

# Globuláris szerkezetű fehérjék vizes oldatainak olvadási diagramja és termodinamikai értelmezésük

TOMPA Kálmán,<sup>a,\*</sup> BOKOR Mónika<sup>a</sup> és TOMPA Péter<sup>b,c</sup>

<sup>a</sup>MTA Wigner Fizikai Kutatóközpont Szilárdtestfizikai és Optikai Intézet, Konkoly-Thege út 29-33.,  
1121 Budapest, Magyarország

<sup>b</sup>MTA Természettudományi Kutatóközpont Enzimológiai Intézet, Magyar tudósok körútja 2.,  
1117 Budapest, Magyarország

<sup>c</sup>VIB Department of Structural Biology, Vrije Universiteit Brussel,  
Building E, Pleinlaan 2, 1050 Brussel, Belgium

## Összefoglalás

Dolgozatunkban bemutatjuk a fehérje-víz rendszerek vizsgálatára kidolgozott, mozgékonyág szempontjából kétkomponensű, széles jelű <sup>1</sup>H NMR szabad precessziós jelek felvételi és értékelési módszerét, továbbá az így nyert kísérleti eredményeink termodinamikai értelmezésére általunk bevezetett és alkalmazott eljárás alapvető elemeit. Az eljárásban meghatároztuk a fehérjemolekulához is kötött vízmolekulák mozgását gátló potenciálgátak energiaeloszlását desztillált vizes oldatokban. Továbbá, jól definiált rendparamétereket vezetünk be, és segítségükkel a globuláris/rendezett és az oldószernek nagyobb mértékben kitett/rendezetlen fehérjék molekuláris mozgékonyágon alapuló osztályozására tettünk javaslatot, valamint a rendezett és rendezetlen részek arányaira, és bennük a fehérje-víz potenciálgátak energiaeloszlására nyerhettünk közvetlen mérési eredményeket. Az eljárás használhatóságát négy globuláris szerkezetűnek tekintett standard fehérje, az ubikvitin, a lizozim, a  $\alpha$ -kazein és a szarvasmarha szérum albumin lehűtött és egyensúlyi állapotain keresztül lassan felmelegített vizes oldatán nyert olvadási diagramokat felhasználva mutatjuk be. Referenciának desztillált vizet és vonatkozási pontként az azonos körülmények között mért olvadási diagramját használtuk.

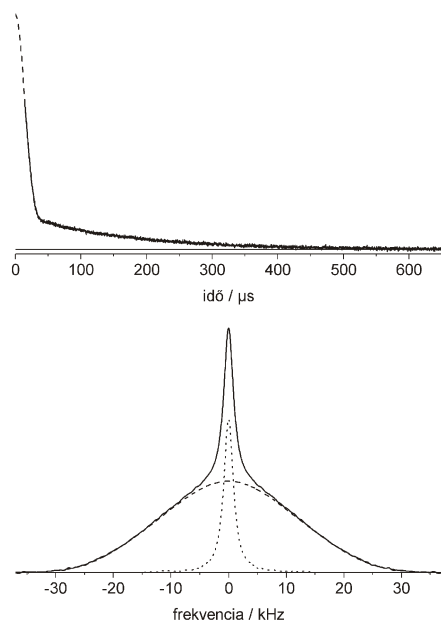
## 1. Bevezetés

A széles jelű <sup>1</sup>H NMR-spektroszkópia általában elfogadott kísérleti módszer a hidrogénatomokat tartalmazó molekulák többnyire röntgen-, és kisebb mértékben neutronszórásos módszerekkel feltárt geometriájának az ellenőrzésére, különös tekintettel a hidrogénatomok elhelyezkedésére. Ugyanakkor az NMR meghatározó módszernek tekinthető a molekulák kondenzált fázisaiban fellépő rotációs-transzlációs (alapvetően nem vibrációs) mozgásainak közvetlen megfigyelésében. A viszonylag gyorsan  $-70$  °C-ig lehűtött, aztán egyensúlyi állapotokon keresztül történő felmelegítés során mért NMR spektrumjellemzők a vizsgált minta molekuláinak mozdulatlan, illetve részben, vagy teljes mértékben mozgékony állapotáról

nyújtanak közvetlen információt. A széles jelű <sup>1</sup>H NMR spektrumból, illetve szabad precessziós (free induction decay, FID) jelből levonható lehetséges következtetéseket korábban összefoglaltuk<sup>1,2</sup>. Irodalmi ismereteink<sup>2,3</sup> alapján határozottan kijelenthetjük, hogy a molekuláris mozgás a széles jelű NMR-spektrum keskenyedésével jár. A jelenség mozgási keskenyedés. Tekintettel arra, hogy széles jelű NMR-vizsgálataink célja a fehérjék, illetve a fehérjét is tartalmazó rendszerek – sztatikus leírason túllépő – termodinamikai jellemzése, így a mozgási keskenyedés megfigyelését használhatjuk célszerűen a legegyszerűbb információforrásként.

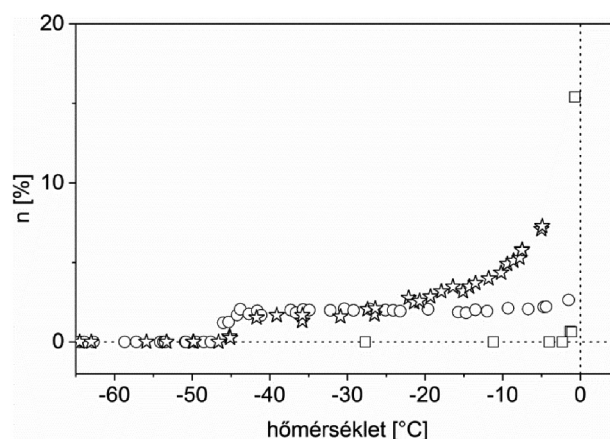
Az NMR-spektroszkópiában alkalmazott rádiófrekvenciás gerjesztések változatait és a kapott válaszokat az adott szűk tématerületet művelő kutatók számára könnyen elérhetővé téve azokat két könyvfejezetbe beírtuk<sup>4,5</sup>. Jelen munkánkban csak a lehető legegyszerűbb, egyetlen 90°-os rádiófrekvenciás pulzussal történő gerjesztéssel foglalkozunk. Az 1. ábrán, felül két különböző mozgékonyágú, hidrogénatommag párokból (proton-proton párokból) álló spinsokaság <sup>1</sup>H NMR szabad precessziós (FID) jelét, és alul annak NMR-spektrumát láthatjuk. Hasonló NMR-jelét és -spektrumot kapunk bizonyos hőmérsékleteken fehérjét és vizet is tartalmazó oldatokon. Az időskálán (felül) és a frekvencia, energia-skálán (alul) bemutatott ábrázolás között matematikailag Fourier-transzformációs kapcsolat áll ugyan fenn, de mégsem felesleges mindkettő felvétele, és információforrásként történő felhasználása. Könnyen hasznosítható információtartalmuk ugyanis különböző. A FID-jel zéró időre extrapolált amplitúdója, így a lassan lecsengő komponensé is, az érintett rezonáns spinek (atommagok) mennyiségéről, a spektrum pedig a protonspinpárok mozgásáról ad közvetlenül mérhető jellemzőket. A mozgás a mágneses dipólus-momentumok egymáshoz viszonyított távolság- és/vagy orientáció-változásában nyilvánul meg. Kétfázisú, vagy a hőmérséklet függvényében azzá váló (például merev és mozgékony spinpárokat is tartalmazó) minta esetén, tehát mindkét jellemzőpárról nyerünk alapvető mennyiségi és mozgékonyági adatokat.

