



PÁZMÁNY PÉTER KATOLIKUS EGYETEM

ROSKA TAMÁS MŰSZAKI ÉS TERMÉSZETTUDOMÁNYI
DOKTORI ISKOLA

**A posztzinaptikus Drebrin fehérje nem
globuláris régióinak szerkezeti és
funkcionális vizsgálata**

PhD Disszertáció tézisei

Varga Soma

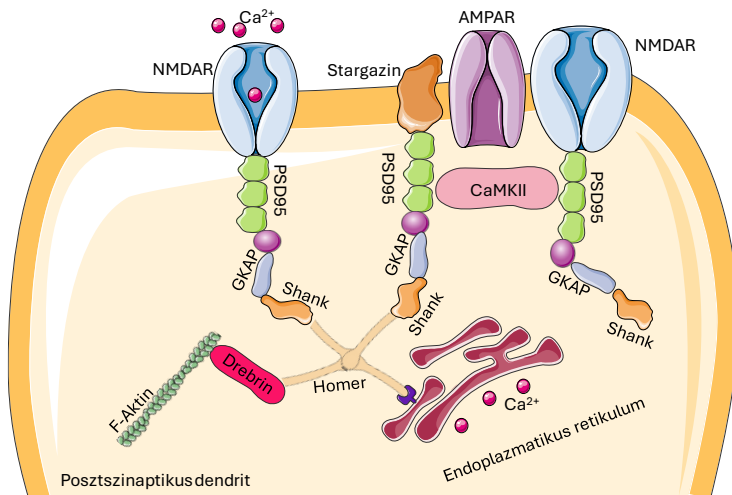
Témavezető: Péterfia Bálint Ferenc, PhD

Budapest • 2025

I. Bevezetés

A Drebrin (Developmentally Regulated Brain Protein) egy sejtvázszerveződésben részt vevő fehérje¹, amely kulcsfontosságú a dendritikus túske morfogenezisében². Korábbi tanulmányok igazolták az aktin-kötegelő³, aktin-kötő⁴, és aktin-depolimerizáló⁵ tulajdonságait, ezzel bemutatva sokoldalú szerepét a PSD-ben (Postsynaptic Density).

A Drebrin csak a filamentális (F) aktinnal képes interakcióba lépni, a monomer globuláris (G) aktint nem köti⁶. A Drebrin kötődése szerkezeti változásokat okoz az F-aktin filamentumokban, lelassítja ezek dinamikus méretváltozását, illetve befolyásolja a motorfehérjék, például a miozin II aktivitását. A dendritikus tüskék szinaptikus aktivitásra történő válasza egy Drebrin-mediált folyamat⁷. A Drebrin fehérje feladata egy köteg stabil aktin-filamentum formálása, amely meghatározza a dendritikus túske méretét egy dinamikus egyensúlyban a Drebrin-kötött és a szabad filamentumok között. Szinaptikus aktiváció hatására beáramló Ca^{2+} esetén a Drebrin-kötött filamentumok kilépnek a szinaptikus tüskéből, ezt a folyamatot Drebrin exódusnak nevezik. Ezáltal a G-aktin beáramol és kitölti a megüresedett teret, ahol polimerizálódik, így a dendritikus túske növekedését okozza. A stimulus végén a Drebrin visszakerül, és visszaállítja az aktin-filamentumok egyensúlyát, ezzel stabilizálva a megnövekedett tüskét. A Drebrin mennyiségének csökkenését összefüggésbe hozták több neurológiai kórképpel, például Alzheimer-Kór, Down-szindróma és öregedés. A Shirao és munkatársai által leírt modellt igazolja a Drebrin kulcsfontosságát a szinaptikus plaszticitás fenntartásában és a kognitív funkciók megtartásában.



1.ábra: A poszt-szinaptikus denzitás fehérjehálózata. A szinapszisok fogadó oldalán található Drebrin fehérje kulcsfontosságú a poszt-szinaptikus Homer fehérjével való interakciója miatt, illetve a teljes fehérje-hálózatot a sejtvázhoz horgonyozza az aktin-filamentumokhoz kötődve.

A Drebrinnek két izoformája ismert, az embrionális fejlődés során megjelenő Drebrin E, valamint a felnőtt korban előforduló Drebrin A, utobbi tartalmaz egy izoforma-specifikus inszerciót. A Drebrin fehérje több különleges nem globuláris régiót is tartalmaz, melyek szerkezetéről és biológiai szerepéről a mai napig nincs konszenzus.

Egy remek példa erre a 173-228 aminosavak közötti régió, melyet előbb coiled-coil predikció eredményeképp írtak le⁸, majd magányos alfa-héliként prediktálták⁹, amely jobban beleillik a fehérje monomer előfordulásáról alkotott képbe³. A magányos alfa-hélix (Single Alpha-Helix, továbbiakban SAH) domének jellemzően citoskeletális, illetve RBS-kötő fehérjékben fordulnak elő, ám fontosságuk ellenére, kísérletileg nehezen vizsgálható jellegükből fakadóan igen kevés szerkezeti adat érhető el róluk.

