PÁZMÁNY PÉTER KATOLIKUS EGYETEM
ROSKA TAMÁS MŰSZAKI ÉS TERMÉSZETTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

Nagy-Kanta Eszter

A GKAP posztszinaptikus állványfehérje szerkezeti és funkcionális vizsgálata

PhD Disszertáció

Témavezető:

Prof. Dr. Gáspári Zoltán DSc

2025

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke 3
1 Bevezetés 6
1.1 Funkcionálisan rendezetlen fehérjék és interakcióik 6
1.2 Az idegi működés molekuláris mechanizmusai: a posztszinaptikus denzitás 8
1.3 A GKAP posztszinaptikus állványfehérjecsalád 10
1.4 A GKAP interakciós partnerei, ismert GKAP komplexek szerkezete 14
1.4.1 PSD-95 interakció ismétlődő motívumokkal 14
1.4.2 LC8 *hub* kötés két SLiM-en keresztül 16
1.4.3 A DLGAP fehérjecsalád közös pontja: a GH1 domén 22
1.4.4 A GKAP C-terminálisa és a Shank állványfehérje kapcsolata 23
1.5 Rendezetlen fehérjék szerkezetvizsgálata NMR spektroszkópiával 26
2 Célkitűzések 30
3 Módszerek 31
3.1 Rekombináns fehérje termelésére alkalmas *E.coli* sejtek létrehozása, klónozás 31
3.2 Transzformálás, rekombináns fehérje termelése és tisztítása 34
3.2.1 Affinitás kromatográfia rendezett és rendezetlen fehérjék esetében 34
3.2.2 His tag hasítása 35
3.2.3 Puffercsere, ioncsere kromatográfia 36
3.2.4 Méretkizárásos kromatográfia 36
3.2.5 Töményítés, mintatárolás, szállítás 37
3.3 Fehérjeminták általános jellemzése fizikokémiai technikákkal 38
3.3.1 Koncentrációmérés abszorbancia alapú, illetve alternatív módszerekkel 38
3.3.2 Tisztaság ellenőrzése, molekulatömeg meghatározása SDS-PAGE és MS technikával 38
3.3.3 Hidrodinamikai rádiusz becslése analitikai méretkizárásos kromatográfiával 38
3.3.4 Hidrodinamikai paraméterek vizsgálata dinamikus fényszórással 39
3.3.5 Másodlagos szerkezeti elemek vizsgálata ECD spektroszkópiával 40
3.4 Fehérje-fehérje interakció vizsgálata BLI módszerrel 40
3.5 Fehérjék szerkezetvizsgálata NMR méréssel, szabad és kötött formában 42
3.6 Számításos és szoftveres módszerek alkalmazása 43
4 Eredmények 45

4.1 GKAP-DYL előállítása és tisztítása 45
4.2 A GKAP-DYL szegmens és az LC8 dimer funkcionális jellemzése szabad formában: fizikokémiai vizsgálatok és NMR spektroszkópia 48
4.2.1 Fizikokémiai vizsgálatok 48
4.2.2 A GKAP-DYL szabad forma NMR eredményei 50
4.2.3 Az LC8 molekula előállítása és NMR vizsgálata önmagában 50
4.3 A GKAP-DYL + LC8 komplex jellemzése, szerkezeti vizsgálata 52
4.3.1 A komplex jellemzése biokémiai módszerekkel 52
4.3.2 GKAP-DYL szerkezeti modell szabad formában és LC8-cal komplexben – NMR vizsgálati eredmények kiegészítve molekuladinamikai számításokkal 53
4.3.3 A GKAP-DYL+LC8 komplex szerkezeti modelljének elemzése számításos módszerekkel, kísérletes adatokkal összevetve 58
4.4 GKAP-Ct43 és Shank1-PDZ előállítása és tisztítása 66
4.5 GKAP-Ct43 funkcionális és szerkezeti jellemzése szabad formában és Shank1-PDZ-vel komplexben – NMR mérési eredmények 66
5 Diszkusszió 72
A disszertáció tézisei 75
Közlemények 77
A disszertációhoz kapcsolódó szóbeli előadások és poszter prezentációk 78
A disszertációhoz nem kapcsolódó egyéb közlemények 80
Köszönetnyilvánítás 81
Hivatkozások 82
Függelék 95

Rövidítések jegyzéke

Rövidítés	Angol megfelelő	Magyar megfelelő
IDP/IDR	*intrinsically disordered protein/region*	eredendően rendezetlen fehérje/régió
SLiM	*Short Linear Motif*	rövid lineáris motívum
Da	*Dalton*	Dalton
PSD	*post-synaptic density*	posztszinaptikus denzitás
NMDA	*N-methyl-D-aspartate*	N-metil-D-aszpartát
AMPA	*α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*	2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il)propánsav
MAGUK	*membrane-associated guanylate kinase*	membrán asszociált guanilát kináz
GKAP	*guanylate kinase-associated protein*	guanilát-kináz asszociált fehérje
DLGAP	*Disks large-associated protein*	*Discs large* asszociált fehérje
SAPAP	*SAP90-associated protein*	SAP90 asszociált fehérje
DLG4	*Disks large homolog 4*	*Discs large* homológ 4
SAP90	*synapse-associated protein 90*	szinapszis asszociált fehérje 90
OCD	*obsessive compulsive disorder*	kényszerbetegség
GH1	*GKAP homology 1*	GKAP homológia 1
Arc	*activity-regulated cytoskeleton-associated protein*	aktivitás-szabályozott citoszkeleton asszociált fehérje
GK	*guanylate kinase*	guanilát kináz
DYL, DLC	*dynein light chain binding region*	dinein könnyű lánc kötő régió
DYNLL, LC8	*dynein light chain*	dinein könnyű lánc
MBP	*maltose binding protein*	maltózkötő fehérje
GBR	*GK-binding region*	GK-kötő régió

Rövidítés	Angol megfelelő	Magyar megfelelő
ITC	*isothermal titration calorimetry*	izotermális titrációs kalorimetria
PDB	*Protein Data Bank*	fehérje adatbázis
K_d	*dissociation constant*	disszociációs állandó
BMRB	*Biological Magnetic Resonance Bank*	biológiai mágneses magrezonancia adatbázis
NMR	*nuclear magnetic resonance*	nukleáris mágneses magrezonancia
HPV1	*human papilloma virus*	humán papilloma vírus
RSK1	*ribosomal S6 kinase*	riboszomális S6 kináz
MAPK	*mitogen-activated protein kinase*	mitogénnel aktivált fehérje kináz
DSS	*4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonic acid*	4,4-dimetil-4-szilapentán-1-szulfonsav
SCS	*secondary chemical shifts*	másodlagos kémiai eltolódások
CSP	*chemical shift perturbation*	kémiai eltolódás perturbáció
CC	*coiled coil*	*coiled coil*
Ct43	*C-terminal 43 residues*	C-terminális 43 aminosav
Ct12	*C-terminal 12 residues*	C-terminális 12 aminosav
cDNS	*complementary DNA*	komplement DNS
PCR	*polymerase chain reaction*	polimeráz láncreakció
TEV	*tobacco etch virus*	tobacco etch vírus
LB	*Luria-Bertani broth*	Luria-Bertani médium
MFU	*MacFarland unit*	MacFarland egység
IPTG	*isopropyl ß-D-1-thiogalactopyranoside*	izopropil ß-D-1-tiogalaktopiranozid
IMAC	*immobilized metal ion affinity chromatography*	immobilizált fémion affinitás kromatográfia
Gdn HCl	*guanidinium chloride*	guanidin-hidroklorid
pI	*isoeletronic point*	izoelektromos pont
MWCO	*molecular weight cutoff*	molekulasúly határérték
SEC	*size exclusion chromatography*	méretkizárásos kromatográfia

Rövidítés	Angol megfelelő	Magyar megfelelő
TCEP	*tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride*	trisz(2-karboxietil)foszfin
DTT	*dithiothreitol*	ditiotreitol, 1,4-bisz-(szulfanil)-bután-2,3-diol
SDS-PAGE	*sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis*	nátrium-dodecil szulfát poliakrilamid gélelktroforézis
LC-MS	*liquid chromatography–mass spectrometry*	folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria
DLS	*dynamic light scattering*	dinamikus fényszórás
ECD/CD	*(electronic) circular dichroism*	(elektronikus) cirkuláris dikroizmus
BLI	*biolayer interferometry*	bioréteg interferometria
HSQC	*heteronuclear single quantum coherence spectroscopy*	heteronukleáris korrelációs spektrum
CCPNmr	*Collaborative Computational Project for NMR*	NMR kollaboratív számítógépes projekt
MD	*molecular dynamics*	molekuladinamika
DSSP, DSSPcont	*Dictionary of Secondary Structure in Proteins, continuous secondary structure assignments*	másodlagos szerkezeti elemek katalógusa, folytonos másodlagos szerkezeti elem meghatározás
SAH	*single α helix*	magányos α hélix

1 Bevezetés

1.1 Funkcionálisan rendezetlen fehérjék és interakcióik

Mióta megdőlt a dogma, hogy egy fehérje aminosavsorrendje (elsődleges szerkezete, azaz szekvenciája) egyértelműen meghatároz egy kompakt, feltekeredett háromdimenziós szerkezetet (másodlagos és harmadlagos szerkezeti elemeket), és ez a szerkezet egyértelműen meghatározza a funkcióját, azóta robbanásszerűen nőtt azon adatok mennyisége, miszerint az eredendően rendezetlen fehérjék többen vannak, és fontosabb szerepet töltenek be, mint azt korábban képzeltük. A rendezetlen fehérjék (*intrinsically disordered proteins/regions*, IDPs/IDRs) natív állapotban, fiziológiás körülmények között is sokféle konformációt képesek felvenni, ennek köszönhetően változatos funkciókat képesek betölteni az élő szervezetekben [1–11]. Ezek a fehérjék szerkezeti sokaságként reprezentálhatóak [6,12–14].

Minden fehérje esetében általános alapvetés, hogy a feladata(i) ellátása során más molekulákhoz kapcsolódik. Ez a partnermolekula lehet például másik fehérje, valamilyen nukleinsav (DNS vagy RNS), oligoszacharid vagy lipid (kettős membrán). A globuláris fehérjék rugalmassága limitált, ezért a feladatuk ellátásához szükséges interakciók kialakítására (dokkolás) is korlátozottak a lehetőségeik. Szerkezetre gyakorolt hatás szempontjából többféleképp csoportosíthatjuk a fehérje-fehérje interakciókat. Az egyik kapcsolódási lehetőség a globuláris fehérjék esetében szinte semmilyen szerkezeti változással nem jár, a jól definiálható szerkezetű, és jól definiálható feladattal bíró fehérjerészlet (domén) az epitóp felszínen interakcióba lép a partnerrel, azaz ligandummal (kulcs-zár modell). Másik esetben az interakció kialakulása során a vizsgált fehérje szerkezete megváltozik, vagy a kölcsönhatás kialakulása előtt (konformációs szelekció), vagy pedig annak következményeként (indukált illeszkedés). A valóságban általában utóbbi két mechanizmus valamilyen kombinációja valósul meg [15].

Míg a globuláris domének esetében a fentebb leírt változások általában nem változtatják meg drámaian a szerkezetet, a rendezetlen fehérjék működésének leírásakor nem tekinthetünk el nagymértékű flexibilitásuktól [16]. A rendezetlen fehérjék konformációs sokaságokat alkotnak, egyidejűleg sokféle különböző konformer állapotban léteznek vizes oldatban (így a sejteken belül is). Globuláris partnereikhez gyakran néhány aminosavas szakaszokon, ún. rövid lineáris motívumokon (Short Linear Motifs, SLiMs) keresztül kapcsolódnak [17]. A SLiM-ek tipikusan 3-10 aminosav hosszú szakaszok, átlagosan feleakkora felületen keresztül érintkeznek a ligandummal mint egy rendezett fehérje, és általában véve alacsonyabb a kötési affinitásuk mint a domén-domén interakciós partnereknek.

Jelenlegi elméleteink szerint ennek oka, hogy a kötés során bekövetkező rendeződéssel együtt járó entrópiacsökkenés a kötési szabadentalpia-változás abszolút értékét csökkenti. Ezen tulajdonságaik miatt viszont a rendezett partnerek közötti kölcsönhatásokkal megvalósíthatónál sokkal kifinomultabb szabályozási, modulálási lehetőségeket kínálnak. Rendezetlen régiókra sok esetben jellemző az ugyanazzal a partnerrel való többféle kölcsönhatás lehetősége: bivalens fehérjék esetében kettő, multivalens partnerek esetében több SLiM szekvencia azonosítható ugyanahhoz a ligandumhoz, amik tipikusan nagyobb affinitású kötődést mutatnak, mint a monovalens interakciós partnerek [18]. Egyre több példa támasztja alá, hogy a rendezetlen fehérjékre általánosságban jellemző a multivalens kötődés, valamint az egyidejűleg többféle partnerrel való interakció kialakításának a képessége [19]. A multivalens komplexek sokféle formát ölthetnek, de jellemző közös tulajdonságuk, hogy egy globuláris, egyértelműen meghatározott 3D szerkezettel bíró domén is részt vesz a komplex kialakításában az IDP/IDR mellett [20].

A rendezetlenség alapvetően meghatározó tulajdonság a *hub* (csomóponti, központi) fehérjék által kialakított multivalens interakciókban. Egy sejt teljes interakciós hálózatában a fehérje-fehérje interakciós mintázat nem egyenletesen oszlik el, hanem hatványfüggvénnyel írható le: a legtöbb résztvevő kevés partnerhez kapcsolódik, míg néhány szereplő a hálózat csomópontjaiban helyezkedik el. Az ilyen *hub* fehérjék esszenciálisak, pleiotrópia és gyakran funkcionális rendezetlenség, nagyobb felületi töltés és több/többféle moduláris kötőhely jelenléte jellemző rájuk. Ezek kulcsfontosságú szerepet töltenek be a sejt homeosztázisának fenntartásában [21–23]. A rendezetlenség teszi lehetővé a sokféle partnerhez való kapcsolódást, valamint rugalmas összekötő (linker) szakaszokat hoz létre funkcionális alegységek között, aminek köszönhető a kötési diverzitás [24]. Az ún. állványfehérjék is molekuláris csomópontként működnek, fizikailag közel hozzák egymáshoz az egy-egy jelátviteli útvonalban egymáshoz kapcsolódó elemeket. Emellett, bár általában saját katalitikus aktivitásuk nincs, mégis közvetlen hatással vannak az információáramlásra, mert képesek allosztérikusan gátolni, modulálni, aktiválni koordinálni vagy szabályozni is a partnereiket, ezáltal például azt a jelátviteli kaszkádot, amiben részt vesznek. Ezáltal a jelátviteli komplex, ami egy adott állványfehérje körül kialakul (valójában amit az adott állványfehérje aktívan kialakít maga körül), több és más tulajdonságokkal bír, mint az egyes résztvevők tulajdonságainak összege, így egy funkcionálisan különálló modul jön létre. Ezekben az állványfehérjékben központi jelentőségű a rendezetlen régióknak köszönhető flexibilitás, dinamika és plasztikusság [25–29].

1.2 Az idegi működés molekuláris mechanizmusai: a posztszinaptikus denzitás

Agyunk működése milliárdnyi idegsejt összehangolt működésének köszönhető, aminek esszenciális elemei az idegsejtek között kialakuló kapcsolódások, a szinapszisok. Ha még nagyobb felbontásban vizsgálódunk, akkor a sejtszintű folyamatok hátterében kifinomult és összetett molekuláris mechanizmusokat találunk. A szinapszisokon keresztül információcsere történik a sejtek között. Az információ „vivőanyagának" megfelelően az elektromos szinapszisok esetében depolarizációval, akciós potenciállal terjed a jel az egyik neuronról a másikra, míg kémiai szinapszisok esetében valamilyen molekula (neurotranszmitter) kerül a preszinaptikus sejtből a szinaptikus résbe, ahonnan a posztszinaptikus sejt képes azt felvenni, ami további jelátviteli útvonalak aktiválódását indukálja.

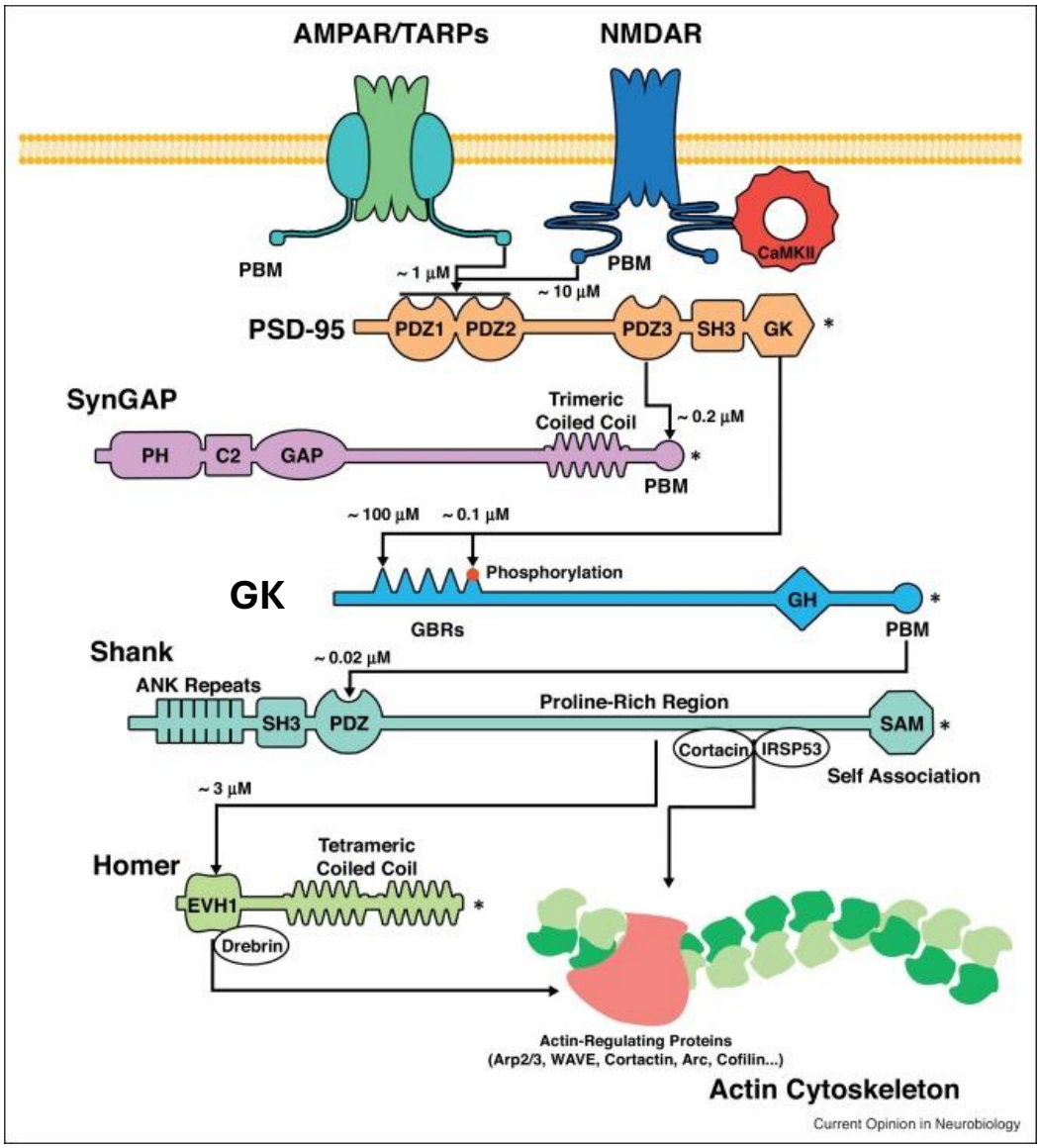
Hajlamosak vagyunk a sejtekre úgy tekinteni, mint egy membránnal körülhatárolt buborékra, amiben a sejtszervecskék szabadon lebegnek. Ezzel szemben a valósághoz lényegesen közelebb áll egy olyan kép, amin látszik, hogy milyen zsúfolt terület egy sejt belseje. Különösen igaz ez a posztszinaptikus membrán belső oldalára: itt elektronmikroszkóppal jól láthatóan elkülönül egy térrész, ami jelentősen sötétebb, sűrűbb, mint a neuron citoplazmájának többi része: ez a posztszinaptikus denzitás (PSD). Ez egy átlagosan GDa (gigadalton) tömegű, 360 nm átmerőjű lemezszerű struktúra, vagyis átlag 100 kDa-s fehérjékből kb. 10 000 lokalizálódik egy átlagos neuron átlagos posztszinaptikus membránjának közelében [30]. Többezer fehérje kapcsolódik itt egymáshoz, számos közülük több funkcionális alegységből, azaz doménből épül fel, így egy sokszorosan összetett hálózat kialakításával adják olyan bonyolult folyamatok molekuláris alapjait, mint a memória, tanulás, és a szinaptikus plaszticitás.

Aktivitás hatására változik a PSD fehérjeösszetétele. Azaz bejövő jel (szignál) hatására egyidejűleg nagy mennyiségű és sok különöző fehérje mennyisége és aktivitása változik meg. Ez a plasztikusság is olyan állványfehérjék működésével lehetséges, amelyek több partnerhez való kapcsolódás képessége révén egyszerre tudják megváltoztatni számos partnerük mennyiségét illetve lokalizációját. A neurális állványfehérjék pótolhatatlan szerepet töltenek be a PSD szervezésében és működtetésében [31,32].

Az állványfehérjék a legszorosabb értelemben vett „jelátvitelt szabályozó fehérjék". Molekuláris funkcióik megfeleltethetők az IDP-k „*assembler*" funkcióinak, azaz a központi szerepük a partnereik „összegyűjtése", egymáshoz közel hozása. Az állványfehérjék között nagy arányban találunk rendezetlen fehérjéket, vagy hosszabb rendezetlen szakaszokat tartalmazó fehérjéket. A rendezetlenség hasznos

tulajdonság *hub* fehérjék esetében, amik egyidejűleg képesek több partnerükhöz kapcsolódni, ami valójában az állványfehérjék – mint csomóponti, *hub* fehérjék – esszenciális tulajdonsága is. A szerkezeti rendezetlenség szorosan kapcsolódik az állványfehérjék számos tulajdonságához, például a több partnerhez való kötődés képességéhez, komplex és tranziens kölcsönhatások közvetítéséhez, valamint komplex poszttranszlációs módosítások sorozatához [26].

A PSD térbeli szerveződése horizontálisan (laterálisan) és vertikálisan is komplex módon szabályozott. A membrántól egyre távolodva rétegekre tagozódnak a jelátviteli- és az állványfehérjék. A membránhoz legközelebb helyezkednek el a membránreceptorok, ioncsatornák, az NMDA (N-metil-D-aszpartát) és az AMPA (2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il)propánsav) receptorok. A második rétegben a receptorokhoz kapcsolódva tipikusan a MAGUK (membrán asszociált guanilát kináz) családba tartozó fehérjék nagy tömegét találjuk, a harmadik rétegben pedig további állványfehérjék, egyebek mellett a Shank és a GKAP fehérjék lokalizálódnak. Oldalirányban ezek a komplexek folyadék-folyadék fázisszeparációval ún. nanodoménekbe tömörülnek, kb ~80 nm átmérőjű kondenzátumokba, ahol többszörös töménységben találunk PSD állvány- és jelátviteli fehérjéket mint ezeken a térrészeken kívül a posztszinaptikus dendritekben. *In vitro* már sikerült reprodukálni a PSD fázisszeparációt, tisztított PSD-95, GKAP, Shank3 és Homer3 fehérjét kevertek össze fiziológiás koncentrációban, ami folyadékszerű kondenzátumok kialakulásához vezetett. Ezek a szereplők mind multimodális állványfehérjék, amik önmagukkal vagy egymással oligomereket és multimereket képezhetnek az ismétlődő kötő motívumoknak köszönhetően. A PSD állványfehérjék multivalenciája és konformációs flexibilitása kedvez a nagy fehérje-fehérje interakciós hálózatok kialakulásának és ezáltal a fázisszeparált biológiai kondenzátumok létrejöttének [30,32,33]. A PSD szerveződésének illusztrációja az 1. ábrán látható [33].



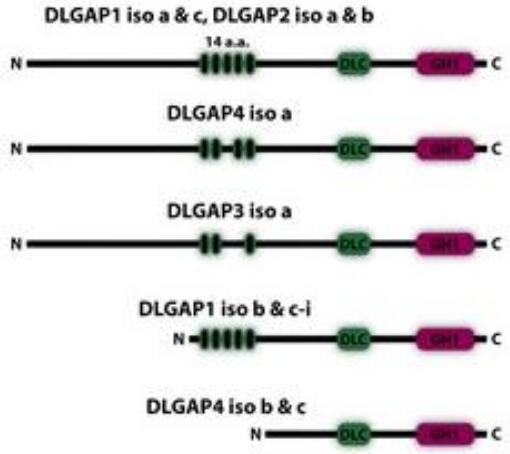
1. ábra: A PSD szerveződése, az állványfehérjék egymáshoz kapcsolódása. Az ábra Feng és mtsai közleményéből származik [33].

1.3 A GKAP posztszinaptikus állványfehérjecsalád

A GKAP (guanilát-kináz asszociált fehérje) a PSD egyik jelentős szereplője. Többféle néven ismert, ugyanezt a fehérjét jelöli a DLGAP1 (*Disks large-associated protein 1*, *Discs large* asszociált fehérje 1), és a SAPAP1 (SAP90 asszociált fehérje 1) rövidítés is. Ezekből az elnevezésekből is kitűnik, hogy ezt a fehérjét minden alkalommal amikor azonosították, egy másik szereplőhöz kapcsolódva írták le. Ez a másik szereplő a GKAP legjobban dokumentált és talán legjelentősebb kötőpartnere, a PSD-95 (más néven DLG4, *Disks large homolog* 4 vagy SAP90, *synapse-associated protein* 90). Ez a posztszinaptikus állványfehérje a MAGUK (membrán asszociált guanilát

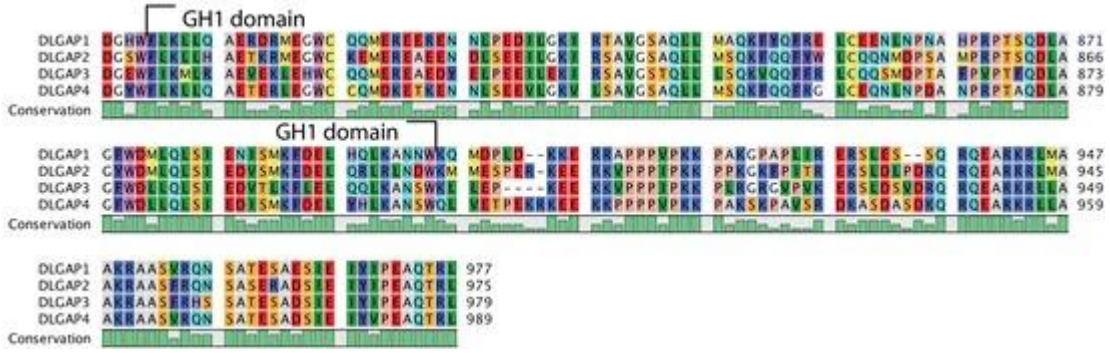
kináz) családba tartozik, és kritikus szerepet tölt be a szinaptogenezisben és az NMDA receptor jelátvitelhez kapcsolódó szinaptikus plaszticitásban [30]. A guanilát kináz domén maga is egy fehérjekötő motívum. A PSD-95 közvetlenül kapcsolódik az NMDA receptorok és kálium csatornák citoplazmatikus oldalához, a GKAP pedig a PSD-95-höz kötve csatlakozik ehhez a hálózathoz. A PSD-95 fokozott vagy csökkentett expressziója megváltoztatja a serkentő és gátló szinapszisok arányát a hippokampusz neuronjaiban [34,35].

A GKAP az öt tagú DLGAP fehérjecsalád egyik tagja. A DLGAP1 molekulára gyakran szokás GKAP néven hivatkozni a szakirodalomban. A DLGAP1-4 fehérjék fontos szerepet töltenek be a szinaptikus jelátvitelben, a DLGAP5 fehérjét viszont daganatos betegségekkel összefüggésben írták le. A DLGAP1-4 fehérjék főleg felépítésüket, funkcionális szakaszaikat tekintve, de szekvenciájukban is viszonylag nagy konzerváltságot mutatnak különböző fajok között, ami alátámasztja, hogy központi szerepet töltenek be ezen organizmusok neurális funkcióiban [36]. A DLGAP fehérjecsalád tagjainak doménszerkezete a 2. ábrán látható. A DLGAP fehérjecsalád tagjainak funkciókiesését leírták már sokféle kognitív zavarral és neurológiai betegséggel összefüggésben, többek között OCD (*obsessive compulsive disorder*, kényszerbetegség), skizofrénia, Alzheimer kór, Parkinson kór és autizmus spektrum zavar kapcsán is [32,36,37].



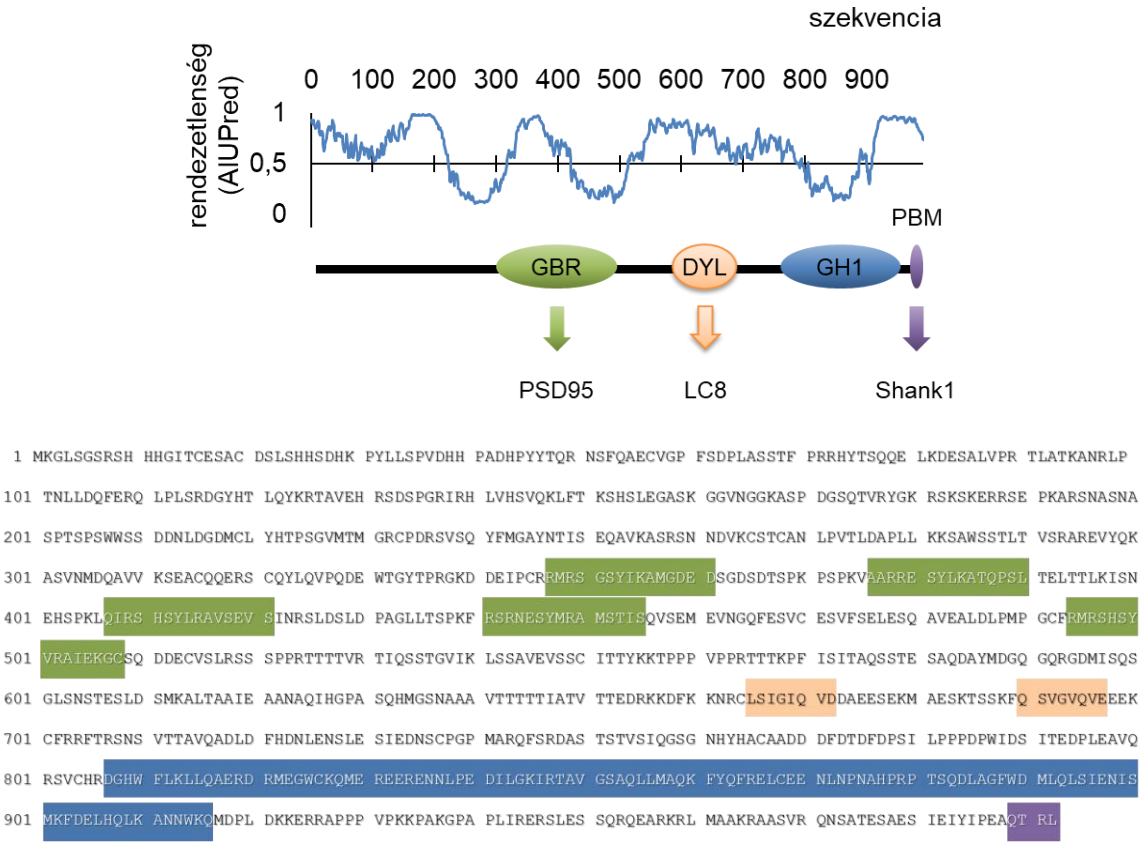
2. ábra: A DLGAP1-4 fehérjék doménszerkezete piktogramon. A DLGAP1-4 fehérjéknek van egy 14 aminosavas ismétlődésekből álló szakasza 0-5 ismétlődéssel izoformától függően, egy DLC (dinein könnyű lánc) kötő doménje, és egy GKAP homológia doménje (GH1). Az ábra Rasmussen és mtsai. közleményéből származik [36].

A DLGAP1-4 fehérjék mindegyike (minden kanonikus és nemkanonikus transzkripciós változat) hordoz három különböző funkcionális régiót: egy 14 aminosavas ismétlődéseket tartalmazó szakaszt, egy dinein könnyű lánc kötő szakaszt és a GH1 domént. A GH1 (GKAP homológia 1) domén a DLGAP fehérjecsaládra jellemző; a DLGAP1-4 fehérjék körében 61-75% homológiát mutat. Ezek mellett a C-terminális 40 aminosav is nagyfokú hasonlósággal jellemezhető a DLGAP fehérjecsaládban [36]. A DLGAP fehérjék C terminálisának és GH1 doménjének szekvenciaillesztése a 3. ábrán látható.



3. ábra: A DLGAP fehérjecsalád C terminálisának szekvenciaillesztése. Az ábra Rasmussen és mtsai. közleményéből származik [36].

A humán GKAP fehérje szekvenciája erősen konzervált, 98%-ban azonos például a patkány (*Rattus norvegicus*) ortológgal (Genbank azonosító kódjaik: U67987 és U67988) [38]. A humán GKAP 1-es izoforma 977, a patkány 1-es izoforma 992 aminosav hosszú. A legelsőként leírt GKAP szekvenciát GKAP1a kóddal jelölték (azóta a frissített besorolásnak megfelelően ez a *Rattus* 3-as izoforma), ami egy 666 aminosav hosszúságú transzkripciós variáns; szinte teljes egészében megfelel egy olyan teljes hosszúságú 1-es izoformának, amiről az első ~300 aminosav hiányzik. AIUPred predikció alapján a GKAP közel 1000 aminosavas hosszának nagy része funkcionálisan rendezetlen. A GKAP fehérje szakirodalomban leírt régiói és AIUPreddel meghatározott rendezetlenségi predikciója a 4. ábrán láthatóak [36,39,40].



4. ábra: A teljes hosszúságú GKAP fehérje (1-es izoforma, UniProt azonosító: P97836-1) rendezetlenségi predikciója AIUPred szoftverrel [41], a szakirodalomban leírt régiói és interakciós partnerei sematikus ábrán, illetve fehérje a teljes szekvenciáján jelölve (egymásnak megfeleltethető színkódolással).

Az első jelentős, jól definiált szegmens a GBR (GK-*binding repeat*) régió: a 347-508 pozíciók között öt egymás után ismétlődő 14 aminosav hosszúságú szekvenciát találunk, melyek a PSD-95 GK doménjéhez tudnak kapcsolódni [40]. A DLGAP1 fehérjében 5 ismétlődő szakaszt találunk [42], ehhez képest a DLGAP család többi tagjában néhány ismétlődő egység hiányzik. Például a DLGAP4 variáns hosszú izoformája nem tartalmazza a 3-as számú ismétlődő szakaszt (lásd a 2. ábrán). Ezek a különbözőségek feltehetően hozzájárulnak a DLGAP1-4 izoformák egyedi funkciójához és eltérő PSD-95 kötődési affinitásához [36].

Ennek az öt ismétlődő szekvenciának más fehérjével való kapcsolódásban is leírták a szerepét. Egy tanulmány alapján az Arc (*activity-regulated cytoskeleton-associated protein*) fehérjével kialakuló interakcióban az előző bekezdésben említett 14 aminosavas ismétlődő szakaszok közvetlen közelében levő, N-terminális irányú szomszédos régióinak van jelentősége. Az öt ismétlődés közül kettőt azonosítottak,

ami ITC és röntgenkrisztallográfiás szerkezetvizsgálat alapján képes az Arc fehérjével komplexet kialakítani [43].

A dinein könnyű lánc kötő régió (DYL vagy DLC, *dynein light chain binding region*) két LC8-kötő motívumot foglal magába a 665-672 és a 690-697 aminosavak között, amelyekkel a GKAP a dinein könnyű lánchoz képes kapcsolódni. Az LC8 a dinein motorfehérje komplex egyik eleme, így ezen az interakción keresztül a GKAP összekapcsolhatja a PSD fehérje komplexeket a motor komplexekkel, a mikrotubulusok dinamikájában, a centroszóma pozícionálásban és a sejtpolaritásban is szerepet játszva [44,45].

A 807-916 aminosavak között található GH1 az egyetlen olyan jól definiálható domén a GKAP fehérje szegmensei között, amely globuláris, aminek másodlagos és harmadlagos szerkezetét ismerjük. Maltózkötő fehérjével (*maltose binding protein*, MBP) fúzionált, és egyéb tekintetben is módosított konstrukciót használva, röntgenkrisztallográfiával Tong és mtsai. megállapították, hogy három egymással kapcsolódó α-hélix alakítja ki a harmadlagos szerkezetét [46]. Szerkezetpredikció alapján egy negyedik, különálló hélix szintén kialakul, ami a kísérletek alapján lazán kapcsolódik a három hélixből álló szerkezethez. Ennek a doménnek egyelőre ismeretlen a funkciója, annak ellenére, hogy konzervált a DLGAP fehérjecsalád tagjaiban.

A GKAP C-terminálisán egy négy aminosavas SLiM szakasszal (`QTRL`) egy másik fontos PSD állványfehérjéhez, a Shank fehérje PDZ doménjéhez képes kapcsolódni [36]. A Shank fehérje is egy jelentős posztszinaptikus állványfehérje, ún. „mester irányító" (*master organizer*) állványfehérje, aminek számos mutációját leírták autizmus spektrum zavarral összefüggésben; potenciálisan monogénes okozója lehet a betegségnek [47].

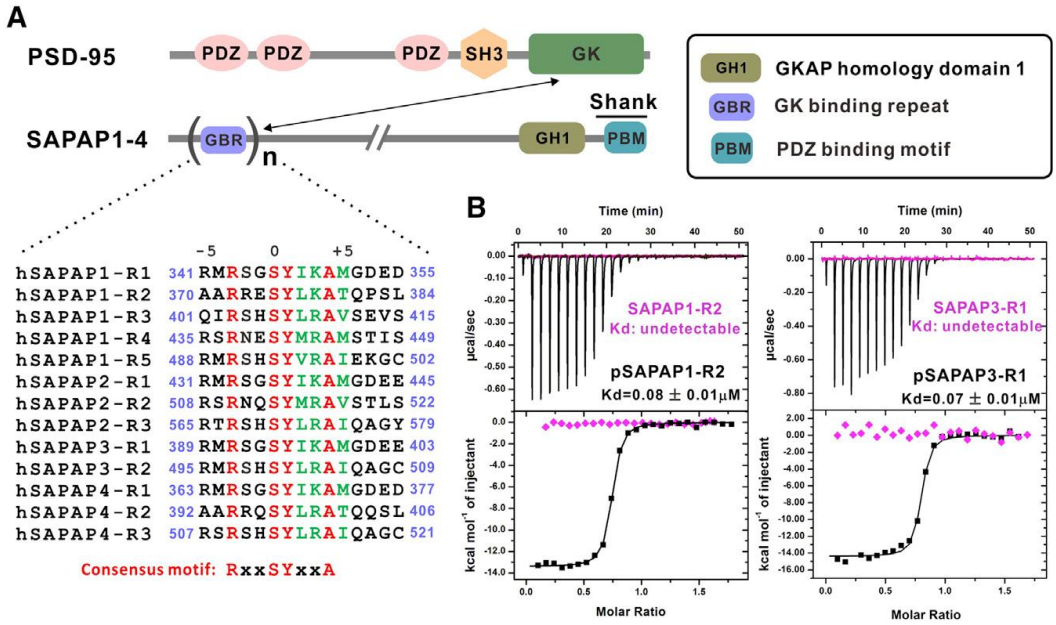
1.4 A GKAP interakciós partnerei, ismert GKAP komplexek szerkezete

1.4.1 PSD-95 interakció ismétlődő motívumokkal

Az első kapcsolódási pont a GKAP (avagy DLGAP1, avagy SAPAP1) fehérjén a GBR (GK-*binding region*, GK-kötő régió), amely a PSD-95 fehérjével való interakcióért felel.

