

# Zárójelentés

Korábbi kutatómunkánk során olyan fenomenologikus modellt dolgoztunk ki a fehérjék stabilitását és működését is befolyásoló Hofmeister-effektusok leírására, ami a fehérje-víz határfelületi feszültség mint központi paraméter segítségével képes volt magyarázatot adni az effektusok változatos megjelenési formáira. Jelen projekt keretében - komplex módszertani repertoár alkalmazásával - a modellt további kísérleti és elméleti bizonyítékokkal támasztottuk alá, egyúttal megadtuk annak mikrofizikai magyarázatát. Az eredmények - amelyekből számos konferencia-kiadvány mellett eddig 5 referált cikk jelent meg nemzetközi folyóiratokban, további publikáció pedig közlés alatt áll – kiemelik a határfelületi vízrétegnek a fehérje-konformációban és –működésben betöltött szerepét. Megközelítésünk általános jellege lehetővé teszi, hogy a koncepciót kiterjesszük az élő anyag magasabb szervezetségi szintjeire (pl. membránok, sejtek) is. Ennek jegyében – kooperációs munka során - létrehoztunk egy olyan modellrendszert, amely alkalmas arra, hogy az egyes biológiai barrieréket (pl. vér-agy gát, bélhám, stb.) alkotó endotél vagy epitél sejtek vizes közegben történő kölcsönhatásait tanulmányozzuk Hofmeister-ágensek jelenlétében. Potenciális gyakorlati hasznosíthatóságára való tekintettel a modellrendszer jogvédelmére szabadalmi beadványt tettünk.

## *Az eredmények részletes ismertetése*

### **1. Kísérletek a Hofmeister-sók fehérjékre gyakorolt hatásának tanulmányozására**

#### ***1.1. A Hofmeister sók hatása a fotoaktív sárga fehérje működésére***

A Hofmeister-effektusok egyik megjelenési formája a semleges sók hatása a fehérje működésére. Ennek vizsgálata jegyében lézer flash spektroszkópiai méréseket végeztünk kaotrop és kozmotrop sóoldatokban szuszpendált fotoaktív sárga fehérjén (PYP). A fényindukált abszorpcióváltozásokat optikai sokcsatornás analizátorral rögzítettük, majd számítógépes illesztéssel kvantitatív módon meghatároztuk a jelenségeket leíró legegyszerűbb fotociklus-modellt. Korábbi elméleti munkánk alkalmazásaként - a Hofmeister-sóknak az elemi sebességi állandókra gyakorolt hatása segítségével - azonosítottuk a legnagyobb konformáció-változással járó átmeneteket, továbbá ezekhez kapcsolódóan meghatároztuk a fehérje-víz határfelület változásának irányát (nyitott-zárt konformációk azonosítása) (*Khoroshyy, P. és mtsi. J. Photochem. Photobiol. 2013, 120, 111*).

### ***1.2. A Trp-kalitka miniprotein szerkezeti változásai***

A Hofmeister-sók Trp-kalitka minifehérjére gyakorolt hatásait spektroszkópai módszerekkel (FTIR és CD spektroszkópia) tanulmányoztuk. A CD-spektroszkópai vizsgálatok eddigi eredményeit nemzetközi konferencián ismertettük poszter formájában (*Fábián L. és mtsi., 2012, Regional Biophysics Conference 2012. Book of Abstracts., p. 67*).

### ***1.3. A bakteriorodopszin egyensúlyi fluktuációi***

A bakteriorodopszint mint modellfehérjét – és komplex kísérleti repertoárt – használva kimutattuk, hogy a Hofmeister-sók befolyásolják a fehérje egyensúlyi fluktuációit. A kísérleti módszereket (FTIR- spektroszkópia, kalorimetria és neutron-szórás) úgy választottuk meg, hogy a fehérje konformációs fluktuációiról egymást kiegészítő információval szolgáljanak. Az eredmények - amelyeket fehérje-víz határfelületi feszültség központi szerepére épülő fenomenologikus fehérjemodellünkkel sikerült konzekvensen értelmeznünk – közvetlen kísérleti alátámasztást adnak az elméletünknek, és felhívják a figyelmet a fehérje-víz határfelületnek a konformációt meghatározó szerepére (*Szalontai és mtsi. 2013, Biochimica et Biophysica Acta 1830 4564–4572*).