A Drebrin N-terminálisán található egy globuláris szerkezettel rendelkező ADF-H (Actin-Depolymerizin Factor-Homology) domén,

amely evolúciója során elveszítette az ortológokban megfigyelt erős aktin-kötő tulajdonságát^{6,10}. A Drebrin aktin-kötő szakasza előbb *in vivo* kísérletekkel lett meghatározva, majd tovább vizsgálták alacsony felbontású analitikai módszerekkel, például koszedimentációs-esszékkal. Ezen tanulmányok eredményeinek összessége az aktin-kötő szakaszt a 233-300, vagy a 233-317 aminosavak közötti régióhoz köti, ám ezt később a fehérje N-terminálisához közelebbi szakaszának kooperatív szerepével is összefüggésbe hozták⁸. Drebrin-dekorált aktin-filamentumok elektronmikroszkópos vizsgálatának alapján a Drebrin alapvetően rendezetlen aktin-kötő szakasza elképzelhető, hogy feltekeredik az interakció hatására, ám erről kapcsolatban még nem készültek atomi-szintű szerkezeti modellek¹¹.

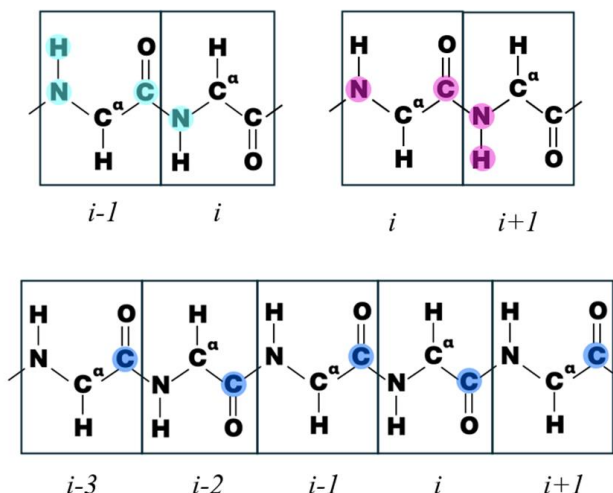
II. Célkitűzések

Kutatásom célja volt a rendkívül érdekes, kísérletileg különösen nehezen vizsgálható nem globuláris fehérjeszakaszok atomi szintű feltérképezése, ezzel megkísérelve a Drebrin funkcionális vizsgálataiból származó eredmények szerkezeti szempontból történő alátámasztását és kiegészítését. A magányos alfa-hélixekről a mai napig csupán két olyan publikáció jelent meg, ahol NMR spektroszkópiával meghatározott szerkezeten keresztül jellemezték a motívum sajátosságait^{12,13}, a Drebrin aktin-kötő mechanizmusának megértése pedig mindkét partner szempontjából kihívásokat jelent. Az F-aktin a polimerizáció során egy dinamikus kettős-hélix szerkezetet alkot, amely alkalmatlanná teszi röntgenkristallográfiás vizsgálatokra¹⁴. A Drebrin aktin-kötő szakaszának prediktált flexibilis természete, valamint a töltéssel rendelkező aminosavak sűrű előfordulása kijelölte számomra az NMR spektroszkópiát, mint legfőképp alkalmazandó módszert. A fehérjeszakaszok előállításán és kísérletes vizsgálatán felül céлом volt még, hogy az eredményeimet holisztikus szemlélettel értelmezzem, illetve bioinformatikai módszerek segítségével egy olyan integratív modellt építsek, mely minél részletesebben jellemezni tudja a nem globuláris fehérjeszakaszok felépítését és viselkedését.

III. Anyagok és módszerek

Munkám során molekuláris klónozási lépések sorozatával elkészítettem az általam vizsgálni kívánt fehérjeszakaszokat kódoló géneket tartalmazó plazmid DNS-eket. Ezekhez a teljes hosszúságú humán Drebrin fehérjét kódoló nukleotid szakaszt tartalmazó plazmidot (RRID: Addgene_40362) alkalmaztam templát DNS-ként. A kiválasztott régiókhoz primereket terveztem, majd touch-up PCR technikákat optimalizáltam a génszakaszok felszaporításához, melyeket a laboratóriumunkban módosított pET-15b (Novagen) plazmidokba klónoztam. Az így kapott konstrukciókat BL21 (DE3) *E. coli* sejtekbe transzformáltam, majd optimalizáltam a fehérjék expressziós protokolljait. A megtermelt rekombináns fehérjék tisztítására különböző kromatográfiás lépésekből álló módszereket fejlesztettem.

