

Szerkezet és mozgékonyág az ideák világában, avagy dinamikus fehérje térszerkezet-vizsgálat

PERCZEL András*

Szerkezeti Kémia és Biológia Laboratórium, valamint MTA Fehérje Modellező Kutatócsoport, ELTE Kémiai Intézet, Budapest 1117, Pázmány Péter sétány 1/a

„Non est volentis, neque currentis, sed miserentis Deus”
(Nem azé, aki akarja, sem nem azé, aki fut, hanem a könyörülő Istené.)

Prológus helyett

Ez az írás az MTA-n – 2010 októberében levelező taggá választásom kapcsán – tartott székfoglaló előadásom összefoglalója. A cikk a Magyar Kémiai Folyóirat főszerkesztője, dr. Sohár Pál akadémikus, évek óta tartó kedves unszolásának, atyai noszogatójának köszönhetően készült el. A dolgozat nem egy szokásos kutatási eredmény tudományos összefoglalója, nem az elért szakmai eredmények száraz bemutatása, inkább a szerző töprengéseinek és gondolatainak kelevéz gyűjteménye szerves molekulákról, azok térszerkezetéről és belső mozgásáról, valamint a molekulák megismerhetőségéről, megtapasztalásáról, láthatóságáról.

Utazás a mélybe

A kíváncsi ember rendszerint szereti az egzotikus utazásokat. Sokak számára ez egy mesés távoli vidék bebarangolását, esetleg egy afrikai kirándulást jelentene. Felkerekedik és hajóra, repülőre száll, talán csak kerékpárra ül, vagy felölti túrabakancsát és nekivág az ismeretlennek, bejárja Ungot, s Baranyát. Vannak aztán olyan „utazók” is, akik egy tapodtat sem mozdulnak ki otthonukból, pedig bejárhatnák az elgondolt tájakat, megismerhetnék személyesen is az áhított helyet. Nem teszik, nem hajóznak új vizekre, nem kalandoznak új vidékekre, ám egy izgalmas könyv és a képzeletük segítségével járják az ismeretlent. Fantáziájuk és képzelőerejük segítségével utaznak a pampák végtelen síkságain, járják a hegyeket, eveznek ezüsttűkrű tavakon.

Olvasó vagy író, mindkettő lehet ilyen, mint például Karl May, aki világhírű „úti beszámolóit” úgy vetette papírra, hogy közben otthonából ki sem lépett. Vannak, akik megtehették volna, de nem utaztak, csak képzeletben. Megint mások viszont szükségszerűen lettek helyben maradásra kárhóztatva, mivel utazásuk célja elérhetetlen. Verne Gyula például a Föld közepe felé vette volna útját, ha tehette volna, de nem utazhatott, s álmai álmok maradnak talán örökre. A híres német és francia írók mellett, kiket létező tájak ihlettek meg, vannak olyanok, mint például Karinthy Frigyes, aki a koponyája körül utazott, s írta le kalandjait. Utazni tehát lehet a valóságban, vagy csak a képzelet szárnyán, a jelenben vagy akár más időben.

Ám az út, amire most Önt invitálom, kedves Olvasó, más természetű. Minden betűje a nagybetűs valóságról szól, mégis komoly szellemi erőfeszítést igényel a megértése. Nem kell fizikailag megmozdulnia, mégis ismeretlen világba vezetem

a gondolat szárnyán: tudásunk és ismereteink alapján a mikrokozmoszba utazunk. A spektroszkópiai mérések, adatok és tények, a ridegen fegyelmezett tudományos valóság talaján állva, ám az Ön olvasói fantáziára is alapozva, szeretnék betekintést nyújtani a mikrokozmoszt felépítő molekulák világába. A képzelőerőnek is teret hagyva, személyessé téve utazásunkat, kalandozunk el abba a valóvilágba, amit a molekulák uralnak, ahol ők töltik ki a teret. Utazunk hát ezúttal közösen, de ne a koponyánk körül, hanem a képzeletünk segítségével a mikrokozmosz felé.

A szerkezetkutató világa: a mikrokozmosz kincsei

Életünk szokásos és kézenfekvő távolságegysége a méter. A legtöbb ember testmagassága 1,5 és 2 m lehet, lakásunk és munkahelyünk szobái is pár méter szélesek, hosszúak és magasak, s aligha futunk száz méternél többet esetenként a busz után. Talán tudjuk, hogy a csillagászatban használt távolságegység – az átlagos Nap-Föld távolság, – az 1 méteres referenciarendszernél 150 milliárdszor nagyobb. Persze erre legtöbbször aligha gondolunk. Egy nyári éjjelen ugyan elmerenghetünk a csillagok messzeségén, az ottani távolságok óriás mivoltán, ám inkább a csillagok rajzolatában szoktunk gyönyörködni, s a szinte felfoghatatlan távolságokkal nem sokat törődünk. Pedig döbbenetes, hogy az égen látott csillagok között lehet sok olyan, amely mára már kihunyott, ám régi „fénye” még bőszen vágat felénk.

A csillagászatban használt egységnyi távolság mintegy 11 nagyságrenddel tér el tehát hétköznapi egységünk hosszától, e nagyságrendi ugrást értjük ugyan, de csak nehezen érezzük. Ez a tizenegy nagyságrend felfelé csak alig több, mint az a 10 nagyságrend lefelé, amit meg kell tennünk ahhoz, hogy kézenfekvő világunkból – ezúttal lefelé – az atomok világába érkezzünk. Oda, ahol távolságegységként az Angströmöt érdemes használni, ami körülbelül egy NH kötés hossza. Míg a különböző távcsövekkel a távoli égitesteket, addig nagyítókkal és fénymikroszkópokkal a parányi tárgyakat, az egymástól is csak mikrométer távolságra lévő baktériumokat szoktuk vizsgálni. Ám a molekulák méretei a pici sejtek átlagos méreteinél is még több nagyságrenddel kisebbek! Ebben a tartományában a svéd fizikusról (Anders Jonas Ångström) elnevezett 1 Angström adódott jól használható távolságegységnek. Az atomok és molekulák világa tehát körülbelül 10 nagyságrenddel van, a szemünk számára szokványos hétköznapi világunkba „beágyazva”. Utazásunk

* A dolgozat Perczel András az MTA levelező tagja 2010. november 16.-án tartott akadémiai székfoglaló előadásának szerkesztett változata.

első lépéseként fénymikroszkóp segítségével a 100 μm -es sejteket, vagy az 1 μm -es baktériumokat figyeljük meg. S csak mikor már megszoktuk ezt a dimenziót akkor haladunk tovább „lefelé”.

