

Záró beszámoló

Koenzimek szerkezeti és dinamikai vizsgálata femtoszekundum időfelbontású fluoreszcencia spektroszkópiával

121170 PD

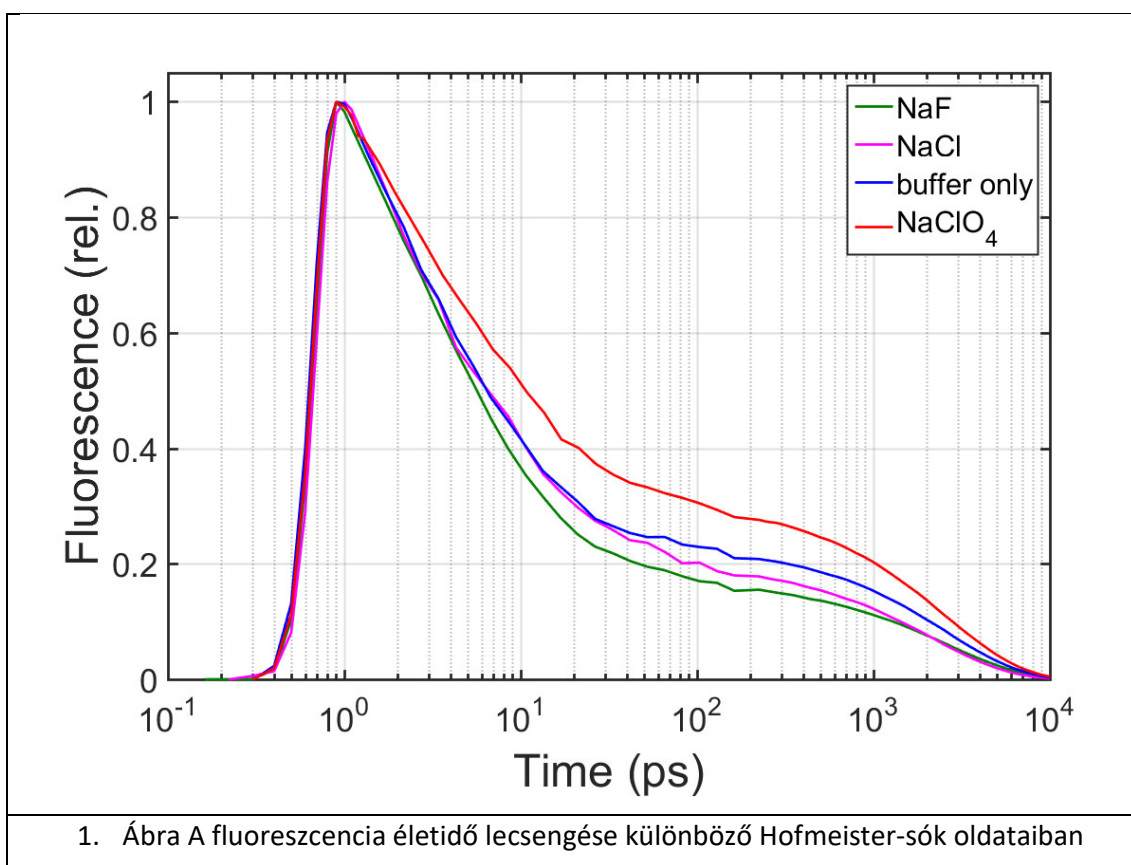
A projekt során flavin-adenin-dinukleotid (FAD) és nikotinamid-adenin-dinukleotid (NADH) koenzimek molekuláris szerkezetének jellemzésére kísérleteket végeztünk ezen molekulák 50 fs és 10 ns között mért autofluoreszcenciája kinetikai paramétereinek meghatározására és ezek hozzárendelésére különböző konformációkhoz. A kísérleti mérések elemzését újonnan kidolgozott matematikai módszerrel végeztük, mely ötvözi a gépi tanulás és optimalizálás módszereit. Az elvégzett molekula mechanikai számítások jó egyezést mutatnak a kísérleti eredmények matematikai értelmezésével.

Az első évben korábbi diszperziómérések alapján láttuk, hogy szükséges egy olyan diszperzió kompenzáló egység kialakítása, melynek elemei nagyobb anyagi diszperzával rendelkezzenek, hogy az optikai veszteségek csökkenthetőek legyenek. A szükséges hullámhossz tartomány függvényében további 25 000 – 10 000 fs² diszperzió bevitele szükséges. Ehhez az elsődleges kísérletekhez egy 150 mm hosszú N-BK7 anyagú tömböt használtunk, de itt többszörös reflexió miatt (négyyszer haladt át a fény az üvegtömbön a szükséges diszperzió eléréséhez) nagyok voltak a veszteségek. Az elérhető üvegtípusok közül az SF11 jelűt választottuk annak elérhetősége, nagy diszperziója és viszonylag kedvező ára miatt. Az számítások alapján egy 70 mm hosszú üveg tömböt telepítettünk a közös lézerútba és egy 20 mm hosszút a pumpa lézer útba, hogy a diszperziót kellőképpen ellensúlyozni tudjuk a lézer oszcillátorunkkal. Az üvegtömbök telepítés után tesztméréseket végeztünk az optimális körülményeket meghatározandó, hogy a lehető legjobb készülékfüggvényt érjük el. A mérések azt mutatták, hogy mintegy ~160 fs felbontás érhető el, mely kétszer kisebb a korábban elérhető értékeknél. Továbbá az üvegtömbön való immár egyszeres áthaladás miatt a jel-zaj viszony is mintegy háromszorosára növekedett.

A pumpaenergia stabilitása érdekében is lépéseket tettünk. A nagyobb jel-zaj viszonynak köszönhetően a FAD koenzim fluoreszcencia kinetika mérése során a mért felkonvertált jelben ingadozást érzeltünk. Ezt a pumpaenergia kis ingadozása okozta, mely a