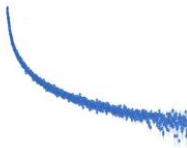
A fehérjék kezdetleges, alacsony felbontású szerkezetvizsgálatához CD spektroszkópiát használtam. A munkám legnagyobb részét az ezt követő NMR spektroszkópiás szerkezeti és funkcionális vizsgálatok tették ki. Az alacsony komplexitású régiók esetében tapasztalt rengeteg jelátfedést kifejezetten erre a célra fejlesztett NMR technikák segítségével oldottam fel. A D233 konstrukciónál annak nagy mértékű rendezetlenségéből fakadó keskeny amid-hidrogén kémiai eltolódás eloszlás, a magányos alfa-hélixnél pedig a rúd-szerű motívum transzverz tengelye mentén párhuzamos amid vektorok dipólus-dipólus csatolásainak nagy számából eredő spektrális zsúfoltság nehezítette a jelhozzárendelést. Előbbihez a peptid-gerinc szekvenciális szomszédságú karbonil ^{13}C atommagok közötti háromkötéses csatolásokra épülő 3D (HN)CO(CO)NH kísérletet¹⁵, utóbbihoz pedig a HN(i-1)-N(i-1)-CO(i-1)-N(i) korrelációkat megjelenítő 4D (HACA)CON(CA)NH valamint a CO(i)-N(i)-(N(i+1))-HN(i+1) korrelációkat megjelenítő 4D (HACA)N(CA)CONH kísérleteket alkalmaztam¹⁶ (2.ábra).



2.ábra: A rezonancia-jelhozzárendelés során alkalmazott alacsony komplexitású fehérjékre speciális NMR technikák. Felül a 4D (HACA)CON(CA)NH (türkíz) és a 4D (HACA)N(CA)CONH (lila) kísérletek, alul a 3D (HN)CO(CO)NH (kék) kísérlet során feltárt korrelációk láthatóak a peptidlánc mentén haladva.

A magányos alfa-hélix globális szerkezeti jellemzéséhez kisszögű röntgenszórást alkalmaztam. A szóródási paraméterek alapján előbb kezdetleges, alacsony felbontású szerkezeti jellemzést végeztem, majd az NMR kémiai eltolódás adatokkal kiegészítve egy komplex, sokaság-alapú metodikát dolgoztam ki a fehérje integratív szerkezeti modellezésére. A kutatócsoportunkban kifejlesztett DIPEND¹⁷ algoritmussal az előzetes eredményeimnek megfelelő kezdeti sokaságot generáltam, melyet a kísérleti peremfeltételekkel vezérelve, molekuladinamikai szimulációk eredményeivel kiegészítve a CoNSEnsX⁺ segítségével¹⁸ többszörös szelekciós eljárással mintavételeztem. A szerkezeti sokaság oldallánc-konfigurációinak elemzésével, azok atom-atom távolságainak vizsgálatával jellemeztem a különleges szerkezeti motívum rendkívüli stabilitását biztosító tranzien másodlagos kölcsönhatások (sóhidak és kation-pí kölcsönhatások) változatos előfordulási lehetőségeit.

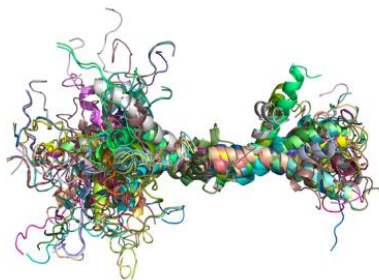
SAXS adatok



NMR adatok



MD szimulációk



Sokaság-alapú modellezés

3.ábra: A Drebrin-SAH integratív modellezési metodikájának egyszerűsített ábrázolása. A SAXS és NMR kísérleti adatok által vezérelt, MD szimulációkkal segített szelekciós eljárás segítségével egy 60 konformerből álló modellt készítettem.

A D233 konstrukció másodlagos szerkezeti jellemzőit előzetesen az aminosav-szekvencia alapján prediktáltam, majd az alifás szénatomok másodlagos kémiai eltolódásaival jellemeztem. Az előforduló másodlagos szerkezeti elemek gyors, ujjlenyomat-szerű vizsgálatához egy $^1\text{H}^{15}\text{N}$ bTROSY és $^1\text{H}^{15}\text{N}$ HSQC spektrumok átfedéses ábrázolásán alapuló módszert alkalmaztam. A Drebrin-Aktin interakció vizsgálatához NMR titrálásokat és t_2 relaxáció méréseket végeztem el.

IV. Eredmények és tézispontok

1./a: Előállítottam a posztiszinaptikus Drebrin fehérjében korábban prediktált magányos alfa-hélix szakaszt kódoló szekvenciát tartalmazó plazmid DNS-t. Az elkészített nukleinsav konstrukciót E. coli sejtekbe transzformáltam, majd optimalizáltam a bakteriális expresszió és a rekombináns fehérje tisztítás protokolljait, így NMR szerkezetvizsgálatra alkalmas fehérje mintát készítettem. 1./b: A szakirodalomban nem konszenzus módon leírt Drebrin-aktin interakció jellemzéséhez megterveztem a D233 konstrukciót, elkészítettem az ezt kódoló plazmid DNS-t, majd a magányos hélix termelési és tisztítási módszereit tovább fejlesztve NMR funkcionális vizsgálatokra alkalmas fehérje mintát készítettem.