### ***1.4. Hofmeister-aktív sók hatása a szöveteket elválasztó monocelluláris membránokra***

A határfelületi feszültség biológiai funkciójára vonatkozó hipotézisünket kiterjesztettük az élő anyag magasabb szervezetségi szintjeire – így a szöveteket elválasztó monocelluláris membránokra - is. Ezek fizikai paramétereinek (transzmembrán ellenállás, permeabilitás, zéta-potenciál, optikai tulajdonságok) vizsgálatára alkalmas kísérleti modellrendszert fejlesztettünk ki. Az eredményeket ismertető publikáció (*Walter és mtsi. 2016, Sensors and Actuators B: Chemical 222: pp. 1209-1219*) megjelentetése előtt a módszer jogvédelme érdekében szabadalmi beadványt nyújtottunk be (*P1400517 alapszámú magyar szabadalmi bejelentés*).

## **2. Kísérletek a fehérje-víz határfelület tanulmányozására**

### ***2.1. FTIR-ATR mérések fehérjék illetve aminosav-oligomerek és az őket körülvevő a víz közötti határréteg szerkezetének vizsgálatára***

A fehérje-víz határfelületi feszültséget - a vízben oldott Hofmeister-sók mellett, a várakozások szerint - nagyban befolyásolják a fehérje-felszín közelében elhelyezkedő aminosav-oldalláncok is (ld. pl. a peptid fragmensek és a víz kölcsönhatására vonatkozó szimulációs eredményeinket). A hatás vizsgálatának kísérleti megközelítése céljából - teljes visszaverődéses Fourier-

transzformációs infravörös spektroszkópiát használva - azt mértük meg, hogyan változik meg a víz szerkezete fehérjeoldat-cseppek fokozatos beszáradása során. Megállapítottuk, hogy pl. mioglobin felszíne inkább kaotrop, ellentétben a strukturálisan hasonló hemoglobin inkább kozmotrop felszínével, ami minden bizonnyal a többi fehérjével történő kölcsönhatásuk különbözőségével van összefüggésben. Az eredendően rendezetlen szerkezetű fehérjék (pl. kazein) felszíne közelében elhelyezkedő vízmolekulák kaotrop és kozmotrop hatást egyaránt mutatnak. A méréseket kiterjesztettük más fehérjékre és oligopeptidekre is. Az eddigi eredményeket az MBFT 2015. évi vándorgyűlésén elhangzott előadás formájában publikáltuk (*kivonat: Szalontai és Dér, 2015, Magyar Tudomány*), további adatok gyűjtése és kiértékelése folyamatban van.

### **3. A számítógépes modellezés eredményei**

#### ***3.1. Az ion-víz kölcsönhatás vizsgálata; a kvantumos és klasszikus leírás összehasonlítása***

Egyatomos alkáli kationok ( $\text{Na}^+$  és  $\text{K}^+$ ), illetve halogenid anionok ( $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$  és  $\text{I}^-$ ) és ( $\text{ClO}_4^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ) vízmolekulával való kölcsönhatását vizsgáltuk kvantumkémiai (QC) eszközökkel. Három különböző szintű módszert alkalmaztunk (DFT-B3LYP, MP2 és CCSD(T)) három különböző nagyságú bázisfüggvény készlettel (6-311G\*\*(p), Sadlej-pVTZ és aug-cc-pVTZ(d)). A rendszer kölcsönhatási energiájának számításánál figyelembe vettük a bázisátfedésből adódó hibát is (BSSE). Kimutattuk, hogy az MP2/Sadlej-pVTZ módszer megfelelő referencia értéket szolgáltat a molekulamechanikával kapott kötési energiákkal történő összehasonlításhoz. A klasszikus, nem-polarizálható erőteret számítások során az ionok paraméterezéséhez a szakirodalomban korábban javasolt értékeket, valamint a TIP3P és TIP4P vízmodelleket használtuk. Kimutattuk, hogy a klasszikus modell helyesen adja vissza az ion-víz kötési energiák sorrendjét, és számértékileg is nagy pontosságot mutat néhány esetben (a  $\text{Na}^+$ -víz kölcsönhatási energia hibája 1 kcal/mol alatt van a referencia QC értékhez viszonyítva). A nagyobb ionok esetében ez a hiba jóval nagyobb, eléri a 3 kcal/mol értéket is. Ezt elsősorban a polarizáció és a töltésátvitel figyelmen kívül hagyása magyarázhatja. Az eredmények alapján valószínűsíthető volt, hogy a kiválasztott ion és a TIP3P vízmodell megfelelő lesz a Hofmeister effektus modellezésére. (*Horváth, J. és mtsi., 2012, poszter, Straub Napok, Szeged*).

