Sztereospecifikus metil | 0 | RMSD nehéz atomok (összes aminosavra, Å) | 1,6 |
| | | RMSD kötэшosszak (Å) | 0,003 |
| Távolság jellegű kényszerfeltételek | | RMSD kötэшzőgek (°) | 0,4 |
| Összes | 1760 | | |
| Aminosavon belüli (i-j =0) | 420 | Molprobita Ramachandran statisztika^{a,b} | |
| Szekvenciális (i-j =1) | 487 | Legkedvezőbb tartomány (%) | 98,1 |
| Közeli (i-j >1 and i-j <5) | 262 | Megengedett tartomány (%) | 1,9 |
| Távoli (i-j ≥5) | 591 | Tiltott tartomány (%) | 0 |
| Kényszerfeltételek száma aminosavanként | 14,5 | | |
| Távoli kényszerfeltételek száma aminosavanként | 4,9 | Globális minőségi pontszámok (nyers/Z érték)^{ab} | |
| | | Verify3D | 0,27/-3,05 |
| Nem teljesülő kényszerfeltételek | | Prosall | 0,85/0,83 |
| 0,1-0,2 Å | 0,1 | Procheck (phi-psi) | -0,06/0,08 |
| 0,2-0,5 Å | Nincs | Procheck (összes) | -0,14/-0,83 |
| >0,5 Å | Nincs | Molprobita clashscore (atomközi ütközések) | 7,33/0,27 |
| | | | |
| Modell jellemzői | | Azonosítók | |
| Rendezett régió (aminosavak) | 8-118 | PDB ID | 9QUX |
| Az összes aminosav száma | 121 | BMRB ID | 34990 |

Ahol nincs külön feltüntetve, az adatok a standard PDB validációs elemzésből származnak.

^aPSVS-sel számolva

^ba rendezett régió aminosavaira (8–118) számolva



10. Ábra: A Homer1 fehérje szerkezete. Az EVH1 domén globuláris szerkezetét főleg β -redők alkotják. A különböző hőmérsékleten felvett CD-spektrumok mellett jobbra a fent a kördiagram a BestSel felbontás eredményét, az alatta lévő diagram a szerkezetből DSSP programmal kapott másodlagos szerkezeti elemeket mutatja (A). A másodlagos szerkezeti elemek elhelyezkedése a szekenciában és a térszerkezetben. Zölddel a β -szálak, lilával az α -hélix, szürkével a hurkok és összekötő régiók (B). A mért (piros) SAXS görbe összehasonlítása a PDB adatbázisba beküldött 20 konformerre számolt és átlagolt görbével (C).

A kémiai eltolódások regisztrálásra kerültek a BMRB adatbázisban 34990 azonosítóval, a Protein Data Bank adatbázisba pedig a 9QUX azonosítóval kerültek bejegyzésre. A PDB-be feltöltött

számozás az N-terminálison lévő expressziós címke miatt három pozícióval el van tolva, viszont a továbbiakban a UniProt szekvenciának (Q9Z2Y3) megfelelő számozást fogom használni. Az általam vizsgált Homer EVH1 domén oldatfázisú szerkezete nagyfokú hasonlóságot mutat a többi EVH1 szerkezettel. Az EVH1 domének alapvető szerkezeti jellemzőik alapján a tágabb PH doméncsaládba tartoznak (Ball et al., 2002). A Homer EVH1 szerkezete megfelel az irodalomban megtalálható EVH1 domének feltekeredésének, mely alapján tartalmaz egy β -szendvicset (Ball et al., 2002) 7 db β -redővel, illetve egy C-terminális hosszú α -hélixet (I. közlemény) (10. ábra A,B).

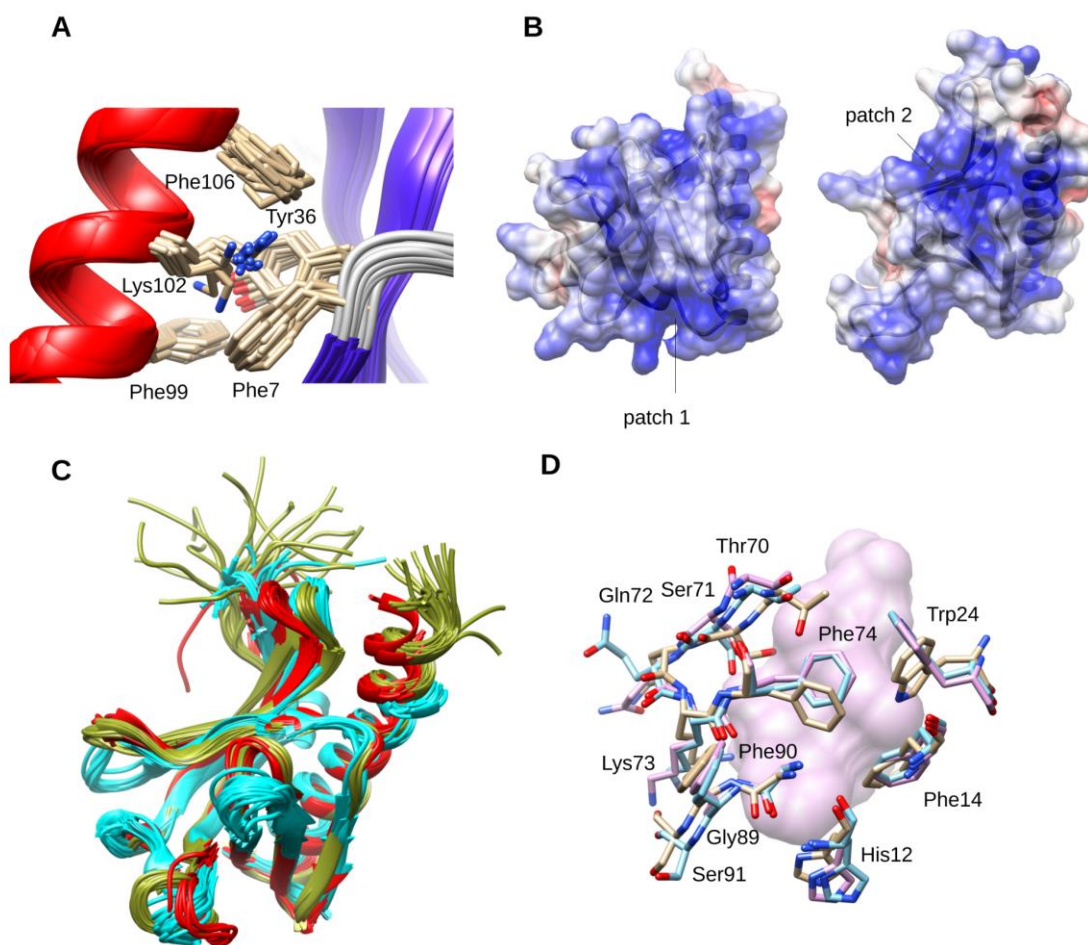
Az elvégzett SAXS mérések kiváló egyezést mutatnak a számolt szerkezettel, a kísérlet során kapott, valamint az átlagolt visszaszámolt görbék illeszkedésére vonatkozó χ^2 érték 1,067 a 20 konformer esetében (10. C ábra). A SAXS adatokat feltöltöttük a SASBDB adatbázisba SASDXK2 azonosítóval.

Azonosítottunk a kémiai eltolódások és a szerkezet alapján egy kation- π kölcsönhatást, amiről tudomásunk szerint nem tesz említést a szakirodalom, ezt mutatja az 11. A ábra. A kation- π kölcsönhatás fontos szerkezetstabilizáló szerepet játszik a fehérjék esetében, így mindenképpen érdemesnek tartottuk ezt megemlíteni.

Elektrosztatikus felszínét tekintve az EVH1 domén túlnyomórészt pozitív, emellett két méginkább pozitív területtel is rendelkezik. Ebből az első az első β -szál és a hélix N-terminális vége között található, ez a ligandumkötő helyhez közel helyezkedik el, a másik ilyen pozitívabb terület pedig a hélix C-terminális szakasza és a β -hordó csúcsa között lelhető fel (11. B ábra) (I. közlemény). Az elektrosztatikus felszín számítását az APBS programmal végeztük: <https://server.poissonboltzmann.org/>. Ez kiszámította az elektrosztatikus felszínt, amit aztán a Chimera programmal jelenítettünk meg.

Az irodalomban több elérhető Homer EVH1 szerkezet megtalálható (1ddv, 1ddw, 1i2h, 1i7a, 2p8v, 5zz9 (Irie et al., 2002) (Beneken et al., 2000) (Barzik et al., 2001) (Huang et al., 2008) (Z. Li et al., 2019), melyek mindegyikét röntgendiffrakcióval határozták meg. Tudomásunk szerint oldatfázisban a mi kutatócsoportunk végezte el az első Homer EVH1 szerkezetmeghatározást. Az NMR-szerkezetet a kristályszerkezetekkel összevetve a legnagyobb eltérés a 17-29, valamint 40-43 aminosav közötti hurokrégiókban található. Az előbbi egy hosszú hurok, egy β -hajtű csúcsát alkotja, ez több, a ligandumkötésben résztvevő aminosavakat is magában foglal (11. C ábra) (I. közlemény). Az általunk meghatározott NMR szerkezetben a Trp24 aminosav indolgyűrűjének orientációja eltérést mutat a többi EVH1 szerkezetben megfigyelthez képest, iránya majdnem merőleges a többi EVH1 szerkezetben észlelhetőekhez viszonyítva (11. D ábra). A Trp24 egyike a ligandumkötő aminosavaknak, mely oldalláncának átrendeződése hozzájárulhat a partner

prolingazdag régiója és az EVH1 aromás klaszter (Phe14, Trp24 és Phe74) közötti kölcsönhatás létrejöttéhez (I. közlemény).



11. Ábra: Az EVH1 szerkezet lokális jellemzői. A) Feltételezett kation-pi kölcsönhatás a Lys102, Phe7, Tyr36, Phe99 and Phe106 aminosavak között NMR sokaságban. B) A Homer1 EVH1 elektrosztatikus felszíne, amely a sokaság első, reprezentatív modellje alapján lett ábrázolva. Kékkel a pozitív, pirossal a negatív töltésű felszíni részek kerültek ábrázolásra. C) EVH1 domének összehasonlítása. Zöldel az általunk meghatározott NMR modell. Narancssárgával egy kiválasztott elérhető Homer1 EVH1 szerkezet (PDB kód: 1ddv). Lilával pedig egy kiválasztott, más fehérjéből származó EVH1 szerkezet (PDB kód: 1evh) lett ábrázolva. D) Ligandumkötő oldalláncok orientációja az NMR sokaság reprezentatív szerkezetében (atomtípus alapján különböző színekkel jelölve), az 1ddw szerkezetben (ligandum nélkül, kék) és az 1ddv szerkezetben (liganddal, lila). Az 1ddv-ben szereplő ligandum (mGluR peptid) pozíciója áttetsző lila felszínként van megjelenítve. Az mGluR és a Shank3 hasonló módon, az EVH1 prolin-gazdag régiójához köt.

4.3 A vad típusú EVH1 domén belső dinamikája

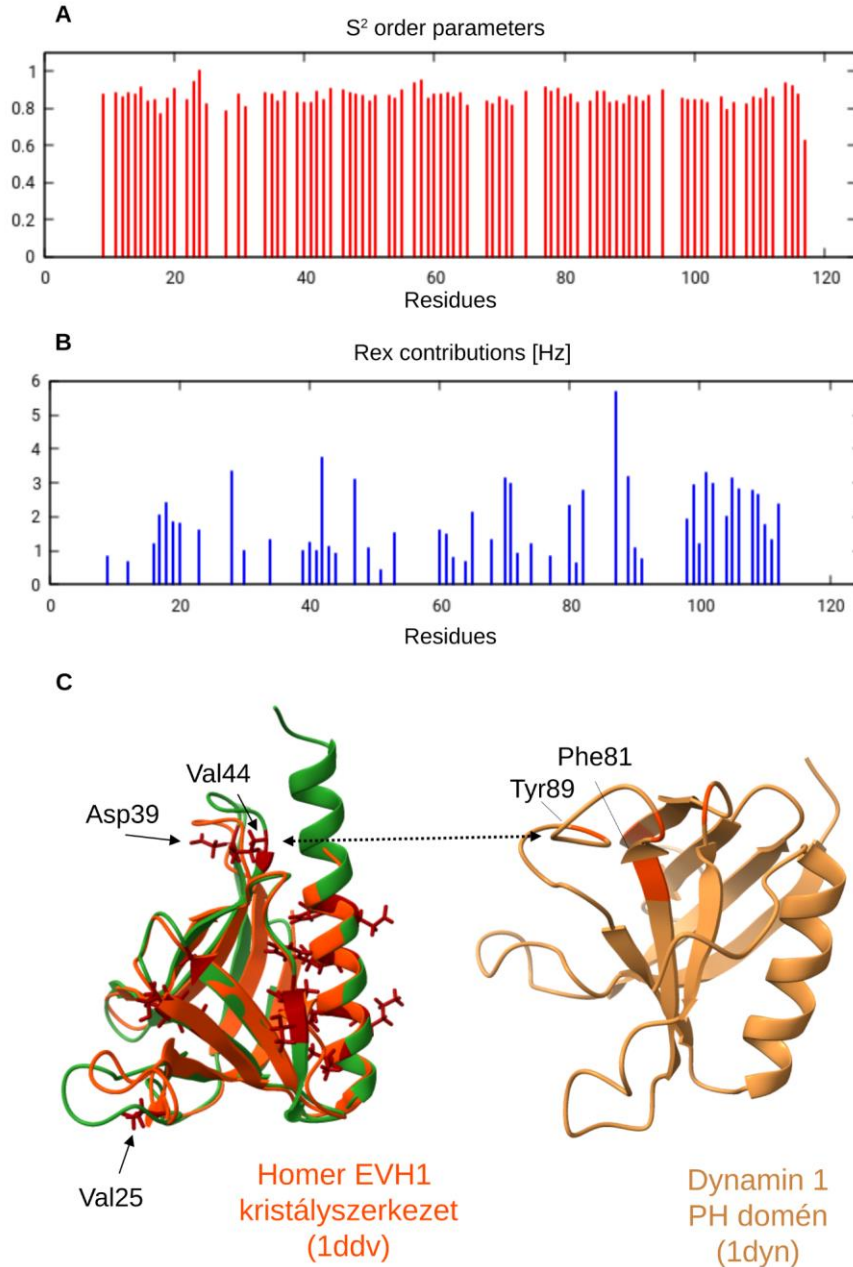
A Tensor2 program segítségével első lépésben a T1/T2 arányból megbecsültük a rotációs korrelációs időt (τ_c), ami alapján ez 7,89 ns. Ez megfelel a molekula mérete alapján várható értéknek. A láncvégeken foglalnak helyet az alacsony hetNOE értékű aminosavak. Az Asn23 esetében a hetNOE érték kissé meghaladja az 1,0-t, ami nem reális, így ezt az aminosavat kizártuk a model-free elemzésből. Az elemzés során kapott S^2 rendezettségi paraméterek általában 0,85 fölött vannak, mindössze négy érték esik 0,8 alá, ez stabil globuláris szerkezetre utal. A két szomszédos β -szálban, a 13–15. és 83–86. pozíciókban, azaz a ligandum kötőhely környezetében, valamint a 102–105. pozíciókban a C-terminális hélixben találjuk a legalacsonyabb S^2 értékeket (12. A ábra).

A jelentős ($> 2,5$ 1/s) R_{ex} hozzájárulással rendelkező aminosavak nagyrészt a hélix N-terminális régiójában, vagy annak közelében tömörülnek. További kiemelt aminosavak a Val28, amely a ligandum kötőhely közelében található, illetve az Asp39 és a Val44, amelyek hidrogénkötést alkotnak egymással a 2. és 3. β -szál közötti kanyarban (12. B ábra). Ezek az aminosavak olyan régiókban helyezkednek el, ahol konformációs eltérések figyelhetők meg a ligandum nélküli oldatfázisú NMR-szerkezet és a röntgenkristallográfiás szerkezetek (pl. PDB ID: 1ddv) között, ami ismét megerősíti a ligandumkötéshez kapcsolódó finom szerkezeti átrendeződések lehetőségét.

Megjegyezzük továbbá, hogy a Thr70 — amely szintén a ligandum kötőhely közelében helyezkedik el — az elemzésünk alapján szintén jelentős R_{ex} hozzájárulást mutatott. A végső kiértékelésből azonban ezt az aminosavat kihagytuk, mivel a spektrumban a jele jelentős mértékben átfedett a Ser35 amidjelével, így az illesztett relaxációs ráták nem feltétlenül teljesen megbízhatóak (12. C ábra).

