

A projekt támogatását a humán sejtek homológ rekombinációs lépéseiben alapvető szerepet játszó hRad51 fehérje kölcsönhatásainak kísérleti biofizikai eszközökkel történő jellemzése céljából kaptuk. A rekombináz funkció során meghatározóak a fehérje ön-asszociációs folyamatai, asszociációja egyes és kettős szálú DNS-szakaszokkal, kölcsönhatása reguláló fehérjékkel, és a sejt környezet komponenseivel. A vizsgálatok során modern és unikális biofizikai kísérleti technikákat szándékoztunk alkalmazni e kölcsönhatások szerkezeti, mechanikai, dinamikai és kinetikai tulajdonságainak jellemzésére és az egyes kötődési reakciók termodinamikai paramétereinek meghatározására. Konkrétan, a vizsgálatokat a hidrosztatikai nyomás és a hőmérséklet függvényében végzett fluoreszcencia és foszforeszcencia spektroszkópia, izotermikus titrációs kalorimetria, gyors kinetikai valamint egy-molekula érzékenységű fluoreszcencia mikroszkópiái, AFM és lézer-csipesz módszerek segítségével terveztük végezni. Ez a kutatási téma mind a mintakészítés metodikája szempontjából, mind a célkitűzésben megfogalmazott problémák szempontjából a témavezető csoportja és az Intézet szempontjából is egy új, izgalmas területet jelentett. Vizsgálataink középpontjába a hRad51 rekombináz funkciójának lépései közül az egyik legmeghatározóbb, és szerkezeti szempontból számunkra legérdekesebbnek tűnő állapotot, az u.n. preszinaptikus filamentumot állítottuk. Ez a szerkezet a DNS kettőstörések helyén létrejövő ssDNS szakaszokon alakul ki hRad51 monomérekből, a funkció által jól meghatározott helikális szerkezetben. A szerkezet paraméterei igen fontosak a javító mechanizmus további lépései számára, mivel ez a szerkezet köt meg dsDNS-szakaszokat, és így tud megindulni a preszinaptikus filamentum tengelyében tárolt ssDNS-szállal homológ szakasz keresése. A preszinaptikus filamentum megfelelő szerkezetben történő kialakulásának feltételei önmagában kulcsfontosságúak a homológ rekombináció eredményessége szempontjából. Ezen kívül, a kérdéskör olyan általános jelentőséggel bíró kérdések tanulmányozására ad lehetőséget, mint a fehérje önszerveződés, és ennek nukleinsavakkal való kölcsönhatások általi perturbációja, vagy indukciója.

**A projekt első évében** folyó munkát a mintakészítés protokolljának kidolgozása, és a lehetőségként felmerülő kísérleti metodikák alkalmazhatóságának tesztelése határozta meg.

1. A fehérje bakteriális expresszióval történő előállításának és tisztításának módszerét abból a mintából és protokollból, kiindulva kezdtük kidolgozni, amit együttműködési partnerünktől, Haracska Lajostól (SzBK) kaptunk a munka indulásakor. Beszereztük a biokémiai eljárásokhoz szükséges vegyszereket és hiányzó eszközöket, egy új laboratóriumot építettünk ki, és a megszervezett munkakörülményekhez adaptáltuk a kapott protokollt. A kapott fehérje minta minőségének fizikai módszerekkel történő vizsgálata azonban azt mutatta, hogy a homogenitási, tisztasági fok nem lesz megfelelő a tervezett mérési módszerek alkalmazásához. Ezért szükség volt a protokoll újratervelésére, új plazmid elkészítésére, a megfelelő hozamot biztosító baktérium-törzs kiválasztására, és a fehérje termelés és tisztítás minden egyes lépésének ellenőrzésére, esetleges korrekciójára. A DNS-munka során nemcsak a vad típus előállítására készültünk fel, hanem több pontmutáns plazmidja is elkészült. A hRad51 nem tartalmaz triptofánt, így egyik célunk az volt, hogy a vizsgálandó témák szempontjából fontos hely közelébe triptofánt ültetve be alkalmassá tegyük a mintát szerkezetváltozások fluoreszcencia-módszerekkel történő vizsgálatára a konformáció elhanyagolható módosítása mellett (F126W, Y315W). Irodalmi adatok alapján, későbbi esetleges fluoreszcencia-mikroszkópiái mérések céljára elkészítettük egy olyan pontmutáns plazmidját is, amelyben egy feltételezetten (...) a felületen levő egyik ciszteint cseréltük szerin-re (C319S), így csupán egyetlen felületi ciszteint meghagyva maleinimid-jelző esetleges specifikus kötődésére. A fehérje DNS-kötő aktivitásának bizonyítására gél-shift méréseket végeztünk és bizonyítottuk a kötődést mind dsDNS, mind ssDNS esetén (2 poszter nemzetközi konferencián és 1 sz. publ.).

2. A fehérje önasszociáció és filamentum-képzés vizsgálatára alkalmazható metodikákat a wt hRad51 mintán és az F126W mutánson kezdtük meg tesztelni. Elsősorban a fluoreszcens jelzésen alapuló nyomás-perturbációs módszerre fókuszáltunk, amellyel korábban a hemoglobin alegységek kötődési állapotjának alloszterikus effektorok hatására történő megváltozását sikerült jellemeznünk (Schay et al. 2006, JBC). A méréshez korábban használt fluoriméter azonban már nem volt működőképes, egy kevésbé érzékeny, használaton kívül álló Hitachi F2500 típusú fluorimétert volt módunk használatba venni, amelynek megvilágító és adatgyűjtő optikáját át kellett alakítani a nyomáscella henger-alakú küvetájának használatához. A műszer átalakítása megtörtént, és kipróbálásra került a hRad51 asszociátumok vizsgálatánál. Próbaként az ANS fluoreszcens jelző jelét vizsgáltuk a fehérje mintával való inkubálás után, és adott nyomástartományban karakterisztikus fluoreszcencia-intenzitás növekedést tapasztaltunk. Ezt azzal magyaráztuk, hogy a nyomás növekedése disszociálja a fehérje-asszociátumokat, ami új kötőhelyeket nyit meg a hidrofób és elektrosztatikus ANS-kötés számára. (Ismeretes, hogy az ANS molekula fluoreszcencia intenzitása és a spektrum maximumhelye is jelentősen változik, ha vizes környezetből fehérjéhez kötött állapotba kerül.) Mivel más körülmények között létrejött asszociátumok más nyomástartományokban mutattak disszociációt, a módszer alkalmasnak tűnt az önasszociációt befolyásoló paraméterek meghatározására, és hatékonyságuk jellemzésére a határfelületi kötés energiáján (ΔG) keresztül.

