

## A Magyar Biofizikai Társaság Molekuláris Biofizika Szekciójának ülése

május 09-én (csütörtökön) a Pécsi Akadémiai Székházban

**Délelőtti szekció előadások:** 11:00-13:00 15+5perc elnök: Lukács András

- 11:00-11:15 Kalmodulin konformációs dinamikája fiziológias kalcium-ion koncentrációkban  
**Liliom Károly** Semmelweis Egyetem Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet
- 11:20-11:35 A Ran kisGTPáz nukleotid specifikus konformációinak feltérképezése  
**Balog Erika** Semmelweis Egyetem Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet
- 11:40-11:55 Szerkezet-funkció koordináció a SALS fehérjében.  
**Szűtsné Tóth Mónika Ágnes** Pécsi Tudományegyetem ÁOK Orvosi Biológiai Intézet
- 12:00-12:15 Fehérje-DNS hibrid fogantyúk tervezése egyedi molekula kísérletekhez  
**Kiss Bálint** Semmelweis Egyetem Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet
- 12:20-12:35 EB1: orchestrating actin: microtubule dynamics through liquid-liquid phase separation and domain interplay?  
**Gaszler Péter** Pécsi Tudományegyetem ÁOK Orvosi Biológiai Intézet
- 12:40-12:55 A miozin-5C motoros tulajdonságainak szabályozása  
**Kengyel András** Pécsi Tudományegyetem, ÁOK, Biofizikai Intézet
- 13:00-14:00 Ebédszünet (szendvics)

**Délutáni szekció előadások:** 14:00-15:40 15+5perc elnök: Smeller László

- 14:00-14:15 Fotoaktív adenilát cikláz funkcionális dinamikájának vizsgálata biofizikai módszerekkel.  
**Lukács András** Pécsi Tudományegyetem, ÁOK, Biofizikai Intézet
- 14:20-14:35 A bakteriális aktin MreB, mint új antibakteriális célpont  
**Huberné Barkó Szilvia** Pécsi Tudományegyetem, ÁOK, Biofizikai Intézet
- 14:40-14:55 RNS vírusban kialakuló G-quadruplex struktúrák vizsgálata és stabilitásuk befolyásolása TMPyP4, PhenDC3, valamint BRACO19 segítségével.  
**Cervenák Miklós** Semmelweis Egyetem Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet
- 15:00-15:15 Baktériumok quorum érzékelésének egysejt-szintű vizsgálata mikrofluidikai módszerekkel  
**Ábrahám Ágnes** HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biofizikai Intézet
- 15:20-15:35 A spektrális zaj hatása a cirkuláris dikroizmus spektroszkópiával történő szerkezetvizsgálat pontosságára  
**Moussong Éva** Eötvös Loránd Tudományegyetem TTK Biológiai Intézet

# KALMODULIN KONFORMÁCIÓS DINAMIKÁJA FIZIOLÓGIÁS KALCIUM-ION KONCENTRÁCIÓKBAN

Liliom Károly, Semmelweis Egyetem, Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet, Budapest

A kalmodulin az intracelluláris jelátvitel fontos szereplője, négy kalcium-iont képes megkötni két-két „EF-hand” motívummal a fehérje két doménjében. Kalcium-kötés hatására a doménekben hozzáférhetővé válnak addig rejtett hidrofób felületek, amelyek részt vesznek a partner fehérjék széles skálájának megkötésében. A kalmodulin kalcium-függő aktivitását legtöbbször úgy modellezik, hogy a kalcium-ionoktól mentes apokalmodulin inaktív, míg a teljesen telített holokalmodulin az aktív forma. Azonban fiziológias körülmények között a jelátvitel során a kalmodulin kalcium-telítettsége alacsony marad, a nyugalmi intracelluláris kalcium-ion koncentráció tranziensen vagy oszcillációk során mintegy 10-30-szorosára növekszik, ami nem elegendő a kalmodulin telítéséhez. A kalmodulin partner-szelektivitását a célfehérjék kompartmentalizációjával, illetve kanonikus kötési módusokkal magyarázzák, ami azonban nem ad választ arra, hogy a fiziológias kalcium-ion koncentráció időbeli változásában megjelenő információtartalom miért nem vész el a jelfeldolgozás során.

Kísérleteinkben kimutattuk, hogy alacsony kalcium-ion telítettség esetén a kalmodulin jelentősen megnövekedett szerkezeti dinamikát mutat és a modell célpeptid mellett is képes megkötni - ráadásul többféle konformációban - a holokalmodulin kialakulása előtt.