A DLGAP fehérjecsalád körében a GBR szekvenciák analízise alapján az öt, 14 aminosavas ismétlődő szekvencia a következő konzervált motívummal írható le: `RxxSYxxA`, ahol az `x` bármilyen aminosav lehet. A DLGAP1 második ismétlődő

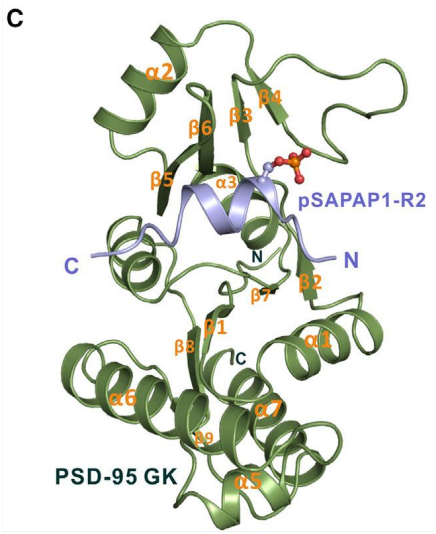
szakaszával (pSAPAP1-R2) és a DLGAP3 első ismétlődő szakaszával (pSAPAP3-R1) század µM-s (0,08 µM és 0,07 µM) erősségű, nagy affinitású interakciót írtak le, szintetikus, szerin-foszforilált peptidekkel végzett ITC kísérletben [40]. Az interakció részletei, a PSD-95 és a GKAP domén szerkezete, az ismétlődő SLiM szekvenciák konzerváltsága, és a két interakció kalorimetriás görbéje az 5. ábrán láthatók. Nem foszforilált peptidekkel az interakció nem volt kimutatható. A foszforilált GKAP-R2 peptid + PSD-95 GK domén kristályszerkezetét leíró tanulmányban a peptid egy rövid hélix szerkezetet vesz fel, ami illeszkedik a GK domén kanonikus foszfopeptid kötőzsebébe (PDB: 5YPO), lásd a 6. ábrán. A tanulmányban leírt minden szerkezeti adat rövid peptidekkel végzett vizsgálatokra vonatkozik (a teljes hosszúságú SAPAP3 fehérjével koimmunoprecipitációs mérést végeztek a szerzők).



5. ábra: A PSD-95 és a SAPAP fehérjék interakciója. (A) A két partnerfehérje doménszerkezete és a GKAP-on levő ismétlődő szakaszok szekvenciaillesztése, konzerváltsága. (B) A foszforilált SAPAP1-R2 és SAPAP3-R3 interakciójának kalorimetriás mérési görbéje a PSD-95 GK doménnel. Az ábra Zhu és mtsai. közleményéből származik [40].

A negyedik és ötödik ismétlődő szakaszt megelőző 8-8 aminosavas motívumok esetében Hallin és mtsai. igazolák, hogy az Arc fehérjével képesek interakciót kialakítani (PDB: 6TNQ, 6TQ0). A kötő motívum a következő kifejezéssel írható le: `PxF/Y` vagy `P(G)xF/Y`. Az Arc fehérje központi szerepet tölt be az idegi plaszticitásban [48,49]. A GKAP-Arc interakció funkciója egyelőre ismeretlen, de

feltételezhetően közvetlenül hatással van a GKAP - PSD-95 komplexre. A szerkezeti adatok nem zárják ki, hogy a GKAP egyszerre képes kötődni az Arc fehérjéhez és a PSD-95-höz is, emellett pedig a PSD-95-tel kialakuló interakció szabályozásában befolyásoló tényező lehet az Arc oligomerizációja is [43].

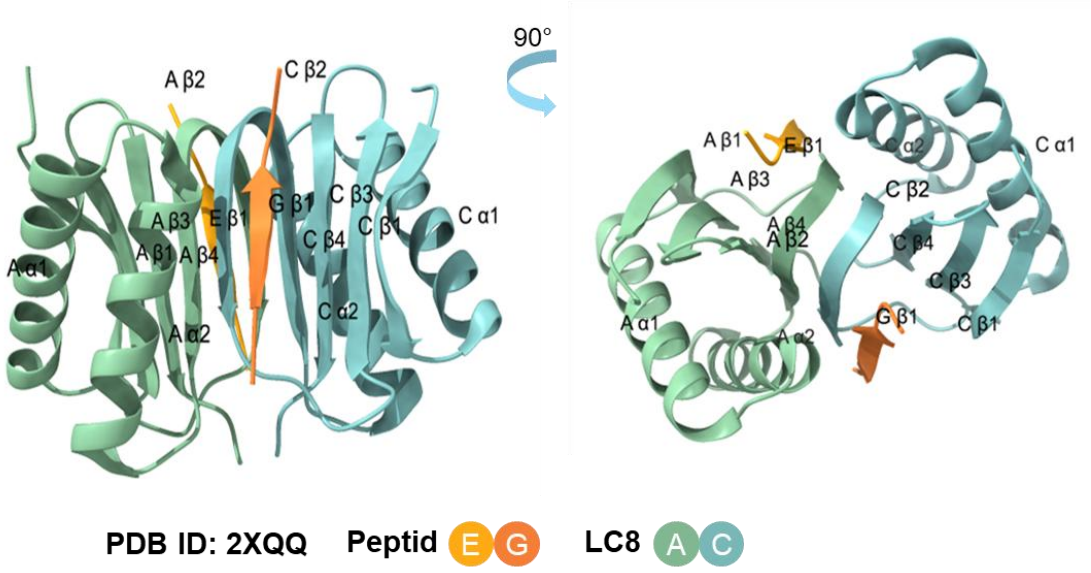


6. ábra: A GKAP GBR domén második, 14 aminosavas ismétlődő szakasza foszforilált állapotban a PSD-95 GK doménnel komplexben helikális szerkezetbe rendeződik. Az ábra Zhu és mtsai. munkája [40].

1.4.2 LC8 *hub* kötés két SLiM-en keresztül

A dinein könnyű lánc fehérje, az LC8 egy központi szereppel bíró, jól definiált 3D szerkezettel rendelkező globuláris fehérje ami multivalens komplexet tud képezni számos IDR/IDP partnerrel [20]. Az emlősökben ismert két paralóg a DLC1 (DYNLL1) és DLC2 (DYNLL2), mindkettő LC8 néven is ismeretes, a 89-ből csupán 6 aminosavban különböznek, és ortológjai nagy mértékben konzerváltak [50,51]. Az LC8 fehérjét eredetileg a sok alegységből álló dinein motor komplex egyik elemeként azonosították, de azóta leírták már sok más partnerrel interakcióban változatos sejten belüli lokalizációkban. Az LC8 fehérje egy csomóponti fehérje (ún. *hub* protein), ami sokféle folyamatban tölt be jelentős szerepet a sejtben, és extrém sok (több, mint 100) különböző partnerhez képes kötődni (https://lc8hub.cgrb.oregonstate.edu/, [52–54], ld. a Függelék 1. táblázatában). Sok LC8 partner IDR/IDP [20], vagyis ez a központi molekula kitűnő példa az olyan multivalens globuláris fehérjékre, amelyek esetében a multispecificitás a rendezetlen fehérjepartnerek preferálásának köszönhetően lehetséges [55].

Az LC8 komplexei változatos sejtes lokalizációban és funkcióban megtalálhatóak [20], de a komplexképződés alapvető szerkezeti mechanizmusa minden esetben azonos [56]. Erős LC8 homodimerizáció (K_d ~ 60 nM [50,57–59]) szükséges ahhoz, hogy feladatát eláthassa, mert mindkét alegység részt vesz a kötőzseb kialakításában. Rendezetlen partnerei SLiM-eken keresztül kapcsolódnak. A preferált kötőmotívumokat jellemezték a szakirodalomban [60–63]; ez alapján két lazán értelmezett konszenzus motívumot definiálhatunk: $[K/R]_{-3}X_{-2}T_{-1}Q_0T_1$ és $G_{-2}I_{-1}Q_0V_1D_2$, ahol a leginkább konzervált glutamin (Q_0) a 0 sorszámmal jelölt referenciapont. Minden ismert LC8 partner ß-szál szerkezetet vesz fel amikor köt az LC8 homodimer kötőzsebéhez [64]. Az LC8 kötőzseb egy 5 ß szál által kialakított ß lemezből áll, (ß1, ß4, ß5, ß2 az egyik alegységtől, ß3 a másik alegységtől származik), amihez hatodikként csatlakozik ß augmentációval a kötőpartner [54,65]. A struktúrát két α hélix stabilizálja a külső felületen (α1 and α2). Mindemellett az LC8 fehérje szimmetrikus, így két tökéletesen egyforma kötőzsebhez két ligandum tud egyidejűleg kötődni, az LC8 homodimer két ellentétes oldalán. Az LC8 dimer szerkezete a 7. ábrán látható.



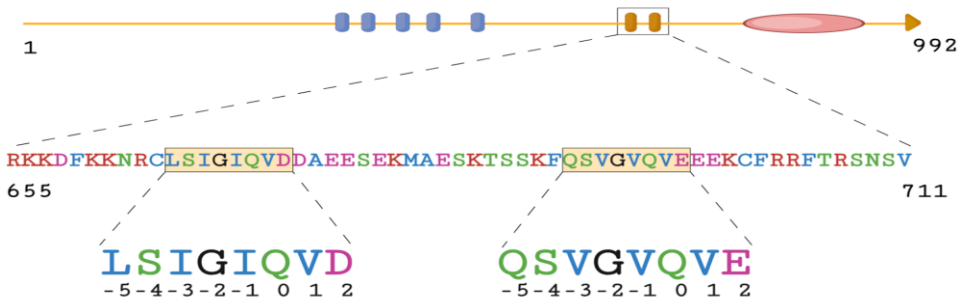
7. ábra: Az LC8 dimer szerkezeti ábrája ligandumkötött állapotban (rövid peptiddel kölcsölhatásban). Az ábra a PDB: 2XQQ szerkezet alapján készült, az A és C lánc zöld és kék színnel ábrázolva az LC8 egy-egy monomer egysége, az E és G lánc pedig egy rövid peptid két példánya (Ac-SRGTQTE) sárga és narancssárga színnel jelölve [63]. Az ábra munkatársam, Kálmán Zsófia E. munkája, ChimeraX szoftver használatával készült [66].

Mind a DLC1, mind a DLC2 molekula interakcióit részletekbe menően leírták már az irodalomban, nagyrészt olyan felállásban amiben az LC8 dimer komplexet képez egy kis peptiddel. Az ismert szerkezeti leírások nagy része egyetlen LC8 dimert tartalmaz, csak néhány magasabb elemszámú rendszert írtak le eddig (ld. a Függelék 1. táblázatát és a 11. ábrát, alább). A PDB adatbázisban néhány olyan szerkezetet találhatunk, amely esetében a dinein könnyű lánc dimerek egy-egy bivalens/multivalens kötőpartnerrel komplexben szerepelnek. Ezeket a szerkezeteket mind röntgenkrisztallográfiával oldották meg, ami azt jelenti, hogy esetükben a különböző molekularészletek között elkerülhetetlenül kialakulnak olyan kristálykontaktusok, amelyek stabilizálhatják az interakciókat és limitálják a komplex lehetséges geometriai paramétereit. Az egyetlen kivétel a S. Clark és mtsai. által bemutatott analízis a Chica fehérjéről (BMRB ID: 26684 [67]), ugyanakkor ők az NMR (nukleáris mágneses magrezonancia) vizsgálatokat csak a szabad állapotú Chica fehérjével végezték el, a komplex-szel nem végeztek NMR kísérleteket (ld. a Függelék 1. táblázatát). Ezek alapján a multivalens LC8 komplexek dinamikája és flexibilitása nagyrészt feltérképezésre vár.

A GKAP-LC8 interakció feltételezések szerint az NMDA receptor komplex szerveződésében látja el funkcióját [68]. Ez az interakció a PSD-95 köré szerveződő jelátviteli komplex motorfehérjék által mediált transzportjában, összeállításában és lokalizációjában játszik szerepet [45,68]. A GKAP mint állványfehérje a ún. „*core complex*" (PSD-95/GKAP/Shank) tagja, ami a PSD-ben a glutamát receptorok szervezését/rendezését/rendszerezését végzi [40,68]. A GKAP fizikai kapcsolatot létesít az NMDA receptorok, a környező állványfehérjék, valamint a citoszkeleton motormolekulái között [46,68].

A GKAP:LC8 interakció kialakulását már számos tanulmány igazolta [45,60,69,70]. A kötő motívumokat különböző biokémiai és fizikokémiai módszerek segítségével azonosították és validálták, elsőként egy élesztő két-hibrid rendszerben [45], majd *pepscan* technikával [60,70,71] illetve koimmunoprecipitációval [45,69,72]. Kísérletesen igazolták az interakciót *in vivo*, sejtekben is fluoreszcens fluktuációs mikroszkóppal (két-foton szkennelő szám és intenzitás technikával, *two-photon scanning number and brightness*, sN&B) [72] és élő sejtes konfokális képalkotással [44]. Habár a DLC1 és DLC2 paralógok nagyfokú hasonlóságot mutatnak, nagyon hasonló biokémiai aktivitással bírnak, mégis az élesztőben végzett kísérletek alapján a GKAP a DLC2 partnert preferálja a DLC1-gyel szemben [45].

A GKAP szekvencián két rövid, LC8-kötő lineáris motívumot találunk, ezek azonban nem a leggyakoribb, kanonikus LC8-kötő régiók közé tartoznak. Mindkét motívumból hiányzik a klasszikus TQT aminosavkombináció a központi pozíciókból [53], és a környező aminosavak is atipikusnak mondhatók. A motívumok a 8. ábrán láthatóak.

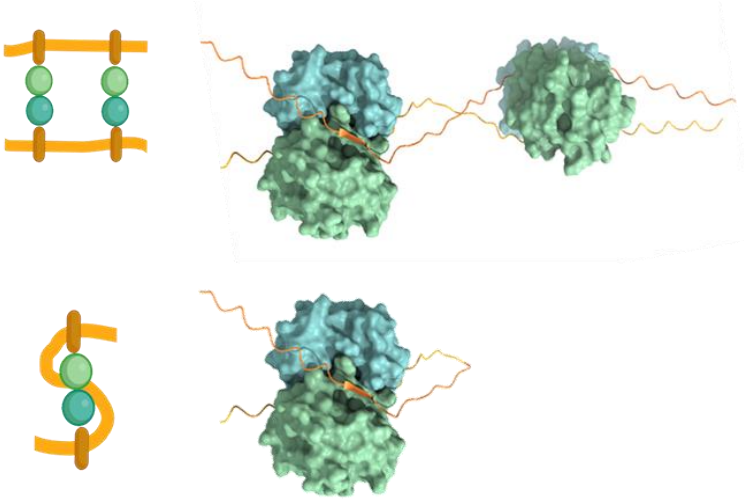


8. ábra: A teljes hosszúságú (1-es izoforma) GKAP fehérjén a 655-711 közötti aminosavak lefedik mindkét dinein könnyű lánc kötő motívumot. A két motívum kiemelve látható, alatta a relatív aminosav számozással, amit az LC8 kötő motívumok esetében szokás alkalmazni, aminek a központjában a core Q *aminosav áll.*

Az 9. ábrán szereplő szekvencialogó a TQT motívum előfordulási gyakoriságát, valamint a többi pozícióban tapasztalható diverzitást szemlélteti. Ugyanakkor az LC8 dimer konzervált partnerkötési mechanizmusa (ß augmentációval, ld. a 7. ábrán) azt valószínűsíti, hogy a GKAP partnerhez is igen hasonló módon képes kapcsolódni. A GKAP két LC8 dimer kötésére képes, egy LC8 dimer pedig szintén két GKAP ligandumot tud kötni, ebből következően felmerül hetero-oligomer, polibivalens molekuláris állványzat kialakulásának a lehetősége, ideértve akár nem kötött sztöchiometriájú, láncolatszerű asszociátumok képződését is.

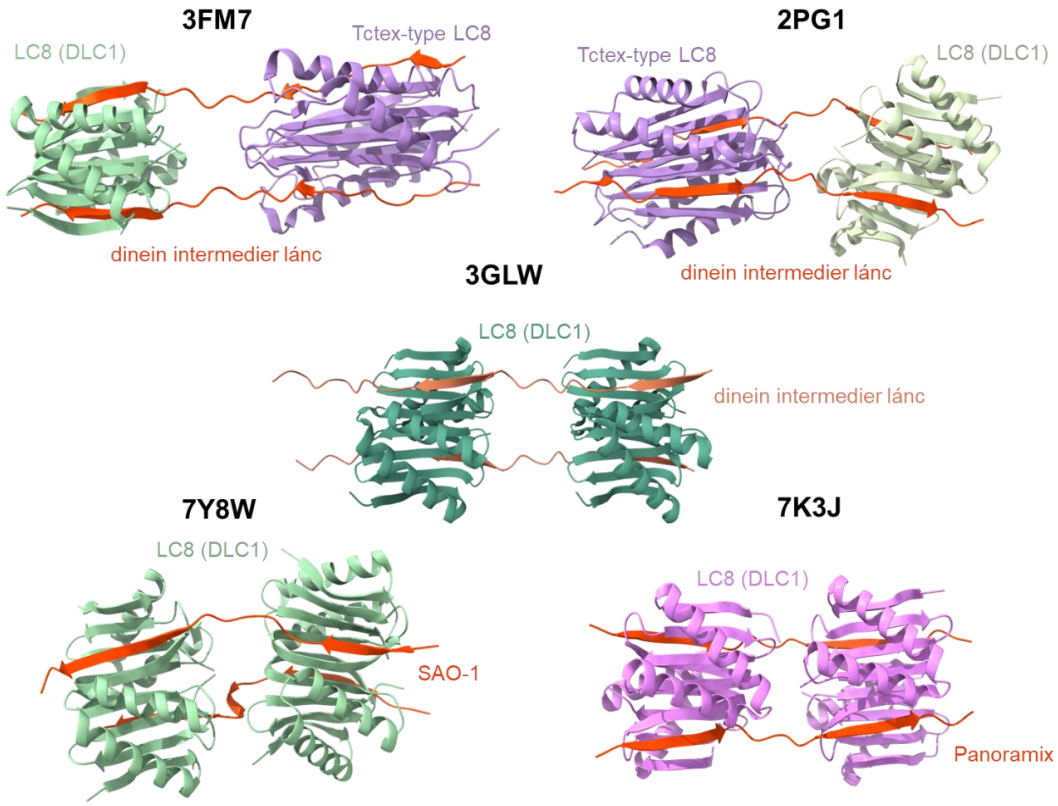
9. ábra: Az LC8 hub adatbázis (https://lc8hub.cgrb.oregonstate.edu/) és a Függelék 1. táblázatában látható LC8 partnerek szekvenciáiból (összesen 117 szekvenciából) készített szekvencialogó (https://weblogo.berkeley.edu/ eszközzel készült [73]), alatta kiemelve a GKAP fehérjében található két kötőhely szekvenciája olvasható.

E. Moutin és mtsai. kétféle lehetséges elrendezést vázoltak fel a GKAP:LC8 komplex esetében. Ők is megerősítették a komplex kialakulását *in vivo* [72], de a pontos sztöchimetria és az atomi szerkezet leírása még várat magára. Az ő hipotézisük szerint a komplex legnagyobb valószínűség szerint 2:2 sztöchiometriával alakul ki (azaz 2 GKAP monomer és 2 LC8 dimer interakciójával). A lehetséges elrendeződéseket a 10. ábrán illusztráltam.



10. ábra: A GKAP:LC8 komplex lehetséges elrendeződései 2:2 vagy 1:1 sztöchiometriával (azaz 2 GKAP : 2 LC8 dimer vagy 1 GKAP : 1 LC8 dimer). Az ábra saját készítésű, E. Moutin és mtsai munkája inspirálta [68], Kálmán Zsófia E. molekuladinamikai futtatásait, ChimeraX [66] és Microsoft Powerpoint szoftvert használtam hozzá.

Szisztematikus, szekvencia alapú keresésem alapján jelenleg öt olyan szerkezet érhető el a PDB adatbázisban, ami két LC8 dimer és egy hosszabb (27-33 aminosavas) multivalens (több különálló LC8 kötőhelyet hordozó) partner által kialakított komplexet mutat be (11. ábra). Ezek közül kettő (PDB: 3FM7 [74] és PDB: 2PG1 [75]) egy DLC1 dimer + egy ún. Tctex típusú DLC dimer komplex a hosszabb multivalens, két kötőhelyet tartalmazó kötőpartnerrel, ami egy dinein *intermediate chain* molekula. A PDB: 3GLW szerkezet egy kvázi-hexamer amit transzlációs és rotációs transzformációval hoztak létre egy DLC1 és egy intermediate chain partner peptid egységből [74]. A negyedik szerkezet két DLC1 dimer és a Panoramix nevű fehérje komplexe (PDB: 7K3J [76]), az ötödik pedig egy DLC1-SAO-1 komplex (PDB: 7Y8W [77]). Ezek a szerkezetek mind röntgenkrisztallográfiás mérések alapján készültek, és mindegyik szabályos, nyújtott alakkal jellemezhető, paralel (vagy más néven „*in-register*") topológiával, azaz egy adott LC8 dimer vagy két N-terminális kötő motívumhoz, vagy két C-terminális kötő motívumhoz kapcsolódik, ahogy a 11. ábrán látható.



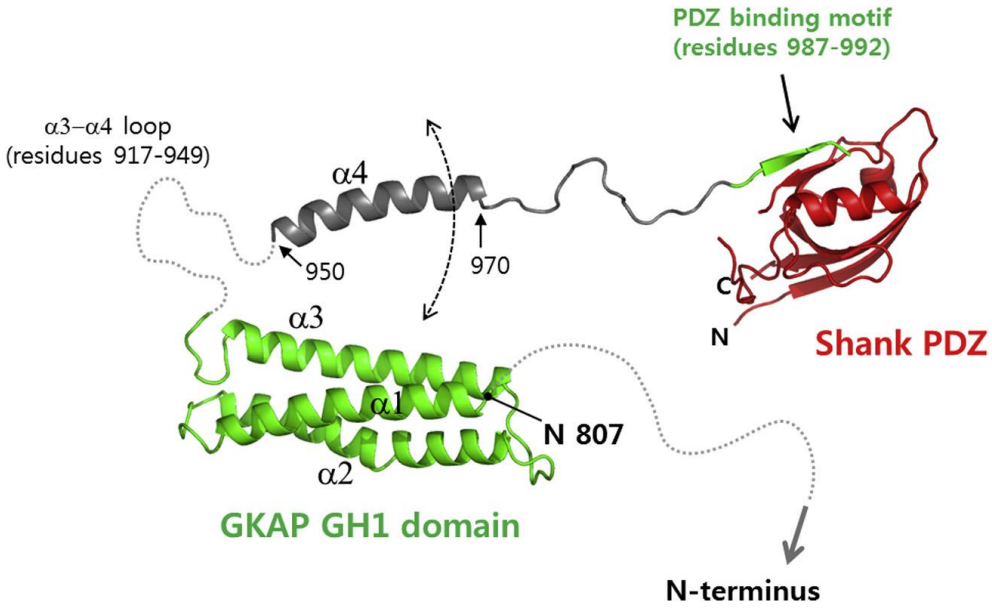
11. ábra: A PDB adatbázisban elérhető szerkezetek, amelyekben dinein könnyű lánc dimerek kapcsolódnak bivalens partnerhez [74–77]. Az ábra a PDB adatbázisban elérhető szerkezetek alapján készült ChimeraX szoftverrel.

Az alternatíva egy „eltolt” („*off-register*”) szerkezeti felállás volna, ahol egy LC8 dimer egyik kötőhelyéhez egy N-terminális, másik kötőhelyéhez egy ugyanolyan partner C-terminális kötőhelye kapcsolódik (amely esetben felmerülne a magasabb rendű oligomerizáció, komplex hálózatos elrendezés kialakulásának lehetősége). Ez a szcenárió egyetlen ismert szerkezet esetében sem látható, ezt az elméleti lehetőséget még nem mutatták ki kísérletes módszerrel.

A leírt röntgenkrisztallográfiás szerkezeteben az összekötő („*linker*”) régió a két LC8 kötőmotívum között nyújtott konformációba rendeződik, és a partnerhez kapcsolódott két LC8 dimer egymással nem alakít ki kontaktust (leszámítva a kristályosításból adódó különböző hexamerek közötti kristálykontaktusokat). Felmerül a lehetőség, hogy ezek a jellemzők csak a kristályok pakoltsága miatt alakulnak ki, és ezen szerkezeti leírások alapján nem ítélhető meg a vizsgált szegmensek valós rugalmassága és dinamikája.

1.4.3 A DLGAP fehérjecsalád közös pontja: a GH1 domén

Tong és mtsai. sikeresen kristályosították a *Rattus norvegicus* GKAP GH1 domént matóz kötő fehérjével (MBP, *maltose binding protein*) fúzionáltatva (PDB: 4R0Y). A szerkezet a 12. ábrán látható. Predikcióik alapján a régió négy hélixből épül fel, ennek vizsgálatára olyan konstrukciót alakítottak ki a szerzők, amiben a becsült hármas és a négyes hélix közötti hosszabb összekötő szakaszon lokalizálódó prolingazdag régiót kivágták a jobb kristályosíthatóság és a proteolízis megakadályozása érdekében. Az első három α hélix tisztán kivehető volt az elektronsűrűség térképeken, de a negyedik nem, feltehetően annak mozgékonysága miatt. Az első három α hélixet kiterjedt hidrofób és sok elektrosztatikus interakció tartja össze. A predikciók szerinti negyedik hélix nagyrészt hidrofil aminosavakból áll, több töltéssel rendelkező aminosav ebben a régióban felveti a lehetőséget, hogy elektrosztatikus kölcsönhatások ezt a szakaszt is a harmadik hélixhez kapcsolják. A szerzők ITC méréssel kimutatták és igazolták, hogy gyenge kölcsönhatással, de köt egymáshoz a GH1 régió első három α helikális szakasza és a becsült negyedik hélix. A DLGAP család fehérjéi között megfigyelhető magas fokú GH1 domén konzerváltság és az enzimatikus aktivitáshoz szükséges katalitikus aktív hely hiánya arra utalhat, hogy feltételezhetően a GH1 domén is fehérje-fehérje interakciós modulként funkcionál a szinaptikus jelátvitelben [46].

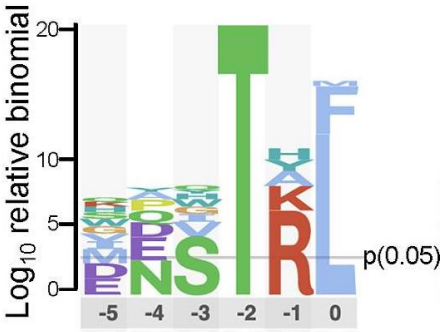


12. ábra: A GH1 domén szerkezete maltóz kötő fehérjével fúzionáltatva (PDB: 4R0Y [46]), valamint a GKAP C terminális 6 aminosavas szakasza Shank1 PDZ doménnel interakcióban (PDB: 1Q3P [78]). A kísérletesen igazolt szerkezeti elemek zöld színnel, a becsült szerkezettel rendelkező szakaszok szürke színnel vannak jelölve. Az ábra Tong és mtsai. cikkéből származik [46].

1.4.4 A GKAP C-terminálisa és a Shank állványfehérje kapcsolata

A GKAP C-terminális régiója a Shank fehérje PDZ doménjéhez kötődik. A Shank1 egy másik posztszinaptikus állványfehérjékből álló család, a Shank egyik tagja, ami szintén nagymértékű rendezetlenséget mutat a szekvenciája mentén. A PDZ domén kiemelten gyakran előforduló szerkezeti elem [79], igen sok fehérje-fehérje interakció közvetítője. Jól definiált globuláris szerkezetű, helikális és nyújtott másodlagos szerkezeti elemeket is tartalmazó molekularész. A PDZ doménekhez a ligandumjai ß-augmentációval kötnek egy rövid lineáris motívumon (SLiM-en) keresztül. Az archetipikus PDZ ligand egy C-terminális peptid, de már leírtak nagy számban internális PDZ-kötő SLiM-eket, illetve PDZ-kötő lipideket is.

A Shank1 PDZ doménnek számos interakciós partnerét ismerjük, ligandumjai között C-terminális és internális kötőmotívumokat is leírtak. A C-terminális Shank1 konszenzus kötő motívum a `xTx(L/F)-COOH` reguláris kifejezéssel adható meg, a jellemző internális motívum pedig a `xTxFx`, ahol `x` bármilyen aminosav [80]. Több C-terminális kötő motívum alapján generált szekvencialogó a 13. ábrán látható.



13. ábra: C-terminális PDZ kötő motívumok alapján előállított szekvencialogó. Az ábra Ali és mtsai kéziratából származik [80].

A Shank1:GKAP kristályszerkezete elérhető, ahol a Shank1 PDZ dimer, a GKAP fehérjéből pedig a C-terminális 6 aminosavas peptid szakasz kötődése látható (PDB: 1Q3P [78]). A szerkezet a 12. ábrán látható. Egy másik kristályszerkezetben (PDB: 7A00) a GKAP C-terminálisának módosított verzióját használták, a C-terminuson L helyett F aminosavval (EAQTRF szekvenciával) [81]. Egy harmadik kristályszerkezetben (PDB: 5OVC) egy 7 aminosavas GKAP peptidet használtak a Shank3 PDZ doménnel komplexben, ebben a szerkezetben a Shank3 PDZ monomer formában van jelen [82]. Ugyanakkor a PDZ dimerizációt egy másik kristályosítási kísérletben is leírták, Zeng és mtsai. (PDB: 5IZU, [83]), ahol a Shank3 fehérje egy hosszabb szakaszát vizsgálták a SAPAP3 fehérje (a GKAP, azaz SAPAP1 fehérje egy rokonának) egy hosszabb, 15 aminosavas A C-terminálisával komplexben. Ez a 15 aminosavas SAPAP3 peptid majdnem 100%-ban megegyezik a GKAP C-terminálisával (csak egyetlen eltérés van, a -13-as pozícióban D helyett E). Ezen a kristályszerkezeten látható, hogy nem csak az utolsó 6 aminosav (szigorúan véve a kötőmotívum), hanem a teljes 15 aminosavas szegmens részt vesz a ß augmentációban, sőt, ez a szegmens a Shank lánc két távoli ß szálának dimerizációjában is részt vesz [83]. Ugyanakkor ezen szerkezetek esetében nem teljesen egyértelmű, hogy a megfigyelt interakciók oldatfázisban is lejátszódnak-e, vagy a kristályosítási körülmények között alakulnak ki. Utóbbi természetesen nem zárja ki teljesen a fiziológiai relevanciát sem, amennyiben pl. tömény, fázisszeparációval kialakuló kondenzált fázisban jön létre a kölcsönhatás a PSD-n belül [84–86]. Emiatt ez az aspektus mindenképpen további, részletes vizsgálatokat igényel.

Habár a peptid:PDZ interakciók elsődleges specificitása egy rövid szegmensre korlátozódik, a C-terminális 4 aminosavra (p_{-4} – p_0 között), számos jel utal arra, hogy a tágabb szekvenciális kontextus is szerepet játszik (minimum p_{-10}-ig) [87]. Ez látható a PDB: 5IZU szerkezeten is [83]. Sok egyéb tanulmány, számos más domén:motívum

kölcsönhatásvizsgálatának eredményéből is következtethetünk arra, hogy a határoló (*flanking*) aminosavaknak, akár a központi (*core*) motívumtól számított 10-15, vagy 20 pozíció távolságban levő aminosavaknak is jelentős funkcionális szerepe lehet [88–90]. PDZ domének esetében az ilyen interakciókra a rendelkezésre álló NMR szerkezetekből következtethetünk, amelyek PDZ:peptid komplexekkel végzett kísérletekből származnak (PDB: 2M3M, 2KOH, 2K20 [91,92]. A HPV51 E6 onkoprotein C-terminális szegmensét NMR-rel vizsgálták, egy hosszabb konstrukcióval, amelynek része a PDZ-kötő C-terminus előtti Zn-kötő domén is (PDB: 2M3L). Ez a domén kompakt szerkezetet vesz fel, aminek része egy C-terminális hélix. Ezt egy ún. bidendate H híd stabilizálja, ami az Arg guanidin csoportja és a Gln illetve Ser aminosavak oldalláncain levő oxigének között alakul ki [91]. Ez a hélix közvetlenül a C-terminális 7 aminosav előtt lokalizálódik, ami nagyrészt rendezetlen és az elsődleges PDZ kötésért felelős.

Az RSK1 kináz C-terminális PDZ kötő motívuma előtt egy viszonylag hosszú, ~40 aminosavas rendezetlen régió lokalizálódik, ami egy autoinhibíciós szakaszt és egy MAPK-kötő helyet is tartalmaz. A PDZ-vel interakcióba kerülő aminosavakat megelőző szakaszról kimutatták, hogy oldatfázisban helikális szerekezti hajlammal rendelkezik. Az E6-tal ellentétben az RSK1 fehérje esetében semmilyen további kölcsönhatást nem mutattak ki a MAGI1 fehérje PDZ2 domén és a 6 C-terminális aminosav között, sem kristályszerkezetben (PDB: 5N5F [93]), sem NMR spektroszkópiával, még egy hosszú, 49 aminosavas C-terminális RSK1 konstrukció használatával sem [94].

Az E6 fehérjével ellentétben, de bizonyos szempontból az RSK1-hez hasonlóan, a GKAP fehérje C-terminusa predikciók szerint egy hosszabb, 40 aminosavas rendezetlen régió. A szakirodalmi adatok alapján nem ismerünk más becsült kötőhelyet ebben a régióban, valamint ennek a szakasznak az aminosav-összetétele lényegesen eltér az RSK1-től. Néhány ismert Shank1, valamint az analóg Shank3 kristályszerkezet a PDZ domén dimerizációját mutatja be, GKAP-pal vagy valamilyen más partnerrel komplexben (PDB: 1Q3P, 5IZU, 3QJN, 3L4F, 7A9B [78,80,83,95,96]), ugyanakkor más kísérletek, egyebek mellett a saját NMR eredményeink is határozottan azt támasztják alá, hogy a Shank1 PDZ monomer oldat fázisban (PDB: 5OVC [82,97]).

Ezen egymásnak ellentmondó adatok alapján szükséges egy részletes elemzés aminek a Shank1:GKAP interakció és komplexük áll a középpontjában. A GKAP fehérje C-terminális PDZ kötő motívumot megelőző hosszú rendezetlen régiójának funkcionális és szerkezeti vizsgálata várat magára. Az AlphaFold2 predikciója

alapján nem csak a már jól ismert GH1 domén (PDB: 4R0Y, [46]) esetében fordulhat elő α helikális szerkezeti preferencia.

1.5 Rendezetlen fehérjék szerkezetvizsgálata NMR spektroszkópiával

A funkcionálisan rendezetlen fehérjék vagy fehérjerégiók nem vesznek fel egy jól definiálható 3D szerkezetet, hanem nagyfokú szerkezeti variabilitást mutatnak, és konformációs sokasággal reprezentálhatók.

A nagymértékben flexibilis makromolekulák szerkezetvizsgálata során csak korlátozottan hagyatkozhatunk csupán statikus, rigid, kevéssé dinamikus szerkezetmeghatározó módszerekre, amik egy-egy pillanatképet rögzítenek a vizsgált struktúráról.

A jelenleg elérhető atomi felbontású szerkezetvizsgáló módszerek közé a röntgenkrisztallográfia, a krioelektronmikroszkópia és az NMR spektroszkópia tartozik. Ezek közül előbbi két módszer alkalmazásához szükség van a minták fixálására, vagyis ezen módszerekkel csak „állóképeket" készíthetünk a vizsgált makromolekulákról, illetve ezek elsősorban a globuláris, jól definiálható háromdimenziós szerkezettel bíró molekulák és komplexeik esetében alkalmazhatók. Az NMR (nukleáris mágneses magrezonancia) spektroszkópia segítségével az előbbiekhez hasonlóan atomi felbontású információ nyerhető egy-egy molekula háromdimenziós szerkezetéről, sőt, mozgékony, oldat fázisban folyamatosan változó szerkezetű molekulák vizsgálata is lehetséges. Ilyen módon részletes adatokat nyerhetünk akár igen változatos konformációs sokasággal jellemezhető fehérjemolekulákról is. NMR spektroszkópia segítségével közvetlen dinamikai adatokat is nyerhetünk, vagyis képet kaphatunk nem csupán adott fehérjék szerkezeti preferenciáiról, hanem a konkrétan bekövetkező konformációváltozások időskálájáról és jellegéről is. Mindezen felül az NMR-spektroszkópia alkalmas arra is, hogy részletes információt kapjuk egy interakció során az asszociáció-disszociáció pontos lépéseiről és atomi/aminosav szintű eseményeiről.

Az NMR spektroszkópia az atommagok mágneses tulajdonságát használja ahhoz, hogy információt szolgáltasson róluk. Számos különböző mérés végezhető, melyekkel megállapítható, mely atomok vannak egymással kovalens kapcsolatban, vagy térben közel a fehérje feltekeredésnek köszönhetően. NMR technikával azok az atommagok vizsgálhatók, amelyeknek spinje nem zérus, ilyenek például a gyakran vizsgált, ½ spinű ^{1}H, ^{13}C, ^{15}N izotópok. Az ^{1}H kivételével ezen izotópok természetes gyakorisága túl alacsony ahhoz hogy a biomolekulák vizsgálata során alkalmazható

koncentrációk mellett hatékonyan mérhető legyen. Emiatt a vizsgált mintát izotópjelölt formában kell előállítani; fehérjék esetében ^{13}C és ^{15}N jelölést szokás alkalmazni. Az NMR spektrumokból kinyerhető egyik legalapvetőbb információ a kémiai eltolódás. Egy-egy atommag kémiai eltolódás értéke elsősorban az atom fajtájától, kötésrendszerétől, és térbeli molekuláris környezetétől függ. Egy fehérje esetében a kémiai eltolódás rendkívül gazdag információforrás, érzékeny a lokális és globális szerkezetre, protonáltsági állapotra, eltemetettségre, stb. Az egyediségre jellemző, hogy az ^{1}H-^{15}N korrelációs spektrumokat, melyekben első közelításben minden jel egy főlánc amid NH csoportnak feleltethető meg, a fehérjék ujjlenyomat-spektrumának is szokás tekinteni. A szerkezet alapján az egyes atomok kémiai eltolódása jó közelítéssel becsülhető (pl. a ShiftX nevű szoftverrel) [98].