3. Sikeres ITC méréseket végeztünk egy IUP fehérjén együttműködésben Óvádi Judit (MTA TTK) csoportjával. A fémion-kötés és nukleotid-kötés hatására végbemenő konformációváltozást jellemeztük termodinamikai paraméterekkel. Ez az önmagában is érdekes munka (2. sz. publikáció) a Rad51-témához előkísérletként kapcsolódik. Egyrészt, hasonló vizsgálatokat terveztünk a Rad51 filamentum-képzés során, másrészt, terveztük a TPPP/p25 IUP fehérje és a rekombináz filamentum-képző határfelülete közötti kölcsönhatás tesztelését. A fenti előzetes Rad51-eredményekből 2011-ben egy-egy poszterrel szerepeztünk két nemzetközi rendezvényen, a Budapestet tartott „8th EBSA European Biophysics Congress” –en és a Strasbourgban rendezett „12th International Conference on Methods and Applications of Fluorescence”-en.

**A projekt második évében** (2012. év szakmai beszámolója) a reprodukálható kísérleti eredményekhez szükséges megbízható mintakészítési eljárás véglegesítése céljából elsősorban a fehérje-készítési protokoll további ellenőrzése és finomítása folyt, valamint a még nem végleges minőségű fehérje-mintákon további metodikák tesztelése.

1. Az év közepén a DNS-munkát elvégző, és a fehérjekészítést kidolgozó posztdoktor kollegánk, Fekete Melinda elment az Intézetből, jelenleg külföldön dolgozik. A protokollt rész-munkaidőben dolgozó új munkatársak bevonásával rutin eljárássá kellett fejlesztenünk. Emellett a fehérje tisztasági fokának és a termelés hatásfokának javítása, a DNS-szennyezés kiküszöbölése, a reprodukálhatóság javítása voltak még megoldandó feladatok. A protokollra vonatkozó irodalmi leírások a végső tisztítási lépésben ioncserélő oszlop-kromatográfia alkalmazását írták le, esetünkben az első évben kipróbált protokoll saját ötlet alapján ssDNS-cellulóz oszlopon való kromatográfiai lépést tartalmazott. Ezt a választást tesztelendő, a megfelelő módszer kidolgozásához többféle ion-cserélő oszlopot is kipróbáltunk az utolsó lépésben. Mivel egy-egy fehérje készítési és tisztítási eljárás 10 nap – két hét időt vesz igénybe, és az eredmény minősítése csak a legvégén lehetséges, a protokoll javítása igen hosszú időszakot jelentett. Végül is sikerült a DNS-szennyezéstől megszabadulnunk, és visszatértünk a ssDNS-cellulóz-oszlop alkalmazására a tisztítás utolsó lépésében. Ezzel a protokoll a következő formában véglegesítettődött.

**hRad51 előállítása és tisztítására kidolgozott protokoll:** A hRad51 wt szekvenciát klónoztuk egy módosított pET-15b vektorba, beleépítve egy szekvenciát N-terminális polihisztidin-tag csatolására és egy TEV-proteáz által felismerendő és hasító helyet a His-tag és a fehérje-szekvencia közé. A fehérjét *E. coli* BL21(DE3)pLysS sejtekben fejeztettük ki, amelyeket 100µg/ml ampicillint és 30µg/ml kloramfenikolt tartalmazó LB medium-ban növesztettünk 37 °C-on míg az abszorbancia elérte az  $A_{600nm} = 0.7-0.8$  értéket. A fehérje-kifejezést 0.2 mM IPTG-

vel indukáltuk 12 órán át 18 °C-on, majd centrifugáltuk. A felülúszót leöntöttük, az üledék tömegét meghatároztuk, és felfuszpendáltuk 5 ml lízis-pufferbe (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, 3 mM β-merkaptotetanol, 5% glycerol, pH 8), ami 1 mM PMSF-t tartalmazott az üledék tömegének megfelelően grammonként. A szuszpenziót lefagyasztottuk 12 órára, majd felolvasztva 1 órát inkubáltuk 5 µg/ml DNÁz-el majd ultrahanggal lízáltuk. A lízátumot centrifugáltuk 20 000 rpm-en 40 percig. A felülúszót 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 3 mM β-merkaptotetanol, 5% glycerol, pH 8 pufferben előkezelt Ni-affinitású kromatográfiás oszlopra vittük, és átmostuk 100-szoros oszloptérfogatú lízis-pufferrel, majd a His-tag-el kötött fehérjét imidazol-gradienssel választottuk le 250mM koncentrációnál. Az 500 µl-es frakciók fehérje-tartalmát SDS-PAGE-analízissel ellenőriztük, és a hRad51-et tartalmazó frakciókat TEV-proteázzal inkubáltuk egy éjszakán át. A TEV-el emésztett fehérjét 4 °C-on 3 órán át 40 mM Hepes, 50 mM NaCl, 5% glycerol, pH 7.5 pufferben dializáltuk, majd az előzetesen ugyanezzel a pufferrel átmosott ssDNA-cellulóz kromatográfiás oszlopra töltöttük. A hRad51 fehérjét NaCl-gradienssel választottuk le, és az 500 µl-es frakciókat SDS-PAGE-el ellenőriztük. A fehérje kb 500 mM NaCl-koncentráció mellett vált le az oszlopról. A DNS-tartalom ellenőrzésére nanodrop-készülékkel UV-abszorpciós spektrumokat vettünk fel, és a koncentrációt is megbecsültük a hRad51 moláris extinkciója alapján, ami a 30 – 50 µM tartományba esett. (9. sz. publ.)

2. A fehérje előállítási protokoll kidolgozása igényelte annak bizonyítását, hogy a végső hRad51 termék kötődik mind ss- mind dsDNS-hez. Ezt gél-shift eredményekkel bizonyítottuk. Fő célunk azonban a filamentum-szerkezet paramétereinek vizsgálata és az önszerveződés során kialakuló **szervezetek vizsgálata** volt. Kialakítottunk egy olyan **vizsgálati protokollt**, ami erre alkalmasnak látszott. Egyik fő szempont volt ebben, hogy tisztán tudjuk vizsgálni annak a környezeti paraméternek a szerkezeti hatását, amelyet kiválasztunk. Saját korábbi tapasztalataink ( ) azt mutatták, hogy a fehérjék stabilitását növelő környezeti tényezőként gyakran használt glicerint, valamint Tween20 felületaktív anyag mindkettő befolyásolhatja a közegben oldott fehérje konformációját. Ezért vizsgálat előtt szükségesnek tartottuk a minta hosszú idejű dializálását (éjszakán át 4 °C-on). Az általában használt foszfát-, vagy Tris-pufferekben a minta dialízis alatt precipitálódott a koncentrációtól is függően. Végül 40 mM Hepes, pH 7.5 puffert és 1-5 µM fehérje-koncentrációt találtuk megfelelőnek, ilyen koncentrációban történt a dialízis Hepes pufferben. A vizsgálati körülmények szempontjából a protokollt úgy alakítottuk, hogy az önszerveződés, a ssDNS jelenlétének hatása, és környezeti tényezők hatása is vizsgálható legyen. A kísérletek többségében ennek megfelelően négyféle mintát hasonlítottuk össze. **A.** a fehérje pufferbe dializálva; **B.** a dializált fehérje ssDNS-el való inkubálás után (37 C, 30 perc); **C.** a fehérje a környezeti tényezőkkel való inkubálás után; **D.** a fehérje ssDNS-el és a környezeti tényezőkkel inkubálva (preszinaptikus filamentum modellje). A mérésekhez szükséges ssDNS-templátot az Agilent-termékeket forgalmazó Kromat Kft.-től szereztek be véletlen szekvenciájú 75 bázis-molekulából álló oligomerek formájában. A DNS-minta fluoreszcencia-szármaszármazékkal (FAM) megjelölt változatát is beszereztük, ami lehetővé tette, hogy a hRad51 kötődését a molekula rotációs diffúziós állandójának változása miatt a FAM festék fluoreszcencia-anizotrópia-változásán keresztül kimutassuk. Ezt a módszert sikeresen adaptáltuk a vizsgálatokhoz, így a vizsgálati protokoll részévé vált összehasonlító mérések céljára.