Megvizsgáltuk alacsony kalcium-ion/kalmodulin arány esetén a kalmodulin konformációs dinamikáját FTIR spektroszkópiával és molekuladinamikai szimulációkkal. Eredményeink alapján ebben a tartományban jelentős növekedést mutat az alacsony-frekvenciás mozgások mértéke, ami utalhat egy lassú, de folyamatos konformációs térben történő dinamikus mozgásra.

Eredményeink arra utalnak, hogy a kalcium-jelátvitel során a kalmodulin működésében nem csak a kalcium-tranziensek nagyságának és időbeli lefutásának van szerepe, hanem a nyugvó sejtekben is megfigyelhető kis „tüske-szerű” kalcium koncentrációs fluktuációknak is, amelyeket sokan eddig egyfajta véletlen „alpvonalnak” tekintettek.

A kutatást az NKFIH FK-135517 és SNN-145763 pályázatok támogatták.

## **A Ran kisGTPáz nukleotid specifikus konformációinak feltérképezése**

Balog Erika, Semmelweis Egyetem, Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet, Budapest

A Ran (RAS-related Nuclear protein) a Ras fehérjék családjába tartozó kis G-fehérje, mely a sejten belüli jelátadási folyamatban, a sejtmag-citoplazma közötti transzportban vesz részt. Más kis GTPázokhoz hasonlóan molekuláris kapcsolóként működik, amely a GDP-hez kötött inaktív és a GTP-hez kötött aktív állapot között “kapcsol”.

A Ran egy globuláris (G-) doménből és egy C-terminális régióból áll, mely a GDP-kötött állapotokban a G-doménhez kötődik. RanGTP esetén a C-terminális szerkezete csak a RanGTP-RanBP (Binding Protein) makromolekuláris komplexben meghatározott. Ezen kristályszerkezetek azt mutatják, hogy a C-terminális nagy konformációváltozáson megy keresztül, átölelve a Ran-kötő doméneket. RanBP-t nem tartalmazó komplexek esetén viszont a C-terminális szerkezete nincs meghatározva, mely a C-terminális nagyfokú mozgékonyására utal.

Munkánk során, molekuladinamikai (MD) és MDeNM (Molecular Dynamics with excited Normal Modes) szimulációs módszerek alkalmazásával bemutatjuk a C-terminális nukleotid-specifikus dinamikai viselkedését és értelmezzük annak funkcionális hatását.

## Szerkezet-funkció koordináció a SALS fehérjében.

Tóth Mónika Ágnes<sup>1</sup>, Gaszler Péter<sup>1</sup>, Vig Andrea Teréz<sup>1</sup>, Rauan Sakenov<sup>1</sup>, Pintér Réka<sup>1</sup>, Held-Baller Dániel<sup>2</sup>, Botka Natália<sup>2</sup>, Bugyi Beáta<sup>1</sup>

<sup>1</sup>PTE ÁOK, Orvosi Biológiai Intézet, Pécs Szigeti út 12. H-7624

<sup>2</sup>PTE GYTK, Biotechnology BSc képzés

A SALS (sarcomere length short) egy *Drosophila*-specifikus szarkomer szabályozó fehérje, mely komplex módon járul hozzá a szarkomerikus aktin filamentumok szerkezeti és funkcionális sajátosságainak kialakításához (1, 2). A SALS túltermelése aktin alapú aggregátumok kialakulását eredményezi (3). Hasonló fenotípust, ún. nemaline testeket írtak le a *Leiomodin* (Lmod) gén mutációjához köthető nemaline myopathiás betegek harántcsíktolt izomszövetében is. Evolúciós szempontból ugyan nincs genetikai kapcsolat az Lmod és a SALS között, azonban az *in vivo* vizsgálatok alapján egymás funkcionális homológjai lehetnek.

A SALS-ban eddig két, néhány tíz aminosavból álló Wiskott-Aldrich-szindróma 2 homológia 2 (WH2) domént azonosítottak (SALS-WH2). *In silico* elemzésünk alapján a SALS WH2 domének rendezetlen sajátossággal bírnak (intrinsically disordered region, IDR). A funkcionális analízisünk szerint a SALS-WH2 aktinkötő sajátossággal bír, ugyanakkor biokémiai aktivitásai nem rekonstruálják a teljes hosszúságú fehérje biológiai funkcióját (4). Hipotézisünk szerint azt további domének, illetve szarkomerikus partnerfehérjék finom hangolják.

Munkánk során kísérletesen, fluoreszcencia spektroszkópia és termikus analízis alkalmazásával igazoltuk a SALS-WH2 IDR természetét. Szedimentáción és fluoreszcencia spektroszkópiai módszereken alapuló vizsgálataink a SALS egy új aktin-kötő régióját azonosították a fehérje N-terminálisán.