\* tel.: +36 1 392 2213, e-mail: tompa.kalman@wigner.mta.hu



1. Ábra.  $^1\text{H}$  NMR szabad precessziós jel, FID (felül) és spektruma (alul), mozgékonyág szempontból kétfázisú spinrendszeren. (A gyorsan lecsengő FID-komponens szaggatott vonallal jelzett, a holt idő miatt elvesző része – mivel a lassan lecsengő részre fordítjuk figyelmünket –, most csak jóval kisebb gondot okoz).

Sokan kételkednek abban, hogy egy ilyen, egyszerűnek tűnő mérés ad-e, adhat-e valami lényegesen újat olyan bonyolult rendszerről, mint például a fehérjemolekula és vizes környezete. Az igenlő válasz megfogalmazásához a lassan lecsengő FID-komponens két jellemzőjének (a  $t = 0$ -ra extrapolált FID-amplitúdónak és a mozgásjellemző spektrumkomponensnek) viszonylag széles hőmérséklet-tartományban történő független mérését hívtuk segítségül. Jelen munkánkban tehát a lassan lecsengő komponens amplitúdója, és annak hőmérsékletfüggése szolgál primer információforrásként. A  $90^\circ$ -os rádiófrekvenciás gerjesztő pulzusra adott válasz amplitúdója ugyanis arányos az  $M_0 nB_0/T$ , egyensúlyi nukleáris mágneszettséggel. Az összefüggésben  $B_0$  az állandó mágneses indukció,  $T$  az abszolút hőmérséklet, és  $n$  a rezonanciában résztvevő magok (itt a protonok) száma. Tehát  $n$  relatív skálán közvetlenül mérhető, és ismert protonszámú minta azonos körülmények között mért hasonló adatával összevetve, tényleges értéke meghatározható. Abból a (ma már bizonyított) munkahipotézisből indultunk ugyanis ki, hogy a lassan lecsengő komponens azoktól a vízmolekuláktól (a bennük levő protonoktól) származik, amelyek fehérjemolekulákhoz is kötődnek, tehát az elfogadott terminológia szerint ezek a fehérjéhez kötött vízmolekulák<sup>6</sup>. Kísérleteinkben tehát a fehérjemolekulák felületén lévő vízmolekulák mozgásának, feltehetően forgásának, a megindulását és hőmérsékletfüggését, vagyis olvadási diagramját vesszük fel széles jelű  $^1\text{H}$  NMR-módszerrel, az NMR-spektrum mozgási keskenyedése alapján. 2. ábránkon három jellegzetes anyag olvadási diagramját mutatjuk be, azaz a mozgó vízmolekulák  $n$  számát  $^\circ\text{C}$  skálán. A tiszta vizét (négyzetek), egy tipikus globuláris standardnak tekintett fehérjeoldatát (körök), és egy rendezetlennek tekintett fehérjeoldatát (csillagok). A rendezetlen fehérjék (IDPs, intrinsically disordered proteins) natív, funkcionális állapotukban sem rendelkeznek jól definiált térszerkezettel.



2. Ábra. Olvadási diagram (MD) desztillált vízben (négyzet), globuláris/rendezett ubikvitin (kör) és rendezetlen ERD10 fehérje (csillag) desztillált vizes oldatán.

A problémához méltó kérdések egész sorát lehet feltenni velük kapcsolatban, például hányan vannak, milyen erővel kötődnek a fehérjékhez; ez a kötődés gyengébb vagy erősebb-e mint a szomszédos vízmolekulákhoz való kötődés, stb. Természetes továbbá, a gyorsan lecsengő komponenssel kapcsolatos hasonló kérdések sora is, amelyek annak eredetére és viselkedésére vonatkoznak. Hivatkozott munkáinkban<sup>1,2</sup> érintettük ezt a kérdést.

Korábban megjelent cikkeinkben<sup>7-10</sup> részletesen foglalkoztunk vízben és pufferelt vizes oldószerben oldott globuláris és rendezetlen fehérjék vizsgálatával, valamint a mérési eredmények részbeni értelmezésével. Példaképpen megemlítünk néhányat a vizsgált fehérjék közül, ubikvitin (UBQ), szarvasmarha szérumalbumin (BSA, bovine serum albumin), -szinuklein és pontmutánsai, kalpasztatin, -kazein. Folyamatban van az MTA-ELTE Fehérjemodellező Kutatócsoportjával és a Szerkezeti Kémia és Biológia Laboratóriummal triptofánkalitka típusú minifehérjék, és az MTA Korea Research Council-lel való együtt-működésben vizsgált fehérjék, pl. p53 TAD tanulmányozása.

Azokban a lassú lecsengésű,  $t = 0$ -ra extrapolált FID-amplitúdó hőmérsékletfüggését olvadási diagram formájában mutattuk be. Amint az a 2. ábrán is látható, a heterogén rendszerek (ilyenek a vizsgált oldataink mind) molekuláris léptékű olvadása eltér a homogén anyag elsődrendű fázisátalakulására jellemző viselkedésétől, mint amilyen pl. a jég egyetlen hőmérsékleten történő olvadása. Oldataink esetén az olvadás értelmezése szélesebb körű. Olvadásnak tekintjük a heterogén összetételű minta egyik komponensének (pl. kötött víz), vagy magas szimmetriájú molekularészének (pl.  $-\text{CH}_3$ , vagy más végcsoportok) mozgásának a megindulását. Olvadásként észleljük továbbá a lehetséges translációs és rotációs molekuláris mozgások akár csak egyikének a megindulását is. Esetünkben ezek a mozgásindulások hőmérsékleti eloszlást mutatnak, és az eloszlást leíró olvadási diagramok összekapcsolják az NMR-rel megfigyelhető atomi, molekuláris mozgásokat, és a jól definiált, közvetlenül mérhető NMR-jellemzőket. Így azok a molekuláris mozgásokról és a rendszerben fellépő

kölcsönhatásokról adnak közvetlen, molekuláris szintű termodinamikai információt. Az olvadási diagramokból idézett munkáinkban<sup>7-10</sup> megjelenésükkor csak kvalitatív következtetéseket vontunk, vonhattunk le.

Ezek a következők voltak. Vizes oldatokban az olvadás, pontosabban a molekuláris mozgások megindulása, közöttük a fehérjemolekulákhoz is kötött vízmolekulák NMR-rel látható mozgása (lényegesen) alacsonyabb hőmérsékleten kezdődik, mint a jég elsőrendű fázisátalakulásának a hőmérséklete, vagyis 0 °C. Minden egyes fehérjeoldatnak termodinamikai jellemzőkön alapuló egyéni olvadási diagramja (egyéni arca) van. A globuláris/rendezett, illetve az IDP/rendezetlen molekulák olvadási diagramjuk (a továbbiakban *MD*, melting diagram) alapján két, markánsan megkülönböztethető karakterű, részben hőmérséklettől független FID-amplitúdóval, azaz platóval rendelkező, illetve plató nélküli csoportba sorolhatók.

## 2. Olvadási diagramok új formában és értelmezésben

Mérési eredményeink bemutatásának és értelmezésének jó néhány kérdésében cikkeink<sup>7-10</sup> megjelenése óta lényegesen előbbre jutottunk<sup>11-12</sup>. Felismertük, hogy a fehérjéhez is kötött vízmolekulákban lévő hidrogén atommagok (protonok) a vizsgált minta szerves részét képező (és nem a szórás kísérletekben szereplő nagyenergiájú protonnyalábként) mágneses dipólus szondákként térképezik fel a fehérjemolekulák potenciálfelületét. Megtett lépéseinket cikkünk<sup>11</sup> 4-6. fejezetében részben leírtuk, és itt kiegészítve, valamint potenciális felhasználók számára rendezve, könnyen érthetővé és használhatóvá téve azokat – hazai folyóiratunkban – bemutatjuk.