#### ***3.2. Alanin alapú polipeptidok***

Polialanin, illetve különböző Lys- és Arg-tartalmú polialanin peptidek esetén molekuladinamikai szimulációkat végeztünk az Amber ff99sb-ildn erőteret és a TIP3P vízmodell alkalmazásával. A

molekuladinamikai szimulációkból származó adatok alapján a különböző Hofmeister-aktív sók hatását vizsgáltuk alanin-alapú peptidek stabilitására, helicitására és különböző szerkezeti változásaira. Eredményeink lényegében megegyeznek a Crevena és munkatársai által időközben publikáltakkal (Crevena és mts *BioPhys J.* 2012, **102**, 197). Számolásaink nagyban hozzásegítettek bennünket a számítási eljárások megfelelő beállításaihoz, de a kapott eredményeket így nem tudtuk publikálni.

### ***3.3. Hofmeister aktív ionok fehérjékre gyakorolt hatásának modellezésére alkalmas modell rendszer***

A Trp-kalitka miniprotein a nem-polarizálható (Amber ff99sb-ildn) erőter és a TIP3P vízmodell felhasználásával molekuladinamikai szimulációkat végeztünk rögzített fehérje-geometriával. Számolásainkat tiszta víz, valamint Hofmeister-aktív sók (NaF, NaCl, NaClO<sub>4</sub> és NaNO<sub>3</sub>) jelenlétében is végrehajtottuk. Sikerült kimutatnunk, hogy a kaotrop anionok felhalmozódnak, míg a kozmotrop anionok kiszorúlnak a fehérje-víz határfelületi rétegből a kísérleti tapasztalatoknak megfelelően. Ugyancsak sikerült megmutatnunk, hogy a legnagyobb felületi töltésű helyek környezetében a vízmolekulák reorientációs dinamikáját is befolyásolják az ionok, amennyiben a fluorid lassítja, a két kaotrop anion pedig gyorsítja azt. Egy másik számolási sorozatban a szabad fehérjével - víz és sók jelenlétében - “replica exchange” molekuladinamikai (REMD) szimulációt végeztünk. Ennek segítségével reprezentatív konformációs sokaságot állítottunk elő a 300-360K hőmérsékleti tartományban több hőmérsékleten. Sikerült kimutatnunk, hogy a miniprotein felszínének nagysága (és így a rendszer stabilitása) az alkalmazott anionoknak a Hofmeister-sorban elfoglalt helyével jól korrelál ezeken a hőmérsékleteken, azaz a modellünk alkalmas az effektus leírására legalább kvalitatív szinten.

### ***3.4. A fehérje-víz határfelületi feszültség változásának jellemzésére alkalmas módszer kifejlesztése***

A fehérje víz által hozzáférhető területének (SASA) átlagát, valamint e mennyiség fluktuációját kiszámolhatjuk például az előző pontban már említett REMD szimulációból. Feltéve, hogy a rendszer szabadenergiájának felületfüggő járuléka felírható a SASA és a határfelületi feszültség ( $\gamma$ ) szorzataként, egy alapvető statisztikus fizikai összefüggés segítségével kapcsolatot teremthetünk a felület átlagának  $\gamma$ -szerinti deriváltja és a felület nagyságának fluktuációja között. Ennek segítségével kiszámolható a határfelületi feszültség változása a tiszta vizes esethez viszonyítva. A Trp-cage miniprotein esetére alkalmazva ezt az eljárást, olyan változásokat

kaptunk a határfelületi feszültségekre, amelyek alátámasztják korábban közölt termodinamikai elméletünket.

