

Povzetek

V pričujočem doktorskem delu so prikazani rezultati raziskav termodinamike zvižanja α -vijačnice v različnih (bio)molekularnih sistemih. V prvem delu smo se posvetili alaninskim peptidom, ki v vodni raztopini tvorijo α -vijačnico. Sistem smo preučili z dvema eksperimentalnima tehnikama – diferenčno dinamično kalorimetrijo (DSC) in CD spektroskopijo. Z DSC smo natančno izmerili temperaturno odvisnost toplotnih kapacitet alaninskih peptidov različnih dolžin. Z uporabo statistično-termodinamskega Lifson-Roigovega modela, ki opisuje prehod α -vijačnica-naključni klobčič, smo uspešno opisali eksperimentalne podatke ter določili temeljne parametre zvitja alaninske α -vijačnice z visoko zanesljivostjo. Določitev nukleacijske konstante je sploh prva kalorimetrična določitev tega osnovnega parametra za prehod α -vijačnica-naključni klobčič. Rezultati spektroskopske raziskave termične denaturacije alaninskih peptidov v veliki meri potrjujejo izsledke kalorimetrične študije. V raziskavi smo pokazali, da trenutno uveljavljena metoda analize CD spektroskopskega signala α -vijačnih peptidov podceni delež aminokislinskih ostankov v α -vijačnici (heličnost). Zato smo razvili nov računski postopek (model) za obravnavo CD signala α -vijačnih peptidov, ki omogoča boljši opis spreminjanja heličnosti med razvijanjem peptida. Modelska analiza iz eksperimentalnih podatkov izlušči več informacij, modelni parametri pa so določeni z večjo zanesljivostjo. Računalniški program za oceno heličnosti peptida je prosto dostopen na GitHub-u (<https://github.com/rubiscoo/Dichroic-CD-model>).

V drugem delu doktorskega dela smo preučevali α -vijačnice v kontekstu intrinzično neurejenih proteinov. Z bioinformatičnimi metodami smo preučevali tako imenovane vijačne vezavne motive (ang. helical binding motifs). Te najdemo v številnih intrinzično neurejenih proteinih in igrajo pomembno vlogo pri vezanju na tarčne proteine. Z analizo aminokislinskih zaporedij smo uspeli razložiti obstoj rezidualnih α -vijačnih struktur (ang. residual helical structure) v nevezanih stanjih intrinzično neurejenih proteinov. Pokazali smo na pomembno vlogo aminokislinskih ostankov z večjo težnjo po tvorbi α -vijačnice. Še posebej izrazita in zanimiva je velika pojavnost levcinskega aminokislinskega ostanka. Ta igra v vijačnih motivih dvojno vlogo, saj poleg stabilizacije rezidualne α -vijačne strukture pomembno prispeva k močnim interakcijam (ang. hotspot) s tarčnimi proteini. Dvojno vlogo levcina v vezavnih motivih smo potrdili tudi eksperimentalno s spektroskopskimi (CD) in kalorimetričnimi eksperimenti (ITC). S kombinacijo slednjih eksperimentalnih tehnik smo preučili tudi interakcijo toksina HlgB2 in

antitoksina HigA2, ki se ob vezanju na globularni toksin uredi v α -vijačnico. Z uporabo Lifson-Roigovega modela in disekcije termodinamskih parametrov asociacije smo uspešno razložili termodinamske prispevke vezanja in zvitja intrinzično neurejenega proteina. Tako smo pojasnili termodinamske vzroke visoke afinitete ($K_D = 3\text{pM}$) intrinzično neurejenega proteina za asociacijo z globularno tarčo. Ta je primerljiva najvišjim afinitetam asociacije globularnih proteinov. Analiza omogoča tudi določitev termodinamskih prispevkov zvitja α -vijačnice za zaporedja z nizko težnjo po tvorbi α -vijačnice, česar drugi pristopi ne omogočajo.