3. **Szerkezetvizsgáló módszerek kiválasztása.** Intézeti lehetőség a dinamikus fényszórásmérés (DLS), amely gömb-közelítésben jellemzi az oldatban levő részecskék méreteloszlását. Kezdetben irodalmi adatok alapján (EMBO J. 2003, 22, p.4566) feltételeztük, hogy az önszerveződés révén kb. 8 monomérből álló gyűrűalakú képződmények jönnek létre a humán Rad51-ből is, amint azt más species-ek esetében kimutatták. Az „A” állapoton végzett DLS-mérések azonban sokkal nagyobb részecskéket mutattak és az összetett méret-eloszlásfüggvények nehezen voltak reprodukálhatóak. Feltettük, hogy esetünkben nem gyűrűkről, hanem talán filamentumokról van szó, amelyek feltehetően még nem is homogén méretűek, vagy állás közben tovább alakulnak. Ilyen alakú minták szerkezet-változása a DLS-módszerrel nem követhető. Az intézetben rendelkezésre álló AFM mérőhelyek a szál-paraméterek (5 – 10 nm) vizsgálatához nem rendelkeznek elegendő felbontással.

Együttműködést kezdeményeztünk a projektben részt vevő Kardos József-en keresztül, ami lehetővé tette, hogy kipróbáljuk az ELTE Biológiai Intézetében levő JEOL-JEM-1011 típusú transzmissziós **elektronmikroszkóp** használatát a hRad51-asszociátumok vizsgálatára. A mintakészítés sikeres volt, és Kovács János professzor úr segítségével sikerült a mérési paramétereket is megfelelően adaptálni a megfelelő kontraszt és a közel nm-es felbontás érdekében.

4. **Az elektronmikroszkópia (TEM) és a vizsgálati protokoll alkalmazásának tesztelése.** Ennek tesztelését, hogy a TEM paraméterek alkalmasak-e arra, hogy az általunk vizsgálni kívánt preszinaptikus filamentum szerkezetét és annak változását kellő részletességgel jellemezzük, a módszert kipróbáltuk egy rész-témában. Ez a téma arra épült, hogy irodalmi adatok szerint nagy (~ 200 mM) K-ion koncentráció mellett a hRad51-filamentum képződés ssDNA templátra szelektívvé válik dsDNS-el szemben. A K-ionok lényeges szerepét valószínűsítette egy homológ rendszeren nyert röntgen-kristallográfiái eredmény is (Amunugama et al. JBC, 2012), amely szerint K-ionok kötődnek be a filamentum képződésnél monomér határfelületként funkcionáló régiókba, és így közvetlen szerepet játszhatnak a szál-szerkezetben. Ennek keretében a fehérje fent leírt A, B, C és D állapotaiban környezeti tényezőként 1 mM ATP-t és 2 mM CaCl<sub>2</sub>-t alkalmazva TEM-felvételeket készítettünk két sorozatban, amelyek között a különbség csak a hosszú előkészítő dialízis K-ion tartalmában volt, 20 és 200 mM koncentrációban. A D állapotban mindkét esetben helikális filamentumokat kaptunk jól meghatározható szerkezeti paraméterekkel (pitch size, átmérő, szálhossz), amelyek a K<sup>+</sup>-tartalomtól függően kis mértékben különböztek statisztikai elemzés alapján. Az A-állapotú minták szerkezet-nélküli változatos hosszúságú szálakat mutattak nagy K<sup>+</sup>-tartalom mellett, míg kis K<sup>+</sup>-tartalom mellett nem képződtek szálak önasszociációval. A helikális szerkezetet mutató minták alkalmasak voltak arra, hogy a paraméter-értékeket számszerűleg is meghatározzuk jellemzően 100 adat leolvasásával és a pixel-méret kalibrálásával. A pitch-size 8-10 nm-nek, az átmérő 8 - 11 nm-nek adódott.

5. **A nyomáskísérel tesztelése a K<sup>+</sup>-hatás segítségével.** Az ANS-jelző alkalmazhatóságát és a nyomáskísérel kivitelezhetőségét, reprodukálhatóságát a K<sup>+</sup>-koncentráció hatásának vizsgálatával teszteltük. A módszerek alkalmasnak bizonyultak arra, hogy kis szerkezeti különbségeket is ki tudjunk mutatni, azonban a mérések reprodukálhatósága arra utalt, hogy a fehérje-preparálás még mindig további finomításra szorul.

Az eredményekből készített poszterrel ill. előadással szerepeltünk két tudományos rendezvényen az alábbiak szerint:

1. Melinda Fekete, Jozsef Kardos, Gusztav Schay, Koppány Vass, Marta Wesolowska, Judit Fidy:

The conditions inducing the helical filament formation of the recombinase hRad51 in solution and bound to ssDNA.  
Prague Protein Spring Meeting 2012 May 3-6 Prague, poster

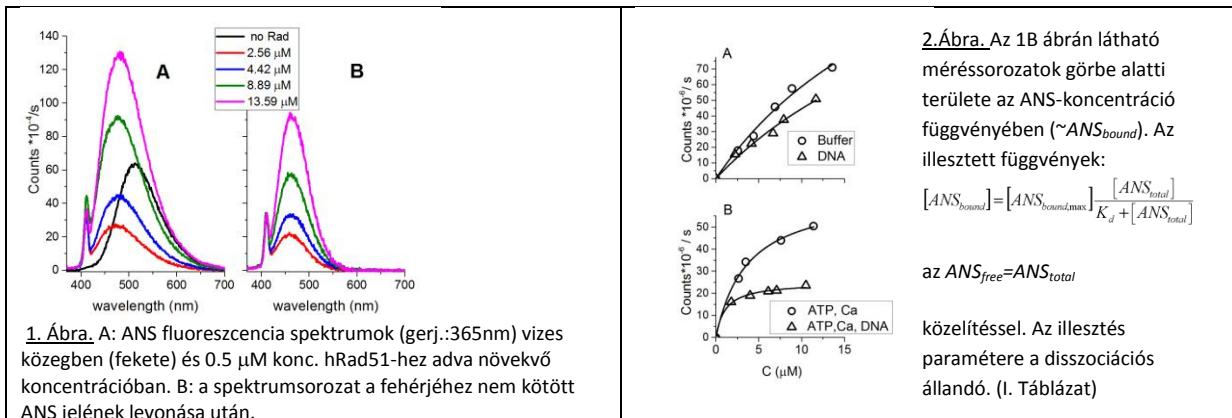
2. Melinda Fekete, Jozsef Kardos, Gusztav Schay, Koppány Vass, Marta Wesolowska, Judit Fidy,