A látható fény 500 nm-es hullámhossza korlátként lép fel e mérettartománynál kisebb tárgyak megfigyelése során. A még kisebb, mindössze 100 nm-es influenzavírus, vagy az ennél is kisebb hepatitis vírus részleteit már csak elektronmikroszkóp segítségével tanulmányozhatjuk. A transzmissziós elektronmikroszkóp (TEM), amely a tárgyakat elektronsugárral „világítja” át, vagy a pásztázó elektronmikroszkóp (SEM), amely a visszavert elektronok segítségével állít elő képet a tárgyak felületéről, segítik tájékozódásunkat. Hogy a molekulákról pontos és „éles” atomi felbontású képet alkothassunk még a krio-elektronmikroszkóp sem igazán alkalmas eszköz, noha ezzel akár az 1-10 nm-es felbontás is elérhető esetenként. De akkor milyen eszközökkel ismerhetjük meg igazán a molekulákat s azok részleteit?

A molekulákat a természettudós sem „látja” úgy, mint ahogy a hétköznapi tárgyakat látjuk. A mért adatokat összegyűjtve, ezek alapján mégis el tudjuk azok térszerkezetét képzelni, le tudjuk írni úgy, mintha tényleg látnánk azokat. A képkötés hiánya még nem jelenti az észlelés hiányát! Röntgen- és elektrondiffrakciós, valamint mágneses magrezonancia spektroszkópiái (NMR) mérési adatokra alapozott információk és logikus megfontolások alapján építünk „képet”, pótoljuk azok tényleges hiányát.

De milyen is a helyes kép egy molekuláról? Az atommagok és elektronok rendszerénél lejjebb a kémikus nem merészkedik; már ez a mélység is kellően komplex és szédítő számára. Bár a kvantummechanika nem értelmezi explicit módon a molekulaszervezet fogalmát, a kémikus mégis nagyon jelentőséget tulajdonít a molekulák reaktivitása és átalakíthatósága mellett, azok térszerkezete és belső mozgása iránt is. A szerkezetkutató ezeket az információkat gyűrja össze, s alkot segítségével „képet” a molekulákról. Sok szerves molekulához hasonlóan a fehérjéket felépítő aminosavak, bár kémiailag egységesek és jól definiáltak, térbeli megjelenésük – azaz térszerkezetük – többféle lehet. *Janus* a kétarcú római istenség csak két eltérő profillal rendelkezett, a molekulák legtöbbször ennél jóval többel bír.

Azokat a molekulákat, amelyek hol az egyik, hol a másik, hol a harmadik, stb. térszerkezetüket mutatják, ezen „arcok” súlyozott átlagaként célszerű bemutatni. A helyes ábrázolás esetén a molekuláról rajzolható „kép” tehát nem csak kicsi, de felettebb dinamikus is.¹ Ám e valóságú ábrázolás (dinamikus képhalmaz) sokszor túlságosan bonyolult, s az atomi részletek dinamikája gyakran csak kevésbé ismert, hajlamosak vagyunk hibásan, csak egy-egy jellegzetes „kimerevített” térszerkezet bemutatásával megelégedni. Így egy kicsit magunkat, s a világot is megtévesztjük egyszerűsítésünk által. A molekulák térszerkezetének sztochasztikus és determinisztikus leírásmódja éppen arra utal tehát, hogy a molekula térszerkezete – bármit is jelentsen az és bármennyi is legyen abból egy időben jelen – komplex módon összeköti a téralkatot (koordinátákat) és azok belső mozgását. Molekuláris téralkat és belsőmozgás: szét nem választható fogalom-pár! Ezt könnyen beláthatjuk, ha tudjuk,

hogy az atomok még zéró kelvinen is rezegnek egyensúlyi állapotaik körül. Érdemes tehát a molekula térszerkezet és a molekuláris belső mozgás összekapcsoltságából adódó tengernyi állapotra és megjelenési formára úgy tekintenünk, mint az adott molekula ideájának manifesztációira, a teljes valóságában meg nem ismerhető lényegére.

Reflexiók az Ideá-ra

Bár a szerkezetkutató célkeresztjében lévő molekulák megismerhetőségéről töprengtem, eközben a filozófiai természetű „ideá” fogalma is felbukkant. Vajon mit is jelent pontosan az előbbi megfogalmazás, miszerint: a legtöbb molekula számos téralkat dinamikus egyensúlyaként írandó le, melyek a molekula ideájának manifesztációi? Mintha ugyanaz a dilemma jelenne meg a mikrokozmoszt benépesítő molekulák helyes leírása esetén, mint amit korábban Szókratész, a hétköznapi életünk tárgyai kapcsán fogalmazott meg. A görög „idein”, melynek jelentése „nézni”, valamely dolog látványára, annak jellegzetes vonásai szerinti besorolására utal. A karakterisztikus vonások alapján történő percepció, majd az ezt követő azonosítás tehát az észlelés kulcsmomentuma s arra utal, hogy egyes tárgyak és jelenségek változékonysága ellenére képesek vagyunk dolgokat felismerni, egyedi vonásaik mögött a tipikusait észrevenni.

