

a kölcsönhatásért, így (egy erősen leegyszerűsített modellben gondolkodva), ha ezek az aminosavak szerepelnek egy fehérje szekvenciájában, akkor az a fehérje képes lesz az adott kölcsönhatásra. Bár a lineáris motívumok a kölcsönhatások leírására nagyon jól működnek, a predikciós erejük (vagyis az, hogy mennyire igaz, hogy egy pár aminosav jelenléte a szekvenciában elég a kölcsönhatás kialakításához) nagyon gyenge.

A kutatás során az ANCHOR és a hozzá kapcsolódó webszerver kifejlesztése mellett meghatároztuk az ANCHOR alapját képező szerkezeti/biofizikai leírás és a szekvenciaalapú lineáris motívumok elmélete közötti összefüggést is (Mészáros, 2012). Bár a két leírás alapja nagyon más megközelítést követ (szerkezeti *vs.* szekvenciaalapú), a leírt kölcsönhatások nagyrészt azonosak, ami jól mutatja, hogy egy biológiai jelenség két komplementer oldalát fogják meg. Munkánk során az elméleti kapcsolaton túl egy gyakorlati útmutatót is adtunk arra, hogy hogyan lehet a két kép előnyeit egyesíteni nagyskálás vizsgálatokban. Ezáltal olyan integrált módszert tudtunk kifejleszteni, mely képes teljesebb, szerkezeti és

szekvenciális információt is adni a vizsgált fehérjéről. Az így elméletileg leírható és azonosítható kölcsönhatások ismerete kiemelten fontos nemcsak az alap kutatásban, de ipari/gyógyterfejlesztési szempontokból is, mivel ezek állnak számos kritikusan fontos biológiai folyamat mögött (például a p27-CDK2/ciklinA kölcsönhatás a sejtciklus-szabályozásnál vagy a p53-MDM2 a tumorszuppresszióknál). Emellett ezen kölcsönhatások modulációs betegségek mögött áll, hanem számos patogén is így képes a humán gazdasejtekkel kölcsönhatásba lépni, illetve kikerülni az immunválaszt. Ezen betegségek megértéséhez és a hozzájuk kapcsolódó célzott farmakológiai kutatások sikeréhez azonban elengedhetetlen, hogy molekuláris szinten képesek legyünk megérteni és felismerni az ezek mélyén lévő kölcsönhatásokat. Ehhez a munkához adhatnak hatékony eszközöket a kísérletes biokémiai munkákkal szinergizmusban fejlesztett bioinformatikai módszerek.

Kulcsszavak: *bioinformatika, rendezetlen fehérjék, predikció, lineáris motívumok, folding*

IRODALOM

Mészáros Bálint – Simon I. – Dosztányi Zs. (2009): Prediction of Protein Binding Regions in Disordered Proteins. *PLOS Computational Biology*, 5(5):e1000376. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1000376 • <http://journals.plos.org/ploscompbiol/article?id=10.1371/journal.pcbi.1000376>

Mészáros Bálint – Dosztányi Zs. – Simon I. (2012): Disordered Binding Regions and Linear Motifs—Bridging the Gap between Two Models of Molecular Recognition. *PLOS One*, 7(10):e46829. DOI: 10.1371/journal.pone.0046829 • <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0046829>

A VÍZ SZEREPE FEHÉRJE–FEHÉRJE ÉS MEMBRÁN–FEHÉRJE KÖLCSÖNHATÁSOKBAN

Szalontai Balázs Dér András

az MTA doktora, tudományos tanácsadó,
MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biofizikai Intézet
szalontai.balazs@brc.mta.hu

az MTA doktora, tudományos tanácsadó,
MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biofizikai Intézet

A víz, bár egyike a legegyszerűbb kémiai összetételű anyagoknak, ugyancsak egyike a legkomplikáltabb fiziko-kémiai viselkedést felmutatóknak is. Különleges tulajdonságai teszik lehetővé az életnek azt a formáját, amit ismerünk, olyannyira, hogy a biológiai molekulák (fehérjék, lipidek, nukleinsavak stb.) szerkezete és funkciója csak a körülöttük levő vízzel együtt értelmezhető. Erről az „együttes létről” azonban sokszor elfeledkeznek még a biológia területén kutatók is, és úgy értelmezik a jelenségeket, mintha azok csak az adott biológiai molekula viselkedésének következményei lennének, nem pedig egy biomolekula-víz-(+más biomolekulák) komplexnek.