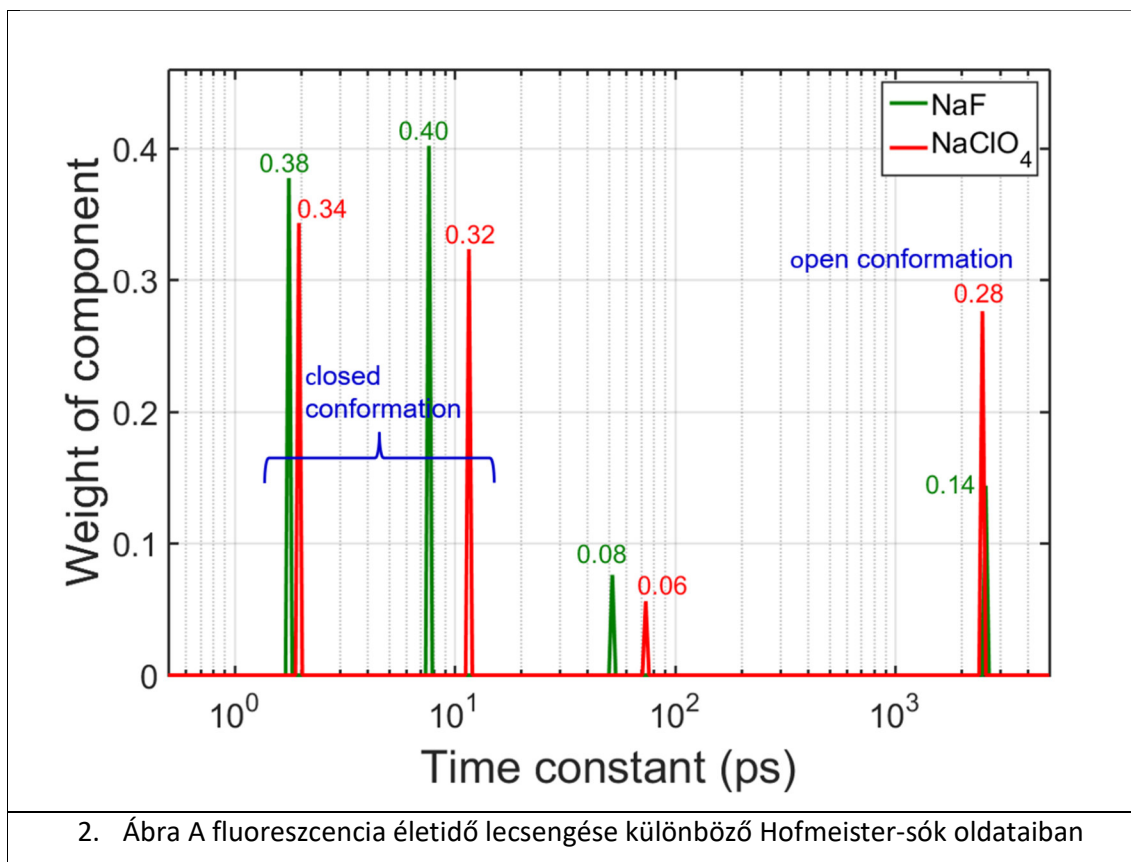
laboratóriumi hőmérséklet kis ($\pm 0.5^\circ\text{C}$) változása miatt következett be. Egy lambdafél-lemez programozott mozgásával és egy polarizációs osztó segítségével, egy folyamatosan visszacsatoló teljesítménymérő alkalmazásával a pumpaenergia ingadozását 3-4%-ról kevesebb, mint 0,5%-ra csökkentettük, mely jelentősen növelte a kísérleti adatok megbízhatóságát.

A fent részletezett fejlesztések lehetővé tették a FAD koenzim részletes tanulmányozását kaotróp (NaClO_4), kozmotróp (NaF) és semleges (NaCl) Hofmeister sók oldataiban. A FAD koncentrációja 1,5 mM volt, ami az optimális szint tekintve az anyagfelhasználást és a jel nagyságát, melyet egy koncentráció függő mérés során sikerült megállapítani 0,1 mM és 3 mM közötti koncentrációk mérésével.



A részletezett minták mérését 480-650 nm hullámhossztartományon végeztük el 10 nm-es lépésközzel. Referencia és ellenőrző mérésenként FAD vizes oldatát alkalmaztuk. A mért eredmények világosan megmutatták, hogy a fluoreszcencia élettíde jelentősen csökkent a kozmotróp NaF oldat esetén, ami azt jelenti, hogy ennek a sónak a hatására a koenzim a zártabb konformációs állapotot vesz fel. A NaClO_4 oldat alkalmazásakor a fluoreszcencia élettíde hosszabb lett, ami azt igazolja, hogy ez a kozmotróp só a jobban nyitott konformációk

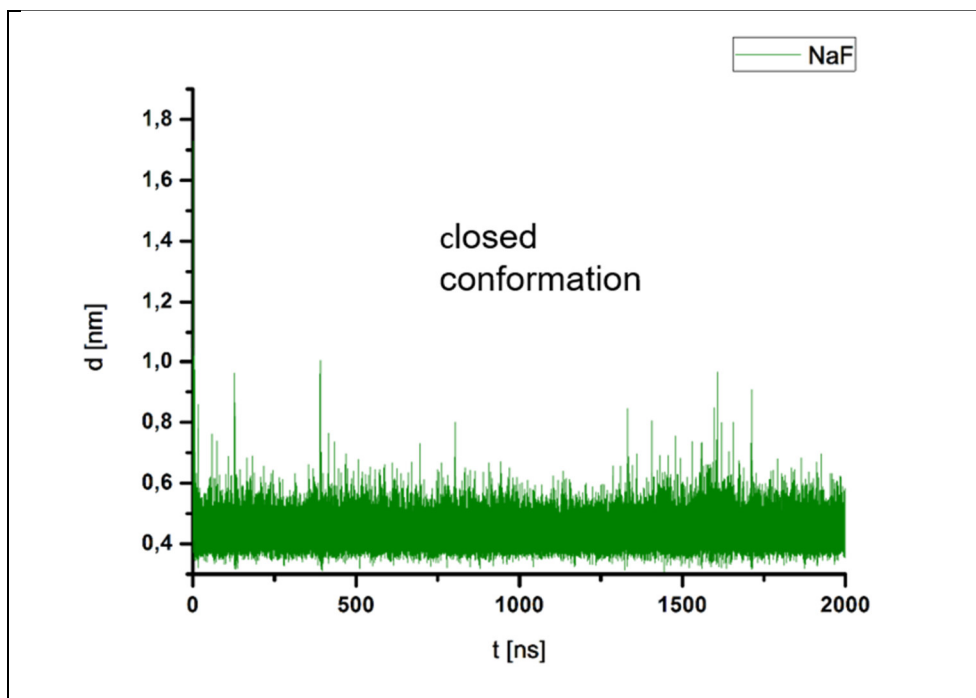
állapotok populációját növelte meg. A NaCl nem változtatott érdemben a fluoreszcencia életidőn a semleges vizes oldathoz képest.