Az általam vizsgálni kívánt szakaszok előállításához olyan primereket terveztem, melyek kompatibilisek a laboratóriumunkban leggyakrabban használt plazmid vektorokkal. A DNS szakaszok sikeres felszaporítása és megtisztítása után restriktációs emésztésekkel, majd ligálási reakciók optimalizálásával, többszöri próbálkozást követően mindegyik fehérjét kódoló expressziós plazmidot sikerült előállítanom. Ezután Sanger-szekvenálással ellenőriztem, hogy a megfelelő helyeken tartalmazzák-e a kívánt génszakaszokat. Ezt követően BL21 (DE3) sejtekbe transzformáltam őket, majd arra a megfigyelésre jutottam, hogy a nem globuláris fehérje szakaszok 37°C hőmérsékleten sokkal nagyobb mértékben expresszálódnak. Az ultrahangos sejtfeltárás során kulcsfontosságúnak bizonyult a proteáz-inhibitor adalékanyag hozzáadása, ugyanis harmadlagos szerkezet hiányában a fehérje gerince sokkal inkább hozzáférhető a proteáz enzimek számára, ezáltal jelentős mennyiségi veszteséget okozva.

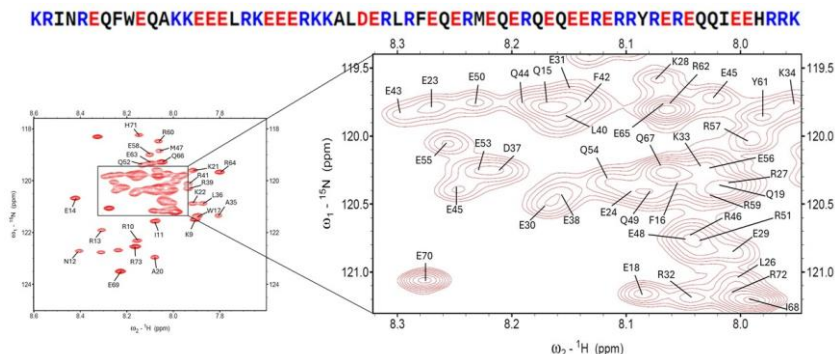
A bakteriális sejt extraktumból Ni-NTA affinitáskromatográfiával választottam el a célfehérjéket a többi sejtalkotótól. Az expressziós címkét TEV-proteáz segítségével távolítottam el. A Drebrin-SAH esetében egy pH=6.0 mellett elvégzett S-oszlopos ioncsere-kromatográfia bizonyult hatékonynak, mivel így sikerült a rengeteg töltött aminosavat azonos protonáltsági állapotba hozni. Ezt követően méretkizárásos kromatográfiával bizonyosodtam meg róla, hogy a célfehérjét elválasztottam a hozzáadott TEV proteáztól és a levágódó fehérje szakasztól is. Mivel a D233 konstrukció nem tartalmaz 280 nm-

en detektálható aminosavakat, így a TEV-hasítás után célszerű volt a kromatográfiás lépések minimalizálására törekedni. Ehhez egy olyan Q oszlopos tisztítást dolgoztam ki, melynek során megkötődött az enzim és a levágódó fehérje szakasz, viszont áteresztődött a célfehérje, melyet izolálni kívántam.

2./a: CD spektroszkópiás és tömegspektrometriás mérésekkel igazoltam a magányos alfa-hélix monomer szerkezetét vizes oldatban. 4 dimenziós NMR kísérletek alkalmazásával elvégeztem a fehérje gerinc ^1H - ^{15}N - ^{13}C teljes jelhozzárendelését, illetve a fehérje oldalláncok részleges jelhozzárendelését. Ca és $\text{C}\beta$ másodlagos kémiai eltolódásokkal bizonyítottam a fehérje lokális szerkezeti preferenciáját.

A 190-260 nm hullámhossztartományon felvett CD spektrum alakja egyértelműen az alfa-héliek jellegzetes tulajdonságait mutatta (lokális maximum 215 nm-en, lokális minimum 222 nm-en). A fehérje hőmérsékletfüggését a 222 nm-en mért értékek 285 K és 350 K közötti változásán keresztül vizsgálva megállapítottam, hogy a fehérje letekeredése nem kooperatív, ezzel kizárva a coiled coil, és igazolva a helikális motívum monomer előfordulását.

A rendkívül nagy arányban előforduló töltéssel rendelkező aminosavak, valamint ezek repetatív előfordulása (4.ábra), és a rúd-szerű motívum amid vektorainak transzverz tengely mentén párhuzamos állása a konvencionális rezonancia-jelhozzárendelési technikákkal megoldhatatlan feladat elé állított. A 4D kísérletekben bevezetett addicionális indirekt ^{15}N dimenzió segítségével sikerült olyan többszörös korrelációkat megfigyelni, melyek már számottevő iteráció elvégzésével egyértelműen azonosíthatóvá tették a spinrendszereket. Az így elérhetővé váló Ca és $\text{C}\beta$ kémiai eltolódásokkal igazolni tudtam a fehérje erős preferenciáját a lokálisan helikális szerkezet irányába.