Gyakran használt példa az, ahogy képesek vagyunk felismerni a közöset, s ezáltal meglátni a fát például a lehulló falevél, a zöldülő rügy, a hárs és fűz morfológiai eltérései ellenére is. A levél, a rügy s minden más is, mind a fára utal. A fa ideáját sejtjük meg a megfigyelt „tények” mögött. Láthatjuk tehát, hogy hétköznapi világunkban is meg kell birkóznunk a látottak feldolgozásával, az absztrakción keresztül az ideá, jelen esetben a fa ideájának megalkotásával. Sok egyedi vonásból vonjuk ki (extraháljuk) az ideát, s alkotjuk meg egy-egy tárgy vagy fogalom transzcendens képét. Furcsa módon már a hétköznapi világban megszerezhető élményeink és tapasztalataink sem magyaráznak meg bizonyos hétköznapi fogalmakat. Például a matematika tárgyai a számok, melyek azonban a maguk konkrétságában egyáltalán nem tapasztalhatók meg. Két almát és három körtét kezünkbe vehetünk ugyan, de sem a 2-es, sem a 3-as számmal közvetlenül nem találkozhatunk. Hasonlóan a geometria tárgyai sem tapasztalhatók meg, hiszen nem létezik a valóságban sem a pont, sem a kör, mégis elfogadjuk, hogy az érintő csupán egyetlen pontban érinti a kört. Nincs továbbá két egyforma alma vagy körte, mégis bátran használjuk az *egyforma*, az *egyenlő* kifejezést tárgyaink jellemzésére.

Mindezek fényében arra a következtetésre juthatunk, hogy a hétköznapi, „méteres” világunk számos fogalma sem a fizikai megtapasztaláson vagy a tényleges látáson alapul. Furcsa módon nem is az absztrakció az, ami fogalmaink megalkotásához vezet, hiszen ahhoz hogy absztrahálni tudjunk, ahhoz ismernünk kellene a tárgy *leglényegét*. Éppen annak a dolognak az ideáját – mondjuk a tökéletes almát vagy a tökéletes körtét, – tehát éppen azt, amit keresünk, *a priori* ismernünk kellene a fogalom megalkotásához. De ha mindez így van, akkor hogyan ismerjük fel és azonosítjuk a minket körülvevő tárgyakat? Gondolhatjuk azt, amint a görögök tették, hogy valamiképpen magunkkal hozzuk ezen

ismereteket. Pontosan nehéz lenne e képességünk eredetét megnevezni. Talán igazuk volt a görögöknek, miszerint földi életünk előtt istenekkel voltunk együtt és ott megszemléltük a valódi létezőket, ott megtapasztaltuk mindenből a valódit, megismertük az ideákat. Szerintük dolgunk ebben a világban nem több, de nem is kevesebb, mint mindarra visszaemlékezni (*anamnészisz*) amit „ott láttunk”. Ebben az értelemben egy-egy hétköznapi tárgy vagy fogalom létező *igazságát* ideájához való hasonlósága adja meg. Az igazi alma tehát pont olyan, mint amilyennek az almának lennie kell, de a létező (a létezés során megvalósuló) alma sohasem éri el önmaga eszményi állapotát, s ezért ideájára vonásai csak részben és töredékesen utalnak.

Igaz léte tehát csak az ideáknak van. Hétköznapi fogalmaink a szubjektív ideák világából valók, mert a valódi, az objektív ideák tőlük függetlenek. Azok örök és változatlan transzcendens valóságok, immanens világunkban nem megismerhetők. Fizikai tárgyaink vagy a megvalósuló események pusztán árnyékaik csupán a saját ideáiknak, létezésük csupán utalás önmaguk tökéletes formájára. Mindez jól mutatja, hogy ha pusztán hétköznapi életünk tárgyait nézzük, ha valóságnak vélt „méteres” világunkat szemléljük, már akkor is észre kell vennünk, hogy „az érzékelhető világ úgy viszonylik az ideákhoz, mint árnyék a testekhez.” Ha tehát ennek fényében „az ideák a valóság princípiumai”, akkor a lényeg meglátásában, sem a makro- sem a mikrokozmosz objektumainál, nincs könnyű dolgunk.

Ahogy tehát kellő megfigyelést követően egy hétköznapi fogalom, például a fa, ideájának megsejtésére képesek lehetünk, – bár az észlelés terén nehezebb helyzetbe kerülünk –, hasonló módon kereshetjük a mikrokozmosz tárgyainak ideáit is. Az idea keresésének stratégiája tehát nem méretfüggő! A kutatás tárgyát képező objektum méretétől függetlenül, azt megsejthetjük. Kicsit másként megfogalmazva az „extrakciós” feladat – az idea megsejtésére – ugyanaz a mentális kihívás, noha az adatgyűjtés módja és eszközei merőben eltérnek, ha a fa vagy ha egy fehérje ideájának megfogalmazása a célunk. „Az anyag szerveződésének különböző szintjei vannak” ahogy ezt Kajtár Márton professzor oly szemléletesen fejti ki a „*Változatok négy elemre*” című könyvében: „Minden szinten mást tekintünk alkotórésznek, építőelemnek és mást szerkezetnek, struktúrának. Az élő szervezetek építőelemei a sejtek az anyag szerveződésének ezt a magasabb rendű szintjét vizsgálja a biológia. A sejt azonban maga is összetett: ezernél is többféle kicsi és nagy molekula bonyolultan szervezett rendszere, struktúrája ezt tanulmányozza a molekuláris biológia ... A molekulák atommagok és elektronok szervezett rendszerei. Ezek vizsgálatával foglalkozik a kémia.”

A szerkezetkutató kémikus feladata tehát többretű, mert egyrészt adatokat gyűjt eltérő spektroszkópiái és diffrakciós eljárások segítségével kis és nagymolekulák térszerkezetéről, belső mozgásáról, másrészt számításokat végez és molekulamodellez. Csak ezek segítségével tudja a „nyers” mérési adatokat értelmezni, s kísérheti meg a képzőtevényt. E háromdimenziós kirakós összerakása, hasonlóan a szokásos kirakósokéhoz annál bonyolultabb, minél több elemből (jelen esetben atomból vagy molekula fragmensből) épül

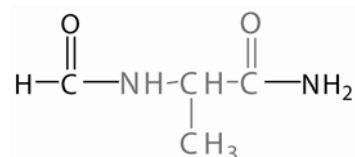
fel. Ugyanakkor a sokszor sziszifuszinak tűnő napi munka közben, a kémikus sem vesztheti szem elől, azt a pontosan soha meg nem oldható feladatot, amit az adatok kibontása, az egyes molekulák ideáinak meghatározása jelent. Ami adatot mérünk és ahogy jellemezzük az adott molekulát, azok mind a molekula ideájáról adnak számot, segítik elő a talán jobb felbontású „képzőtevényt”. Nagy kihívás, hogy fától lássuk az erdőt, hogy a tengernyi technikai részlet és partikuláris adat közepette ne veszítsük szem elől a lényegét. Célunk, hogy ki tudjuk válogatni a leglényegesebb vonásokat és emelni azokat, amelyek arra a molekulára nézve különösen fontosak és jellemzőek, s talán a „legtömörebb módon” reflektálnak az adott ideára. Cipész a kaptafánál, kémikus a molekuláknál maradjon. Lássunk inkább néhány példát arra, hogyan lehet a szerkezet-meghatározás kihívásai mellett az általánosra, az adott molekula ideájára következtetni.