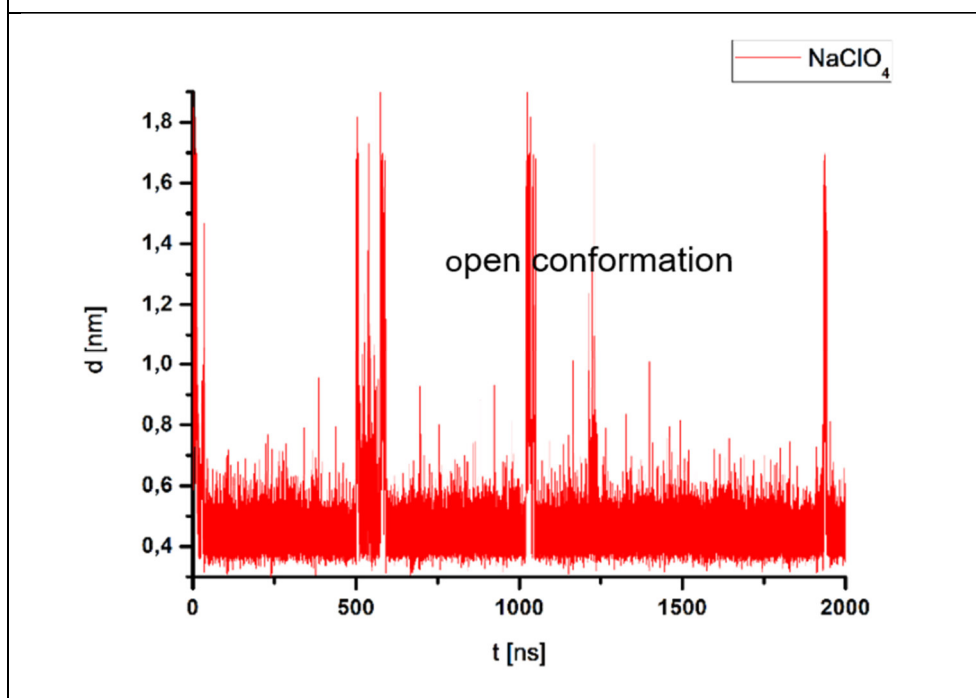
Az adatokat a korábban kidolgozott matematikai módszerrel elemezve [Groma, G.I., et al., *Estimation of kinetic parameters from time-resolved fluorescence data: A compressed sensing approach*. Rsc Advances, 2012. 2(30): p. 11481-11490.] exponenciálisokat illesztünk különböző időállandókkal. A hosszabb/rövidebb időállandók a nyitott/zárt konformációknak megfelelően azok populációjával arányosan változik (2. ábra).

A fenti sókombinációk esetében a FAD molekulák molekuláris dinamikus (MD) számításait a Gauss-féle kvantumkémiai program (Hartree-Fock és B3LYP módszerek és különböző alapkészletek alkalmazásával) és az AMBER szoftver (RESP, GAFF) segítségével. Az MD szimulációkat nem polarizált erőtermodellt alkalmazva, a GROMACS csomag keretében végeztük explicit víz (TIP3P) és különböző anionok jelenlétében. 2000 ns hosszú szimulációs futást rögzítettünk 2 fs integrációs időlépéssel, és minden 500. koordinátakészletet rögzítettünk, így minden sókombinációhoz 2 millió szerkezetet adtunk az osztályozáshoz. Ezeket a konformációs struktúrákat a FAD molekula izoalloxazin és adenin gyűrűi közötti

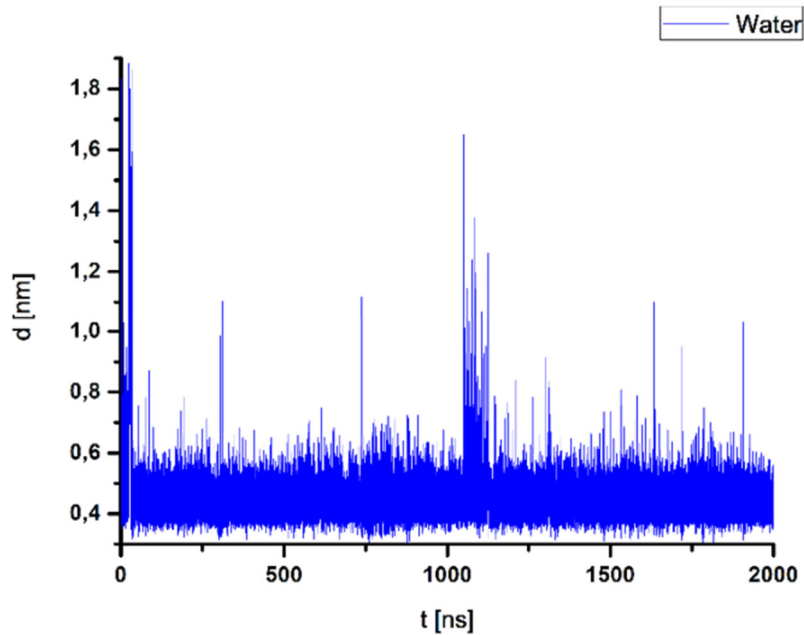
távolság és szög alapján osztályoztuk. Az eredmények azt mutatják, hogy a kozmotróp (záró) só jelenléte növelte a zárt konformációk populációját, és a semleges esethez képest csökken a két gyűrű közötti átlagos távolság. A kaotróp oldatnak ellentétes hatása van, növeli a nyíltabb konformációk arányát, és a gyűrűk közötti átlagos távolság növekedést mutat. Ezek az eredmények kiválóan összhangban vannak a kísérleti mérésekkel.



Gyűrűk távolsága zárt konformáció esetén

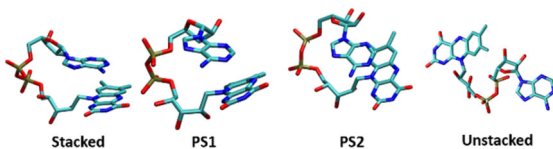


Gyűrűk távolsága nyílt konformáció esetén



Gyűrűk távolsága semleges oldószerben

-
1. **Tightly stacked (TS):** $d < 4.5 \text{ \AA}$
 2. **Stacked (S):** $d < 6 \text{ \AA}$, $0^\circ < \{\theta, \varphi\} < 40^\circ$ or $140^\circ < \{\theta, \varphi\}$
 3. **Partially Stacked 1 (PS1):** $d < 6 \text{ \AA}$, $0^\circ < \varphi < 40^\circ$ or $140^\circ < \varphi$
 4. **Partially Stacked 2 (PS2):** $d < 6 \text{ \AA}$, $0^\circ < \theta < 40^\circ$ or $140^\circ < \theta$
 5. **Partially Stacked 3 (PS3):** $d < 6 \text{ \AA}$, $40^\circ < \{\theta, \varphi\} < 140^\circ$
 6. **Partially Unstacked 0 (PU0):** $6 \text{ \AA} < d < 10 \text{ \AA}$, $0^\circ < \{\theta, \varphi\} < 40^\circ$ or $140^\circ < \{\theta, \varphi\}$
 7. **Partially Unstacked 1 (PU1):** $6 \text{ \AA} < d < 10 \text{ \AA}$, $0^\circ < \varphi < 40^\circ$ or $140^\circ < \varphi$
 8. **Partially Open 2 (PU2):** $6 \text{ \AA} < d < 10 \text{ \AA}$, $0^\circ < \theta < 40^\circ$ or $140^\circ < \theta$
 9. **Partially Unstacked 3 (PU3):** $6 \text{ \AA} < d < 10 \text{ \AA}$, $40^\circ < \{\theta, \varphi\} < 140^\circ$
 10. **Unstacked (U):** $d > 10 \text{ \AA}$