A kapott eredményeket összehasonlítva a távolabbi rokonságot mutató dynamin1 PH domén oldatfázisú dinamikájával (Fushman et al., 1997), jól látható, hogy a PH doménben a nagy R_{ex} hozzájárulású aminosavak eloszlása jelentősen eltér a Homer1 EVH1 doménétől, és a hélixben található folt teljesen hiányzik. Ugyanakkor az Asp79, Thr84 és Tyr86 aminosavak — amelyek a 6. és 7. β -szálat összekötő kanyar (turn) közelében helyezkednek el — hasonló pozíciót foglalnak el, mint a dynamin1 PH domén egyik nagy R_{ex} értékű aminosavcsoportja (Ferguson et al., 1994).

Ezek az eredmények arra utalnak, hogy ebben a nagy domén családban egyszerre vannak jelen konzervált és egyedi dinamikai jellemzők (12. C ábra).



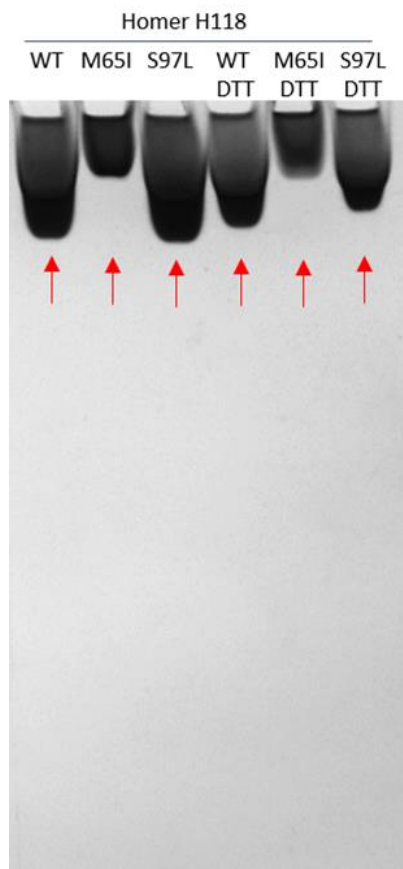
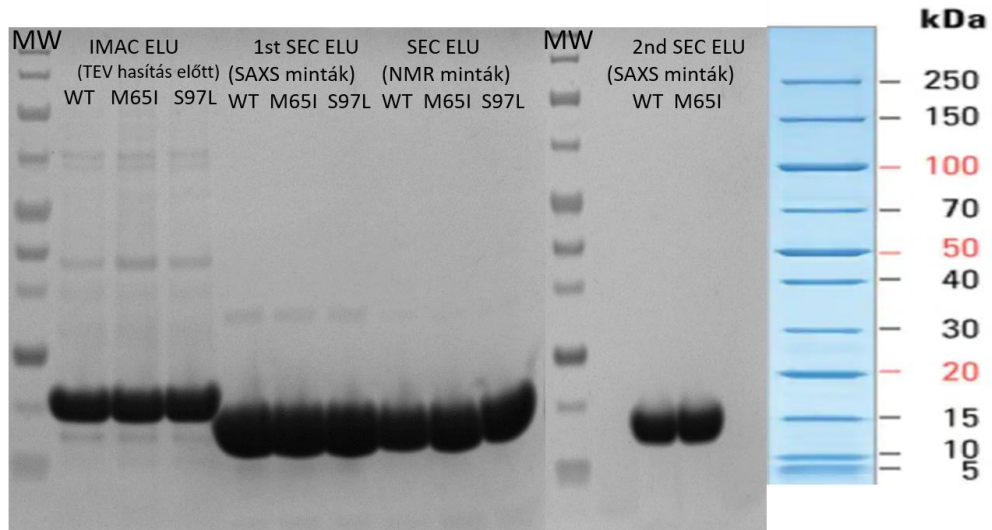
12. Ábra: Az EVH1 domén dinamikája. A vad típusú EVH1 doménre számolt S^2 rendparaméterek (A). A Model-free analízisből kapott R_{ex} hozzájárulások az egyes aminosavak esetében (B). A jelentős R_{ex} hozzájárulással (pirossal kiemelve) elhelyezkedése a Homer1 EVH1 szerkezetben. Az N-terminális helikális régióban találhatóakon kívül a Val25, Asp39 és Val44 (a UniProt Q9Z2Y3 bejegyzés szerinti számozásban) olyan helyeken találhatóak, ahol jellegzetes konformációs eltérések figyelhetők meg a rendelkezésre álló röntgenkristallográfiás szerkezetekhez képest (zöld: a mi modellünk, narancssárga: PDB 1ddv). Emellett olyan aminosavak is érintettek, amelyek olyan régióban találhatóak, amely megfelel a magas R_{ex} értékeket mutató aminosavak klaszterének a dynamin1 PH doménben (bézs: PDB 1dyn) (C).

4.5 Az M65I és S97L mutánsok HSQC spektrumának összevetése a vad típussal

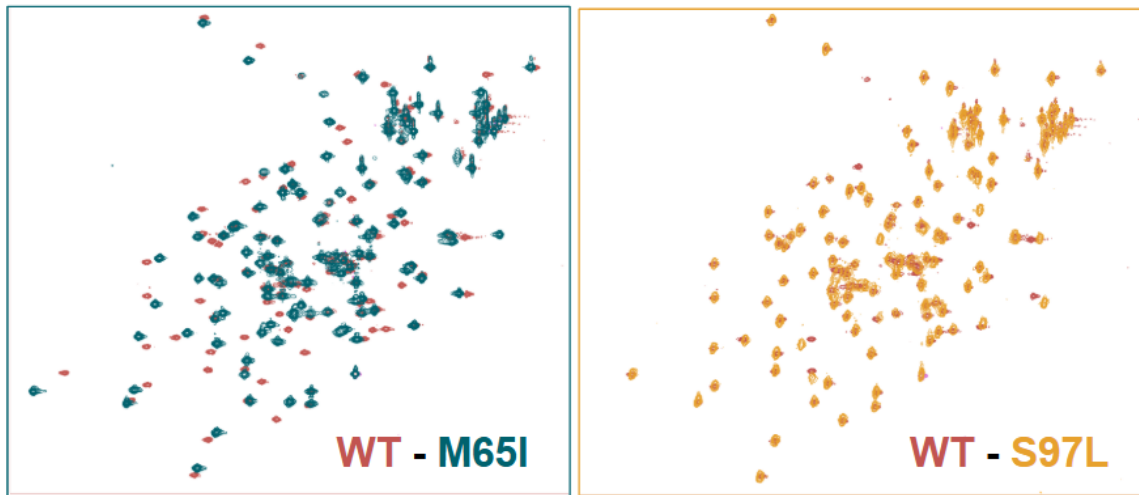
A vad típusú Homer1 EVH1 domén jelhozzárendelése már rendelkezésemre állt. A vad típusú EVH1 domén asszignációját Dr. Czajlik András végezte el (de annak érdekében, hogy az adatok CCPNMR-ben is elérhetőek legyenek, elvégeztem én is a jelhozzárendelést (15. ábra)). Ehhez a dupla izotóp (^{13}C és ^{15}N) jelölt, tiszta, tömény, NMR mérésre alkalmas mintát Maruzs Brigitta biztosította. A minta 600 μl , 190 μM töménységű volt. A minta 50 mM foszfát puffer, 20 mM NaCl, 0,02 NaN_3 -at tartalmazott, a puffer pH-ja 7,36 volt. A mérések a Bruker Avance NEO 700 MHz spektrométeren történtek 298 K hőmérsékleten. A sztenderd 2 dimenziós (^1H - ^{15}N HSQC, ^1H - ^{13}C HSQC) és háromdimenziós spektrumok (HNCA, HNCACB, HNCOCACB, HN(CA)CO, HN(CO)CA, HCCONH) lettek lemérve. Emellett 3D TOCSY-HSQC, NOESY-HSQC, HNHA és HNHB spektrumok is készültek. Az M65I és az S97L mutánsok esetében - bár előzetes HSQC adataink voltak - a teljes fehérje termelés és tisztítási folyamatot újra elvégeztem, majd további szerkezeti és funkcionális vizsgálatot hajtottam végre. A minta tisztaságát SDS-PAGE futtatással ellenőriztem (13. ábra). A fehérje főlánc asszignálás mindkét esetben sikeres lett, és az oldalláncok jelhozzárendelését is sikerült az aminosavak túlnyomó többsége esetében elvégezni. A kapott kémiai eltolódásokat a BMRB adatbázisban elérhetővé tettük 53479 (M65I), illetve 53480 (S97L) azonosítók alatt. Az M65I mutáns ^1H - ^{15}N HSQC spektrumát összevetve a vad típuséval azt láthatjuk, hogy lényegében az összes amid NH kémiai eltolódás máshová esik. Bár a csúcsok egymáshoz képest közel maradnak, de mégis egyértelműen eltolódva jelennek meg. A 14. ábrán látható a vad típus (WT) - M65I, illetve vad típus (WT) - S97L HSQC spektrumának összehasonlítása. A WT-M65I HSQC spektrumokon jól láthatóan máshol vannak az M65I mutáns kémiai eltolódásai. Ezzel szemben az S97L pontmutáció alig okoz eltéréseket a vad típus HSQC spektrumával összevetve (WT-S97L). Egyedül néhány aminosav kémiai eltolódása jelenik meg némiképp eltolódva. Az asszignáció elvégzése után a csúcsok részletes elemzése megmutatta, hogy mindkét mutánsnál a pontmutáció helyén és annak környezetében található amid keresztcsúcsok mutatnak jelentős változást. Ez az M65I mutáns esetében egy kiterjedtebb régiót jelent, a szekvenciában a 60-78 pozíciók szakaszán nagyobb kémiai eltolódás perturbációk láthatóak. Ez alapján elmondható, hogy markáns különbség van a két mutáns között. Az észlelt különbségek arra utalnak, hogy a két mutáció eltérő mértékben változtatja meg a domént. Míg az S97L pontmutáció várhatóan nem okoz lényegi szerkezetváltozást, az M65I variáns esetében a lehetséges magyarázatok között a szerkezet komolyabb megváltozása, vagy esetlegesen a belső mozgások nagyobb léptékű átrendeződése jöhet szóba. Mivel az amid NH csoportok kémiai eltolódása nagyon érzékeny a kémiai környezetre

kisebbs megváltozásaira is, ez a kérdés pusztán a HSQC spektrumok alapján nem dönthető el. Az amid NH jelek pozícióinak ilyen mértékű megváltozása miatt mindenképpen szükség volt a teljes jelhozrendelés elvégzésére az M65I mutáns esetében. Következő lépésként ezért ezt, illetve a jobb összehasonlíthatóság kedvéért ezzel együtt az S97L mutáns jelhozrendelését is elvégeztem a megfelelő spektrumok alapján.

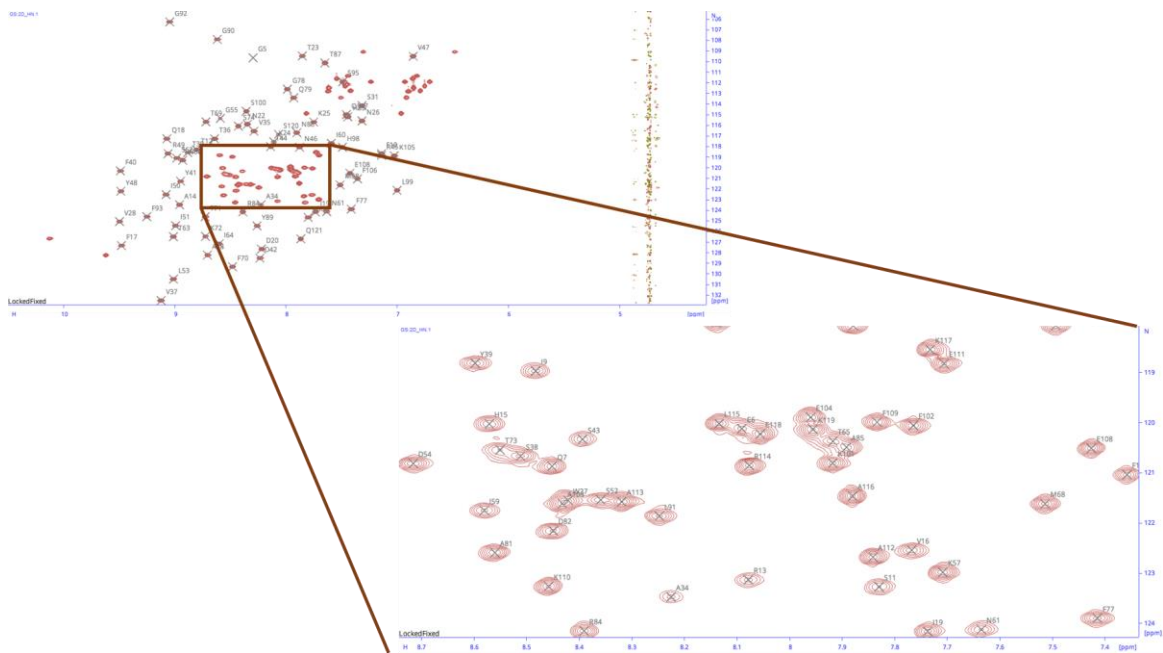
Az M65I variáns esetében a legnagyobb eltérést a 63-as threonin és nem meglepő módon a 65-as izoleucin aminosavak mutattak, a többi aminosav esetében is szinte mindenhol máshová került a kémiai eltolódás, de viszonylag közel a vad típus hasonló aminosavához. A teljes főlánc asszignáció elvégzése után kiszámolt másodlagos C α és H α kémiai eltolódások elemzése megerősíti, hogy a másodlagos szerkezeti elemek nagyrészt változatlanok maradnak a vad típushoz képest (16. ábra). Ezek az adatok arra utalnak, hogy az észlelt kémiai eltolódások nem jelentős szerkezeti átrendeződés következményei az M65-ös aminosav után. Így a hőstabilitást és a belső dinamikát is vizsgáltuk, hogy részletesebb információhoz jussunk.

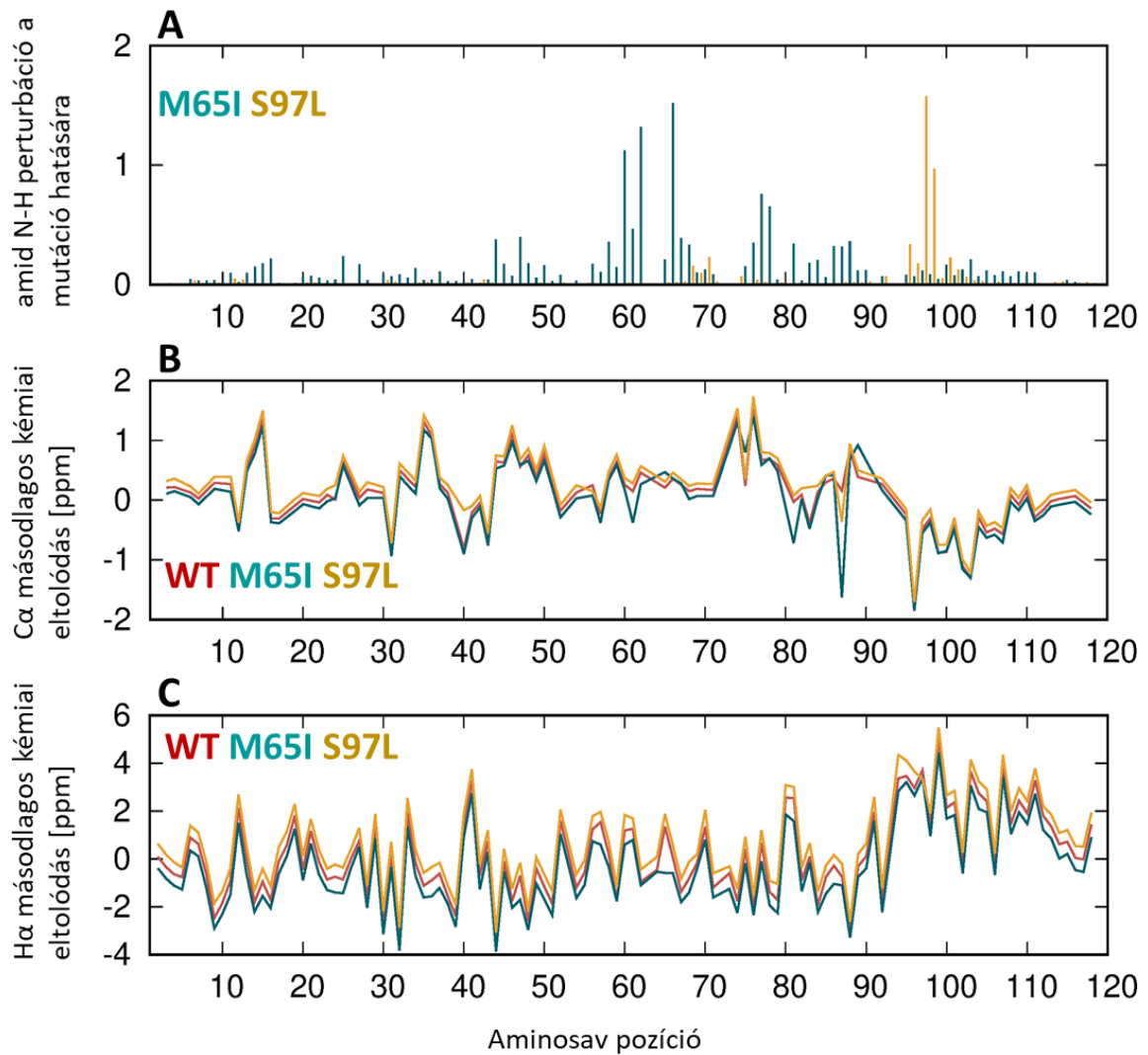


13. Ábra: SAXS és NMR minták ellenőrzése SDS-PAGE-n. SAXS minta esetén első SEC tisztítás után még láthatóak egyéb sávok magasabb molekulaméretnél, így egy második SEC alkalmával ezektől megszabadultam. Második SEC után teljesen tiszta mintához jutottam. NMR esetében is tiszta volt a fehérje egyéb szennyező sáv nélkül. Az ábrán a natív PAGE eredményei látszanak.