(1) Bai J, Hartwig JH, Perrimon N. SALS, a WH2-domain-containing protein, promotes sarcomeric actin filament elongation from pointed ends during *Drosophila* muscle growth. *Dev Cell*. 2007 Dec;13(6):828-42.

(2) Shwartz A, Dhanyasi N, Schejter ED, Shilo BZ. The *Drosophila* formin Fhos is a primary mediator of sarcomeric thin-filament array assembly. *Elife*. 2016 Oct 12;5:e16540.

(3) Farkas D, Szikora S, Jijumon AS, Polgár TF, Patai R, Tóth MÁ, Bugyi B, Gajdos T, Bíró P, Novák T, Erdélyi M, Mihály J. Peripheral thickening of the sarcomeres and pointed end elongation of the thin filaments are both promoted by SALS and its formin interaction partners. *PLoS Genet*. 2024 Jan 10;20(1):e1011117.

(4) Tóth MÁ, Majoros AK, Vig AT, Migh E, Nyitrai M, Mihály J, Bugyi B. Biochemical Activities of the Wiskott-Aldrich Syndrome Homology Region 2 Domains of Sarcomere Length Short (SALS) Protein. *J Biol Chem*. 2016 Jan 8;291(2):667-80.

Támogatók:

Innovációs és Technológiai Minisztérium Új Nemzeti Kiválósági Program ÚNKP-21-3-II-PTE-997 (GP), KA-2023-12, (TMÁ) Pécsi Tudományegyetem, Orvostudományi Kar. Köszönjük Mihály Józsefnek és Farkas Dávidnak (Genetikai Intézet, Biológiai Kutatóközpont) a SALS plazmidokat.

# **EB1: orchestrating actin: microtubule dynamics through liquid-liquid phase separation and domain interplay?**

Péter Gaszler<sup>1,2,\*</sup>, Mónika Ágnes Tóth<sup>1</sup>, Tony Wesely<sup>1</sup>, Fruzsina Szász<sup>1</sup>, Andrea Vig<sup>1</sup>, Beáta Bugyi<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> University of Pécs, Medical School, Department of Medical Biology, Szigeti str. 12, Pécs, H-7624, Hungary

<sup>2</sup> Regional Committee of The Hungarian Academy of Sciences at Pécs, The Expert Committee of Physics and Astronomy, Spectroscopy Committee, Pécs, Hungary

\*E-mail: peter.gaszler@aok.pte.hu

EB1 (End-binding protein 1, also known as MAPRE1) belongs to the +TIPS (microtubule plus-end tracking proteins) recruiting other factors to the plus end of the microtubules. EB1 can form molecular condensates through liquid-liquid phase separation (LLPS) in specific conditions to constitute the microtubule plus-end machinery. EB1 LLPS dynamics seem to be important for mitotic chromosome movement in HeLa cells. Our UV-VIS spectroscopy and thermal analysis reveal the concentration-dependent aggregation of EB1. Analysing the effects of either the N-, and C-terminal truncations suggests an interplay between the CH and EBH-tail domains in filamentous actin binding.

## **Acknowledgments**

„Supported by the ÚNKP-22-3-II-PTE-1607 New National Excellence Program of The Ministry for Culture and Innovation from the Source of the National Research, Development and Innovation Fund.” We thank József Mihály and István Földi (Institute of Genetics, Biological Research Centre, Szeged, Pécs) for the EB1 plasmids.

## A MIOZIN-5C MOTOROS TULAJDONSÁGAINAK SZABÁLYOZÁSA

Kengyel András<sup>1,2</sup>, Philip M. Palarz<sup>2</sup>, Jacqueline Krohn<sup>2</sup>, Anja Marquardt<sup>1</sup>, Johannes N. Greve<sup>1</sup>, Robin Heiringhoff<sup>1</sup>, Anne Jörns<sup>3</sup>, Dietmar J. Manstein<sup>2</sup>