A konformációk osztályozása

3. Ábra Molekuladinamikai számítások

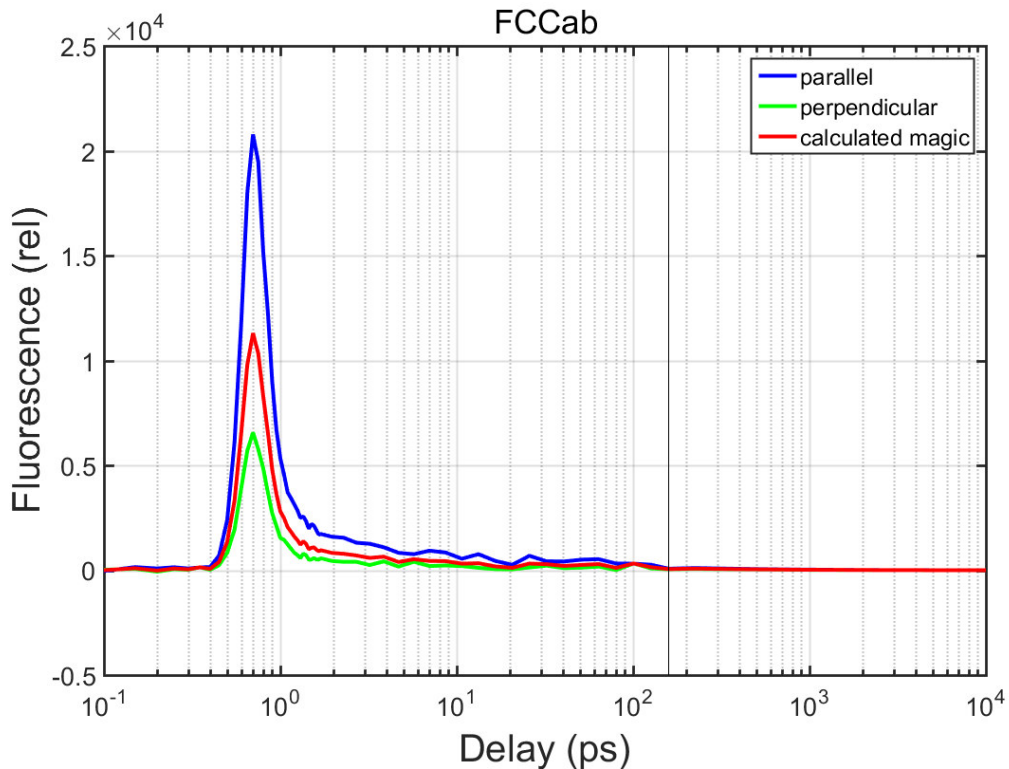
A mérési sorozatból tanulva a FAD koenzimmel az oldatban, elkészítettük az FCC mintakezelő rendszerét, és előzetes méréseket végeztünk. Az FCC esetében megfigyelt sokkal alacsonyabb jel-zaj arány miatt további vizsgálatokat folytattunk a jobb jel elérése és a gyorsabb mérések elvégzése érdekében.

Az időfelbontású fluoreszcens kinetikai mérési beállításban további diszperzív elemeket vezetünk be az impulzushossz több kulcsfontosságú helyen történő mérése után.

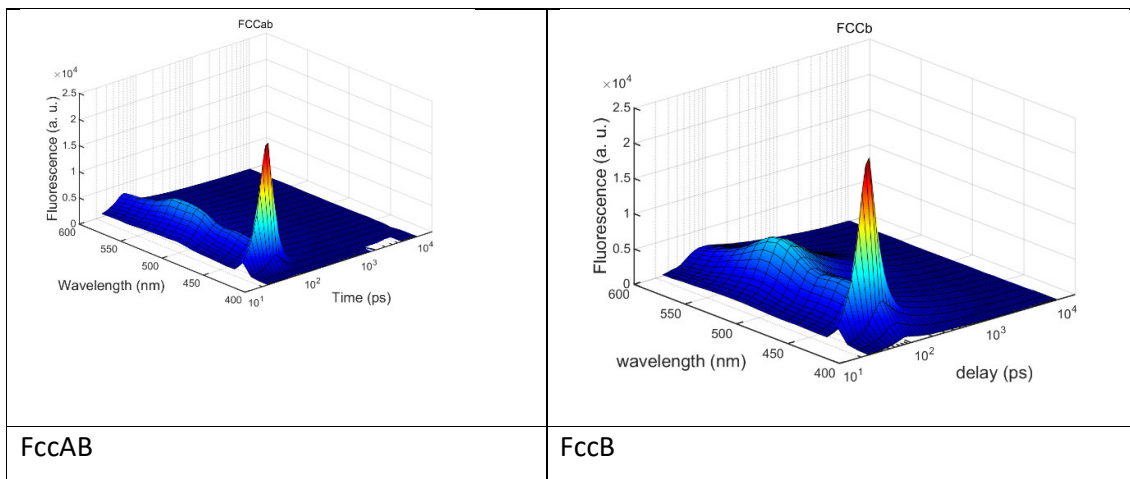
Ez lehetővé tette az impulzus időtartamának kiegyensúlyozását a berendezés pumpa- és próbakarjaiban, tovább növelve az időfelbontást.

A második harmonikus keltés folyamat modellezése jelezte, hogy ennek a folyamatnak a jelentős javítása az elrendezés jelentős módosítását igényli, így ezeket egyelőre elhalasztották. Az összefrekvenciakeltés modellezése során több számítást is végeztünk, melyek jelezték, hogy további szempontokat is figyelembe kell venni, amelyeket a modellszámítási módszerekbe be kell építeni, így ez a munka még folyamatban van.