A víz szerkezetének például a fehérjék viselkedésére való direkt hatásáról már 1888 óta vannak ismereteink, amikor is Franz Hofmeister úgy tudott sorba rendezni ionokat (elsősorban az anionok – $F^- \approx SO_4^{2-} > HPO_4^{2-} > CH_3COO^- > Cl^- > NO_3^- > Br^- > ClO_3^- > I^- > ClO_4^- > SCN^-$ – bizonyultak érdekesnek), hogy azok a sorban balról jobbra haladva a kicsapatástól (kozmotróp hatás) a fokozott oldódásig (kaotróp hatás) tudták befolyásolni a fehérjék viselkedését. Kiderült, hogy a látható hatáshoz szükséges magas koncentrá-

ciójuk (>100 mM) nem általában változtatja meg a víz szerkezetét, hanem az a döntő, hogyan befolyásolják a fehérjékkel érintkező/ azokhoz igen közel levő vízmolekulák rendezettségét, illetve kölcsönhatási lehetőségeit.

Mivel ilyen koncentrációjú sók az élőlényekben nincsenek, de maga az „élő anyag” olyan sűrű, hogy általában csak néhány száz tízmolekulányi vízréteg választja el a sejt belsejében a biomolekulákat, kíváncsiak voltunk, vajon maguk a biomolekulák képesek-e a velük érintkező víz szerkezetének befolyásolására, és ezen keresztül saját szerkezetük, illetve a pár molekulányi vízréteg másik felén levő más biomolekulák körülményeinek megváltoztatására.

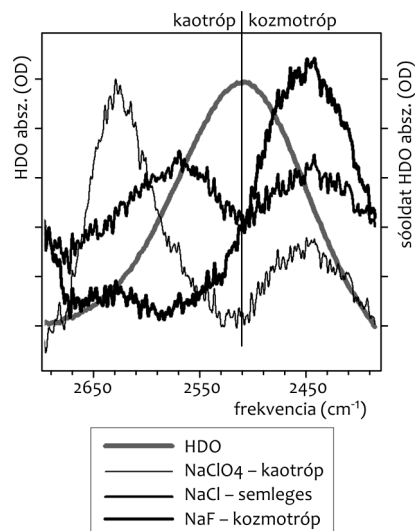
A méréseket infravörös spektroszkópiával végeztük, annak olyan módjával, amikor egy nagy törésmutatójú kristály (ATR-kristály) belsejében haladó fény a kristály felszínénél teljes visszaverődést szenved, és abszorbeálódik a felszínen kívül levő molekulákban. Így fel tudjuk venni azok infravörös spektrumát (attenuated total reflection [ATR] spectroscopy). A vizsgálatokhoz a 95% H_2O + 5% D_2O keverékből előálló kb. 10%-nyi HDO molekula 2500 cm^{-1} közelében levő O-D rez-

gését használtuk, mert az nem fed át semmilyen más víz-, vagy biomolekula-eredetű rezgéssel.

Először azt néztük meg, hogy meg tudjuk-e látni a várhatóan legnagyobb effektust, a Hofmeister-sók által okozott szerkezetváltozást a víz-spektrumokban. Mint az 1. ábrán látható, a tiszta HDO O-D rezgéséhez képest, a (0,9 M sóoldat [szintén HDO-ban] mínusz tiszta HDO) spektrumokban oldalsávok jelennek meg; a kaotróp só esetében magasabb, a kozmotróp esetében pedig alacsonyabb hullámszámoknál (cm^{-1}). A Hofmeister-hatás szempontjából semleges NaCl kis intenzitású, szimmetrikus oldalsávokat adott a tiszta HDO O-D sávjának két oldalán.

A víz szerkezete szempontjából a kozmotróp hatás azt jelenti, hogy a vízmolekulák között a tiszta vízhez képest nagyobb számban alakulnak ki (erős) hidrogénhidak, amikben mind az O, mind a D atom részt vesz. Az O/D atomra irányuló külső vonzás következtében az O-D kötés távolsága valamelyest nő, ezért a köztük levő vonzóerő csökken, aminek következtében kisebb energia kell az O-D kötés menti rezgés gerjesztéséhez. Ez látszik meg az alacsonyabb hullámszámokban (NaF spektrum az 1. ábrán). Kaotróp hatás esetén a vízmolekulák közötti hidrogénhidak száma csökken, ezért a fenti logika szerint esetünkben az O-D kötés átlagos távolsága csökken, a megrezgetéséhez szükséges energia pedig nő (lásd a magasabb hullámszámot a NaClO_4 esetében az 1. ábrán). Az ilyen hatások révén átalakult szerkezetű vizet a továbbiakban *kozmotróp*, illetve *kaotróp víz* néven említjük.

