

Önszerveződő rendszerek:  
a kollagén, és ahogyan a  
plakk-képződést elkerüli

Pálfi Villő Katalin

Doktori értekezés tézisei

Témavezető: Dr. Perczel András

Egyetemi tanár

Program: Szintetikus kémia, anyagtudomány és biomolekuláris kémia

Programvezető: Dr. Horváth István Tamás

Kémia doktori iskola

Doktori iskola vezetője: Dr. Inzelt György

Eötvös Loránd Tudományegyetem

Kémiai Intézet

2008.

## Bevezetés

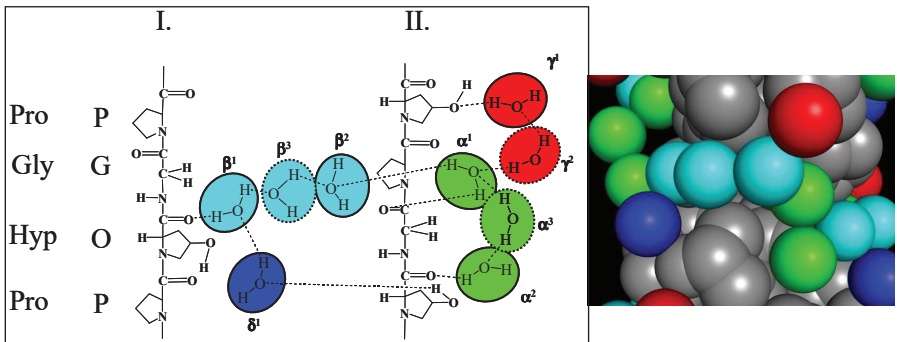
Aggregálódó fehérjék mind beteg, mind egészséges szervezetben előfordulnak. A legismertebb példa az előbbire az amiloid, az Alzheimer-kór okozója, az utóbbira a kollagén. Az első fajta aggregációképzés nem irányítható, és az aggregátumokat nem is tudja lebontani a szervezet. A kollagéneképzés viszont teljes mértékben szabályozott, és a felépült szerkezet le is bontható, mint ahogy ezt a csontok fejlődése is mutatja.

Sok jól jellemzett fehérje (SH3,  $\beta$ 2-mikroglobulin, lizozim, mioglobin) képes aggregálódásra, ha az oldatbeli körülmények eltérnek a fiziológiástól. Az általuk képzett lerakatok hasonló szerkezetű, mint amelyet az amiloid képez. Ugyanígy aggregátumokat figyelhetünk meg a kergemarha-kór és a Huntington-kór esetében. Ezeknek a lerakódásoknak ugyanaz a makroszkopikus szerkezetük (amiloid fibrillumok), és ezért vélhetően ugyanaz, vagy legalábbis hasonló a molekulák elrendeződése is. Az az általánosan elfogadott vélemény, hogy ezek az aggregátumok  $\beta$ -redőzött rétegben gazdag szerkezetek, ahol egy peptidlánc két szakaszán található nyújtott szerkezeti elem, melyet egy kanyar köt össze, és maguk a peptidlánckok egymás után lerakódva alkotnak végtelen kristályt. A megfelelő körülmények között gyakorlatilag bármely eddig vizsgált fehérje képes volt ezt a betegséget okozó  $\beta$ -redőzött szerkezetet felvenni. Ezért felmerül az a kérdés, hogy mi teszi a  $\beta$ -redőzött réteget ilyen stabilá.