Mérési eredményeink értelmezéséhez a klasszikus irodalmat felhasználva, segítségül hívtuk – e területen elsőként – C. Kittel és H. Kroemer nyomán<sup>13</sup> a hőmérséklet energiaegységekben mérő, fundamentális hőmérséklet ( $T_f$ ), valamint ezen a területen új elemként bevezettük az adott molekuláris mozgás megindulási hőmérsékletét és a szükséges termikus gerjesztési energiát ( $E_a \sim T$ ) összekapcsoló J. S. Wough és E. I. Fedin<sup>14</sup> által javasolt formalizmust (dimenziók tekintetében kijavítva és fundamentális hőmérsékletskálát használva).

### 2.1. Az értelmezés elemei részletesen

a) Javasoltuk a fundamentális hőmérsékletskála ( $T_f$ ) használatát, valamint annak a jég olvadáspontjára normált változatát ( $T_{fn}$ ). Definíciószerűen  $T_f = k_B T$  alakban írható, ahol  $k_B = 1,381 \cdot 10^{-16}$  erg/K ( $1,381 \cdot 10^{-23}$  J/K) a Boltzmann állandó,  $T$  pedig az abszolút hőmérséklet. Moláris anyagmennyiségekben gondolkodva a  $T_f = RT$  összefüggés használható, ahol  $R = 8,317$  J/(mol·K), az univerzális gázállandó. Amennyiben dimenzió nélküli skálát szeretnénk, úgy  $T_{fn}$  normált fundamentális hőmérséklet használata célszerű, mégpedig a tömbi jég olvadáspontjára normálva, azaz  $T_{fn} = RT/(R \cdot 273,15) = T/273,15$ . Ezek alapján lehetővé válik tehát a molekuláris mozgások megindulásának  $T_f$  energiaskálán történő jellemzése.

b) Következő lépésként segítségül hívtuk a J. S. Wough és E. I. Fedin által javasolt formalizmust<sup>14</sup>, és alkalmaztuk vizes oldatokra, dimenziók tekintetében kijavított alakban,  $T_f$  fundamentális hőmérsékletskálát használva.

A javasolt és használt összefüggés atomi, molekuláris szinten

$$E_a [\text{erg}] \quad c T_f [\text{erg}], \quad (1, a)$$

vagy mólnyi mennyiségre alkalmazva

$$E_a [\text{kJ/mol}] \quad c T_f [\text{kJ/mol}]. \quad (1, b)$$

Az összefüggésekben  $c$  dimenzió nélküli mennyiség, vagyis szám. Értékét úgy határoztuk meg, hogy az (1,b) összefüggést a tömbi (bulk) jég olvadására alkalmaztuk, és felhasználtuk a jég olvadáshőjét, amit régóta ismerünk. Értéke 6,01 kJ/mol (1,435 kcal/mol)<sup>15,16</sup>. A  $T = 273,15$  K-nel ekvivalens fundamentális hőmérséklete pedig  $T_f = RT = 2,272$  kJ/mol. Az (1,b) összefüggés alapján az arányossági tényező  $c = 2,65!$

Az (1,a) egyenletünket összevetve az ekvipartíció tétel egy szabadsági fokra jutó  $1/2 k_B T$  összefüggésével, úgy a vízmolekula  $2c=5,3$  szabadsági fokú mozgására következtethetünk, ami egy elektromos dipólus vízmolekula forgómozgása esetén nem tűnik abszurdumnak, és figyelmeztet, hogy a szórás módszerek keV-os, MeV-os energiája sok nagyságrenddel felette van az itteni  $6 \cdot 10^2$  eV-os termikus gerjesztési energiaszintnek.

c) Bevezettünk továbbá a fehérjemolekulák rendezett/rendezetlen állapotának kvantitatív jellemzésére vonatkozó, a sztatikus szerkezeti leírás túlmutató termodinamikai jellemzőket (**rendparamétereket**).

Heterogenitás Arány, *HeR*. Tapasztalataink<sup>7-11</sup> és az ott idézett irodalom szerint a fehérjemolekulák vízkötési energiaeloszlásuk homogenitása/heterogenitása alapján jellemezhetők, és osztályozhatók! Az osztályozás alapjául a heterogenitási arány mérésére általunk javasolt összefüggés

$$HeR = (1 - T_{fne}) / (1 - T_{fno}), \quad (2)$$

ahol  $(1 - T_{fne})$  és  $(1 - T_{fno})$  a tömbi jég olvadáspontjától mért távolságokat adnak meg a normált fundamentális hőmérsékletskálán. (A 3. és 4. ábrák megtekintése segít az eligazodásban.) Ezek az értékek az olvadási diagramokról közvetlenül leolvashatók.  $T_{fno}$  az *MD* hőmérséklettől független részének, a platónak a kezdetét, illetve  $T_{fne}$  annak a magas hőmérsékleti végét jelenti. *HeR* értéke 1 (egy) heterogén kötésű (plató nélküli) rendszerekre. Értéke 0 (zéró) homogén kötésű rendszerekre (pl. a víz), 0-1 közötti értéket mutat a részben heterogén kötésű rendszerekre (tényleges értékeket a példaként vizsgált oldatokra az 1. táblázatban adunk meg). *HeR* tehát arra ad rendparaméter tulajdonságú felvilágosítást, hogy a fehérjemolekula felülete vízkötés szempontból milyen mértékben tekinthető heterogénnek (rendezetlennek), illetve, hogy mennyiben nem. Hangsúlyoznunk kell, hogy ez az összefüggés a lehetséges két energiatartomány kiterjedésének

összehasonlítása alapján, és nem a bennük megvalósuló tényleges fehérje-víz kötések száma alapján méri a heterogenitás arányát. A heterogenitás, illetve homogenitás mind a vonatkozó potenciál jellegében, nagyságában, mind annak távolságfüggésében jelentkezhet<sup>16-18</sup>.

Finomítható a vízkötések (potenciálgátak) homogenitására, heterogenitásának mértékére vonatkozó kijelentésünk; amennyiben azt a kérdést is feltesszük, hogy a kérdéses energiatartományban ténylegesen mennyi a fehérje-víz kötések száma. A heterogenitás arányára a tényleges kötőszámok alapján javasolt második összefüggés

$$HeR_n = n_{he}/(n_{he} + n_{ho}), \quad (3)$$

ahol  $n_{ho}$  az első hidráthéjban,  $n_{he}$  pedig a heterogén tartományban mért összes fehérje-víz kötés száma. Az összefüggésben szereplő számok  $MD$  alapján közvetlenül is mérhetők.  $n_{ho}$  nagy pontossággal a platonon mért összes  $n$  pont átlagaként kapható meg,  $(n_{he} + n_{ho})$  pedig közelítőleg (alsóhatár becslésként) a legmagasabb,  $T_{fn} = 1$ -hez közeli ( $T_{fn} = 0,995$  hőmérsékleten) megbízhatóan mért  $n$  érték alapján.

d) A bevezetett normált fundamentális hőmérsékletskála alapján lehetővé válik például hatvány függvénnyel való közelítés, nevezetesen az alábbi sor alkalmazása.