A fehérjékben jellemző kémiai eltolódás-tartományok: ^{1}H atommagok esetében leggyakrabban 2-10 ppm, ritkán akár -4-15 ppm (standardhoz viszonyított érték, mértékegysége ppm, *pars per million*), ^{13}C atommagok esetében 0-190 ppm, ^{15}N atommagok, főlánc amid N atomok esetében 100-140 ppm között. A mérések kiértékelése során gondot kell fordítani a kémiai eltolódások pontos leolvasására, melynek feltétele a megfelelő referencia beállítása, ez a vizes oldatban történő mérések esetében a DSS molekula metilcsoportjainak segítségével történik, ebben az ^{1}H és ^{13}C atomok eltolódása megállapodás szerint 0 ppm. A gyakorlatban az ^{1}H eltolódások esetében a referencia beállítása közvetlenül, a ^{13}C és ^{15}N magok esetében ún. indirekt módszerrel történik. Ennek különösen nagy jelentősége van a rendezetlen fehérjék esetében, ahol a másodlagos kémiai eltolódások tipikusan kicsik (lásd alább).

Az egyes atommagokhoz tartozó kémiai eltolódásokat a jelhozzárendelés (asszignáció) során határozzuk meg. Ehhez olyan spektrumokat kell felvennünk, amelyeken végigkövethetőek az egyes atomok kémiai kapcsolatai aminosavakon belül, valamint a szomszédos aminosavak között. Duplán (^{15}N és ^{13}C izotóppal) jelölt fehérjékből tipikusan ún. tripla-rezonancia spektrumokat szokás felvenni. Ezek jellemzően 3 dimenziósak, a jelek egy ^{1}H, egy ^{13}C és egy ^{15}N tengely mentén oszlanak el, és a jelek mintázata az adott mérésre (pulzusszekvenciára) jellemző módon jelenik meg és ad információt az egyes atomok közötti kapcsolatokról.

Főlánc asszignáció során az egyes aminosavak amid N és H, karbonil C, és Cα atomjának a kémiai eltolódását azonosítjuk, a gyakorlatban kiegészítve a Cβ és gyakran a Hα, Hβ eltolódásokkal is. A Cβ eltolódásokat tartalmazó spektrumok felvétele és elemzése kulcsfontosságú az egyes aminosavak típusának besorolásához a Cβ atom jellegzetes, oldalláncfüggő kémiai eltolódása miatt.

A jelhozzárendelés gyakorlati elvégezhetősége nagyban függ a jelek eloszlásától, lehetséges átfedéseitől, ami elsősorban a fehérje szerkezeti-dinamikai tulajdonságain múlik. Míg a globuláris fehérjék esetében általában a jelek széles tartományban oszlanak el és gyakorlatilag minden aminosav esetében egyedi, jellemző értéket mutatnak, a funkcionálisan rendezetlen fehérjék a mozgások miatt kiátlagolódó, és a hasonló kémiai környezet miatt gyakran egymáshoz közeli kémiai eltolódásokkal jellemezhetőek. A jelátfedések feloldása ilyen esetekben szükségessé teheti nagyobb dimenziós (4D, 5D) vagy speciális spektrumok felvételét [99,100].

A kémiai eltolódások szerkezetfüggésének egyik aspektusa, hogy információt adnak a vizsgált fehérje másodlagos szerkezeti preferenciáiról. Az ún. másodlagos kémiai eltolódásokat (*secondary chemical shifts*, SCS) úgy kaphatjuk meg, hogy a mért értékekből kivonjuk az adott aminosav adott atomjára jellemző „átlagos" értéket. A kapott másodlagos eltolódás előjele – atomtípusra jellemző módon – és nagysága utal az adott aminosav helikális vagy nyújtott jellegére, illetve az ahhoz tartozó szerkezeti preferencia mértékére. Nagy abszolút értékű másodlagos eltolódások tipikusan stabil, jól meghatározott másodlagos szerkezeti elemek jelenlétére utalnak, míg a funkcionálisan rendezetlen fehérjék jellemzően kicsi, az átlagos értékhez közeli értékeket mutatnak. Az irodalomban többféle „átlagos" (ún. *random coil*) értékeket tartalmazó leírás/lista található, ami jól mutatja ezen értékek meghatározásának nehézségét. A rendezetlen fehérjék gyenge szerkezetei preferenciáinak megállapításához a random coil értékekhez közeli eltolódások miatt kiemelten fontos a referencia megfelelő beállítása [101].

NMR segítségével követett titrálási mérésekkel egy fehérje partnerkötésének folyamata is követhető. Az egyes partnereket különböző arányban tartalmazó mintákból mért spektrumokban azt vizsgáljuk, hogy a szabad és a komplex állapotú fehérje egyes aminoavai, illetve azok atomjai milyen változáson mennek keresztül a kötődés hatására. Ehhez egy mérési sorozatból nyerhetünk kémiai eltolódás perturbáció (*chemical shift perturbation*, CSP) adatokat. Amelyik régióban nagy amplitúdójú CSP értékeket kapunk, az a szegmens feltehetően közvetlenül érintett a kötődésben (atom-atom kontaktusokat alakít ki, rigidebbé válik, „eltemetődik"). Ugyanakkor, főleg globuláris fehérjék esetében, az eltolódások változása a közvetlen kötőhelytől távolabbi régiókban is megjelenhet, ha azok szerkezeti-dinamikai változáson esnek át a kölcsönhatás során.

Végezetül meg kell említeni az NMR-spektroszkópia korlátait. Mérési oldalról fizikai korlátot jelent a vizsgálható molekulatömeg [102,103]: a körülbelül 45 kDa-nál nagyobb méretű molekulák rotációs diffúziós (*tumbling*) mozgása oldatfázisban túl lassú ahhoz (a mérendő jelek túl gyorsan csengenek le), hogy a spektrumon látható

csúcsot adjanak. A másik korlát az ún. „köztes csere” (*intermediate exchange*) jelensége: a tipikusan a ns-µs tartományba eső, az érintett atomok kémiai eltolódásának megváltozásával járó kémiai vagy konformációs átrendeződések az érintett jelek kiszélesedése miatt nem vagy csak nehézségek árán vizsgálhatóak.

A gyakorlatban ezek mellett az egyik legfontosabb limitáló tényező a minta előállíthatósága: NMR mérésre alkalmas pufferben, megfelelő tisztaságban és töménységben, aggregáció nélkül oldat fázisban maradó izotóp jelölt fehérjeszegmensekre van szükség, melyek létrehozása számos esetben több hónapos, vagy akár több éves mintaoptimalizálást követel meg, és nem is mindig vihető sikerre.

2 Célkitűzések

Doktori munkám megkezdése előtt a GKAP posztszinaptikus denzitásbeli állványfehérje szerkezetéről minden ismeretünk csak rövid peptidekkel végzett vizsgálatokra korlátozódott. Röntgenkrisztallográfiás technikával leírt szerkezeti képet ismerünk egy 15 aminosavas szegmensről (a GBR szakasz második ismétlődő motívumáról) a PSD95 GK doménjével komplexben, illetve a C-terminális hexapeptidről a Shank1 PDZ doménnel komplexben. Munkám során a GKAP hosszabb szakaszainak vizsgálatát tűztem ki célul; mivel predikció alapján nagyrészt rendezetlen fehérje, ezért szerkezeti jellemzésére az NMR spektroszkópiát választottam. NMR mérésekkel funkcionális egységről funkcionális egységre haladva képet kaphatunk az egyes régiók globális, valamint aminosavszintű jellegzetességeiről is. Az NMR spektrumok sajátossága, hogy csak az izotóp jelölt molekularészekről nyerhetünk információt, mi pedig fontosnak tartottuk a kialakuló komplexek mindkét résztvevőjének szerkezeti jellegzetességeit megvizsgálni, ezért kétszer megismételtük a komplex NMR vizsgálatát: az első mérési sorozatban ^{15}N, ^{13}C-jelölt GKAP-DYL molekulát titráltunk jelöletlen LC8 molekulával, a második mérés során pedig ^{15}N, ^{13}C-jelölt LC8 molekulát jelöletlen GKAP-DYL fehérjével.. Az NMR vizsgálatokat kiegészítettem molekuladinamikai számításos módszerekkel, illetve egyéb biokémiai vizsgáló módszerekkel, hogy a GKAP szegmenseit és komplexeiket átfogóan jellemezzem.

Doktori munkám során célul tűztem ki:

- a GKAP posztszinaptikus állványfehérje rendezetlen régióit, a dinein kötő szakaszt és a C-terminális PDZ domént kötő szakaszt előállítani és tisztítani további analitikai célra.
- az előállított rendezetlen szakaszokat többféle biokémiai vizsgálati technikával jellemezni, különös figyelemmel a méretükre, tömegükre, hidrodinamikai átmérőjükre.
- az alkalmas tisztaságban és töménységben előállított konstrukciókat NMR spektroszkópiával részletes szerkezeti vizsgálatnak alávetni, tekintettel a globális és lokális, aminosav szintű jellegzetességekre is.
- a szóban forgó fehérjerégiókat partnereikkel komplexben vizsgálni, kötődési kinetikájukat jellemezni, illetve részletes szerkezeti elemzést készíteni NMR spekroszkópiás mérések alapján, molekuladinamikai számításos módszerekkel kiegészítve.

3 Módszerek

3.1 Rekombináns fehérje termelésére alkalmas *E.coli* sejtek létrehozása, klónozás

NMR méréssel az ~1000 aminosavas fehérjeláncokról nem lehet egyszerűen, egyértelműen kiértékelhető spektrumot készíteni. Rendezetlen fehérjék esetében tovább szűkíti a lehetőségeket a nagy arányú jelátfedés. Emiatt a 992 aminosavas teljes hosszúságú GKAP fehérjét egyben vizsgálni nem érdemes, de még a rövidebb 666 aminosavas izoforma vizsgálata sem célszerű. Illetve mivel a GKAP-nak több partnere van, az egyes partnereihez való kapcsolódásról úgy nyerhetünk precíz kísérleti adatokat, ha a fehérjét csak részleteiben vizsgáljuk. Munkám során ugyanakkor fontos szempont volt, hogy ne csak a közvetlen kötő régiókat, hanem azok tágabb kontextusát is vizsgáljam. A csoportunk számos különböző konstrukciót tervezett, amik a fehérje különböző szakaszait fedik le. Ezek az 1. táblázatban láthatók. A GK-kötő régió (GKAP-GBR) ismétlődő szekvenciáit magába foglaló három konstrukciót, valamint az GKAP-DYL+CC régiót lefedő konstrukciót én terveztem.

Konstrukció elnevezése	Kezdő pozíció	Utolsó pozíció	Konstrukció hossza	Vektor (expressziós címke)
GKAP-GBR1-3	338	430	93	pEV (6xHis-tag)
GKAP-GBR4-5	425	510	86	pEV (6xHis-tag)
GKAP-GBR1-5	338	513	176	pEV (6xHis-tag)
GKAP-DYL (vagy GKAP-DYL2)	**655**	**711**	**61**	**pEV (6xHis-tag)**
GKAP-DYL-CC	655	736	82	pEV (6xHis-tag)
GKAP-GH1	807	992	186	pEV (6xHis-tag)
GKAP-Ct43	**950**	**992**	**43**	**pEV (6xHis-tag)**
GKAP-C12 peptid	981	992	12	peptidszintézissel gyártva

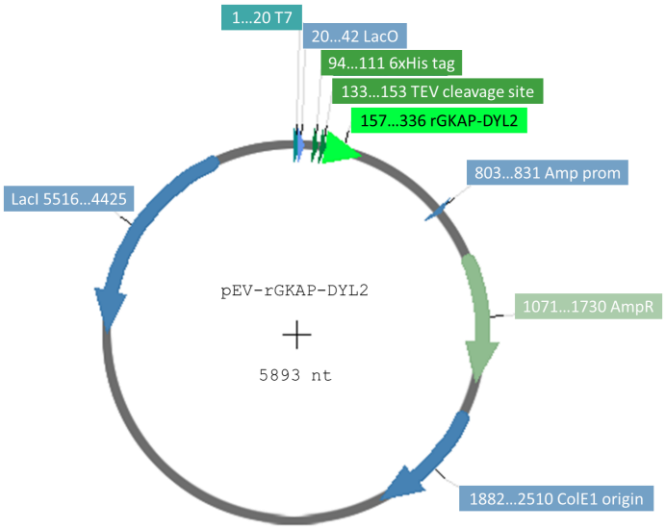
1. táblázat: A csoportunkban létrehozott, a GKAP fehérje különböző szakaszait lefedő konstrukciók. A dolgozat további részében a GKAP-DYL (GKAP-DYL2) és a GKAP-Ct43 konstruciókkal végzett munkámat mutatom be részletesen, ezért ezeket kiemeltem a táblázatban.

Az alábbiakban részletesen ismertetem a klónozás, fehérjetermeltetés és -tisztítás lépéseit azon fehérjék esetében, amelyekkel NMR mérést végeztem, a dolgozat további részében ezek relevánsak.

A klónozáshoz rendelkezésünkre álló templát cDNS szekvencia Enora Moutin feljánlásából a "GKAP1a" *Rattus norvegicus* GKAP 3-as izoforma (UniProt: P97836-5) kódoló szakasza volt. Ez egy teljes hosszúságú GKAP cDNS, complementary DNS szekvencia, ami RNS-ről reverz transzkripcióval készült, csak a fehérjét kódoló DNS szakaszokat tartalmazza, intron szekvenciákat nem. A PCR reakcióhoz megfelelő forward és reverse primerpárok tervezése szükséges, így jelölhetjük ki a számunkra releváns kódoló szakaszt, és bevihetjük a restrikciós endonukleázok felismerő helyeit is. Az optimalizált primerpárok nem kötődnek aspecifikusan a templát szekvenciához, illetve olvadáspontjuk megfelelő az optimális PCR beállításához.

A templát cDNS szekvenciáról tehát PCR reakcióval felsokszoroztuk a kiválasztott szakaszokat, illetve a megfelelően megtervezett primerpár segítségével a szakaszok végén restrikciós endonukleáz (NdeI és XhoI) hasító helyeket alakítottunk ki. Ezután az enzimatikus emésztés során a PCR terméket és a célvektort is ugyanazokkal a restrikciós endonukleázokkal hasítottuk, ennek eredményeképp egymással hibridizálni képes rövid szakaszok, "ragadós végek" alakultak ki az inszert és az emésztéssel linearizált vektor DNS szálakon is, amelyek egymással hibridizálni képesek. FastAP kezelést (amivel a szabad poszfát csoportok eltávolíthatóak az inszert végéről), valamint hibridizációt követően ligálással kovalensen összekapcsoltuk a cukor-fosztfát lánc megfelelő elemeit, így az inszertet beépítettük a cél vektorba. A használt pEV plazmid egy módosított pET-15b vektor, ami a klónozó hely közvetlen közelében N-terminális 6xHis taget és *tobacco etch vírus* (TEV) hasító helyet kódol. Az így előállított fehérjekonstrukciók N-terminálisán, TEV hasítást követően négy extra aminosav marad (GSHM).

Az előállított pEV plazmidok tartalmaznak két további lényeges elemet, ami a fehérje előállításához szükséges (ld. a 14. ábrán): (1) egy ampicillin rezisztenciát kódoló gént, amivel a sikeresen transzformált baktérium klónok szelekciója válik lehetővé ampicillin antibiotikumot tartalmazó táptalajon vagy folyékony tápoldatban, (2) egy promótert, esetünkben lac promótert, amivel a rekombináns fehérje transzkripciója indukálható (bekapcsolható) a vektor DNS-ről.



14. ábra: A GKAP-DYL konstrukció expresszáltatására szolgáló pEV vektor felépítése.

Az általunk megkonstruált GKAP-DYL kódoló plazmid mind a két LC8 kötő motívumot magába foglalja, valamint további 10, illetve 14 aminosavat N illetve C-terminális irányban, ez a templáton (UniProt: P97836-5) a 655-711 aminosavak közötti szakasznak felel meg (ld. 8. ábra).

A *Rattus norvegicus* DYNLL2 gént kódoló (UniProt: Q78P75, 100%-ban megegyezik a humán ortológgal, UniProt: Q96FJ2), LC8 fehérje előállítására alkalmas plazmid konstrukciót Prof. Nyitray László bocsátotta rendelkezésünkre. Ez a cDNS szintén pEV vektorba van klónozva, így szintén N-terminális 6xHis taget tartalmaz, TEV proteáz hasítóhelyet és négy aminosavat (GSHM) az N-terminuson az expressziós címke maradványaként.

Szintén a *Rattus norvegicus* GKAP (UniProt: P97836) C-terminális 43 aminosavas szakaszát vizsgáltuk, azaz a 950-992 pozíciók közti szakaszt, ami 100%-ban megegyezik a humán homológ DLGAP1 fehérje megfelelő szakaszával (UniProt: O14490, 935-977 aminosavak között). Az általunk használt, GKAP-Ct43 elnevezésű konstrukció lefedi a C-terminális PDZ-kötő EAQTRL motívumot és a tágan értelmezett szomszédos szakaszát, további 37 aminosavat, ami predikció alapján részben rendezetlen.

A *Rattus norvegicus* Shank1-PDZ (UniProt: Q9WV48, 654-768 aminosav pozíciók, ami 100%-ban azonos a humán ortológ UniProt: Q9Y566, 654-768 pozíciók közti szakasszal) előállítását és tisztítását szintén az alább részletesen leírt protokoll szerint végeztük [97].

3.2 Transzformálás, rekombináns fehérje termelése és tisztítása

A ligált rekombináns DNS vektort transzformálással vittem be *E. coli* BL21 (DE3) vagy Dh5α baktérium törzsekbe. Utóbbi törzs klóramfenikol kezelés hatására magas kópiaszámban replikálja a transzformált plazmidot, így plazmid preparációval tisztítható belőle vektor DNS. Az így előállított plazmid DNS-t Sanger szekvenálással ellenőriztettük, hogy a létrehozott szekvencia valóban a megtervezett fehérjét kódolja.

A plazmiddal transzformált BL21 *E.coli* klónokat felszaporítottam, agar táptalajon vagy tápoldatban tenyésztettem, további felhasználás függvényében LB (Low salt Broth) vagy házilag készített M9 minimál médiumban (ennek összetétele: 22 mM KH_2PO_4, 50,6 mM Na_2HPO_4, 8,6 mM NaCl, vitamin mix, 2 mM $MgSO_4$, nyomelem mix, 4 g/l glükóz, 2,5 g/l NH_4Cl), 37°C-on. Utóbbihoz ^{13}C-jelölt D-glükózt, illetve ^{15}N-jelölt NH_4Cl-t adtam, mint egyedüli C illetve N forrás, hogy izotóp jelölt fehérjét állítsak elő. 6 MFU (MacFarland unit) denzitású kultúrában 1 mM IPTG-vel (izopropil ß-D-1-tiogalaktopiranozid) indukáltam a fehérje expressziót, 20°C-on 16 órán keresztül. A centrifugált pelleteket -20°C-on tároltam további felhasználásig.

A termelt fehérjék adatai a Függelék 2. táblázatában olvashatóak (molekulatömeg, becsült izoelektromos pont, extinkciós koefficiens, stb.).

3.2.1 Affinitás kromatográfia rendezett és rendezetlen fehérjék esetében

A tisztítás első lépéseként jégen lízispufferben (50 mM NaPi, 300 mM NaCl, pH 7,4), ultrahangos szonikálással homogenizáltam a sejteket (a sejtpelletet 10% pufferben feloldva: 1 g pellethez 10 ml puffert adva), majd centrifugálással (11 000 rpm, 30 perc, 4°C) ülepítettem a szilárd fázisú sejttörmeléket.

Hagyományos affinitás címkés kromatográfiás tisztítás során a felülúszóval dolgozunk tovább, amely tartalmazza a célfehérjét és a baktériumok által megtermelt összes többi fehérjét is. Ebből az oldatból a plazmid által kódolt affinitás címke segítségével tudjuk "kihorgászni" a kívánt fehérjét. Például a 6xHis tag affinitás címke oldalláncai nikkel ionokkal kelátot képeznek, így olyan affinitás kromatográfiás oszloppal tisztíthatók (IMAC, *Immobilized Metal ion Affinity Chromatography*), amelyen a töltethez Ni2+ ionok kapcsolódnak. Affinitás kromatográfiás oszlophoz való kötődés után a célfehérje olyan molekula segítségével

eluálható (oldható le az oszlopról), ami elősebben kötődik az oszlop töltethez, mint a címke. 6xHis-tag címke esetében ez az imidazol.

A rekombináns fehérjék olykor oldhatatlan (inszolubilis) formában termelődnek *E.coli* sejtekben, ún. inklúziós testekbe (zárványtestekbe) különíti el őket a baktérium. Rendezetlen fehérjék esetében ez gyakran előfordul. Ebben az esetben sejtlízist és centrifugálást követően a fehérje a pelletbe kerül, onnan denaturálószerrel oldható be: 6 M ureával vagy 6 M guanidin-hidrokloriddal (Gdn HCl). Denaturációt követően renaturáció szükséges, vissza kell állítani a natív környezetet, amiben a fehérje funkcióképes. Az erre szolgáló lényegi lépés a puffercsere, ami megvalósítható hígítással, dialízissel, vagy affinitás kromatográfiás oszlophoz kötött állapotban. A GKAP-DYL konstrukció esetében ez utóbbi eljárást alkalmaztam: a 6xHis-GKAP-DYL molekula denaturáló pufferrel (6 M Gdn HCl, 50 mM NaPi) szolubilizált oldatát 5 ml-s Bio-Rad EconoFit NuviaTM IMAC oszlopra töltve elválasztottam a baktérium fehérjéktől, majd natív pufferrel (50 mM NaPi, 300 mM NaCl, pH 7,4) az oszlophoz kötött állapotban renaturáltam a fehérjét, majd egy mosási lépést követően (50 mM imidazollal) natív állapotban tudtam eluálni magas koncentrációjú imidazolos elúciós pufferrel (50 mM NaPi, 300 mM NaCl, 250 mM imidazol). Minden tisztítási lépéshez a Bio-Rad FPLC (*fast protein liquid chromatography*, gyors fehérje folyadékkromatográfiás) rendszerét használtam.

Az LC8 dimer, GKAP-Ct43 és a Shank-PDZ konstrukciók esetében nincs szükség denaturációra, ezek a fehérjék jól oldhatóak, natív IMAC tisztítással kinyerhető a fehérje, ennek megfelelően az ultrahangos lízist követően a felülúszó oldatot közvetlenül az oszlopra töltöttem, majd eluáltam a fehérjét.

3.2.2 His tag hasítása

Az affinitás kromatográfiás tisztítási lépést követően a TEV hasítás következett. A TEV proteáz enzimet a laboratóriumban állítottuk elő ugyanazzal a klónozási eljárással, amit fentebb ismertettem. 5 mg fehérjéhez adtam 0,5 mg TEV proteázt, és a konstrukciót 16 órás inkubációval emésztettem 10°C-on.

TEV hasítást követően beiktatható egy reverz IMAC tisztítási lépés, amellyel a levágott His tag darabokat, az el nem hasított rekombináns fehérjemolekulákat és a TEV proteáz molekulákat lehet eltávolítani az oldatból. Ezt a lépést a Shank1-PDZ domén tisztításához alkalmaztam, mert ott már nem került sor az utolsó méretkizárásos kromatográfiás tisztítási lépésre. Ehhez Ni2+ ionnal borított IMAC gyöngyöket (Bio-Rad NuviaTM IMAC Ni-affinitású gyöngyöket) adtam a reakcióelegyhez, majd centrifugálást követően a felülúszóval dolgoztam tovább.

3.2.3 Puffercsere, ioncsere kromatográfia

Minden fehérjemolekulának az izoelektromos pont (pI) függvényében adott pH-n adott értékű pozitív vagy negatív töltése van, ez az aminosavösszetétel alapján a szekvencia ismeretében kiszámítható. Ennek megfelelően a különböző töltésű molekulák elválaszthatóak egymástól: az alacsony pH-n (pH 6,0) pozitív össztöltéssel rendelkező molekulák a pozitív töltetű Q oszlopon az átfolyó frakcióba kerülnek, míg a negatív töltésű szennyező nukleinsavak kötődnek az oszlophoz.

A GKAP-DYL, LC8, GKAP-Ct43 és Shank1-PDZ fehérjének is pozitív töltése van pH 6,0 környezetben. A pI (izoelektromos pont) értékek becsléséhez a Protein Calculator v3.4 eszközt használtam (https://protcalc.sourceforge.net/). Az egyes konstrukciók adatai a Függelék 2. táblázatában olvashatók.

Az ioncsere kromatográfiához szükséges pH és alacsony sókoncentráció beállítása puffercserével lehetséges, amihez puffercsere oszlop vagy dialízis alkalmazható. Előbbi használatához töményítésre van szükség, mert egy 5 ml térfogatú puffercsere oszlopon csak 1,5 ml minta sómentesíthető precízen, kevés anyagveszteség mellett (az IMAC tisztítási lépésben pedig rendszerint nagyobb mennyiségű, akár 8-12 ml hígabb, szennyezetteb fehérjeoldatot kapunk). A fehérjemintákat Amicon® Ultra-15 ultracel-3K (3 kDa MWCO (*molecular weight cutoff*)) centrifugaszűrővel töményítettem, majd Cytiva HiTrapTM Desalting 5 ml-s puffercsere oszloppal eltávolítottam az imidazolt a pufferből (a puffercserét követően a minták 50 mM NaPi, 20 mM NaCl, pH 6,0 pufferbe kerültek). Ezt követően ioncsere kromatográfiával tisztítottam tovább, 5 ml-s Bio-Rad EconoFit Macro-Prep High Q oszloppal, a rekombináns fehérjéket az átfolyóban begyűjtve.

3.2.4 Méretkizárásos kromatográfia

Még egy töményítési lépést követően az utolsó tisztítási lépés méretkizárásos kromatográfiával (*size exclusion chromatography*, SEC) történt egy Cytiva Superdex™ 75 Increase 10/300 GL oszlop segítségével. Ennek a kromatográfiás technikának az alapját a speciális pórusos gyöngy töltet adja, ami a viszonylag nagy, 24 ml-es oszlopban található. A nagyobb molekulák nem jutnak be a gyöngyök belsejébe, a kisebb molekulák viszont igen, így nagyobb utat járnak be az oszlop belsejében, emiatt lassabban eluálódnak. Az elúció "időpontja" (ami megfeleltethető az átfolyt térfogatnak) tehát arányos a molekula hidrodinamikai paramétereivel. Retenciós térfogatnak nevezzük azt a térfogatot, ahol az adott fehérje eluálódik az oszlopról (ez minden fehérje egyedi tulajdonságaitól függ). Ennek alapján a méretkizárásos kromatográfia nem csak preparatív, hanem analitikai módszerként

is alkalmazható: a retenciós térfogat logaritmusa és a molekula hidrodinamikai rádiusza (mérete/molekulatömege) egyenesen arányosak (figyelembe véve a molekula rendezetlenségét is) – ez alapján ismeretlen molekulák rádiusza, illetve kompaktsága becsülhető.

Tisztítási lépésként alkalmazva a maradvány szennyeződéseket, baktériumfehérjéket, el nem távolított TEV proteáz enzim molekulákat tartalmazó oldatból nagy tisztasággal elkülöníthető a rekombináns fehérje, valamint egy lépésben az is elérhető, hogy az NMR méréshez szükséges nagy tisztaságú, szűrt pufferbe kerüljön az előállított makromolekula.

A fehérjemintákat 500 µl térfogatban injektáltam az oszlopra, 0,8-1 ml/min áramlási sebességet alkalmaztam. A GKAP-DYL és LC8 minták végleges puffere 50 mM NaPi, 20 mM NaCl, pH 6,0 volt, a következő adalékanyagokkal: 0,02% NaN3 és 5 mM TCEP (trisz(2-karboxietil)foszfin); a GKAP-Ct43 és Shank1-PDZ minták esetében a TCEP adalékanyagot elhagytam. Az LC8 esetében a béta-merkaptoetanol és a DTT nem használható, mivel ezek a redukálószerek rákapcsolódnak a molekula egy hozzáférhető cisztein oldalláncára, emiatt a TCEP tiolmentes redukálószer alkalmazására volt szükség.

3.2.5 Töményítés, mintatárolás, szállítás

A titrálási partnerek (LC8, Shank1-PDZ) esetében méretkizárásos kromatográfia után még egy töményítési lépést alkalmaztam, hogy a partnerhez viszonyítva minél nagyobb töménységű oldatot kapjak, hogy a tirálási lépésekkel elérhető legyen a szaturáció. A GKAP-DYL konstrukció esetében a töményítési lépések minimalizálására törekedtem, mert ez a konstrukció hajlamos a töményítő szűrőhöz hozzátapadni, ezért egy-egy töményítési lépés jelentős anyagveszteséggel járt. Ezzel a konstrukcióval a legmagasabb koncentráció, amit el tudtam érni, 0,5 mg/ml volt.

Az előállított fehérjemintákat folyékony N2 oldatban lefagyasztottam, majd vákuumban fagyasztva szárítással liofilizáltam, így hűtés nélkül hosszabb távon (néhány hónapig) tárolhatóvá, illetve szállíthatóvá váltak.

3.3 Fehérjeminták általános jellemzése fizikokémiai technikákkal

3.3.1 Koncentrációmérés abszorbancia alapú, illetve alternatív módszerekkel

A 6xHis-GKAP-DYL, LC8, GKAP-Ct43 és Shank1-PDZ konstrukciók esetében a koncentráció meghatározása a 280 nm-en mért abszorbanciájuk alapján történt, egy NanoDrop2000 fotométer segítségével. Az abszorpciós koefficiensek becsléséhez a Protein Calculator v3.4 eszközt használtam (https://protcalc.sourceforge.net/), az egyes konstrukciók adatai a Függelék 2. táblázatában olvashatók. A GKAP-DYL konstrukció esetében Qubit™ Protein Assay Kit-et használtam a gyártó protokollja szerint. A leolvasáshoz Dr. Garay Tamás és kutatócsoportjának tagjai biztosították számomra a fluorométer készüléket.

3.3.2 Tisztaság ellenőrzése, molekulatömeg meghatározása SDS-PAGE és MS technikával

A rekombináns fehérjék tisztaságát és pontos molekulatömegét SDS-PAGE (nátrium-dodecil szulfát poliakrilamid gélelektroforézis) és LC-MS (folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria) vizsgálatokkal igazoltam. Előbbihez előre öntött, Bio-Rad gyártmányú 10%-os SDS-PAGE gélt használtam, a gélképeket pedig a GelAnalyzer nevű szoftverrel értékeltem ki (GelAnalyzer 23.1.1, available at www.gelanalyzer.com, by Istvan Lazar Jr., PhD and Istvan Lazar Sr., PhD, CSc). Az LC-MS méréseket Schlosser Gitta végezte az ELTE TTK-n.

3.3.3 Hidrodinamikai rádiusz becslése analitikai méretkizárásos kromatográfiával

Minden molekula retenciós térfogata (az a térfogat, ahol eluálódik a méretkizárásos kromatográfiás oszlopról) a hidrodinamikai sugarától függ. Ez a globuláris fehérjék esetében a molekulatömeggel (annak logaritmusával is) arányosnak tekinthető, ezáltal abból jól becsülhető. Rendezetlen fehérjék esetében azonban a nagyobb konformációs szabadság miatti kisebb kompaktságból adódóan a hidrodinamikai rádiusz tipikusan nagyobb, mint amit a molekulatömeg alapján várnánk.

Az analitikai SEC mérések lényege, hogy egy standard, ismert molekulatömegű sorozattal kalibrációs görbét határozunk meg, amihez a becsülni kívánt molekula méretét viszonyítjuk. A kalibrációs görbéhez a következő fehérjéket használtam:

BSA, mioglobin, RNáz A, B12 vitamin. Ezeket ugyanabban a pufferbe beoldottam, amiben a GKAP-DYL és az LC8 konstrukciót (50 mM NaPi, 20 mM NaCl, pH 6,0, 5 mM TCEP), és ugyanolyan térfogatban, 500 µl-ben injektáltam őket a Cytiva Superdex™ 75 Increase 10/300 GL oszlopra, mint a GKAP-DYL és LC8 fehérjéket. Az áramlási sebesség 0,8-1 ml/min volt. A kalibrációs görbéhez használt fehéjék adatai a 2. táblázatban láthatók.

	Koncentráció (mM)	Molekulatömeg (kDa)	Retenciós térfogat
BSA	0,2	66,4	9,65
mioglobin	2,5	17	13,55
RNáz A	3	13,7	14,3
B12 vitamin	0,3	1,3	19,37

2. táblázat: Az analitikai méretkizárásos kromatográfiához használt standard sor elemeinek adatai.

A kalibrációs görbe meghatározásához a retenciós térfogat logaritmusát vettem, azt ábrázoltam, majd kiszámítottam a retenciós térfogattal mért és a valós, ismert tömeg arányát. Amennyiben ez az arány ~1, akkor a vizsgált fehérje globuláris, ha >1,5 akkor rendezetlen [104].

3.3.4 Hidrodinamikai paraméterek vizsgálata dinamikus fényszórással

A dinamikus fényszórás (*dynamic light scattering*, DLS) méréseket a HUN-REN TTK-n végeztem Dr. Juhász Tünde segítségével. Ez a módszer makromolekulák méretének becslésére használatos. A GKAP-DYL, az LC8, és kettejük komplexének részecskeméret-meghatározása 20 °C-on történt egy W130i DLS eszközzel dióda lézerrel (660 nm) és fotodióda detektorral. 80 µl mintát mértünk kis térfogatú egyszer használatos, 1 cm úthosszúságú küvettákkal. Az időfüggő autokorrelációs függvényt 10 másodperes, 10 ismétléses mérésekkel határoztuk meg. Az analízishez i-Size 3.0 szoftvert használtunk.

3.3.5 Másodlagos szerkezeti elemek vizsgálata ECD spektroszkópiával

Az elektronikus cirkuláris dikroizmus (ECD, vagy röviden CD) spektroszkópia a fehérjék kiralitását használja ki, azt, hogy a körkörösen polarizált fény abszorpciója különböző az óramutató járásával megegyező, illetve azzal ellentétes irányú fény esetén. A távoli UV CD spektroszkópia a fehérjék másodlagos szerkezeti elemeinek, illetve azok stabilitásának vizsgálatára használatos, a közeli UV tartomány pedig az aromás oldalláncokról ad információt.

Az ECD spektroszkópiás méréseket Farkas Viktor támogatásával végeztük az ELTE TTK-n. A fehérjeminták CD spektrumát JASCO J-1500 spektrométeren mértem 20 °C-on, egy 0,1 cm úthosszúságú J/21 kvarc küvettával, 300 µl térfogatban, a következő beállításokkal: 195–260 nm spektrum, 50 nm/min szkennelési sebesség, 1 nm sávszélesség, 0,2 nm lépésköz, 0,5 mp válaszadási idő és 3 akkumulált szken, alapvonal korrekcióval. A GKAP-DYL konstrukció spektruma 6,5 µM, az LC8 fehérje 11,25 µM (monomer) koncentráción került felvételre. A komplex spektrumát ugyanezeken a moláris koncentrációértékeken mértem (azaz 6,5 µM GKAP + 11,25 µM LC8). Ez alapján a molekulák nagy többsége komplexált állapotban van az oldatban, így a spektrumok összehasonlítása azzal a feltételezéssel történt, hogy a mért spektrum a komplexet reprezentálja.

3.4 Fehérje-fehérje interakció vizsgálata BLI módszerrel

A bioréteg interferometria (*biolayer interferometry*, BLI) módszer lényege, hogy egy szenzor felületéhez hozzákötjük a két partnermolekula egyikét (jellemzően valamilyen erre alkalmas molekularészlet, címke (*tag*) segítségével, ami lehet például az általunk használt 6xHis tag címke, ami a szenzoron levő Ni2+ ionokhoz köt), majd a másik molekulát is hozzáadjuk. A felkötött molekulát a könnyebb érthetőség kedvéért gyakran "csali" (*bait*), a partnert "préda" (*prey*) kifejezéssel illetjük. A szenzor felületén levő réteg vastagodása mérhető, első lépésben a csali általi vastagodás, majd interakció esetén a második lépésben a préda kötése által okozott vastagodás. Precíz koncentrációértékekkel, megfelelő alapvonal és negatív kontroll mérésekkel az interakció disszociációs állandója (Kd) meghatározható.

A BLI méréseket egy FortéBio BLItz™ Protein Detection System eszközzel végeztem. A mérések során a fehérje- és puffermintákat 250 ul térfogatban, fekete falú, 0,5 ml-es csövekben adagoltam a szenzorokhoz. A kíesérletek előtt minden Sartorius Ni-NTA bioszenzort kinetikai pufferben hidratáltam (50 mM NaPi, 20 mM NaCl, pH 6,0 + 20 mM imidazol, 0,1% BSA, 0,02% Tween 20, 0,02% NaN3) 25°C-on 10 percig. A puffereket, a csali- és a ligandumoldatokat a mérések előtt szobahőmérsékletre

ekvilibráltam. A 6xHis-GKAP-DYL fehérjét immobilizáltam a bioszenzor felületére 5 µg/ml koncentrációban, kinetikai pufferben 90 másodpercig. Ezután hátteret vettem fel kinetikai pufferben, 30 másodpercig. Az LC8 dimerek asszociációs és disszociációs szenzorgramját 3,125 uM és 50 uM közötti koncentráció értékekkel vettem fel, kinetikai pufferben, mindegyiket 90 másodperces inkubálási idővel. A Kd értéket (egyensúlyi disszociációs állandót) a mért görbék alapján az eszközhöz tartozó analízis szoftver segítségével határoztam meg, globális illesztéssel. A görbéket negatív kontroll mérésekkel korrigáltam (0 mM hozzáadott ligandummal). Az aspecifikus kötődés ellenőrzéséhez ugyanezeket a lépéseket végeztem az első kivételével: nem adtam hozzá a csali 6xHis-GKAP-DYL fehérjét az immobilizálás lépésekor. Az aspecifikus kötődéshez tartozó negatív kontroll mérést üres kinetikai pufferrel végeztem.

GKAP-Ct43 és Shank1-PDZ esetén Jessica Amy Li és Varga Soma végezték a méréseket, a fent leírt protokollhoz hasonló eljárással.

A GKAP-Ct43 fehérjemolekulákat His-tag címkével 200 nM koncentrációban rögzítették az NTA-érzékelőkhöz csalinak, és a Shank1-PDZ konstukciót 4, 2, 1 és 0,5 uM koncentrációban ligandumként adták hozzá. A kinetikai mérések protokollja a következő volt: 30 másodperc alapvonal felvétel, 120 másodperc *loading* (a csali fehérje szenzorhoz kötése), 30 másodperc alapvonal mérés, 60 másodperc asszociáció, végül 60 másodperc disszociáció. A kinetikai puffer összetétele 50 mM NaPi, pH 7,4, 20 mM NaCl, 20 mM imidazol, 0,1% BSA és 0,02% Tween20 volt. A puffereket, a csali- és a ligandumoldatokat a mérések előtt szobahőmérsékletre ekvilibrálták. Fontos megjegyezni, hogy a BLItz műszer hőmérséklet-szabályozása nem lehetséges, ezért a különböző mérések között maximum 3 °C hőmérsékletkülönbség léphet fel. Kontrollmérések a következők voltak: (1) a *loading* során csali helyett kinetikai puffert adtak hozzá, majd megmérték az asszociációt a Shank1-PDZ-vel, hogy megfigyeljék a Shank nem specifikus kötődését a szenzorhoz; (2) kinetikus puffert alkalmaztak az asszociációs fázisban (Shank-PDZ fehérje nélkül), hogy az alapvonalat felvehessék. Az adatok értékelése során a háttérgörbét kivonták a mért görbékből. A disszociációs állandót (Kd) három független mérés átlagaként számították, amelyeket a BLI kinetikai görbékből határoztak meg az eszköz kezelő szoftverének globális illesztési módszerével.