A kollagén egy extracelluláris fehérje, mely szerveztünk fehérjéinek egynegyedét adja. Szerkezetalkotó fehérje, mely molekuláris „kábeleket” alkotva erősíti az inakat, és rétegekbe szerveződve pedig a bőrt és a belső szerveket tartja. Hierarchikusan szerveződve épül fel. Az első szint a tropokollagén, amelyet három fehérjélánc alkot egy tripla hélixet felépítve. Hét ilyen tropokollagén tripla hélix egymás köré fonódva már egy hexagonális mikrofibrillumot alkot. A tropokollagén tripla hélix egymáshoz nagyon hasonló szerkezetű elemekből (homokonformerekből) épül fel, amelyet poliprolin II-nek, vagy röviden PPII-nek is szokás nevezni. Ezeket a  $\phi \approx -70^\circ$ ,  $\psi \approx +160^\circ$  ( $\epsilon_L$ ) paraméterekkel lehet jellemezni, amelyek nagyon hasonlóak a  $\beta$ -redőzött rétegben található szerkezeti elemekhez ( $\beta_L$ ,  $\phi \approx -150^\circ$ ,  $\psi \approx +150^\circ$ ). A kollagén elsődleges szerkezetére a Xxx-Yyy-Gly ismétlődő egység (triplet) a jellemző, ahol az Xxx helyeken gyakran találhatóunk prolint (Pro) és az Yyy pozíciókban pedig hidroxiprolint (Hyp).

Ez a tripla hélix erősen hidratált, legalább 4 vagy 5 vízmolekula kell tripletenként a normális feltekeredéshez. A kollagén körüli hidrátburok atomi szerkezetét először Bella és munkatársai írták le részletesen, és ezt azóta több más röntgenszerkezetben is megfigyelték. Megfigyelésük szerint a tropokollagéhez kötött vízmolekulák rendszert alkotva kapcsolódnak a felszínhez és egymáshoz, így hidrogénhíddal összetartott vízláncok kötik össze a tropokollagének különböző pontjait. Vízhidaknak nevezzük ezeket a rendszereket, ha a lánc első és utolsó molekulája ugyanahhoz a tropokollagéhez kapcsolódik. Egy POG (Pro, Hyp, Gly) típusú kollagént körülvevő legközelebbi vízréteg minimum 6, maximum 9 vízmolekulából áll tripletenként, amelyből 5 kapcsolódik közvetlenül a fehérjéhez.

Bella és munkatársai négy különböző vízhidat írtak le, amelyet  $\alpha$ -nak,  $\beta$ -nak,  $\gamma$ -nak és  $\delta$ -nak neveztek, attól függően, hogy a kollagén mely atomjához kapcsolódnak. (1. ábra)



**1. ábra** Bal: A kollagén tripla hélixet körülvevő vízburók sematikus vízhálózata. Zöld:  $\alpha$ , világoskék:  $\beta$ , piros:  $\gamma$  and sötétkék:  $\delta$ . A vízhidakat Bella és munkatársai nyomán neveztem el, az egyéni molekulák nevei ezekből következnek. A teljes vonallal bekarikázott vízmolekulák mindig megtalálhatók a szerkezetekben, a szaggatott vonallal körülvettek jelenléte nem kötelező. Jobb: Ugyanezek a vízhidak, ahogyan azt az 1V7H PDB-azonosítójú röntgenszerkezetben láthatjuk. A színezés ugyanaz, mint a bal oldali sémán, míg a fehérje összes atomja szürke. (A hidrogénatomok nincsenek jelölve.)

## Módszerek

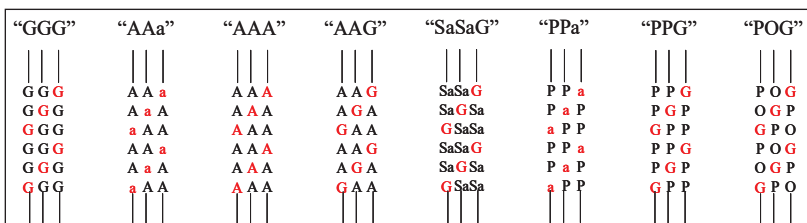
### *Amiloid modellek*

A legstabilabb szorosan pakolt szerkezet meghatározásához két modellpeptiden végeztünk számításokat. Az Ac-(Ala)<sub>3</sub>-NHMe az oldallánccal rendelkező, királis aminosavakból

felépülő rendszereket modellezte, míg a Ac-(Gly)<sub>3</sub>-NHMe az oldallánc nélküli aminosavakból, glicinből felépülőket. Ezekben a számításokban minden olyan konformációt megvizsgáltunk, ahol egy peptidcsoport két másikkal alkot hidrogénkötést. A szerkezeteket HF/3-21G szinten optimáltuk, amelyeken B3LYP/6-31G(d) szinten végeztünk energiaszámításokat.