$$n = A + B(T_{fn} - T_{fn1}) + C(T_{fn} - T_{fn2})^2 + \dots \quad (4)$$

Így, a (4) összefüggés segítségével az olvadási diagramot,  $MD$ -t, azaz az összes mozgó vízmolekula szám termikus gerjesztési energiától való függését analitikusan írhatjuk le. Az összefüggésben (a további ki nem írt tagokat illetően is)  $T_{fnx}$  illesztési paraméter, alsó indexében  $x$  a zárójel kitevőjével azonos. Az összefüggés jelen formája egyben figyelem felhívás is az egyes tagok meghatározott hőmérséklettartományban való érvényességére. Továbbá, tartományonként megadhatjuk  $MD$  változását a normált fundamentális hőmérséklettel, azaz  $n/T_{fn}$  differenciáhányadost,  $DMD$ -t,

$$n/T_{fn} = B + 2C(T_{fn} - T_{fn2}) + \dots, \quad (5)$$

tehát az adott hőmérsékleten éppen megmozduló vízmolekulák számát. Hangsúlyoznunk kell, hogy az összefüggésekben minden mennyiség, így az együtthatók is dimenzió nélküli mennyiségek: számok, tehát matematikai műveletek alkalmas szereplői.

Heterogenitás Mértéke,  $HeM$ . A második rendparaméter jelegű mennyiség, amit említettünk,

$$HeM = (B + 2C)/(1 - T_{fne}). \quad (6)$$

Megjegyezzük, hogy ez az összefüggés is rendben van dimenziók tekintetében, és  $HeM$ , illetve  $B + 2C$  értékét illetően szükségünk van az illesztés eredményeire.  $HeM$  értéke pozitív szám, a kvázi ekvipotenciális molekulafelületű (kb. gömb alakú!) fehérjékre értéke zéró.  $HeM$  tehát rendparaméter jellegű mennyiségnek tekinthető. A nevező,  $(1 - T_{fne})$  azt az energiatartományt jelöli ki, ahol a

hőmérséklettel változó nagyságú (heterogén potenciáeloszlású) fehérje-víz kötések vannak,  $B + 2C + \dots$  pedig a két tartományban előforduló kötések számának a növekedési sebessége. A tört így a  $DMD$  függvény meredeksége, iránytangense. Fehérjékre vonatkozó értékei nem szoríthatók a 0-1 tartományba, mint ahogy a tangensfüggvény sem. A nem teljesen heterogén kötésfelületű fehérjék esetén, mint amilyenek a tapasztalat szerint a globuláris fehérjék, így a példánk is,  $HeM$  értéke értelemszerűen a plató feletti tartományra vonatkozik.

A legegyszerűbb esetekben (ide tartoznak eddigi tapasztalataink szerint a tiszta vizes oldatok), a heterogén tartományba eső fehérje-víz kötések mennyisége az illesztési tagok számától függően a következő lehet:  $B(1 - T_{fne})$ , illetve  $2C(1 - T_{fne})$ , ha mindkettő, akkor a két tag összege. Leegyszerűsítve a fehérje-víz kötések számának (makroszkopikusan a hidratáció mértékének) a meghatározását, azt a  $DMD$  diagramról közvetlenül leolvasható síkidomok, az ábrákon beszínezett területek összege (elméletben a  $T_{fne}$ -től  $T_{fn} = 0,995$ -ig terjedő tartományra vett határozott integráloknak az értéke), illetve azok összege adja.

Amint (3) összefüggésünkkel kapcsolatban említettük,  $n_{ho}$  nagy pontossággal  $n_{he}$  pedig alsó határ becslésként  $MD$ -ből közvetlenül is leolvashatók. Részletekről a példánkban lesz majd szó; itt pedig lehetőséget nyújtanak a matematikai műveletek ellenőrzésére, mert a vonatkozó illesztési paramétereknek meg kell egyeznie az  $MD$  alapján leolvasottakkal. Az eljárás így önellenőrzési lehetőséget tartalmaz és így javul az adatok megbízhatósága.

Az analitikusan leírható  $MD$  függvény derivált alakjának,  $DMD$ -nek a meghatározása lehetővé teszi a fehérjemolekulához is kötött vízmolekulák mozgását gátló potenciálgátak energiaeloszlásának egyedüli és egyedi feltérképezését. Az olvadási diagramok értelmezéshez szükséges elemeket felhasználva jelen munkánk célkitűzése egyszerűen megfogalmazható. Nevezetesen, mérési eredményeink mélyebb, termodinamikai értelmezése. A példák, melyeket bemutatunk a sokak által vizsgált és globuláris standardnak tekinthető UBQ, a lizozim, a -kazein és a BSA fehérjék vizes oldatai.

### 3. A mintafehérjék és a rajtuk kapott eredmények

A kisméretű UBQ molekula, 76 aminosavból áll, központi szerepet játszik abban, hogy a sejtek vezéreljék azon saját fehérjéik megsemmisítését, amelyekre már nincs szükségük. Az UBQ molekula a feleslegessé vált fehérjékhez kapcsolódik, és jelzi a sejtnak, hogy ezek a megjelölt fehérjék szétbonthatók. Az UBQ megtalálható minden eukarióta sejtben, szerte a testben.

A lizozim fontos szerepet játszik az immunrendszer működésében, elsősorban a szervezet „kapuinál” (száj, szem, orr). Megtalálható a könnyben, a nyálban, a verejtékben, az anyatejben, az orrváladékban és a gyomornedvben egyaránt. Egyes növényekben (pl. torma) is előfordul. Az emlősök lizozimjai csak kis mértékben különböznek egymástól, mindegyikük 129 aminosavból felépülő polipeptid.

A tehéntej négyféle kazeint tartalmaz, közöttük a  $\beta$ -kazein a második leggyakoribb fehérje, 209 aminosavból áll, a micellaképződésben érintett, és fontos biológiai aktivitást mutat az immun-, szív- és ér-, gyomor-bél-, és a központi idegrendszerben. A  $\beta$ -kazein a tej teljes fehérjetartalmának 27%-át adja.

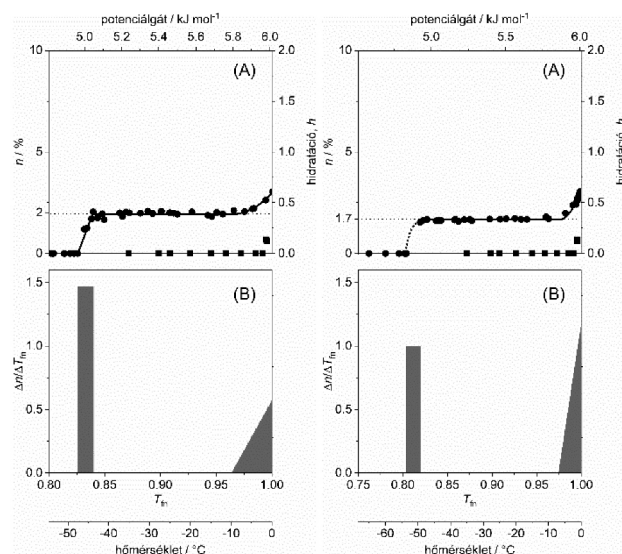
Szérumalbuminból, így szarvasmarha szérumalbuminból (BSA) is a legnagyobb mennyiség a vérplazmában van. Nagy molekula, 607 aminosav alkotja. A zsírsavakat szállítja a vérben, és sok más vízben oldhatatlan molekulát is meg tud kötni. Sok gyógyszermolekulához is kötődik, mint pl. az ibuprofenhez, és erőteljesen befolyásolja a testben történő szállításukat.