3.5 Fehérjék szerkezetvizsgálata NMR méréssel, szabad és kötött formában

Az NMR méréseket a GKAP-DYL konstrukció esetében 0,06-0,5 mM töménységű, a GKAP-Ct43 konstrukció esetében 0,3 mM töménységű ^{15}N, ^{13}C izotóppal jelölt fehérjemintával végeztük 2/98% D_2O/H_2O oldatban, pH 6,0-n. A kémiai eltolódások méréséhez belső referenciaként DSS-t (4,4-dimetil-4-szilapentán-1-szulfonsav) használtunk. Minden spektrumot 298,15 K fokon mértünk egy TCI 1H/13C/15N Z-grádiens kriogenikus mérőfejjel felszerelt Bruker AVANCE III HD 800 MHz spektrométeren, Prof. Perttu Permi segítségével a finnországi Jyväskylä-i Egyetemen. Az adatokat a TopSpin szoftver 3.5.7-es verziójával gyűjtöttük és processzáltuk.

A következő spektrumokat rögzítettük és használtuk fel a jelhozzárendeléshez (asszignációhoz) a GKAP-DYL és a GKAP-Ct43 konstrukció esetében: ^{1}H-^{15}N HSQC, konstans-idejű ^{1}H-^{13}C HSQC-alifás, konstans-idejű ^{1}H-^{13}C HSQC-aromás, HNCACB, HN(CO)CACB, HNCO, HBHA(CO)NH, (H)CC(CO)NH, H(CCCO)NH [105,106] és i(HCA)CO(CA)NH [107]. A GKAP-DYL és a GKAP-Ct43 konstrukciók asszignációjához használt NMR mérések adatai a Függelék 3.A és 3.B táblázataiban olvashatók.

Az LC8 esetében a ^{1}H-^{15}N HSQC spektrum részleges főlánc asszignációja nagyrészt a BMRB: 15076 adatainak felhasználásával történt, HNCACB és HN(CO)CACB spektrumok megerősítésével. Erre azért volt szükség, hogy a ^{1}H-^{15}N HSQC titrálási spektrumot kiértékelhessem, pontosabban azonosítani tudjam a komplexképződés során eltűnő, illetve nem módosult csúcsokat, amik a szabad LC8 molekulához tartoznak, illetve amik részt vesznek az interakció kialakításában. Az irodalomban leírt asszignáció mellett az új mérésekre az eltérő körülmények (TCEP tartalmú puffer) volt szükség, ugyanis a HSQC spektrumok nem egyeztek meg az egyérteélmű azonosításhoz szükséges mértékben az irodalomban elérhetővel.

Az NMR titrálási méréseket két ^{1}H-^{15}N HSQC mérési sorozattal végeztük el; első esetben a GKAP-DYL volt jelen a komplexben izotóp jelölt formában („*forward*" titrálás), második esetben az LC8 („reverz" titrálás). A GKAP-Ct43 konstrukció esetében a *forward* titrálási mérési sorozatot mutatom be a dolgozatban (ahol a GKAP-Ct43 szakasz izotóp jelölt és a Shank1 PDZ domén jelöletlen). A reverz titrálást Sánta Anna kollégám végezte el, ahol a GKAP molekula jelöletlen, viszont a Shank1-PDZ izotóp jelölt, ezeket az eredményeket ő ismerteti szakmai cikkeiben és a doktori disszertációjában. A titrálási NMR spektrumok adatai a Függelék 4.A, 4.B és 4.C táblázataiban láthatók.

A kémiai eltolódás asszignációhoz a CCPNmr Analysis v3.1 szoftvert, a kiértékeléshez pedig Microsoft Excel programot használtam.

A másodlagos kémiai eltolódási értékek kiszámításához sokféle *random coil* kémiai eltolódás lista elérhető a szakirodalomban, melyek más eredményt adhatnak ezáltal eltérő másodlagos szerkezeti preferenciákra utalhatnak [101,108]. A modernebb adathalmazokban (melyeket az elmúlt 20 évben publikáltak) korrigált értékek szerepelnek, szekvenciára (szomszédsági adatokra), hőmérsékletre és/vagy pH-ra korrigálva kérhetünk le számított *random coil* kémiai eltolódás adatsorokat. A dolgozat készítésének idején nem volt elérhető az ncIDP és a Prosecco adathalmaz [109,110], így az ncIDP frissebb verzióját, a POTENCI-t és a másik elérhető, rendezetlen fehérjékre alkalmazható adatsort használtam fel, amit Kjaergaard és Poulsen közölt le [111,112]. A lehetőségek közül rendezetlen fehérjék esetében leginkább ajánlott a szekvenciális szomszédság-, hőmérséklet- és pH-korrigált *random coil* kémiai eltolódásokat tartalmazó POTENCI listája [111].

Szintén másodlagos szerkezeti preferenciák elemzéséhez használatm a CheSPI [113] szoftvert, a C', Cα, Cß, N és HN kémiai eltolódásokat alapul véve.

A kémiai eltolódás perturbáció számításokhoz a következő képletet használtam:

$$\Delta ppm = \sqrt{(\Delta\delta_{HN})^2 + (\Delta\delta_N \times \alpha)^2}$$

ahol α = 0,14 [114].

3.6 Számításos és szoftveres módszerek alkalmazása

A számítógépes módszerekkel végzett számításokat Dr. Kálmán Zsófia E., Dr. Gáspári Zoltán és Dr. Dobson László végezte. Az eredmények ismertetése és a diszkusszió szempontjából releváns számításos eljárásokat mutatom be. A szövegben T/1 megfogalmazással jelzem, amely lépések kivitelezésében én is részt vettem.

A kezdeti modellépítéshez a PDB: 2XQQ kódú LC8 dimer szerkezet [63] szolgált templátként. A hosszú rendezetlen szakaszokat DIPEND [115] és MODELLER [116,117] segítségével modellezték (Chimera programból meghívva). A molekuladinamikai (MD) szimuláció előtt a szerkezeteket a FoldX programmal tették teljesé (pl. hiányzó atomok pótlására volt szükség).

A számításokat a Komondor szuperszámítógépen végezték. A modelleket GROMACS [118,119] segítségével szimulálták, explicit oldószerben (spc216.gro oldszer modellel) végzett klasszikus molekuladinamikai számításokkal. Az AMBER99SB-ILDN fehérje erőteret használták; a szimulációs doboz beállításához a molekulától vett

minimális távolság 1 nm volt. A kezdeti modellből kiindulva a konformációs tér jobb feltérképezéséhez öt párhuzamos 200 ns futtatást hajtottak végre, eltérő véletlenszerű kezdeti sebességeloszlásból indítva (md_200_1, md_200_2, md_200_3, md_200_4, md_200_5).

A Colabfold komplex modellező beállításával, az AlphaFold2 segítségével előállítottunk további öt modellt [120]. A generált modellekre szintén 200 ns molekuladinamikai szimulációt futtatak a fenti beállításokkal (AF1, AF2, AF3, AF4, AF5). Így összesen tíz, egyenként 200 ns hosszú futást készítettek, ezekből 10 x 20 000 szerkezeti modellt elemeztünk.

Az MD által generált modellek elemzése során a másodlagos szerkezetet a DSSP, illetve a DSSPcont program segítségével jósolták meg [121–123]. Az egyes aminosavakhoz tartozó oldószer által hozzáférhető felszínt is a DSSP kimenetek alapján számították ki. A girációs sugarat (*radius of gyration*) egy saját Python nyelvű szkript segítségével számították ki. A φ/ψ szögeket minden modell esetében az UCSF Chimera phipsi.py szkriptjével számították ki, majd egy saját szkript segítségével elemezték. Minden egyéb számításhoz és fájlformázáshoz a csoportunk által írt Python 3 kódokat használtak. A *coiled coil* predikciót a wagga-wagga webszerver [124] segítségével végezték. A legreprezentatívabb peptidet („*mean structure*”) a Molmol program [125] segítségével konstruálták meg.

Az aminosav-aminosav interakciókat a Voronota eljárás [126] segítségével elemezték, amelyből megkapták az átlagos aminosavtávolságokat. Vizualizációhoz a ChimeraX, a Weblogo és a Jalview [66,73,127] programokat használtuk.

4 Eredmények

Munkám során sikeresen előállítottam a posztszinaptikus denzitásban részt vevő GKAP két különálló, predikció alapján rendezetlen szegmensét (GKAP-DYL és GKAP-Ct43), nem csak jelöletlen formában, hanem NMR mérés elvégzéséhez szükséges tisztaságban és töménységben, ^{13}C-, ^{15}N-izotóppal jelölt formában is. Ahhoz, hogy szabad és komplexált formában is vizsgálatokat végezhessek, előállítottam a partner fehérjékeket is, a dinein könnyű lánc (LC8) fehérjét, valamint a Shank1 fehérje PDZ doménjét, előbbit ^{13}C-, ^{15}N-izotóppal jelölt formában is. Az előállított fehérjeszakaszok funkcionalitását többféle biokémiai módszerrel jellemeztem, de munkám fő fókuszában mindvégig a szerkezeti karakterizálás állt, elsősorban NMR spektroszkópiás mérésekkel, kiegészítve molekuladinamikai számításokkal. Az alábbi fejezetekben lépésről lépésre bemutatom az elért eredményeimet, amiket két folyóirat cikkben tettem közzé [128,129].

4.1 GKAP-DYL előállítása és tisztítása

Kidolgoztam és optimalizáltam a GKAP fehérje dinein kötő régiójának tisztítási protokollját, hogy a minta tulajdonságai minél jobb jel/zaj arány elérését tegyék lehetővé magasabb dimenziójú NMR mérések során. Rendezetlen fehérjék NMR mérésre való előállítása sok optimalizálást igénylő, hosszadalmas folyamat. Egyedi jellegzetességek (hátrányok, de olykor előnyök is lehetnek) például az IDP-k különös érzékenysége proteolitikus hasításra, denaturáló körülmények használatának lehetősége (a *refolding*, azaz helyes feltekeredés nem olyan komplex feladat, mint globuláris fehérjék esetén), vagy az IDP-k kvantifikálásának problematikája.

Önmagában kihívást jelent az NMR minták előállítása során a megfelelő mennyiségű fehérje termeltetése *E. coliban*, hiszen az NMR-hez szükséges, megközelítőleg 100%-os izotóp jelölést M9 minimál médiumban, kizárólagos ^{15}N-izotóp jelölt nitrogénforrás használatával lehet elérni. M9 minimál médiumban viszont a sejtek vitalitása nem ugyanolyan jó, mint LB médiumban, emiatt lassabban osztódnak, ugyanolyan térfogatú kultúrával kisebb sejtszámú populáció tenyészthető, és indukciót követően a fehérjetermelés hozama is jelentősen alacsonyabb lesz, mint jelöletlen kultúra esetén. Az NMR spektroszkópia viszonylag alacsony érzékenységű eljárás, ami azt jelenti, hogy relatív nagy mennyiségű, milligram/tized milligram nagyságrendű fehérje előállítására van szükség, amihez viszonylag nagy térfogatú jelölt minimál médiumos kultúrával kell dolgozni.

Az IDP/IDR szekvenciák nagyobb hajlamot mutatnak proteázok általi emésztésre, mint a globuláris fehérjék. Többféle megközelítést leírtak már a szakirodalomban, amivel ez a nehézség kiküszöbölhető [130–132]. Az általam alkalmazott tisztítási protokoll lényeges eleme, hogy szonikálás után azonnal következik a denaturálószerrel való szolubilizálás, illetve hogy jégen dolgoztam, aminek köszönhetően a bakteriális proteázok működőképessége jelentősen mérséklődik.

Rekombináns IDP/IDR szakaszok expressziója során a sejtek gyakran zárványtestekbe (*inclusion body*, inklúziós test) zárják a fehérjéket [133–135], hiszen az eukarióta fehérjék idegenek a prokarióta citoplazmatikus környezetben. Emellett sok fehérje hajlamos aggregációra [136]. Bár kontraintuitívnak tűnhet, hogy a tipikusan poláris vagy töltéssel rendelkező fehérjeszakaszok hajlamosak vízben oldhatatlan aggregátumokat képezni, mégis leírták ezt a jelenséget, ami az IDP-k fehérje-fehérje interakcióra való megnövekedett hajlandóságával van összefüggésben. Sok IDP könnyen alakít ki hidrogénkötéseket, és a töltéssel rendelkező oldalláncok hozzájárulhatnak elektrosztatikus interakciók kialakulásához, valamint az entropikus hatások is hozzájárulhatnak a gyakori IDP aggregációhoz [136–138]. Ebben az esetben oldékonyságot növelő adalékanyagok alkalmazása segíthet újra oldatba vinni a fehérjéket, valamint feloldani az inklúziós testeket. A guanidin hidroklorid (Gdn HCl) ideális denaturáló ágens, amivel nekem is sikerült oldatba vinni a zárványtestekből a GKAP-DYL konstrukciót. Minimális mértékben lép interakcióra bármilyen fehérjével, és kompatibilis a fémion-affinitás kromatográfiás módszerekkel, például az IMAC Ni-ion affinitás kromatográfiával is, amit én használtam a 6xHis-taggel jelölt konstrukció esetében [134]. A Gdn HCl használatának hátránya, hogy nem kompatibilis SDS-PAGE futtatással, így azokat a mintákat csak korlátozottan tudtam ellenőrizni gélelektroforézissel, amelyeket 6 M Gdn HCl oldattal denaturáltam. Bár rendezetlen fehérjék esetében abban az értelemben nincs szükség szerkezetet helyreállító (*refolding*, feltekeredés) lépésre, mint a globuláris fehérjék esetében lenne, mégis a natív körülmények helyreállítására szükség van; egyrészt azért, hogy a fiziológiás körülményeknek megfelelő környezetben vizsgáljuk az adott IDP-t is, másrészt pedig mert a GKAP partnerei globulárisak, az LC8 dimer és a Shank1-PDZ domén is natív körülmények között, denaturálószermentes pufferben tudja ellátni funkcióját.

Az IDP-k specifkus tulajdonságaik miatt (nagy hidrodinamikai rádiusz, specifikus aminosav összetétel) a hasonló méretű globuláris fehérjéktől eltérő mobilitást mutatnak a méretkizárásos kromatográfiás oszlopon illetve az SDS gélelektroforézis során is. Ezek a jellegzetességek a tisztítási protokollt is befolyásolják, viszont mivel a vizsgált fehérjeszakaszok ezekből levonható tulajdonságai az eredményeim részét

képezik, ezért a SEC és SDS-PAGE kísérleti eredményeimet a következő fejezetekben ismertetem.

További jelentős kihívás a rendezetlen fehérjék kvantifikálása. A leggyakrabban alkalmazott fehérje mennyiségi meghatározásra szolgáló technika alapja az aromás oldalláncok jelenléte (ez a 280 nm abszorbancia alapú mérés), viszont az IDP-k gyakran kevés aromás oldalláncú aminosavat tartalmaznak, vagy akár egyet sem. Emiatt az abszorpció 214 vagy 220 nm-en monitorozható, ahol a peptidkötés jel látható, de ebben a tartományban ad jelet sokféle puffer adalékanyag is, így az ezen hullámhosszon mért abszorpcióval nem adható meg megbízhatóan egy adott fehérjeminta koncentrációja [139]. Más bevett módszerek egy-egy előre meghatározott töménységű ún. standard sorhoz hasonlítják a vizsgált molekula mennyiségét, viszont ezek a viszonyítási alapul szolgáló standard-ek szinte minden esetben globuláris fehérjék, amik jelentős mértékben eltérően viselkedhetnek, így nem használhatóak megbízhatóan IDP-k/IDR-ek esetében (ilyenek a Bradford, BCA vagy Lowry tesztek) [139,140].

Egy tanulmány szerzői összehasonlították a különböző módszereket rendezett és rendezetlen fehérjék esetében, és azt találták, hogy a Bradford és a BCA esszé a globuláris fehérjék körében 30% pontosságú, míg rendezetlen fehérjéknél 60, vagy akár 80%-ban is eltérhet a várt értéktől [137,140]. Munkám során a Qubit™ Protein Assay kit-et választottam, aminek az előbb említett tanulmány szerint megfelelő a reprodukáhatósága rendezetlen fehérjék esetén is.

Az NMR méréshez szükséges magas koncentrációjú GKAP-DYL fehérje oldat előállítása nagy kihívást jelentett, ez a nehézség szintén gyakran felmerül az IDP-k/IDR-ek esetén [141]. Dialízissel nagy aggregációs hajlamot mutatott ez a konstrukció, centrifuga szűrővel pedig hajlamos volt kitapadni a szűrőhöz, így ez az eljárás nagy anyagveszteséget okozott. Mindenesetre sikerült 500 µM koncentrációjú mintát készítenem, ami alkalmasnak bizonyult a teljes főlánc asszignációhoz, valamint a részleges oldallánc asszignációhoz szükséges NMR mérések elvégzésére [128].

4.2 A GKAP-DYL szegmens és az LC8 dimer funkcionális jellemzése szabad formában: fizikokémiai vizsgálatok és NMR spektroszkópia

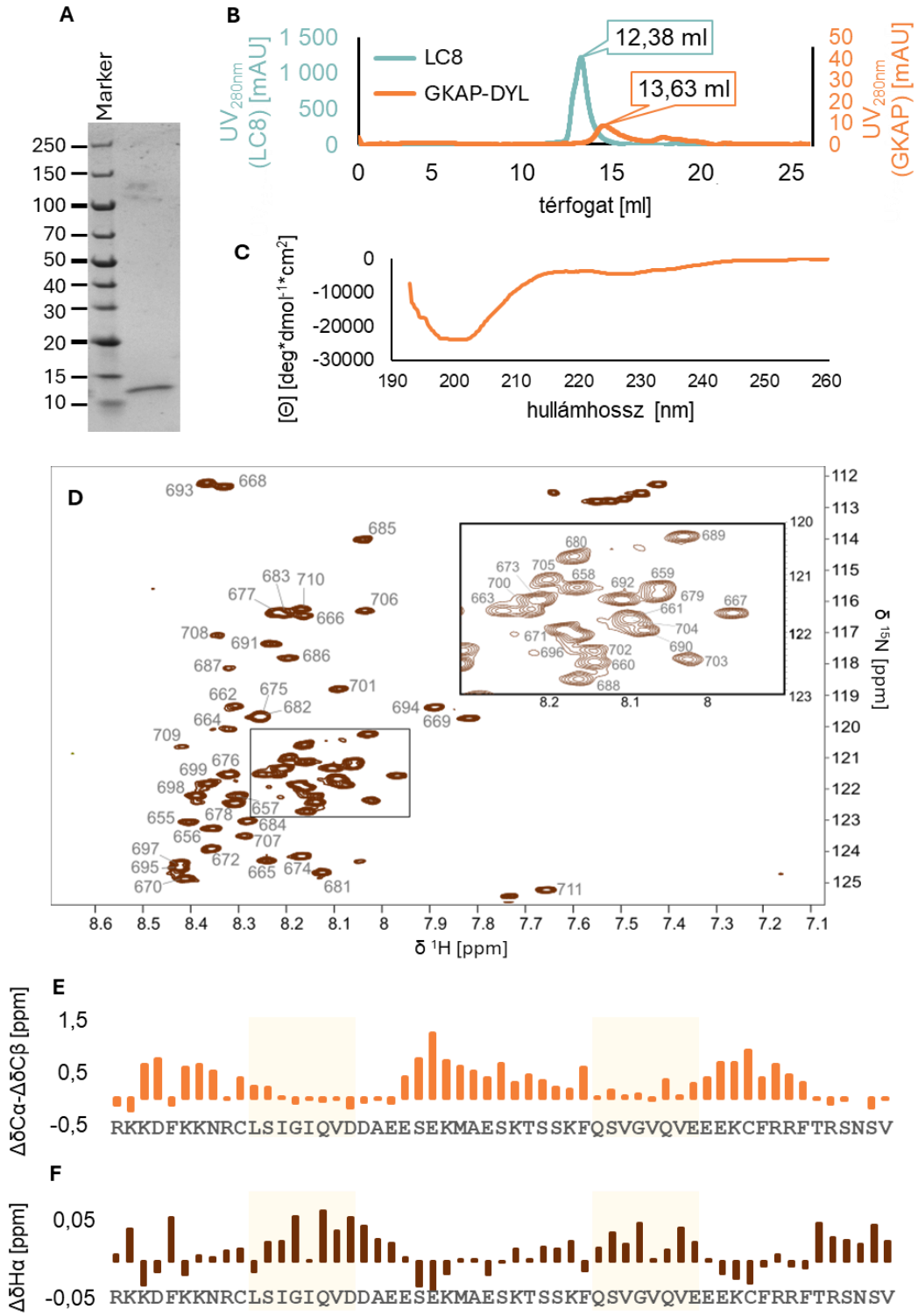
4.2.1 Fizikokémiai vizsgálatok

A GKAP-DYL rekombináns fehérjekonstrukció egy tipikus funkcionálisan rendezetlen fehérje tulajdonságait mutatja, azaz relatív nagy hidrodinamikai dimenzió és rendezett másodlagos szerkezeti elemek alacsony aránya jellemzi [128].

A konstrukció aminosavszekvencia alapján számított molekulatömege (M_r) 7 kDa (7014,88 Da). Denaturált állapotban, SDS-poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) futtatás során a fehérje a vártnál lassabban migrál a gélben, az ennek megfelelő látszólagos molekulatömege a kalibrációs sor alapján 13 kDa-nak becsülhető (ld. 15.A ábra).

Natív körülmények között az analitikai méretkizárásos kromatográfiás (SEC) oszlopon futtatás szintén megerősítette, hogy a GKAP-DYL konstrukció hidrodinamikai dimenziói nagyobbak, mint amit egy feltekeredett globuláris fehérje esetében várunk. A megfigyelt retenciós térfogat alapján a mért és az elméleti molekulatömeg egymáshoz viszonyított aránya 1,56, ami teljesen kitekeredett állapotnak felel meg [104] (ld. 15.B ábra).

A szabad formájú konstrukció CD spektruma is megerősítette, hogy rendezetlen: a spektrumnak két minimuma van, 200 és 225 nm hullámhosszoknál, valamint nincs pozitív előjelű része, ami rendezetlen fehérjékre jellemző [142–144] (ld. 15.C ábra).



15.ábra: A GKAP dinein kötő régiójának kísérletes jellemzése szabad formában. Mindegyik eredmény azt támasztja alá, hogy a GKAP-DYL szakasz rendezetlen. (A) SDS-PAGE futtatás, amin a GKAP-DYL lassabban migrál a vártnál, 13 kDa tömegűnek látszódik 7 kDa helyett. (B) Analitikai méretkizárásos kromatográfiás

mérés során a kromatogramon nagyobb hidrodinamikai dimenziójúnak látszik a GKAP-DYL mint egy hasonló tömegű, globuláris fehérje esetében várnánk (mint például az LC8). (C) A GKAP-DYL távoli UV CD spektruma is megerősíti, hogy a fehérjeszakasz rendezetlen. (D) A GKAP-DYL szakasz ^{1}H-^{15}N HSQC spektrumán kis jeldiszperzió látható. (E, F) A Cα-Cβ, illetve Hα másodlagos kémiai eltolódások szintén a fehérje rendezeltenségét mutatják, igen enyhe másodlagos szerkezeti preferenciákkal. A két kötőmotívumot világos sárga színnel kiemeltem.

4.2.2 A GKAP-DYL szabad forma NMR eredményei

Elvégeztem a GKAP dinein kötő régiónak a teljes főlánc és részleges oldallánc asszignációját (az N, HN, C', Cα, Cβ, Hα és Hβ atomok 100%-át, a Cγ és Hγ atomok 52% illetve 61%-át rendeltem hozzá sikeresen) szabad formában (az adatsor BMRB azonosítója: 52712) [128]. A szabad állapotú fehérjében mindkét cisztein (C664 és C701) Cβ kémiai eltolódása 27,9 ppm volt, ami megfelel a TCEP hozzáadásával beállított redukáló körülményeknek. Szabad formában az ^{1}H-^{15}N HSQC spektrum jeldiszperziója ~1,2 ppm a ^{1}H és ~13 ppm a ^{15}N dimenzióban (ld. 15.D ábra).

A szekvenciális szomszédság-, hőmérséklet- és pH-korrigált másodlagos kémiai eltolódás értékek a Cα-Cβ atomokra -0,2 és +1,2 ppm, Hα atomokra -0,2 és +0,6 ppm közöttiek. Ezek a megállapítások megerősítik, hogy a GKAP-DYL konstrukció teljes hosszúságában funkcionálisan rendezetlen. A Cα-Cβ atomok másodlagos kémiai eltolódásában számolt különbség enyhe fokú nyújtott konformációs preferenciát mutat az első kötő motívum esetében (667-674 aminosavak), és változatos helikális szerkezeti preferenciát a kötő motívumok környező szakaszain (656-665, 675-688 és 696-704 aminosavak) (ld. 15.E,F ábra).

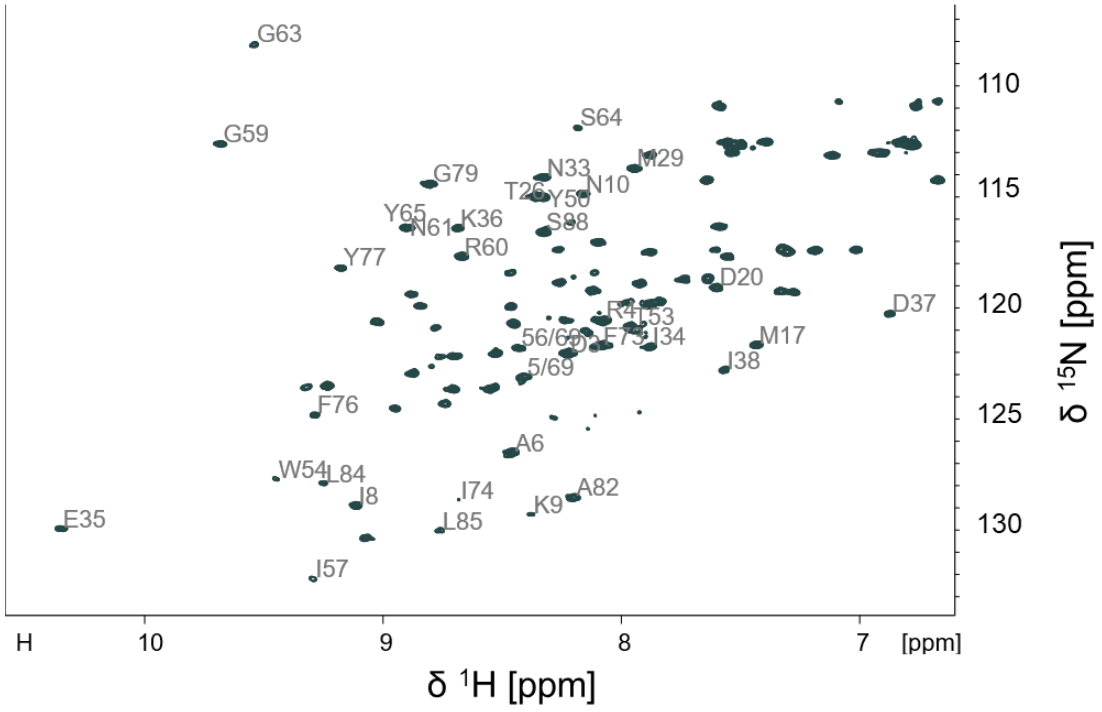
A CheSPI szoftveres analízis szintén igazolja, hogy elsősorban rendezetlen a konstrukció, nem mutat erős preferenciát semelyik másodlagos szerkezeti elem kialakulásának irányába sem (C', Cα, Cβ, N és HN kémiai eltolódások alapján).

4.2.3 Az LC8 molekula előállítása és NMR vizsgálata önmagában

Az LC8 dimer előállítása és tisztítása során nem volt szükség hosszadalmas optimalizálásra, egyrészt mert a protokoll már rendelkezésemre állt, másrészt pedig a globuláris, viszonylag kis méretű (~ 10 kDa monomerként, ~ 20 kDa dimerként) molekula könnyen oldatban tartható és jól töményíthető. Egy olyan tulajdonsága van,

amire különös tekintettel kellett lennem: a benne található ciszteinekhez kovalensen tud kapcsolódni a béta-merkaptoetanol és a DTT redukálószer is, ezért ezek használata nem megengedett – TCEP-et kellett tehát használnom amikor a fiziológiai relevanciájú redukáló körülményeken szerettem volna elvégezni a szerkezeti és funkcionális vizsgálatokat.

Elvégeztem a dinein könnyű lánc fehérje részleges főlánc asszignációját redukáló körülmények között. Bár a BMRB-ben több LC8 kémiai eltolódás adatsor is rendelkezésre áll, egyik mérés sem TCEP tartalmú pufferben történt. Emiatt olyan mértékű különbözőségek láthatóak a spektrumok között, ami lehetetlenné tette a titrálásban érintett csúcsok azonosítását. Ezért tehát asszignációhoz szükséges HNCACB és HNCOCACB spektrumok felvételére is sor került, ami alapján azonosítani tudtam azon csúcsok egy részét, amik a szakirodalmi jelhozzárendelésből nem azonosíthatók egyértelműen. Az LC8 fehérje szabad formában mért ^{1}H-^{15}N HSQC spektruma a 16. ábrán látható.

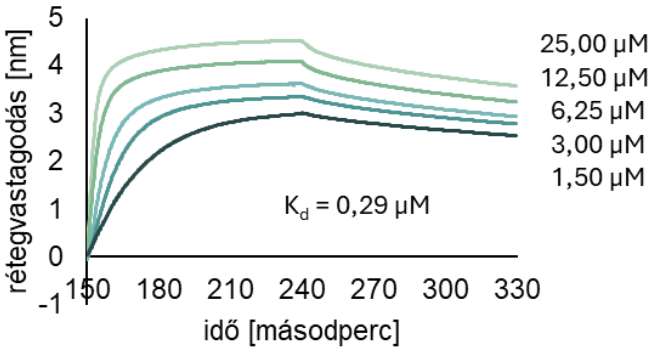


16. ábra: A szabad formájú LC8 dimer ^{1}H-^{15}N HSQC spektruma TCEP redukákószer jelenlétében, részleges főlánc asszignációval.

4.3 A GKAP-DYL + LC8 komplex jellemzése, szerkezeti vizsgálata

4.3.1 A komplex jellemzése biokémiai módszerekkel

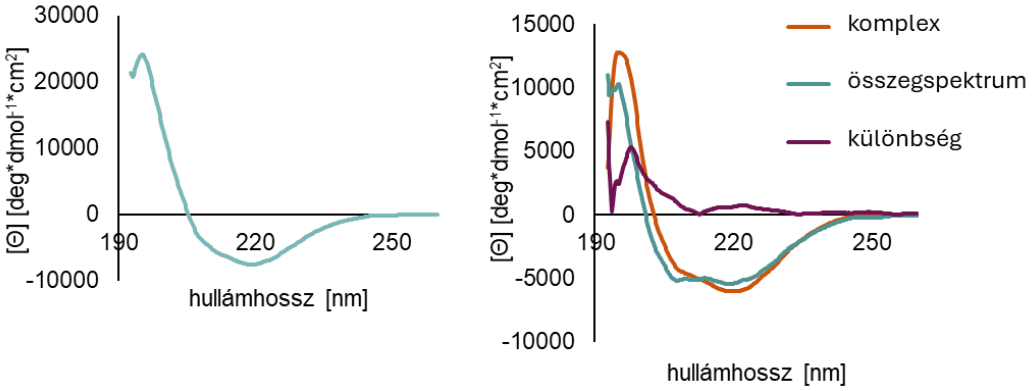
Bioréteg interferometria (BLI) méréssel igazoltam, hogy a GKAP fehérje dinein kötő régióján egyidejűleg mindkét kötő motívumhoz képes LC8 partnerfehérje kötődni. A GKAP-DYL és az LC8 kölcsönhatása pszeudo-elsőrendű kötődési kinetikát követ, egyetlen átmenettel (ld. 17. ábra). A K_d disszociációs állandó 0,29 uM (R^2 = 0,9779). Ez alapján relatív erős interakció lép fel a két molekula között, összevetve az LC8 dimer és az nNOS peptid kölcsönhatásával (5,41+/- 0,15 µM ITC, izotermális titrálási kalorimetria módszerrel mérve), aminek szintén nem kanonikus LC8 kötőmotívuma van (`IQV` szekvenciával `TQT` központi motívum helyett). Az asszociációs sebességi konstans (k_a) 8800 ± 83 $M^{-1}s^{-1}$, a disszociációs sebességi konstans (k_d) 2,5 $\cdot 10^{-3}$ ± 4,3 $\cdot 10^{-5}$ s^{-1}.



17. ábra: Bioréteg interferometria kinetikai mérési eredmény a GKAP-DYL + LC8 interakcióról.

A DLS mérési eredményeim megerősítik, hogy egy nagyrészt homogén frakció alakul ki a GKAP:LC8 1:1 sztöchimetriájú elegyében. A becsült hidrodinamikai átmérő ~5 nm, nagyobb, mint a szabad formájú GKAP-DYL szegmens (~1-4 nm) és a ligandum nélküli LC8 dimer (~3-4 nm) DLS-sel becsült átmérője. A becsült 5 nm-es átmérő megfeleltethető a 2 GKAP-DYL + 2 LC8 dimer összekapcsolódásával kialakuló, 56,6 kDa molekulasúlyú vegyes hexamer átmerőjének.

A GKAP:LC8 komplex CD spektruma csak kis mértékben tér el az önállóan mért egyedi spektrumok összegétől, ami azt jelzi, hogy az interakció során az LC8 dimer szerkezete nem változik meg jelentős mértékben. A GKAP dinein kötő régió és az LC8 fehérje komplexének kialakulása során a másodlagos szerkezeti elemek arányában lényegi változás nem történik – konzisztensen azzal, hogy az interakció kialakul, de nem jár jelentős fehérjeszerkezeti változással (ld. 18. ábra).

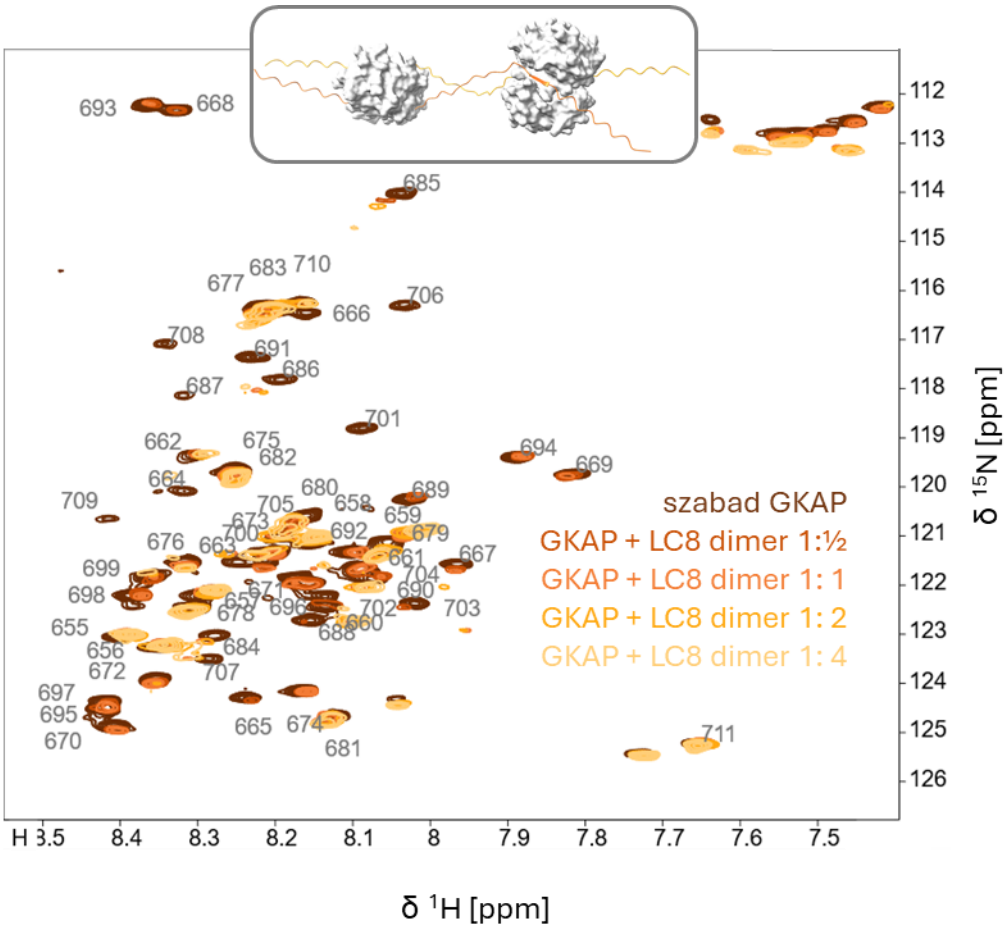


18. ábra: A dinein könnyű lánc távoli UV CD spektruma megfelel a szakirodalomban leírt spektrumnak. A komplex spektruma és a két szabad forma spektrumának összegspektruma között van eltérés, de nem jelentős, ami azt mutatja hogy nagymértékű másodlagos szerkezeti átrendeződés nem történik.

4.3.2 GKAP-DYL szerkezeti modell szabad formában és LC8-cal komplexben – NMR vizsgálati eredmények kiegészítve molekuladinamikai számításokkal

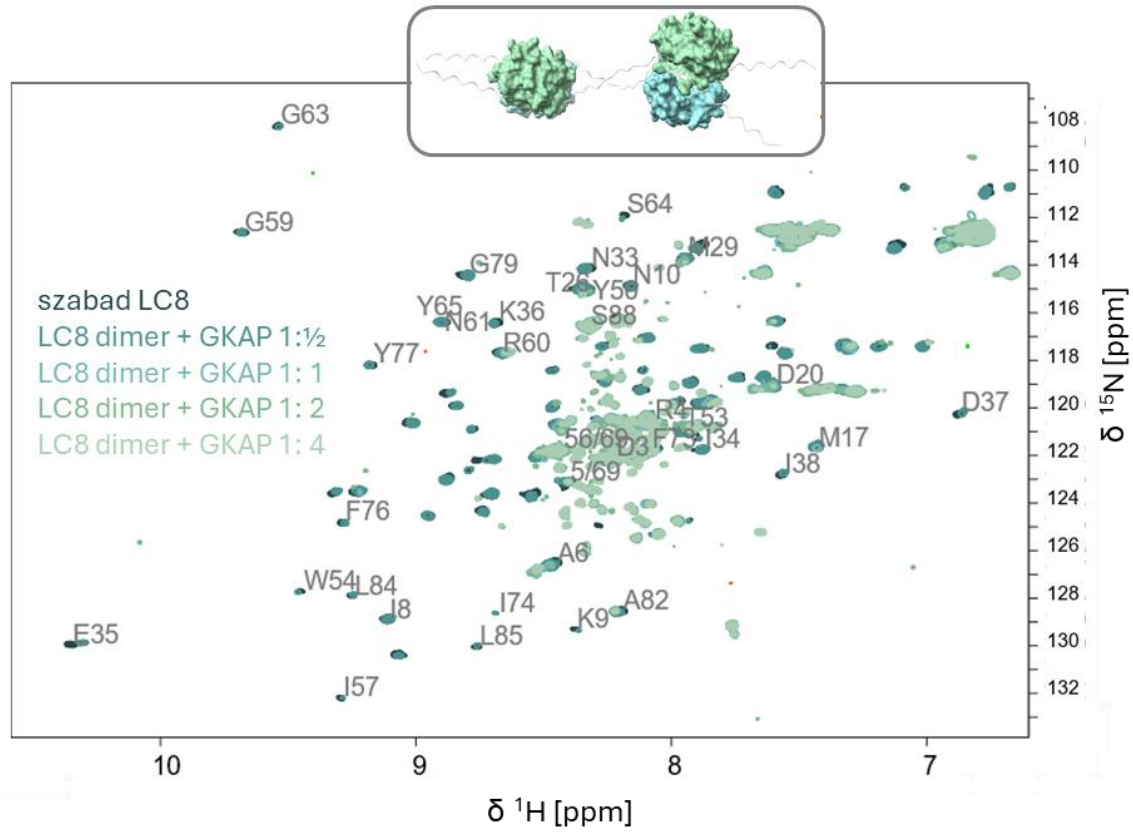
A komplex NMR-spektroszkópiai vizsgálatát kétféle módon is elvégeztük. A közleményünkben „*forward*" titrálásnak hívott elrendezésben a ^{13}C, ^{15}N-jelölt GKAP-DYL molekulát jelöletlen LC8-cal titráltuk, míg a „reverz" kísérletben duplán jelölt LC8 molekulát és jelöletlen GKAP konstrukciót titráltunk. A *forward* titrálás során bebizonyosodott, hogy mindkét kötőhely érintett az interakció során. A titrálási pontokban ^{1}H-^{15}N HSQC méréseket végeztünk, ezekben a GKAP:LC8 molekulák egymáshoz viszonyított aránya 1:½, 1:1, 1:2, 1:4 volt (ha az LC8 molekulát dimernek tekintjük) (ld. 19. ábra). Mind a két kötő motívumban találunk olyan aminosav pozíciókat, amikhez a tartozó amid N-H csúcsok egyértelműen eltűnnek a spektrumról a becsült 1:1 sztöchimetriáú hígítási pontnál (amikor 2 GKAP molekulára jut 2 LC8 dimer), és a populáció szintjén nincs nyoma heterogenitásnak.