### Kollagén modellek

A következő néhány aminosav-triplet gerinckonformációjának és a tripla hélixre gyakorolt stabilizáló hatásának vizsgálatához hat aminosav hosszú, három százból álló modelleket építettünk. Így egy rendszer 18 aminosavat tartalmazott. Az alábbi tripleteket vizsgáltuk: *i)* csak glicint tartalmazó (GGG kollagén hélix modell), *ii)* csak L-alanint tartalmazó (AAA kollagén hélix modell), *iii)* L-alanint és glicint tartalmazó (AAG kollagén hélix modell), *iv)* L-alanint és D-alanint tartalmazó, (AAa kollagén hélix modell) *v)* L-prolint és glicint tartalmazó (PPG kollagén hélix modell), *vi)* L-prolint és D-alanint tartalmazó (PPa kollagén hélix modell), *vii)* szarkozint és glicint tartalmazó (SaSaG kollagén hélix modell) és *viii)* L-prolint, L-hidroxirolint és glicint tartalmazó (POG kollagén hélix modell). Minden esetben, amikor nem csak egyfajta aminosavból épült fel a modell, a glicineket a megfelelő helyre építettük be, és a láncokat a tripletekből a megfelelő eltolással építettük fel. Például: -Gly-Xxx-Yyy-Gly-Xxx-Yyy-, -Yyy-Gly-Xxx-Yyy-Gly-Xxx- és -Xxx-Yyy-Gly-Xxx-Yyy-Gly-, és a láncok párhuzamosan, egy irányban épülnek fel. Mindezeket a modelleket a 2. ábra szemlélteti.



2. ábra 3x6 aminosavból álló modellek, amelyekkel az egyes aminosavak tripla-hélix stabilitására gyakorolt hatását vizsgáltuk.

Az összes szerkezetet először a RHF/3-21G, majd a B3LYP/6-31G(d) szinten optimalizáltuk. Ezek után az optimalizált szerkezeteken további energiaszámításokat hajtottunk végre a B3LYP/6-311++G(d,p) és B3LYP/PCM/6-31G(d) szinteken. A PCM számításokhoz az IEF-PCM módszert használtuk víz oldószerrel, ami azt jelenti, hogy  $\epsilon=78.39$  volt. Ezen kívül az összes optimált geometriájú szerkezeten frekvenciaszámítást hajtottunk végre a B3LYP/6-31G(d) szinten. A szabadentalpia és entrópia eredmények ezekből a számításokból származnak.

A tropokollagénhez hidrogénkötéseken keresztül kapcsolódó vízmolekulák energiájának feltérképezéséhez három különböző modellrendszert használtunk. Az első egy belső, szerkezeti, úgynevezett  $\zeta$ -típusú vízmolekula tanulmányozására szolgál. Ennek jelenlétéhez nem lehet sem prolin, sem hydroxiprolin az Xxx helyen. Ezért 3x6 aminosavat tartalmazó modellünkben mind az Xxx, mind az Yyy helyre alanint raktunk. Mind a hat vízmolekulát beépítettük a rendszerbe, és az egészet a B3LYP/6-31G(d) szinten optimalizáltuk.

A második modellrendszer a kollagén körüli vízszintes vízfonal jellemzésére szolgál, ezért itt az  $\alpha$ - és  $\beta$ -vízhidak vannak a középpontban. Azért, hogy ezek a vízmolekulák pontosan a röntgenszerkezetekben látható helyükön maradjanak, néhány más, környező vízhídbeli molekulát is be kellett építeni.

A harmadik modellrendszer a függőleges vízfonalak jellemzésére szolgál. Ezért itt a  $\gamma$ - és  $\delta$ -vízhidak vannak a középpontban.

Minden számításhoz a Gaussian03 programot használtuk

## **Eredmények**

### *Kristályszerkezetek*

Az oldallánccal rendelkező peptideket az Ac-(Ala)<sub>3</sub>-NHMe-el modelleztük. Az itt felépített szerkezetek közül a legalacsonyabb energiájúak a  $\beta$ -redőzött formák. Azok közül is a legstabilabb az antiparalel, egyrétegű  $\beta$ -redő. Utána következő a paralel egyrétegű  $\beta$ -redő, majd a paralel, többretegű  $\beta$ -redő, de még ez is csak 1,7 kcal·mol<sup>-1</sup>-al kevésbé stabil, mint az antiparalel forma.