Ezután azt vizsgáltuk meg, vajon a fehérjék a felszínükön levő víz infravörös spektrumában képesek-e hasonló oldalsávokat létrehozni, amelyek ott szintén a szabad – víz spektrumát jelenti. A második komponens (u_2) azonban mind a kaotróp, mind a kozmotróp oldalon mutat



1. ábra • H_2O és D_2O keverékéből (95:5) előállított kb. 10%-nyi HOD-molekula O-D nyújtási rezgésének Fourier-transzformációs infravörös spektruma, illetve az ilyen vízkeverékben feloldott sók (0,9 M) mínusz tiszta HDO-spektrumok.

tényleg csak a molekulák felszínén levő vízmolekulákat lássuk, úgy értük el, hogy fokozatosan beszárítottuk az ATR-kristály felszínére kis cseppekben (kb. 10 csepp, összesen 20 μl) felvitt mintákat. Az oldalsávok megjelenését a szárítás során sorozatban felvett infravörös spektrumokból egy, tisztán algebrai módszerrel (ami tehát nem kívánt meg semmilyen előzetes feltevést), határoztuk meg (szinguláris értékre való lebontás [SVD]).

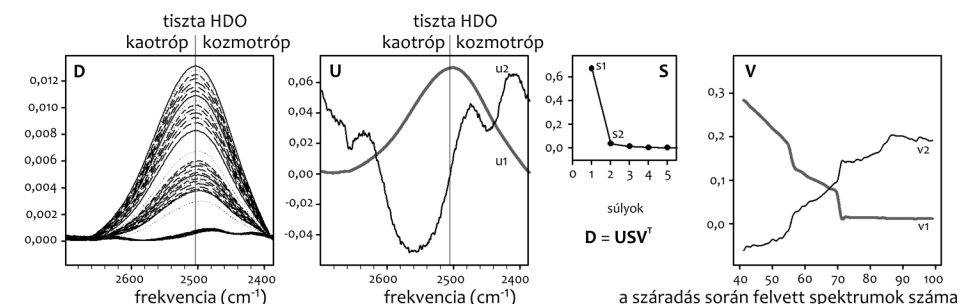
Egyik példaként a β -kazeint vizsgáltuk. A 2. ábrán látható, hogy az U első komponense (u_1) jól egyezik a tiszta HDO O-D rezgés sávjának alakjával, amint annak lennie is kell, hiszen ez a komponens az „átlagos” – esetünkben a szabad – víz spektrumát jelenti. A második komponens (u_2) azonban mind a kaotróp, mind a kozmotróp oldalon mutat

sávokat, jó egyezésben a β -kazein amfifil természetével. A β -kazein tartalmaz egy nagy hidrofób régiót (kaotróp sáv), amely révén más kazeinmolekulákkal aggregálódik a Ca^{++} -szállító kazeinmicellák kialakulásának első lépésében, illetve egy erősen poláros, foszforil oldalláncokat tartalmazó régiót, amelyhez a Ca-foszfát tud kötődni (kozmotróp sáv).

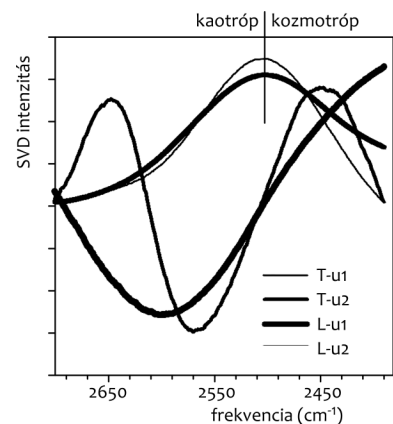
Más fehérjékre is megmutatható, hogy a fehérje felszíne olyan módon befolyásolja az őt burkoló víz rendezettségét, ami megfelel a fehérje biológiai funkciójának. Például, annak ellenére, hogy térszerkezetük hasonló, a mioglobinnal elsősorban „kaotróp vizet”, a hemoglobinnal „kozmotróp vizet” alakít ki maga körül. Ez megfelel annak, hogy a mioglobinnal elsősorban más fehérjékkel kell kölcsönhatnia, és ehhez segítség, hogy a felszínén levő, „önmagát szerető” kaotróp víz ki tud menekülni a kölcsönható fehérjék közül. Ezzel szemben a hemoglobinnal elsősorban az oxigént/szén-dioxidot kell nagy, akár makroszkopikus távolságban levő rendeltetési helyére juttatnia, ebben kerülendőek a más fehérjékkel való kölcsönhatások. Ehhez a neutralitáshoz a