Mind a négy molekulát széleskörűen használják nem specifikus fehérjeként tudományos kutatások modellanyagaként.

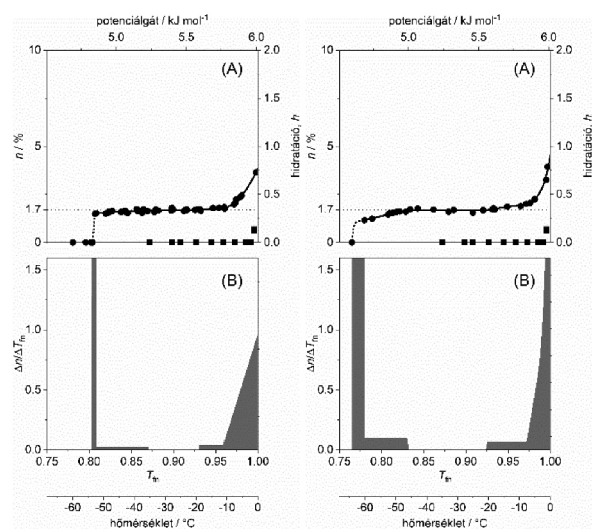
A 3. és 4. ábrán az (A) részekben tiszta vízben oldott fehérjéken mért  $MD$ -ket, a hozzá referenciának használt tiszta vízben mért hasonló görbéket, a (B) részekben pedig a fehérje oldatokra vonatkozó derivált görbéket ( $DMD$ ) mutatjuk be. Mérési eredményeink eredete UBQ esetén publikációnk<sup>7</sup>, illetve lizozim,  $\beta$ -kazein és BSA esetén pedig saját, csak konferencia kiadványokban bemutatott eredményeink. A mérőberendezésre és a mérés részleteire vonatkozó információk említett cikkünkben, és könyvfejezetekben<sup>4,5</sup> találhatóak.

Konkrét kísérleteink jellemzését két lényeges sajátság megemlítésével kívánjuk kiegészíteni. Méréseink zárt mintatérben, termodinamikailag állandó térfogatban történtek, tehát melegítés során a hőközléshez nem kapcsolható térfogati munkavégzés. (A jég olvadása – egyébként is, anomális módon – térfogatcsökkenéssel jár.) A második jellegzetesség, hogy méréseink nagy része még akkor történt, amikor az értelmezés általunk bevezetett új módszerében támasztott magas követelmények még nem merülhettek fel. Ezzel magyarázható a mérési pontokban helyenként mutatkozó egyenetlen sűrűség. Ez a hiányosság levont következtetéseinket azonban nem befolyásolja.

A 3. ábrán két fehérje, az UBQ (baloldal) és a  $\beta$ -kazein (jobboldal) vizes oldatán mért eredményeket mutatjuk be. A 4. ábrán a másik két molekula (baloldal lizozim, jobboldal szarvasmarha szérumalbumin) vizes oldatán mért eredményeket láthatjuk. A fejezet végén az 1. táblázatban együtt mutatjuk be mind a négy molekula jellemző tulajdonságait.



**3. Ábra.** Kétszer desztillált vízben oldott UBQ és  $\beta$ -kazein fehérje olvadási diagramja ( $MD$ ) (fekete körök) és a lefagyasztott oldószer, desztillált víz hasonló körülmények között felvett olvadási görbéje (fekete négyzetek) látható az ábra (A) részein. A baloldali ábra az UBQ-en, jobboldali ábra a lizozimon mért eredményeket mutatja. Mindkét fehérjén, a jobboldali ordinátákon a hagyományos hidratációs értéket is feltüntettük – a cél a makro- és mikro-jellemzők összehasonlítása. A (B) részekben a  $DMD$  görbék láthatók. Az ábrák  $T_m = 0,995 - 1,00$  ( $-2 - 0$  °C) tartományában nincs megbízható mért adat. Az ábrákon az (A) részekben az alsó  $T_m = 0,81-0,84$  közötti részén a mért pontok kis száma és a tartomány nagyon kis szélessége azt sugallja, hogy a tartomány minden  $n$  értékét azonosnak tekintjük, és a (B) részekben a feltehetően normál eloszlást téglalappal közelítjük.



**4. Ábra.** Kétszer desztillált vízben oldott lizozim és BSA fehérje olvadási diagramja ( $MD$ ) (fekete körök), és az oldószer (víz) olvadási görbéje (fekete négyzetek) láthatók az ábrák (A) részein. A (B) részen a  $DMD$  görbéket tüntettük fel. Az ábra  $T_m = 0,995 - 1,00$  ( $-2 - 0$  °C) tartományában nincs megbízható mért adat. A jobboldali ordinátán a hagyományos hidratációs értékeket tüntettük fel. A cél a makro- és mikro-jellemzők összehasonlítása. Az ábrán az alsó  $T_m = 0,77-0,87$  közötti részén a mért pontokat két tartományra oszthatjuk és a derivált ábrázolásban (a 3. ábraszöveg indoklásához hasonlóan) itt két téglalappal közelítjük.

### 3.1. A 3. és 4. (A) ábráról leolvasható információ

A fekete négyszögek a jég-víz fázisátalakulás mikroszkopikus képét mutatják.

Mit várnánk egy végtelen nagyságú (elvileg periodikus határfeltétellel rendelkező) abszolút tisztaságú vízminta esetén, feltéve, hogy minden vízmolekula azonos környezetben, hidrogénkötésekkel kapcsolódik a szomszédjaihoz? Egyetlen, végtelen iránytangensű lépést  $T_{fn} = 1,00$  és  $E_a = 6,01$  kJ/mol gerjesztési energiánál (0,00 °C-on), ahol a tetraédres szimmetriájú környezetben lévő vízmolekula minden kötése egyszerre olvad meg. A végtelen iránytangensű lépés helyett, nem sokkal 0 °C fok alatt ( $T_{fn} = 0,995$  környékén) már mozgó vízmolekulákat detektálunk. Ennek több oka lehet. A mintánk nem végtelen nagy, és a kisméretű minta felületén lévő molekulák környezete és az így a fellépő kölcsönhatások sem azonosak a tömbi környezetben lévő vízmolekuláival. Másodsor, a minta nem abszolút tisztaságú, a szennyezések környezete sem azonos a tiszta környezetben lévőkével. Harmadsor, a minta hőmérsékletét a mérés során  $\pm 0,1$  °C tartományban tudjuk kézben tartani. A mért hőmérsékletek ilyen határozatlansággal értendők, 0 °C környezetében pedig nem tüntettük fel azokat.

### 4. A fehérjék vizes oldataira vonatkozó eredmények

A 3. és 4. ábrán bemutatott olvadási diagramok alapján a globuláris fehérjék olvadása három jól megkülönböztethető tartományra bontható. Az első a legalacsonyabb hőmérsékleten felvett (téli körökkel jelzett) olvadási tartomány (kezdeté  $T_{fns} = 0,78$  BSA estén és  $T_{fns} = 0,83$  UBQ esetén) azt a hőenergia befektetést (termodinamikai jelöléssel  $dQ$ -t) mutatja, ami részben a fehérjéhez is kötött vízmolekulák megmozdításához szükséges. Ez a szűk energiatartomány (UBQ és -kazein esetén  $E_{a,s} = 4,93$ - $5,00$  kJ/mol) az első hidráthéj kötési energiájának kismértékű (lizozim és BSA esetén  $E_{a,s} = 4,69$ - $4,85$  kJ/mol értékű, nagyobb és két szakaszra osztható) heterogenitására jellemző. Ez az UBQ és -kazein estén közel azonos elemekből álló, lizozim és BSA esetén még mindig szűk, de kétkomponensű potenciáltér a lehetséges H-hidak sajátságára emlékeztet<sup>16-18</sup>, és nagymértékben különbözik a modellek szerinti, erősen távolságfüggő (pl. Coulomb-, van der Waals-típusú) potenciáloktól. A tartományban lévő fehérje-víz kötések  $n_{ho}$  számát a platón mért  $n$ -ek átlaga, illetve a (B) részen a vonatkozó alsó energiatartományra eső síkidom(ok) területe (a határozott integrál értéke, téglányösszege) adja. A fehérjékre jellemző különbség a mintafehérjék kémiai összetételétől (elsőrendű szerkezettől) függő sajátság, pontos kimérésük és értelmezésük a H-hidak sajátságairól nyújt majd további lényeges információt.