14. Ábra: Az M65I és S97L mutánsok HSQC spektrumai. Az M65I mutáns EVH1 (méregzöld) és vad típusú EVH1 (bordó) domén HSQC spektruma jelentős eltérést mutat, a csúcsok nem fednek át. Ezzel ellentétben az S97L mutáns EVH1 (mustársárga) és vad típusú EVH1 (bordó) domén HSQC spektrumán a csúcsok szinte teljesen átfednek.

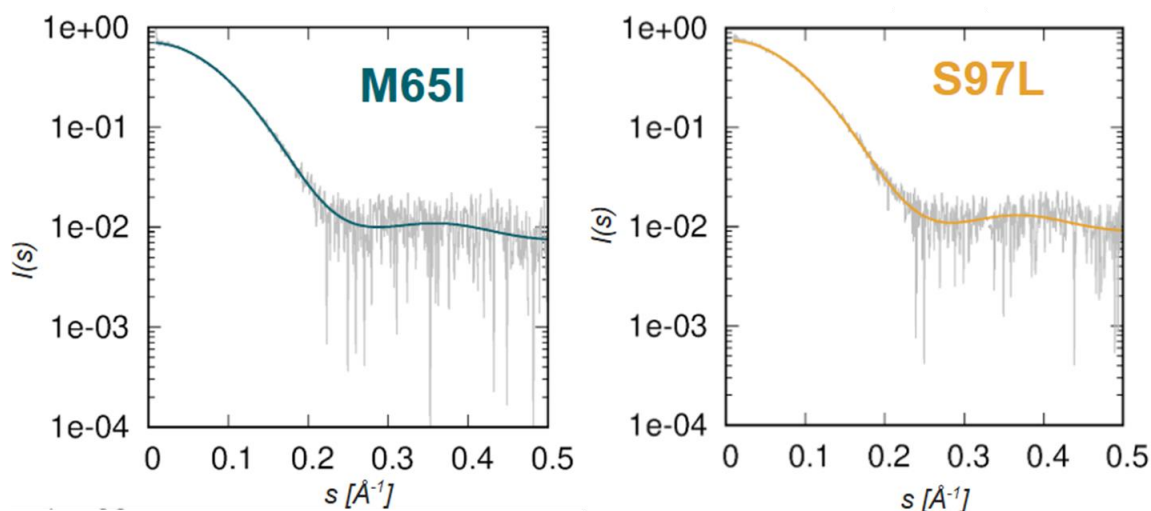




16. **Ábra:** Amid N-H perturbációk, α és α másodlagos kémiai eltolódások. Az **A** ábra az amid N-H perturbációkat mutatja be a mutáció hatására M65I és S97L variánsoknál. A **B** ábra a α másodlagos kémiai eltolódást mutatja be. A **C** ábra pedig a α másodlagos kémiai eltolódásokat szemlélteti. A másodlagos kémiai eltolódások bemutatásakor a mutánsok görbéi minimálisan eltekintve tolvá felfelé ill. lefelé, hogy a vonalak ne fedjék egymást teljesen. WT-piros, M65I-zöld, S97L-sárga színekkel jelölve.

4.6 Kiszögű röntgenszórás (SAXS) eredmények

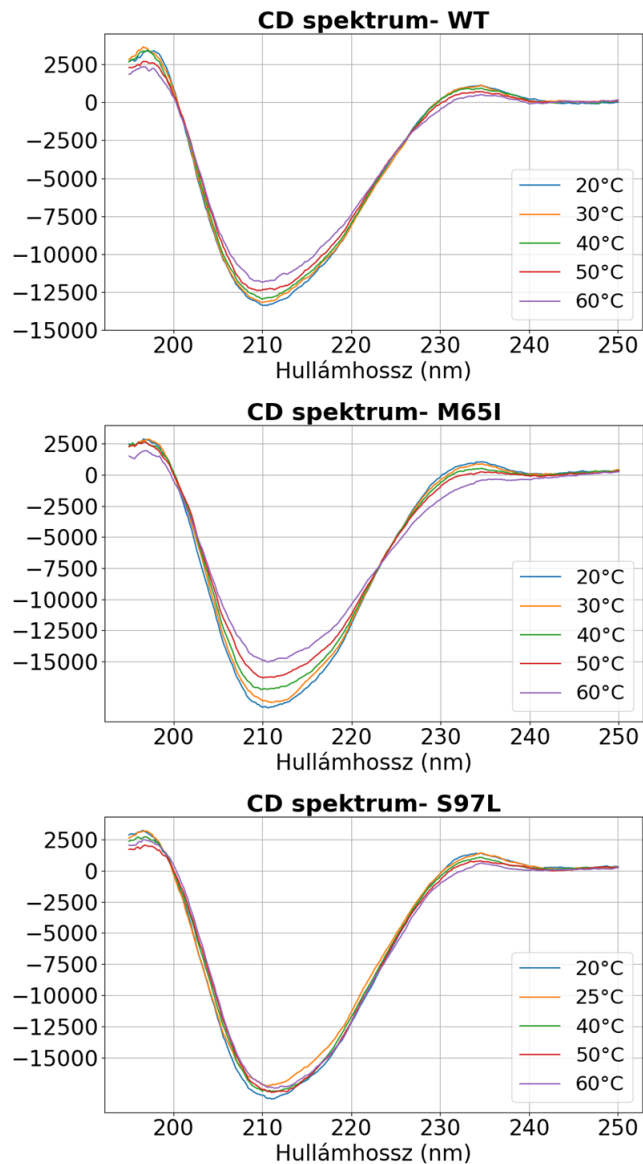
A mutáns EVH1 domének SAXS vizsgálatának eredménye nem mutatott lényegesen eltérő szerkezetet a vad típusú doménhez képest. Ezt a görbéknek a vad típusú EVH1 szerkezeten alapuló szerkezeti modellekhez való kiváló illeszkedése is alátámasztja. Az M65I illesztésének Chi2 értéke 1.12, az S97L mutánsé pedig 1,10 (17. ábra).



17. Ábra: SAXS eredmények. A SAXS görbék kiválóan illeszkednek a mutánsok szerkezeti modelljeihez, amelyeket a vad típus alapján építettünk, és amelyek lényegében ugyanazzal a harmadlagos szerkezettel rendelkeznek. A kísérleti görbék szürkével, a szerkezeti modellek alapján számított görbék színesen láthatók.

4.7 Cirkuláris dikroizmus vizsgálat

A vad típusú EVH1 domén ECD elemzésével kapott eredmények összhangban vannak a meghatározott atomi szintű térszerkezetből kapott másodlagos szerkezeti elemekkel. Ezek alapján az EVH1 aminosavainak 13,6%-a van α -hélix, 46,3%-a béta-redő konformációban, a maradék 40,1%-ban nem vesz részt reguláris másodlagos struktúrák kialakításában. A mutánsok esetében is történtek CD mérések, a vad típusra kapottal megegyező eredménnyel. A hőmérséklet szisztematikus változtatásával is végeztünk méréseket a 20 °C-tól 60 °C-ig terjedő tartományban, 10 °C-os lépésekben, de a hőmérséklet emelése nem okozott jelentős eltérést a spektrumokban, mindhárom EVH1 változat jól definiált, stabil szerkezetűnek bizonyult. A legnagyobb változást ebben a tekintetben is az M65I változat mutatja (magasabb hőmérsékleten), de az észlelt változások volumene itt sem utal jelentős szerkezetváltozásra, kitekeredésre (18. ábra).

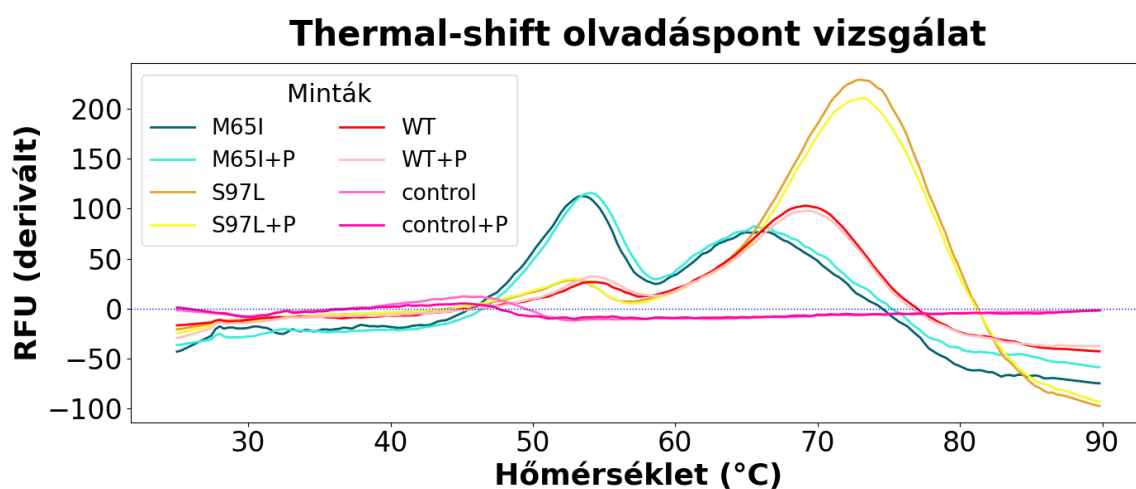


18. Ábra: CD spektrumok. Hőmérsékletfüggő circular dichroism spektrumok a vad típus (A), az M65I (B) és az S97L (C) variánsok esetében.

4.8 Hőstabilitás vizsgálat

Az egyes variánsok (vad típus, M65I és S97L mutáns) hőstabilitását Thermal Shift Assay vagy másnéven differenciális hőstabilitási vizsgálat segítségével elemeztem. Mindhárom esetben vizsgáltam a denaturációs kinetikát a szabad és a Shank3 peptiddel (LVPPPEEFANG) komplexben lévő domén esetében is. Érdekes módon mindhárom variáns kétcsúcsú görbét mutat, ami két, részleges kitekeredési/destabilizálódási eseményre utal. WT és S97L esetében az első csúcs nem

tekinthető markánsnak. Érdekes módon az S97L variáns első csúcsa picit alacsonyabb, a második kicsit magasabb hőmérsékletnél észlelhető, mint a vad típus esetében, itt tehát, legalábbis részlegesen, egy enyhe stabilizáló hatásról is beszélhetünk. Azt, hogy az S97L mutáció esetében magasabb az RFU (relative fluorescence units) érték a vad típushoz képest, magyarázhatjuk azzal, hogy ennek a mutánsnak valamivel nagyobb a hidrofób felszíne, emiatt több festék kötődik hozzá. Ugyanakkor az M65I mutáns esetében mindkét csúcs intenzív, és a második egyértelműen alacsonyabb hőmérsékletnél van, mint a vad típusban (19. ábra). Ez egyértelműen a domén destabilizációjára utal, amelyben feltehetően a kitekeredést is meghatározó belső dinamikai mozgások modulációja is szerepet játszik. A domének Shank3 peptiddel alkotott komplexe esetében érdekes módon csak minimális változások látszanak az olvadási görbékben, így tehát ez a kölcsönhatás nem eredményez különösebb destabilizációt vagy stabilizációt.



19. Ábra: Az EVH1 variánsok hőstabilitása. A három variáns hőstabilitási (thermal shift olvadáspont vizsgálat) görbéi peptid ligandumokkal (+P) és anélkül. A bemutatott görbék két mérés átlagának felelnek meg. A WT pirossal, az M65I kézzel, az S97L pedig sárgával ábrázolva. A "control" a fehérje nélküli méréseket mutatja.

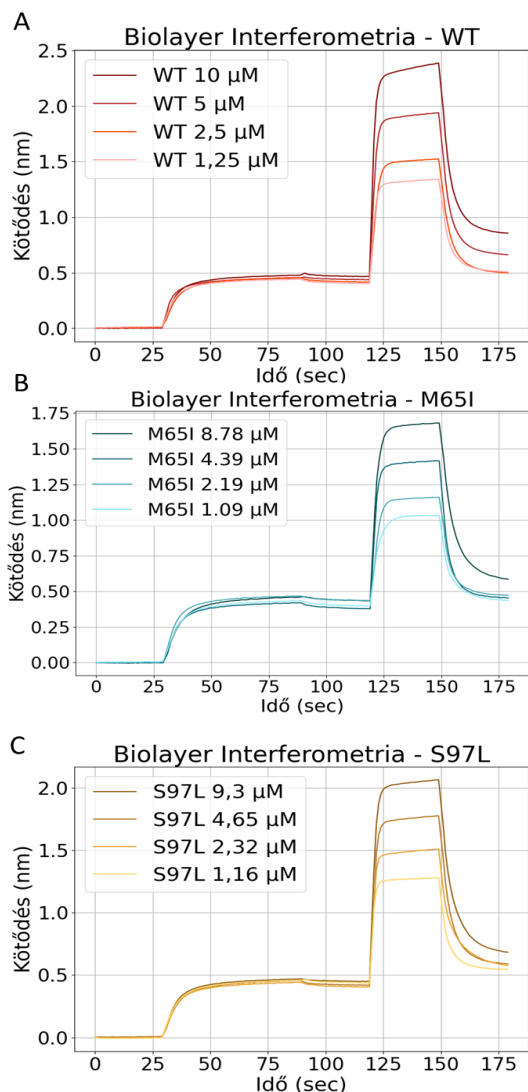
5. Táblázat: Tm1 és Tm2 adatok táblázatos ábrázolása.

| Minta | Tm1 (°C) | Tm2 (°C) |
|-----------|----------|----------|
| WT | 86,5 | 36,4 |
| WT+P | 86,5 | 83,2 |
| S97L | 38,2 | 41,5 |
| S97L+P | 36,4 | 39,1 |
| M65I | 86,2 | 83,8 |
| M65I+P | 86,8 | 83,2 |
| control | 52,9 | 57,4 |
| control+P | 58,0 | 52,9 |

4.9 Biolayer Interferometria vizsgálat

A biolayer interferometria vizsgálatot is mindhárom fehérje variáns esetében elvégeztem. Elsőnek a 10 μM koncentrációjú EVH1 fehérjét (vad típus, M65I, S97L sorrendben) adtam a bioszenzorhoz, majd felező hígítással összesen 5 koncentrációban (10-5-2,5-1,25-0) mértem le. Amikor a legnagyobb koncentrációban adtam hozzá az EVH1 fehérjéket, vad típus esetén 1,4 nm, M65I esetén 1 nm, S97L esetén pedig körülbelül 1,2 nm rétegvastagodást figyeltem meg. Minden felezés alkalmával körülbelül 0,2 nm-t csökkent a rétegvastagság (20. ábra). Összességében kiemelkedő kötődésbeli különbség nem figyelhető meg a mutánsok esetében a vad típushoz képest, viszont az M65I mutáns kötési erőssége 17%-kal kisebb volt a vad típushoz képest, ami azt jelzi, hogy az EVH1-Shank3 interakció gyengébb. S97L esetében pedig a kötődés kis mértékben erősebb volt a vad típushoz képest. A legerősebben kötődő S97L és a leggyengébben kötő M65I közötti különbség is csak kb. kétszeres, ez azt jelzi, hogy a kötődés általános erősségét a mutációk lényegesen nem befolyásolják. A görbeillesztés mindhárom fehérje esetében megfelelő volt, az R^2 0,99 volt a vad típus és az M65I esetében, és 0,98 az S97L-nél. Az illesztett globális K_d a következőképp alakult: a vad típusnál 5,15 μM , M65I esetében 8,88 μM , S97L-nél pedig 3,88 μM (6. táblázat). Megjegyezhető, hogy az M65I esetében az asszociáció kinetikája meredekebb az illesztett görbénél.