hemoglobint körülvevő „fehérjeszerető” rendezett kozmotróp víz, a fehérje–fehérje kontaktusok valamelyes „leárnékolásával”, segítséget tud nyújtani. (Ezeket az adatokat terjedelmi okok miatt nem mutatjuk.)

Az élőlényekben a membránok rendkívül fontos szerepet játszanak mind az egyes területek elválasztásában, mind a területek közötti anyagtranszport, illetve jelátadás lehetővé tételében/gátlásában. Mivel az elválasztott területek mindegyike vizes fázisú, megnéztük, meg tudjuk-e mutatni, megváltozik-e a víz szerkezete egy lipid modell membrán (dioleoil-foszfátidilkolin [DOPC]:koleszterol [Kol], 10:1), illetve egy biológiai membrán (tilakoid) felszínén (3. ábra). Jól látszik, hogy a modellmembrán felszínén a víz szerkezete kozmotróp irányba tolódik el (lásd a negatív sávot a kaotróp oldalon és a folyamatos növekedést a kozmotróp oldalon. Ezzel szemben a valódi biológiai membránban jelen van mind a kozmotróp víz (2450–60 cm^{-1} körül), mind a kaotróp víz (2640–50 cm^{-1} körül). A kaotróp víz minden valószínűség szerint a jelenlevő membránfehérjék következménye, amelyek



2. ábra • A víz szerkezetének megváltozása β -kazein felületén szinguláris értékre való lebontással (SVD) kiértékelve. Az SVD-eljárás során az adatokat tartalmazó \mathbf{D} mátrixot három mátrix szorzatára (\mathbf{USV}^T) bontjuk fel. Az \mathbf{U} mátrix tartalmazza a független komponenseket, amelyekkel a súlyok (\mathbf{S}) figyelembevételével a \mathbf{V}^T mátrixszal való összeszorítás révén állíthatók vissza a mért spektrumok (\mathbf{D}). A módszer hatásosságát az adja, hogy a súlyok általában nagyon gyorsan csökkennek, így elegendő csak néhány (esetünkben kettő) komponens figyelembe venni.



3. ábra • Diioleil-foszfatidilkolin (DOPC) és koleszterol (Kol) 10:1 arányú keverékéből készített liposzómák, illetve egy Cianobaktérium tilakoid membrán szuszpenzió beszárítása során a környezetükben levő víz szerkezetváltozásának nyomon követése SVD-analízissel (csak a komponens spektrumokat mutatjuk, részletek az előző ábrán). A HDO-molekulák O-D rezgésének első (u1), második (u2) komponens spektruma tilakoid (T), illetve DOPC/Kol-membránok (L) környezetében.

sok (más fehérjékkel való kölcsönhatásra, receptor feladatokra stb. szolgáló), a vizes fázisba benyomuló oldallánccal rendelkeznek.

Összefoglalva: sikerült megmutatnunk, hogy a biológiai molekulák megváltoztatják a velük kölcsönhatásban levő vízmolekulák egymás közti kapcsolódásának rendjét. Képesek felszínükön kaotróp, illetve kozmotróp vízből álló „párna” kialakítására. A kaotróp vízben a vízmolekulák közti kölcsönhatások általában erősebbek, mint a vízmolekulák és