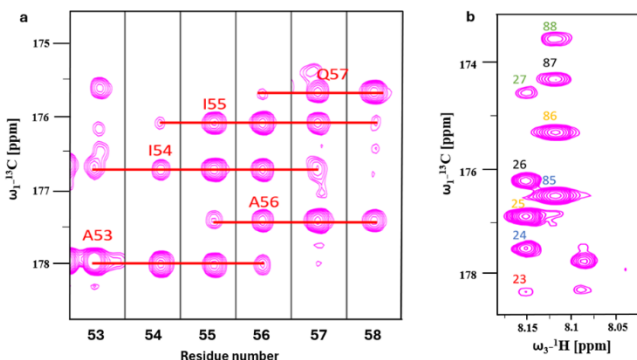


4.Ábra: A Drebrin-SAH domén szekvenciális jelhozzárendelése. Az alacsony komplexitás és a töltéssel rendelkező aminosavak sűrű előfordulása kék színnel (pozitív töltés) és piros színnel (negatív töltés) kiemelve. A panel bemutatja a magányos alfa hélixről készült ^1H - ^{15}N HSQC spektrumot 50 mM NaCl, 17 mM NaH_2PO_4 , 3 mM Na_2HPO_4 , pH 6.0 és 25°C körülmények között. A nagyítás kiemeli a spektrum centrális régiójában található extrém NH jelátfedéseket. Az asszignált kémiai eltolódásokat egy betűs aminosav-kódokkal jelöltem.

2./b: Rendezetlen fehérjékre specializált NMR kísérletekkel elvégeztem a fehérje gerinc ^1H - ^{15}N - ^{13}C teljes jelhozzárendelését, illetve a fehérje oldalláncok részleges jelhozzárendelését. A másodlagos kémiai eltolódások a fehérje nagy arányú rendezetlenségét mutatták, az N-terminális szakaszon tapasztalt helikális régió kivételével.

A Drebrin fehérje aktin-kötő szakaszát tartalmazó D233 konstrukció nagyfokú rendezetlenségéről előzetes CD spektroszkópiai kísérletekkel meggyőződtem, így célzottan egy ilyen fehérjék jelhozzárendelésére specifikus NMR metodikát alkalmaztam. A (HN)CO(CO)NH kísérletben a nagy távolságú karbonil-karbonil korrelációkat használva kerültem meg az amid protonok degenerált kémiai eltolódásából eredő nehézségeket (5.ábra). A kísérletben kihasználtam a ^{13}C karbonil atommagok rendezetlen fehérjékben kifejezetten kedvező relaxációs tulajdonságait, ezáltal egy különösen hosszú akvizíciós időt alkalmaztam egy félig konstans idejű t_1 evolúcióval a ^{13}C indirekt dimenzióban. A MOCCA-XY16 pulzusszekvenciben egy extrém hosszú (500 ms) izotróp keveredési idő

segítségével képes voltam akár 5 szekvenciálisan szomszédos karbonil jel összekapcsolására, ezzel jelentősen felgyorsítva az egyébként komplex jelhozzárendelési folyamatot. A részleges oldallánc-jelhozzárendelést (H)CC(CO)NH kísérlettel végeztem el, az alifás szénatomok kémiai eltolódásait pedig a CheSPI program segítségével használtam fel a fehérje másodlagos szerkezetének jellemzésére. A nagy mértékű rendezetlenség mellett, némileg meglepő módon a fehérje N-terminálisához közeli szakaszán egy körülbelül 15 aminosav hosszúságú helikális motívum jelenlétét igazoltam.



5.ábra: a, Szekvenciálisan szomszédos aminosavak szalagdiagramjai (A53-tól R58ig) $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ jelölt 3D (HN)CO(CO)NH spektrumon. **b,** A 3D (HN)CO(CO)NH spektrum egy kinagyított F1-F3 régióján ábrázolt karbonil jelek (zöld:i+1, fekete:i, narancssárga:i-1, kék:i-2, piros:i-3) közötti korrelációk. A jól feloldott régiókban lehetséges akár 5 egymást követő karbonil felismerése is.

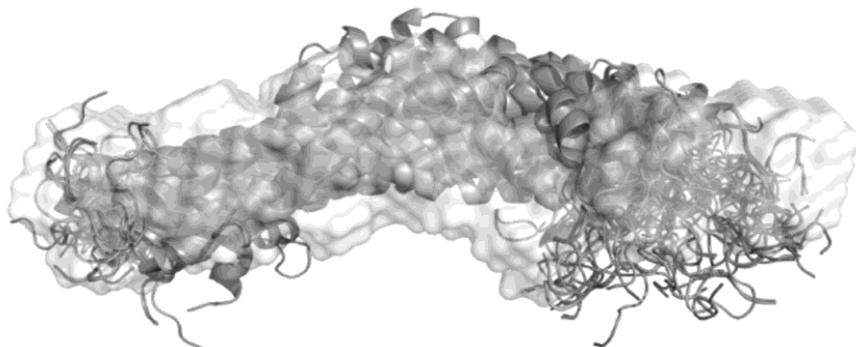
3: NMR és SAXS adatok, valamint molekuladinamikai szimulációk által vezérelve egy sokaság-alapú modellt készítettem a magányos alfa-hélixről, mely egyaránt tükrözi a kísérletek során feltárt lokális és globális szerkezeti paramétereket, valamint rávilágít a helikális motívum rendkívüli stabilitását biztosító sóhidak és kation-pi kölcsönhatások tranzienst hálózatának kialakulására.