1 Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Biofizikai Intézet, Pécs

2 Hannover Medical School, Institute for Biophysical Chemistry, Hannover, Germany

3 Hannover Medical School, Institute of Clinical Biochemistry, Hannover, Germany

A miozin-5c motorfehérje fontos szerepet játszik a szekréciós folyamatokban: nagy mennyiségben termelődik az endokrin szövetekben, elsősorban a hasnyálmirigyben, az emlőben, a pajzsmirigyben vagy a nyálmirigyekben; az endotéliumban pedig elősegíti a von Willebrandt faktor kibocsátását. A miozin-5c két dimerizált nehézláncból és a hozzá kapcsolódó könnyűláncokból álló komplex. A nehézlánc tartalmazza az aktin-kötő és ATP-hasító motor domént, a 6 könnyűlánc kötődését szolgáló IQ-motívumokat, a dimerizációért felelős coiled-coil szakaszt és a transzportban szerepet játszó globuláris kargo-kötő domént. Jóllehet a miozin-5c alacsony munkaciklus-arányú, nem-processzív motorfehérje, transzportfolyamatok során több miozin-5c összekapcsolódása lehetővé teszi a processzív mozgást. Jelen munkánkban bemutatjuk a rekombináns humán miozin-5c nehézmeromiozin előállítását és funkcionális karakterizálását. Igazoltuk, hogy a miozin-5c nyaki régiója a kalmodulinon kívül esszenciális- és regulatórikus könnyűláncokat is képes kötni, amelyek befolyásolják a miozin-5c enzimátikus tulajdonságait. Különböző tropomiozin (Tpm)-izoformákkal dekorált aktin filamentumok is képesek módosítani miozin-5c motoros tulajdonságait: Tpm3.1 növeli, Tpm1.8 nem befolyásolja, míg Tpm1.6 csökkenti az aktin-aktivált ATPáz aktivitást, viszont mindhárom Tpm izoforma fokozza a motorfehérjék aktív mozgató képességét. A motoros tulajdonságokat jelentősen gátolja a pentabromopszeudilin, a korábban már más miozinok vonatkozásában leírt allosztérikus regulátor, ami a molekuladinamikai szimulációk alapján az aktin- és nukleotid-kötő zseb közelében húzódnak kötéskötéshez, fél-telítési dózisa ~280 nM, a kötés számított szabadentalpia-változása -18,44 kcal/mol. Immunhisztokémiai vizsgálataink kimutatták a miozin-5c jelenlétét az endokrin hasnyálmirigyben, a Langerhans-szigetek béta-sejtjeiben, ahol szoros kolokalizációt mutatott az inzulinnal. Az inzulint-tartalmazó szekréciós granulumok mozgása több különböző motorfehérje összehangolt működésén keresztül valósul meg. Eredményink hozzásegíthetnek a miozin-5c-aktin-Tpm komplexek lehetséges szerepének tisztázásához az inzulin-kiválasztás folyamatában.

Tpm: tropomiozin

# RNS VÍRUSBAN KIALAKULÓ G-QUADRUPLEX STRUKTÚRÁK VIZSGÁLATA ÉS STABILIZÁSLÁSUK BEFOLYÁSOLÁSA TMPyP4, PhenDC3, VALAMINT BRACO19 HOZZÁADÁSÁVAL

Cervenak Miklós Smeller László

Semmelweis Egyetem Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet, Budapest

A G-quadruplexek (GQ) olyan nemkanonikus polinukleotid szerkezetek, melyek a nukleinsav molekulák guaninban gazdag régióiban alakulhatnak ki. Egy GQ-t 2-3 egymás fölött elhelyezkedő G-kvartett alkot. A G-kvartett egy síkba rendezett, Hoogsten-féle hidrogénkötésekkel összetartott 4 darab guaninból áll. GQ szerkezetek előfordulnak például a telomer, vagy egyes onkogén promóter régiókban.

Több potenciálisan GQ kialakítására képes szekvencia ismert a SARS-CoV-2 genomjában is. Elsődleges célunk, ezen G-quadruplex struktúrák termodinamikai stabilitásának vizsgálata és a stabilitást befolyásoló tényezők leírása. Kutatásunk során kiemelt hangsúlyt fektettünk a GQ stabilizátor ligandok stabilitásra gyakorolt hatására.

Kísérleteink során fluoreszcens spektroszópiával vizsgáltuk az egyes oligonukleotidok végeihez kapcsolt fluorofórok között létrejött energiáttranszfert. Nemlineáris regressziós módszerekkel határoztuk meg a fázisátmenet (unfolding) hőmérsékletét ( $T_m$ ), valamint az ezt kísérő entalpiaváltozást ( $\Delta H$ ).

A SARS-CoV-2 genomjában általunk vizsgált három RNS oligomer mindegyike képes GQ forma kialakítására. A kísérleteink során használt stabilizáló ligandumok közül egyedül a TMPyP4 volt képes mindhárom GQ stabilitásának nagymértékű növelésére. Ezzel szemben a PhenDC3, illetve a BRACO19 különböző módon befolyásolta az egyes GQ szerkezetek stabilitását, egyes esetekben destabilizáló hatást mutattunk ki.