Más szavakkal, az LC8 látszólag egyforma affinitással kötődik a két GKAP kötőhelyhez. A két utolsó titrálási pont (GKAP:LC8 dimer 1:2 és 1:4 arányban) gyakorlatilag megkülönböztethetetlen, ami arra utal, hogy a szaturációt elértük. A csúcsok limitált számából és a csúcsok pozíciójából arra következtethetünk, hogy a titrálási végpontban a minta homogén. A csúcsok megfigyelt viselkedése kétféleképp magyarázható: vagy keletkezik az oldatban egy nagy molekulatömegű *species*, vagy a nagymértékű jelkiszélesedés hátterében olyan kicserélődési események állnak, amik a µs-ms időskálán történnek. Bármelyik eset is áll fenn, a legkézenfekvőbb magyarázat az, hogy az érintett aminosavak részt vesznek olyan kölcsönhatásokban, amik LC8 hiányában nincsenek jelen a vizsgált rendszerben.

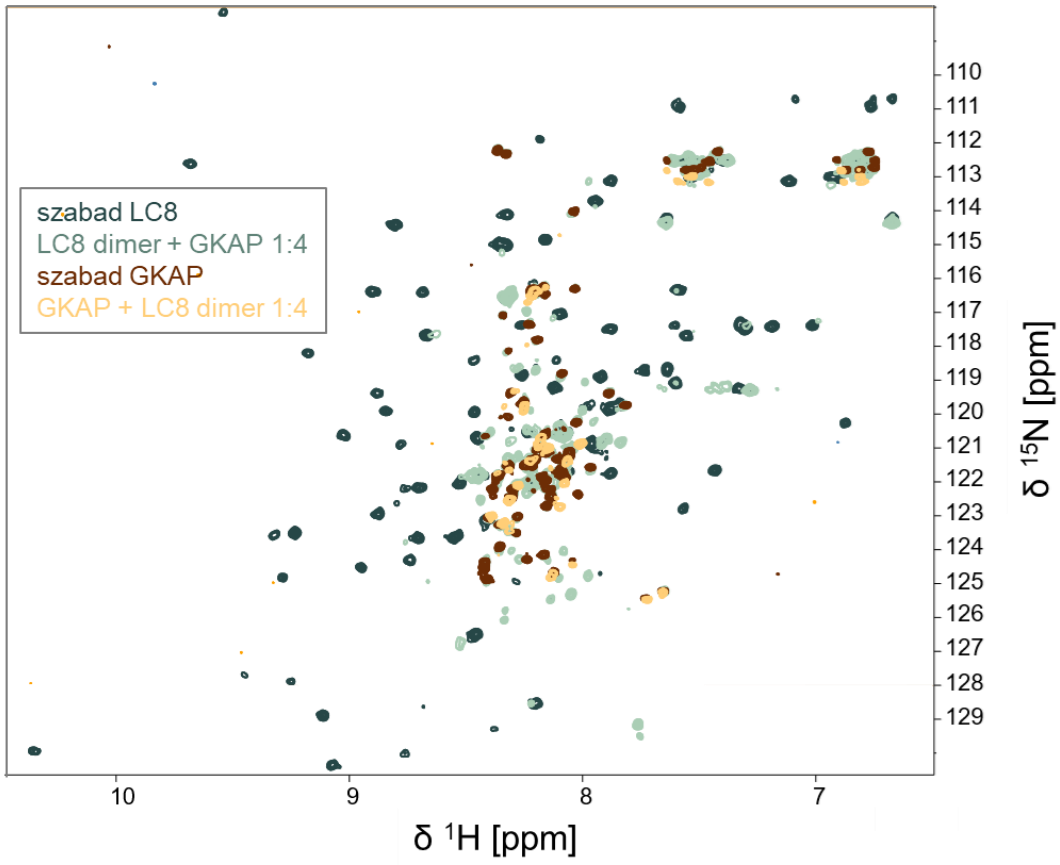


19. ábra: Jelölt GKAP-DYL + jelöletlen LC8 „forward" titrálás, ^{1}H-^{15}N HSQC spektrumok.

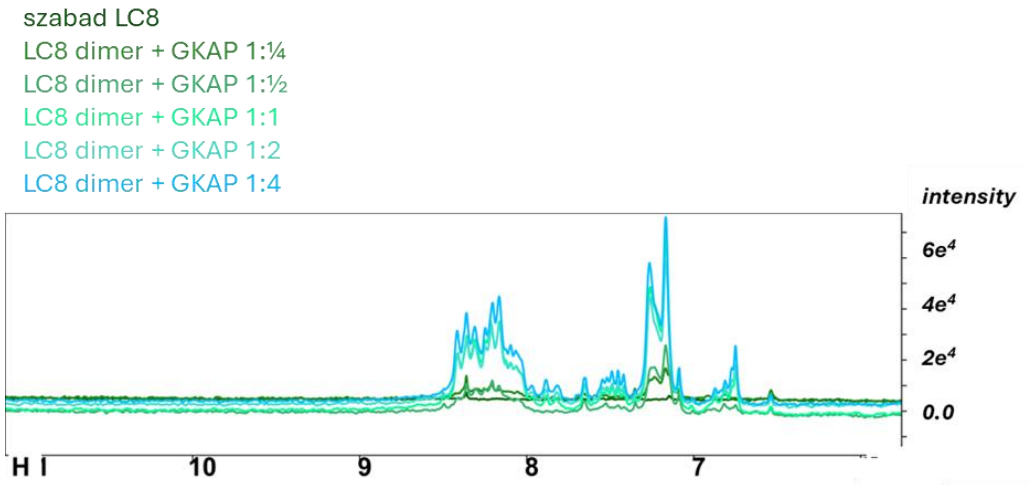
Nagyon hasonló jelenség tapasztalható a reverz titrálási mérések során, amikor ^{15}N, ^{13}C-jelölt LC8 molekula titrálását végeztük jelöletlen GKAP-DYL partnerrel (ld. a 20. ábrán). Szaturációnál jelentős mértékű változások láthatóak az LC8 ^{1}H-^{15}N HSQC spektrumában: sok amid jel eltűnik a spektrumról a GKAP koncentráció növekedésével, ebből arra következtethetünk, hogy egy nagyméretű komplex alakul ki az oldatban, ami az NMR spektrumon nem ad látható jelet. Egyértelműen eltűnnek olyan amid csúcsok a spektrumról, amelyekhez tartozó aminosavak a partnerkötésben vesznek részt: a K9, N10, E35, K36, N61, S64, Y65, F73 és Y77 aminosavak amid csúcsai [145]. 2:2 GKAP:LC8 dimer aránynál, ahol hipotetikusan az összes LC8 dimer kötött formában van, és minden további mérés esetében, ahol a GKAP feleslegben van jelen a rendszerben, a legtöbb amid jel eltűnik, ami a szabad LC8-hoz tartozik. Ezzel egyidejűleg azonban a spektrum középső (^{1}H 7,8 ppm – 8,5 ppm) régiójában sok új csúcs is megjelenik (ld. 20. ábra). A rendszert tovább vizsgáltuk érzékeny, egy éjszakán át tartó (*overnight*) ^{1}H, ^{15}N spektrumok rögzítésével, amelyekben mind a ^{15}N-jelölt LC8-hoz, mind a jelöletlen GKAP-hoz tartozó csúcsok megfigyelhetők voltak (lásd a 21. ábrán). Az utóbbi csúcsok olyan pozíciókban találhatók, amelyek megegyeznek a *forward* titrálás maradék csúcsainak pozícióival, azaz a ^{15}N-jelölt GKAP és a jelöletlen LC8 komplexének ^{1}H-^{15}N HSQC spektrumával. Ezenkívül a ^{15}N-szűrt ^{1}H spektrumok egyértelműen jelzik, hogy ezek a csúcsok a reverz titrálási kísérletekben a ^{1}H, ^{14}N csoportokból, azaz a jelöletlen GKAP-ból származnak (lásd a 22. ábrán). Ez megerősíti az LC8 ^{1}H, ^{15}N csúcsok többségének eltűnését.



20. ábra: Jelölt LC8 + jelöletlen GKAP-DYL „reverz" titrálás, ^{1}H-^{15}N HSQC spektrumok.



21. ábra: Nagy tranziens számmal futtatott (ns=128, kb. 10 óra hosszú) ^{1}H-^{15}N HSQC mérés, ahol a természetes izotóp eloszlással jelen lévő GKAP-DYL keresztcsúcsok is megjelennek.



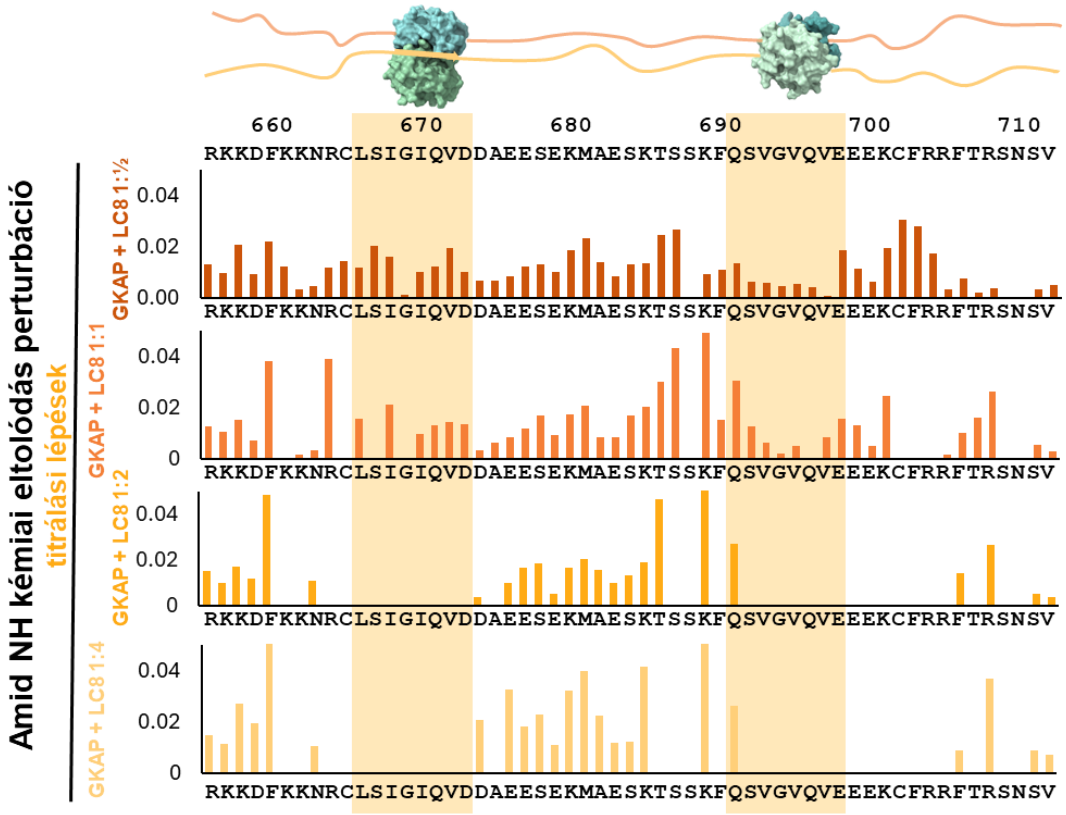
22. ábra: ^{15}N és ^{13}C szűrt 1D ^{1}H spektrumok a dupla jelölt LC8 + jelöletlen GKAP-DYL titrálási pontokban. Ezek az 1D ^{1}H spektrumok megerősítik, hogy a HSQC

spektrumon újonnan megjelenő csúcsok, amik egybeesnek a dupla jelölt GKAP-DYL HSQC spektrumán látott csúcsokkal, ezek valóban a jelöletlen GKAP-DYL molekuláról származnak.

4.3.3 A GKAP-DYL+LC8 komplex szerkezeti modelljének elemzése számításos módszerekkel, kísérletes adatokkal összevetve

A kísérletes eredmények azt támasztják alá, hogy a kialakuló komplex egy jól definiált hexamer negyedleges szerkezetet vesz fel, amiben két GKAP szegmens két LC8 dimer molekulához kapcsolódik. A komplex elemei nagy valszínűséggel a 10. ábrán (illetve E. Moutin és mtsai által bemutatott 3C ábrán [68]) látható topológiának megfelelő módon kapcsolódnak egymáshoz, ami azt jelenti, hogy egy LC8 dimer a két GKAP partnernek ugyanazon kötőhelyével (két N-terminális SLiM-mel, vagy két C-terminális SLiM-mel) alakít ki interakciót. A molekuladinamikai modellezés igazolta, hogy a két LC8 kötőhely közötti 17 aminosavas összekötő (*linker*) szakasz megengedi két LC8 dimer egyidejű kapcsolódását az egyes GKAP szegmensekhez, párhuzamos geometriai elrendezéssel. Az előállított hexamer szerkezeti modellek számolt mérete ugyanabba a mérettartományba esik, mint amit kísérletesen (DLS méréssel) meghatároztam. Az eredményeink alapján az 1:1 sztöchimetriájú komplex kialakulásának lehetőségét kizárhatjuk (ami az E. Moutin és mtsai által bemutatott 1DE ábrán 2:1 sztöchiometriának felel meg), ahol egy GKAP molekula két kötőmotívuma ugyanahhoz az LC8 dimerhez kapcsolódik, és a GKAP rendezetlen összekötő szakasza szorosan feltekeredik a dinein dimer molekula köré.

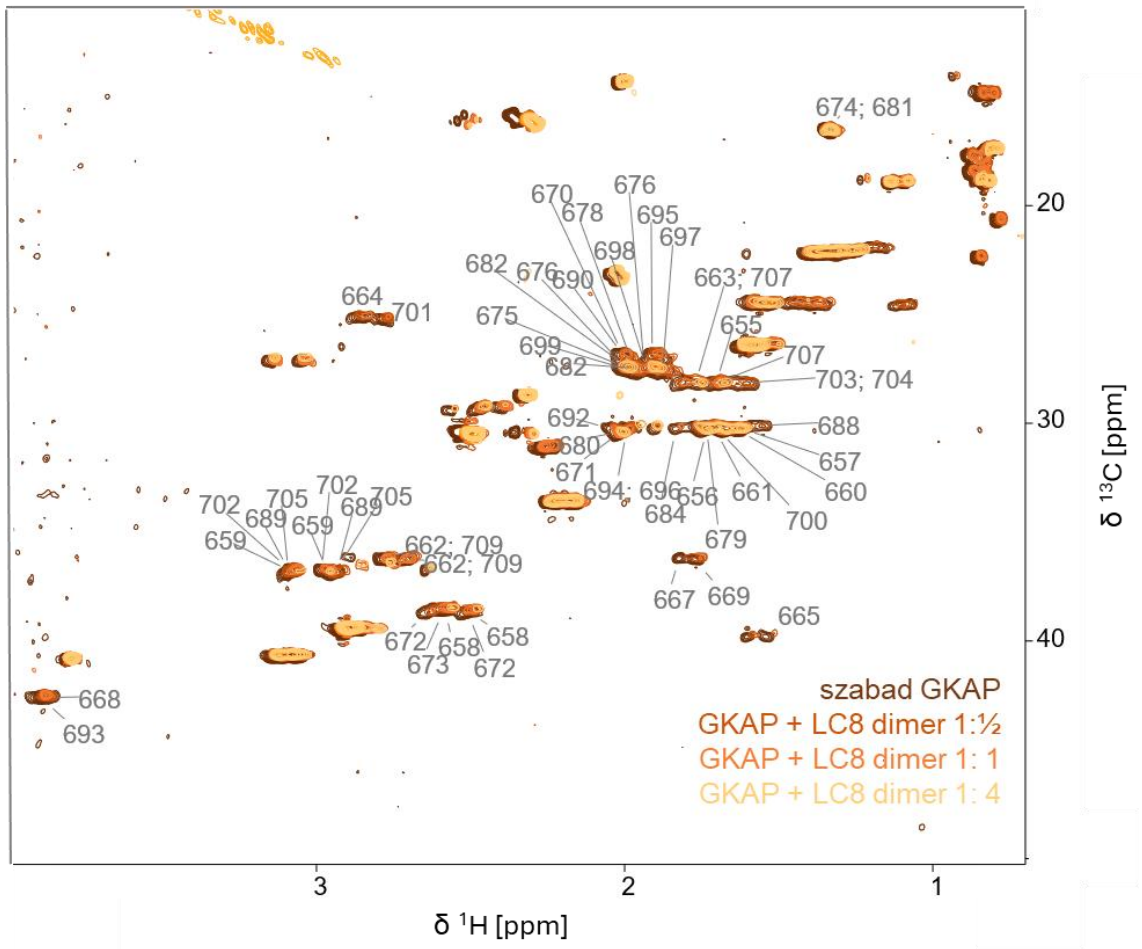
Néhány csúcs nagyjából változatlannak mutatkozik az ^{1}H-^{15}N HSQC spektrumon, az GKAP-DYL szegmens szabad és kötött állapotát összehasonlítva. Ezeknek a csúcsoknak, kémiai eltolódásoknak a nagy része a két LC8 kötő motívum közötti aminosavakhoz tartozik, ami arra enged következtetni, hogy a polipeptidlánc ezen szakasza nagyrészt megtartja rendezetlen jellegét még komplexált formában is (az N és HN kémiai eltolódás perturbáció adatok a 23. ábrán láthatók). Ennek alapján a két kötőhely közötti összekötő (*linker*) régió megtartja flexibilitását, és kémiai környezete nem változik meg jelentős mértékben a partnerkötés hatására.



23. ábra: Kémiai eltolódás perturbáció adatok a forward titrálási mérésekben.

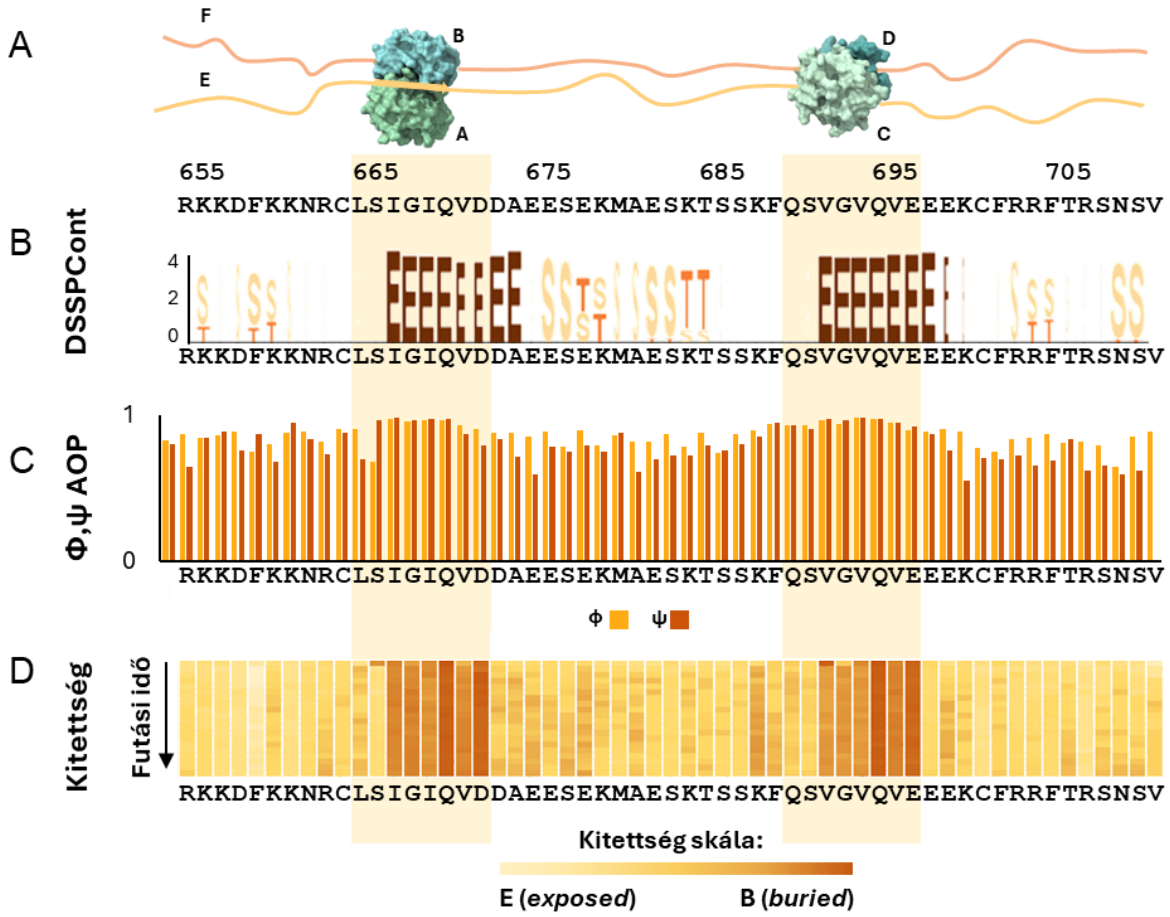
Az első, N-terminálishoz közelebb eső kötő motívum környezetében minden amid csúcs (H és NH jel) eltűnik az eredeti pozíciójából, a K_{-10}-től az A_4 pozícióban levő aminosavig, két kivétellel (ezek: N_{-8} és D_3) (a relatív aminosav számozást ld. a 8. ábrán). A második, C-terminális felőli kötő motívum környezetében minden amid csúcs eltűnik az eredeti pozíciójából, T_{-10}-től N_{14}-ig, a következő kivételektől eltekintve: K_{-7}, Q_{-5}, F_7, R_9. Habár intenzív jelátfedés és magas fokú jelátfedés jellemző az ^1H-^{13}C HSQC spektrumra (ld. 24. ábra), még így is számos aminosavhoz tartozó Cα-Hα illetve Cβ-Hβ jel eltűnése megerősíthető. A következő aminosavak kémiai környezete olyan mértékben megváltozik a kötődés hatására, hogy mind az ^1H-^{15}N HSQC, mind pedig az ^1H-^{13}C HSQC spektrumokról eltűnnek (vagy beazonosíthatatlanul elmozdulnak) a hozzájuk tartozó H-NH, Cα-Hα illetve Cβ-Hβ csúcsok: C_{-6} (664), L_{-5} (665), I_{-3} (667), G_{-2} (668), I_{-1} (669), Q_0 (670), D_2 (672) az első, F_{-6} (689), G_{-2} (693), V_{-1} (694), Q_0 (695), V_1 (696), E_4 (699), C_6 (701), R_9 (704), T_{11} (706) pedig a második kötő motívum közelében. Ezek mellett teljes bizonyossággal kijelenthető, hogy számos N-terminális közeli aminosav, illetve a kötő motívumok közötti *linker* régióban lokalizálódó aminosavak jelentős része

nagyjából ugyanolyan intenzitással, ugyanabban a pozícióban ad jelet mind a szabad, mind a kötött forma esetében (ld. 20., 23. és 24. ábra).



24. ábra: Forward titrálás, a ^{1}H-^{13}C HSQC spektrumok részlete.

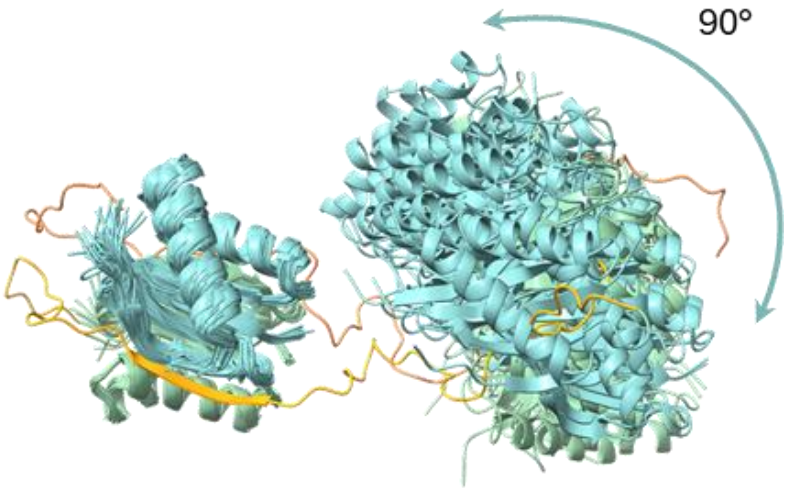
Molekuláris dinamikai (MD) szimulációk alapján kötött állapotban bár mindkét LC8 kötőhely ß-szál szerkezetet alkot (ß augmentációval köt), de különbségek is láthatók köztük, különösen ha a környező (*flanking*) régiókat is figyelembe vesszük. A DSSP eljárás [122] nem tud egyértelműen szabályos másodlagos szerkezeti elemeket hozzárendelni a kötőrégión kívüli aminosavak egy-egy definiálhat szegmenséhez (bizonyos aminosavak esetében hélixet rendel hozzá). A DSSPcont [121] eljárással végzett elemzés alapján a *linker* elsősorban rendezetlen/flexibilis szakaszként jellemezhető, azonban néhány szimulációban enyhe helikális preferencia figyelhető meg, ami összhangban van a kísérleti eredményekkel (ld. 25. ábra).



*25. ábra: Az LC8 kötött GKAP-DYL tulajdonságainak elemzése a molekuladinamikai futtatások alapján. Az ábrát Dr. Kálmán Zsófia E. készítette. A világossárga háttér kiemeli a két LC8 kötő motívumot (*LSIGIQVD *és* QSVGVQVE*) az egész ábrán. (A) Sematikus ábra az LC8 és a GKAP kötéséről, nem méretarányos. (B) DSSPCont futtatás eredményei egy futtatáson, a kötőhely eltérő viselkedésének bemutatása (E nyújtott, S hurok (loop), T fordulat (turn)). (C) A főlánc φ és ψ torziós szögeinek rendezettségi paraméterei (AOP, angular order parameter) egy kiválaszott futtatás esetében. (D) A hozzáférhetőség átlaga az 5 általunk épített modell futtatása esetében, DSSP-ből számolva.*

MD-szimulációink és az AlphaFold Multimer-alapú modellezésünk azt sugallja, hogy a hexamer szerkezetben a két LC8-dimer relatív térbeli orientációja nagyon változatos lehet az általunk feltételezett topológia mellett is. Ez összhangban van a kötőhelyek közötti összekötő (*linker)* régió flexibilitásával (ld. 26. ábra). A szimulációinkban gyakran előforduló forgatókönyv szerint a két LC8-dimer

egymáshoz közeledik, létrejön köztük kapcsolat, majd egymáshoz viszonyított helyzetük a ezután már csak minimálisan változik. Ebben a tekintetben mind ezek, mind az AlphaFold Multimerrel kapott különböző modellek inkább statikus pillanatfelvételeket mutatnak, mintsem közvetlen betekintést nyújtanak a dinamikus átrendeződésbe, amely a leginkább jellemzi ezt a hexamert és összhangban áll kísérleti megfigyeléseinkkel is. A komplex formára jellemző szerkezeti plaszticitást a GKAP konformerek gerincének φ/ψ szögeire számított rendezettségi paraméterek (*angular order parameter*) is megerősítik (az MD trajektóriákra számítva). Az értékek a kötő motívumokon kívüli szakaszokon konzisztensen alacsonyabbak, ami nagyobb szerkezeti variabilitásra utal (ld. 25. ábra).



26. ábra: A GKAP-DYL + LC8 komplex flexibilitása. Az ábrán az egyik molekuladinamikai futtatás eredményéből nyert szerkezeti sokaság minden ezredik elemét (összesen 20 szerkezetet) illesztettem az egyik dimerre, illetve a 20 000-ből csak egyetlen GKAP-DYL láncot ábrázoltam, hogy az LC8 dimerek változatos elrendeződése jobban látható legyen, így ezzel GKAP flexibilitását illusztráljam.

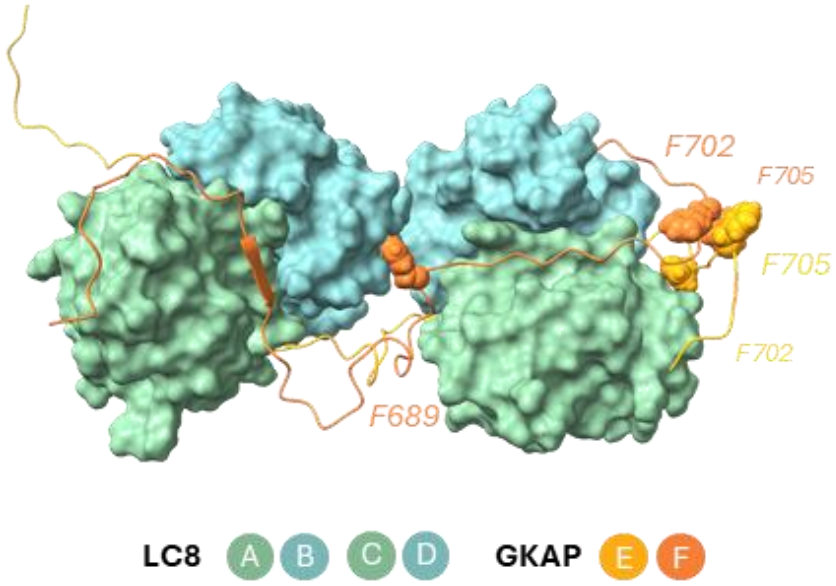
Az NMR-adatok azt megerősítik, hogy mindkét LC8 kötőhely részt vesz az interakcióban, azonban szerkezeti tulajdonságaikban vannak eltérések. Mindkét kötőhely esetében a kémiai eltoldás perturbáció adatok arra utalnak, hogy a közvetlen kötőhelyen kívüli aminosavak is hozzájárulnak az interakcióhoz, az N-terminális kötőhely esetében egészen a -10 pozícióig, a C terminális kötőhely esetében pedig legalább a +4 pozícióig. A kötőhelyek melletti szakaszok különböző módon

vesznek részt a szerkezet stabilizálásában. Az ezeknek megfeleltethető csúcsok javarészt eltűnnek (2-4 kivétellel) az ^{1}H-^{15}N HSQC titrálási spektrumokról (ld. 23. és 25. ábra), de a két SLiM esetében eltérő mintázatokkal. Erre a jelenségre két magyarázat lehetséges: 1) vagy ezek az oldalláncok az LC8 dimer köré tekerednek, elveszítve rugalmasságukat, vagy 2) az ezen aminosavakhoz tartozó atomok az ún. *intermediate exchange* (nagyságrendileg ns-µs) időskálájú kicserélődési eseményekben vesznek részt.

A két kötőhely szerkezeti flexibilitása a DSSPCont számítások alapján eltérő, de ez csak néhány egyedi futásban figyelhető meg. A „*core*" (szűken értelmezett) motívum egyes pozíciói biztosabban azonosíthatók ß-szál szerkezetűnek, míg mások többféle állapotot is felvehetnek. Az összes futtatás átlagát figyelembe véve ezek a különbségek csak kis mértékűek (ld. 25. ábra). Az MD szimulációkban az N-terminális kötőmotívum -10 és -9 pozícióiban található két lizin (K660 és K661) úgy tűnik, hogy képes kölcsönhatásba lépni az LC8-cal, de ezek nem stabil interakciók, és nem lehetséges, hogy mindkét oldallánc egyidejűleg kötődjön. Feltételezéseink szerint nincs olyan konformáció, ahol a főlánc elhelyezkedése lehetővé tenné, hogy mindkét oldallánc eltemetett (*buried*) állapotba kerüljön. Hipotézisünk szerint ezek az interakciók dinamikusan változnak, ami az NMR spektrumon a jelek kiszélesedését okozza, így a csúcsok „láthatatlanná" válnak NMR vizsgálattal. Sem a spektrumokban, sem az MD szimulációkban nem figyelhető meg jellegzetes különbség a *core* `IQV` és `VQV` kötődési motívumok között: a hozzájuk tartozó jelek eltűnnek (a szomszédos aminosavakhoz tartozó jelekkel együtt), és a szimulációk során sem változnak sokat az atom-atom kontaktusok. A közös jellemző, hogy a -1 és +1 pozíciók teljesen eltemetett állapotban vannak, és kontaktusokat alakítanak ki az LC8 dimerek ß3 és ß4 szálait alkotó aminosavakkal.

A két kötőhely esetében a -8, -7 és -5 pozícióban, bár kémiailag hasonló aminosavakat találunk, azok mégis különböző mechanizmussal működnek. Például az első kötőhely -7 pozíció esetében, az R663 amid jele teljesen eltűnik, míg az ennek megfeleltethető pozícióban a második kötőhely esetében a K688 aminosav amid jelnél csak részleges elmozdulás történik a spektrumban. A szimulációk alapján az első kötőhelynél ezek a pozíciók eltemetett állapotban vannak komplexált formában, és jelentős atom-atom kapcsolatokat létesítenek az LC8 dimerrel. Az első motívum N-terminális környező (*flanking*) régiója lazán részt vesz az interakció kialakításában. A második motívum -6 pozíciójában levő F689 meglepő módon képes alternatív módon mindkét LC8 dimerrel kontaktust kialakítani. A linker szakasz flexibilitása arra utal, hogy ez a fenilalanin oldallánc nem csupán egyféle orientációban képes rögzülni a komplexben, hanem kötött és nem kötött állapotok sokaságát veszi fel (ld. 27. ábra). A szűken vett kötő motívum aminosavai között is felmerül egy gyors kicserélődési jelenség

lehetősége az első motívum -4 pozíciójában található szerin esetében, habár ez nem igazolható minden kétséget kizáróan a komplexált állapot teljes asszignációjának hiányában.



27. ábra: A linker szakasz olyan mértékben flexibilis, hogy a két LC8 dimer érintkezhet (A-B és C-D láncok). A GKAP fenilalanin oldalláncai is képesek olyan orientációban elhelyezkedni, hogy a két GKAP lánc képes egymással kontaktust kialakítani (E és F láncok). Az ábrát Dr. Kálmán Zsófia E. készítette.

A különbségek még szembetűnőbbek a C-terminális határoló szakaszok esetében. Az 5-14 pozícióban lévő aminosavak csak a második, C-terminális kötő motívum esetében érintettek, a többségükhöz tartozó amid jelek teljesen eltűnnek a titrálási HSQC spektrumokról (ld. 19., 23. és 24. ábra). Az első, N-terminális kötő motívum környezetében levő, megfeleltethető pozíciók a két kötőhely közti *linkert*, összekötő szakaszt adják, és csak kisebb különbségeket mutatnak a szabad és a kötött forma között, ami egyértelműen arra utal, hogy ez a szegmens nagyrészt rendezetlen marad. Ezek a különbözőségek rámutatnak arra, hogy fontos a hosszabb konstrukciók vizsgálata, szemben azokkal a tanulmányokkal, amelyek csak a minimális SLiM-ek vizsgálatára koncentrálnak. MD-számításaink szerint ez a régió lehet eltemetett (*buried*), és közel kerülhet az LC8 dimerekhez, de esetében nem látható következetes mintázat, ami összhangban van a régió kísérletileg igazolt dinamikus jellegével. A két kötőhely közötti legjelentősebb különbség az, hogy a C-terminális kötőhely és annak C-terminálisan elhelyezkedő környező régiója

valószínűleg további, másodlagos kontaktusok kialakítása révén vesz részt a komplexképződésben.

Míg az N-terminális kötőmotívum esetében a minimális SLiM után közvetlenül következő aminosavak, a +3 pozíciótól kezdve – az A_{+4} kivételével – láthatóak maradnak a komplex HSQC spektrumában, addig a C-terminális motívum utáni aminosavak NMR-rel nem detektálhatók. Ez a különbség nem magyarázható könnyen MD szimulációinkkal, ahol mindkét szomszédos szegmens részben el van temetve. Más tanulmányokban leírták már, hogy az LC8 molekula felülete részben pozitív töltésű, ahol ezekkel az aminosavakkal potenciálisan kölcsönhatásba tud lépni [67,145], és így hitelt érdemlő az a feltételezés, hogy a negatív töltésű aminosavak eltérő eloszlása, különösen a C-terminális kötőhely után a +2 - +4 pozícióban található három glutamát sorozata hozzájárulhat ezekhez a különbségekhez.

Több MD által generált szerkezetben látható, hogy a két GKAP szegmens hidrofób kontaktust alakít ki egymással a második kötőhely utáni C-terminális régióban található két fenilalanin oldallánc, az F702 és az F705 segítségével. Ez arra utal, hogy a két GKAP lánc kölcsönhatást alakíthat ki egymással, amelyet az LC8 kötés elősegít (ld. 27. ábra). Spekulációink szerint ez az interakció esetleg indukálhat és stabilizálhat egy egyébként gyenge és nem kanonikus *coiled coil* szegmenst a GKAP fehérje C-terminálishoz közelebb eső szakaszain.

Az LC8 komplexált formája kapcsán általánosságban kijelenthető, hogy a ligandumkötés nem változtatja meg jelentősen annak konformációját a szabad állapothoz képest [56], ezt az MD szimulációnk és a CD spektroszkópiás mérés is megerősíti.