Kisszögű röntgenszórás kísérletekkel megerősítettem, hogy a Drebrin-SAH széles koncentráció tartományban vizsgálva is monomerként fordul elő. A dimenziómentes Kratky-diagrammokkal igazoltam a

szerkezetileg megnyúlt molekula hipotézisét, illetve finomítottam a rúd-szerű alakról alkotott előzetes elképzelést, mivel leginkább egy megcsavart banán formájával írható le a szóródási felület.

Az NMR kísérletekből származó $C\alpha$ és $C\beta$ kémiai eltolódások, valamint a SAXS adatok által vezérelve egy összetett sokaság-alapú metodikát dolgoztam ki a magányos hélix motívum szerkezeti jellemzésére. A DIPEND algoritmussal generált 5000 tagú kezdeti konformációs sokaságból a kétféle kísérleti peremfeltétellel párhuzamosan vezérelt szelekcióval egy alsokaságot generáltam, melyet rögzített peptidgerinc mellett molekuladinamikai szimulációkkal feldúsítva mintavételeztem a lehetséges oldallánc-konfigurációkat. Az így kapott alsokaságon megismételtem az NMR és SAXS adatokon alapuló szelekciós eljárást, így egy 60 konformerből álló végső sokaságot kaptam (6.ábra).

A mind a lokális, mind a globális szerkezeti preferenciákat kiválóan tükröző konformereken atom-atom távolságok elemzését végeztem a helikális motívum rendkívüli stabilitásáért felelős másodlagos kötőerők tranziens hálózatának jellemzéséhez. Eredményeimmel feltártam rengeteg olyan sóhid, illetve kation- π kölcsönhatás lehetőségét, melyek dinamikus változásának eredőjeként fogható fel az az elektrosztatikus erő, amely lehetővé teszi az elongált magányos alfa hélix monomer előfordulását vizes oldatokban.



6.ábra: Az NMR adatokból származó sokaság (szürke szalagok) térbeli illesztése és összehasonlítása egy SAXS adatokból *ab initio* rekonstruált modell (fehér felület) általános alakjával.

4: Az atomi szinten korábban nem vizsgált Drebrin-aktin interakció jellemzéséhez NMR titrálások és t_2 relaxációs mérések optimalizálását végeztem. A D233 jelek F-aktin hozzáadására tapasztalt változásai alapján a kötődés tényét igazoló módszert sikerült beállítanom, mely a későbbiekben részletesebb vizsgálatok alapjaként szolgálhat majd.

A sikeres rezonancia-jelhozzárendelés után rendelkezésemre állt a D233 konstrukció „ujjlenyomat-szerű” információja, azaz a fehérje $^1\text{H}^{15}\text{N}$ HSQC spektrumán minden aminosavhoz tartozó NH jelet egyértelműen azonosítottam. Ezzel megnyitottam az utat a fehérje interakcióban részt vevő régió meghatározásához, melyhez elsőként a leginkább célszerű NMR-titrálásokkal próbálkoztam. A ^{15}N jelölt D233 mintához izotópjelölés nélküli F-aktin oldatot adagolva a D233 jelek nagy részében változásokat tapasztaltam. Kontroll kísérletként a D233 fehérjét ATP oldattal is titráltam, mivel ezt az F-aktin polimerizációját biztosító puffer is tartalmazta, míg a D233 jelhozzárendelését egy ATP-mentes mintán végeztem el. Ekkor azt tapasztaltam, hogy az ATP koncentráció növelése is egyértelműen megfigyelhető perturbációt okoz a D233 jelek egy jelentős hányadában. Mivel ezek közül több az ATP-t tartalmazó F-aktin oldat hozzáadásánál is megváltozott, így jelentősen megnehezedett a kizárólag NMR titrálásokon alapuló megközelítés a Drebrin-aktin interakciós felület meghatározására.

Ezek után megmértem a fehérje NH jeleinek r_2 relaxációs rátáját szabad, illetve F-aktin hozzáadására kialakuló kötött állapotban, azonos D233 koncentráció és puffer tartalom mellett. Érdekes módon a folyamatot „egy lépéses NMR titrálásként” értelmezve, a szabad és a kötött formák spektrumait egymásra vetítve csupán minimális eltéréseket (kémiai eltolódás perturbáció, jelkiszélesedés az NH jelek egy kis hányadánál) tapasztaltam, azonban az r_2 relaxációs ráták gyakorlatilag minden aminosav esetében hasonló mértékben megnövekedtek. Az eredmények alapján arra a következtetésre jutottam, hogy a fehérje-fehérje interakció egy olyan kinetikai tartományban zajlik, ahol az r_2 relaxációs ráták úgy átlagolódnak, hogy eközben elveszítik érzékenységsüket a szabad és kötött formában létező kémiai eltolódások környezetére. Emiatt az effektus nem lokalizálódik a szekvencia bizonyos tartományaira, ezzel felvetve a lehetőségét annak, hogy az interakciót egy magasabb rendű molekuláris mozgás dominálja.