Fehérje-konformer prototípusok

A fehérjék bonyolult téralkatú, komplex poliamid rendszerek,^{2,3} melyek a legváltozatosabb biológiai feladattal rendelkezhetnek. Ma fehérje adatbázisokból százezernél is több különböző fehérje 3D-térszerkezetét húzhatjuk elő, akár atomi felbontásban is tanulmányozhatjuk részleteiket.⁴ Miközben e téralkatok száma igen nagy és sokszínűségük lenyűgöző, a fehérjéket felépítő aminosavak száma korlátos, mindössze 20. Elgondolkodtató tehát, hogy ez a véges számú fehérjeépítő, L-konfigurációjú, α -aminosav milyen módon képes polimer láncba szerveződve ilyen nagyszámú, egymástól annyira különböző térszerkezetet létrehozni?

Alkalmazott kvantumkémiai módszerek segítségével arra a kérdésre kerestük a választ, hogy hány elkülöníthető téralkata lehet egy-egy ilyen fehérjeépítő aminosavnak? Mekkora az a konformációs „repertoár”, ami felhasználásra kerülhet aztán egy-egy fehérje bioaktív térszerkezetének kialakítása során?⁵ Kezdetben – a nyolcvanas évek második felében, – csak alacsonyabb elméleti szinteken, s csak a legegyszerűbb királis aminosav, az alanin-diamidjának (1. ábra) konformációs feltérképezésére vállalkozhattunk.⁶ Később, magasabb elméleti szinteken, hosszabb és bonyolultabb oldalláncú molekulák esetében is el tudtuk már végezni a téralkatok feltérképezését.⁷⁻¹²

Egyes molekulák esetében azóta e számolások helyességét kísérletes módszerek segítségével is igazolni tudtuk.¹³ Megállapítottuk, hogy kilenc jól jellemezhető és elvben elkülöníthető molekula gerinc-konformer alkotja a fent említett repertoárt (2. ábra). Úgy tűnik, hogy ez a 9 téralkat prototípus a fehérjéket felépítő 20 természetes aminosav mindegyikére jellemző, s a fehérje téralkatok bármilyen sokszínűek és komplexek is lehetnek, ezek mindegyikben csak ez a 9 alapszerkezet variálódik.

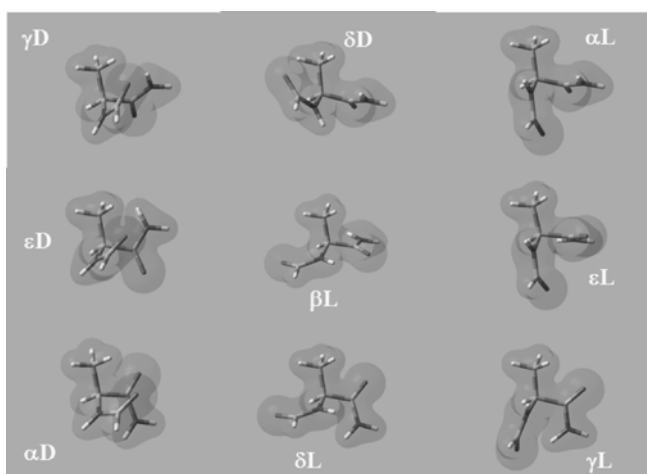


1. Ábra. A fehérjeépítő 20 természetes aminosav konformációs prototípusaként használt For-L-Ala-NH₂ kémiai szerkezete.

Egy n atomból felépülő molekula – $n=16$ a For-L-Ala-NH₂,

esetében (1. ábra) – nagyszámú (3n-6) vibrációs és rotációs alapállapottal rendelkezik. Mint az embert az ujjlenyomata, ugyanolyan jól jellemzik a molekulák bármely térszerkezetét a vibrációs és rotációs energiaátmenetek. Tehát a fehérjeépítő-aminosavak bármely téralkata is jól jellemezhető ezen adatok segítségével. Ám az aminosavak és konformációs állapotaik egyedi jellemzése mellett, közös, erre a molekulacsaládra jellemző vonások is azonosíthatók voltak. S ahogy sok egyedi vonásból megalkotható a „fa” ideája, úgy a 20 különböző aminosav kémia és spektroszkópiai sokszínűségéből, konformációs tulajdonságaik együttes analiziséből meghatározhatóvá váltak közös vonások.¹⁴ Ideájuk körvonalazódott.

Ahogy egy gyermek alapkaraktere is néhány ügyes fénykép segítségével behatárolható (3. ábra), úgy a 9 konformer prototípus beazonosítása hozzájárulhat a fehérjeépítő α -L-aminosavak ideájának helyesebb meghatározásához.



2. Ábra. Bármilyen gazdag is a globuláris fehérjék térszerkezete, az azokat felépítő aminosavak úgynevezett gerinc-konformerei az ábrán látható kilenc prototípus (γ_D , δ_D , α_L , stb.) valamelyikével nagy szerkezeti hasonlóságot mutatnak.