A reverz titrálási eredményeket is elemeztük a MD szimulációk tükrében. A fennmaradó LC8 csúcsok között vannak olyanok, amelyek egyértelműen hozzárendelhetők a D3, R4, A6 és S88 aminosavak amid NH-jához. Néhány további csúcs is egyértelműen az LC8 dimerhez tartozik, azonban a felvett spektrumok alapján ezeket nem lehetett teljes bizonyossággal hozzárendelni (mivel a komplex 3D kísérletei nem voltak kivitelezhetők). Molekuladinamikai számításaink azt mutatják, hogy vannak olyan aminosavak, főleg az α1 és α2 hélixekben, amelyek nem vesznek részt sem a dimerizációban, sem a ligandumkötésben. Emellett az MD szimulációk arra is utalnak, hogy sokféle kölcsönhatás alakulhat ki a két különböző kötőhelyhez kötődő két LC8 dimer között. Ezekben különböző főlánc és oldallánc atomok is részt vehetnek az N-terminálison, az α1 és α2 hélixekben, a β1 szálban és a hurok régiókban is. Így valószínű, hogy a ligandumkötőhelyen kívüli

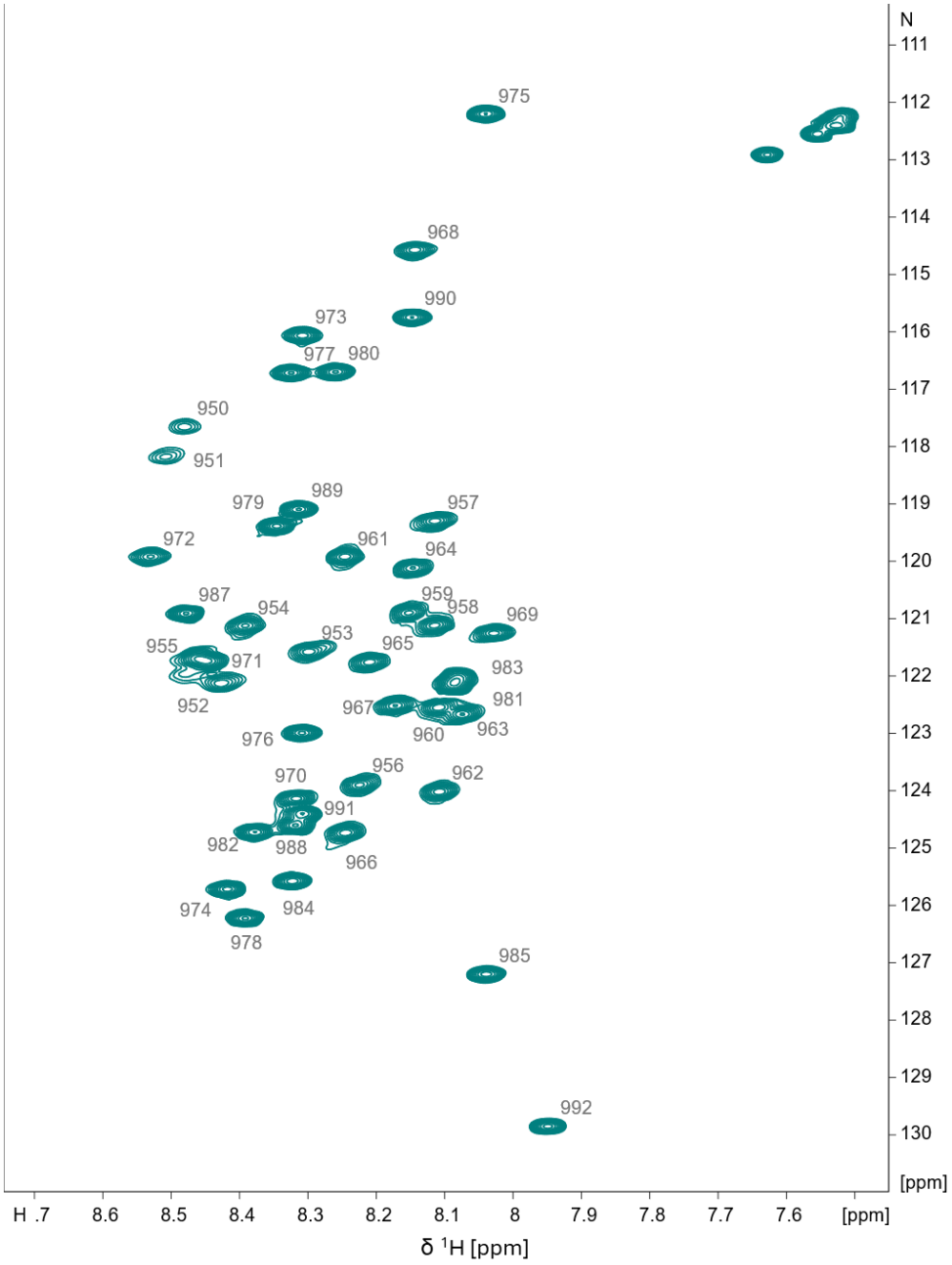
aminosavakhoz tartozó amid csúcsok eltűnése avagy jelentős elmozdulása a két LC8 dimer közötti kölcsönhatásokkal magyarázható. Másrészt a titrálás során nem változó csúcsok jelenléte ismét csak a komplex állapotban is megmaradó flexibilitást mutatja. Az egyik MD trajektóriában az N-terminálishoz közeli R4 és az N51 aminosavak (két különböző LC8 dimerben) fizikai kontaktusba kerülnek egymással, mivel az LC8 láncok N-terminális régiója flexibilis marad, összhangban a reverz NMR titrálás során tapasztaltakkal.

4.4 GKAP-Ct43 és Shank1-PDZ előállítása és tisztítása

A GKAP C-terminális szegmensét és a Shank1 fehérje PDZ doménjét is sikeresen előállítottam, előbbit jelöletlen és ^{13}C, ^{15}N izotóp jelölt formában is [129]. Ennek a peptidszakasznak az NMR-re alkalmas formában való előállítása kevesebb kihívást okozott, mint a dinein kötő szakaszé. A GKAP-Ct43 konstrukció megfelelő hozammal termeltethető, natív IMAC eljárással tisztítható, könnyen oldatban tartható és töményíthető, illetve koncentrációmeghatározása is lehetséges volt 280 nm-en mért abszorbancia érték alapján, mert egy aromás tirozin oldallánc van a konstrukció szekvenciájában. A Shank1-PDZ konstrukciót és tisztítási protokollját Sánta Anna tervezte meg és optimalizálta [97].

4.5 GKAP-Ct43 funkcionális és szerkezeti jellemzése szabad formában és Shank1-PDZ-vel komplexben – NMR mérési eredmények

Elvégeztem a GKAP fehérje 43 aminosavas C-terminális régiójának teljes főlánc asszignációját (N, H, C', Cα, Hα, Cß és Hß atomok, BMRB azonosító: 53245). A GKAP-Ct43 konstrukció ^{1}H-^{15}N HSQC spektrumában a jel diszperziója ~0,6 ppm az 1H dimenzióban, és ~18 ppm a ^{15}N dimenzióban (ld. 28. ábra). Az N és HN atomok jelhozzárendelését is elvégeztem Shank1-PDZ fehérje partnerrel kötött formában (több titrálási lépésre), a titrálási spektrumok alább, a 30. ábrán láthatók [129].

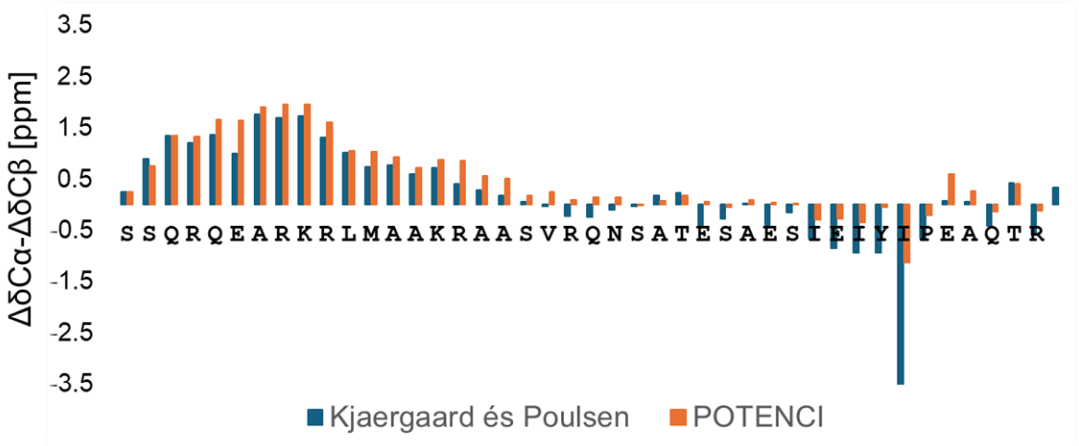


28. ábra: A GKAP-Ct43 konstrukció ^{1}H-^{15}N HSQC spektruma.

A POTENCI [111] eljárás segítségével számított szekvenciális szomszédsági, hőmérsékleti és pH-korrigált másodlagos kémiai eltolódási értékek -1,12 és +2 ppm között vannak a Cα-Cβ kémiai eltolódások esetében, és -0,12 és +0,08 ppm között a Hα atom kémiai eltolódások esetében (ld. 29. ábra). A Cα-Cβ kémiai eltolódások esetében összehasonlítást is végeztem a Kjaergaard és Poulsen által ajánlott *random*

coil kémiai eltolódásokkal (ld. 30. ábra), az így kapott értékek összehangban vannak, ez még erősebb evidencia a 950-967 régióban levő helikális preferenciára [112].

29. ábra: Cα-Cβ, illetve Hα másodlagos kémiai eltolódások a GKAP-Ct43 konstrukció NMR mérési eredményeiből számítva. Sötétlila háttérrel jelöltem az AlphaFold2 predikciója szerinti α helikális szegmenst.



30. ábra: A kétféle random coil kémiai eltolódással számított másodlagos kémiai eltolódás értékek összehasonlítása. A kétféle adatsor alapján kapott másodlagos kémiai eltolódások nagyon hasonló mintázatot mutatnak, mindkét esetben igazolható a helikális preferencia a 950-967 aminosavak között [108,111,112].

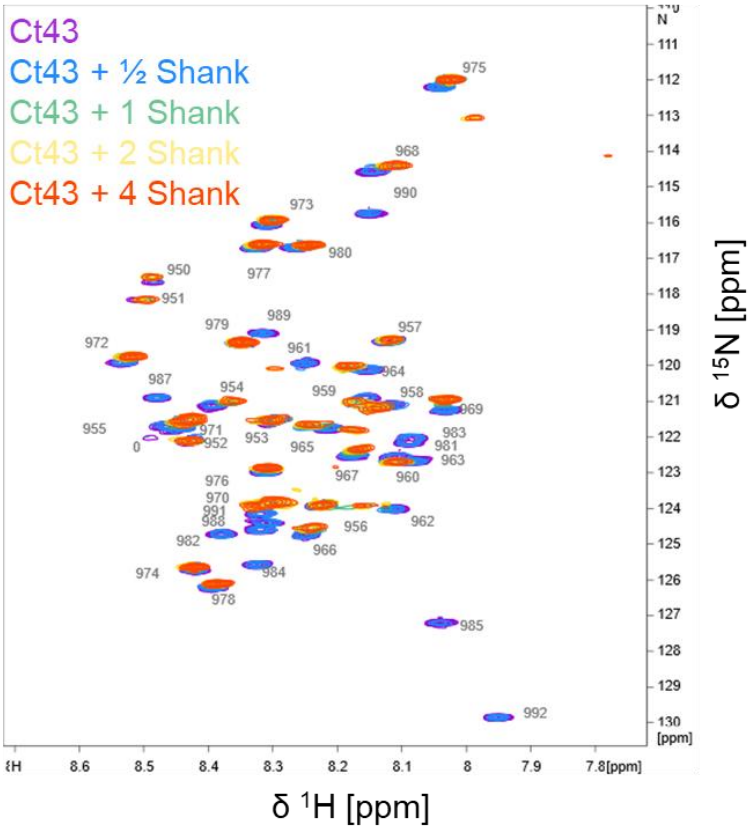
A kémiai eltolódások elemzése azt mutatja, hogy a konstrukció majdnem teljes hosszában rendezetlen. A Cα és Cß másodlagos kémiai eltolódások között számított különbség enyhe helikális preferenciát jelez a 950-967 pozíciók között; alátámasztja az AlphaFold2 szoftver által becsült α helikális régió jelenlétét ezen a szakaszon (ld. 29. és 30. ábra). A CheSPI-elemzés [113] alapján szintén főként rendezetlen szerkezet jellemzi ezt a szakaszt: nem mutat másodlagos szerkezeti preferenciát a PDZ-kötő motívumot közvetlenül megelőző szegmens mentén (971–992. aminosav), de egyértelműen helikális hajlamot mutat a kiterjesztett régióban, a 950–970. aminosavak között.

Megjegyzésre érdemes, hogy az I985-P986 aminosavpár esetében egyedi másodlagos kémiai eltolódási mintázat figyelhető meg (ld. 29. és 30. ábra). Az I985 viszonylag nagy negatív másodlagos Cα-Cß eltolódási különbsége és a P986 nagy negatív Hα másodlagos kémiai eltolódása feltételezésünk szerint az aszimmetrikusan elágazó izoleucin oldallánc és a pirrolidin gyűrű között létrejövő egyedi sztérikus kölcsönhatásnak lehet betudható. Jelenlegi adataink alapján nem határozható meg egyértelműen, hogy a P986 cisz vagy transz izomerként van jelen, de a rendezetlen szakaszokra sok esetben jellemző izomerizációból eredő heterogenitásnak nem láthatóak jelei [146,147]

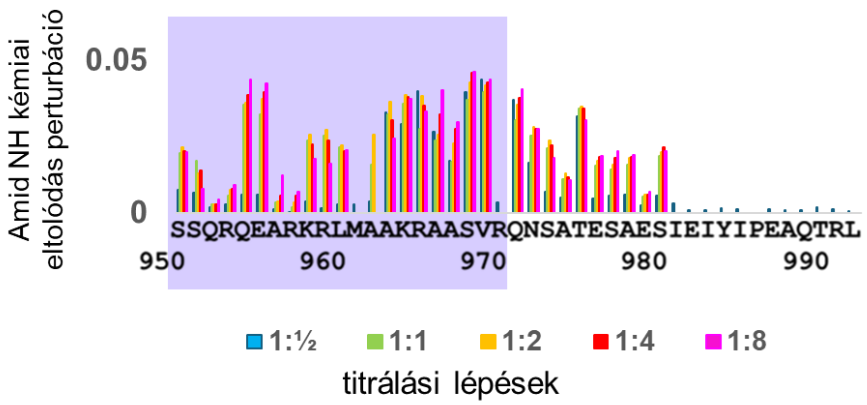
Kollégáim, Varga Soma és Jessica Li Amy BLI mérése alapján a Shank-1 PDZ és a GKAP-Ct43 közti interakció Kd értéke 3,1± 0,7 µM [129].

A kötött formájú C-terminális szakasz ^{1}H-^{15}N HSQC spektruma jelentős részben hasonlít a szabad állapotban mért spektrumhoz (ld. a 31. ábrán). A várakozásoknak megfelelően a szaturáció elérésekor (1:1 sztöchiometria fölött) eltűnnek a spektrumról azok az amid NH jelek, amik az interakció kialakításában közvetlenül érintett aminosavakhoz tartoznak. Ennek többféle oka lehet, a legkézenfekvőbb magyarázat az, hogy kötött állapotban az érintett atomok rigidebb struktúrába rendeződnek és lassabb mozgásokat végeznek, aminek köszönhetően az NMR spektrumon nem adnak látható jelet. Megjegyzendő, hogy nem feltétlenül kellene ennek bekövetkeznie: amennyiben a PDZ domén monomer formában marad, és a kölcsönhatás során egy plusz ß szállal lesz csak nagyobb, míg a GKAP-Ct43 konstrukció többi része megtartja flexibilitását, akkor a bekötött C-terminálissal együtt létrejövő komplex mérete önmagában nem indokolja a jelek eltűnését, csupán azok pozíciójának megváltozását. Ezek az eltűnő jelek a 981-992 aminosavakhoz tartoznak (`IEIYIPEAQTRL` szekvencia, a C-terminuson 12 aminosav), ami lényegesen hosszabb, mint a kölcsönhatás létrejöttéhez minimálisan szükséges szakasz, ami kb. 5 aminosav (a kémiai eltolódás perturbációt lásd a 32. ábrán). Az érintett 12

aminosav nagy részének esetében az ^{1}H-^{13}C HSQC spektrumon látható Cα-Hα illetve Cβ-Hβ jelek is eltűnnek, ezáltal megerősítettem, hogy a főlánc mellett az oldallánc atomok is részt vesznek a kontaktusok kialakításában, és nem maradnak az oldat által hozzáférhetőek. A 981, 983-987, 989-989, 992 pozíciókban lévő aminosavaknak megfelelő Cα-Hα illetve Cβ-Hβ jelek egyértelműen eltűnnek a spektrumról.



31. ábra: A GKAP-Ct43 ^{1}H-^{15}N HSQC spektrumai a Shank1-PDZ doménnel végzett titrálási mérésekben.



32. ábra: A GKAP-Ct43 szakasz Shank1 PDZ doménnel való kölcsönhatás során észlelt kémiai eltolódás perturbáció értékei.

Ezzel szemben meglepő módon néhány további aminosavhoz tartozó jel is eltűnik a spektrumokról, amik még távolabb vannak a szigorúan vett QTRL kötő motívumtól: az ^{1}H-^{15}N HSQC spektrumról eltűnik az M961, szaturáció fölött az A962 aminosav, valamint az R970 pozícióhoz tartozó jel (lásd a 32. ábrán), az ^{1}H-^{13}C HSQC spektrumról pedig az L960 és az M961 aminosavak jelei. Ez felveti a lehetőséget, hogy ezek a főlánc és oldallánc atomok további kontaktusokat alakítanak ki a Shank1-PDZ doménnel, ezáltal részt vesznek az interakció modulálásában vagy szabályozásában. Annak fényében, hogy egyes jelek teljesen eltűnnek, igen meglepő, hogy a többi jel helyzete nem változik a titrálás során. Ezt a komplexet a dinein kötő régióhoz hasonlóan vizsgálhatnánk molekuladinamikai futtatással, hogy azzal kiegészítve pontosabb képet kaphassunk arról, hogy ezek az aminosavak hogyan járulnak hozzá az interakcióhoz.

5 Diszkusszió

Rendezetlen fehérjék kísérletes szerkezetvizsgálata bár sok buktatót rejt magában, de elengedhetetlen ahhoz, hogy többet tudjunk ezeknek a molekuláknak a működéséről. Az AlphaFold2 (majd az AlphaFold3) szoftverek létezésével nagy lépést tettünk, hogy a fehérjeszerkezeteket megismerjük, de a globuláris szerkezeti elemekkel nem rendelkező makromolekulák nem jellemezhetőek precízen ezekkel a számítógépes, predikciós módszerekkel [148,149].

Érdemes a rendezetlen fehérjék szerkezetét vizsgálni; már csak önmagában azért is, hogy kísérleti úton igazoljuk, hogy egy adott fehérje (vagy annak egy részlete) valóban funkcionálisan rendezelten, és pontosan mely szakaszain az. Emellett viszont fontos azt is szem előtt tartanunk, hogy jelenlegi becslések szerint a magasabb rendű eukarióták proteomjának több, mint 30%-a rendezetlen fehérjét kódol [150], a humán fehérjék esetében ez a 44%-a [7], mégis csupán az ismert rendezetlen fehérjék töredékéről van bármilyen szerkezeti információnk. Van még mit feltérképeznünk ezen a területen ahhoz, hogy jobban megérthessük az ilyen típusú molekulák működését [6].

Az eredményeim alapján látható, hogy az NMR és a molekuladinamika együttes alkalmazása informatív lehet összetett, de rugalmas rendszerek esetében. Az eredményeim alapján igazolódott, hogy rendezetlen fehérjék és komplexeik szerkezetvizsgálata során releváns lehet nem csak a szűken értelmezett SLiM motívumokat, hanem a környező szakaszaikat is figyelembe venni, mert jelentős szereplői lehetnek egy-egy interakciónak.

Munkám során sikeresen előállítottam és NMR spektroszkópiával, illetve más kísérletes technikákkal vizsgáltam a GKAP posztszinaptikus denzitás állványfehérje két különálló rendezetlen régióját. Elsőként mutattam be kísérletes bizonyítékot arra, hogy ez a két szegmens rendezetlen, valamint jellemeztem szerkezetüket [128,129].

A mért NMR spektrumok kiértékelésével, molekuladinamikai futtatások elemzésével részletesen bemutattam a vizsgált dinein kötő régió és LC8 dimer molekula között kialakuló komplex globális szerkezetét is, illetve aminosavszintű kontaktusait is. Elsőként dokumentáltam a kötés kinetikájának disszociációs állandóját (K_d = 0,29 µM), ami összevethetőnek bizonyult az irodalomban leírt, hasonló szakaszok disszociációs állandójával (a szintén `IQV` központi motívumú nNOS fehérje teljes kötő szekvenciája: `EMKDTGIQVDRDL` , disszociációs állandója: K_d = 5,4 µM, ld. a Függelék

1. táblázatát [18]). Megállapítottam, hogy a két partner egyfajta elrendeződésben képez komplexet, magasabb rendű oligomerizáció lehetősége az alkalmazott kísérleti körülmények között nem merült fel. Vizsgálataim csatlakoznak olyan kutatási eredmények sorához, amiben az LC8 molekula és rendezetlen partnereinek hasonló viselkedését írták le: Barbar és kutatócsoportja leírása szerint az LC8 „*in register*" köti a rendezetlen multivalens partnereit, a partner pedig komplexált formában is a szabad formához hasonlíthatóan flexibilis marad [151]. A GKAP dinein kötő szakaszának nagyfokú rugalmassága tökéletesen alkalmassá teszi, hogy az NMDA receptorkomplex organizációját végezze a PSD-ben: fizikailag összekösse a PSD fontos jelátviteli fehérjéit, amik nagy része változatos orientációban van jelen a térben, ezáltal a hálózatot dinamikus de egymáshoz stabilan kapcsolódó formában fenntartsa. Az adataink és az LC8 kötődési mechanizmusáról leírt korábbi eredmények felvetik a lehetőséget, hogy a GKAP LC8-hoz való kötődése további kapcsolódást indukálhat GKAP monomerek között, akár egy rövid *coiled coil* szegmens kialakításával. Ez a fajta interakció két GKAP monomer között a kísérleti eredményekből látható preferált sztöchiometriát és a hexamer elrendeződést, valamint a kötődési kinetikát is megmagyarázná. Ennek igazolására további kísérletekre van szükség.

A C-terminális régió vizsgálata során nagyfokú rendezetlensége mellett azt is igazoltam, hogy az AlphaFold2 becslésének megfelelően a GKAP 950-970 szakasza helikális hajlammal írható le. Ez a helikális hajlam jelentős, de nem olyan mértékű, mint a klasszikus α hélixek esetén, például a Drebrin SAH (egyszálú α hélix) régióban, ahol a másodlagos Hα eltolódások abszolútértéke majdnem kétszer akkora [100]. Bár a helikális szegmens megfeleltethető az AlphaFold2 előrejelzésének, de a másodlagos eltolódások alapján számolt hélix a C-terminus irányában rövidebb, mint a predikált. A hélix N-terminális régiójában tapasztalható különbség oka az, hogy a konstrukció csak az AlphaFold2 által előre jelzett hélix N-terminális vége után kezdődik. Ezt a szegmenst a GH1 kristályszerkezetét leíró tanulmányban a negyedik hélixként azonosították. Bár a PDB adatbázisban levő szerkezeti modellben (PDB: 4R0Y) nem látható, ITC-mérésekkel kimutatták, hogy gyenge kölcsönhatás van a hélixnek megfelelő peptid (950–971 aminosavak) és az első három hélix által meghatározott szerkezeti elem (807–911) között [46]. Eredményeink megerősítik ennek a régiónak az oldatbeli konformációs preferenciáit. A közvetlenül a PDZ-kötő motívum előtti `YIPE` aminosavak esetében valószínűleg egyetlen helikális fordulatot látunk. Ennek a szerkezeti elemnek a helyzete nagyjából egybeesik az E6 onkoprotein Zn-kötő doménjének C-terminális spiráljának helyével [91] és az RSK1-ben megfigyelt spirális hajlammal [94]. Ennek a szegmensnek a pontos relevanciája a GKAP-PDZ interakcióban még nem ismert. A jelölt GKAP-Ct43 konstrukcióval is

jelentős hozzáadott értéke lenne annak, ha a dinein kötő régióhoz hasonlóan részletes molekuladinamikai futtatásokkal és kiértékeléssel elemeznénk a kötődés aminosavszintű eseményeit, valamint kísérletes technikákkal vizsgálnánk a dimerizáció, illetve nagyobb komplexek kialakulásának lehetőségét.

A posztszinaptikus denzitás alkotóelemeinek szerkezeti és funkcionális vizsgálata elengedhetetlen ahhoz, hogy olyan sejtszintű folyamatokat jobban megérthessünk, mint például az agyi ingerület továbbítása. Ahhoz, hogy terápiás eljárásokat vagy hatóanyagokat fejleszthessünk neurológiai betegségek kezelésére, nem csupán egy-egy fehérje szerkezetét kell minél részletesebben leírnunk, hanem az elemek egymáshoz kapcsolódását és dinamikáját is. Az ilyen komplexek ismeretében jobban megérthetjük az olyan folyamatok molekuláris, vagy akár atomi szintű hátterét, mint a tanulás, memória vagy az agyi plaszticitás [152–154]. A GKAP fehérje aminosavszintű, illetve funkcionális egységek szerinti vizsgálatával hozzájárultam ahhoz, hogy jobban értsük a posztszinaptikus denzitást felépítő molekulák működését. Ilyen és ehhez hasonló kísérletekkel ismerhetjük meg molekuláris szinten agyunk működését, például a viselkedés, a tanulás vagy az emlékezés képességét.

A disszertáció tézisei

1. tézispont

NMR mérésre alkalmas tisztaságban és töménységben előállítottam a poszszinaptikus denzitásban részt vevő GKAP két régióját. A GKAP fehérje dinein kötő régiójának előállítási és tisztítási protokollját kidolgoztam és optimalizáltam, hogy a minta tulajdonságai és körülményei alkalmasabbak legyenek magasabb dimenziójú NMR mérések elvégzésére.

A tézisponthoz kapcsolódó közlemény: [J1]

A tézisponthoz kapcsolódó szóbeli előadások és poszter prezentációk: [O2]–[O6], [P3]-[P11]

2. tézispont

Elvégeztem a jelhozzárendelést (kémiai eltolódás asszignációt) olyan fehérjeszakaszok esetében amiket korábban még nem vizsgáltak NMR módszerrel, illetve amelyeket az általam alkamazottaktól eltérő körülmények között vizsgáltak.

2.a. Elvégeztem a GKAP dinein kötő régiónak a teljes főlánc és részleges oldallánc asszignációját (az N, HN, C', Cα, Cß, Hα és Hß atomok 100%-át, a Cγ és Hγ atomok 52% illetve 61%-át rendeltem hozzá sikeresen).

2.b. Elvégeztem a dinein könnyű lánc fehérje részleges főlánc asszignációját, mert a BMRB adatbázisban nem érhető el olyan kémiai eltolódás adatsor, ami TCEP redukálószer hozzáadása melletti mérés alapján készült.

2.c. Elvégeztem a GKAP fehérje 43 aminosavas C-terminális régiójának teljes főlánc és részleges oldallánc asszignációját.

A tézisponthoz kapcsolódó közlemények: [J1]-[J2]

A tézisponthoz kapcsolódó szóbeli előadások és poszter prezentációk: [O1]–[O6], [P1]-[P11]

3. tézispont

NMR méréssel, SDS-PAGE futtatással, SEC analitikai géloszlopszűréssel és CD spektroszkópiával igazoltam, hogy a GKAP fehérje dineinkötő régiója teljes hosszában funkcionálisan rendezetlen. A Cα-Cß másodlagos kémiai eltolódások

elemzésével megállapítottam, hogy ez a régió az első kötőmotívum környékén enyhe nyújtott konformáció preferenciával jellemezhető, míg a kötő motívumokon kívüli szakaszokon változó mértékű helikális hajlam figyelhető meg.

A tézisponthoz kapcsolódó közlemény: [J1]

A tézisponthoz kapcsolódó szóbeli előadások és poszter prezentációk: [O2]–[O6], [P3]-[P11]

4. tézispont

NMR méréssel jellemeztem a GKAP-DYL+LC8 komplex szerkezetét. Megállapítottam, hogy a GKAP bizonyos szakaszai kötött állapotban is megőrzik flexibilitásukat, ugyanakkor igazoltam, hogy egy jól meghatározott összetételű komplex alakul ki, mivel nem jelenik meg több különböző jelsorozat a HSQC spektrumon. Ugyanezt megmutattam az LC8 fehérje NMR mérésével is: az eltűnő jelek, különböző jelsorozatok felbukkanásának hiánya egy nagy molekulaméretű komplex kialakulását bizonyítják. Megmutattam, hogy a GKAP két különböző kötőmotívuma különbözőképpen alakít ki kötést az LC8-cal, és hogy a motívum környékén levő 10-14 aminosav is érintett az interakcióban.

NMR mellett más kísérletes módszerekkel is jellemeztem a komplexet. CD spektroszkópiával igazoltam, hogy a GKAP dinein kötő régió és az LC8 fehérje komplexének kialakulása során a másodlagos szerkezeti elemek arányában lényegi változás nem történik. BLI méréssel igazoltam, hogy a GKAP fehérje dinein kötő régióján egyidejűleg mindkét kötő motívumhoz képes LC8 partnerfehérje kötődni. Megállapítottam, hogy a komplex disszociációs állandója Kd = 0,29 uM. DLS méréssel megbecsültem a komplex méretét, ami megfelelt az előzetesen számított értékeknek (56 kDa).

A tézisponthoz kapcsolódó közlemény: [J1]

A tézisponthoz kapcsolódó szóbeli előadások és poszter prezentációk: [O2]-[O6], [P3]-[P11]

5. tézispont

NMR spektroszkópiával igazoltam, hogy a GKAP C-terminális régiója majdnem teljes hosszában funkcionálisan rendezetlen. Az NMR mérések alapján megállapítottam, hogy az 950-970 aminosavak között enyhe helikális szerkezeti preferenciával jellemezhető. Közvetlenül a kötőmotívum előtt egy kanyar (turn) szerkezet található, melyhez hasonló elem észlelhető egyes korábban leírt komplex szerkezetekben is. Kísérleti eredményeim alapján a GKAP C-terminális régiója partnerkötés hatására a várttól eltérő módon viselkedik. Bár nagyrészt megőrzi rendezetlenségét, nem csupán a kötés kialakításáért elsősorban felelős aminosavak, hanem a C-terminálistól távolabbi pozíciók is jelentős mértékben érintettek. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a teljes hosszúságú molekulák közötti kölcsönhatás során létrejövő komplex nem modellezhető csupán a kötés létrejöttéhez elsődlegesen szükséges molekularészletekről meglévő ismereteink alapján.

A tézisponthoz kapcsolódó közlemény: [J2]

A tézisponthoz kapcsolódó szóbeli előadások és poszter prezentációk: [O1], [P1]-[P2]

Közlemények

A disszertáció alapjául szolgáló, téziseket alátámasztó közlemények

[J1] **Eszter Nagy-Kanta**, Zsófia E. Kálmán, Helena Tossavainen, Tünde Juhász, Fanni Farkas, József Hegedüs, Melinda Keresztes, Tamás Beke-Somfai, Zoltán Gáspári, Perttu Permi, & Bálint Péterfia (2025). Residual flexibility in the topologically constrained multivalent complex between the GKAP scaffold and LC8 hub proteins. The FEBS Journal. 2026 Jan;293(1):76-95. doi: 10.1111/febs.70219.

[J2] **Eszter Nagy-Kanta**, Anna Sánta, Zsófia E. Kálmán, Jessica Amy Li, Perttu Permi, Zoltán Gáspári, Bálint Péterfia (2025). 1H, 13C, and 15N resonance assignment of the C terminal region of the disordered postsynaptic scaffold protein GKAP. Journal of Biomolecular NMR Assignments. 2025 Nov 5;20(1):2. doi: 10.1007/s12104-025-10253-2.

A disszertációhoz kapcsolódó szóbeli előadások és poszter prezentációk

[O1] **Eszter Nagy-Kanta**, Anna Sánta, Zsófia E. Kálmán, Perttu Permi, Zoltán Gáspári, Bálint Péterfia. Insights on the interaction between the postsynaptic GKAP and Shank scaffold proteins. September, 2025 – FEBS3+ Meeting, Belgrade, Serbia. Short talk.

[O2] **Eszter Nagy-Kanta**, Zsófia Dobson-Kálmán, Helena Tossavainen, Zoltán Gáspári, Perttu Permi, Bálint Péterfia. Structural description of the multivalent interaction of the post-synaptic scaffold protein GKAP and dynein motor molecule. June, 2024 – FEBS Congress, Milano, Italy. Speed talk.

[O3] **Nagy-Kanta Eszter**, Kálmán Zsófia, Gáspári Zoltán. A GKAP és a DLC2 multivalens komplexének jellemzése NMR és molekuladinamika segítségével. May, 2024 – Hungarian NMR Discussion Group Meeting, Balatonszemes, Hungary. Scientific talk.

[O4] **Eszter Nagy-Kanta**, Helena Tossavainen, Zoltán Gáspári, Perttu Permi, Bálint Péterfia. A posztszinaptikus GKAP fehérje és a dinein könnyűlánc (DYNLL2) multivalens interakciójának vizsgálata. October, 2022 - Hungarian NMR Discussion Group Meeting, Balatonszemes, Hungary. Scientific talk.

[O5] **Eszter Nagy-Kanta**, Bálint Péterfia, József Hegedüs, Melinda Keresztes, Viktor Farkas, Perttu Permi, Zoltán Gáspári. Functional and structural investigation of an intrinsically disordered segment of the post-synaptic scaffold protein GKAP. October, 2019 – From Protein Complexes to Cell-Cell Communication, Esztergom, Hungary. Scientific talk.

[O6] **Eszter Nagy-Kanta**. Functional and structural investigation of the post-synaptic scaffold protein GKAP. June, 2019 – PhD Proceedings, Budapest, Hungary. Scientific talk.

[P1] **Eszter Nagy-Kanta**, Anna Sánta, Perttu Permi, Zoltán Gáspári, Bálint Péterfia. Connecting the dots in the postsynapse: interaction between the postsynaptic GKAP and Shank scaffold proteins. July, 2025 – 49th FEBS Congress, Istanbul, Turkey.

[P2] **Eszter Nagy-Kanta**, Anna Sánta, Perttu Permi, Zoltán Gáspári, Bálint Péterfia. Connecting the dots: the interaction between the postsynaptic GKAP and Shank scaffold proteins. March, 2025 – Hungarian Molecular Life Sciences Conference, Eger, Hungary.

[P3] **Eszter Nagy-Kanta**, Zsófia E. Kálmán, Zoltán Gáspári. Diversity in the bivalent and multivalent interactions of the LC8 hub protein. September, 2024 – FEBS3+ Meeting: Exploring Molecular Frontiers, Pula, Croatia.

[P4] **Eszter Nagy-Kanta**, Zsófia E. Kálmán, Bálint Péterfia, Zoltán Gáspári. Structural investigation of the multivalent complex of the GKAP scaffold and LC8 hub protein. August, 2024 – Annual Meeting of the Hungarian Biochemical Society, Budapest, Hungary. Poster prize, 2nd place.

[P5] **Eszter Nagy-Kanta**, Zsófia E. Kálmán, Helena Tossavainen, Zoltán Gáspári, Perttu Permi, Bálint Péterfia. Structural description of the multivalent interaction of the post-synaptic scaffold protein GKAP and dynein motor molecule. June, 2024 – 48th FEBS Congress, Milano, Italy; and Young Scientists' Forum, Pavia, Italy.

[P6] **Eszter Nagy-Kanta**, Zsófia E. Kálmán, Bálint Péterfia, Zoltán Gáspári. Egy multivalens fehérje-fehérje interakció elemzése NMR mérésekkel és bioinformatikai módszerekkel. April, 2024 – Biotechnology Days of the Hungarian Biotechnology Students' Association, Budapest, Hungary.

[P7] **Eszter Nagy-Kanta**, Bálint Péterfia, Fanni Farkas, Perttu Permi, Maarit Hellman, Helena Tossavainen, Zoltán Gáspári. NMR-based structural characterization of the post-synaptic density scaffold protein GKAP. November, 2021 – Hungarian Molecular Life Sciences, Eger, Hungary.

[P8] **Eszter Nagy-Kanta**, Anna Sánta, Fanni Farkas, Perttu Permi, Maarit Hellman, Helena Tossavainen, Zoltán Gáspári, Bálint Péterfia. NMR-based structural characterization of the post-synaptic density scaffold protein GKAP. July, 2021 – The 45th FEBS Congress, Ljubljana, Slovenia (online conference).

[P9] **Eszter Nagy-Kanta**. Structural characterization of the postsynaptic density scaffold protein GKAP with NMR spectroscopy. June, 2020 – PhD Proceedings, Budapest, Hungary.

[P10] **Eszter Nagy-Kanta**, Bálint Péterfia, József Hegedüs, Fanni Farkas, Zita Harmat, Viktor Farkas, Gyula Batta, Zoltán Gáspári. Structural and functional characterization of the GKAP post-synaptic density scaffold protein. July, 2019 – The 44th FEBS Congress, Krakow, Poland.

[P11] **Eszter Nagy-Kanta**, Zita Harmat, Bálint Péterfia, József Hegedüs, Gyula Batta, Zoltán Gáspári. Structural and functional characterization of the GKAP post-synaptic density scaffold protein. March, 2019 – Hungarian Molecular Life Science 2019, Eger, Hungary.

A disszertációhoz nem kapcsolódó egyéb közlemények

[J3] Szabó, A.L., **Nagy-Kanta, E.**, Varga, S., Jáger, E.A., Pongor, C.I., Laki, M., Laki, A.J. and Gáspári, Z. Diffusion-based size determination of solute particles: a method adapted for postsynaptic proteins. FEBS Open Bio. 2026 Jan;16(1):25-40. doi: 10.1002/2211-5463.70111.

[J4] Kumar M, Michael S, Alvarado-Valverde J, Zeke A, Lazar T, Glavina J, **Nagy-Kanta E**, Donagh JM, Kalman ZE, Pascarelli S, Palopoli N, Dobson L, Suarez CF, Van Roey K, Krystkowiak I, Griffin JE, Nagpal A, Bhardwaj R, Diella F, Mészáros B, Dean K, Davey NE, Pancsa R, Chemes LB, Gibson TJ. ELM-the Eukaryotic Linear Motif resource-2024 update. Nucleic Acids Res. 2024 Jan 5;52(D1):D442-D455. doi: 10.1093/nar/gkad1058.

Köszönetnyilvánítás

Elsősorban hatalmas nagy köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Gáspári Zoltánnak. Az ő támogatását már jóval a doktori tanulmányaim megkezdése előtt megtapasztalhattam, és nagyon hálás vagyok, hogy ő kísért végig ezen az úton. Olyan valóságos vezető volt, aki sose volt számonkérő vagy türelmetlen az eredmények tekintetében, viszont mindig végtelenül segítőkész volt és rendelkezésemre állt, amikor szükségem volt rá. Köszönöm minden belém vetett bizalmát.

Különleges helyen van a köszönetnyilvánításban és a szívemben Kálmán Zsófia, aki nélkül ez a dolgozat, de különösen is az első cikkem nem olyan lenne amilyen lett (vagy talán nem is lenne egyáltalán). Köszönök minden beszélgetést, biztatást, iránymutatást és pettyességet. Remélem innen folytatjuk!