A legkevésbé stabil szerkezetben az amidsoportok által bezárt szög  $-60^\circ$ . Érdekes, hogy a 2 szomszédossal rendelkező, és a 4 vagy 6 szomszédossal rendelkező szerkezetek közötti energiakülönbség elég nagy, több, mint  $10 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Ez azt jelenti, hogy a számítások igazolják a logikai megfontolásokat, vagyis hogy az oldalláncok jelenléte akkora távolságot kényszerít a peptidláncok közé, hogy a köztük lévő hidrogénkötés túl gyenge lesz.

Oldallánccal nem rendelkező aminosavakból (glicinből) felépülő peptidok esetében a legstabilabb szerkezet az, amelyben egy peptidláncot hat másik vesz körül, és az amidsoportok hajlásszöge  $120^\circ$ . Itt a molekulák poliprolin II konformációt vesznek fel. Ezt a szerkezetet már Crick és Rich is leírta a poliglicin II vizsgálatokor. A legmagasabb energiájú szerkezet szintén hexagonális, de itt a peptidsoportok hajlásszöge  $60^\circ$ .

Összefoglalásként tehát elmondhatjuk, hogy az oldallánccal rendelkező aminosavak tartalmazó peptidok számára a legstabilabb szerkezet valamilyen  $\beta$ -redőzött réteg, míg a poliglicin számára a hexagonális a legkedvezőbb aggregálódási forma, ahol az aminosavak a kollagénnel hasonló  $\epsilon_t$  konformációban találhatók.

### *Kollagén tripla hélixek*

A kollagén tripla hélix stabilitása a három különálló peptidszállhoz képest a következő sorrendet mutatja: AAA<PPa<AAa<AAG<GGG<POG<PPG<SaSaG, ahol a tripla-hélix képződés az utolsó 5-nél (GGG, AAG, POG, PPG és SaSaG triplet) kedvezményezett. Ez a sorrend egyezik a kísérleti olvadáspont mérésekre alapozott stabilitási sorrenddel. A különböző olvadáspont értékeket különböző tripleteknek a  $(\text{POG})_3\text{-XYG-(POG)}_4$  szekvenciába való beépítésével nyerték. A modellek stabilitása a kísérletben a AAA  $\rightarrow$  AAG  $\rightarrow$  PPG  $\rightarrow$  POG irányba nőtt.

Az iminosavat nem tartalmazó modellek esetén (AAA, GGG, AAa és AAG) a háromszalú parallel  $\beta$ -redőzött réteg mind az egyes energia, mind a szabadentalpia értékek szempontjából kedvezőbb a kollagén tripla hélixnél. A PCM oldószermoddellel számolt energiakülönbségek  $\Delta E^{\text{B3LYP/PCM/6-31G(d)}/\text{B3LYP/6-31G(d)}} = +6,4, +3,8, +4,3$  és  $+4,7 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  tripleteként a felforról modellekre. A legstabilabb  $\beta$ -redőzött réteget a csak alaninból álló AAA triplet alkotja az összes elméleti szinten. A másik négy triplet (SaSaG, PPa, PPG és POG modellek) számára viszont a kollagén tripla hélix a kedvezőbb szerkezet. A PPG tripla hélix modell  $4,8 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ -al stabilabb a redőzött szerkezetnél vákumban és  $3,8 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ -al vízben.

Ugyanezek az energiaértékek 3.4 kcal·mol<sup>-1</sup>-nak és 2.0 kcal·mol<sup>-1</sup>-nak adódtak a POG modellre. A SaSaG triplet számára a szabadentalpia értékeket tekintve ugyanannyival kedvezőbb a kollagén-szerű szerkezet, mint a POG triplet számára, bár az energiaértékeket tekintve ez kicsit kevésbé igaz. Ennek ellenére elmondhatjuk, hogy a SaSaG triplet igen stabil tripla hélixet képez. A PPA összetétel számára a tripla hélix képzés csak nagyon kevésbé kedvező, mind az energia, mind a szabadentalpia értékeket tekintve.