Tanulságok a legkisebb fehérje kapcsán

Máig nyitott kérdés a globuláris fehérje primer és terciér szerkezetének intim kapcsolata. Tudjuk, hogy az aminosav-sorrend, tehát az elsődleges vagy primer szerkezet nem csak a polipeptid-lánc kémiai összetételét, de a harmadlagos (tercier) szerkezetet is meghatározza. Tehát az aminosav összetétel és sorrend egyszerre határozza meg a globuláris fehérjék téralkatát és dinamikus jellemzőit. Ám homály fedi e globális összefüggés részleteit. Komoly szakmai érdeklődés övezi ezért az egyre rövidebb láncú, tehát egyre kisebb molekulatömegű olyan fehérjék vizsgálatát, amelyek vizes oldatban önállóan feltekerednek, azaz időátlagban egységes 3D-szerkezettel rendelkeznek. Ilyen minifehérjéket részben globuláris fehérjék lerövidítésével és átszabásával, részben *de novo* tervezéssel állíthatunk elő.^{15,16} Az általunk előszeretettel vizsgált minifehérje e család legkisebb képviselője: mindössze 20 aminosavból épül fel, mégis rendelkezik az úgynevezett „Trp-kalitka” harmadlagos szerkezettel. Az α - és 3_{10} -hélix¹⁷ mellett jelenlevő poliprolin típusú másodlagos szerkezeti elemek egymással

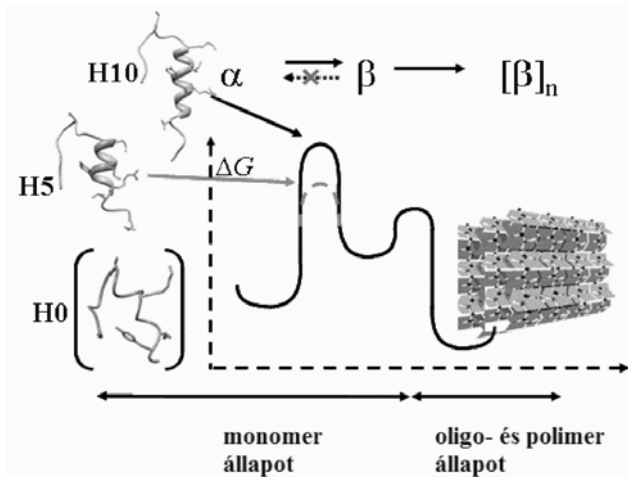


3. Ábra. Ahogy a kilenc különböző arckifejezésben felismerhetjük ugyanazt a személyt, megsejthetjük hangulatát, úgy a 9 konformer prototípus megismerése is elvezethet az aminosavak közös konformációs vonásának, ideájának megsejtéséhez.

kölcsönható, kompakt téralkatot hoznak létre vízben. Az *in vitro* és *in silico* feltekeredési vizsgálatok tanulságai szerint ez a térszerkezet stabil marad, a molekula akár 30-40 fokos melegítése ellenére is.¹⁵ A globuláris fehérjék, s így a minifehérjék fel- és letekeredésének atomi részleteiről, a térszerkezet belső dinamikus viselkedéséről azért szeretnénk többet megtudni, hogy a fent említett ok-okozati összefüggést mélyebben és pontosabban megérthessük.¹⁸⁻²⁰

A nagyobb, akár több száz aminosavból felépülő fehérjék esetében gyakran meg kell elégednünk az úgynevezett két-állapotú modell adta precizitással. Ennek alkalmazása során feltételezünk egy teljesen feltekeredett (F), valamint egy teljesen letekeredett (U) makromolekuláris állapotot, s csupán ezen két állapot segítségével jellemezzük a fehérje térszerkezetének hőmérséklet- (vagy nyomás-) függését. Mivel a mindössze 20 aminosavból álló minifehérje kellően kisméretű molekuláris rendszer, ezért itt eredményesen vizsgálhattuk a folyamat részleteit, a le- és fel-tekeredési út részállomásait is. A ¹⁵N és ¹³C/¹⁵N jelölt fehérjék hőmérsékletfüggő NMR-mérései alapján különböző közti-állapotokat figyeltünk meg, és jellemeztük azokat mind semleges, mind savas pH-n.

Az NMR spektrumok elemzésére egy új dekonvolúciós eljárást dolgoztunk ki, mellyel jellemezni tudtuk az akár „láthatatlan” fel- és letekeredett, illetve a közbülső intermedier állapotokat is.^{21,22} Újszerű elemző módszereinknek köszönhetően azokat a teljesen tiszta (pl. 100% F, 100% U 4. ábra) téralkatokat is jellemezni tudtuk, amelyek a gyakorlatban nem tudnak megvalósulni egyéb okok miatt. Például a 100%-ban feltekeredett állapot nem tud megvalósulni, mert olyan alacsony hőmérsékletre kellene lehűteni a molekulát, ahol a közeget jelentő víz már megfagy. Egy alkalmas, nem-lineáris illesztési módszert felhasználva megkaptuk mind a több-lépéses feltekeredési folyamat termodinamikai paramétereit (ΔH^{F-1} , T_m^{F-1} , ΔC_p^{F-1})



5. Ábra. A Tc5b egy mutánsa a H0, és ennek 5 (H5) majd további 5 aminosavval meghosszabbított variánsa (H10), konformációs preferenciájuk jellemzése. A H0 nagyfokú rendezetlensége (U-állapot) stabilizálódik az első, majd a második 5 aminosav hozzáadásával, ám míg a H10 a Trp-kalitka téralkatát igen magas koncentrációban is megőrzi, addig a H5 már fiziológiásnak mondható körülmények között is könnyen aggregálódik.

Más betegségek során tapasztalt fehérjék hibás fel- és letekeredése mellett, ezen betegségek esetében egyes fehérjék (pl. Tau, APP-fragmensek) fokozott aggregációs képessége áll. A H0, H5 és H10 modellek összehasonlító szerkezetvizsgálata egy olyan aggregációs modell-rendszert eredményezett, amelyben a fehérjék 3 alapállapota elkülönülten, de egy rendszerben tanulmányozható. Nevezetesen a rendezetlen (H0), az aggregálódó (H5) és a globuláris jellegű megőrző (H10) modellek fehérje-állapotai lefedik a ma ismert „fehérje-konformációs teret”; a „fehérje univerzumot”. Eredményeink szerint a Trp-kalitka téralkat ígéretes modell nem csak a fehérjék le- és feltekeredésének, de a különböző aggregációs vizsgálatoknak is. (Ugyanez nagyobb globuláris fehérjék esetében atomi szinten csak nehezen vagy elnagyoltan tanulmányozható.)