Mind a BLI mind a Thermal Shift Assay vizsgálatok eredményei azt mutatják, hogy az M65I kevésbé stabil mind önmagában, mind interakció során. Érdekességképp az S97L mutáció viszont stabilizálja az interakciót és a fehérjét is.



20. Ábra: Biolayer interferometria vizsgálatok a Homer1 és Shank3 peptid között. Az A ábra az EVH1 domén M65I és S97L mutáció helyeit, valamint a Shank3 peptid kötőhelyét mutatja. A B sematikus ábrán a Homer1 és a Shank3 fehérjét alkotó domének és azok interakciója látható. C, D és E ábrák a WT, M65I és S97L variánsok Shank3 peptiddel való kötődését mutatják be különböző koncentrációkban.

6. Táblázat: *Biolayer Interferometria eredmények. A variánsok Shank3 peptidhez (LVPPPEEFANG) való kötődési affinitása, biolayer interferometriával meghatározva.*

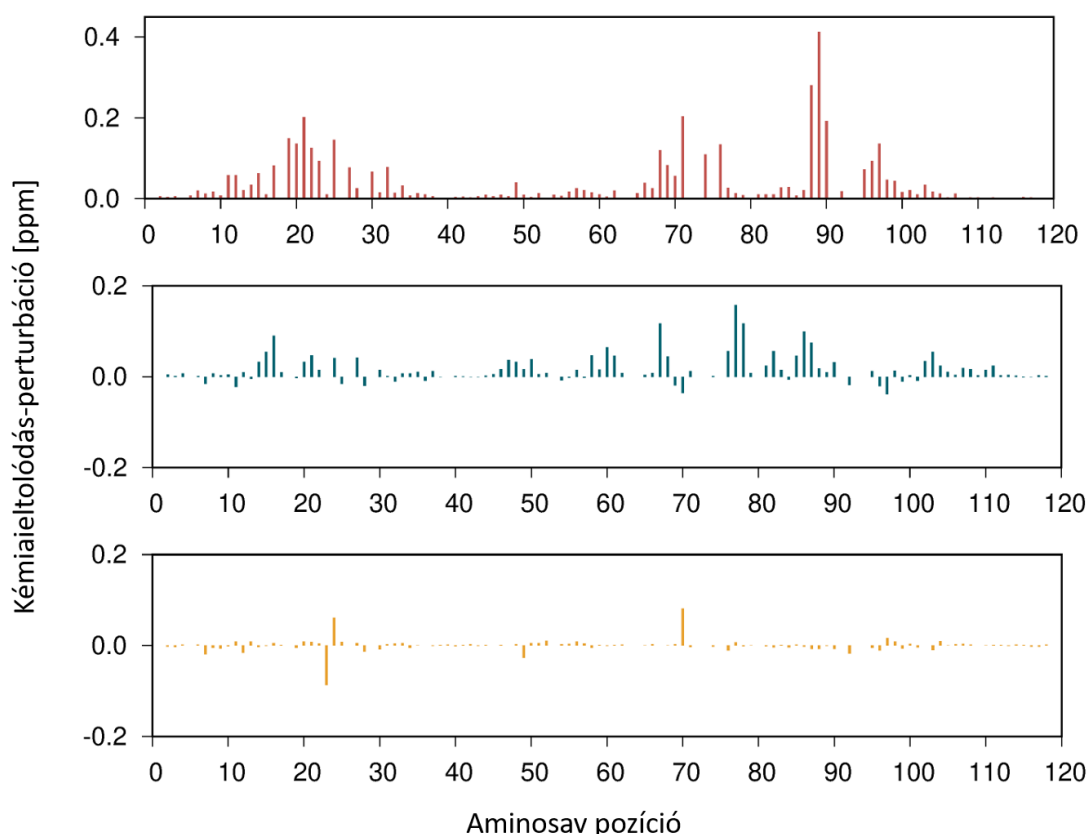
| Variáns | WT | M65I | S97L |
|--|------|------|------|
| Globális Kd [μM] | 5.15 | 8.88 | 3.88 |
| R ² (illeszkedési együttható) | 0.99 | 0.99 | 0.98 |

4.10 Interakcióvizsgálat NMR titrálással

NMR spektroszkópia segítségével is vizsgáltam a doménvariánsok peptidkötésre adott válaszát. NMR titráláshoz ¹⁵N jelölt vad típusú és mutáns (M65I és S97L) fehérje mintákat állítottam elő. Ehhez a fentebb említettekhez hasonlóan a fehérjét baktériumban meg kellett termelni, a fehérje expressziót indukálni, majd három lépésben kitisztítani a fehérjét, hogy NMR minőségű, kellően tiszta, nagy koncentrációjú mintákhoz jussak. Vad típus esetében 571 μM , M65I esetében 509 μM , S97L esetében pedig 352 μM koncentrációjú mintát sikerült kitisztítanom. A mérések 10 lépésben - a partner, Shank3 PRO régióból származó rövid, izotópjelölést nem tartalmazó peptid (LVPPPEEFANG) hozzáadásával - minden pontban ¹H-¹⁵N HSQC spektrumot felvéve történtek. A spektrumokat a CCPNMR szoftver segítségével értékeltem ki. Első lépés a csúcsok beazonosítása volt, ez viszonylag egyszerű folyamat volt azt követően, hogy az NMR asszignálás már megtörtént. Persze némi nehézséget okozott azon csúcsok meghatározása, amelyek az interakció hatására más pozícióba kerültek, de végül minden csúcs beazonosításra került. A titrálás során nem merült fel olyan változás a spektrumokban, amely a teljes jelhozzárendelés újra elvégzését indokolta volna a végpontban, ugyanakkor ez azt is jelenti, hogy egyes csúcsok esetében azért minimális bizonytalansággal számolni kell. Megjegyzendő, hogy a három variáns, a vad típus, az M65I és az S97L mutánsok esetében több csúcs esetében is hasonló típusú változásokat észleltem, ami viszont az eredmények megbízhatóságát erősíti.

Mivel az egyes fehérjekonstrukciók esetében az elkészült, stabil minta töménysége valamennyire eltérő volt, a mérésekhez használt tömény peptid oldat viszont azonos, úgy döntöttem, hogy azokat a titrálási pontokat vetem össze, mint végpontokat, amelyekben a domén:peptid arány közel azonos. A vad típusú domén esetében mért 10. titrálási pontnak így az M65I variáns esetében a 9., az S97L esetében pedig a 6. pont feltethető meg leginkább, a kvantitatív összehasonlításokban ezeket a pontokat használom.

Mindhárom variáns esetében hasonló mintázat figyelhető meg, mégpedig, hogy elsősorban a közvetlen kötőhelyet alkotó aminosavaknak megfelelő csúcsok helyzete változik meg. Összességében hasonló az eredmények mindhárom esetben, viszont az M65I mutáns általában nagyobb változásokat mutat. Ezt jól szemlélteti a 21-es ábra ahol a WT értékek és az M65I (zöld) illetve az S97L (sárga) értékek különbségét ábrázoltam. Látható, hogy az M65I esetén több csúcs kémiai eltolódása is megváltozott, míg az S97L esetében alig történt változás ligandumkötés hatására a titrálás során (21. ábra). A Gly89 csúcs összetett viselkedést mutat, a titrálás során eltűnik, majd később újra megjelenik, az egyes variánsokban következetesen hasonló módon.



21. Ábra: NMR titrálás Shank3 peptiddel (LVPPPEEFANG). Az ábrán az egyes EVH1 variánsok (A: WT, B: M65I, C: S97L) NH amid kémiai eltolódás perturbációi láthatóak. Az M65I és az S97L mutánsok esetén az értékek WT-hez viszonyított különbségét ábrázoltam. A kémiai eltolódás perturbációk kiszámítását az alábbi képlettel végeztem $\sqrt{0.14 * \Delta\delta N^2 + \Delta\delta H^2}$.

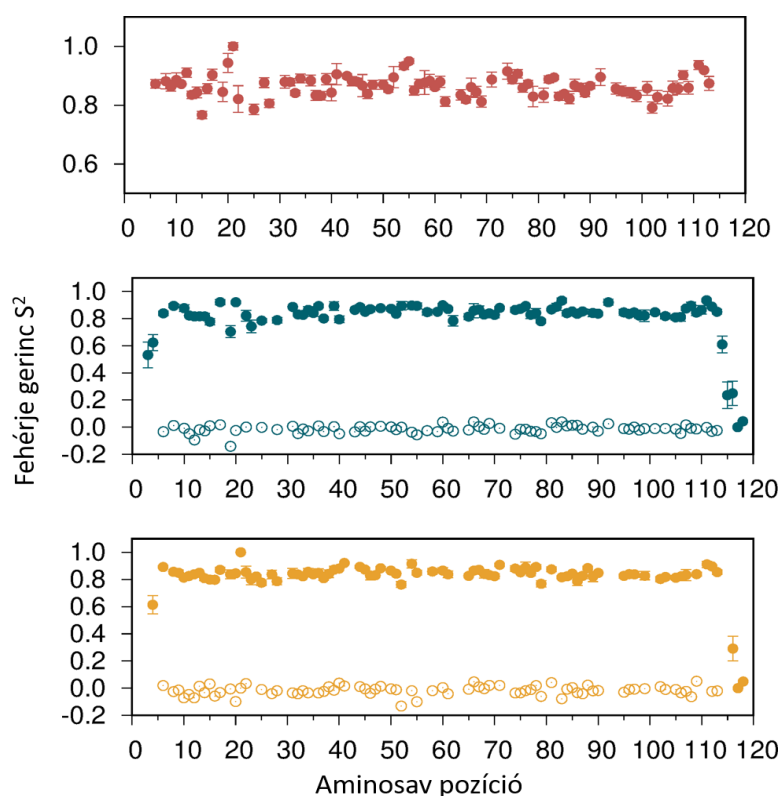
4. 11 A mutánsok belső dinamikája, összevetés a vad típussal

A ¹⁵N-relaxációs elemzés különböző, lassú időskálájú mozgások jelenlétét sugallja a variánsokban

A mutáns EVH1 domének belső dinamikájának vizsgálatára ¹⁵N-relaxációs méréseket végeztünk, majd azokat model-free (modellmentes) analízissel értékeltük (22-23. ábrák). A kapott eredményeket a vad típusú domén korábbi elemzésével hasonlítottuk össze. Érdekes módon az Asn23 aminosav a ligandumkötő helyen mindhárom variánsban 1-nél nagyobb heteronukleáris NOE értéket mutat, akárcsak néhány terminális aminosav. Ezeket kizártuk a végső model-free analízisből, de a terminális szakaszokban nem tartozó Asn23 esetében ez a jelenség figyelemre méltó, mivel komplex dinamikus viselkedésre utalhat a kötőhely közelében. A mutánsok S^2 gerinc rendezettségi paraméterei általában jól illeszkednek (22. ábra) a vad típusú doménnél meghatározott értékekhez. A kapott model-free illesztéseket néhány esetben megbízhatatlannak tekintettük, vagy nagyon magas (>1) S^2 vagy S^2_f értékek miatt, vagy mert a Tensor2 nem tudta a paramétereket kellően megbízhatóan illeszteni. Megjegyzendő, hogy a legtöbb érintett aminosav a terminális régiókban található, ahol a megnövekedett mozgékonyág egyrészt nem meglepő, másrészt annak funkcionális jelentősége várhatóan nem számottevő (24. ábra). A domén belsejében a legnagyobb különbség a vad típushoz képest a 19–15. aminosavak közötti szegmensben figyelhető meg, ahol az M65I mutáns esetében két aszparagin, Asn19 és Asn23 alacsonyabb S^2 értékeket mutat a vad típushoz és az S97L mutánhoz képest (22. ábra). Érdekes, hogy az S97L esetében a Lys21 illesztett S^2 értéke pontosan 1. Ezek az aminosavak nagyon közel vannak a ligandum kötőhelyéhez, és figyelemre méltó, hogy ebben a régióban a két mutáns ellentétes változásokat mutat a ps–ns időskálájú dinamika tekintetében a vad típushoz képest. A mutáns változatok belső dinamikájában azonban a legnagyobb különbség a Rex hozzájárulással illesztett aminosavak eltérő eloszlása (23. ábra), ami az R2 relaxációs rátákból is nyilvánvaló. Némileg szubjektíven meghatároztunk egy 2,5 Hz-es küszöböt, amely fölött a Rex hozzájárulásokat jelentősnek tekintjük, de a legtöbb, alább tárgyalt esetben a megfigyelt különbségek kellően robusztusak, nem függenek túlzott mértékben ettől a választástól. Legfeltűnőbb, hogy mind az M65I, mind az S97L mutánsok megváltozott mintát mutatnak az érintett aminosavak körében mindkét mutációs helynél (25. ábra). Mindhárom variánsban megmarad az α -hélix N-terminális régiójában lévő, nagy Rex hozzájárulással rendelkező aminosav-klaszter, bár kisebb változásokkal a 97-es pozíció környékén. Az S97L mutáns Leu97 pozíciója nagy Rex hozzájárulást mutat, de a Ser97 a WT és M65I variánsokban nem. Hasonlóképpen, az Ile65 aminosavnak viszonylag nagy R_{ex}

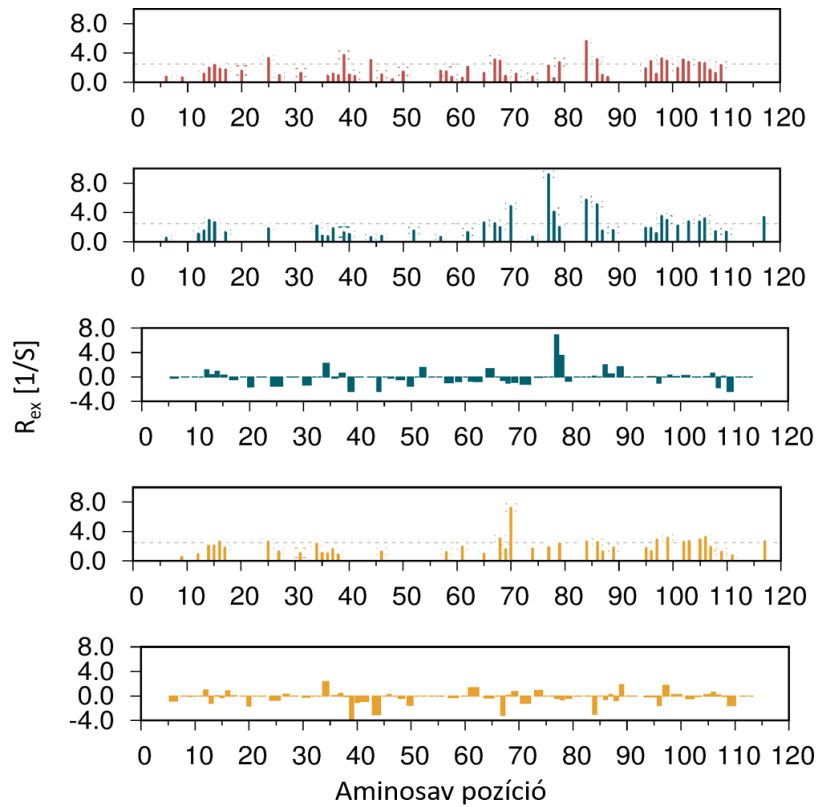
értéke az M65I mutánsban és csak abban, és a közeli aminosavak a $\beta 5$ szálban mindhárom variánsban másként érintettek. Megjegyezzük, hogy bár elemzésünk azt sugallja, hogy a Thr70 aminosav csak a mutánsokban mutat jelentős R_{ex} hozzájárulást, R_2 relaxációs rátája a vad típusú doménben is nagy, de a megfelelő csúcs más csúcsokkal való jelentős átfedése miatt a végleges közzétett elemzésünkéből (I. közlemény) ezt az aminosavat kizártuk. A domén N-terminális felében az Asp39 és Val44 aminosavak R_{ex} értéke csak a vad típusú EVH1-ben haladja meg a 2,5 Hz-et, de egyik mutánsban sem. Az N-terminális közelében lévő minta variáns-specifikus: Val25 csak a vad típusú és az S97L mutánsban érintett, míg a 14-16 szakasz mindhárom variánsban eltérően eloszló magas R_{ex} értékeket mutat, ahol a változó, hogy pontosan mely aminosavak mutatnak 2,5 Hz fölötti R_{ex} értéket (22. és 26-os ábrák).