Növelve a hőmérsékletet, a második szélesebb tartomány, a plató (kiterjedése UBQ esetén  $T_{fno} = 0,83$ -tól  $T_{fne} = 0,96$ -ig, -kazein esetén  $T_{fno} = 0,82$ -tól  $T_{fne} = 0,97$ -ig, lizozim esetén  $T_{fno} = 0,86$ -tól  $T_{fne} = 0,93$ -ig, BSA estén  $T_{fno} = 0,84$ -tól  $T_{fne} =$

$0,93$ -ig tart). Ez az a tartomány, ahol a 3. és 4. ábra (B) részein a  $n/T_{fn}$  értéke 0 (zéró). A plató nagyon lényeges mondanivalót hordoz. Ebben a gerjesztési energiatartományban  $n$  nem változik, tehát nem mozdulnak meg újabb vízmolekulák, mert nem léteznek olyan vízmolekulák, amelyek ekkora energiával kötődnek a fehérjéhez (hidrofób hatás<sup>16</sup>). Feltételezzük, hogy az eredetileg itt lévő H-hidak kötik gombolyaggá (feltekeredetté) a fehérjemolekula globuláris/rendezett részét. A tartományban befektetett hő ( $dQ$ ) belső energia növelésre ( $dU$ ), a már forgó vízmolekulák forgássebességének növelésére fordítódik, amint azt az UBQ-en végzett DSC méréseket is tartalmazó munkánkban<sup>7</sup> valószínűsítettük.

Tovább növelve a hőmérsékletet  $T_{fne}$ -hez, vagyis a plató végéhez érünk. Itt kezdődik a harmadik energiatartomány, ahol a víz-víz és a fehérje-víz kötések eredője közelít a tiszta vízben lévő értékhez, feltehetően a fehérjemolekula víznek jobban kitett részein. Mérhető kiterjedése UBQ esetén  $T_{fne} = 0,96$ -tól  $T_{fn} = 0,995$ -ig és BSA esetén  $T_{fne} = 0,93$ -tól  $T_{fn} = 0,995$ -ig tart. A felső határhoz tartozó gerjesztési energia érték 5,98 kJ/mol, az alsó határok  $T_{fne}$  alapján UBQ esetén 5,77 kJ/mol, BSA esetén pedig 5,57 kJ/mol (a további két vizsgált fehérje jellemzői az 1. táblázatban található). Itt  $n$  hőmérsékletfüggését a hatványfüggvény magasabb kitevőjű tagjaival tudjuk leírni. A heterogén kötési tartomány termodinamikai értelmezése lényegesen különbözik a platóval kapcsolatban mondottaktól. Először is  $n$ , a fehérjéhez kötött víz mennyisége (amit itt mi közvetlenül megmérünk) a melegítés következtében folytonosan növekszik. Ennek megfelelően változik a már megolvadt kötött víz térfogata,  $dV$  változik (termodinamikában elfogadott jelöléssel) a rendszert jellemző entrópia,  $dS$ , és entalpia,  $dH$ , valamint az összes többi állapotfüggvény ( $dF$ : szabadenergia,  $dG$ : szabadentalpia, és változik a kémiai potenciált,  $\mu$ -t tartalmazó  $dn \cdot \mu$  tag) is. A részleteket illetően Nagy Károly könyvére, különösen annak 10. és 11. fejezetére utalunk<sup>19</sup>. A többváltozós függés az itt levont következtetéseinket nem befolyásolja, (mert a  $dU$  belső energia változását, a molekuláris mozgás létezését az NMR jel lassan lecsengő komponense közvetlenül bizonyítja, és sajátságait meghatározza). Határozottan felhívja viszont a figyelmet a nagymértékben rendezetlen, valamint a puffertelt oldatok rendezetlenségének/heterogenitásának az értelmezésével kapcsolatos gondokra. Ezeknél a fehérjéknél a heterogén tartományban kötött vízmolekulák kötéseiben a szomszédos vízmolekulákkal és nem a fehérjével való kötések kapnak nagyobb hangsúlyt, valamint a van der Waals-típusú kötések egyéb változatai<sup>16-18,20</sup>. Nagyszámú fehérje és aminosav vizes oldatain végzett mérés (hangsúlyozottan az NMR relaxációs idők mérési) eredményének az elemzése vezethet csak a fellépő kötések természetének mélyebb feltérképezéséhez.

Minden adat rendelkezésünkre áll, így a 3. és 4. ábráról leolvasható jellemzőket, és az általunk bevezetett rendparamétereket az 1. táblázatban összefoglalhatjuk.

**1. Táblázat.** A vizsgált fehérjék olvadási diagramjának jellemzői.  $T_{\text{ins}}$ : a molekuláris mozgás indulása,  $T_{\text{ino}}$ : a plató kezdete,  $T_{\text{inc}}$ : a plató vége,  $HeR$ : az első, valamint a többi hidráthéj olvadáspontjának arányán alapuló heterogenitási arány,  $n_{\text{ho}}$ : homogénen kötött vízmolekulák száma,  $n_{\text{he}}$ : heterogénen kötött vízmolekulák száma,  $HeR_n$ : a hidráthéjak nagyságán alapuló heterogenitási arány,  $HeM$ : heterogenitási mértéke.

Protein	$T_{\text{ins}}$	$T_{\text{ino}}$	$T_{\text{inc}}$	$n_{\text{ho}}^b$	$HeR$	$n_{\text{he}}^{b,c}$	$HeR_n^c$	$HeM^c$
UBQ	0,82	0,83	0,96	226(3) <sup>a</sup>	0,23(1)	>102(33)	≈0,3	≈241
lizozim	0,81	0,86	0,93	267(2)	0,49(9)	>272(26)	≈0,50	≈317
β-kazein	0,82	0,82	0,97	433(3)	0,142(5)	>249(25)	≈0,56	≈1828
BSA	0,78	0,83	0,93	1290(17)	0,46(3)	>1345(46 8)	≈0,51	≈10 <sup>5</sup>

<sup>a</sup> a zárójelbe tett szám a mérési hiba az utolsó szám nagyságrendjében, az első három oszlopban értéke 0,005

<sup>b</sup> mol H<sub>2</sub>O/mol fehérje

<sup>c</sup> az adatok alsó határ becslés eredményei

Első közelítésben, a rendezetlen gerjesztési energiatartományok szélessége alapján kijelenthetjük, hogy globuláris molekuláink bizonyos, konkrétan 14-49% mértékben rendezetlenek.

A kvázi homogén kötési energiatartományban, más szóval az első hidráthéjban a fehérje-víz kötések  $n_{\text{ho}}$  (platón is ellenőrzött!) mért számának a realitását többre értékelhetjük, ha azokat összehasonlítjuk a fehérjét felépítő aminosavak hidratációjára vonatkozó klasszikus ismeretekkel<sup>21-23</sup>.