Rövidítések:

GQ: G-quadruplex

SARS-CoV-2: Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

RNS: Ribonukleinsav

TMPyP4: meso-5,10,15,20-tetrakis-(N-methyl-4-pyridyl)porphine

PhenDC3: 3,3'-[1,10-Phenanthroline-2,9-diylbis(carbonylimino)]bis[1-methylquinolinium]

# Quorum sensing response of single bacterial cells studied by a microfluidic mother machine device

Ágnes Ábrahám<sup>1,2</sup>, Krisztina Nagy<sup>1</sup>, László Dér<sup>1</sup>, Eszter Csákvári<sup>3</sup> and Péter Galajda<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Biophysics, HUN-REN Biological Research Centre Szeged, Szeged, Hungary

<sup>2</sup> Doctoral School of Multidisciplinary Medical Science, University of Szeged, Szeged, Hungary

<sup>3</sup> Division of Biotechnology, Bay Zoltán Nonprofit LTD. for Applied Research, Szeged, Hungary

Social interactions are common and essential in natural microbial ecosystems. Among these, quorum sensing is one of the most important forms of bacterial communication. Quorum sensing is used to regulate (and synchronize) gene expression of a population according to cell density. It involves the production and detection of small, excreted signal molecules (autoinducers), and controls multiple functions, e.g. bioluminescence, metabolic pathways, motility, biofilm formation, sporulation and virulence. We applied a microfluidic “mother machine” device to trap single cells of *Pseudomonas aeruginosa* bacteria and expose them to waves of autoinducer signal molecules. We studied the quorum sensing response on single cell and population level by means of a GFP-based fluorescence reporter system. We described the kinetics of the response and explored cell-to-cell variations. Furthermore, we tracked cell size, division and cell relatedness and explored their importance in quorum sensing.

## **A spektrális zaj hatása a cirkuláris dikroizmus spektroszkópiával történő szerkezetvizsgálat pontosságára**

Moussong Éva<sup>1,2</sup>, Nyiri Márton Péter<sup>1</sup>, Frank Wien<sup>3</sup>, Kardos József<sup>1,4</sup>, Micsonai András<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup> ELTE Eötvös Loránd Tudományegyetem, Biológiai Intézet, Biokémiai Tanszék, Budapest

<sup>2</sup> ELTE – Funkcionális Nukleinsav-motívumok Kutatócsoport, ELTE Eötvös Loránd Tudományegyetem, Biológiai Intézet, Biokémiai Tanszék, Budapest

<sup>3</sup> SOLEIL Synchrotron, Gif-sur-Yvette, 91192 Franciaország

<sup>4</sup> ELTE NAP Neuroimmunológiai Kutatócsoport, ELTE Eötvös Loránd Tudományegyetem, Biológiai Intézet, Biokémiai Tanszék, Budapest

A cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia széles körben használt technika fehérjék másodlagos szerkezetének vizsgálatára. A legtöbb szerkezetvizsgáló algoritmus a mért és a számolt CD spektrum közötti eltérés minimalizálásán alapszik. Az, hogy miként definiáljuk a spektrális eltérést, illetve a mért spektrum mekkora zajjal terhelt, jelentős hatással van az illesztésre, és így a kapott másodlagos szerkezetre is. Megvizsgáltuk a mérési zaj profilját asztali és szinkrotronradiációs CD készülékek esetén, illetve jellemeztük a különböző algoritmusok pontosságát különböző zajszint mellett. A zaj okozta hiba csökkentése érdekében megvizsgáltuk a spektrumok különböző mértékű simításának hatását, valamint az illesztés pontosságának jellemzésére a normalizált RMSD (normalized root mean square deviation) új formáját dolgoztuk ki. Eredményeink alapján módosítottuk a csoportunk által fejlesztett BeStSel spektrumelemző webszerver algoritmusát, így jelentősen javítva a gyengébb minőségű, zajosabb spektrumok esetében becsült szerkezetösszetételt. Vizsgáltuk továbbá az utóbbi időkben népszerűvé váló, spektrális különbségeken alapuló, fehérjéket összehasonlító módszerek eredményességét a szerkezetalapú összevetéssel szemben.

Támogatók: Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (PD135510, K138937, 2019-2.1.6-NEMZ\_KI-2019-00012, és 2019-2.1.11-TÉT-2020-00101), Nemzeti Agykutatási Program 3.0 (NAP2022-I-3/2022), Eötvös Loránd Tudományegyetem Egyetemi Kiválósági Alap (EKA 2022/045-P278-1). A munka „a Kulturális és Innovációs Minisztérium ÚNKP-23-3 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból finanszírozott szakmai támogatásával készült.”