A D233 fehérjéről felvett $^1\text{H}^{15}\text{N}$ bTROSY és $^1\text{H}^{15}\text{N}$ HSQC spektrumok egymásra vetítésekor egy érdekes megfigyelést tettem: Amennyiben aminosav-típustól függetlenül 93 Hz átlagos értékű skaláris csatolást vettem alapul, majd ennek felével eltoltam az egyik spektrumot, úgy az NH jelek döntő többsége a várakozásnak megfelelően átfedésbe került, azonban jól definiálhatóan körülbelül 15 jel esetében továbbra is különbséget tapasztaltam. A CheSPI eredmények alapján ez a 15 aminosav pontosan a rendezetlen fehérje gyakorlatilag egyetlen szerkezeti elemeként értelmezhető N-terminális közeli helikális szakasz. Ez a megfigyelés felveti a lehetőségét egy javarészt rendezetlen fehérjék lokális, esetleg tranziens szerkezeti elemeinek meghatározását célzó gyors, ujjlenyomatszerű módszer fejlesztésének

V. Publikációs jegyzék

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Varga, S., Péterfia, BF., Dudola, D., Farkas, V., Jeffries, CM., Permi, P., Gáspári, Z. (2025). Dynamic Interchange of Local Residue-Residue Interactions in the Largely Extended Single Alpha-Helix in Drebrin. *Biochemical Journal*, vol. 482, no. 08, pp. 383–399,

<https://doi.org/10.1042/BCJ20253036>

Varga, S., Kaasen, JM., Gáspári, Z., Péterfia, BF., Mulder, FAA. (2025). Resonance assignment of the intrinsically disordered actin-binding region of Drebrin. *Biomolecular NMR Assignments*

<https://doi.org/10.1007/s12104-025-10239-0>

Egyéb közlemények

Szabó, AL., Nagy-Kanta, E., Varga, S., Jáger, EA., Pongor, CI., Laki, M., Laki, AJ., Gáspári, Z. (2025). Diffusion-based size determination of solute particles: a method adapted for PSD proteins, *FEBS Open Bio*, submitted

Karjalainen, M., Kontunen, A., Anttalainen, A., Mäkelä, M., Varga, S., Lepomäki, M., Anttalainen, O., Kumpulainen, P., Oksala, N., Roine,

A., Vehkaoja, A. (2022). Characterization of signal kinetics in real time surgical tissue classification system. Sensors and Actuators B: Chemical, Volume 365, 2022, 131902, <https://doi.org/10.1016/j.snb.2022.131902>.

Előadások

- Konferencia előadás a “3rd ML4NGP MEETING on Machine Learning and Non-globular proteins, Vilnius, May 20-23, 2025” konferencián
- Konferencia előadás a “Hungarian NMR Working Committee Meeting, Balatonszemes, May 8-9, 2025” konferencián
- Konferencia előadás a “Hungarian Molecular Life Science Conference 2025, Eger, March 28-30, 2025” konferencián
- Előadás a “Zechmeister László Lecture Competition, Hungarian Academy of Sciences, 2024.11.15.” előadói versenyen, 2.helyezés
- Konferencia előadás a “Hungarian NMR Working Committee Meeting, Balatonszemes, May 23-24, 2024” konferencián

Poszterek

- Poszter a “46th Danish NMR meeting, Rebuild January 30-31, 2025” konferencián
- Poszter a ”Small Angle Neutron and X-ray Scattering from biomacromolecules in solution, 16 – 20 September 2024 | Grenoble, France, organized by European Molecular Biology Organization” kurzuson
- Poszter a “The 48th FEBS Congress, 29 June – 3 July 2024, Milano, Italy” konferencián
- Poszter a “45th Danish NMR meeting, Roskilde January 29-30, 2024” konferencián
- Poszter a “NMR for combatting diseases: from cancer to SARS-CoV-2 - Sesto Fiorentino, Italy, 27/03/2023 - 31/03/2023, organized by ICGEB” kurzuson
- Poszter a “iNEXT-Discovery 2023 Experimental and computational aspects of Structural Chemistry and Biology 22-24 June 2023 Budapest, Hungary” konferencián