A további diszperzív elemek megvalósításával megjelenő megnövekedett jel-zaj arány és a stabilizált pumpateljesítmény felhasználásával folytattuk a flavocytokróm-c (FCC) fluoreszcens kinetikájának mérését. A mérések során számos probléma merült fel az FCC-től kapott viszonylag alacsony upkonverziós jel miatt szükséges hosszú (több mint egynapos) adatgyűjtési időközök miatt. Az FCC oldat elvesztését úgy orvosoltuk, hogy kevésbé átteresztő csöveket alkalmaztak a keringető rendszerben, és egy jobban záró mintatartót alkalmaztunk. A hosszú és ismételt mérések során a fluoreszcencia élettartamának bomlási görbéiben lassú komponens alakult ki, amelyet vélhetően az FCC molekula disszociációja és a nem kötött flavin-adenin-dinukleotid (FAD) koenzimmolekulák megjelenése okoz nyílt konformációban. Ennek a hatásnak a megfigyelésére egy kamerát és egy megfelelő valós idejű képelemzést építettek be a mérőrendszerbe, amely figyeli a mintatartó küvetát körülvevő szórt fényt. A rendszer a szórás fokozatos változását mutatta, ami azt jelzi, hogy az oldat megváltozik, és a helyes upkonverziós méréshez rendelkezésre álló idő korlátozott. A mintaoldat buborékképződésének kiküszöbölése is elengedhetetlen volt, mivel ez jelentős jelvesztést okozott, vagy akár lehetetlenné tette a méréseket. A probléma megoldása egy olyan hűtőmechanizmus telepítése volt, amely lehetővé tette a minta hőmérsékletének több fokos csökkentését, így a buborékképző hatás jelentősen csökkent. Az oldat hűtése pozitív hatással volt az FCC időbontott upkonverziós jel mérésére alkalmas időtartamra is. Natív FCCab-val végzett és módosított a kis alegység nélküli FCCb-vel végzett méréseket, és ígéretes előzetes eredményeket kaptunk. A kapott adatok szignifikáns különbséget mutatnak a két molekula között, ami arra utal, hogy az upkonverziós mérésre rendelkezésre álló korlátozott időkeretben még jobb eredményeket lehet elérni.



4. Ábra FccAB molekula ultragyors lecsengése.



5. Ábra. Flavocitokró-m-c időkorrelált egyfoton-számlálás mérések. A kis alegység nélküli gyorsabb lecsengést mutat.

Fényforrásunk, a Spectra Physics MaiTai lézeroszcillátor 2018. júniusi meghibásodása miatt sajnos a méréseket nem tudtuk folytatni. A lézeroszcillátor helyszíni javítási kísérlete laboratóriumunk nem volt sikeres, ezért az egységet javításra a gyártóhoz szállították.

E hiba miatt a NADH molekula mérését a következő évre kellett halasztani.

A javítás ideje alatt az FCC számos genetikai módosítását végeztük el, és készen állnak a tenyésztésre és az enzimgyűjtésre.

Az eddig összegyűjtött adatok elemzésére új és pontosabb matematikai módszert fejlesztettünk ki, amelyet teszteltünk az adatelemzésben.

A lézert javítás után 2019. január végén kaptuk vissza a gyárból. A lézer visszaépítése a mérőrendszerbe, valamint számos teszt és beállítás futtatása jelentős időt és erőfeszítést igényelt. A megvalósítás végül sikeres volt, és a rendszer megbízhatónak és működésképesnek bizonyult a mérések folytatásához.

A lézer javítása és a megvalósítás 7 hónapos szünetet jelentett a kísérletezésben. A tesztmérések során felfedeztük, hogy további 3 hónapos adat hibás a lézerimpulzusok korábbi hibája miatt, ezért ezeket meg kellett ismételni.

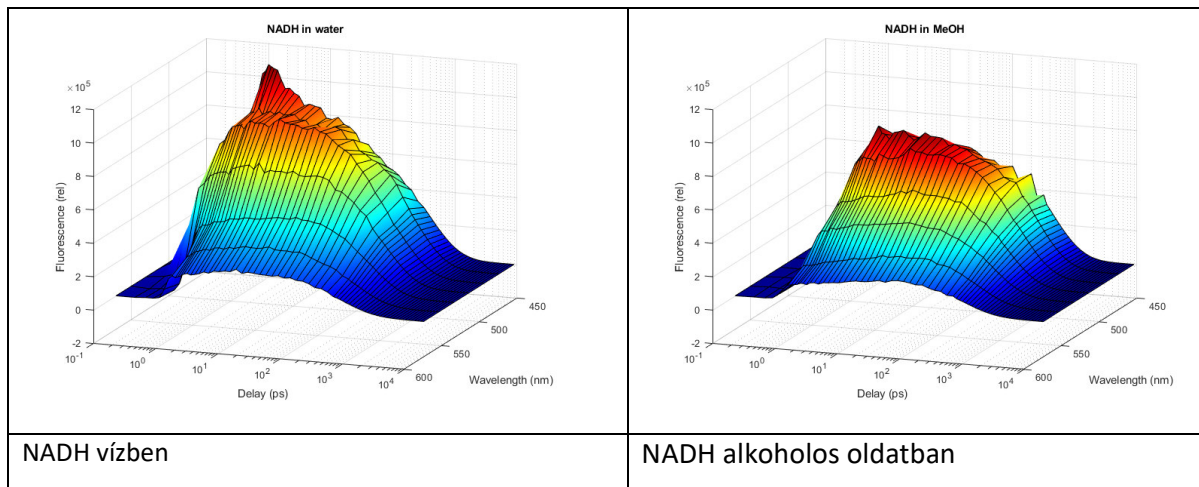
Így az FCC minták méréseit megismételték és folytattuk, de előre nem látható instabilitások miatt több mérést meg kellett ismételni. Az ismétlésekhez több FCC-minta előállítására volt szükség, amelyek a vártnál tovább tartottak.

A NADH-minták mérését megkezdtük és végrehajtottuk, de az FCC-minták instabilitásával és a minta-előkészítési problémákkal kapcsolatos előre nem látható problémák miatt késtek.

Az eddig összegyűjtött adatok elemzése folyt, az új és pontosabb matematikai módszert kifejlesztettük, ezt teszteltük és beépítettük az adatelemzésbe, amely gépi tanulási módszereket és a legkorszerűbb optimalizálást valósítja meg [Zimányi, László ; Sipos, Áron ; Sarlós, Ferenc ; Nagypál, Rita ; Groma, Géza I. *Machine-learning model selection and parameter estimation from kinetic data of complex first-order reaction systems* PLOS ONE 16 : 8 p. e0255675 (2021)]