### *A kollagén első hidrátburka*

Az egyes vízmegkötő helyek kötési erőssége a következő: ( $\alpha^3$ ), ( $\gamma^2$ ),  $\alpha^2$ ,  $\alpha^1$ ,  $\delta^1$ ,  $\gamma^1$ ,  $\beta^1$ , ( $\beta^3$ ), ( $\beta^2$ ),  $\zeta$  (vagy belső).  $\alpha^3$  a legkedvezőbb, míg  $\beta^2$  a legkedvezőtlenebb kötődési hely a POG-összetételű kollagénen. A  $\zeta$  (vagy belső) víz kötődése bármelyik POG-szerű víznél kedvezőtlenebb. (Ez a vízkötőhely csak akkor jelenik meg, ha az Xxx aminosav nem prolin.)

Megfigyeltük, hogy a vízhidak vízfonalakba szerveződnek a tropokollagén körül. A kollagént alkotó mindegyik fehérjelánc balcsavarodású hélixet alkot, de a belőlük szerveződő tripla hélix jobbsodrású. Mint ahogy azt Orgel és munkatársai leírták, a hét tropokollagén egységből felépülő szál szintén jobbsodrású. Ezért az általunk felfedezett balsodrású vízfonalak jól betöltik a két jobbsodrású szint közötti üreget. A csavart köteleknél ez a fajta „ellencsavarás” az, ami a kötél szálai közötti tapadást biztosítja, így érdekes volt ugyanezt felfedezni egy „molekuláris kötélnél”.

A  $\alpha$ ,  $\beta$  és  $\gamma$ -hidakban lévő extra vízmolekulák szerepe többféle lehet. Az „üres” helyek betölthetnek „víz-lyukvezető” szerepet, ami alatt azt értjük, hogy a vízmolekulák felhasználhatják ezeket a pozíciókat amikor a tropokollagén tripla hélixek között áramlanak. Ez lehet a magyarázat arra, hogy Henkelman és munkatársai mérései szerint a kollagénből található vizek áramlása akadálymentes. Másodszor pedig molekuláris „puffer” szerepük lehet, mivel magas víztartalom mellett a molekulák elfoglalhatják ezeket a helyeket, amíg alacsony víztartalom mellett egyszerűen üresen maradnak. Természetesen a maradék vízmolekulák ilyenkor is úgy helyezkednek el, hogy a hidrogén-hidak kialakítása a legkedvezőbb legyen. Így a kollagén szivacs-ként viselkedhet: felvehet, tárolhat és leadhat vizet anélkül, hogy a molekuláris hálózat globális szerkezete megcsúszna.

## Összefoglalás

Fehérjeaggregátumok – plakkok – sokféle szerepet játszhatnak egy állati szervezetben. Az amiloid és a hozzá hasonló aggregátumok szabályozás nélkül képződnek, és sokféle betegség kapcsolható megjelenésükhöz. Az erős kollagén viszont szükséges egy egészséges szervezethez, és a kollagén szálak lebonthatók és felépíthetők a szervezet szüksége szerint.

Különböző fehérjékből képződő plakkok többféle betegséghoz is köthetők. Továbbá sok fehérjéről kiderült, hogy képes plakkot képezni, ha megfelelő körülményeket teremtünk rá. Ezek a plakkok hasonló makroszkopikus szerkezettel rendelkeznek, ezért vélhetőleg ugyanaz a mikroszkopikus elrendeződésük, vagyis  $\beta$ -redőzött réteget alkotnak. Ez felveti a kérdést, hogy miért ilyen stabilak a  $\beta$ -redőzött rétegek. Ennek a megválaszolására egy logikai megfontolást javasoltunk, aminek az alátámasztására megfelelő elméleti számításokat terveztünk. Így az első olyan kutatók között voltunk, akik periodikus számításokat végeztek peptideken.