VI: Irodalomjegyzék

- (1) Pérez-Martínez, M.; Gordón-Alonso, M.; Cabrero, J. R.; Barrero-Villar, M.; Rey, M.; Mittelbrunn, M.; Lamana, A.; Morlino, G.; Calabia, C.; Yamazaki, H.; Shirao, T.; Vázquez, J.; González-Amaro, R.; Veiga, E.; Sánchez-Madrid, F. F-Actin-Binding Protein Drebrin Regulates CXCR4 Recruitment to the Immune Synapse. *J Cell Sci* **2010**, 123 (7), 1160–1170. <https://doi.org/10.1242/jcs.064238>.
- (2) Lin, W.; Shiimoto, S.; Yamada, S.; Watanabe, H.; Kawashima, Y.; Eguchi, Y.; Muramatsu, K.; Sekino, Y. Dendritic Spine Formation and Synapse Maturation in Transcription Factor-Induced Human IPSC-Derived Neurons. *iScience* **2023**, 26 (4), 106285. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.106285>.
- (3) Li, Z.; Liu, H.; Li, J.; Yang, Q.; Feng, Z.; Li, Y.; Yang, H.; Yu, C.; Wan, J.; Liu, W.; Zhang, M. Homer Tetramer Promotes Actin Bundling Activity of Drebrin. *Structure* **2019**, 27 (1), 27–38.e4. <https://doi.org/10.1016/j.str.2018.10.011>.
- (4) Hayashi, K.; Ishikawa, R.; Kawai-Hirai, R.; Takagi, T.; Taketomi, A.; Shirao, T. *Domain Analysis of the Actin-Binding and Actin-Remodeling Activities of Drebrin*; 1999. <http://www.idealibrary.com>.
- (5) Mikati, M. A.; Grintsevich, E. E.; Reisler, E. Drebrin-Induced Stabilization of Actin Filaments. *Journal of Biological Chemistry* **2013**, 288 (27), 19926–19938. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.472647>.
- (6) Lappalainen, P.; Kessels, M. M.; Jamie, M.; Cope, T. V.; Drubin, D. G. *Essay The ADF Homology (ADF-H) Domain: A Highly Exploited Actin-Binding Module*; 1998; Vol. 9.
- (7) Shirao, T.; Hanamura, K.; Koganezawa, N.; Ishizuka, Y.; Yamazaki, H.; Sekino, Y. The Role of Drebrin in Neurons. *Journal of Neurochemistry*. Blackwell Publishing Ltd June 1, 2017, pp 819–834. <https://doi.org/10.1111/jnc.13988>.
- (8) Worth, D. C.; Daly, C. N.; Geraldo, S.; Oozer, F.; Gordon-Weeks, P. R. Drebrin Contains a Cryptic F-Actin-Bundling Activity Regulated by Cdk5 Phosphorylation. *Journal of Cell Biology* **2013**, 202 (5), 793–806. <https://doi.org/10.1083/jcb.201303005>.

- (9) Kovács, Á.; Dudola, D.; Nyitray, L.; Tóth, G.; Nagy, Z.; Gáspári, Z. Detection of Single Alpha-Helices in Large Protein Sequence Sets Using Hardware Acceleration. *J Struct Biol* **2018**, *204* (1), 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2018.06.005>.
- (10) Yao, N.; Li, J.; Liu, H.; Wan, J.; Liu, W.; Zhang, M. The Structure of the ZMYND8/Drebrin Complex Suggests a Cytoplasmic Sequestering Mechanism of ZMYND8 by Drebrin. *Structure* **2017**, *25* (11), 1657–1666.e3. <https://doi.org/10.1016/j.str.2017.08.014>.
- (11) Grintsevich, E. E.; Galkin, V. E.; Orlova, A.; Ytterberg, A. J.; Mikati, M. M.; Kudryashov, D. S.; Loo, J. A.; Egelman, E. H.; Reisler, E. Mapping of Drebrin Binding Site on F-Actin. *J Mol Biol* **2010**, *398* (4), 542–554. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.03.039>.
- (12) Barnes, C. A.; Shen, Y.; Ying, J.; Takagi, Y.; Torchia, D. A.; Sellers, J. R.; Bax, A. Remarkable Rigidity of the Single α -Helical Domain of Myosin-VI As Revealed by NMR Spectroscopy. *J Am Chem Soc* **2019**, *141* (22), 9004–9017. <https://doi.org/10.1021/jacs.9b03116>.
- (13) Batchelor, M.; Wolny, M.; Baker, E. G.; Paci, E.; Kalverda, A. P.; Peckham, M. Dynamic Ion Pair Behavior Stabilizes Single α -Helices in Proteins. *Journal of Biological Chemistry* **2019**, *294* (9), 3219–3234. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006752>.
- (14) Grintsevich, E. E. Remodeling of Actin Filaments by Drebrin and Its Implications. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*; Springer New York LLC, 2017; Vol. 1006, pp 61–82. https://doi.org/10.1007/978-4-431-56550-5_5.
- (15) Yoshimura, Y.; Kulminskaya, N. V.; Mulder, F. A. A. Easy and Unambiguous Sequential Assignments of Intrinsically Disordered Proteins by Correlating the Backbone ^{15}N or ^{13}C Chemical Shifts of Multiple Contiguous Residues in Highly Resolved 3D Spectra. *J Biomol NMR* **2015**, *61* (2), 109–121. <https://doi.org/10.1007/s10858-014-9890-7>.
- (16) Tossavainen, H.; Salovaara, S.; Hellman, M.; Ihalin, R.; Permi, P. Dispersion from ^{13}C or ^{15}N : 4D Experiments for Backbone Resonance Assignment of Intrinsically Disordered Proteins. *J Biomol NMR* **2020**, *74* (2–3), 147–159. <https://doi.org/10.1007/s10858-020-00299-w>.

- (17) Harmat, Z.; Dudola, D.; Gáspári, Z. Dipend: An Open-Source Pipeline to Generate Ensembles of Disordered Segments Using Neighbor-Dependent Backbone Preferences. *Biomolecules* **2021**, *11* (10). <https://doi.org/10.3390/biom11101505>.
- (18) Dudola, D.; Kovács, B.; Gáspári, Z. CoNSEnsX+ Webserver for the Analysis of Protein Structural Ensembles Reflecting Experimentally Determined Internal Dynamics. *J Chem Inf Model* **2017**, *57* (8), 1728–1734. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.7b00066>.