Nagyon köszönök mindent Péterfia Bálintnak, a 324-es Molekuláris Biológiai Laboratórium vezetőjének, aki, bár talán nem lett volna feladata, de kérdés nélkül minden alkalommal segített és támogatott a munkámban, sok értékes diszkussziót, ötletet és nehézségeken való átlendülést köszönhetek neki. Szinte mindent amit tudok a fehérje expresszálásról és tisztításról, azt tőle tudom. Az első időszakban nagy segítségemre volt Hegedüs József, az ő ötleteiből is nagyon sokat tanultam a fehérjepreparálásról. Hasonló hálával vagyok a Molekuláris Biológiai Labor és a Gáspári csoport minden jelenlegi és egykori tagjának, akikkel együtt dolgozhattam, akikkel osztoztunk nehézségeken és megoldásokon: Varga Somának, Sánta Annának, Farkas Fanninak, Stránerné Szabó Zsuzsannának, és mindenki másnak is. Örömmel és szeretettel gondolok a Doktori Iskola minden tagjára, minden barátomra/kollégámra, akikkel együtt töltöttük ezeket a valóban átformáló éveket.

Hálásan köszönöm a közös munkát és a segítséget minden külsős kollégának, akikkel együtt dolgozhattam, legelső sorban a jyväskylä-i NMR-es kollégáknak, Perttu Perminek, Helena Tossavainennek, Maarit Hellmannak és Ilona Pitkänennek, illetve köszönök minden műszerhasználati lehetőséget, tanítást, kiértékelésben nyújtott segítséget Farkas Viktornak, Schlosser Gittának, Stráner Pálnak, Juhász Tündének, Beke-Somfai Tamásnak és Dobson Lászlónak. Az ITK dolgozói közül nagyon köszönöm Garay Tamás, Iván Kristóf és Csikász-Nagy Attila támogatását.

Köszönettel tartozom az ITK-nak amiért biztosította a szükséges feltételeket doktori tanulmányaim során, valamint Szolgay Péternek, Szederkényi Gábornak, Vida Tivadarnénak, Pongor Sándornak és a Doktori Iskola minden képviselőjének, akik hozzájárultak a doktori fokozatom megszerzéséhez.

Szeretném a végtelen hálámat kifejezni a családom felé: a szüleim és a testvérem felé, akik életem első napjától kezdve a legnagyobb drukkereim és mindig hittek

bennem, a férjemnek pedig a töretlen bizodalmát, kitartását, végtelen türelmét és támogató szeretetét amivel a végsőkig kitartott mellettem ezen a hosszú és nehézségekkel teli úton, amíg a végéhez elérkeztem. Köszönöm, hogy vagytok. Illetve köszönöm a kislányaim szeretetét és (jelen)létét is; eme mű harmadik gyermekemként, egyértelműen a legnehezebb szülésként vonul be életem történetébe.

Hivatkozások

1. Tompa, P. Intrinsically unstructured proteins. *Trends Biochem. Sci.* **27**, 527–533 (2002).

2. Tompa, P. Intrinsically disordered proteins: A 10-year recap. *Trends Biochem. Sci.* **37**, 509–516 (2012).

3. Pauwels, K., Lebrun, P. & Tompa, P. To be disordered or not to be disordered: is that still a question for proteins in the cell? *Cellular and Molecular Life Sciences* **74**, 3185–3204 (2017).

4. Lazar, T., Tantos, A., Tompa, P. & Schad, E. Intrinsic protein disorder uncouples affinity from binding specificity. *Protein Science* **31**, 1–13 (2022).

5. Kosol, S., Contreras-Martos, S., Cedeño, C. & Tompa, P. Structural characterization of intrinsically disordered proteins by NMR spectroscopy. *Molecules* **18**, 10802–10828 (2013).

6. Ghafouri, H. *et al.* PED in 2024: improving the community deposition of structural ensembles for intrinsically disordered proteins. *Nucleic Acids Res.* **52**, D536–D544 (2024).

7. van der Lee, R. *et al.* Classification of intrinsically disordered regions and proteins. *Chem. Rev.* **114**, 6589–631 (2014).

8. Uversky, V. N. What does it mean to be natively unfolded? *Eur. J. Biochem.* **269**, 2–12 (2002).

9. Dunker, A. K., Silman, I., Uversky, V. N. & Sussman, J. L. Function and structure of inherently disordered proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **18**, 756–764 (2008).

10. Receveur-Bréhot, V., Bourhis, J. M., Uversky, V. N., Canard, B. & Longhi, S. Assessing protein disorder and induced folding. *Proteins: Structure, Function and Genetics* **62**, 24–45 (2006).

11. Dunker, A. K. *et al.* The unfoldomics decade: An update on intrinsically disordered proteins. *BMC Genomics* **9**, 1–26 (2008).

12. Thomasen, F. E. & Lindorff-Larsen, K. Conformational ensembles of intrinsically disordered proteins and flexible multidomain proteins. *Biochem. Soc. Trans.* **50**, 541–554 (2022).

13. Marsh, J. A. & Forman-Kay, J. D. Ensemble modeling of protein disordered states: Experimental restraint contributions and validation. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics* **80**, 556–572 (2012).

14. Quaglia, F. *et al.* Exploring Curated Conformational Ensembles of Intrinsically Disordered Proteins in the Protein Ensemble Database. *Curr. Protoc.* **1**, 1–28 (2021).

15. Tompa, P., Schad, E., Tantos, A. & Kalmar, L. Intrinsically disordered proteins: emerging interaction specialists. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **35**, 49–59 (2015).

16. Orand, T. & Jensen, M. R. Binding mechanisms of intrinsically disordered proteins: Insights from experimental studies and structural predictions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **90**, 102958 (2025).

17. Van Roey, K. *et al.* Short Linear Motifs: Ubiquitous and Functionally Diverse Protein Interaction Modules Directing Cell Regulation. *Chem. Rev.* **114**, 6733–6778 (2014).

18. Radnai, L. *et al.* Affinity, avidity, and kinetics of target sequence binding to LC8 dynein light chain isoforms. *J. Biol. Chem.* **285**, 38649–57 (2010).

19. Sipko, E. L., Chappell, G. F. & Berlow, R. B. Multivalency emerges as a common feature of intrinsically disordered protein interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **84**, 102742 (2024).

20. Clark, S. A., Jespersen, N., Woodward, C. & Barbar, E. Multivalent IDP assemblies: Unique properties of LC8-associated, IDP duplex scaffolds. *FEBS Lett.* **589**, 2543–51 (2015).

21. Walker, D. R. *et al.* Linker Length Drives Heterogeneity of Multivalent Complexes of Hub Protein LC8 and Transcription Factor ASCIZ. *Biomolecules* **13**, (2023).

22. Jespersen, N. & Barbar, E. Emerging Features of Linear Motif-Binding Hub Proteins. *Trends Biochem. Sci.* **45**, 375–384 (2020).

23. Patil, A., Kinoshita, K. & Nakamura, H. Domain distribution and intrinsic disorder in hubs in the human protein-protein interaction network. *Protein Sci.* **19**, 1461–8 (2010).

24. Dunker, A. K., Cortese, M. S., Romero, P., Iakoucheva, L. M. & Uversky, V. N. Flexible nets. *FEBS J.* **272**, 5129–5148 (2005).

25. Good, M. C., Zalatan, J. G. & Lim, W. A. Scaffold proteins: hubs for controlling the flow of cellular information. *Science* **332**, 680–6 (2011).

26. Buday, L. & Tompa, P. Functional classification of scaffold proteins and related molecules. *FEBS J.* **277**, 4348–4355 (2010).

27. Zeke, A., Lukács, M., Lim, W. A. & Reményi, A. Scaffolds: interaction platforms for cellular signalling circuits. *Trends Cell Biol.* **19**, 364–74 (2009).

28. Alexa, A., Varga, J. & Reményi, A. Scaffolds are 'active' regulators of signaling modules. *FEBS J.* **277**, 4376–82 (2010).

29. DiRusso, C. J., Dashtiahangar, M. & Gilmore, T. D. Scaffold proteins as dynamic integrators of biological processes. *Journal of Biological Chemistry* **298**, 102628 (2022).

30. Verpelli, C., Schmeisser, M. J., Sala, C. & Boeckers, T. M. Scaffold proteins at the postsynaptic density. *Adv. Exp. Med. Biol.* **970**, 29–61 (2012).

31. Shin, S. M. *et al.* GKAP orchestrates activity-dependent postsynaptic protein remodeling and homeostatic scaling. *Nat. Neurosci.* **15**, 1655–1666 (2012).

32. Iasevoli, F., Tomasetti, C. & de Bartolomeis, A. Scaffolding proteins of the post-synaptic density contribute to synaptic plasticity by regulating receptor localization and distribution: relevance for neuropsychiatric diseases. *Neurochem. Res.* **38**, 1–22 (2013).

33. Feng, Z., Chen, X., Zeng, M. & Zhang, M. Phase separation as a mechanism for assembling dynamic postsynaptic density signalling complexes. *Curr. Opin. Neurobiol.* **57**, 1–8 (2019).

34. Niethammer, M., Kim, E. & Sheng, M. Interaction between the C terminus of NMDA receptor subunits and multiple members of the PSD-95 family of membrane-associated guanylate kinases. *J. Neurosci.* **16**, 2157–63 (1996).

35. Takeuchi, M. *et al.* SAPAPs. A family of PSD-95/SAP90-associated proteins localized at postsynaptic density. *J. Biol. Chem.* **272**, 11943–51 (1997).

36. Rasmussen, A. H., Rasmussen, H. B. & Silahtaroglu, A. The DLGAP family: neuronal expression, function and role in brain disorders. *Mol. Brain* **10**, 43 (2017).

37. Gao, C., Tronson, N. C. & Radulovic, J. Modulation of behavior by scaffolding proteins of the post-synaptic density. *Neurobiol. Learn. Mem.* **105**, 3–12 (2013).

38. Kim, E. *et al.* GKAP, a novel synaptic protein that interacts with the guanylate kinase-like domain of the PSD-95/SAP90 family of channel clustering molecules. *J. Cell Biol.* **136**, 669–678 (1997).

39. Boeckers, T. M. *et al.* Proline-rich synapse-associated proteins ProSAP1 and ProSAP2 interact with synaptic proteins of the SAPAP/GKAP family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **264**, 247–52 (1999).

40. Zhu, J. *et al.* Synaptic Targeting and Function of SAPAPs Mediated by Phosphorylation-Dependent Binding to PSD-95 MAGUKs. *Cell Rep.* **21**, 3781–3793 (2017).

41. Erdős, G. & Dosztányi, Z. AIUPred: combining energy estimation with deep learning for the enhanced prediction of protein disorder. *Nucleic Acids Res.* **52**, W176–W181 (2024).

42. Zhang, M. *et al.* Phosphorylation-dependent recognition of diverse protein targets by the cryptic GK domain of MAGI MAGUKs. *Sci. Adv.* **9**, eadf3295 (2023).

43. Hallin, E. I., Bramham, C. R. & Kursula, P. Structural properties and peptide ligand binding of the capsid homology domains of human Arc. *Biochem. Biophys. Rep.* **26**, 100975 (2021).

44. Manneville, J.-B., Jehanno, M. & Etienne-Manneville, S. Dlg1 binds GKAP to control dynein association with microtubules, centrosome positioning, and cell polarity. *J. Cell Biol.* **191**, 585–98 (2010).

45. Naisbitt, S. *et al.* Interaction of the postsynaptic density-95/guanylate kinase domain-associated protein complex with a light chain of myosin-V and dynein. *J. Neurosci.* **20**, 4524–34 (2000).

46. Tong, J., Yang, H., Eom, S. H., Chun, C. & Im, Y. J. Structure of the GH1 domain of guanylate kinase-associated protein from Rattus norvegicus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **452**, 130–135 (2014).

47. Monteiro, P. & Feng, G. SHANK proteins: roles at the synapse and in autism spectrum disorder. *Nat. Rev. Neurosci.* **18**, 147–157 (2017).

48. Lyford, G. L. *et al.* Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron* **14**, 433–45 (1995).

49. Myrum, C. *et al.* Arc is a flexible modular protein capable of reversible self-oligomerization. *Biochem. J.* **468**, 145–58 (2015).

50. Rapali, P. *et al.* DYNLL/LC8: a light chain subunit of the dynein motor complex and beyond. *FEBS J.* **278**, 2980–96 (2011).

51. Pfister, K. K. *et al.* Genetic analysis of the cytoplasmic dynein subunit families. *PLoS Genet.* **2**, e1 (2006).

52. Erdős, G. *et al.* Novel linear motif filtering protocol reveals the role of the LC8 dynein light chain in the Hippo pathway. *PLoS Comput. Biol.* **13**, (2017).

53. Jespersen, N. *et al.* Systematic identification of recognition motifs for the hub protein LC8. *Life Sci. Alliance* **2**, (2019).

54. Hall, J., Hall, A., Pursifull, N. & Barbar, E. Differences in dynamic structure of LC8 monomer, dimer, and dimer-peptide complexes. *Biochemistry* **47**, 11940–52 (2008).

55. Teilum, K., Olsen, J. G. & Kragelund, B. B. On the specificity of protein-protein interactions in the context of disorder. *Biochem. J.* **478**, 2035–2050 (2021).

56. Fan, J., Zhang, Q., Tochio, H., Li, M. & Zhang, M. Structural basis of diverse sequence-dependent target recognition by the 8 kDa dynein light chain. *J. Mol. Biol.* **306**, 97–108 (2001).

57. Estelle, A. B., George, A., Barbar, E. J. & Zuckerman, D. M. Quantifying cooperative multisite binding in the hub protein LC8 through Bayesian inference. *PLoS Comput. Biol.* **19**, e1011059 (2023).

58. Lightcap, C. M. *et al.* Biochemical and structural characterization of the Pak1-LC8 interaction. *J. Biol. Chem.* **283**, 27314–24 (2008).

59. Benison, G., Chiodo, M., Karplus, P. A. & Barbar, E. Structural, thermodynamic, and kinetic effects of a phosphomimetic mutation in dynein light chain LC8. *Biochemistry* **48**, 11381–9 (2009).

60. Rodríguez-Crespo, I. *et al.* Identification of novel cellular proteins that bind to the LC8 dynein light chain using a pepscan technique. *FEBS Lett.* **503**, 135–41 (2001).

61. Benison, G., Karplus, P. A. & Barbar, E. The interplay of ligand binding and quaternary structure in the diverse interactions of dynein light chain LC8. *J. Mol. Biol.* **384**, 954–66 (2008).

62. Slevin, L. K., Romes, E. M., Dandulakis, M. G. & Slep, K. C. The mechanism of dynein light chain LC8-mediated oligomerization of the Ana2 centriole duplication factor. *J. Biol. Chem.* **289**, 20727–39 (2014).

63. Rapali, P. *et al.* Directed evolution reveals the binding motif preference of the LC8/DYNLL hub protein and predicts large numbers of novel binders in the human proteome. *PLoS One* **6**, e18818 (2011).

64. Nyarko, A. *et al.* Conformational dynamics promote binding diversity of dynein light chain LC8. *Biophys. Chem.* **159**, 41–7 (2011).

65. Remaut, H. & Waksman, G. Protein-protein interaction through beta-strand addition. *Trends Biochem. Sci.* **31**, 436–44 (2006).

66. Pettersen, E. F. *et al.* UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Sci.* **30**, 70–82 (2021).

67. Clark, S., Nyarko, A., Löhr, F., Karplus, P. A. & Barbar, E. The Anchored Flexibility Model in LC8 Motif Recognition: Insights from the Chica Complex. *Biochemistry* **55**, 199–209 (2016).

68. Moutin, E., Raynaud, F., Fagni, L. & Perroy, J. GKAP-DLC2 interaction organizes the postsynaptic scaffold complex to enhance synaptic NMDA receptor activity. *J. Cell Sci.* **125**, 2030–40 (2012).

69. Haraguchi, K. *et al.* The hDLG-associated protein DAP interacts with dynein light chain and neuronal nitric oxide synthase. *Genes Cells* **5**, 905–911 (2000).

70. Lajoix, A.-D. *et al.* Cellulose membrane supported peptide arrays for deciphering protein-protein interaction sites: the case of PIN, a protein with multiple natural partners. *Mol. Divers.* **8**, 281–90 (2004).

71. Navarro-Lérida, I. *et al.* Proteomic identification of brain proteins that interact with dynein light chain LC8. *Proteomics* **4**, 339–46 (2004).

72. Moutin, E. *et al.* The stoichiometry of scaffold complexes in living neurons - DLC2 functions as a dimerization engine for GKAP. *J. Cell Sci.* **127**, 3451–62 (2014).

73. Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J.-M. & Brenner, S. E. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res.* **14**, 1188–90 (2004).

74. Hall, J., Karplus, P. A. & Barbar, E. Multivalency in the assembly of intrinsically disordered Dynein intermediate chain. *J. Biol. Chem.* **284**, 33115–21 (2009).

75. Williams, J. C. *et al.* Structural and thermodynamic characterization of a cytoplasmic dynein light chain-intermediate chain complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 10028–33 (2007).

76. Schnabl, J. *et al.* Molecular principles of Piwi-mediated cotranscriptional silencing through the dimeric SFiNX complex. *Genes Dev.* **35**, 392–409 (2021).

77. Zhang, D. *et al.* Interaction between DLC-1 and SAO-1 facilitates CED-4 translocation during apoptosis in the Caenorhabditis elegans germline. *Cell Death Discov.* **8**, 441 (2022).

78. Im, Y. J. *et al.* Crystal structure of the Shank PDZ-ligand complex reveals a class I PDZ interaction and a novel PDZ-PDZ dimerization. *J. Biol. Chem.* **278**, 48099–104 (2003).

79. Ivarsson, Y. Plasticity of PDZ domains in ligand recognition and signaling. *FEBS Lett.* **586**, 2638–47 (2012).

80. Ali, M. *et al.* Integrated analysis of Shank1 PDZ interactions with C-terminal and internal binding motifs. *Curr. Res. Struct. Biol.* **3**, 41–50 (2021).

81. Celis, S. *et al.* Query-guided protein–protein interaction inhibitor discovery. *Chem. Sci.* **12**, 4753–4762 (2021).

82. Ponna, S. K. *et al.* Structural basis for PDZ domain interactions in the post-synaptic density scaffolding protein Shank3. *J. Neurochem.* **145**, 449–463 (2018).

83. Zeng, M. *et al.* A binding site outside the canonical PDZ domain determines the specific interaction between Shank and SAPAP and their function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, E3081-90 (2016).

84. Christensen, N. R. *et al.* Bidirectional protein-protein interactions control liquid-liquid phase separation of PSD-95 and its interaction partners. *iScience* **25**, 103808 (2022).

85. Lv, P. *et al.* O-GlcNAcylation modulates liquid-liquid phase separation of SynGAP/PSD-95. *Nat. Chem.* **14**, 831–840 (2022).

86. Basak, S. *et al.* Different Forms of Disorder in NMDA-Sensitive Glutamate Receptor Cytoplasmic Domains Are Associated with Differences in Condensate Formation. *Biomolecules* **13**, (2022).

87. Luck, K., Charbonnier, S. & Travé, G. The emerging contribution of sequence context to the specificity of protein interactions mediated by PDZ domains. *FEBS Lett.* **586**, 2648–61 (2012).

88. Chica, C., Diella, F. & Gibson, T. J. Evidence for the Concerted Evolution between Short Linear Protein Motifs and Their Flanking Regions. *PLoS One* **4**, e6052 (2009).

89. Palopoli, N., González Foutel, N. S., Gibson, T. J. & Chemes, L. B. Short linear motif core and flanking regions modulate retinoblastoma protein binding

affinity and specificity. *Protein Engineering, Design and Selection* **31**, 69–77 (2018).

90. Simonsen, S. *et al.* Extreme multivalency and a composite short linear motif facilitate PCNA-binding, localisation and abundance of p21 (CDKN1A). *FEBS J.* https://doi.org/10.1111/febs.70133 (2025) doi:10.1111/febs.70133.

91. Mischo, A., Ohlenschläger, O., Hortschansky, P., Ramachandran, R. & Görlach, M. Structural insights into a wildtype domain of the oncoprotein E6 and its interaction with a PDZ domain. *PLoS One* **8**, e62584 (2013).

92. Tyler, R. C., Peterson, F. C. & Volkman, B. F. Distal interactions within the par3-VE-cadherin complex. *Biochemistry* **49**, 951–7 (2010).

93. He, D. *et al.* Conservation of the structural and functional architecture of encapsulated ferritins in bacteria and archaea. *Biochem. J.* **476**, 975–989 (2019).

94. Gógl, G. *et al.* Dynamic control of RSK complexes by phosphoswitch-based regulation. *FEBS J.* **285**, 46–71 (2018).

95. Im, Y. J. *et al.* Structural basis for asymmetric association of the betaPIX coiled coil and shank PDZ. *J. Mol. Biol.* **397**, 457–66 (2010).

96. Lee, J. H., Park, H., Park, S. J., Kim, H. J. & Eom, S. H. The structural flexibility of the shank1 PDZ domain is important for its binding to different ligands. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **407**, 207–12 (2011).

97. Sánta, A., Czajlik, A., Batta, G., Péterfia, B. & Gáspári, Z. Resonance assignment of the Shank1 PDZ domain. *Biomol. NMR Assign.* **16**, 121–127 (2022).

98. Howard, M. J. Protein NMR spectroscopy. *Curr. Biol.* **8**, 331–333 (1998).

99. Varga, S., Kaasen, J. M., Gáspári, Z., Péterfia, B. F. & Mulder, F. A. A. Resonance assignment of the intrinsically disordered actin-binding region of Drebrin. *Biomol. NMR Assign.* https://doi.org/10.1007/s12104-025-10239-0 (2025) doi:10.1007/s12104-025-10239-0.

100. Varga, S. *et al.* Dynamic Interchange of Local Residue-Residue Interactions in the Largely Extended Single Alpha-Helix in Drebrin. *Biochem. J.* **482**, 383–99 (2025).

101. Kovács, D. & Bodor, A. The influence of random-coil chemical shifts on the assessment of structural propensities in folded proteins and IDPs. *RSC Adv.* **13**, 10182–10203 (2023).

102. Narayanan, R. L. *et al.* Automatic assignment of the intrinsically disordered protein Tau with 441-residues. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 11906–7 (2010).

103. Mukrasch, M. D. *et al.* Structural Polymorphism of 441-Residue Tau at Single Residue Resolution. *PLoS Biol.* **7**, e1000034 (2009).

104. Uversky, V. N. Natively unfolded proteins: a point where biology waits for physics. *Protein Sci.* **11**, 739–56 (2002).

105. Sattler, M. Heteronuclear multidimensional NMR experiments for the structure determination of proteins in solution employing pulsed field gradients. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **34**, 93–158 (1999).

106. Permi, P. & Annila, A. Coherence transfer in proteins. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **44**, 97–137 (2004).

107. Mäntylahti, S., Tossavainen, H., Hellman, M. & Permi, P. An intraresidual i(HCA)CO(CA)NH experiment for the assignment of main-chain resonances in 15N, 13C labeled proteins. *J. Biomol. NMR* **45**, 301–310 (2009).

108. Kovács, D. & Bodor, A. The influence of random-coil chemical shifts on the assessment of structural propensities in folded proteins and IDPs. *RSC Adv.* **13**, 10182–10203 (2023).

109. Tamiola, K., Acar, B. & Mulder, F. A. A. Sequence-specific random coil chemical shifts of intrinsically disordered proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 18000–3 (2010).

110. Sanz-Hernández, M. & De Simone, A. The PROSECCO server for chemical shift predictions in ordered and disordered proteins. *J. Biomol. NMR* **69**, 147–156 (2017).

111. Nielsen, J. T. & Mulder, F. A. A. POTENCI: prediction of temperature, neighbor and pH-corrected chemical shifts for intrinsically disordered proteins. *J. Biomol. NMR* **70**, 141–165 (2018).

112. Kjaergaard, M. & Poulsen, F. M. Sequence correction of random coil chemical shifts: correlation between neighbor correction factors and changes in the Ramachandran distribution. *J. Biomol. NMR* **50**, 157–65 (2011).

113. Nielsen, J. T. & Mulder, F. A. A. CheSPI: chemical shift secondary structure population inference. *J. Biomol. NMR* **75**, 273–291 (2021).

114. Hobbs, B., Drant, J. & Williamson, M. P. The measurement of binding affinities by NMR chemical shift perturbation. *J. Biomol. NMR* **76**, 153–163 (2022).

115. Harmat, Z., Dudola, D. & Gáspári, Z. DIPEND: An Open-Source Pipeline to Generate Ensembles of Disordered Segments Using Neighbor-Dependent Backbone Preferences. *Biomolecules* **11**, (2021).

116. Webb, B. & Sali, A. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. *Curr. Protoc. Bioinformatics* **54**, (2016).

117. Yang, Z. *et al.* UCSF Chimera, MODELLER, and IMP: an integrated modeling system. *J. Struct. Biol.* **179**, 269–78 (2012).

118. Van Der Spoel, D. *et al.* GROMACS: fast, flexible, and free. *J. Comput. Chem.* **26**, 1701–18 (2005).

119. Páll, S. *et al.* Heterogeneous parallelization and acceleration of molecular dynamics simulations in GROMACS. *J. Chem. Phys.* **153**, (2020).

120. Mirdita, M. *et al.* ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nat. Methods* **19**, 679–682 (2022).

121. Carter, P. DSSPcont: continuous secondary structure assignments for proteins. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3293–3295 (2003).

122. Kabsch, W. & Sander, C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* **22**, 2577–637 (1983).

123. Touw, W. G. *et al.* A series of PDB-related databanks for everyday needs. *Nucleic Acids Res.* **43**, D364-8 (2015).

124. Simm, D., Hatje, K. & Kollmar, M. Waggawagga: comparative visualization of coiled-coil predictions and detection of stable single α-helices (SAH domains). *Bioinformatics* **31**, 767–769 (2015).

125. Koradi, R., Billeter, M. & Wüthrich, K. MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J. Mol. Graph.* **14**, 51–5, 29–32 (1996).

126. Olechnovič, K. & Venclovas, C. Voronota: A fast and reliable tool for computing the vertices of the Voronoi diagram of atomic balls. *J. Comput. Chem.* **35**, 672–81 (2014).

127. Troshin, P. V, Procter, J. B. & Barton, G. J. Java bioinformatics analysis web services for multiple sequence alignment--JABAWS:MSA. *Bioinformatics* **27**, 2001–2 (2011).

128. Nagy-Kanta, E. *et al.* Residual flexibility in the topologically constrained multivalent complex between the GKAP scaffold and LC8 hub proteins. *FEBS J.* https://doi.org/10.1111/febs.70219 (2025) doi:10.1111/febs.70219.

129. Nagy-Kanta, E. *et al.* 1H, 13C, and 15N resonance assignment of the C terminal region of the disordered postsynaptic scaffold protein GKAP. *Biomol. NMR Assign.* **20**, 2 (2025).

130. Goda, N. *et al.* A method for systematic assessment of intrinsically disordered protein regions by NMR. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 15743–15760 (2015).

131. Tolkatchev, D., Plamondon, J., Gingras, R., Su, Z. & Ni, F. Recombinant Production of Intrinsically Disordered Proteins for Biophysical and Structural Characterization. in *Instrumental Analysis of Intrinsically Disordered Proteins* 653–670 (Wiley, 2010). doi:10.1002/9780470602614.ch22.

132. Tang, N. C. *et al.* Synthetic intrinsically disordered protein fusion tags that enhance protein solubility. *Nat. Commun.* **15**, 3727 (2024).

133. Singh, S. M. & Panda, A. K. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J. Biosci. Bioeng.* **99**, 303–10 (2005).

134. Hwang, P. M., Pan, J. S. & Sykes, B. D. Targeted expression, purification, and cleavage of fusion proteins from inclusion bodies in Escherichia coli. *FEBS Lett.* **588**, 247–52 (2014).

135. Pesarrodona, M., Latorre, I. & Salvatella, X. Intrinsically Disordered Proteins (IDP): Purification Under Denaturing Conditions. *Methods Mol. Biol.* **2406**, 359–370 (2022).

136. Churion, K. A. & Bondos, S. E. Identifying solubility-promoting buffers for intrinsically disordered proteins prior to purification. *Methods Mol. Biol.* **896**, 415–27 (2012).

137. Graether, S. P. Troubleshooting guide to expressing intrinsically disordered proteins for use in NMR experiments. *Front. Mol. Biosci.* **5**, (2019).

138. Linding, R., Schymkowitz, J., Rousseau, F., Diella, F. & Serrano, L. A Comparative Study of the Relationship Between Protein Structure and β-Aggregation in Globular and Intrinsically Disordered Proteins. *J. Mol. Biol.* **342**, 345–353 (2004).

139. Szőllősi, E., Házy, E., Szász, Cs. & Tompa, P. Large systematic errors compromise quantitation of intrinsically unstructured proteins. *Anal. Biochem.* **360**, 321–323 (2007).

140. Contreras-Martos, S. *et al.* Quantification of intrinsically disordered proteins: A problem not fully appreciated. *Front. Mol. Biosci.* **5**, (2018).

141. Lenton, S., Tully, M. D. & Skepö, M. From dilute to concentrated solutions of intrinsically disordered proteins: Sample preparation and data collection. in 457–478 (2022). doi:10.1016/bs.mie.2022.08.036.

142. Micsonai, A. *et al.* BeStSel: analysis site for protein CD spectra—2025 update. *Nucleic Acids Res.* **53**, W73–W83 (2025).

143. Miles, A. J., Drew, E. D. & Wallace, B. A. DichroIDP: a method for analyses of intrinsically disordered proteins using circular dichroism spectroscopy. *Commun. Biol.* **6**, 823 (2023).

144. Micsonai, A. *et al.* Disordered–Ordered Protein Binary Classification by Circular Dichroism Spectroscopy. *Front. Mol. Biosci.* **9**, (2022).

145. Benison, G., Karplus, P. A. & Barbar, E. Structure and dynamics of LC8 complexes with KXTQT-motif peptides: swallow and dynein intermediate chain compete for a common site. *J. Mol. Biol.* **371**, 457–68 (2007).

146. Sebák, F. *et al.* Selective 1 H α NMR Methods Reveal Functionally Relevant Proline cis/trans Isomers in Intrinsically Disordered Proteins: Characterization of Minor Forms, Effects of Phosphorylation, and Occurrence in Proteome. *Angewandte Chemie International Edition* **61**, (2022).

147. Sebák, F., Szolomájer, J., Papp, N., Tóth, G. K. & Bodor, A. Proline cis/trans Isomerization in Intrinsically Disordered Proteins and Peptides. *Frontiers in Bioscience-Landmark* **28**, (2023).

148. Varadi, M. *et al.* AlphaFold Protein Structure Database in 2024: providing structure coverage for over 214 million protein sequences. *Nucleic Acids Res.* **52**, D368–D375 (2024).

149. Tunyasuvunakool, K. *et al.* Highly accurate protein structure prediction for the human proteome. *Nature* **596**, 590–596 (2021).

150. Lobanov, M. Y. & Galzitskaya, O. V. How Common Is Disorder? Occurrence of Disordered Residues in Four Domains of Life. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 19490–507 (2015).

151. Reardon, P. N. *et al.* The dynein light chain 8 (LC8) binds predominantly 'in-register' to a multivalent intrinsically disordered partner. *J. Biol. Chem.* **295**, 4912–4922 (2020).

152. Frank, R. A. & Grant, S. G. Supramolecular organization of NMDA receptors and the postsynaptic density. *Curr. Opin. Neurobiol.* **45**, 139–147 (2017).

153. Grant, S. G. N. The synaptomic theory of behavior and brain disease. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **83**, 45–56 (2018).

154. Grant, S. G. N. Synapse diversity and synaptome architecture in human genetic disorders. *Hum. Mol. Genet.* **28**, R219–R225 (2019).

Függelék

1. táblázat: Az LC8 kötő partnerek motívum szekvenciái és kötési állandóik (K_d)

2. táblázat: A használt fehérjekonstrukciók adatai

3. A. táblázat: A GKAP-DYL fehérjeszakasz jelhozzárendeléséhez használt NMR spektrumok adatai.

   B. táblázat: A GKAP-Ct43 fehérjeszakasz jelhozzárendeléséhez használt NMR spektrumok adatai.

4. A. táblázat: Az izotóp jelölt GKAP-DYL molekula titrálása jelöletlen LC8 dimerrel; a különböző sztöchiometria mellett felvett spektrumsorozatok adatai.

   B. táblázat: Az izotóp jelölt LC8 dimer molekula titrálása jelöletlen GKAP-DYL konstrukcióval; a különböző sztöchiometria mellett felvett spektrumsorozatok adatai.

   C. táblázat: Az izotóp jelölt GKAP-Ct43 molekula titrálása jelöletlen Shank1-PDZ domén molekulával; a különböző sztöchiometria mellett felvett 1H-15N HSQC spektrumsorozat adatai.

Függelék 1. táblázat: Az LC8 kötő partnerek motívum szekvenciái és kötési állandóik (K_d)

Partner név	Partner Uniprot azonosító	Motívum szekvencia	PDB ID	Konstr. mérete (amino-savszám)	Multi-valencia, dimerizáció	Kd (μM) ± SE (μM)	Kd mérési módszer	PMID	Megjegy-zés
ana2	Q9XZ31	ICAGTQTD	4QH7_1	9	-	1.14±0.07	ITC	24920673	
ana2	Q9XZ31	STTGTQCD	4QH8_1	9	-	12.8±1.5	ITC	24920673	
WWC1	Q8IX03	LDVSSQTD	-	8	-	0.45±0.03	SPR	29240760	
WWC1	Q8IX03	VDKETNTE	-	8	-	4.00±0.50	SPR	29240760	
WWC2	Q6AWC2	LDAGSQTS	-	8	-	32.7±2.97	SPR	29240760	
WWC2	Q6AWC2	VDKETNTD	-	8	-	17.6±0.54	SPR	29240760	
WWC3	Q9ULE0	CDAGSQTD	-	8	-	5.34±0.18	SPR	29240760	
WWC3	Q9ULE0	VDKETNTE	-	8	-	3.50±0.15	SPR	29240760	
AMOT	Q4VCS5	RDCSTQTE	-	8	-	1.20±0.04	SPR	29240760	
AMOTL1	Q8IY63	KDSSTQTD	-	8	-	1.55±0.04	SPR	29240760	
AMOTL2	Q9Y2J4	RDGSTQTE	-	8	-	1.98±0.19	SPR	29240760	
Bmf	Q96LC9	DKATQTL	-	7	-	1.05+0.04	ITC	20889982	
Bmf	Q96LC9	DKATQTL	-	7	-	0.735+0.022	ITC	20889982	
Bmf	Q96LC9	dimer	-	-	multi-valens	0.003+0.00046	ITC	20889982	
Bmf	Q96LC9	DKATQTL	-	7	-	3.58±0.4	SPR	20889982	
Bmf	Q96LC9	DKATQTL	-	7	-	110±20	SPR	20889982	
nNOS	syntetic	DTGIQVD	-	7	-	7+0.23	ITC	20889982	
nNOS	syntetic	DTGIQVD	-	7	-	5.41+0.15	ITC	20889982	
Myosin Va	Q9Y4I1-2	DKNTMTD	-	7	-	8.85+0.67	ITC	20889982	
Myosin Va	Q9Y4I1-2	ELESENKKLKNELNELRKALSEKSAPEVTAPGAPAYRVLMEQLTSVSEELDVRKEEVLILRSQLVSQKEAIQPKDDKNTMTDSTILLE	-	88	multi-valens	0.037+0.005	ITC	20889982	
dimeric myoVa	Q9Y4I1-2	DKNTMTD	-	7	-	0.05±0.0147	SPR	20889982	
dimeric myoVa	Q9Y4I1-2	DKNTMTD	-	7	-	2.69±0.86	SPR	20889982	
Pak1	Q13153	DVATSPI	-	7	-	42.7+5.3	ITC	20889982	
dyn inter-mediate	Q62871	YTKETQTP	2PG1_1	33	-	-	Thermo-dynamic analysis	17551010	

dyn inter-mediate	Q24246	KETLVYTKQTQTT	3FM7_3	13	-	8.0±1.5	ITC	19759397	
dyn inter-mediate chain	Q24246	NLSVYNVQATNIPPKETLVYTKQTQTT	3FM7_3	28	-	0.5±0.06	ITC	19759397	
dyn inter-mediate chain	Q24246	NLVYTKQTQTTPPKETLVYTKQTQTTST	3GLW_1	28	-	8.0±2.1	ITC	19759397	
protein panora-mix	Q9W2H9	KNAATQTE	7K3J_1, 7K3K, 7K3L	8	-	0.075	ITC	33574069	
protein panora-mix	Q9W2H9	RDAGTQVR	7K3J_1, 7K3K, 7K3L	8	-	0.14	ITC	33574069	
SAO-1	C6KRN1	MQHANVATD	7Y8W_1	8	-	0.5±0.07	ITC	36323675	
SAO-1	C6KRN1	MKSVECQTE	7Y8W_1	8	-	0.5±0.07	ITC	36323675	
szintetikus	-	Ac-DKSTQTD	-	7	-	5.6	ITC	21533121	
szintetikus	-	Ac-GDKSTQTD	-	8	-	0.56	ITC	21533121	
szintetikus	-	Ac-VDKSTQTD	-	8	-	0.07	ITC	21533121	
szintetikus	-	Ac-SRGTQTE	2XQQ_1	7	-	15.2	ITC	21533121	
szintetikus	-	Ac-GSRGTQTE	-	8	-	1.64	ITC	21533121	
szintetikus	-	dimeric-GSGDKSTQTD*	-	-	dimer	<0.007	ITC	21533121	
szintetikus	-	dimeric-GSVDKSTQTD*	-	-	dimer	<0.009	ITC	21533121	
szintetikus	-	dimeric-GSGSRGTQTE*	-	-	dimer	<0.003	ITC	21533121	
szintetikus	-	dimeric-GSVSRGTQTE*	-	-	dimer	<0.007	ITC	21533121	
EML3	Q32P44	VSRGTQTE	-	86	-	0.05	ITC	21533121	
myosin Va	Q9Y4I1	MSQKEAIQPKDDKNTMTDSTILLE	4D07_1	25	-	9	STD	25312846	
NOS	P29476	KAEMKDTGIQVDR	1CMI_1	13	-	-	-	10426949 [S1]	
BIM	O43521	MSCDKSTQT	1F95_1	9	-	-	-	11178896	BMRB: 4931
nNOS	syntetic	MKDTGIQVDRDLDGKSHK	1F96_1	18	-	-	-	11178896	BMRB: 4911
IC chain DYN	Q24246	KETLVYTKQTQTTSTG	2P2T_1	16	-	-	-	17570393	BMRB: 15078