Search for fluorescence techniques to monitor protein interactions in the presynaptic filament formation of homologous recombination.  
Fluorescent Biomolecules and Their Building Blocks, Göteborg, Sweden, 5-8 juli 2012  
oral presentation

**A projekt harmadik évében (2013 – (2014)),** augusztusban engedélyt kértem arra, hogy változatlan anyagi támogatás mellett a projekt kidolgozási idejét egy évvel meghosszabbítsam. Ennek egyik oka az volt, hogy a tanulmányozandó fehérje, funkcionális szerepéből adódóan, nagyfokú asszociációs hajlammal rendelkezik, ami az előállítás és tisztítás több lépésénél is problémákat okoz. Például, viszonylag hamar kiderült, hogy a Hepes puffer kedvezőnek tűnik a tisztított fehérje tárolására és kísérleti mediumként is, azonban az irodalomban leírt kísérletekben legtöbbször Tris vagy foszfát-puffert használtak. Egy másik szempont volt, hogy Hepes használata jelentősen növeli a költségeket is. Ezért több alkalommal kísérleteztünk a fehérje előállítási protokoll módosításával, más pufferekre térve át. Ezek a próbálkozások nem vezettek látványos eredményre, aggregációt tapasztaltunk, és vissza kellett térnünk a Hepes pufferre. Mivel egy-egy tisztítás kb. két heti munkafolyamatot jelent, a próbálkozások jelentősen lassították a munka előrehaladását. Másik lassító körülmény volt, hogy két fontos munkatársat is veszítettünk 2013-ra (Fekete Melinda PhD, Vass Koppány PhD hallgató), és helyettük több kezdő TDK-s, és rész munkaidőben, együttműködésben a témán dolgozó kolléga csatlakozott. Ezzel természetesen a hatékonyság egy időre – a betanulásig – mindenképpen csorbát szenvedett. A munka utolsó szakaszában jól reprodukálható kísérleti munkasorozatokra törekedtünk a korábban előkísérletekben kipróbált metodikák alkalmazásával, **publikálható eredmények** céljából. Ezekben a mérésekben a K-koncentráció 200 mM, a puffer 40 mM Hepes, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, pH 7.5 volt. A fehérje kémiai környezete 1 mM ATP-t és 2 mM CaCl<sub>2</sub>-t jelentett (C és D állapotok), az ssDNS templát koncentrációja 5 μM volt nukleotidokban. Az ATP Mg<sup>2+</sup>-kofaktora helyett Ca<sup>2+</sup>-ot használtunk, az ATP-hidrolízis lelassítása céljából. Ismeretes, hogy a hRad51 ATPáz aktivitással bír, és hogy a hidrolízis után a DNS-hez való kötődés meglazul, a fehérjék monomérként leválnak az ssDNS-ről. A fehérje-minta vizsgált A,B,C,D állapotait 37 °C-on 30 percig tartó inkubálással állítottuk elő. Az állapotok összehasonlításával a fenti protokoll alapján arra kérdeztünk rá, hogy van-e szerepe, és **mi a szerepe az ATP-kötésnek a hRad51 asszociátumok szerkezetében.**

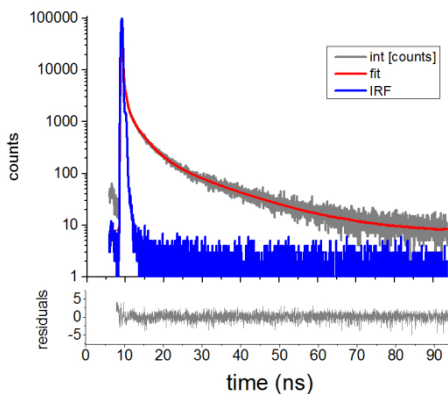
**1. A fehérje koncentráció meghatározás pontosítása.** A tervezett fizikai mérőeszközökben, és a jellemző paraméterek meghatározásához szükséges pontosan ismernünk a minták hRad51 koncentrációját. A metodikák kidolgozása idején a tisztítás után nyert fehérje koncentrációját 2 μl minta-térfogattal abszorbancia-mérés (NanoDrop1000, Thermo Scientific) alapján, irodalomból vett moláris extinkció alapján becsültük, és összevetettük BSA referenciára alapozott Bradford-teszt eredményekkel (3 parallel mérés alapján). Az eredmények szórta, egyes esetekben még szignifikánsan különböző eredményeket is kaptunk annak ellenére, hogy tekintetbe vettük mindkét módszer jelentős metodikai hibáját. Ezután denzitometriás mérés kidolgozásával próbálkoztunk gélikép alapján. Ehhez a méréshez is szükséges egy kalibrációs mérés ismert koncentrációjú fehérjével, azonban itt a mért jel (pixel-fényesség) a referencia fehérje és a minta denaturált állapotában kötött festék-mennyiségen alapul, és nem a felgombolyodott fehérje felületén megkötött mennyiségen, mint a Bradford teszt esetében mért abszorbancia. Ezért, véleményünk szerint a denzitometriás mérés megbízhatóbb értéket ad. Ez a mérés azonban csak megfelelően homogén megvilágítás mellett készült géliképek alapján szolgáltat értékelhető eredményt. Több készüléket is kipróbálva (köztük az intézetit is), az ELTE Biokémiai Tanszékén található műszert találtuk alkalmasnak. Azt találtuk, hogy a denzitometriás eredmény kb. 2-es faktoral kisebb koncentrációt adott, mint a Bradford teszt. A végső kiértékeléseknél az így korrigált koncentráció-értékeket vettük alapul.