A lassú időskálájú mozgások jelenlétének részletesebb elemzése érdekében CEST kísérleteket is végeztünk, azonban ezek nem szolgáltatott egyértelmű eredményeket, ami arra utal, hogy a különbségek valószínűleg kizárólag a 200 s^{-1} sebességnél gyorsabb belső mozgásokhoz kapcsolódnak (Vallurupalli et al., 2012).

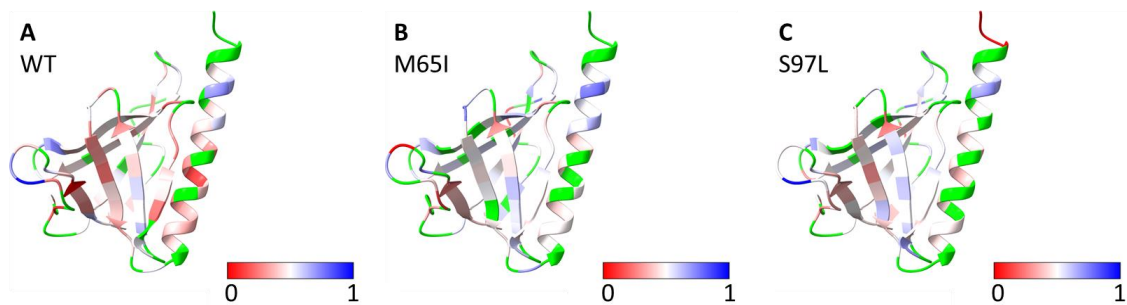


22. Ábra: A dinamikai paraméterek illesztése során kapott molekulagerinc S^2 rendparaméterek. Az ábrák a vad típusú fehérje és két mutáns változat gerinc S^2 rendparamétereinek aminosav-pozíció menti eloszlását mutatják (A-WT-piros, B-M65I-zöld, C-S97L-sárga). Az x tengely az aminosavsorszámot, míg az y tengely a fehérjeváz lokális rendezettségét jellemző S^2 értékeket ábrázolja. A

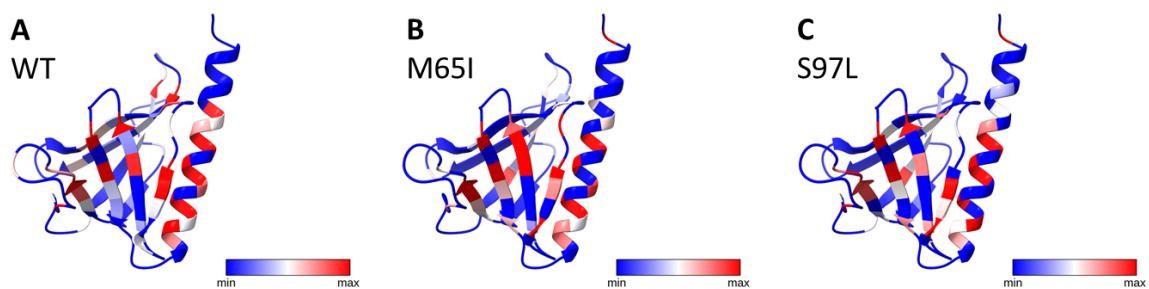
magasabb S^2 értékek merevebb, strukturált régiókra, az alacsonyabb értékek fokozott flexibilitásra utalnak, lehetővé téve a gyors időskálán (ps-ns) megjelenő dinamikai különbségek összehasonlítását a vad típus és a mutáns fehérjék között. Összehasonlításnál (üres kör jelöli mind az M65I, mind az S97L esetében) ott van ábrázolt adat, ahol volt mind a WT, mind az adott mutáns esetében rendelkezésre áll illesztett S^2 paraméter.



23. Ábra: A dinamikai paraméterek illesztése során kapott R_{ex} értékek. A három diagram a vad típusú fehérje és két mutáns változat (A-WT-piros, B-M65I-zöld, C-S97L-sárga) R_{ex} (1/s) értékeinek aminosav-pozíció menti eloszlását mutatja. Az x tengely az aminosav-sorszámot, míg az y tengely a konformációs cseréből származó R_{ex} hozzájárulást jelzi. A diagramok lehetővé teszik a mikro-millisekundos időskálájú dinamikai különbségek összehasonlítását a vad típus és a mutáns fehérjék között. Összehasonlításnál (második adott színnel jelölt diagram) ott van adat, ahol mind a WT, mind az adott mutáns esetében rendelkezésre áll az illesztett R_{ex} paraméter.



24. Ábra: Molekulagerinc S^2 rendparaméterek a szerkezetekre vetítve. Az ábrák az egyes EVH1 variánsok fehérje gerincének S^2 rendparamétereit mutatják (A-WT, B-M65I, C-S97L), amelyek az egyes aminosavak lokális mozgékonyágát jellemzik a ps-ns időskálán. A színskála a flexibilitás mértékét jelzi: a magas S^2 értékek (kék) merev, jól rendezett régiókra, míg az alacsony S^2 értékek (piros) flexibilis, rendezetlen szakaszokra utalnak. Az eredmények az oldatfázisú dinamikai tulajdonságokat tükrözik. Zölddel azokat az aminosavakat jelöltem, ahol nem volt illesztett érték.



25. Ábra: A ms- μ s időskálájú mozgásokra utaló R_{ex} értékek a molekulászerkezetre vetítve. Az ábrák a három variáns (A-WT, B-M65I, C-S97L) R_{ex} csere értékeit mutatják. A színskála a mikro—milliszekundumos időskálán zajló konformációs cseréhez kapcsolódó dinamikát jelzi: a magas R_{ex} értékek (piros) jelentős konformációs fluktuációra vagy állapotközi egyensúlyra utalnak, míg az alacsony értékek (kék) dinamikailag stabil régiókat jeleznek. A R_{ex} paraméter a lassabb, feltehetően funkcionálisan releváns mozgások érzékeny indikátora.

A molekuláris dinamika elemzése alátámasztja a kísérleti megfigyeléseket

A belső mozgások további elemzése érdekében több párhuzamos molekuláris dinamikai szimulációt is lefutattunk a vad típus és mutáns doménváltakozatok szabad, azaz ligandum nélküli formájában. A vizsgált szimulációs idő alatt (1 mikroszekundum) nem volt jelentős különbség a WT és a mutánsok között. Az RMSF értékek összehasonlíthatók a különböző szerkezetek között, kivéve egy kis eltérést a $\beta 1$ és $\beta 2$ közötti hurokban. Csak a terminális régiók és a hurkok flexibilitása számottevő, míg a szerkezet többi része érdemben nem változik (szintén megfigyelhető az MD trajektóriák kezdeti és végső modelljein). Ez összhangban van a legfontosabb kísérleti

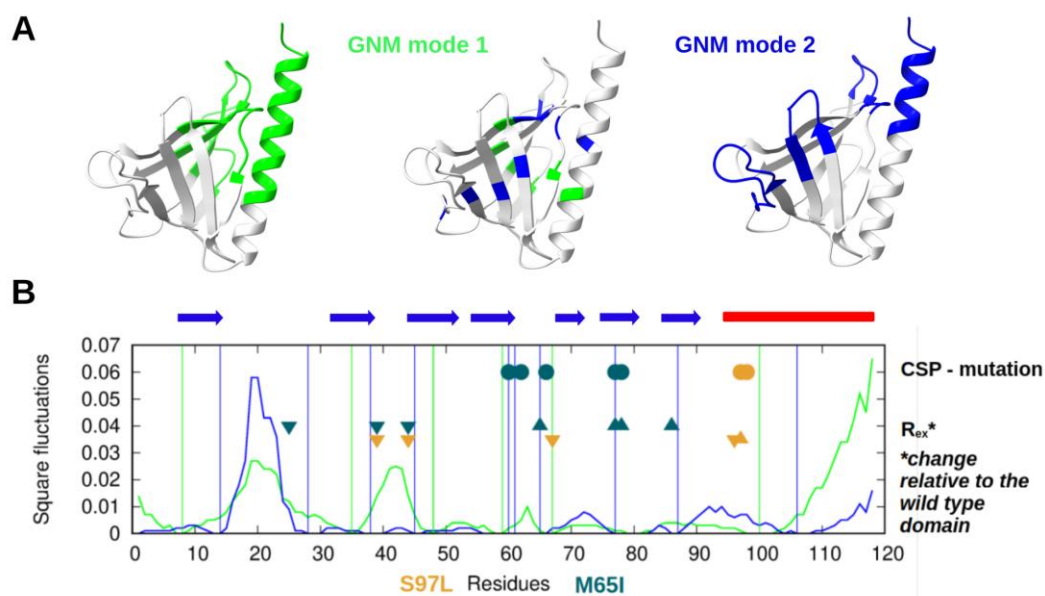
megfigyeléseinkkel, amelyek azt mutatják, hogy a domének szerkezete alapvetően stabil és a mutációk sem okoznak komolyabb változásokat. Némi változékonyság nem a mutációkat tartalmazó pozíciókban figyelhető meg, hanem azok környékén, de ez nem befolyásolja jelentősen a szerkezeteket. Ugyanez érvényes a vizsgált aminosav-aminosav kölcsönhatásokra is, ahol kisebb eltéréseket látunk a Van der Waals-kölcsönhatásokban és a hidrogénkötési mintázatban a mutánsoknál, de az aminosavcserékkel közvetlenül érintett pozíciókban nem. A molekuladinamikai szimulációkból kapott szerkezeteken elvégzett, a molekulagerinc hidrogénkötés-mintázatán alapuló DSSP elemzés minimális különbségeket mutatott a vad típusú domén és a mutánsok között, a mutánsok esetében nagyobb arányban azonosított kanyar (turn, T) szerkezeteket a szekvencia 18-21 és a 80-83 aminosavainak régióiban, mindkét esetben a hidrogénkötést nem mutató "bend" (S) állapot rovására. Ez a különbség azonban a harmadlagos szerkezetben alig jelenik meg, csupán az M65I mutáns esetében növekszik meg a számolt RMSF (root mean square fluctuation) érték a 18-23 aminosavak között az egyik MD futás esetében. Véleményünk szerint ezek az eltérések elhanyagolhatóak, és nem segítik a kapott dinamikai R_{ex} paraméterek értelmezését, bár kvalitatív módon összhangban vannak azzal, hogy az S^2 értékek csak minimálisan változnak a mutációk hatására.

4.12 Gaussian network model elemzés

A lassú belső mozgások eloszlását az EVH1 domén szerkezetében Gauss hálózati modell (GNM) modell segítségével becsültük meg, a módszer ProDy programcsomagban implementált változatát alkalmazva (Zhang et al., 2021). Ez az egyszerűsített modell csak a Ca pozíciókat veszi figyelembe, így a domén általános szerkezetének elemzésére alkalmas. Emiatt nem képes arra, hogy számot adjon a mutánsok közötti különbségekről. Ebben az esetben alkalmazásától azt reméltük, hogy segít feltárni az EVH1 architektúra általános jellemzőit, és azokat a pozíció-specifikus, a kémiai környezet megváltozásaira rendkívül érzékeny NMR kísérleti adatokkal összevetve lehetőséget nyújt arra, hogy közelebb kerüljünk a mutációk mechanisztikus hatásainak megértéséhez.

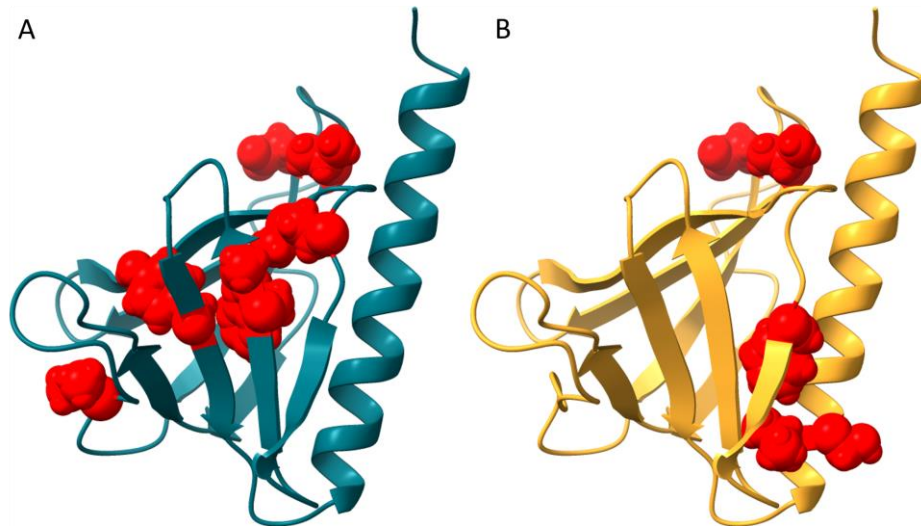
A GNM által azonosított első két módus (26. *A ábra, két szélső szerkezet*) azt sugallja, hogy a domén „felső” és „alsó” részei egymáshoz képest elmozdulhatnak. A középső ábrán a zöld és kék színezés az első, illetve a második módushoz tartozó „csukló” aminosavak pozícióját mutatja (26. *A ábra, középső szerkezet*). Némileg meglepő módon az ezen módusok kapcsán csuklóként („hinge”) azonosított aminosavak nagyrészt jól meghatározott másodlagos szerkezeti elemekben helyezkednek el, elsősorban a β -szálakban, valamint az α -hélix középső részénél. Figyelemre méltó, hogy van egy rövid szakasz az 59-67-es aminosavak között, amelyben egymáshoz közel mindkét módhoz tartozó csuklópontok megtalálhatóak. Az M65I mutációval érintett Met65

aminosavat az elemzés a 2. módushoz tartozó csuklópontként azonosította. A GNM elemzés eredményeit hozzávetőlegesnek tekintve is valószínűsíthető, hogy az M65 mutáció egy olyan aminosavat érint, amely kulcsszerepet játszik a doménre jellemző legfontosabb belső mozgásokban. Ezt az is alátámasztja, hogy az M65I variánsban az amid NH kémiai eltolódások és/vagy az illesztett R_{ex} értékek közül a vad típushoz képest legnagyobb eltérést mutató aminosavak közül több is a GNM elemzés által kiadott csuklópontoknak felel meg. Ilyenek a Thr60, Thr66, Trp77 a CSP esetében, illetve a Phe14, Met65, és ismét Trp77 a R_{ex} hozzájárulásoknál (27. ábra). Érdekes módon a 2. mód csuklóhelyei közelében több aminosav is mindkét mutánsban megváltozott R_{ex} hozzájárulást mutat, nevezetesen az Asp39 és a Val44, melyek a Tyr38 és Tyr45 csuklóhelyekkel határolt hajtűkanyar (turn) szerkezetben találhatóak. Az S97L változat esetében a megfigyelt mintázat kevésbé egyezik a GNM eredményekkel, mivel a Leu97 aminosav, amely egyrészt nagy CSP-t mutat, másrészt a mutánsban a vad típushoz képest nagyobb R_{ex} értéket, nem kapcsolható egyértelműen egyik csuklóhoz sem. A hozzá legközelebbi pozíció a 100-as aminosav, amely a 1. mód csuklója, és majdnem egy teljes fordulattal arrébb van a hélixben (26. B ábra).



26. Ábra: Gauss-hálózati modell elemzés az EVH1 domén szerkezetéről. A) A szerkezeti modellben az első módushoz tartozó csukló aminosavak sötétzölddel, a második módus csukló aminosavai kékekkel vannak jelölve. B) A $C\alpha$ pozíciókhoz tartozó becsült elmozdulások (square fluctuations) az első és második módusnak megfelelően sötétzöld és kék vonalakkal ábrázolva a szekvencia mentén. A függőleges vonalak a módokhoz tartozó csukló aminosavakat jelölik. A körök a vad típusú doménhez képest jelentős kémiaieltolódás-változást mutató aminosavakat jelölik. A háromszögek olyan pozíciókat jelölnek, ahol a R_{ex} hozzájárulások jelentős változást mutatnak a

vad típushoz képest; lefelé mutató szimbólum a csökkenést, felfelé mutató a növekedést jelzi az R_{ex} paraméterekben. A feltüntetett pozíciókban a változás jelentős R_{ex} -re ($> 2,5$ Hz) történő átmenetet okoz, és maga a változás meghaladja az 1 Hz-t. A szimbólumok színe az érintett variánsokra utal.