Swallow	P40688	MYHIRSATSAKATQTD	3E2B_1	16	-	-	-	17570393	
pak1	Q13153	TPTRDVATSP	3DVP_1	10	-	-	-	18650427	
Swallow	P40688	MYHIRSATSAKATQTD	3E2B_1	16	-	-	-	18948118	
NEK9	Q8TD19	VGMHSKGTQTA	3ZKE_1, 3ZKF_1	11	-	0.16 (with P-serine: 0.96)	ITC	23482567	
chica	Q9H4H8	multivalens	-	68	multi-valens	0.4 ± 0.1	ITC	26652654	BMRB: 26684
chica QT1p	Q9H4H8	EKAIDAATQTE	5E0L_1	11	-	0.4 ± 0.1	ITC	26652654	BMRB: 26684
chica QT2p	Q9H4H8	SVSEVTQTS	-	9	-	6.3 ± 0.4	ITC	26652654	BMRB: 26684
chica QT3p	Q9H4H8	TTACAGTQTA	-	10	-	nd	ITC	26652654	BMRB: 26684
chica QT4p	Q9H4H8	SYWSRSTTTQTD	5E0M_1	12	-	5.2 ± 0.1	ITC	26652654	BMRB: 26684
L-MAG	P20917	KDSYTLTE	6GZJ_1, 6GZL_1	54	-	7.3	ITC	30261098 [S2]	
bmf	Q96LC9	TSQEDKATQTLSPASPSQGV	7CNU_1	20	-	0.79 ± 0.095	ITC	34462553 [S3]	
vp35 virus	-	RNSQTQTD	7D35_1	8	-	3.91	ITC	33630249 [S4]	
vp35 virus	-	KTRNSQTQTD	-	10	-	3.91	ITC	33630249 [S4]	
Bdbv	-	QTRSVQTQTD	-	10	-	0.820	ITC	33630249 [S4]	
Sudv	-	RKSDKQVQTD	-	10	-	6.45	ITC	33630249 [S4]	
Tafv	-	RTRNTQTQTD	-	10	-	4.29	ITC	33630249 [S4]	
Bomv	-	KRVDNDTQTD	-	10	-	27.9	ITC	33630249 [S4]	
Restv	-	RTCTSSSQTE	-	10	-	62.1	ITC	33630249 [S4]	
Kib1	Q8IX03	QYLDVSSQTD	-	10	-	0.45 ± 0.03	ITC	21621319	
Swa	P40688	ATSAKATQTD	-	10	-	0.62 ± 0.04	ITC	21621319	
Kib2	Q9ULE0	LKVDKETNTE	-	10	-	4.0 ± 0.5	ITC	21621319	
IC	syntetic	IVYTKQTQTT	-	10	-	3.0 ± 0.1	ITC	21621319	
Bim	syntetic	MSCDKSTQTP	-	10	-	0.52 ± 0.03	ITC	21621319	
NUP159	P40477	multivalens	-	53	dimer	1.9 ± 0.03	ITC	23223634	
NUP159	P40477	multivalens	-	65	multi-valens	1.9 ± 0.04	ITC	23223634	
NUP159	P40477	multivalens	-	78	multi-valens	2.8 ± 0.02	ITC	23223634	
NUP159	P40477	multivalens	-	90	multi-valens	3.8 ± 0.10	ITC	23223634	

NUP159	P40477	multivalens	-	103	multi-valens	4.8 ± 0.04	ITC	23223634	
NUP159	P40477	multivalens	-	56	dimer	2.0 ± 0.01	ITC	23223634	
NUP159	P40477	ETCNFSVQTF	-	44	-	1.0 ± 0.01	ITC	23223634	
NUP159	P40477	multivalens	-	373	multi-valens	5.1 ± 0.1	ITC	23223634	
ASCIZ	O43313	multivalens	-	147	multi-valens	1.4 ± 0.1	ITC	29714690 [S5]	
ASCIZ	O43313	multivalens	-	83	multi-valens	2.4 ± 0.1	ITC	29714690 [S5]	
ASCIZ	O43313	multivalens	-	70	multi-valens	4.1 ± 0.2	ITC	29714690 [S5]	
ASCIZ	O43313	multivalens	-	55	multi-valens	1.0 ± 0.1	ITC	29714690 [S5]	
ASCIZ	O43313	multivalens	-	67	multi-valens	1.6 ± 0.4	ITC	29714690 [S5]	
ASCIZ	O43313	QKLDMETQTE	-	15	-	14 ± 3.5	ITC	29714690 [S5]	
ASCIZ	O43313	LLRDIETQTP	-	15	-	7 ± 0.4	ITC	29714690 [S5]	
ASCIZ	O43313	TRGDIGTMTD	-	15	-	weak	ITC	29714690 [S5]	
ASCIZ	O43313	TSAHMYTQTC	-	14	-	15 ± 0.8	ITC	29714690 [S5]	
ASCIZ	O43313	GLSHIQTQTH	-	14	-	11 ± 0.6	ITC	29714690 [S5]	
ASCIZ	O43313	LYNTQHTQTC	-	15	-	20 ± 1.0	ITC	29714690 [S5]	
ASCIZ	O43313	NFQSTCTQTR	-	14	-	10 ± 0.5	ITC	29714690 [S5]	
ASCIZ	Q9VZU1	multivalens	-	70	multi-valens	4.8 ± 0.2	ITC	36979339	QT 2-4
ASCIZ	Q9VZU1	RDIETQTP	-	70	-	9.3 ± 0.3	ITC	36979339	QT2
ASCIZ	Q9VZU1	GDIGTMTD	-	70	-	36 ± 2	ITC	36979339	QT3
ASCIZ	Q9VZU1	AHMYTQTC	-	70	-	15 ± 1	ITC	36979339	QT4
ASCIZ	Q9VZU1	multivalens	-	70	multi-valens, dimer	6.3 ± 0.3	ITC	36979339	QT2,3
ASCIZ	Q9VZU1	multivalens	-	70	multi-valens, dimer	4.4 ± 0.4	ITC	36979339	QT3,4
ASCIZ	Q9VZU1	multivalens	-	70	multi-valens, dimer	1.8 ± 0.1	ITC	36979339	QT2,4
53BP1	Q12888	multivalens	-	85	multi-valens	0.3 ± 0.2	ITC	36335430 [S6]	LBD
53BP1	Q12888	NNIGIQTM	-	7	-	5.2 ± 0.9	ITC	36335430 [S6]	QT1
53BP1	Q12888	VSAATQTI	-	7	-	0.62 ± 0.06	ITC	36335430 [S6]	QT2
53BP1	Q12888	QDATVQTE	-	7	-	1 ± 0.3	ITC	36335430 [S6]	QT3
53BP1	Q12888	multivalens	-	24	dimer	0.18 ± 0.004	ITC	36335430 [S6]	QT12
53BP1	Q12888	multivalens	-	32	dimer	0.19 ± 0.009	ITC	36335430 [S6]	QT23

LCA5	Q86VQ0	CTKGVQTM	-	8	-	8.1	FP	36114230 [S7]	
LCA5	Q86VQ0	CTKGVQTM	-	8	-	2.6	ITC	36114230 [S7]	
LCA5	Q86VQ0	multivalens	-	22	dimer	0.76 ± 0.06	ITC	36114230 [S7]	
LCA5	Q86VQ0	multivalens	-	22	dimer	0.68 ± 0.08	ITC	36114230 [S7]	
LCA5	Q86VQ0	multivalens	-	22	dimer	1.22 ± 0.08	ITC	36114230 [S7]	
Pac11a	P40960	multivalens	-	87	dimer	0.04 ± 0.01	ITC	26253171	
Pac11a	P40960	multivalens	-	80	dimer	0.04 ± 0.01	ITC	26253171	
Swa	P40688	ATSAKATQTD	3BRL_1	-	-	-	-	19863079	
GKAP	P97836	NRCLSIGIQVD	-	-	-	2.4	ITC	-	personal communication
ASCIZ	Q9VZU1	multivalens	-	76	multi-valens	-	-	32139510	BMRB: 28033
synthetic	-	multivalens	-	66	multi-valens	0.036±0.003	ITC	35245498 [S8]	
IQUB	Q8NA54	HNAGTQTV	-	8	-	3.57±0.13	SPR	[S9]	https://doi.org/10.1101/2023.09.15.557927
MAP4	P27816	GSKSTQTV	-	8	-	4.42±0.68	SPR	[S9]	
CFAP91	Q7Z4T9	RDADVQTD	-	8	-	0.55±0.03	SPR	[S9]	
CEP152	O94986	LDCGSQTD	-	8	-	2.37±0.29	SPR	[S9]	
CDK5RAP2	Q96SN8	KDASVQTV	-	8	-	12.46±3.88	FP	[S9]	
AKAP9	Q99996	RNSSTQTQ	-	8	-	12.40±3.08	FP	[S9]	
ALMS1	Q8TCU4	KDIGTQTN	-	8	-	19.20±5.50	FP	[S9]	
OFD1	O75665	KESCNMETQTS	-	11	-	12.5±1.3	SPR	[S9]	
OFD1	O75665	KESCNMETQTS	-	11	-	12.8±1.7	kompeti-tív FP	[S9]	

[S1]	Liang, J., Jaffrey, S. R., Guo, W., Snyder, S. H., & Clardy, J. (1999). Structure of the PIN/LC8 dimer with a bound peptide. *Nature structural biology*, *6*(8), 735–740.
[S2]	Myllykoski, M., Eichel, M. A., Jung, R. B., Kelm, S., Werner, H. B., & Kursula, P. (2018). High-affinity heterotetramer formation between the large myelin-associated glycoprotein and the dynein light chain DYNLL1. *Journal of neurochemistry*, *147*(6), 764–783.
[S3]	Zhi, Z., Ouyang, Z., Ren, Y., Cheng, Y., Liu, P., Wen, Y., & Shao, Y. (2022). Non-canonical phosphorylation of Bmf by p38 MAPK promotes its apoptotic activity in anoikis. *Cell death and differentiation*, *29*(2), 323–336.
[S4]	Lim, D., Shin, H. C., Choi, J. S., Kim, S. J., & Ku, B. (2021). Crystal structure of human LC8 bound to a peptide from Ebola virus VP35. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)*, *59*(4), 410–416.
[S5]	Clark, S., Myers, J. B., King, A., Fiala, R., Novacek, J., Pearce, G., Heierhorst, J., Reichow, S. L., & Barbar, E. J. (2018). Multivalency regulates activity in an intrinsically disordered transcription factor. *eLife*, *7*, e36258.

[S6]	Howe, J., Weeks, A., Reardon, P., & Barbar, E. (2022). Multivalent binding of the hub protein LC8 at a newly discovered site in 53BP1. *Biophysical journal*, *121*(23), 4433–4442.
[S7]	Szaniszló, T., Fülöp, M., Pajkos, M., Erdős, G., Kovács, R. Á., Vadászi, H., Kardos, J., & Dosztányi, Z. (2022). The interaction between LC8 and LCA5 reveals a novel oligomerization function of LC8 in the ciliary-centrosome system. *Scientific reports*, *12*(1), 15623.
[S8]	Mostofian, B., McFarland, R., Estelle, A., Howe, J., Barbar, E., Reichow, S. L., & Zuckerman, D. M. (2022). Continuum dynamics and statistical correction of compositional heterogeneity in multivalent IDP oligomers resolved by single-particle EM. *Journal of molecular biology*, *434*(9), 167520.
[S9]	Pajkos, M., Szaniszló, T., Fülöp, M. & Dosztányi, Z. (2023.) Entering new circles: Expansion of the LC8/DYNLL1 interactome in the ciliary-centrosomal network through system-driven motif evolution. *bioRxiv* 2023.09.15.557927 doi:10.1101/2023.09.15.557927

Függelék - 2. táblázat: A használt fehérjekonstrukciók adatai

	Molekulasúly (Da)			Amino-sav-szám	Becsült pI	Becsült töltés adott pH-n:	
	jelöletlen		^{13}C-^{15}N-jelölt				
	izotópok szerint átlagolt	100% jelölet-len	100% izotóp jelölt			pH 7.4	pH 6.0
GKAP-DYL	7014.88	7010.45	7398.17	61	8.92	2.80	4.00
His-GKAP-DYL	9495.47	9489.53	10023.53	81	7.61	0.40	5.60
DYNLL2	10631.077	10624.16	11226.38	92	7.47	0.10	3.30
His-DYNLL2	13111.67	13103.24	13851.74	112	6.86	-2.3	4.90
2 GKAP + 4 DYNLL2 monomer	56,6 kDa			490			
His-GKAP-CT43	7726.46	7721.75	8159.53	67	7.75	0.40	5.50
GKAP-CT43	5245.87	5242.67	5534.18	47	10.23	2.80	3.90
His-Shank-PDZ (S757)	15083.2	-	-	140	7.02	-1.4	5.2
Shank-PDZ (S757)	13151.13	-	-	119	8.5	1	3.6

Függelék - 2. táblázat: A használt fehérjekonstrukciók adatai

	Extinkciós koefficiens 280 nm-en $(mg/mL)^{-1}$ cm^{-1}			
	jelöletlen, izotópok szerint átlagolt		^{13}C-^{15}N-jelölt, 100% izotóp jelölt	
	diszulfid híddal	diszulfid híd nélkül	diszulfid híddal	diszulfid híd nélkül
GKAP-DYL	0.02	0.00	0.02	0.00
His-GKAP-DYL	0.28	0.27	0.27	0.26
DYNLL2	1.27	1.26	1.20	1.19
His-DYNLL2	1.22	1.21	1.16	1.15
His-GKAP-CT43	0.50	0.50	0.47	0.47
GKAP-CT43	0.24	0.24	0.23	0.23
His-Shank-PDZ (S757)	0.72		-	
Shank-PDZ (S757)	0.66		-	

Függelék - 2. táblázat: A használt fehérjekonstrukciók adatai

	Rekombináns peptidszakasz	Címke szekvencia
GKAP-DYL	TEV hasítóhely	GSHM
His-GKAP-DYL	6xHis címke, TEV hasítóhely	GHHHHHHDYDIPTTENLYFQGSHM
DYNLL2	TEV hasítóhely	GSHM
His-DYNLL2	6xHis címke, TEV hasítóhely	GHHHHHHDYDIPTTENLYFQGSHM
His-GKAP-CT43	6xHis címke, TEV hasítóhely	GHHHHHHDYDIPTTENLYFQGSHM
GKAP-CT43	TEV hasítóhely	GSHM
His-Shank-PDZ (S757)	6xHis címke, TEV hasítóhely	MGHHHHHHDYDIPTTENLYFQGSHM
Shank-PDZ (S757)	TEV hasítóhely	GSHM

Függelék - 2. táblázat: A használt fehérjekonstrukciók adatai

	A konstrukció teljes szekvenciája
GKAP-DYL	GSHMRKKDFKKNRC**LSIGIQVDDAEE**SEKMAESKTS**SKFQSVGVQVEEE**KCFRRFTRSNSV
His-GKAP-DYL	GHHHHHHDYDIPTTENLYFQGSHMRKKDFKKNRC**LSIGIQVDDAEE**SEKMAESKTS**SKFQSVGVQVEEE**KCFRRFTRSNSV
DYNLL2	GSHMSDRKAVIKNADMSEDMQQDAVDCATQAMEKYNIEKDIAAYIKKEFDKKYNPTWHCIVGRNFGSYVTHETKHFIYFYLGQVAILLFKSG
His-DYNLL2	GHHHHHHDYDIPTTENLYFQGSHMSDRKAVIKNADMSEDMQQDAVDCATQAMEKYNIEKDIAAYIKKEFDKKYNPTWHCIVGRNFGSYVTHETKHFIYFYLGQVAILLFKSG
His-GKAP-CT43	GHHHHHHDYDIPTTENLYFQGSHMSSQRQEARKRLMAAKRAASVRQNSATESAESIEIYIPEAQTRL
GKAP-CT43	GSHMSSQRQEARKRLMAAKRAASVRQNSATESAESIEIYIPEAQTRL
His-Shank-PDZ (S757)	MG**HHHHHH**DYDIPTT**ENLYFQ****GSHM**GSDYIIKEKTVLLQKKDSEGFGFVLRGAKAQTPIEEFTPTPAFPALQYLESVDEGGVAWRAGLRMGDFLIEVNGQNVVKVGHRQVVNMIRQGGNTLMVKVVMVTRHPDMDEAVHK
Shank-PDZ (S757)	GSHMGSDYIIKEKTVLLQKKDSEGFGFVLRGAKAQTPIEEFTPTPAFPALQYLESVDEGGVAWRAGLRMGDFLIEVNGQNVVKVGHRQVVNMIRQGGNTLMVKVVMVTRHPDMDEAVHK

Függelék – 3.a táblázat: A GKAP-DYL fehérjeszakasz jelhozzárendeléséhez használt NMR spektrumok adatai.

TENGELYEK	H	N	C
^{1}H Watergate (NS=8)			
Adatpontok száma	2048	-	-
Spektrumszélesség [Hz]	12820	-	-
Spektrális tartomány [ppm]	-3,2-12,8	-	-
^{1}H-^{15}N HSQC (NS=4)			
Adatpontok száma	4096	1024	-
Spektrumszélesség [Hz]	12820	2800	-
Spektrális tartomány [ppm]	-3,2-12,8	100,9-135,4	-
konstans-idejű ^{1}H-^{13}C HSQC-alifás (NS=8)			
Adatpontok száma	4096	-	2048
Spektrumszélesség [Hz]	12820	-	16077
Spektrális tartomány [ppm]	-3,2-12,8	-	5,8-85,7
konstans-idejű ^{1}H-^{13}C HSQC-aromás (NS=16)			
Adatpontok száma	4096	-	1024
Spektrumszélesség [Hz]	12820	-	7042
Spektrális tartomány [ppm]	-3,2-12,8	-	113-148
HNCACB (NS=24)			
Adatpontok száma	512	256	256
Spektrumszélesség [Hz]	2790	1784	15015
Spektrális tartomány [ppm]	6,5-10	110,2-132,2	8,6-83,2
HN(CO)CACB (NS=24)			
Adatpontok száma	512	256	256
Spektrumszélesség [Hz]	2790	1784	15015
Spektrális tartomány [ppm]	6,5-10	110,2-132,2	8,6-83,2
HNCO (NS=4)			
Adatpontok száma	512	256	256
Spektrumszélesség [Hz]	2790	1784	2800
Spektrális tartomány [ppm]	6,5-10	110,2-132,2	169,8-183,8
HBHA(CO)NH (NS=24)			
Adatpontok száma	512	256	256
Spektrumszélesség [Hz]	2790	1784	8000
Spektrális tartomány [ppm]	5,6-9	110,2-132,2	-2,7-7,3
(H)CC(CO)NH (NS=8)			
Adatpontok száma	512	256	256
Spektrumszélesség [Hz]	2790	1784	15015
Spektrális tartomány [ppm]	6,5-10	110,2-132,2	8,4-83

H(CCCO)NH (NS=8)			
Adatpontok száma	512	256	256
Spektrumszélesség [Hz]	2790	1784	8000
Spektrális tartomány [ppm]	6,5-10	110,2-132,2	-2,7-7,3
i(HCA)CO(CA)NH (NS=32)			
Adatpontok száma	400	256	256
Spektrumszélesség [Hz]	2180	1784	2818,5
Spektrális tartomány [ppm]	6,8-9,5	110,2-132,2	169,8-183,8

Függelék – 3.b táblázat: A GKAP-Ct43 fehérjeszakasz jelhozzárendeléséhez használt NMR spektrumok adatai.

TENGELYEK	H	N	C
^{1}H Watergate (NS=16)			
Adatpontok száma	2048	-	-
Spektrumszélesség [Hz]	12820	-	-
Spektrális tartomány [ppm]	-3,2-12,8	-	-
^{1}H-^{15}N HSQC (NS=2)			
Adatpontok száma	2048	1024	-
Spektrumszélesség [Hz]	4006	1784	-
Spektrális tartomány [ppm]	4,8-9,8	109,1-131,1	-
konstans-idejű ^{1}H-^{13}C HSQC-alifás (NS=4)			
Adatpontok száma	4096	-	2048
Spektrumszélesség [Hz]	12820	-	16077
Spektrális tartomány [ppm]	-3,2-12,8	-	5,8-85,7
konstans-idejű ^{1}H-^{13}C HSQC-aromás (NS=4)			
Adatpontok száma	1024	-	512
Spektrumszélesség [Hz]	4006	-	7042
Spektrális tartomány [ppm]	4,8-9,8	-	110,3-145,3
HNCACB (NS=8)			
Adatpontok száma	704	256	256
Spektrumszélesség [Hz]	2754	1784	15015
Spektrális tartomány [ppm]	6,3-9,8	109,1-131,1	8,6-83,2
HN(CO)CACB (NS=8)			
Adatpontok száma	704	256	256
Spektrumszélesség [Hz]	2754	1784	15015
Spektrális tartomány [ppm]	6,3-9,8	109,1-131,1	8,6-83,2
HNCO (NS=4)			
Adatpontok száma	704	256	256
Spektrumszélesség [Hz]	2754	1784	2800
Spektrális tartomány [ppm]	6,3-9,8	109,1-131,1	170-183,7
HBHA(CO)NH (NS=8)			
Adatpontok száma	704	256	256
Spektrumszélesség [Hz]	2754	1784	8000
Spektrális tartomány [ppm]	5,6-9	110,2-132,2	-2,7-7,3
i(HCA)CO(CA)NH (NS=8)			
Adatpontok száma	704	256	256
Spektrumszélesség [Hz]	2754	1784	2818,5
Spektrális tartomány [ppm]	6,3-9,8	109,1-131,1	170-183,7

Függelék – 4.a táblázat: Izotóp jelölt GKAP-DYL molekula titrálása jelöletlen LC8 dimerrel; a különböző sztöchiometria mellett felvett spektrumok adatai.

TENGELYEK	H	N	C
^{1}H-^{15}N HSQC (NS=4) szabad GKAP-DYL			
Adatpontok száma	2048	1024	-
Spektrumszélesség [Hz]	6410	1622	-
Spektrális tartomány [ppm]	4,7-12,7	108-128	-
^{1}H-^{15}N HSQC (NS=4) szabad GKAP-DYL			
Adatpontok száma	4096	1024	-
Spektrumszélesség [Hz]	19230	12987	-
Spektrális tartomány [ppm]	-7,3-16,7	0-160	-
^{1}H-^{13}C HSQC-alifás (NS=4) szabad GKAP-DYL			
Adatpontok száma	4096	-	1024
Spektrumszélesség [Hz]	12820	-	16077
Spektrális tartomány [ppm]	-3,3-12,7	-	3-83
^{1}H-^{13}C HSQC-aromás (NS=16) szabad GKAP-DYL			
Adatpontok száma	2048	-	1024
Spektrumszélesség [Hz]	6410	-	7042
Spektrális tartomány [ppm]	4,7-12,7	-	107,5-142,5
^{1}H-^{15}N HSQC (NS=4) 1:½ GKAP-DYL + LC8 dimer			
Adatpontok száma	2048	1024	-
Spektrumszélesség [Hz]	6410	1622	-
Spektrális tartomány [ppm]	4,7-12,7	108-128	-
^{1}H-^{15}N HSQC (NS=4) 1:½ GKAP-DYL + LC8 dimer			
Adatpontok száma	4096	1024	-
Spektrumszélesség [Hz]	19230	12987	-
Spektrális tartomány [ppm]	-7,3-16,7	0-160	-
^{1}H-^{13}C HSQC-alifás (NS=4) 1:½ GKAP-DYL + LC8 dimer			
Adatpontok száma	4096	-	1024
Spektrumszélesség [Hz]	12820	-	16077
Spektrális tartomány [ppm]	-3,3-12,7	-	3-83
^{1}H-^{13}C HSQC-aromás (NS=16) 1:½ GKAP-DYL + LC8 dimer			
Adatpontok száma	2048	-	1024
Spektrumszélesség [Hz]	6410	-	7042
Spektrális tartomány [ppm]	4,7-12,7	-	107,5-142,5

^{1}H-^{15}N HSQC (NS=4) 1:1 GKAP-DYL + LC8 dimer			
Adatpontok száma	2048	1024	-
Spektrumszélesség [Hz]	6410	1622	-
Spektrális tartomány [ppm]	4,7-12,7	108-128	-
^{1}H-^{15}N HSQC (NS=4) 1:1 GKAP-DYL + LC8 dimer			
Adatpontok száma	4096	1024	-
Spektrumszélesség [Hz]	19230	12987	-
Spektrális tartomány [ppm]	-7,3-16,7	0-160	-
^{1}H-^{15}N HSQC (NS=8) 1:1 GKAP-DYL + LC8 dimer			
Adatpontok száma	2048	1024	-
Spektrumszélesség [Hz]	6410	1622	-
Spektrális tartomány [ppm]	4,7-12,7	108-128	-
^{1}H-^{13}C HSQC-alifás (NS=4) 1:1 GKAP-DYL + LC8 dimer			
Adatpontok száma	4096	-	1024
Spektrumszélesség [Hz]	12820	-	16077
Spektrális tartomány [ppm]	-3,3-12,7	-	3-83
^{1}H-^{13}C HSQC-aromás (NS=16) 1:1 GKAP-DYL + LC8 dimer			
Adatpontok száma	2048	-	1024
Spektrumszélesség [Hz]	6410	-	7042
Spektrális tartomány [ppm]	4,7-12,7	-	107,5-142,5
^{1}H-^{15}N HSQC (NS=4) 1:2 GKAP-DYL + LC8 dimer			
Adatpontok száma	2048	1024	-
Spektrumszélesség [Hz]	6410	1622	-
Spektrális tartomány [ppm]	4,7-12,7	108-128	-
^{1}H-^{15}N HSQC (NS=8) 1:2 GKAP-DYL + LC8 dimer			
Adatpontok száma	4096	1024	-
Spektrumszélesség [Hz]	19230	12987	-
Spektrális tartomány [ppm]	-7,3-16,7	0-160	-
^{1}H-^{15}N HSQC (NS=16) 1:2 GKAP-DYL + LC8 dimer			
Adatpontok száma	2048	1024	-
Spektrumszélesség [Hz]	6410	1622	-
Spektrális tartomány [ppm]	4,7-12,7	108-128	-
^{1}H-^{13}C HSQC-alifás (NS=8) 1:2 GKAP-DYL + LC8 dimer			
Adatpontok száma	4096	-	1024
Spektrumszélesség [Hz]	12820	-	16077
Spektrális tartomány [ppm]	-3,3-12,7	-	3-83

^{1}H-^{13}C HSQC-aromás (NS=32) 1:2 GKAP-DYL + LC8 dimer			
Adatpontok száma	2048	-	1024
Spektrumszélesség [Hz]	6410	-	7042
Spektrális tartomány [ppm]	4,7-12,7	-	107,5-142,5
^{1}H-^{15}N HSQC (NS=4) 1:4 GKAP-DYL + LC8 dimer			
Adatpontok száma	2048	1024	-
Spektrumszélesség [Hz]	6410	1622	-
Spektrális tartomány [ppm]	4,7-12,7	108-128	-
^{1}H-^{15}N HSQC (NS=8) 1:4 GKAP-DYL + LC8 dimer			
Adatpontok száma	4096	1024	-
Spektrumszélesség [Hz]	19230	12987	-
Spektrális tartomány [ppm]	-7,3-16,7	0-160	-
^{1}H-^{15}N HSQC (NS=16) 1:4 GKAP-DYL + LC8 dimer			
Adatpontok száma	2048	1024	-
Spektrumszélesség [Hz]	6410	1622	-
Spektrális tartomány [ppm]	4,7-12,7	108-128	-
^{1}H-^{13}C HSQC-alifás (NS=8) 1:4 GKAP-DYL + LC8 dimer			
Adatpontok száma	4096	-	1024
Spektrumszélesség [Hz]	12820	-	16077
Spektrális tartomány [ppm]	-3,3-12,7	-	3-83
^{1}H-^{13}C HSQC-aromás (NS=32) 1:4 GKAP-DYL + LC8 dimer			
Adatpontok száma	2048	-	1024
Spektrumszélesség [Hz]	6410	-	7042
Spektrális tartomány [ppm]	4,7-12,7	-	107,5-142,5

Függelék – 4.b táblázat: Izotóp jelölt LC8 dimer molekula titrálása jelöletlen GKAP-DYL konstrukcióval; a különböző sztöchiometria mellett felvett spektrumok adatai.

TENGELYEK	H	N	C
^{1}H-^{15}N HSQC (NS=2) szabad LC8			
Adatpontok száma	2048	1024	-
Spektrumszélesség [Hz]	6410	2798	-
Spektrális tartomány [ppm]	4,7-12,7	100,8-135,3	-
^{1}H Watergate (NS=24) szabad LC8			
Adatpontok száma	2600	-	-
Spektrumszélesség [Hz]	16025,6	-	-
Spektrális tartomány [ppm]	-5,3-14,7	-	-
^{1}H-^{13}C HSQC-alifás (NS=2) szabad LC8			
Adatpontok száma	4096	-	1024
Spektrumszélesség [Hz]	12820	-	16077
Spektrális tartomány [ppm]	-3,3-12,7	-	3-83
^{1}H-^{13}C HSQC-aromás (NS=8) szabad LC8			
Adatpontok száma	2048	-	1024
Spektrumszélesség [Hz]	6410	-	7042
Spektrális tartomány [ppm]	4,7-12,7	-	107,5-142,5
^{1}H-^{15}N HSQC (NS=2) szabad LC8			
Adatpontok száma	2048	1024	-
Spektrumszélesség [Hz]	9615,4	12987	-
Spektrális tartomány [ppm]	4,7-16,7	0-160	-
^{1}H-^{15}N HSQC (NS=2) szabad LC8			
Adatpontok száma	4096	1024	-
Spektrumszélesség [Hz]	19230,8	12987	-
Spektrális tartomány [ppm]	-7,3-16,7	90-250	-
^{1}H-^{15}N HSQC (NS=16) 1:½ LC8 dimer + GKAP-DYL			
Adatpontok száma	2048	1024	-
Spektrumszélesség [Hz]	6410	2798	-
Spektrális tartomány [ppm]	4,7-12,7	100,8-135,3	-
^{1}H Watergate (NS=48) 1:½ LC8 dimer + GKAP-DYL			
Adatpontok száma	2600	-	-
Spektrumszélesség [Hz]	16025,6	-	-
Spektrális tartomány [ppm]	-5,3-14,7	-	-

^{1}H-^{13}C HSQC-alifás (NS=16) 1:½ LC8 dimer + GKAP-DYL			
Adatpontok száma	4096	-	1024
Spektrumszélesség [Hz]	12820	-	16077
Spektrális tartomány [ppm]	-3,3-12,7	-	3-83
^{1}H-^{13}C HSQC-aromás (NS=64) 1:½ LC8 dimer + GKAP-DYL			
Adatpontok száma	2048	-	1024
Spektrumszélesség [Hz]	6410	-	7042
Spektrális tartomány [ppm]	4,7-12,7	-	107,5-142,5
^{1}H-^{15}N HSQC (NS=16) 1:½ LC8 dimer + GKAP-DYL			
Adatpontok száma	2048	1024	-
Spektrumszélesség [Hz]	9615,4	12987	-
Spektrális tartomány [ppm]	4,7-16,7	0-160	-
^{1}H-^{15}N HSQC (NS=16) 1:½ LC8 dimer + GKAP-DYL			
Adatpontok száma	4096	1024	-
Spektrumszélesség [Hz]	19230,8	12987	-
Spektrális tartomány [ppm]	-7,3-16,7	90-250	-
^{1}H-^{15}N HSQC (NS=16) 1:1 LC8 dimer + GKAP-DYL			
Adatpontok száma	2048	1024	-
Spektrumszélesség [Hz]	6410	2798	-
Spektrális tartomány [ppm]	4,7-12,7	100,8-135,3	-
^{1}H Watergate (NS=48) 1:1 LC8 dimer + GKAP-DYL			
Adatpontok száma	2600	-	-
Spektrumszélesség [Hz]	16025,6	-	-
Spektrális tartomány [ppm]	-5,3-14,7	-	-
^{1}H-^{13}C HSQC-alifás (NS=16) 1:1 LC8 dimer + GKAP-DYL			
Adatpontok száma	4096	-	1024
Spektrumszélesség [Hz]	12820	-	16077
Spektrális tartomány [ppm]	-3,3-12,7	-	3-83
^{1}H-^{13}C HSQC-aromás (NS=64) 1:1 LC8 dimer + GKAP-DYL			
Adatpontok száma	2048	-	1024
Spektrumszélesség [Hz]	6410	-	7042
Spektrális tartomány [ppm]	4,7-12,7	-	107,5-142,5
^{1}H-^{15}N HSQC (NS=16) 1:1 LC8 dimer + GKAP-DYL			
Adatpontok száma	2048	1024	-
Spektrumszélesség [Hz]	9615,4	12987	-
Spektrális tartomány [ppm]	4,7-16,7	0-160	-

^{1}H-^{15}N HSQC (NS=16) 1:1 LC8 dimer + GKAP-DYL			
Adatpontok száma	4096	1024	-
Spektrumszélesség [Hz]	19230,8	12987	-
Spektrális tartomány [ppm]	-7,3-16,7	90-250	-
^{1}H-^{15}N HSQC (NS=16) 1:2 LC8 dimer + GKAP-DYL			
Adatpontok száma	2048	1024	-
Spektrumszélesség [Hz]	6410	2798	-
Spektrális tartomány [ppm]	4,7-12,7	100,8-135,3	-
^{1}H Watergate (NS=48) 1:2 LC8 dimer + GKAP-DYL			
Adatpontok száma	2600	-	-
Spektrumszélesség [Hz]	16025,6	-	-
Spektrális tartomány [ppm]	-5,3-14,7	-	-
^{1}H-^{13}C HSQC-alifás (NS=16) 1:2 LC8 dimer + GKAP-DYL			
Adatpontok száma	4096	-	1024
Spektrumszélesség [Hz]	12820	-	16077
Spektrális tartomány [ppm]	-3,3-12,7	-	3-83
^{1}H-^{13}C HSQC-aromás (NS=64) 1:2 LC8 dimer + GKAP-DYL			
Adatpontok száma	2048	-	1024
Spektrumszélesség [Hz]	6410	-	7042
Spektrális tartomány [ppm]	4,7-12,7	-	107,5-142,5
^{1}H-^{15}N HSQC (NS=16) 1:2 LC8 dimer + GKAP-DYL			
Adatpontok száma	2048	1024	-
Spektrumszélesség [Hz]	9615,4	12987	-
Spektrális tartomány [ppm]	4,7-16,7	0-160	-
^{1}H-^{15}N HSQC (NS=16) 1:2 LC8 dimer + GKAP-DYL			
Adatpontok száma	2048	1024	-
Spektrumszélesség [Hz]	9615,4	12987	-
Spektrális tartomány [ppm]	4,7-16,7	90-250	-
^{1}H-^{15}N HSQC (NS=64) 1:4 LC8 dimer + GKAP-DYL			
Adatpontok száma	2048	1024	-
Spektrumszélesség [Hz]	6410	2798	-
Spektrális tartomány [ppm]	4,7-12,7	100,8-135,3	-
^{1}H Watergate (NS=48) 1:4 LC8 dimer + GKAP-DYL			
Adatpontok száma	2600	-	-
Spektrumszélesség [Hz]	16025,6	-	-
Spektrális tartomány [ppm]	-5,3-14,7	-	-

^{1}H-^{13}C HSQC-alifás (NS=64) 1:4 LC8 dimer + GKAP-DYL			
Adatpontok száma	4096	-	1024
Spektrumszélesség [Hz]	12820	-	16077
Spektrális tartomány [ppm]	-3,3-12,7	-	3-83
^{1}H-^{13}C HSQC-aromás (NS=64) 1:4 LC8 dimer + GKAP-DYL			
Adatpontok száma	2048	-	1024
Spektrumszélesség [Hz]	6410	-	7042
Spektrális tartomány [ppm]	4,7-12,7	-	107,5-142,5
^{1}H-^{15}N HSQC (NS=64) 1:4 LC8 dimer + GKAP-DYL			
Adatpontok száma	2048	1024	-
Spektrumszélesség [Hz]	9615,4	12987	-
Spektrális tartomány [ppm]	4,7-16,7	0-160	-
^{1}H-^{15}N HSQC (NS=64) 1:4 LC8 dimer + GKAP-DYL			
Adatpontok száma	2048	1024	-
Spektrumszélesség [Hz]	9615,4	12987	-
Spektrális tartomány [ppm]	4,7-16,7	90-250	-

Függelék – 4.c táblázat: Az izotóp jelölt GKAP-Ct43 molekula titrálása jelöletlen Shank1-PDZ domén molekulával; a különböző sztöchiometria mellett felvett spektrumok adatai.

TENGELYEK	H	N	C
^{1}H-^{15}N HSQC (NS=2) szabad GKAP-Ct43			
Adatpontok száma	2048	1024	-
Spektrumszélesség [Hz]	4006	1784	-
Spektrális tartomány [ppm]	4,8-9,8	109,1-131,1	-
^{1}H Watergate (NS=32) szabad GKAP-Ct43			
Adatpontok száma	2048	-	-
Spektrumszélesség [Hz]	12,820,5	-	-
Spektrális tartomány [ppm]	-3,3-12,7	-	-
^{1}H-^{13}C HSQC-alifás (NS=2) szabad GKAP-Ct43			
Adatpontok száma	4096	-	2048
Spektrumszélesség [Hz]	12820	-	16077
Spektrális tartomány [ppm]	-3,2-12,8	-	5,8-85,7
^{1}H-^{15}N HSQC (NS=2) 1:½ GKAP-Ct43 + PDZ domén			
Adatpontok száma	2048	1024	-
Spektrumszélesség [Hz]	4006	1784	-
Spektrális tartomány [ppm]	4,8-9,8	109,1-131,1	-
^{1}H Watergate (NS=32) 1:½ GKAP-Ct43 + PDZ domén			
Adatpontok száma	2048	-	-
Spektrumszélesség [Hz]	12,820,5	-	-
Spektrális tartomány [ppm]	-3,3-12,7	-	-
^{1}H-^{13}C HSQC-alifás (NS=2) 1:½ GKAP-Ct43 + PDZ domén			
Adatpontok száma	4096	-	2048
Spektrumszélesség [Hz]	12820	-	16077
Spektrális tartomány [ppm]	-3,2-12,8	-	5,8-85,7
^{1}H-^{15}N HSQC (NS=2) 1:1 GKAP-Ct43 + PDZ domén			
Adatpontok száma	2048	1024	-
Spektrumszélesség [Hz]	4006	1784	-
Spektrális tartomány [ppm]	4,8-9,8	109,1-131,1	-
^{1}H Watergate (NS=32) 1:1 GKAP-Ct43 + PDZ domén			
Adatpontok száma	2048	-	-
Spektrumszélesség [Hz]	12,820,5	-	-
Spektrális tartomány [ppm]	-3,3-12,7	-	-

^{1}H-^{13}C HSQC-alifás (NS=2) 1:1 GKAP-Ct43 + PDZ domén			
Adatpontok száma	4096	-	2048
Spektrumszélesség [Hz]	12820	-	16077
Spektrális tartomány [ppm]	-3,2-12,8	-	5,8-85,7
^{1}H-^{15}N HSQC (NS=2) 1:2 GKAP-Ct43 + PDZ domén			
Adatpontok száma	2048	1024	-
Spektrumszélesség [Hz]	4006	1784	-
Spektrális tartomány [ppm]	4,8-9,8	109,1-131,1	-
^{1}H Watergate (NS=32) 1:2 GKAP-Ct43 + PDZ domén			
Adatpontok száma	2048	-	-
Spektrumszélesség [Hz]	12,820,5	-	-
Spektrális tartomány [ppm]	-3,3-12,7	-	-
^{1}H-^{13}C HSQC-alifás (NS=2) 1:2 GKAP-Ct43 + PDZ domén			
Adatpontok száma	4096	-	2048
Spektrumszélesség [Hz]	12820	-	16077
Spektrális tartomány [ppm]	-3,2-12,8	-	5,8-85,7
^{1}H-^{15}N HSQC (NS=2) 1:4 GKAP-Ct43 + PDZ domén			
Adatpontok száma	2048	1024	-
Spektrumszélesség [Hz]	4006	1784	-
Spektrális tartomány [ppm]	4,8-9,8	109,1-131,1	-
^{1}H Watergate (NS=32) 1:4 GKAP-Ct43 + PDZ domén			
Adatpontok száma	2048	-	-
Spektrumszélesség [Hz]	12,820,5	-	-
Spektrális tartomány [ppm]	-3,3-12,7	-	-
^{1}H-^{13}C HSQC-alifás (NS=2) 1:4 GKAP-Ct43 + PDZ domén			
Adatpontok száma	4096	-	2048
Spektrumszélesség [Hz]	12820	-	16077
Spektrális tartomány [ppm]	-3,2-12,8	-	5,8-85,7