**2. Az ANS-kötődés mérése fluoreszcencia-spektrumok alapján. A kötődési állandó meghatározása.** Az ANS-jelző alkalmazása elsősorban azt a célt szolgálta, hogy fluoreszcens jelet nyerjünk a hidrosztatikai nyomás alkalmazása mellett várható filamentum-disszociáció kimutatására. Ehhez szükség volt annak bizonyítására, hogy a jelző kötődik a fehérjéhez, és a kötődés mértéke érzékeny arra, hogy milyen kötőhelyek vannak a jelző számára elérhető módon. Emellett, megvizsgáltuk, hogy a minta A,B,C,D állapotában kimutatható-e szerkezeti különbség az ANS-kötőhelyeken keresztül. Az ANS fluoreszcens jelzőt széles körben alkalmazzák főként hidrofób felületek exponáltságának kimutatására. Kevés szerző (Daniel és Weber, Biochemistry, 1966) írja le azonban azokat a metodikai problémákat, amelyek a kvantitatív kiértékelés esetén felmerülnek. A kötődés kimutatásának és a kiértékelésnek az az alapja, hogy az emisszió kvantumhatásfoka és a spektrum maximum-helye is jelentősen megváltozik (a kvantumhatásfok nő, a spektrum maximuma rövidebb hullámhosszra tolódik) ha a festék vizes közegből kikötődik a fehérje felületére. Ezeket a változásokat kell a festék-koncentráció függvényében megbízhatóan meghatározni. A kiküszöbölendő problémák közé tartozott az, hogy véletlenszerűen megjelent egy a fehérjéhez kötődő festéknél rövidebb hullámhosszon jelentkező másik rövid hullámhosszú komponens is, amit több kísérletsorozat után sikerült a küvetta falára kiülő festékhez rendelni. Kiderült, hogy mivel 500 μl-es küvetákat használtunk, a leszűkített küvetta falán megkötött festék emissziója belesett a fényútba a nem tökéletesen párhuzamos megvilágítás mellett. Megfelelően leszűkített megvilágító rés alkalmazásával sikerült ettől a zavaró jeltől megszabadulni. Kiderült továbbá, hogy figyelembe kell venni a minta fotokémiai érzékenységét, és emiatt a koncentrációtól függő spektrumsorozatot nem lehet többszöri festék-adagolás mellett felvenni, hanem minden egyes esethez friss festékekkel új mintát kell készíteni. Korrekciók utáni spektrum-sorozatra látunk példát az 1. Ábrán (az éles csúcs a megvilágító fény Raman szórása víz-molekulákon). A 2. Ábrán látható, hogy az ANS-kötődés mértéke a fehérje vizsgált négyféle állapotában jelentősen különböző, az illesztésből kapott disszociációs állandók is különbözőek. A kötött ANS jelentős mennyisége a minta A,B,C állapotában laza szerkezetre utal, amelyekben az aggregáció esetén fedésbe kerülő monomér határfelületek elérhetőek a festék kötődése számára. A D állapotot kompakt szerkezetet mutat, de a kevés elérhető kötőhelyen viszont szoros a kötődés.



**3. Az ANS-kötődés vizsgálata fluoreszcencia-élettartam-mérésekkel.** A spektrum-mérésekkel követett ANS-kötődés-vizsgálatokat fluoreszcencia-élettartam-mérésekkel is követték felhasználva az Intézet ISS ChronosBH (Champaign, Illinois, USA) típusú idő-amplitúdó-

Sample:	$K_d$ (ANS)	$\langle T \rangle$	$T_1$	$f_1$	$T_2$	$f_2$	$T_3$	$f_3$	$T_4$	$f_4$	$f_{\text{free}}$	$f_{\text{bound}}$
ANS added to	( $\mu\text{M}$ )	(ns)	(ns)		(ns)		(ns)		(ns)		(total)	(total)
buffer	na	0,28	0,25	0,99	2,66	0,01	-		-			
Rad	26,9	7,27	0,1	0,24	0,81	0,1	3,85	0,33	17,2	0,34	0,33	0,67
Rad+DNA	29,6	5,83	0,11	0,3	0,79	0,12	3,66	0,31	16,5	0,28	0,42	0,58
Rad+ATP+Ca	3,6	3,17	0,12	0,33	0,62	0,33	3,15	0,2	16	0,12	0,69	0,31
Rad+ATP+Ca+DNA	1,1	2,66	0,11	0,54	0,65	0,15	3,33	0,18	15	0,13	0,69	0,31

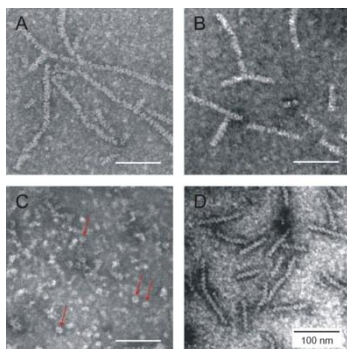


3. Ábra. Rad51 oldathoz adott ANS fluoreszcencia lecsengési görbéje (szürke pontok) a minta D állapotában: 0.75  $\mu\text{M}$  hRad51 40 mM Hepes, 200 mM KCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, pH 7.5 pufferben dializálva, majd inkubálva 1mM ATP, 2 mM  $\text{CaCl}_2$  and 5  $\mu\text{M}$  DNS jelenlétében. Az ANS jelzőt a 37 C-os inkubálás után adtuk a mintához 30  $\mu\text{M}$  koncentrációban, és szobahőmérsékleten 30 percig kevertettük a mintát mérés előtt a kötődési egyensúly kialakításához. A gerjesztési hullámhossz 370 nm, az emisszió hullámhossza 450 nm volt. A műszer válaszfüggvényét kék színnel, az illesztett négy komponensű lecsengési görbét piros színnel jelöltük.

korrelált egy-foton-számláláson alapuló mérőberendezését. A fluoreszcencia-lecsengési görbéket a szabad ANS esetén két exponenciális, a fehérje jelenlétében, a négy állapotban 4 exponenciális összegével tudtuk illeszteni. Egy

lecsengési görbét és az illesztett függvényt a 3. Ábrán mutatok be, az eredményeket a fenti Táblázat tartalmazza. A szabad ANS rövid élettartama (0.28 ns) teljesen megfelel az irodalmi adatoknak. A fehérjét is tartalmazó minták négy élettartama közül a két rövidebbet rendeltük a mintákban szabadon levő ANS molekulákhoz, ezek átlaga megfelelt a szabad állapotnak. A másik kettő átlaga fehérjékhez kötött ANS irodalmi adatainak értékeit közelítette. Az ATP-t is tartalmazó két állapotban lecsökken a kötött ANS mennyisége ami kompaktabb struktúrát jelez, a kötőhelyek nagy része elfedett. Érdekes még a kötődési állandók összehasonlítása. Az ATP-t is tartalmazó szerkezetekben jelentősen szorosabb a kötődés, a kötés konfigurációs feltételei jobban definiáltak. Legszorosabb az illeszkedés az ATP-t és DNS-t tartalmazó mintában. A kevés kötött festék (l. 2. Ábra) itt jól meghatározott szerkezetben kötődik, amit a termikus fluktuációval megnyíló monomer határfelületekhez rendeltünk.