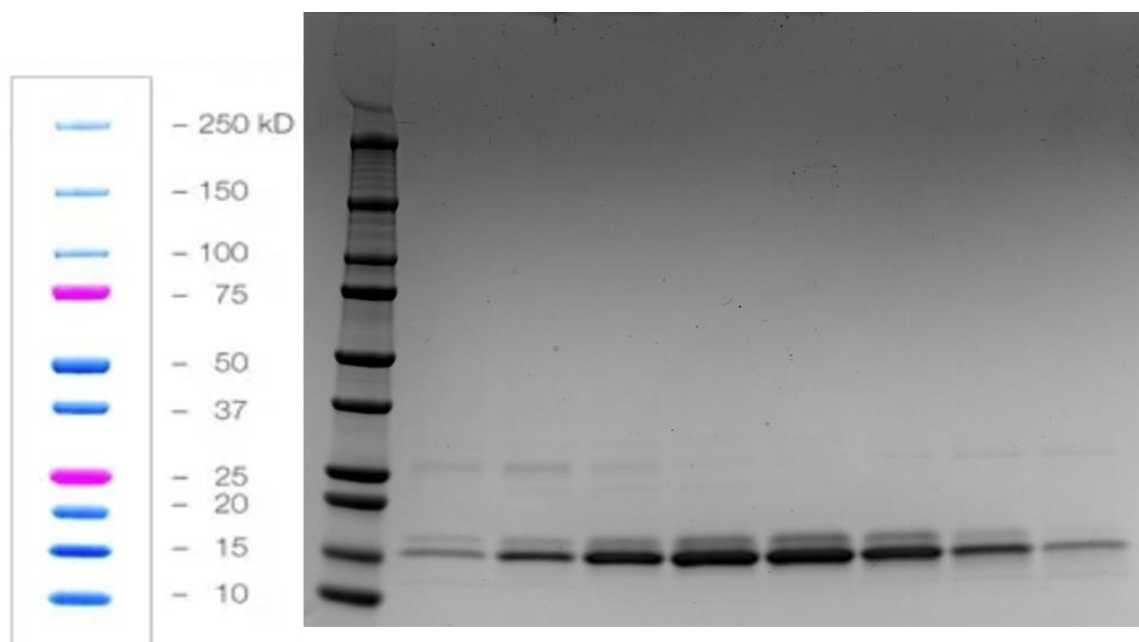
27. Ábra: Az A ábrán az M65I variánsban a WT-hez képest jelentősen eltérő R_{ex} értékkel jellemezhető aminosavakat, a B ábrán az S97L variánsban a WT-hez képest jelentősen eltérő R_{ex} értékeket mutató aminosavakat emeltem ki (lásd még a 26. ábrán is).

4.13 A GKAP fehérje rendezetlen GBR1-3 régiója kicsapódásra hajlamos

A GKAP fehérje GBR1-3 régiójának előállítására és jellemzésére irányuló projektet nem sikerült teljes egészében megoldani, azonban jelentős eredményeket sikerült elérnem. A protokoll a későbbiekben természetesen még áteshet módosításokon, optimalizáláson, alább az általam elért legjobb eredményekhez vezető eljárásokat részletezem. Kísérletek során arra jutottam, hogy a refolding, azaz a GdnHCl által denaturált fehérje újbóli feltekeredése a legjobb, ha az oszlopon, az IMAC tisztítás során történik. Ami még kiderült a tisztítás közben, hogy hiába 0,48 a GBR1-3 domén becsült extinkciós koefficiense, nincs elnyelése 280 nm-en, amit mind a NanoDrop, mind az Äkta vagy FPLC használatánál figyelembe kell venni. Viszont megfigyeltem, hogy 210 nm-en van mérhető elnyelése, így szerencsére detektálható tisztítás közben. A fehérje szekvenciája (GSHMGKDDEIPCRMRSGSYIKAMGDEDSGSDTSPKPSKVAARRESYLKATQPSLTELTTLKISNEHSPKLQIRSHSYLRAVSEVSINRSLDSDL) nem tartalmaz triptofánt, ez magyarázza a 280 nm-es elnyelés gyengeségét.

Még egy érdekességet figyelhettem meg a tisztítás során, a GBR1-3 SDS-PAGE-n 2 sávban jelent meg (28. ábra). Ennek okát nem sikerült tisztáznom. Az NMR mérést követően a spektrumokat a

CCPNMR és Sparky szoftver segítségével kezdtem el elemezni, a csúcsokat asszignálni, azonban sajnos a kapott spektrumokban látott mintázat nem volt egyértelműen összeegyeztethető a várt szekvenciával, annak ellenére, hogy az expresszió és a tisztítási lépések során nem merült fel olyan körülmény, amely ekkora inkonzisztenciára utalt volna. A kapott ^1H - ^{15}N HSQC spektrum egyértelműen bizonyította a fehérje rendezetlen jellegét. Bár a HSQC spektrumon kevesebb csúcs volt látható, mint az elvárt, ennek valószínűsíthető oka, hogy sok csúcs átfedésben volt egymással. Összességében elmondható, hogy bár a rutin elemzések alapján úgy látszott, hogy az expressziót sikerült annyira optimalizálnom, hogy NMR-mérésre alkalmas mintát állíthassak elő, a régió vizsgálata továbbra is nehézségekbe ütközik. Az észlelt problémák okainak feltárása és kiküszöbölése a már befektetett munka mellett további jelentős időráfordítást igényelne, melyet PhD tanulmányaim alatt nem láttam biztosíthatónak, különösen a siker bizonytalanságát is figyelembe véve.



28. Ábra: A GBR1-3 dupla sávval jelenik meg az SDS-PAGE gélképen. Baloldalon a méret meghatározáshoz használt molekula létra látható (Precision Plus Protein Dual Color Standards), majd az utolsó tisztítási lépés (SEC) frakciói. Az egyes frakciók több lépésben lettek begyűjtve annak érdekében, hogy tisztaság szempontjából elkülönített adagokat kapjunk.

5. Diskusszió

Az EVH1 doménekből, de általában a PH doméncsalád tagjaiból viszonylag kevés oldatfázisú szerkezet elérhető. Emiatt is igen fontos, hogy a Homer1 EVH1 domén NMR-szerkezetét sikeresen meghatároztuk. A Homer fehérjecsald EVH1 doménjeiből tudomásunk szerint csak röntgendiffrakcióval meghatározott kristályszerkezetek álltak korábban rendelkezésre, melyekben a szabad és a ligandumkötött konformáció szinte teljes mértékben megegyezett, azt sugallva, hogy a domén teljesen merev, és nem történik szerkezeti átrendeződés a peptidkötés során. Bár ez a kép a mai általános ismereteink szerint sem túlzottan valószínű, az észlelt szerkezeti különbségek fontos lépést jelentenek a partnerkötés során bekövetkező változások pontos megértésében.

A szerkezetmeghatározás során kialakult képet erősítik az oldatfázisú dinamika vizsgálata során kapott eredményeink. Tudomásom szerint EVH1 doménről még nem készült korábban NMR dinamikai vizsgálat, csupán egyes, távoli rokonnak tekinthető PH domének esetében álltak rendelkezésre eredmények. A vad típusú Homer1 EVH1 domén az NMR tanúsága szerint a ps-ns időskálán merev, de a kapott R_{ex} hozzájárulások alapján a μ s-ms időskálán feltételezhetően jelentősebb belső mozgásokkal jellemezhető. Ezek a mozgások érintik a ligandumkötő régió környékét, valamint az általunk azonosított, pozitív töltésű felszíni részhez közeli hurokrégiókat is. Az ennek megfelelő régió az, ahol egy távoli rokon PH doménben is tapasztaltak hasonló dinamikai jellegűket, így felmerül, hogy ez, pontosabban az észlelt paraméterek mögötti belső elmozdulások alapvető jellege a doméncsalád valamelyest konzervált vonása lehet. Ezek az eredmények megerősítik a szerkezetvizsgáló technikák egymást kiegészítő jellegét, rámutatva, hogy az oldatfázisú NMR-vizsgálatok még egy jól jellemzettnek tekinthető molekulacsalád esetében is fontos új aspektusokkal gazdagíthatják ismereteinket, elsősorban a dinamikai viselkedés tekintetében. Ennek hangsúlyozása talán nem magától értetődő abban a korban, amikor a röntgendiffrakció a régóta jelenlévő rutin és a fejlődő automatizálás, a krio-elektronmikroszkópia pedig a hiányában korábban nehezen vizsgálható komplex rendszerek miatt háttérbe szorítja a mágneses magrezonancia elemzéseket a globuláris fehérjék tekintetében.

Ugyanezt a képet erősítik a két vizsgált mutáns kapcsán kapott eredményeim. Bár idő- és munkaigényes jellege miatt ezek esetében nem végeztük el a teljes szerkezetmeghatározási folyamatot, a lokális szerkezetről aminosav szintű információt nyújtó másodlagos kémiai eltolódások, és a globális szerkezetre érzékeny technikák, mint a SAXS és a CD egyértelműen azt mutatják, hogy sem az S97L, sem az M65I mutáns esetében nem változik meg érdemben a domén térszerkezete. Ugyanakkor a dinamikai jellemzők elemzése egy jól definiált időskálán markáns

különbségekre világít rá. Megjegyzendő, hogy a dinamikai különbségek megléte megfelelő magyarázattal szolgálhat az M65I mutáns HSQC spektrumában észlelt nagyobb mértékű változásra, még ha ez meglepőnek is tűnhet. Az ^1H - ^{15}N HSQC spektrumot a molekula ujjenyomatának tekintjük, ám megváltozása érzékenysége miatt nem csupán a szerkezetre - pontosabban az időben "átlagosnak" tekinthető konformációra -, hanem a dinamikus viselkedés egyes aspektusaira is utalhat. Az M65I mutáns komplexebb kitekeredési görbéje és alacsonyabb hőstabilitása is arra utal, hogy ez a mutáció jelentősebben befolyásolja a domén viselkedését, ám a másodlagos kémiai eltolódások és a SAXS mérések egyértelműen arra utalnak, hogy a domináns szerkezet nem tér el a vad típusétól. Ebben az esetben is igaz tehát, hogy az NMR spektroszkópia tette lehetővé az okozott változások jellegének pontos azonosítását.

Azt reméltem, hogy a mutánsok szerkezeti és funkcionális vizsgálatával egyértelmű választ kapok majd arra, hogy a mutációk miért okozhatják a posztzinaptikus fehérjehálózat megváltozását, és ezáltal érthetővé válik, hogy miért hozhatók összefüggésbe az autizmussal. Eredményeim azonban nem adnak erre a kérdésre egyértelmű választ, elsősorban azért, mert a vizsgált, Shank fehérjéből származó partnerrel mért kölcsönhatás erőssége nem változik drasztikusan egyik mutáció hatására sem. Emiatt a mutációk által okozott funkcionális változás mechanizmusát máshol kell keresnünk. Rokon EVH1 domének esetében kísérleti bizonyíték van arra, hogy partner fehérjeszakaszok kötésében a β 4- β 5 hurokrégió is részt vehet. Az ENAH EVH1 domén esetében ráadásul ez a régió jelentős mértékben járul hozzá a partnerkötés erősségének meghatározásához, és ezt a rokon EVL fehérje EVH1 doménjének célzott módosítása is megerősíti (Hwang et al., 2021). Emellett az N-WASP fehérje EVH1 doménjének elérhető NMR szerkezetei is arra utalnak, hogy ez a régió az elsődleges kötőhely mellett további kölcsönhatások kialakításában is részt vehet (Volkman et al., 2002) (Peterson et al., 2007). Fontos megjegyezni, hogy mindkét előbbi példában (ENAH és N-WASP EVH1) a doménhez kötött peptid orientációja ellentétes az ismert Homer1 EVH1 doménekben észlelttel. Ezzel együtt felmerül a lehetőség, hogy elsősorban az M65I mutáció hatása legalább részben az lehet, hogy az elsődleges kötőhelyen kívül kialakított kölcsönhatásokat megváltoztatja, akár közvetlen aminosav-aminosav kontaktusok átrendezése, akár a dinamikai viselkedés áthangolása révén. Ennek a hipotézisnek a vizsgálata természetesen további, célzott kísérleteket igényelne. A kutatócsoportunkban elért friss eredmények más, lineáris motívumot kötő fehérjék esetében egyértelműen utalnak arra, hogy funkcionálisan rendezetlen partnerfehérjén az elsődleges, a kötés erősségét dominánsan meghatározó motívumtól távolabb lévő aminosavak is fizikai kontaktusba kerülhetnek a globuláris kötőpartnerrel (Nagy-Kanta et al., 2026), így azt gondolom, hogy mindenképpen számításba kell venni a kiterjesztett kölcsönhatások modulálásának lehetőségét.

A másik fontos aspektus a Homer fehérjék esetében, hogy a működést érdemes a fiziológián releváns, tetramer formában is vizsgálni. Ennek korlátja, hogy a hosszú coiled-coil régió biotechnológiai előállítására alkalmas formában előreláthatóan lényegesen nehezebb, mint a globuláris EVH1 régió. Ezért a kztatóportunk első megközelítésként egy modellezési eljárást választott, melynek eredményét az EVH1 domén szerkezetét is leíró közleményünkben (I. közlemény) ismertettük, részleteire azonban - mivel maga a modellezés nem saját munkám - a disszertációban nem tértem ki. Legfontosabb eredményünk, hogy a coiled-coil régió egyes szakaszai eltérő stabilitásúak, és emiatt a teljes, tetramer molekula kellően flexibilis ahhoz, hogy a két végén található EVH1 doménekkal felismert posztszinaptikus struktúrák közötti kapcsolatot akkor is fenntartsa, ha azok relatív térbeli helyzete megváltozik.

A közvetlen kötőmotívum melletti régiók szerepének vizsgálatába illeszkedett másik alapvető kutatási célkitűzésem, a GKAP fehérje GK-kötő régiójának vizsgálata is, azonban ebben a projektben végül nem sikerült olyan konstrukciót előállítanom, amely részletes funkcionális vizsgálatra lett volna alkalmas. A rendezetlen régiók elemzésében kétségkívül a mágneses magrezonanciáé a vezető szerep az atomi szintű kísérletes technikák közül, azonban, mint ahogyan ez a példa is mutatja, a mintakészítés terén még igen komoly nehézségekbe ütközhetünk.

A posztszinaptikus denzitás komplexitásának megfelelően annak szerveződésének megértéséhez az eredményeim csak viszonylag kis lépésekben visznek közelebb. Rávilágítanak azonban arra, hogy a molekuláris mechanizmusok részletes megértéséhez mindenképpen szükség van a bináris kölcsönhatásokon és az azokat közvetlenül meghatározó molekularészleteken túlmutató, integrált megközelítésre, valamint a statikus szerkezeteken túl a dinamikai viselkedés feltérképezésére is.

6. Tézispontok

1 Sikeresen előállítottam posztzinaptikus fehérjék szerkezeti és funkcionális vizsgálatára alkalmas konstrukcióit.

1/a Az előállított Homer1 EVH1 domén ^{15}N - ^{13}C jelölt formában is stabil, kicsapódásmentes marad, nagy töménységben is.

A Homer1 EVH1 fehérje expresszálása *E.Coli* BL21 baktériumsejtekben jó határfokon történt, amit az SDS-PAGE vizsgálat támasztott alá. A SAXS vizsgálatához, BLI-hez és Thermal Shift Assay-hez jelöletlen, NMR titráláshoz ^{15}N jelölt, NMR jelhozzárendeléshez pedig ^{13}C - ^{15}N jelölt mintára volt szükségem. Minden esetben sikerült a Homer1 EVH1 fehérje variánsokat (vad típus, M65I és S97I) nagy tisztaságban, stabil, kicsapódástól mentes formában előállítanom.

1/b Az előállított GKAP fehérje rendezetlen GBR1-3 régiója kicsapódásra hajlamos.