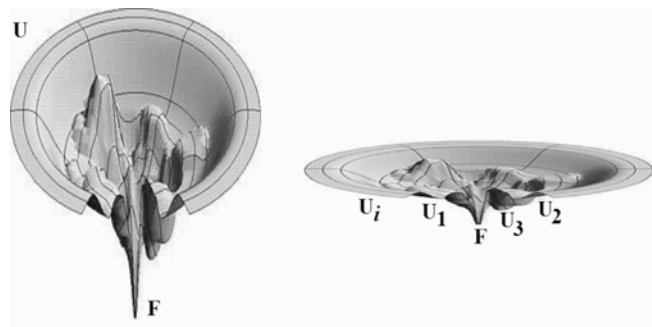
Talán ezek a modellrendszerek segíthetnek jobban megérteni a káros fehérje aggregáció és amiloid képződés molekuláris hátterét, a „fehérje-temető” mibenlétét. Most, a korábbi példaktól eltérően nem egy molekula, hanem egy fogalom, a fehérje aggregáció ideájának mélyebb megértése volt a cél. Megállapítottuk, hogy az aggregáció fogalma szorosan és szervesen összekapcsolódik a fehérjékkel, azok poliamid kémiai összetételéből következik. Leszögezhetjük, hogy akkor lesz ez a képesség felfokozott, ha az említett $\alpha \rightarrow \beta$ irreverzibilis konformációs átmenetek aktiválási szabadentalpiája lecsökken. Történhet ez egy mutáció, egy átalakulás vagy környezeti változás megjelenésével. Tehát bármely változás a fehérje állapotában, amely ez irányba hat, a fehérjét sérülékenyebbé, sebezhetővé teszi, minek következtében a fehérje könnyebben jut termodinamikai mélypontjára, az úgynevezett „fehérje-temetőbe”. Az aggregáció mint esemény ideája összetett és bonyolult, de a folyamat mibenléte alkalmas modell rendszerek segítségével hatékonyan tanulmányozható, ahogy ezt néhány Trp-kalitka modell példája is jól szemlélteti.

A rendezetlenség titkai

Korábban úgy tekintettünk az U-állapotra (4. ábra) - s talán ezen példák esteében is olyan színben tűnhettek fel, - mint valami rossz és elkerülendő helyzetre. Valóban az U-állapot jellemzése ($U_1, U_2, U_3, U_4, \dots$ azonosítása) (6. ábra), különösen atomi szinten nehéz, gyakran megoldhatatlan kihívást jelent a szerkezetkutató számára. A sok ezer, talán milliárdnyi, netán milliárdnyi egymástól különböző téralkat szimultán jellemzése ma megoldhatatlan feladat. Mégis számos olyan fehérjét ismerünk, amely bár az úgynevezett rendezetlen rendezetlen fehérjék (angol rövidítésük nyomán: IDP-k) családjába tartozik, világos biológia feladatot hordoz.^{24,25}

Néhány éve derült fény arra, hogy a hagyományos dajkafehérjékhez (chaperon-okhoz) hasonlóan az IDP-k is képesek számottevő bioaktivitásra. Ennek a jelenségnek a szerkezet-funkció vizsgálatára az *A. thaliana* (lúdfű) egy dehidrin nevű fehérjét az ERD14-t használtuk fel. A dehidrinek növényi stressz-fehérjék, amelyek leggyakrabban teljesen rendezetlen téralkatúak (U-állapot), s amelyek kifejeződése a sejtben és szövetekben jelentős mértékben megnő a kiszáradás, a fokozott só koncentráció, vagy fagyveszély esetén. Különböző enzimek jelenlétében (alkohol dehidrogenáz, luciferáz, citrát szintáz) végzett „chaperon” aktivitás vizsgálatok révén kimutattuk, hogy az ERD14 valóban, *in vitro* körülmények között is hatékony védelmet nyújt az említett stresszek esetén.

A jelenség szerkezeti hátterének vizsgálatához a 185 aminosavból felépülő ERD14 molekulát használtuk fel, jellemeztük modern és szofisztikált²⁶ 3D-, 5D-NMR mérések segítségével.²⁷ A másodlagos kémiai eltolódásértékek és relaxációs adatok megerősítették elképzelésünket, miszerint az ERD14 teljesen rendezetlen, ám ugyanakkor öt rövid régiója valamelyest korlátozott mozgékonyasága miatt, helyi „helicitási” hajlamot mutat. *E. coli* rendszerben túlermelt ERD14 *in-cell* NMR mérések segítségével kimutattuk, hogy ebből három régió (konzervált K-szegmensek) további rendeződésen megy keresztül. Ezekben a pontokban valószínűleg a fehérje megköti a sejtek egyes molekuláit.



6. Ábra. Mind a globuláris, mind a fibrilláris fehérjék hipotetikus feltekeredési energiátölcseré (bal oldali tölcser) számottevően különbözik attól, ami egy belsőleg rendezetlen fehérje (IDP) esetében tapasztalható (jobb oldali tölcser). Míg az első esetben az F (feltekeredett) és U (rendezetlen) állapotokat nagyobb energia választja el egymástól, addig az IDP-k esetében ez az érték kicsi, továbbá az egyes állapotok (F, $U_1, U_2, U_3, U_4, \dots$) közötti gátmagasság is igen alacsony. Ezért a második esetben az állapotok könnyen cserélődve, kiterjedt dinamikus rendszert alkothatnak, ahol i értéke csillagászati nagyságú is lehet.

Ezek a vizsgálatok a fehérje-rendezetlenség fogalmát, mint ideát járják körül és mutattak rá arra, hogyan is lehetséges az, hogy az IDP-k is hatékony bioaktív molekulák. A korábbi elképzelésekkel ellentétben tehát – Anfinsen Nobel-díjas kísérlete ellenére, – nem csak a rendezett téralkatú (F-állapotú), de a rendezetlen dinamikus sokaságot alkotó (U-állapot) fehérjék is hordozhatnak biológiai szerepet (6. ábra).