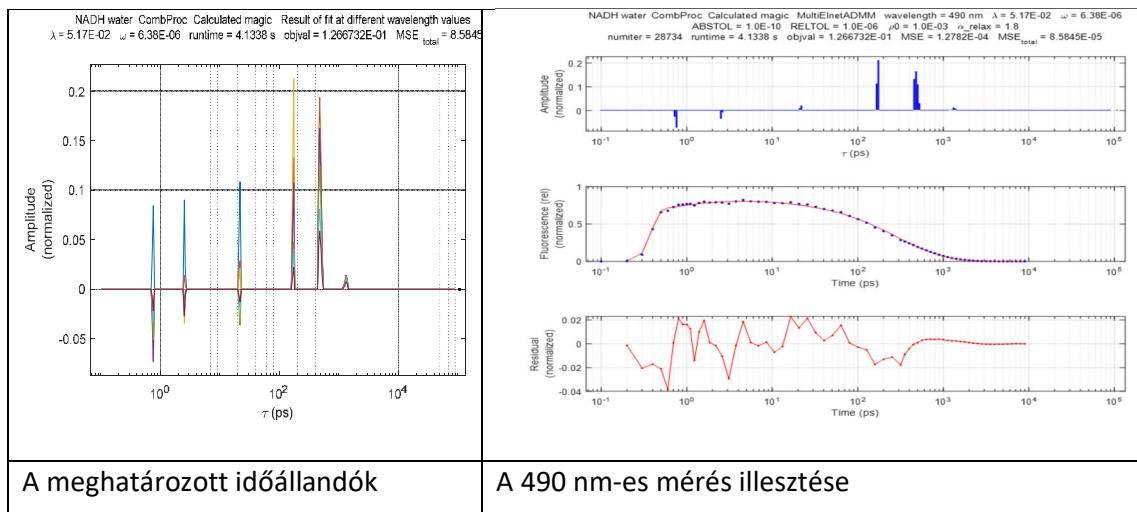
A fent felsorolt problémák és késedelmek miatt a projekt 10 hónapos meghosszabbítására volt szükség.

A hosszabbítás időtartama alatt a NADH mérések véglegesítése megtörtént, azokat az új módszerrel elemeztük.



6. Ábra NADH fluoreszcenciakinetikai mérése hullámhossz függvényében vizes és alkoholos oldatban

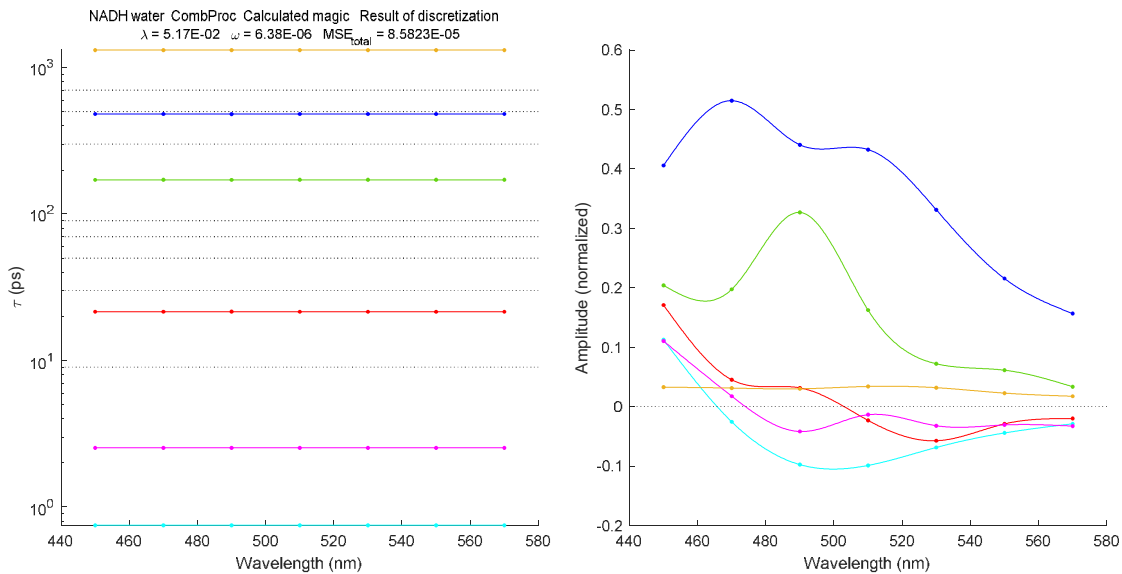
A FOKin [<https://github.com/groma-geza/FOKin>] programcsomagot alkalmazva annak algoritmikus lépéseit követve gépi tanulás módszerét alkalmazva elemeztük a méréseket. A módszer előnye, hogy nem határozzuk meg az illesztett exponenciálisok számát, ezt algoritmikusan a levető legritkábbnak választjuk meg.



7. Ábra NADH vízben Restricted leave-n_v-out Cross Validation módszerrel való elemzése

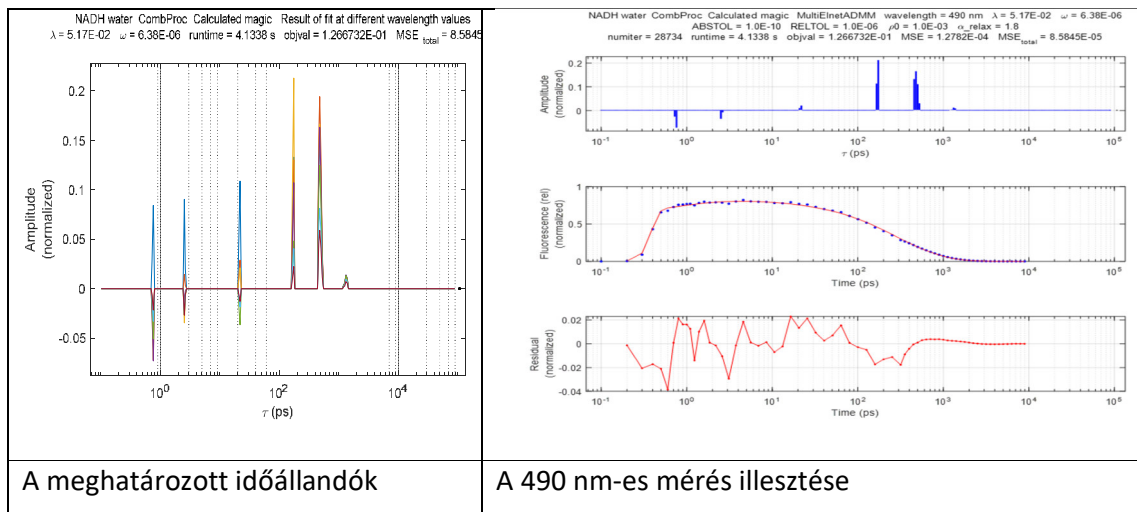
Az upkonverziós mérés időtartományában (mintegy 1 ns-ig) az elemzés valamivel nagyobb hibát jelez, de elfogadható mértéken belül marad (<2%).

Az időállandók ez esetben nem csak diszkrét értékeket mutatnak, ami arra utal, hogy nem teljesen elsőrendű (first order kinetics) kinetikákról van szó.