Eljárásunk helyességének ellenőrzése céljából a fehérje-víz határfelületi feszültség kiszámítására újabb módszert alkalmaztunk, ami a Kirkwood-Buff elmélet számítógépes szimulációkban jól alkalmazható újragondolásán alapul. A víz és az ionok fehérje körüli radiális eloszlásából (vagyis a felület közeli régiókban bekövetkező lokális ion- és vízsűrűség változásokból) szintén kiszámoltuk a felületi feszültség ionok hatására történő megváltozását. A kapott értékek a NaF, NaNO<sub>3</sub> és NaClO<sub>4</sub> esetén jó egyezést mutatnak a saját módszerrel kapott adatokkal 300K-en, a NaCl esetén azonban enyhe növekedést kaptunk a saját módszerrel kapott enyhe csökkenéssel szemben. Megjegyzendő továbbá, hogy a Horinek és mts. (Horinek és mts., *J. Phys. Chem. A* 2011, **115**, 6125) módszerével kapott értékek alig mutatnak hőmérsékletfüggést a mi módszerünkkel ellentétben, ami azzal magyarázható, hogy az előbbi módszer nem veszi figyelembe a fehérje hőmérséklet-függő konformáció-változásait. Eredményeinket - a korábbiakkal együtt - a JCPB-ben publikáltuk (*Bogár és mtsi. J. Phys. Chem. B*, 2014, *118*, 8496).

### **3.5. A Trp-cage miniprotein modellezése vízben oldott, Hofmeister-aktív ionok jelenlétében.**

#### *A határfelületi vízréteg orientációs dinamikája*

A rögzített szerkezetű minifehérjéhez legközelebbi vízmolekulák orientációs dinamikáját vizsgáltuk az orientációs autokorrelációs függvény felhasználásával. Kimutattuk, hogy a tömbfázishoz viszonyítva kisebb lesz a vízmolekulák átlagos rotációs mozgékonyága. Megmutattuk továbbá, hogy a Hofmeister-aktív anionok azon vízmolekulák rotációs dinamikáját befolyásolják leginkább, amelyek oxigén atomjukat fordítják a minifehérje felé (H-kötés akceptorok). Kimutattuk azt is, hogy a kaotrop anionok gyorsítják, míg a kozmotropok lassítják ezt a lokális dinamikát. (*Bogár és mtsi. J. Phys. Chem. B*, 2014, *118*, 8496, *Násztor és mtsi. Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2016, *23*, 29)

#### *Az ionfelhalmozódás és az oldalláncok szerkezeti fluktuációjának korrelációja*

Kimutattuk, hogy a felhalmozódás mértéke skálázza az aminosavankénti térbeli fluktuáció különbségét a tiszta vizes rendszerhez viszonyítva. Több kaotrop anion jelenléte növeli az adott aminosav oldalláncának fluktuációját, ellentétben a kozmotrop anionok esetével, ahol ellentétes hatás tapasztalható (*Násztor és mtsi. Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2016, *23*, 29).

#### *A Collins-szabály és a Hofmeister effektus*

Munkánk során megvizsgáltuk a Hofmeister aktív anionok ( $F^-$ ,  $ClO_4^-$ ) és a pozitívan töltött Lys8 és Arg16 aminosavak, illetve az N-terminális végen található  $NH_3^+$  csoport közötti kölcsönhatást. Elemeztük a kapcsolódó párképzési és tulajdonságokat és kimutattuk, hogy a Collins-szabálynak megfelelően a kaotrop anionokra a legtöbb esetben közvetlen kölcsönhatásba lépnek a fehérjével, míg a kozmotrop ionokra az egy vagy több vízburkon keresztül történő kölcsönhatás jellemző. A töltött oldalláncokéhoz hasonló erősségű kölcsönhatást találtunk olyan kisebb pozitív parciális töltésű csoportok esetén is, amelyek felszín kavitásaiban helyezkednek el (*Násztor és mtsi. 2016 közlésre elküldve*).