Epilógus

Összefoglalóm szakmai része fő kutatási területemről, a fehérjék fel- és letékeredéséről, egyes polipeptidek és fehérjék önszerveződő^{28,29} aggregációs képességéről számolt be.³⁰ A megvizsgált példákon keresztül az egyedi tulajdonságok, a technikai részletek megismertetése és bemutatása mellett céлом volt az „egészre” is fókuszálni. Mert szépek a fák, de még szebb, ha az egész erdőben gyönyörködhetünk. Próbáltam a klasszikus „idea-tan” jegyében egyes molekulák vagy állapotok ideáira utalva, azokról teljesebb képet alkotni. Kérdés persze, hogy mindez mennyire sikerült, egyáltalán mennyire sikerülhet ez a feladat? Vajon meg lehet-e valamely tárgy vagy fogalom ideáját igazán és objektíven ragadni, ha figyelembe vesszük a fenomenológia, mint filozófiai irányzat elgondolását?

Az idea-tanhoz hasonlóan – e szintén görög eredetű kifejezés – a *phainomenon* és a *logosz (tan)* szóösszetételből áll. Az első tag a *phainomenon*, a megjelenő, a megmutató jelenség vagy tárgy vizsgálatának mibenlétére utal. A fenomenológia mottója talán az a felszólítás is lehetne, miszerint vissza a jelenséghez, ahhoz, ami megfigyelhető. E filozófiai irányzat két kiemelkedő képviselője, Maurice Merleau-Ponty és Edmund Husserl, éppen a megfigyelés problémás voltára hívják fel a figyelmünket. Ha látok ugyanis egy tárgyat, akkor soha sem lehetek teljesen biztos abban, hogy e látvány híven tükrözi (reprezentálja) a megismeréstől független objektumot (ha akarom, a tárgy ideáját). Ám biztos lehetek abban, hogy van egy olyan személyes – megfigyelőről megfigyelőre változó élményem, miszerint látom azt az objektumot. Tehát amit megismerek ebben az élményben, az nem maga az objektum (idea), hanem a látvány élménye (fenomén).

Ennek fényében tehát bármilyen objektíven is akarok egy tárgyat leírni, például a fa ideáját meghatározni, egy molekula ideáját körvonalazni, az *ab ovo* lehetetlen feladat. Hiszen a megfigyelést éppen a megfigyelőtől, tehát önmagamtól nem tudom függetleníteni! Objektív lehet-e tehát a megismerés egyáltalán? Avagy beavatkozik-e szükségszerűen a megfigyelő (személyisége) magába a megfigyelés folyamatába és ezáltal befolyásolja, de legalább is szubjektív színezettel látja el a megfigyelés objektívnek vélt folyamatát? S ha szükségszerűen személyes a megfigyelés végeredménye, akkor talán ideák megfogalmazása helyett inkább fenomének megalkotására kellene törekednünk, ami a megismerő tudat számára a (jelen)valóság. Miben lehetek hát biztos, ha magában a megfigyelés objektívitasában sem bízhatok? Vajon célom lehet-e az objektív valóság megismerése, ha pontos leírása nem is? Tényleg csak tükör által homályosan láthatunk? Talán túl sok is a kérdés ezen a ponton, s ezért álljon itt inkább a Magyar Tudományos Akadémia korábbi főtükora,

Arany János „A tudós macskája” című verséből egy rövid idézet.

„Nagy volt, mondok, a tudósnak
Az ő tudománya,
De mi haszna! Kevés hozzá
A vágott dohánya.
Könyvet irt a bölcseségről
-- S hajna!
Ilyen ápró dőreségek
Gyakran estek rajta.”

Köszönetnyilvánítás

A sort szüleimmel édesanyámmal és édesapámmal kezdem, hiszen nekik köszönhetem neveltetésem és világnézetem alapjait. Középiskolás tanáraimmal folytatom a sort, akik közül név szerint említem Fórián-Szabó Zoltán kémia és Pázmándi György biológia tanáraimat. Nekik köszönhetem, hogy 1977-ben megismerkedhettem Kajtár Márton és Hollósi Miklós professzorokkal az ELTE-n, akiknek köszönhetően döntöttem végleg a kémia tanulása és későbbi művelése mellett. Mellettük egyetemi tanulmányaim során Kucsman Árpád és Medzihradsky Kálmán professzorok hatása volt meghatározó.

Mint fiatal kutató korán megismerkedtem Gráf László biokémikus, Náray-Szabó Gábor elméleti kémikus és Tusnády Gábor matematikus professzorokkal; köszönet támogatásukért a közös munka kapcsán diszciplínáik megszerettedéséért. Később lehetőségem nyílt több ország különböző laboratóriumában dolgoznom, ezért itt a teljesség igénye nélkül nekik mondok köszönetet: Csizmadia G. Imre (Torontó), Gerard D. Fasman (Boston), Iain D. Campbell (Oxford), John Markley és William Milo Westler (Wisconsin), Tóth Gábor és Penke Botond (Szeged) professzoroknak.

Közvetlen munkatársaim, korábbi diákjaim és PhD hallgatóim mindegyikének köszönöm az izgalmas munkát a közös kutatást. Név szerint csak azokat szeretném abc sorrendben kiemelni, akikkel több közös meghatározó közleményt írtunk: dr. Beke Tamás, dr. Bodor Andrea, dr. Czajlik András, dr. Gáspári Zoltán, dr. Hudáky Péter, dr. Hudáky Ilona, dr. Harmath Veronika, dr. Jákló Imre, dr. Kiss Róbert, dr. Láng András, dr. Mucsi Zoltán, dr. Pálfi Villó Katalin, Rovó Petra, dr. Pohl Gábor, Stráner Pál és dr. Szalayné Ágoston Bianka. Végül de nem utolsó sorban szeretném megköszönni feleségemnek dr. Perczel Forintos Dórának, a jobbik énemnek (ahogy ezt az angolok mondják) több mint három évtizeden át kitartó szeretetét és támogatását, valamint közben felnőtt gyermekeink, Kristófnak, Juliának és Györgynek, hogy néha a játszótér helyett, bejöttek velem NMR-t mérni.