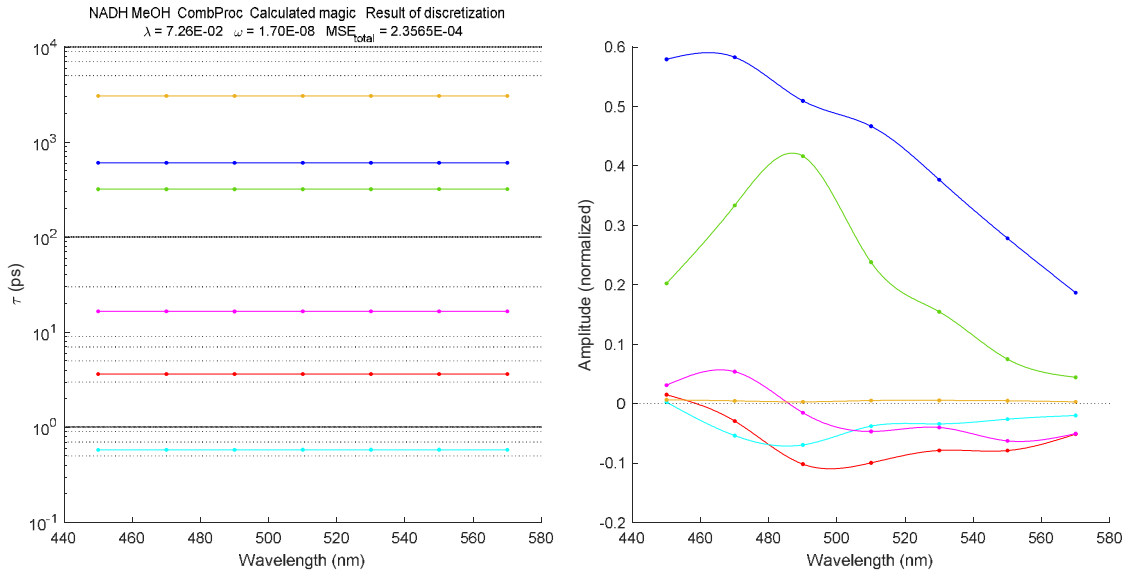
8. Ábra A különböző lecsengési időállandókhöz tartozó lecsengési spektrumok NADH vizes oldatában.

A lecsengési időállandókat hullámhossz szerint ábrázolva (9. ábra) azt találjuk, hogy a rövid, maximum néhány 10 ps-os időállandók amplitúdója előjelet vált, mely a Stokes-féle eltolódásra, vibrációs relaxációra utal. Ennek pontosabb elemzése is szükséges a pontosabb megértéshez. A nagyobb (>100 ps) időállandókhöz tartozó görbéken egy völgyet és egy hegyet látunk (zöld és kék), ami az exponenciális illesztésből adódó anomália.



9. Ábra NADH alkoholos oldatban Restricted leave- n_v -out Cross Validation módszerrel való elemzése

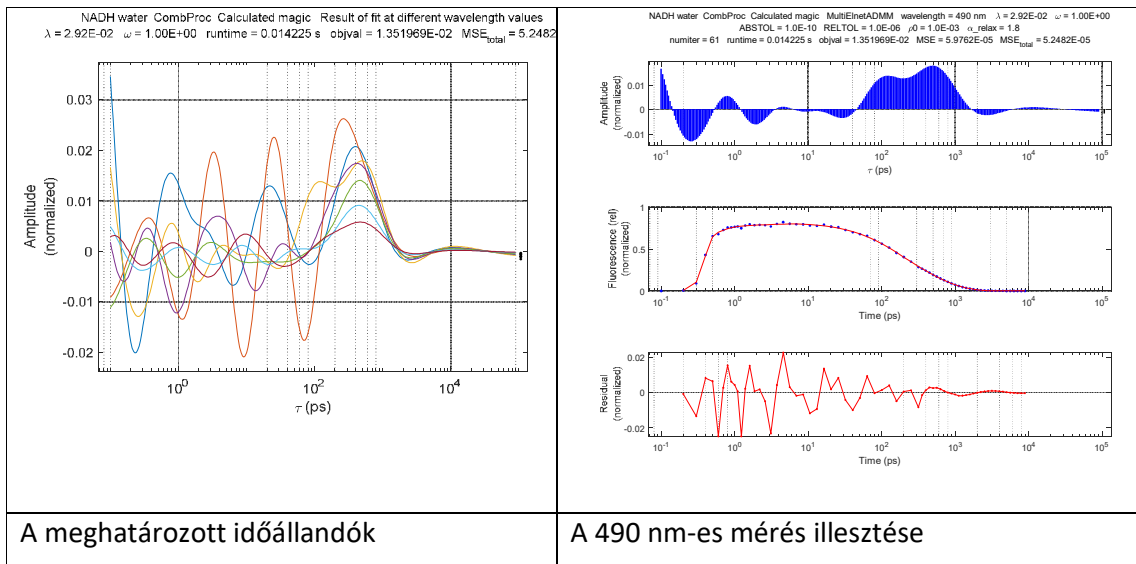
50%-os metilalkoholos oldatban a rövidebb időállandójú komponensek intenzitása csökken, a hosszabb időállandójúaké nő és a nagyobb értékek felé tolódik, ami a nyitottabb állapotok populációjának növekedésére utal.



10. Ábra A különböző lecsengési időállandókhöz tartozó lecsengési spektrumok NADH alkoholos oldatában.

50%-os metilalkoholos oldatban ismegfigyelhető a vibrációs relaxációra utaló előjelváltás, valamint az anomália is.

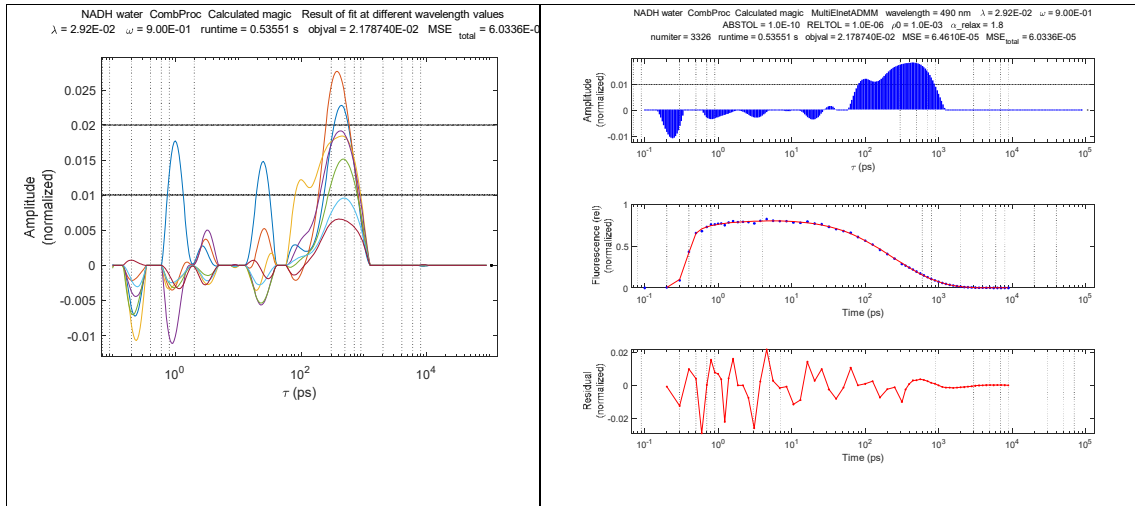
A számítások során 10 szeres keresztvalidációt alkalmazva gyökeresen más képet kapunk az időállandókról:



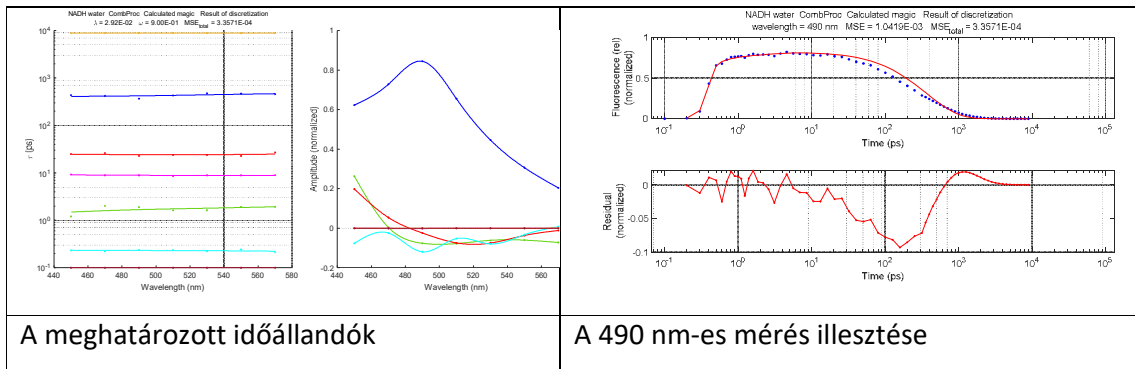
11. Ábra NADH vízben 10-fold CV módszerrel való elemzése

Ebben az esetben $\omega=1$ érték túl nagy a sávok nem különülnek el, ez a megoldás nem lehet helyes, az időállandók negatív-pozitív értékek közt oszcillálnak. A gyors komponensek is szélesek ebben az esetben, ami szintén kétséges.

Ha $\omega=0.9$ értéket választunk, akkor az időállandók a következőképpen alakulnak:

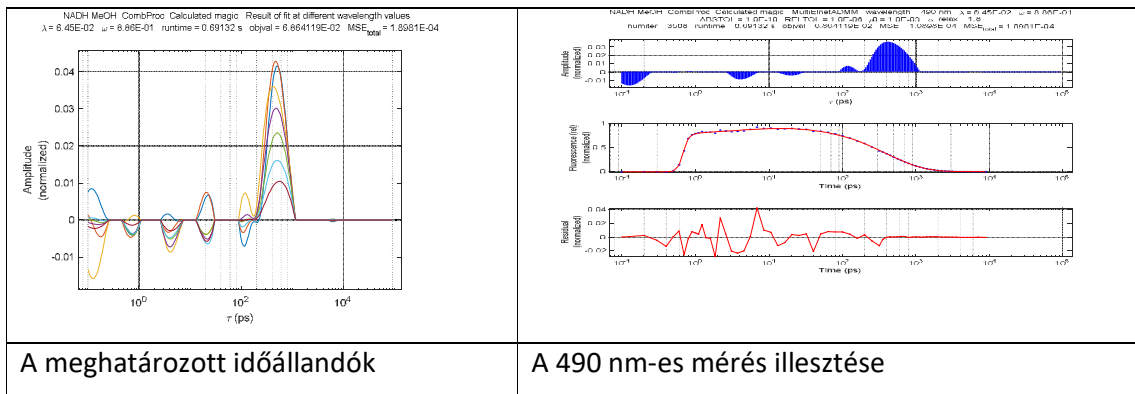


12. Ábra NADH vízben 10-fold CV módszerrel való elemzése $\omega=0.9$ értéket választva
Ekkor az egyes komponensek elkülönülnek, az anomália is csökken, de a hiba jelentősen
megnö:

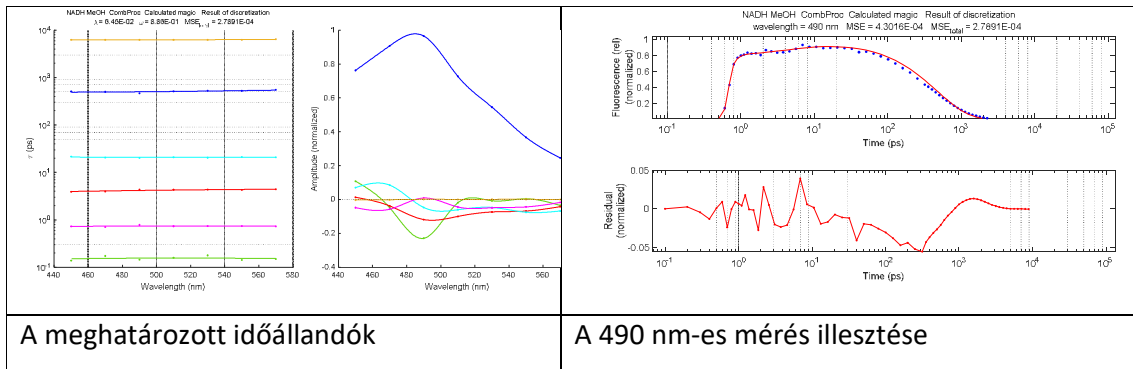


13. Ábra különböző lecsengési időállandókhöz tartozó lecsengési spektrumok NADH
vízben 10-fold CV módszerrel való elemzése $\omega=0.9$ értéket választva.

Ugyanez a jelenség figyelhető meg alkoholos oldat esetében is:



14. Ábra NADH alkoholos oldatban 10-fold CV módszerrel való elemzése $\omega=0.9$ értéket
választva



15. Ábra különböző lecsengési időállandókhöz tartozó lecsengési spektrumok NADH alkoholos oldatban 10-fold CV módszerrel való elemzése $\omega=0.9$ értéket választva.

Következtetésképpen elmondható, hogy a NADH fluoreszcencia lecsengése ezen elemzés alapján nem csak kizárólag elsőrendű folyamatokból áll, ezért további fejlesztés szükséges, hogy megfelelő paraméterkészlettel bizonyos kiszélesedésű időállandó csoportokat tudjunk illeszteni a mért görbékre, ahol az egyes kiszélesedések is szabadon futó paraméterekként választhatók meg.

Hasonlóan a Fokin programot FAD molekulán végzett mérésekre alkalmazva azt találtuk, hogy összetettebb folyamattal állunk szemben, mint a korábbi elemzések mutatták, így annak a pontos kidolgozásán is dolgozunk.