UBQ esetén az első hidráthéjban a közel azonos energiával kötött vízmolekulák száma közvetlen mérésünk szerint  $n_{\text{ho}} = 226(3)$ . A heterogén kötések tartományában alsó határként további  $n_{\text{he}} = 77(33)$  kötött vízmolekulával számolhatunk. A kettő összege 303(33), az egy fehérje molekulára jutó kötött vízmolekulák mért száma. Összeadva az UBQ molekula lehetséges elméleti H-hídjainak számát<sup>21-23</sup>, úgy 444 adódik. Ez a szám az összes mért kötött víz számához esik közel.

-kazein esetén az első hidráthéjban a közel azonos energiával kötött vízmolekulák száma közvetlen mérésünk szerint  $n_{\text{ho}} = 433(3)$ . A heterogén kötések tartományában alsó határként további  $n_{\text{he}} = 388(25)$  kötött vízmolekulával számolhatunk. A kettő összege 821(25) az egy fehérje molekulára jutó kötött vízmolekulák mért száma. Összeadva a -kazein molekula lehetséges elméleti H-hídjainak számát<sup>21-23</sup> úgy 539 adódik. Ez a szám láthatóan az  $n_{\text{ho}} = 433(3)$  mért értékhez esik közelebb, és nem az összes kötött vízmolekula számához.

Lizozim esetén az első hidráthéjban a közel azonos energiával kötött vízmolekulák száma közvetlen mérésünk szerint  $n_{\text{ho}} = 267(2)$ . A heterogén kötések tartományában alsó határként további  $n_{\text{he}} = 272(26)$  kötött vízmolekulával számolhatunk. A kettő összege 539(26), az egy fehérje molekulára jutó kötött vízmolekulák mért száma. Összeadva az lizozim molekula lehetséges elméleti H-hídjainak számát<sup>20-22</sup> úgy 810 adódik. Ez a szám az összes mért kötött víz számához esik közel.

BSA esetén az első hidráthéjban a közel azonos energiával kötött vízmolekulák száma közvetlen mérésünk szerint  $n_{\text{ho}} = 1290(17)$ . A heterogén kötések tartományában alsó határként további  $n_{\text{he}} = 2000(150)$  kötött vízmolekulával számolhatunk. A kettő összege 3290(167) az egy fehérje molekulára jutó kötött vízmolekulák mért száma. Összeadva az BSA molekula lehetséges elméleti H-hídjainak számát<sup>21-23</sup> úgy 1725 adódik. Ez a szám az  $n_{\text{he}} = 2000(150)$  mért értékhez esik közelebb, és nem az összes kötött vízmolekula számához.

A lehetséges elméleti értékeket a mért értékekkel való összehasonlítás végett közöltük, a hasonlóságokból és az eltérésekből következtetést most nem kívánunk levonni.

Hangsúlyoznunk kell viszont, hogy a táblázat első négy oszlopában közvetlenül mért értékek szerepelnek, és a rendezettség/rendezetlenség arányára, az általunk bevezetett rendparaméterek számszerű értéket adnak. Az egy aminosavra jutó közvetlenül (első szomszédként) kötött vízmolekula-szám ( $n_{\text{ho}}$ /aminosav-szám) UBQ esetén 226/76  $\cong 3$ , lizozim esetén 267/129  $\cong 2$ , -kazein esetén 433/209  $\cong 2$  valamint 1290/607  $\cong 2$  BSA-nál. Az  $n_{\text{ho}}$ /aminosav számok egész számokkal való azonosság (≅ 2, és 3), illetve UBQ esetén a többiekétől való markáns eltérése (≅ 3) elgondolkodtat és további, a molekulák nagyságával, aminosav-összetételével és jellemzőivel kapcsolatos kérdés feltevését sugallja.

## 5. Rövid összefoglalás és kitekintés

Korábbi mérési eredményeinket újraértelmezve meghatároztuk a fehérjemolekulához is kötött vízmolekulák mozgását gátló potenciálgátak energieloszlását négy standard globuláris szerkezetűnek tekintett – UBQ, lizozim, α-kazein, és BSA – fehérje lehűtött és egyensúlyi állapotain keresztül lassan felmelegített tiszta vizes oldatán. A globuláris/rendezett és az oldószernek nagyobb mértékben kitétt/rendezetlen fehérjemolekula-részek arányaira és az utóbbi mértékére, valamint a vízmolekulák mozgását gátló potenciálgátak energiaviszonyaira vonhattunk le kvantitatív következtetéseket. Valószínűsítettük a H-hidak első hidrát héj kialakításában játszott domináns szerepét. A bemutatott fehérjék vízkötési tulajdonságainak a feltérképezése távolról

sem az egyedüli területe az eljárás alkalmazhatóságának. Megemlítünk néhány további lehetőséget erre, például a NaCl-ot is tartalmazó standard puffertelt oldószer fehérjemolekula-tulajdonságokra gyakorolt hatásának a meghatározását. A NaCl-ot tartalmazó puffer hatását a vízzel-érintkező felület megváltozásán keresztül detektáljuk. A változás olyan irányú, ami az elfogadott terminológia szerint rendezetlenebbé teszi a molekulákat. Megnöveli a víz (feltehetően még ezenkívül más kismolekulák) számára a hozzáférhető molekulafelület nagyságát.

Az eljárás nyújtotta további lehetőségek például a molekulák közötti kölcsönhatás, makromolekulák és aggregátumok, valamint magasabb rendű struktúrák kialakulásának gyors roncsolásmentes mérése, továbbá szilárd fázisú minták (pl. gyógyszerek) nedvesség-tartalmának a meghatározása.

### Köszönetnyilvánítás

E helyen is köszönetünket fejezzük ki mindazoknak, akik a felsorolt publikációinkban társszerzőként munkánkban részt vettek, továbbá azon intézményeknek, itthon és külföldön, amelyek azt támogatták.