**4. TEM-vizsgálatok: az A,B,C,D állapotok szerkezeti azonosítása.** Az A,B,C,D állapotú mintákat a szerkezetet stabilizáló 37 C-on történő, 30 perces inkubálás után a hordozóra ülepítéssel vittük fel, majd uranil acétáttal kezeltük. A minta előkészítés időigénye (dialízis, inkubálás,



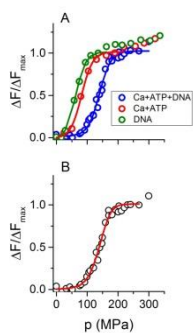
4. Ábra. A minta négy vizsgált állapotában készült felvételek

szállítás az ELTE-n levő műszerhez) miatt a minták az ülepítés és szárítás után, másnap kerültek mérésre, majd a méréseket egy nappal később megismételtük. A mérésre előkészített rétegeket páramentes környezetben, 4 C-on tároltuk. A topográfiai eredmények jó összhangban vannak az ANS kötődési vizsgálatok eredményeivel. A fehérje pufferben történő dialízis után (A) önmagában filamentumokat képez, amelyek laza szerkezetűek, és hosszúságra nézve inhomogén eloszlásúak. Monomér állapotú fehérjéket (átmérő 3 – 4 nm) nem találtunk. Pufferben ssDNS-el való inkubálás után (B) vannak az önasszociátumokhoz nagyon hasonló hosszú filamentumok is, azonban a 75 bázis hosszú ssDNS-szálak hosszúságával megegyező filamentumok (kb. 40 nm) is. A filamentumok átmérője egy felvételen kb. azonos. Ennek alapján feltételeztük, hogy vannak a ssDNS-re épülő szálak is a mintában, de önasszociátumok is. A hRad51 ssDNS-re való kötődését FAM-el jelzett DNS-szálakkal végzett fluoreszcencia-anizotrópia-mérések is igazolták. A (C) állapotban DNS-templát nincs a mintában, de ATP-vel és  $\text{Ca}^{2+}$ -al inkubáltuk. Ezek a kofaktorok jelentősen befolyásolják az asszociációt, feltételezhetően az oligomerizáció határfelületére

kötődve. Jellemzően gyűrű alakú asszociátumok képződnek, ami már határozott szerkezeti kapcsolatot jelent a szomszédok között. A D állapotban a minta ATP,  $\text{Ca}^{2+}$ , és ssDNS templáttal való inkubálás után készült. Látható, hogy az ATP jelenléte kompakt, helikális szerkezetű

filamentumok képződéséhez vezet a DNS-szál körül. A képek lehetőségét adták a szálak paramétereinek jellemzésére. A D-állapotot értékeltük ki nagy számú adat alapján. A pitch-méretet 9.3 nm-nek találtuk, ami egy nappal később 8.4 nm-re változott. Ezt annak tulajdonítjuk, hogy a  $\text{Ca}$ -ionok jelenlétében sem kizárt az ATP-hidrolízis, csupán lelassult. Irodalmi adatok mutatják, hogy hidrolízis után a szálak homológ szerkezetekben kompaktabbá váltak. A szál-hosszúság adatok statisztikai elemzése azt mutatta, hogy egyszeres és többszörös DNS-szálhossznak megfelelő preszinaptikus szerkezetek is kialakulnak.

**5. A hidrosztatikai nyomással indukált oligomer-disszociációs kísérletek eredményei.** Hidrosztatikai nyomás hatására az ANS fluoreszcencia-spektrumok maximum-helye rövidebb hullámhosszakra tolódik és intenzitása jelentősen megnő. Az intenzitás-változást értékeltük, mint a disszociációval megnyíló határfelülethez rendelhető kötőhelyek számának növekedésére utaló jelet. Határozott



nyomásértékekhez rendelhető szigmoid-görbékét kaptunk a nyomás függvényében mind a négy esetben (5. Ábra). A jellemző nyomásértékek (félérték-nyomások) nőttek a minta állapotának megfelelően. A legnagyobb stabilitást a D esetben kaptuk: helikális szerkezetű filamentum ssDNS-szára épülve, határfelületen kötött ATP-vel. Az A esetben volt a legkisebb a disszociációs nyomás, ezt csak jelentősebb hibával lehetett meghatározni, mivel ez a szerkezet atmoszferikus nyomáson is részben disszociált, laza szerkezetű. Ezt az adatsort az 5. Ábra nem tartalmazza. Az 5B ábrán a preszinaptikus szerkezet adatai láthatók egy disszociációs modell illesztésével. (A modell leírása a mellékelt kéziratban elérhető.) A modell illesztésével az atmoszferikus nyomáshoz tartozó határfelületi disszociációs állandót lehetett meghatározni. A nyomáskísérlétekből kapott paramétereket az alábbi táblázatban mutatjuk be. A disszociációs állandók alapján számítható a disszociációhoz tartozó szabadentalpia-változás, ezt is feltüntettük. Szerepel még a disszociációs térfogatváltozás ( $\Delta V$ ) és  $n$ , a filamentum szálhossza.

5. Ábra. A fehérjéhez kötött ANS fluoreszcencia intenzitás változása a hidrosztatikai nyomás függvényében.

minta: ANS kötve 200 mM KCl mellett	$p_{1/2}$ (MPa)	$K_{do}$ (M)	$\Delta V$ (ml/mol)	$n_{max}$	$\Delta G_{diss}$ (kJ/mol)
Rad pufferben	~ 50	$4.1 \times 10^{-8}$ ( $\pm 70\%$ )	-166.7	550	42.4
Rad+DNA	64	$1.15 \times 10^{-8}$ ( $\pm 10\%$ )	-194.2	25	45.6
Rad+ Ca+ATP	82.4	$1.6 \times 10^{-9}$ ( $\pm 50\%$ )	-180.9	8	50.4
Rad+Ca+ATP+DNA	140	$1.8 \times 10^{-11}$ ( $\pm 17\%$ )	-211.2	25	61.6

**6. Az ATP-kötés szerepe a preszinaptikus filamentum felépülésében.** A munka utolsó szakaszában a korábbi tapasztalatok, és többször kiegészített és javított protokollok alapján publikálható eredményekből kézirat összeállítását és beküldését tűztük ki célul. A projekt tervezésénél sokkal több eredményre gondoltunk, azonban nem számítottunk arra, hogy a biokémiai kísérletek céljára alkalmas fehérje minták és termeltetési, tisztítási protokollok nem szolgáltatnak elegendően tiszta, minőségében magas szinten reprodukálható mintákat. Szükséges volt ezek minden egyes lépésének újra-tervezése kísérlet sorozatokon keresztül. A munka előrehaladását lassította, hogy egy új laboratórium felszerelésével, és új metodikák adaptálásával járt együtt, és a kollégák számára is új ismereteket jelentettek.