Eredményeink azt mutatják, hogy egy csak glicint tartalmazó peptid számára a legkedvezőbb egy olyan kétdimenzióban periodikus szerkezet, amelyet már Crick és Rich is leírt, és amelyben az egyes aminosavaknak  $\epsilon_L$  konformációjuk van. A kollagént felépítő aminosavak ugyanilyen  $\epsilon_L$  konformációt vesznek fel. Az alanint tartalmazó peptidnek (mint az oldalláncot rendelkező peptidek modelljének) viszont a  $\beta$ -redőzött rétegek a kedvezőek, mivel ezek a szerkezetek mintegy  $10 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ -al stabilabbak, mint bármely másik forma. Mivel az oldalláncok nem engedik a peptid-gerinceket elég közel kerülni egymáshoz a hidrogénhidak jóval gyengébbek lesznek, ami kialakítja a fenti energiasorrendet. Így azt mondhatjuk, hogy az elméleti számítások logikai feltevésünket, miszerint az oldalláncot tartalmazó peptidek számára az egyedüli lehetséges szerkezet valamiféle  $\beta$ -redőzött réteg. Ezért van, hogy bármely fehérje vagy peptid, amely előtt megnyílik az út egy szorosan pakolt szerkezet létrehozására, amiloid-szerű plakkot hoz létre.

A glicinből felépülő peptidek által preferált szerkezet őrződik meg a kollagén tripla hélixben. Megvizsgáltuk néhány aminosav hatását a tropokollagén stabilitására. Ehhez kvantumkémiailag számításokat alkalmaztunk, amelyekben összehasonlítottuk a kollagén tripla hélix stabilitását a  $\beta$ -redőzött réteg stabilitásával. Így össze tudtuk hasonlítani az aminosavaktól származó különböző hatásokat. Azokra az aminosavakra vagy tripletekre, melyekre létezett kísérleti eredmény, a számítások alapvetően ugyanazt az eredményt adták, mint a mérések. A szarkozin egy olyan aminosav, amely elég nagy koncentrációban található



meg az emberi szervezetben, de nincs a genetikailag kódolt 20 között. Eredményeink szerint a SaSaG triplet jobban elősegíti a tripla hélix képzést, mint akár a POG akár a PPG triplet. Ezért szarkozint tartalmazó mesterségesen szintetizált kollagéneknek a jövőben orvosi vagy kozmetikai alkalmazásai lehetnek.

Számítási eredményeinkből egy egyszerű gondolatmenet következik: a kollagént stabilizáló aminosavaknak csökkenteniük kell azokat a hidrogénhíd-kötési lehetőségeket, amelyek nem a tripla hélix tengelye felé, hanem attól elfele irányulnak. Így a megkötött vízmolekulák szerepe másként is felfogható, mivel ezek azok, amelyek hidrogénkötést létesítenek azokkal a maradék karbonilcsoportokkal, amelyek a tripla hélix felé mutatnak.

Meghatároztuk az első hidrátburkot alkotó vízmolekulák kötési energiáit, legjobb tudomásunk szerint az irodalomban először. Számításaink szerint szinergikus hatást lehet felfedezni ezek között a vízmolekulák között, amelyek erős hidrogénkötésekkel vannak összekapcsolva. Továbbá, ezek a vízmolekulák vízfonalakat képeznek a kollgén körül, és így mintegy hálóként körbefonják. (Legjobb tudomásunk szerint ezt a hálózatot mi találtuk meg először.) A tropokollagént ezek a vízhálók védik és kapcsolják őket össze egymással. Ezért elképzelhető, hogy biológiai vagy orvosi alkalmazás (például a csontritkulás csökkentésére) alapulhat azon, hogy ezt az erős vízhálózatot fenntartsuk a tripla hélix körül.

## Kapcsolódó közlemények

1. Palfi, V.K. and A. Perczel, *How stable is a collagen triple helix? An ab initio study on various collagen and beta-sheet forming sequences*. Journal of Computational Chemistry, 2008. **29**(9): p. 1374-86.
2. Perczel, A., P. Hudaky, and V.K. Palfi, *Dead-end street of protein folding: Thermodynamic rationale of amyloid fibril formation*. Journal of the American Chemical Society, 2007. **129**(48): p. 14959-14965.