### Hivatkozások

1. Tompa, K.; Bokor, M.; Han, K.-H.; Tompa, P. *Intrinsically Disordered Proteins* 2013, *1*, 77–86. <https://doi.org/10.4161/idp.25767>
2. Grüner, Gy.; Tompa, K. *Kémiai Közlemények*, **1968**, *30*, 315–356.
3. Slichter C. P. *Principles of magnetic resonance*. Springer Series in Solid-State Sciences Vol. 1, **1990**. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-09441-9>
4. Tompa, K.; Bokor, M.; Tompa, P. *In Instrumental Analysis of Intrinsically Disordered Proteins: Assessing Structures and Conformation*; Uversky, V.; Longhi S. Eds.; John Wiley, & Sons, **2010** <https://doi.org/10.1002/9780470602614>
5. Tompa, K.; Bokor, M.; Tompa, P. *In Intrinsically Disordered Protein Analysis: Volume 1, Methods and Experimental Tools; Methods in Molecular Biology*, vol. 895 V. N. Uversky and A. K. Dunker Eds.; Springer Science+Business Media, LLC, **2012**. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-927-3>
6. Cooke, R.; Kuntz, I. D. *Annual Revs. of Biophys, Bioeng.* **1974**, *3*, 95-124. <https://doi.org/10.1146/annurev.bb.03.060174.000523>
7. Tompa, K.; Bánki, P.; Bokor, M.; Kamasa, P.; Lasanda, G.; Tompa, P. *Biophys. J.* **2009**, *96*, 2789–2798. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2008.11.038>
8. Csizmók, V.; Bokor, M.; Bánki, P.; Klement, E.; Medzihradszky, K. F.; Friedrich, P.; Tompa, K.; Tompa, P. *Biochemistry*. **2005**, *44*, 3955–3964. <https://doi.org/10.1021/bi047817f>
9. Hazy, E.; Bokor, M.; Kalmar, L.; Gelencser, A.; Kamasa, P.; Han, K.-H.; Tompa, K.; Tompa, P. *Biophys. J.* **2011**, *101*, 2260–2266. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.08.052>
10. Tompa, P.; Bánki, P.; Bokor, M.; Kamasa, P.; Kovács, D.; Lasanda, G.; Tompa, K. *Biophys. J.* **2006**, *91*, 2243–2249. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.084723>
11. Tompa, K.; Bokor, M.; Verebélyi, T.; Tompa, P. *Chem. Phys.* **2015**, *448*, 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.chemphys.2014.12.008>
12. Tompa, K.; Bokor, M.; Ágner, D.; Iván, D.; Kovács, D.; Verebélyi, T.; Tompa, P. *ChemPhysChem*. **2017**, *18*, 677–682. <https://doi.org/10.1002/cphc.201601136>
13. Kittel, C.; Kroemer, H. *Thermal Physics*, W. H. Freeman, San Francisco, **1980**; Appendix B. Temperature Scales, p. 445. <https://doi.org/10.12691/ijp-2-6-2>
14. Waugh, J. S.; Fedin, E. I. *Fiz. Tverd. Tela (Leningrad)*. **1962**, *4*, 2233–2237. English translation *Sov. Phys. Solid State*. **1963**, *4*, 1633–1636.
15. *CRC Handbook of Chemistry and Physics* 97th Edition, Haynes, W. M., Editor-in-Chief; CRC Press, Taylor & Francis Group, **2016**. ISBN-13: 978-1498754286
16. Atkins, P.; de Paula, J. *Physical Chemistry*, 9th edition., Oxford University Press, Oxford, **2010**. ISBN-13: 978-1429218122
17. Chaplin, M. *Water's hydrogen bond strength*. **2007**, arXiv:0706.1355 [cond-mat.soft].
18. Steiner, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 48–76. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20020104\)41:1<48::AID-ANIE48>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020104)41:1<48::AID-ANIE48>3.0.CO;2-U)
19. Nagy, K. *Termodinamika és statisztikus mechanika*. Tankönyvkiadó, Budapest, **1991**. ISBN: 963-18-3562-6
20. Persegian, V. A. *Van der Waals Forces, A handbook for Biologists, Chemists, Engineers and Physicists*; Cambridge, University Press, **2006**. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511614606>
21. Kuntz, I. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 514–516. <https://doi.org/10.1021/ja00731a036>
22. Bizzarri, A. R.; Wang, C. X.; Chen, W. Z.; Cannistraro, S. *Chem. Phys.* **1995**, *201*, 463–472. [https://doi.org/10.1016/0301-0104\(95\)00267-7](https://doi.org/10.1016/0301-0104(95)00267-7)
23. Matsuoka, D.; Nakasako, M. *Chem. Phys.* **2013**, *419*, 59–64. <https://doi.org/10.1016/j.chemphys.2012.12.040>

### Globular proteins – melting diagrams of aqueous solutions, thermodynamic interpretation

A novel thermodynamic method is presented, applicable in the characterization of aqueous protein solutions. The method is based on measurements and evaluation of the two-component wide line  $^1\text{H}$  NMR free induction decay (FID) signal and its Fourier transformed spectrum. We also provide the definition and description of key elements of the procedure conceived for the thermodynamic interpretation of such results. The essential elements are the fundamental temperature, order/disorder parameters based on molecular dynamics/mobility, heterogeneous and homogeneous binding regions, etc. This interdependent experimental and

theoretical treatment provides direct experimental data on the potential energy surface of protein molecules.

The usefulness and merits of our approach are demonstrated through four globular structured protein examples, like ubiquitin, lysozyme,  $\alpha$ -casein, and bovine serum albumin. These proteins were selected because of their widespread utility in protein research. We provide a detailed analysis and interpretation of data recorded earlier on aqueous protein solutions.

As a first step of experiment, the solutions are cooled as fast as possible and then slowly warmed up through thermal equilibrium states. In these states NMR FID signals generated by a simple  $90^\circ$  pulse were detected. The characteristics of FID give direct information about the mobility states of the protein molecules. FID amplitudes extrapolated to zero time give the number of resonant nuclei and spectra provide information about the motional states. The amplitudes and the spectral characteristics are directly measurable quantities. These properties are collected in a wide temperature range and provide independent information sources. Molecular motion produces narrowing of the wide line NMR spectrum, which phenomenon serves as the simplest information source and it is independent of the amplitude values of the FID signals.

The temporal behavior of the slowly decaying FID component proves clearly that during heating the internal energy changes and that there do exist molecular motions. The characteristics of the motion can be determined by the analysis of this component. Thermal distributional data of the amounts of mobile entities yield direct, thermodynamic, molecular level information.

We introduced and use energy based description of the measured thermal properties. Characteristics of the distribution of potential energy barriers inhibiting the rotational movement of water molecules bound to the water-accessible surface of protein molecules are provided by this description. The amount of mobile hydration water as a function of the normalized fundamental temperature gives a melting diagram. Melting diagrams provide special characterization of the proteins, they are a kind of rough-sketch of them. We can deduce quantitative conclusions about the ratios of the globular (ordered) and the more solvent exposed (disordered) regions of the protein molecules, and also about the energy relations of the protein-water interactions. We suggest that the short range forces (i.e. hydrogen bonds) play dominant roles in the formation of the first hydrate shell.

Melting of a globular protein solution takes place in three steps. First, water molecules in the first hydrate layer of the protein gradually arrive at a mobile state at the lowest potential barriers. In some cases, this happens in two stages,

referring to two different types of hydrogen bridges. Other interaction types than hydrogen bonds (e.g. Coulomb or van der Waals interactions) probably do not exist here.

The second step of melting is the plateau section of the melting diagram. There is no change in the number of moving water molecules, this constant region corresponds to the globular part of protein. The heat put in at this stage results in elevated internal energy, and a higher rotational speed of mobile water molecules.

The third step of melting is the potential range starting at the higher end of the plateau. A disordered region starts here, and van der Waals interactions are probably characteristic in these regions. The interaction strengths are very near to that of the water-water hydrogen bonds in bulk water. Most possibly, those parts of the protein molecule which are most accessible to water molecules are involved in this process.

It can be stated that these “globular” proteins are disordered to some definite, though small degree. The extent of disorder ranges from 0.14% to 0.49% in the presented proteins.

The introduced experimental and interpretational procedures based on wide line NMR measurements are applicable usefully by far not only to map the protein-water binding characteristics of protein solutions. The rapid non-disruptive measurement and the data interpretation had already opened a novel avenue to study inter- and intramolecular interactions and to determine the moisture content of solid-phase protein samples.

In the outline of our present work we listed some additional possibilities. Three of these are i) the possibility to directly demonstrate the interaction between different molecules (e.g. protein and drug), ii) the possibility of direct, non-destructive measurement of the different bonds between identical molecules (oligomeric and amyloid connections), and iii) to determine the effect of a standard solvent (often NaCl containing) on the structure and properties of protein molecules. The bonding heterogeneities of these systems make the analysis and interpretation to a not so easy, straightforward task at present. The van der Waals type interactions of water are realized with other molecules too (e.g. sugar, carbohydrate), not only with the protein.