Hivatkozások:

1. Gáspári, Z.; Perczel, A.; „Protein dynamics as reported by NMR” Annual reports in NMR spectroscopy, **2010**.
2. Perczel, A.; Hollósi, M.; Foxman, B. M.; Fasman, G. D. *Journal of the American Chemical Society* **1992**, *113*, 9772-9784.

3. Perczel, A.; Jákli, I.; Foxman, B.M.; Fasman, G.D. *Biopolymers* **1996**, *38*, 723-732.
4. Hudáky, I.; Perczel, A. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* **2008**, *70*, 1389-1407.
5. Hódi, Zs.; Németh, A.L.; Radnai, L.; Hetényi, Cs.; Schlett, K.; Bodor, A.; Perczel, A.; Nyitray, L. *Biochemistry* **2006**, *45*: 12582-12595.
6. Perczel, A.; Ángyán, J.G.; Kajtár, M.; Viviani, W.; Rivail, J.L.; Marcoccia, J.F.; Csizmadia, I.G.; *Journal of the American Chemical Society*, **1991**, *113*, 6256-6265.
7. Perczel, A.; McAllister, M.A.; Császár, P.; Csizmadia, I.G. *Journal of the American Chemical Society* **1993**, *115*, 4849-4858.
8. Viviani, W.; Rivail, J.L.; Perczel, A.; Csizmadia, I.G. *Journal of the American Chemical Society* **1993**, *115*, 8321-8329.
9. Perczel, A.; Farkas, Ö.; Csizmadia, I.G. *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117*, 1653-1654.
10. Perczel, A.; Farkas, Ö.; Csizmadia, I.G. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118*, 7809-7817.
11. Topol, I.A.; Burt, S.K.; Deretey, E.; Tang, T.H.; Perczel, A.; Rashin, A.; Csizmadia, I.G. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123*, 6054-6060.
12. Láng, A.; Csizmadia, I.G.; Perczel, A. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* **2005**, *58*, 571-588.
13. Pohl, G.; Perczel, A.; Vass, E.; Magyarfalvi, G.; Tarczay, G. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2007**, *9*, 4698-4708.
14. Beke, T.; Czajlik, A.; Csizmadia, I.G.; Perczel, A. *Physical Biology* **2006**, *3*, 26-39.
15. Neidigh, J.W.; Fesinmeyer, R.M.; Andersen, N.H. *Nature Structural Biology*, **2002**, *9*, 425-430.
16. Mucsi, Z.; Perczel, A.; Orosz, G. *Journal of Peptide Science* **2002**, *8*, 643-655.
17. Jákli, I.; Fejér, Sz.N.; Farkas, Ö.; Viskolcz, B.; Jensen, S.K.J.; Csizmadia, I.G.; Perczel, A. *Chemical Physics Letters* **2013**, *563*, 80-87.
18. Szenthe, B.; Gáspári, Z.; Nagy, A.; Perczel, A.; Gráf, L. *Biochemistry* **2004**, *43*, 3376-3384.
19. Fodor, K.; Harmat, V.; Hetényi, C.; Kardos, J.; Antal, J.; Perczel, A.; Patthy, A.; Katona, G.; Gráf, L. *Journal of Molecular Biology* **2005**, *350*, 156-169.
20. Gáspári, Z.; Szenthe, B.; Patthy, A.; Westler, W.M.; Gráf, L.; Perczel, A.; *FEBS Journal* **2006**, *273*, 1831-1842.
21. Rovó, P.; Farkas, V.; Hegyi, O.; Szolomajer-Csikós, O.; Tóth, G.K.; Perczel, A. *Journal of Peptide Science* **2011**, *17*, 610-619.
22. Rovó, P.; Láng, A.; Stráner, P.; Nyitray, L.; Huszár, K.; Perczel, A. *Chem.Eur.J.* **2013**, *19*, 2628-2640.
23. Farkas, V.; Csordás, B.; Hegyi, O.; Tóth, G.K.; Perczel, A. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 3513-3522.
24. Tompa, P. „Structure and function of intrinsically disordered proteins” Taylor and Francis, **2009**.
25. Kiss, R.; Kovács, D.; Tompa, P.; Perczel, A. *Biochemistry* **2008**, *47*, 6936-6945.
26. Westler, W.M.; Lin, J.J.; Perczel, A.; Weinhold, F.; Markley, J.L. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*, 1310-1316.
27. Ágoston, B.S.; Kovács, D.; Tompa, P.; Perczel, A. *Biomolecular NMR Assignments* **2011**, *5*, 189-193.
28. Beke, T.; Csizmadia, I.G.; Perczel, A. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 5158-5167.
29. Pohl, G.; Beke, T.; Borbély, J.; Perczel, A. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 14548-14559.
30. Perczel, A.; Hudáky, P.; Pálfi, V.K. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 14959-14965.

Retrieving the “idea” of structure any dynamics:dynamic structure analysis of polypeptides and proteins

The present paper is a conceptual summary on structure and dynamics of organic biomolecules, especially on peptides and proteins, rather than a research article focusing on technical details of the latter subject. The problem of properly presenting molecular structures, encoding not only spatial information (3D-coordinates) but also their internal dynamics has been around for chemists and biochemist. Ignoring the dynamical aspect of biopolymers (conformational ensemble properties, internal mobility, local unfolding, etc.), can conclude to misunderstandings on the true nature of biomolecules. Measuring and incorporating both type of information and thus, attempting to retrieving the true “platon-

idea” of a biomolecules could be lengthy, but rewarding. Such a complex “view” can provide a better description of what is observed indeed. Examples are presented here on how useful is to determine dynamical and conformational data on *i*) simple proteinogenic amino acid derivatives, *ii*) mini-proteins and *iii*) intrinsically disordered proteins. Although the proper graphical presentation of protein flexibility is yet a challenge, it has advantages when doing molecular docking, analyzing macromolecular interaction, etc.. For studies incorporating molecular flexibility to understand and predict biological processes, we have proposed the term **DSAR for Dynamic Structure-Activity Relationship** analysis.