A központi kérdés, amire választ kerestünk a következő volt. Mi az oka annak, hogy a preszinaptikus filamentum biológiai aktivitásához ATP jelenléte szükséges, de ha az ATP hidrolizál, akkor a funkcióhoz szükséges, kb 10 nm pitch-méretű, helikális szerkezet leépül. Ismeretes, hogy a hRad51 ATPáz aktivitással bír, azaz  $Mg^{2+}$  jelenlétében ATP-ből ADP keletkezik.

Feltettük, hogy a rekombinációnak abban a lépésében, amikor a preszinaptikus filamentum kialakul, az ATP-nek nem biokémiai, hanem szerkezeti szerepe lehet. Olyan kísérlet sorozatot terveztünk, amelynek során a hidrolízis nélküli ATP-kötés megvalósítható, és a kötés tisztán szerkezeti hatása vizsgálható. A fentiekben ismertetett eredmények alapján a következő megállapításokat tehetjük.

1. ATP nélkül a hRad51 fiziológiás só-környezetben nem létezik monomér állapotban, hanem laza szerkezetű hosszú filamentumokat képez önasszociáció révén.
2. A hRad51 ATP nélkül is kötődik az ssDNS-hez, filamentumok képződnek, ezek azonban nem helikális szerkezetűek, így nem alkalmasak arra, hogy részt vegyenek a homológ rekombinációban.
3. A hRad51 önmagában ATP/Ca jelenlétében gyűrűket és rövid, helikális formára emlékeztető filamentum-kezdeményeket képez. Feltehető, hogy ATP-kötés hatására alakult a fehérje egyes felületi tartományja olyan szerkezetűre, amely indukálja a kötődést a szomszédos monomérrel olyan térszerkezetben, aminek meghatározott topológiai formája van. Az ATP-nek tehát ssDNS jelenléte nélkül is van határozott kötőhelye az oligomér szerkezet határfelületein.
4. A fehérjét a D állapotban ssDNS-templáttal telített állapotban, ATP és Ca<sup>2+</sup> jelenlétében vizsgáltuk. A hRad51 szabályos helikális szerkezetben filamentumot képezett a DNS-szálon. A B és C állapot tulajdonságait is tekintetbe véve kijelenthetjük, hogy helikális szerkezetű filamentum csak ATP jelenlétében képződik az ssDNS-szálon. Az is kijelenthető, hogy az ATP-kötés önmagában nem elegendő a szerkezet kialakulásához, a DNS-kötés és az ATP kötése által indukált határfelületi kötődés közötti alloszterikus csatolás is szükséges.

A fenti eredményekből beküldött alábbi kézirat kisebb korrekciókat feltételezve (minor revision) elfogadást nyert a *Journal of Chemical Physics B* -ben. („Decision letter” mellékelve.):

Gusztáv Schay, Bálint Borka, Linda Kernya, Éva Bulyáki, József Kardos, Melinda Fekete, Judit Fidy, **Without Binding ATP, Human Rad51 does not Form Helical Filaments on ssDNA.**

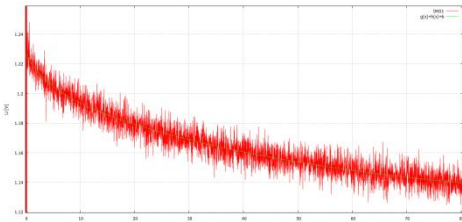
#### **A Projekt eddigi eredményeinek összefoglalása.**

**Tudományos eredmények.** A projekt célja a homológ rekombinációban alapvető szerepet játszó humán Rad51 rekombináz molekuláris kölcsönhatásainak fizikai módszerekkel történő vizsgálata volt. Több, együttműködő partnerektől átvett protokollt kipróbálva, végül a molekuláris klónozástól elindulva újraterveztünk és megvalósítottunk egy fehérje termeltetési és tisztítási eljárást, amellyel a hRad51 fehérjét spektroszkópiai tisztaságú minőségben és kb 50  $\mu M$  koncentrációban elő lehet állítani. Úgyszintén, eljárást dolgoztunk ki a fehérje háromféle, triptofánt tartalmazó pontmutánsának, valamint egy cisztein mutánsának ugyancsak nagy tisztaságban és koncentrált formában történő előállítására. Az sikeres eljárás kidolgozásának egyik kulcsa volt annak megakadályozása, hogy az asszociációra hajlamos fehérje az eljárás lépései során aggregálódjon. Ezt megfelelő puffer- és ion-komponensek kiválasztásával sikerült teljesíteni. A munka során egy új laboratóriumot szereltünk fel eszközökkel, és betanítottunk egy laboránst a szükséges biokémiai eljárások pontos végzésére. Eljárást dolgoztunk ki a fehérje-koncentráció megbízható pontosságú mérésére, valamint a fehérje biológiai aktivitását bizonyító ATPáz aktivitás

mérésére radioaktív jelzés kiküszöbölésével. Mérőberendezést állítottunk össze meglévő egységekből, amelynek segítségével a hidrosztatikai nyomás széles tartományú (400 MPa-ig) változtatása mellett oldat-minták fluoreszcencia spektrumai regisztrálhatók, és szoftvert fejlesztettünk a spektrumsorozatokat korrekciójára és kiértékelésére. Megmutattuk, hogy ez a mérési módszer alkalmas fehérje-homo-asszociációs jelenségek kimutatására, és modell illesztése után az asszociátumot összetartó határfelületi kölcsönhatás energiájának meghatározására. Az általunk kidolgozott termeltetési és tisztítási eljárással előállított fehérje, a hRad51 alkalmas további fehérje önasszociációs és fehérje-DNS kötődési jelenségek tanulmányozására. Mindkét témakör alapvető jelentőségű konkrétan a humán genom stabilitásának, épségének fenntartása szempontjából, másrészt önmagukban is igen fontos biológiai problémákat képviselnek. Az első kidolgozott témáról a fentiekben számoltam be, és a munka részleteiben olvasható lesz a hamarosan megjelenő publikációban.

#### Elindult további projektek.

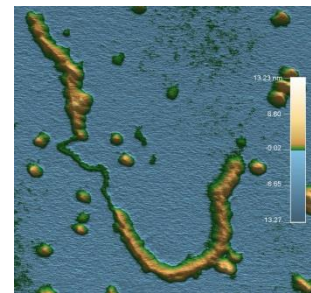
1. A hRad51 triptofán-pontmutánsai célzottan a protomér határfelületek és a DNS-kötő régió szelektív vizsgálatára készültek. Az F126W mutáns tesztelését kezdtük meg stopped-flow kísérletekben a *DNS és ATP-kötődés kinetikájának* mérése céljából, együttműködésben



Kovács Mihály (ELTE TTK Biokémiai Tanszék) laboratóriumával. Az első mérések azt mutatták, hogy elegendő a fluoreszcencia-intenzitás mikroM koncentrációjú fehérje-minták vizsgálatára, és a fluoreszcencia intenzitás jól mérhető, összetett idő-függésű csökkenő jelet mutat. A mellékelt ábra 75mer ssDNS oligó hozzáadása mellett mért időfüggő triptofán-fluoreszcenciát mutat. A megfelelő mutáns kiválasztását nehezíti, hogy a hRad51 kristályszerkezetét még nem sikerült meghatározni, a becslések homológ szerkezetekre alapoznak. A vizsgált mutáns triptofánjának (wt-ben fenilalanin) helyét egyes vélemények a DNS-kötő hely (JMB (2008) 383, 575), mások a határfelület közelében (PNAS (2009) 106, 13248)

jósolják. Az ATP-kötési és a DNS-kötési kísérletek várhatóan erre a kérdésre is fényt derítenek majd.