A GKAP fehérje GBR1-3 régiójának *E.Coli* BL21 baktériumban való termelése, majd több lépéses tisztítása megtörtént. A rendezetlen minta kicsapódásra hajlamos, guanidium hidroklorid jelenlétében stabil. Ez azonban kitekert állapotban tartja a fehérjét, így szerkezeti vizsgálatokra nem alkalmas. A fehérje tisztítási protokoll rengeteg optimalizáláson ment keresztül, ami több puffer és adalék hozzáadását tartalmazta, így sikerült egy rövid ideig viszonylag stabil mintát előállítani. Készült NMR mérés is, a spektrumok kiértékelése is elindult, azonban ezek nem bizonyultak kellően jó minőségűnek ahhoz, hogy egy teljes fehérje asszignációjára alkalmasak legyenek. Így a jövőben majd további protokoll optimalizálási lépésekre van még szükség.

2 A Homer1 EVH1 domén oldatfázisú szerkezete funkcionálisan fontos aspektusokra világít rá.

Homer1 fehérje EVH1 domén szerkezete alapvető vonásaiban megfelel az irodalomban korábban leírtaknak, tartalmaz egy β -szendvicset, 7 β -redővel és egy C-terminális végi hosszú α -hélixet (I. közlemény). Az elérhető, röntgenkristallográfiával meghatározott szerkezetekhez képest azonban kisebb eltéréseket mutat, leginkább a ligandumkötő hely közelében lévő, a 17-29, valamint a 40-43 aminosavak közötti hurokrégiókban. A ligandumkötésben közvetlenül érintett

Trp24 aminosav indolgyűrűje is eltérő orientációt mutat, emiatt valószínűsíthető, hogy a ligandumkötés hatására a doménben kisebb szerkezeti-dinamikai átrendeződések következnek be, ellentétben a korábban elérhető szerkezetek által sugallt teljesen merev konformációval.

3 A vizsgált mutációk nem változtatják meg érdemben az EVH1 domén globális és lokális szerkezetét.

Az M65I mutáns HSQC spektrumát összevetve a vad típuséval azt láthatjuk, hogy lényegében az összes kémiai eltolódás máshová esik, a csúcsok nem fednek át. A csúcsok egymáshoz képest közel maradnak, de mégis eltolódva. Ezzel szemben az S97L pontmutáció alig okoz eltéréseket a vad típus HSQC spektrumával összevetve. A megfigyeltek alapján tehát van különbség a két mutáció között, hatásuk alapvetően különbözik. A mutánsok NMR jelhozzárendelését elvégezve, annak alapján a Ca és Ha kémiai eltolódásokat elemezve a másodlagos szerkezetben nem találtam lényeges eltérést a vad típushoz képest. Az elvégzett SAXS mérések arra utalnak, hogy a globális szerkezet is hasonló maradt a vad típushoz mindkét mutáns esetében. Ugyanezt megerősítik a CD mérések is, így kijelenthető, hogy bár az ^1H - ^{15}N HSQC spektrumok egyértelműen utalnak a két mutáció eltérő hatására, azok egyike sem okoz komolyabb szerkezeti átrendeződést.

4 Az egyes variánsok ligandumkötése minimálisan, hőstabilitása nagyobb mértékben különbözik.

A biolayer interferometria (BLI) vizsgálatok a Shank3 PRO régióból származó rövid, izotópjelölést nem tartalmazó peptid (*LVPPPEEFANG*) hozzáadásával történtek. Az M65I variáns esetében a kötési erősség kis mértékben gyengült, míg S97L esetében kis mértékben nőtt a vad típushoz képest.

Hőstabilitási vizsgálatok az S97L esetében részleges, enyhe stabilizáló hatást, míg az M65I variáns esetében a domén destabilizációját mutatják. A Shank3 peptiddel való kötődés nem befolyásolta a denaturációs kinetikát. NMR titrálási kísérletek során a három variáns, a vad típus, az M65I és az S97L mutánsok esetében több csúcs esetében is hasonló típusú változásokat észleltem, ami az eredmények megbízhatóságát erősíti.

5 Az EVH1 vizsgált mutációi a domén belső dinamikájának átrendeződését okozzák.

A mutáns álzottatok NMR-dinamikai elemzése kevés, de vélhetően releváns változásra mutatott rá a vad típus viselkedéséhez képest. A gyors (ps-ns) időskálájú mozgásokra jellemző S^2 rendparaméterek igen hasonlóak mindhárom variáns esetében. A lassabb, μ -ms időskálájú elmozdulásokra utaló R_{ex} paraméterek eloszlása ugyanakkor jellegzetes különbségeket mutat. Az ezek mögötti konformációs átrendeződések feltárásának érdekében végzett CEST méréseink azonban nem szolgáltatott eredményt, ami az érintett mozgások időskálájának szűkebb tartományba tartozását valószínűsíti. Az EVH1 doménen elvégzett Gaussian network model (GNM) elemzésünk arra utal, hogy a doménben jelen vannak olyan lassú időskálájú belső mozgások, amelyeket a mutációk befolyásolhatnak. Több, a feltételezhető mozgásokhoz tartozó csukló aminosav vagy a közvetlen környezete mutat ugyanis nagyobb mértékű változást a kémiai eltolódások és/vagy az R_{ex} paraméterek tekintetében. Az M65I mutáció által érintett M65 aminosav, illetve környezete pl. a két leginkább domináns GNM módusban is érintett, és az NMR-paraméterekben is változásokat mutat.

7. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Gáspári Zoltánnak, mindazt a szakmai iránymutatást, támogatást és türelmet, amit nem csak a PhD éveiben, hanem az azt megelőző években, a BSc-s és MSc-s kutatásom alatt is tanúsított. Segítségével elérhettem ezt a mérföldkövet, amiért mérhetetlenül hálás vagyok.

Nem kevesebb köszönet illeti Dr. Péterfia Bálintot, aki folyamatos szakmai ötleteivel, támogatásával új és új lehetséges megoldások kitalálására sarkallt minden nehezebb akadállynál. Neki is köszönhetem, hogy sosem adtam fel és újra és újra megpróbáltam.

Szeretném megköszönni Dr. Kálmán-Dobson Zsófia Etelkának a közös munkát, a molekuladinamikai számításokat és a milánói konferencián szerzett élményeket.

Köszönettel tartozom Dr. Batta Gyulának és Dr. Czajlik Andrásnak az NMR mérések elkészítéséért és kiértékelésükben nyújtott segítségért.

Hálás vagyok Dr. Perttu Perminek, hogy dolgozhattam 5 hónapot a laboratóriumában és készségesen segített újra és újra lemérni a GBR1-3 mintákat. Köszönöm Dr. Chandan Thapanak a segítséget, amit a kihívásokkal teli GBR1-3 protokollal optimalizálása során nyújtott. És Ilonának, hogy jó, és megértő barátárra leltem finnországi tartózkodásom alatt.

Köszönöm Tomas Klumplernek is, hogy lehetővé tette számunkra a SAXS minták lemérését Brno-ban, Csehországban.

A tömegspektrometriás mérések megvalósulását köszönöm Dr. Papp Istvánnak.

Szeretném még megköszönni a labor többi tagjának, Briginek, Eszternek, Annának és Somának is a laborban nyújtott segítséget, a kedvességet és beszélgetéseket.

Emellett szeretném megköszönni barátaimnak, Borkának, Juditnak, Katának és Barnabásnak, hogy a nehéz napok ellenére mindig támogattak, motiváltak, lelkesítettek.

Nem utolsó sorban köszönöm szüleimnek, nagyszüleimnek, hogy mindig támogattak abban, hogy tanuljak, fejlődjek.

Végezetül, szeretném megköszönni a Tématerületi Kiválósági Programnak (TKP2021-EGA-42) és a Hiteles Ember Alapítványnak, hogy lehetővé tették támogatásukkal a munkám megvalósulását, konferenciákon való részvételeimet. Valamint az Erasmus + programnak, hogy átélhettem életem

legnagyobb kalandját, mely során rengeteget fejlődtem mind szakmailag, mind emberileg az 5 hónapos finnországi tartózkodásom során.

8. Publikációk

8.1 Tézis alapjául szolgáló

I. közlemény: Zs. E. Kálmán, A.Czajlik, B. Maruzs, **F. Farkas**, I. Pap, Cs. Homonnay, T. Klumpler, Gy. Batta, Z. Gáspári, B. Péterfia, "Structural modelling and dynamics of the full-length Homer1 multimer"
doi: <https://doi.org/10.1101/2025.05.26.655084>

II. közlemény: **F. Farkas**, B. Maruzs, Zs. E. Kálmán-Dobson, T. Klumpler, Gy. Batta, B. Ferenc Péterfia, Z. Gáspári, "Modulation of the internal dynamics of the Homer1 EVH1 domain by putative autism-associated mutations" (közlésre elfogadva)

8.2 Tézissel kapcsolatos poszterek és szóbeli előadások

P1 **F. Farkas**, Zs. E. Dobson-Kálmán, G. Batta, B.F. Péterfia, Z. Gáspári "Structural investigation of the wild-type and mutant EVH1 domain of the Homer1 protein in regards of Shank interaction", 49th FEBS CONGRESS, Istanbul, Turkey, 05-09 July 2025.

P2 **F. Farkas**, Zs. E. Dobson-Kálmán, G. Batta, B.F. Péterfia, Z. Gáspári, „The Homer1-Shank3 interaction: NMR and SAXS studies on wild type and mutant Homer1 EVH1 domains” Magyar Molekuláris Élettudományi Konferencia, Eger, Magyarország, 28-30 March 2025.

P3 **F. Farkas**, Zs. E. Dobson-Kálmán, G. Batta, B.F. Péterfia, Z. Gáspári, „Structural studies of the HOMER1 protein: combining experiments and modeling”, 48th FEBS CONGRESS, Milano, Olaszország, 29 Jun- 03 July 2024.

P4 **F. Farkas**, A. Czajlik, G. Batta, B. Péterfia, Z. Gaspari, "Atomiclevel investigations of the PSD-95 GK domain and its interaction with GKAP" July, 2021 – The 45th FEBS Congress, Ljubljana, Slovenia (online conference).

O1 **F. Farkas**. "Investigation of the Homer1:Shank3 interaction." Jun, 2025 - PhD Proceedings, Budapest Hungary. Scientific talk.

O2 **F. Farkas**. "Structural and functional investigation of the wild type and mutant EVH1 domain of the HOMER1 protein." Jun, 2024 - PhD Proceedings, Budapest Hungary. Scientific talk.

O3 **F. Farkas.** “Structural and functional investigation of the postsynaptic Homer protein”. Jun, 2023 - PhD Proceedings, Budapest Hungary. Scientific talk.

O4 **F. Farkas.** “Optimization of the expression and purification protocol of the GBR region of GKAP protein and initial NMR analysis.” Jun, 2022 - PhD Proceedings, Budapest Hungary. Scientific talk.

8.3 A szerző további publikációi

Sz1 E. Nagy-Kanta, Zs. E. Kálmán, H. Tossavainen, T. Juhász, **F. Farkas**, J. Hegedüs, M. Keresztes, T. Beke-Somfai, Z. Gáspári, P. Permi, B.Péterfia “Residual flexibility in the topologically constrained multivalent complex between the GKAP scaffold and LC8 hub proteins”

doi: <https://doi.org/10.1111/febs.70219>

9. Irodalomjegyzék

- Bai, Y., Wang, H., & Li, C. (2022). SAPAP Scaffold Proteins: From Synaptic Function to Neuropsychiatric Disorders. *Cells*, *11*(23), 3815. <https://doi.org/10.3390/cells11233815>
- Ball, L. J., Jarchau, T., Oschkinat, H., & Walter, U. (2002). EVH1 domains: Structure, function and interactions. *FEBS Letters*, *513*(1), 45–52. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(01\)03291-4](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(01)03291-4)
- Barzik, M., Carl, U. D., Schubert, W. D., Frank, R., Wehland, J., & Heinz, D. W. (2001). The N-terminal domain of Homer/Ves1 is a new class II EVH1 domain. *Journal of Molecular Biology*, *309*(1), 155–169. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4640>
- Bax, A., & Clore, G. M. (2019). Protein NMR: Boundless opportunities. *Journal of Magnetic Resonance*, *306*, 187–191. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2019.07.037>
- Beneken, J., Tu, J. C., Xiao, B., Nuriya, M., Yuan, J. P., Worley, P. F., & Leahy, D. J. (2000). Structure of the Homer EVH1 domain-peptide complex reveals a new twist in polyproline recognition. *Neuron*, *26*(1), 143–154. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)81145-9](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)81145-9)
- Bhattacharya, A., Tejero, R., & Montelione, G. T. (2007). Evaluating protein structures determined by structural genomics consortia. *Proteins*, *66*(4), 778–795. <https://doi.org/10.1002/prot.21165>
- Boeckers, T. M. (2006). The postsynaptic density. *Cell and Tissue Research*, *326*(2), 409–422. <https://doi.org/10.1007/s00441-006-0274-5>
- Boeckers, T. M., Bockmann, J., Kreutz, M. R., & Gundelfinger, E. D. (2002). ProSAP/Shank proteins—A family of higher order organizing molecules of the postsynaptic density with an emerging role in human neurological disease. *Journal of Neurochemistry*, *81*(5), 903–910. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.00931.x>
- Caire, M. J., Reddy, V., & Varacallo, M. A. (2025). Physiology, Synapse. In *StatPearls*. StatPearls

Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526047/>

- Chen, X., Vinade, L., Leapman, R. D., Petersen, J. D., Nakagawa, T., Phillips, T. M., Sheng, M., & Reese, T. S. (2005). Mass of the postsynaptic density and enumeration of three key molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(32), 11551–11556. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505359102>
- Cheng, D., Hoogenraad, C. C., Rush, J., Ramm, E., Schlager, M. A., Duong, D. M., Xu, P., Wijayawardana, S. R., Hanfelt, J., Nakagawa, T., Sheng, M., & Peng, J. (2006). Relative and absolute quantification of postsynaptic density proteome isolated from rat forebrain and cerebellum. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, *5*(6), 1158–1170. <https://doi.org/10.1074/mcp.D500009-MCP200>
- Choi, J., Ko, J., Park, E., Lee, J.-R., Yoon, J., Lim, S., & Kim, E. (2002). Phosphorylation of stargazin by protein kinase A regulates its interaction with PSD-95. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(14), 12359–12363. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200528200>
- Clementel, D., Del Conte, A., Monzon, A. M., Camagni, G. F., Minervini, G., Piovesan, D., & Tosatto, S. C. E. (2022). RING 3.0: Fast generation of probabilistic residue interaction networks from structural ensembles. *Nucleic Acids Research*, *50*(W1), W651–W656. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac365>
- Cobo-Simón, M., Hart, R., & Ochman, H. (2023). Escherichia Coli: What Is and Which Are? *Molecular Biology and Evolution*, *40*(1), msac273. <https://doi.org/10.1093/molbev/msac273>
- Cousins, S. L., Kenny, A. V., & Stephenson, F. A. (2009). Delineation of additional PSD-95 binding domains within NMDA receptor NR2 subunits reveals differences between NR2A/PSD-95 and NR2B/PSD-95 association. *Neuroscience*, *158*(1), 89–95. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.12.051>
- de Bartolomeis, A., Barone, A., Buonaguro, E. F., Tomasetti, C., Vellucci, L., & Iasevoli, F. (2022). The Homer1 family of proteins at the crossroad of dopamine-glutamate signaling: An

- emerging molecular “Lego” in the pathophysiology of psychiatric disorders. A systematic review and translational insight. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *136*, 104596. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2022.104596>
- Diering, G. H., Nirujogi, R. S., Roth, R. H., Worley, P. F., Pandey, A., & Huganir, R. L. (2017). Homer1a drives homeostatic scaling-down of excitatory synapses during sleep. *Science (New York, N.Y.)*, *355*(6324), 511–515. <https://doi.org/10.1126/science.aai8355>
- Dosemeci, A., Weinberg, R. J., Reese, T. S., & Tao-Cheng, J.-H. (2016). The Postsynaptic Density: There Is More than Meets the Eye. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, *8*, 23. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2016.00023>
- Dosset, P., Hus, J. C., Blackledge, M., & Marion, D. (2000). Efficient analysis of macromolecular rotational diffusion from heteronuclear relaxation data. *Journal of Biomolecular NMR*, *16*(1), 23–28. <https://doi.org/10.1023/a:1008305808620>
- Droogers, W. J., & MacGillavry, H. D. (2023). Plasticity of postsynaptic nanostructure. *Molecular and Cellular Neurosciences*, *124*, 103819. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2023.103819>
- Dudola, D., Kovács, B., & Gáspári, Z. (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>
- Esser, K. (Ed.). (1986). *Plasmids of eukaryotes: Fundamentals and applications*. Springer.
- Feng, W., Tu, J., Yang, T., Vernon, P. S., Allen, P. D., Worley, P. F., & Pessah, I. N. (2002). Homer regulates gain of ryanodine receptor type 1 channel complex. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(47), 44722–44730. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207675200>
- Feng, W., & Zhang, M. (2009). Organization and dynamics of PDZ-domain-related supramodules in the postsynaptic density. *Nature Reviews. Neuroscience*, *10*(2), 87–99. <https://doi.org/10.1038/nrn2540>
- Feng, Z., Chen, X., Zeng, M., & Zhang, M. (2019). Phase separation as a mechanism for