az adott biológiai molekula közti kölcsönhatások; a kozmotróp vízben a vízmolekulák és a biológiai molekulák közti kölcsönhatás – erős hidrogénhidak révén – erősebb, mint a vízmolekulák közti átlagos kölcsönhatás. Egy ilyen vízpárnának nagy jelentősége lehet például a stresszfehérjék esetében, ahol egy-egy fehérje sok különféle folyamatban tud hatásként részt venni; olyanokban, amelyekben nem lehet feltételezni, hogy a fehérjékre egyébként jellemző, atomi szintű specificitáson alapuljon a hatékonyság. Ha például egy membrán stabilizálásáról lenne szó, egy, a stresszfehérjét körülvevő, rendezett vizet tartalmazó kozmotróp vízpárna a stresszfehérje és a membrán közé „szorulva” a membránnal kialakított hidrogénhidak révén megvédheti a membránt a túlzott fellazulástól. A rosszul feltekeredett fehérjék térszerkezetét helyreállítani képes „dajkafehérjék” működése is alapulhat olyan mechanizmuson, hogy belsejükben erősen kaotróp vizet kialakítva az áttekerendő fehérje döntően csak saját térszerkezeti információira, energetikai viszonyaira kénytelen támaszkodni, amíg meg nem találja energia-minimumát. Ebben a dajkafehérjével való kölcsönhatások a köztük lévő kaotróp vízpárna miatt nem fogják zavarni.

Egy ilyen általános „vízalapú”, elsődleges kölcsönhatási rendező elv egyelőre csak egy hipotézis, melyet az eddigi eredmények nem bizonyítanak be, de lehetséges voltát, és így a további ilyen irányú kutatásokat bátorítják.

Kulcsszavak: HDO, Hofmeister-effekt, fehérjeszerkezet, fehérjestabilitás, vízszerkezet

2. Modern biofizikai módszerek

BEVEZETŐ

Smeller László

egyetemi tanár
SOTE Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet
smeller.laszlo@med.semmelweis-univ.hu

Nagy Péter

egyetemi tanár
Debreceni Egyetem Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet
nagy@med.unideb.hu

A jelenleg folytatott sejt- és molekuláris biológiai kutatások fontos hiányossága, hogy a vizsgált paramétereket legtöbbször csak kvalitatív vagy szemikvantitatív módon jellemzik. A szekcióban olyan eljárások kerültek bemutatásra, melyekkel a biológia számára fontos paramétereket (például: sejtadhézió erőssége, struktúrák 3D kiterjedése) lehet pontosan elemezni.

A sejtektől a makroszkopikus élőlényekig terjed azoknak az élő rendszereknek a sora, amelyek mozgása analizálható Osváth Szabolcs új módszerével. A hagyományos képalkotó módszereknél a megfigyelt objektum mozgása általában a képminőség rovására ment, az új eljárás viszont éppen az élő szervezetben mindig előforduló mozgásokra koncentrált. Erről részletesebben is olvashatnak Osváth Szabolcs és munkatársai cikkében.

A fénymikroszkópok z irányú (az optikai tengellyel párhuzamos) felbontóképessége sokkal rosszabb, mint az x-y irányú felbontás, ezért a objektumok az optikai tengellyel párhuzamosan megnyúlnak a három dimenziós képeken. Ezen hiba kiküszöbölésére mutatott be egy ötletes eljárást Búzás András, aki a sejteket egy fényrel vezérelhető mikro-manipulátorra helyezte. A sejteket ezután a

mikroszkópban forgatva javult a kapott mikroszkópi kép minősége. A részletekről Búzás András és munkatársai írása számol be.

A sejtek és egyes makromolekulák kötődése fontos szerepet játszik az immunválasz elindításában. Ennek vizsgálatáról beszélt Ungai-Salánki Rita (Pannon Egyetem). A makromolekulákat egy mikroszkóp tárgyleny felületére vitte fel, majd a hozzájuk tapadt sejtek adhéziójának erősségét úgy vizsgálta, hogy ezeket egy mikropipettával próbálta lehúzni. A leszíváskor alkalmazott vákuum mértéke jellemző a sejt adhéziójának erősségére. Ezzel a módszerrel szelektíven lehet sejteket válogatni a kötődés erőssége szerint, valamint a módszer további előnye, hogy viszonylag gyors és automatizálható.

A Patkó Dániel (MTA Energetikatudományi Kutatóközpont Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Intézet) által bemutatott nagy érzékenységű optikai bioszenzor mind fehérjék, mind sejtek jelölésmentes detektálására alkalmas. Az optikai hullámvezető elvén alapuló szenzor már néhány pikogramm tömegű anyagot képes érzékelni. A módszer kiválóan alkalmas a felületre kitapadó sejtek különböző bevonatokkal való kölcsönhatásának tanulmányozására.