2. Újabb irodalmi adatok arra utalnak, hogy a preszinaptikus filamentum mellett a dsDNS-en kialakuló hRad51 filamentumnak is van fontos biológiai funkciója (NAR (2013) 41, 7302). Ezt a szerkezetet kezdtük meg vizsgálni *AFM mérésekkel*, az Intézet AFM-laboratóriumában (vez.: Prof. Kellermayer Miklós). Sikerült kidolgoznunk egy eljárást a filamentum létrehozására és vizualizálására. A mellékelt ábrán látható a templát DNS (1300 bp Lambda DNS) is egy szakaszon, bizonyítva, hogy a többi részen a szál valóban fehérje-filamentum. A magukban álló „pötytyök” mérete a gyakran előforduló gyűrűs szerkezeteknek felel meg. Az első eredmények azt mutatják, hogy az ATP-kötésnek ebben az esetben is alapvető szerepe van a szál-szerkezetben.



#### Tudományos utánpótlás nevelése.

TDK munka, prezentációk és díjak TDK konferencián:

- Soltész Borbála ELTE TTK biofizikus MSc hallgató  
2014 (SE) prezentáció és I. díj
- Borka Bálint ELTE TTK fizikus BSc hallgató  
2014 (SE) prezentáció és II. díj

Diplomamunka, szakdolgozat:

- Soltész Borbála: MSc szakdolgozat 2015 (ELTE TTK biofizikus szak)
- Borka Bálint: BSc szakdolgozat 2015 (ELTE TTK fizikus szak)

#### Prezentációk nemzetközi konferenciákon:

*Effect of DNA binding on the self-association of the human recombinase protein Rad51*

M. Fekete<sup>1</sup>, G. Schay<sup>2</sup>, J. Kardos<sup>3</sup>, Cs. Pongor<sup>2</sup>, M. S. Kellermayer<sup>2</sup>, J. Fidy<sup>1,2</sup>(poszter)

**8th EBSA Congress, 2011 Aug. 23-27, Budapest**

*Self-association of the hsRad51 recombinase on ssDNA. Studies by combined high pressure and fluorescence methods.*

Schay, G<sup>1</sup>, Fekete, M<sup>3</sup>, Kardos, J.<sup>2</sup>, Kellermayer, M. Jr.<sup>1</sup>, Pongor, Cs.<sup>1</sup>, Fidy, J.<sup>1,3</sup>(poszter)

**MAF12 conference 2011 Sept. 11-14 Strasbourg**

*Conditions inducing the helical filament formation of the recombinase hsRad51 in solution and bound to ssDNA.*

J. Fidy, M. Fekete,<sup>1</sup>J.Kardos, G. Schay, K. Vass, M. Wesolowska, (poszter)

**2nd Prague Protein Spring meeting: Proteins in Different Environments, 2012, Május 3-6, Prága**

*Search for fluorescence techniques to monitor protein interactions in the presynaptic filament formation of homologous recombination.*

Melinda Fekete<sup>a</sup>, Jozsef Kardos<sup>b</sup>, Gusztav Schay<sup>a</sup>, Koppány Vass<sup>a</sup>, Marta Wesolowska<sup>a</sup>, Judit Fidy<sup>\*a</sup>(Előadás, Fidy J.)

**Fluorescent Biomolecules and their Building Blocks – Design and Applications (FB<sup>3</sup>), 2012, July 5 - 8 Göteborg, Sweden**

*Structural stability of hsRad51 filaments of self-aggregates and of presynaptic complexes studied by electronmicroscopy and pressure tuning fluorescence spectroscopy.*

Melinda Fekete<sup>a</sup>, Jozsef Kardos<sup>b</sup>, Gusztav Schay<sup>a</sup>, Judit Fidy<sup>\*a</sup>(poszter)

**American Biophysical Society Congress, 2013, Febr. 2-6, Philadelphia**

**ATP BINDING IS PREREQUISITE TO THE HELICAL STRUCTURE OF HUMAN RAD51 PRESYNAPTIC FILAMENT**

Judit Fidy<sup>1</sup>, Bálint Borka<sup>1</sup>, Eva Bulyáki<sup>2</sup>, József Kardos<sup>2</sup>, Gusztáv Schay<sup>1</sup>, (poszter)

**American Biophysical Society Congress, 2015, Febr. 7-11, Baltimore**

„Decision Letter” a publikáció elfogadásáról.

Journal: The Journal of Physical Chemistry  
Part: Part B: Biophysical Chemistry, Biomaterials, Liquids, and Soft Matter  
Section: B: Biophysical Chemistry and Biomolecules  
Please note that the final decision on journal Part and Section remains with the journal Editors.

Title: "Without Binding ATP, Human Rad51 does not Form Helical Filaments on ssDNA"  
Authors: Schay, Gusztav; Borka, Bálint; Kernya, Linda; Bulyáki, Éva; Kardos, József; Fekete, Melinda; Fidy, Judit  
Manuscript ID: jp-2015-12220h.R1

Dear Prof. Fidy:

Congratulations; your Article has been accepted for publication in The Journal of Physical Chemistry Part B: Biophysical Chemistry, Biomaterials, Liquids, and Soft Matter, B: Biophysical Chemistry and Biomolecules.

You should receive galley proofs in approximately 1-3 weeks, and your manuscript should be published on the Web in 2-4 weeks and in a print issue in 6-8 weeks. Please note: An ACS ID is required to access proof materials. If you do not have an ACS ID, you will be prompted to create one or go to <http://www.acschemworx.org> to register.

Should you happen to be away during that period, you might assign one of your collaborators to do the proofreading for you. Once a manuscript appears on the Web, it is considered published. Any change to the manuscript will then need to be submitted to the journal office as an Addition or Correction.

Please address all further inquiries regarding this manuscript by contacting the Journal Production Department at [jpcprod@acs.org](mailto:jpcprod@acs.org) or 614-447-3665.

Thank you again for choosing The Journal of Physical Chemistry for the publication of your work.

With sincere regards,

Prof. Robert Dickson  
Senior Editor  
The Journal of Physical Chemistry  
Phone: 404-894-4007  
Fax: 202-354-4799  
Editor Email: [dickson-office@jpc.acs.org](mailto:dickson-office@jpc.acs.org)