- assembling dynamic postsynaptic density signalling complexes. *Current Opinion in Neurobiology*, 57, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.12.001>
- Ferguson, K. M., Lemmon, M. A., Schlessinger, J., & Sigler, P. B. (1994). Crystal structure at 2.2 Å resolution of the pleckstrin homology domain from human dynamin. *Cell*, 79(2), 199–209. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90190-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90190-2)
- Feyder, M., Karlsson, R.-M., Mathur, P., Lyman, M., Bock, R., Momenan, R., Munasinghe, J., Scattoni, M. L., Ihne, J., Camp, M., Graybeal, C., Strathdee, D., Begg, A., Alvarez, V. A., Kirsch, P., Rietschel, M., Cichon, S., Walter, H., Meyer-Lindenberg, A., ... Holmes, A. (2010). Association of mouse Dlg4 (PSD-95) gene deletion and human DLG4 gene variation with phenotypes relevant to autism spectrum disorders and Williams' syndrome. *The American Journal of Psychiatry*, 167(12), 1508–1517. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2010.10040484>
- Frueh, D. P. (2014). Practical aspects of NMR signal assignment in larger and challenging proteins. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 78, 47–75. <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2013.12.001>
- Fushman, D., Cahill, S., & Cowburn, D. (1997). The main-chain dynamics of the dynamin pleckstrin homology (PH) domain in solution: Analysis of ¹⁵N relaxation with monomer/dimer equilibration. *Journal of Molecular Biology*, 266(1), 173–194. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0771>
- Grabrucker, A. M., Schmeisser, M. J., Schoen, M., & Boeckers, T. M. (2011). Postsynaptic ProSAP/Shank scaffolds in the cross-hair of synaptopathies. *Trends in Cell Biology*, 21(10), 594–603. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.07.003>
- Hammond, C., & Esclapez, M. (2015). The chemical synapses. In *Cellular and Molecular Neurophysiology* (pp. 121–144). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397032-9.00006-6>
- Hayashi, M. K., Ames, H. M., & Hayashi, Y. (2006). Tetrameric hub structure of postsynaptic

- scaffolding protein homer. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(33), 8492–8501. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2731-06.2006>
- Hayashi, M. K., Tang, C., Verpelli, C., Narayanan, R., Stearns, M. H., Xu, R.-M., Li, H., Sala, C., & Hayashi, Y. (2009). The postsynaptic density proteins Homer and Shank form a polymeric network structure. *Cell*, 137(1), 159–171. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.050>
- Huang, G. N., Huso, D. L., Bouyain, S., Tu, J., McCorkell, K. A., May, M. J., Zhu, Y., Lutz, M., Collins, S., Dehoff, M., Kang, S., Whartenby, K., Powell, J., Leahy, D., & Worley, P. F. (2008). NFAT binding and regulation of T cell activation by the cytoplasmic scaffolding Homer proteins. *Science (New York, N.Y.)*, 319(5862), 476–481. <https://doi.org/10.1126/science.1151227>
- Huynh, K., & Partch, C. L. (2015). Analysis of protein stability and ligand interactions by thermal shift assay. *Current Protocols in Protein Science*, 79, 28.9.1-28.9.14. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps2809s79>
- Hwang, T., Parker, S. S., Hill, S. M., Ilunga, M. W., Grant, R. A., Mouneimne, G., & Keating, A. E. (2021). A distributed residue network permits conformational binding specificity in a conserved family of actin remodelers. *eLife*, 10, e70601. <https://doi.org/10.7554/eLife.70601>
- Inoue, H., Nojima, H., & Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96(1), 23–28. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(90\)90336-p](https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90336-p)
- Irie, K., Nakatsu, T., Mitsuoka, K., Miyazawa, A., Sobue, K., Hiroaki, Y., Doi, T., Fujiyoshi, Y., & Kato, H. (2002). Crystal structure of the Homer 1 family conserved region reveals the interaction between the EVH1 domain and own proline-rich motif. *Journal of Molecular Biology*, 318(4), 1117–1126. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)00170-5](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00170-5)
- Jurrus, E., Engel, D., Star, K., Monson, K., Brandi, J., Felberg, L. E., Brookes, D. H., Wilson, L., Chen, J., Liles, K., Chun, M., Li, P., Gohara, D. W., Dolinsky, T., Konecny, R., Koes, D. R., Nielsen,

- J. E., Head-Gordon, T., Geng, W., ... Baker, N. A. (2018). Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 27(1), 112–128. <https://doi.org/10.1002/pro.3280>
- Kálmán, Z. E., Czajlik, A., Maruzs, B., Farkas, F., Pap, I., Homonnay, C., Klumpler, T., Batta, G., Gáspári, Z., & Péterfia, B. (2025). Structural Modeling and Dynamics of the Full-Length Homer1 Multimer. *Proteins*. <https://doi.org/10.1002/prot.70091>
- Kelleher, R. J., Geigenmüller, U., Hovhannisyan, H., Trautman, E., Pinard, R., Rathmell, B., Carpenter, R., & Margulies, D. (2012). High-throughput sequencing of mGluR signaling pathway genes reveals enrichment of rare variants in autism. *PloS One*, 7(4), e35003. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035003>
- Kennedy, M. B. (2013). Synaptic Signaling in Learning and Memory. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(2), a016824. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016824>
- Kim, E., Naisbitt, S., Hsueh, Y. P., Rao, A., Rothschild, A., Craig, A. M., & Sheng, M. (1997). GKAP, a novel synaptic protein that interacts with the guanylate kinase-like domain of the PSD-95/SAP90 family of channel clustering molecules. *The Journal of Cell Biology*, 136(3), 669–678. <https://doi.org/10.1083/jcb.136.3.669>
- Koradi, R., Billeter, M., & Wüthrich, K. (1996). MOLMOL: A program for display and analysis of macromolecular structures. *Journal of Molecular Graphics*, 14(1), 51–55, 29–32. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00009-4](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00009-4)
- Kovács, D., & Bodor, A. (2023). The influence of random-coil chemical shifts on the assessment of structural propensities in folded proteins and IDPs. *RSC Advances*, 13(15), 10182–10203. <https://doi.org/10.1039/d3ra00977g>
- Lee, W., Tonelli, M., & Markley, J. L. (2015). NRMFAM-SPARKY: Enhanced software for biomolecular NMR spectroscopy. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 31(8), 1325–1327. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu830>
- Li, D., & Brüschweiler, R. (2025). COLMARvista: An open source 2D and pseudo-3D NMR spectral

- processing, visualization, and analysis software in JavaScript. *Journal of Biomolecular NMR*, 79(3), 171–179. <https://doi.org/10.1007/s10858-025-00465-y>
- Li, Z., Liu, H., Li, J., Yang, Q., Feng, Z., Li, Y., Yang, H., Yu, C., Wan, J., Liu, W., & Zhang, M. (2019). Homer Tetramer Promotes Actin Bundling Activity of Drebrin. *Structure (London, England: 1993)*, 27(1), 27-38.e4. <https://doi.org/10.1016/j.str.2018.10.011>
- Luo, P., Fei, F., Zhang, L., Qu, Y., & Fei, Z. (2011). The role of glutamate receptors in traumatic brain injury: Implications for postsynaptic density in pathophysiology. *Brain Research Bulletin*, 85(6), 313–320. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2011.05.004>
- Luo, P., Li, X., Fei, Z., & Poon, W. (2012). Scaffold protein Homer 1: Implications for neurological diseases. *Neurochemistry International*, 61(5), 731–738. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2012.06.014>
- Lüscher, C., & Malenka, R. C. (2012). NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(6), a005710. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005710>
- Marion, D. (2013). An Introduction to Biological NMR Spectroscopy. *Molecular & Cellular Proteomics*, 12(11), 3006–3025. <https://doi.org/10.1074/mcp.O113.030239>
- Marley, J., Lu, M., & Bracken, C. (2001). A method for efficient isotopic labeling of recombinant proteins. *Journal of Biomolecular NMR*, 20(1), 71–75. <https://doi.org/10.1023/a:1011254402785>
- Meng, E. C., Goddard, T. D., Pettersen, E. F., Couch, G. S., Pearson, Z. J., Morris, J. H., & Ferrin, T. E. (2023). UCSF ChimeraX: Tools for structure building and analysis. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 32(11), e4792. <https://doi.org/10.1002/pro.4792>
- Micsonai, A., Moussong, É., Wien, F., Boros, E., Vadász, H., Murvai, N., Lee, Y.-H., Molnár, T., Réfrégiers, M., Goto, Y., Tantos, Á., & Kardos, J. (2022). BeStSel: Webserver for secondary structure and fold prediction for protein CD spectroscopy. *Nucleic Acids Research*, 50(W1), W90–W98. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac345>

- Müller-Esparza, H., Osorio-Valeriano, M., Steube, N., Thanbichler, M., & Randau, L. (2020). Bio-Layer Interferometry Analysis of the Target Binding Activity of CRISPR-Cas Effector Complexes. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7, 98.
<https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00098>
- Nagy-Kanta, E., Kálmán, Z. E., Tossavainen, H., Juhász, T., Farkas, F., Hegedüs, J., Keresztes, M., Beke-Somfai, T., Gáspári, Z., Permi, P., & Péterfia, B. (2026). Residual flexibility in the topologically constrained multivalent complex between the GKAP scaffold and LC 8 hub proteins. *The FEBS Journal*, 293(1), 76–95. <https://doi.org/10.1111/febs.70219>
- Pain, R. (2005). Determining the CD spectrum of a protein. *Current Protocols in Protein Science*, Chapter 7, 7.6.1-7.6.24. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0706s38>
- Peng, J., Kim, M. J., Cheng, D., Duong, D. M., Gygi, S. P., & Sheng, M. (2004). Semiquantitative proteomic analysis of rat forebrain postsynaptic density fractions by mass spectrometry. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(20), 21003–21011.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M400103200>
- Pereda, A. E. (2014). Electrical synapses and their functional interactions with chemical synapses. *Nature Reviews. Neuroscience*, 15(4), 250–263. <https://doi.org/10.1038/nrn3708>
- Peterson, F. C., Deng, Q., Zettl, M., Prehoda, K. E., Lim, W. A., Way, M., & Volkman, B. F. (2007). Multiple WASP-interacting protein recognition motifs are required for a functional interaction with N-WASP. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(11), 8446–8453.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M609902200>
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605–1612.
<https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
- Rasmussen, A. H., Rasmussen, H. B., & Silaharoglu, A. (2017). The DLGAP family: Neuronal expression, function and role in brain disorders. *Molecular Brain*, 10(1), 43.

<https://doi.org/10.1186/s13041-017-0324-9>

- Romorini, S., Piccoli, G., Jiang, M., Grossano, P., Tonna, N., Passafaro, M., Zhang, M., & Sala, C. (2004). A functional role of postsynaptic density-95-guanylate kinase-associated protein complex in regulating Shank assembly and stability to synapses. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *24*(42), 9391–9404. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3314-04.2004>
- Sala, C., Vicidomini, C., Bigi, I., Mossa, A., & Verpelli, C. (2015). Shank synaptic scaffold proteins: Keys to understanding the pathogenesis of autism and other synaptic disorders. *Journal of Neurochemistry*, *135*(5), 849–858. <https://doi.org/10.1111/jnc.13232>
- Sheng, M., & Hoogenraad, C. C. (2007). The postsynaptic architecture of excitatory synapses: A more quantitative view. *Annual Review of Biochemistry*, *76*, 823–847. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.060805.160029>
- Sheng, M., & Kim, E. (2011). The postsynaptic organization of synapses. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *3*(12), a005678. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005678>
- Shin, S. M., Zhang, N., Hansen, J., Gerges, N. Z., Pak, D. T. S., Sheng, M., & Lee, S. H. (2012). GKAP orchestrates activity-dependent postsynaptic protein remodeling and homeostatic scaling. *Nature Neuroscience*, *15*(12), 1655–1666. <https://doi.org/10.1038/nn.3259>
- Shiraishi-Yamaguchi, Y., & Furuichi, T. (2007). The Homer family proteins. *Genome Biology*, *8*(2), 206. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-2-206>
- Südhof, T. C. (2012). The presynaptic active zone. *Neuron*, *75*(1), 11–25. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.06.012>
- Sultana, A., & Lee, J. E. (2015). Measuring protein-protein and protein-nucleic Acid interactions by biolayer interferometry. *Current Protocols in Protein Science*, *79*, 19.25.1-19.25.26. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps1925s79>
- Suzuki, T., Kametani, K., Guo, W., & Li, W. (2018). Protein components of post-synaptic density lattice, a backbone structure for type I excitatory synapses. *Journal of Neurochemistry*,

144(4), 390–407. <https://doi.org/10.1111/jnc.14254>

- Szumliński, K. K., Lominac, K. D., Kleschen, M. J., Oleson, E. B., Dehoff, M. H., Schwarz, M. K., Seeburg, P. H., Worley, P. F., & Kalivas, P. W. (2005). Behavioral and neurochemical phenotyping of Homer1 mutant mice: Possible relevance to schizophrenia. *Genes, Brain, and Behavior*, 4(5), 273–288. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2005.00120.x>
- Tamiola, K., Acar, B., & Mulder, F. A. A. (2010). Sequence-specific random coil chemical shifts of intrinsically disordered proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 132(51), 18000–18003. <https://doi.org/10.1021/ja105656t>
- Vallurupalli, P., Bouvignies, G., & Kay, L. E. (2012). Studying “invisible” excited protein states in slow exchange with a major state conformation. *Journal of the American Chemical Society*, 134(19), 8148–8161. <https://doi.org/10.1021/ja3001419>
- Verpelli, C., Schmeisser, M. J., Sala, C., & Boeckers, T. M. (2012). Scaffold proteins at the postsynaptic density. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 970, 29–61. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0932-8_2
- Volkman, B. F., Prehoda, K. E., Scott, J. A., Peterson, F. C., & Lim, W. A. (2002). Structure of the N-WASP EVH1 domain-WIP complex: Insight into the molecular basis of Wiskott-Aldrich Syndrome. *Cell*, 111(4), 565–576. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)01076-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)01076-0)
- Vranken, W. F., Boucher, W., Stevens, T. J., Fogh, R. H., Pajon, A., Llinas, M., Ulrich, E. L., Markley, J. L., Ionides, J., & Laue, E. D. (2005). The CCPN data model for NMR spectroscopy: Development of a software pipeline. *Proteins*, 59(4), 687–696. <https://doi.org/10.1002/prot.20449>
- Wei, Y., Thyparambil, A. A., & Latour, R. A. (2014). Protein helical structure determination using CD spectroscopy for solutions with strong background absorbance from 190 to 230nm. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1844(12), 2331–2337. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.10.001>
- Williamson, M. P. (2013). Using chemical shift perturbation to characterise ligand binding.

Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, 73, 1–16.

<https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2013.02.001>

Zhang, S., Krieger, J. M., Zhang, Y., Kaya, C., Kaynak, B., Mikulska-Ruminska, K., Doruker, P., Li, H., & Bahar, I. (2021). ProDy 2.0: Increased scale and scope after 10 years of protein dynamics modelling with Python. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 37(20), 3657–3659.

<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btab187>

Zhu, J., Shang, Y., & Zhang, M. (2016). Mechanistic basis of MAGUK-organized complexes in synaptic development and signalling. *Nature Reviews. Neuroscience*, 17(4), 209–223.

<https://doi.org/10.1038/nrn.2016.18>

Zhu, J., Zhou, Q., Shang, Y., Li, H., Peng, M., Ke, X., Weng, Z., Zhang, R., Huang, X., Li, S. S. C., Feng, G., Lu, Y., & Zhang, M. (2017). Synaptic Targeting and Function of SAPAPs Mediated by Phosphorylation-Dependent Binding to PSD-95 MAGUKs. *Cell Reports*, 21(13), 3781–3793.

<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.107>