#### *A kozmotrop stabilizáció és a kaotrop destabilizáció folyamatát meghatározó változások*

Megvizsgáltuk, hogy milyen mechanizmusok állhatnak a kaotrop perklorát ion által kiváltott szerkezeti destabilizáció, illetve a kozmotrop fluorid ion jelenlétében tapasztalt stabilizáció hátterében. Kimutattuk, hogy fluorid ion esetében a minifehérje és környezete közötti Coulomb és van der Waals kölcsönhatás csökken a tiszta vizes esethez viszonyítva, míg a perklorát esetében nő. Ez egyben a minifehérje és környezete közti csatolás csökkenését illetve növekedését is jelenti.

Kimutattuk továbbá, hogy kaotrop destabilizáció során a perklorát ionok jelentős dehidratáción esnek át, ami fontos hajtóereje lehet a folyamatnak. A kozmotrop stabilizáció esetében a miniprotein első hidratációs burka átfed a fluorid ionok erősen kötött hidrátburkával, aminek következtében jelentősen lassul az itt lévő vízmolekulák rotációs dinamikája, csökkentve a felületi fluktuációt is (*Násztor és mtsi. 2016, közlésre elküldve*).

#### **3.6. A beta-amiloid monomer szerkezetének és stabilitásának számítógépes vizsgálata vízben oldott, Hofmeister-aktív ionok jelenlétében**

A beta-amiloid fehérje aggregációjában fontos szerepet játszhat, hogy ennek a 40-42 aminosav hosszúságú peptidnek a szerkezete erősen függ a környezetétől. Ez a környezeti hatás származhat a kölcsönható partnerektől, pl. az oldószertől, és a benne oldott sóktól is. A REMD szimulációkból kapott eredmények alapján az  $A\beta$  a savas környezetnek megfelelő protonáltság esetén TFE oldószerben (Bogár és mtsi. Struct. Chem. 2015, **26**, 1389), illetve fiziológiás körülmények között, vizes oldatban is rendezetlen szerkezetet mutat. Kimutattuk, hogy vizes oldatban, pH 7-en a kaotrop  $F^-$  ionok hatására az  $A\beta$  esetében is jelentősen csökken a SASA, míg a kozmotrop  $ClO_4^-$  ionok hatására nő. Az előbbi változás lényegesen nagyobb a Trp-kalitka miniprotein esetén kapottnál valamennyi vizsgált hőmérsékleten, míg az utóbbi összemérhető az ott számolt értékekkel. A határfelületi feszültség megváltozása fluorid ion esetén a teljes vizsgált

hőmérsékleti tartományon közel állandó értéket mutat, ami közel megegyezik a Trp-kalitka esetében kapott értékkel. A perklorát esetén a  $\gamma$  csökkenése jelentősen kisebb, mint amit a Trp-kalitka esetében tapasztaltunk. Ezek az eredmények a közeljövőben publikálásra kerülnek a sók által indukált szerkezeti változások analizésével együtt.

### ***3.7. Peptid fragmensek hidratációja***

Szimulációs módszerekkel megvizsgáltuk a fehérjefelszín-közeli vízmolekulák tulajdonságait két, egyenként 12 aminosavból álló polilizin (PLL) és poliglutamát (PGA) oligomer esetében. Mindkét modellrendszert harmonikus kényszerek segítségével fix pozícióban tartottuk, a molekulagerincet pedig  $\alpha$ -helikális szerkezetben. A szimulációkat a korábban leírt paraméterekkel végeztük. A kapott eredmények nem kerültek közlésre, az itt tapasztaltakat felhasználtuk a korábban leírt - az ion párképzésre vonatkozó - Collins szabály modellezhetőségére vonatkozó kutatásainkban, amelyeket a Trp-kalitka minifehérjén végeztünk.