

## Kutatói végjelentés

A kutatást az alábbi három fő irányban folytattuk:

### a) Peptidszekvenálást segítő algoritmus és számítógépes program kidolgozása

Peptidek és fehérjék azonosítása, szerkezet-meghatározása egyre nagyobb mértékben tandem tömegspektrometriás módszereken alapul. A tandem tömegspektrumok értelmezése (a fragmentációs folyamatok azonosítása), és ennek révén peptidek szekvenciameghatározása több mint két évtizede áll az érdeklődés középpontjában. Ennek eredményeképpen számos empirikus szabály született, de a „spektrumfejtés” ma is nagy gyakorlati tapasztalatot és komoly időráfordítást igényel, és ennek ellenére gyakran csak részleges eredményt szolgáltat. Ez korlátozza a peptidkémiai kutatásokban egyre nagyobb mértékben elterjedő 'high-throughput' módszerek hatékonyságát. A tandem spektrum alapján történő szekvencia-meghatározás automatizálásához az első, legfontosabb és legnehezebb lépés a tömegspektrum szekvencia alapján történő „elméleti” meghatározása (ill. becslése). Bár az interneten keresztül nagy számban érhető el peptidszekvenálást segítő szoftver, ezek egyszerű statisztikai számításon alapulnak, a kísérleti körülmények hatását nem veszik figyelembe, pontatlanok, peptidek tömegspektrumának elméleti számítására csak igen korlátozott mértékben használhatók.

A kutatási munka elején MassKinetics modellt ill. a programot (<http://www.chemres.hu/ms/masskinetics>) sikeresen továbbfejlesztettük, amelynek népszerűségét a több mint 1200 regisztrált felhasználó jelzi. A fejlesztés eredményeként a program kinetikus energiefel szabadulás számítására és összetett reakciómechanizmusok modellezésére is alkalmassá vált, amely a peptidek fragmentációjának vizsgálatához elengedhetetlen. A módosított programot több konferencián bemutattuk, cikkekben közzöltük. A peptidfragmentáció leírásához számos jelenséget részletesen meg kellett ismerni és az elméleti modellünkkel leírni, mielőtt a peptidekkel kapcsolatos gyakorlati feladatok megoldásához hozzáláthattunk volna.

A legújabb irodalmi adatok alapján peptidek fragmentációja protonnal összetartott oxazonon gyűrűs szerkezeten keresztül valósul meg. Ebből adódóan a protonnal összetartott komplexek tulajdonságainak vizsgálata alapvetően fontos a lejátszódó folyamatok megértéséhez, valamint a peptidfragmentáció sikeres modellezéséhez. A módosított programot több esetben alkalmaztuk protonnal összetartott komplexek vizsgálatára. Igazoltuk, hogy a MassKinetics képes e komplexek fragmentációjának pontos modellezésére.

Kémiai reakciók, így peptidek fragmentációja esetén is az aktiválási entrópia szerepe jelentős a reakciósebesség meghatározásában. Ennek leírására gyakran használják az ún. kiterjesztett kinetikus módszert (extended kinetic method), de ezen megközelítés jogossága az irodalomban vitatott. Megállapítottuk, hogy a

MassKinetics program e kérdés vizsgálatára alkalmas, ez eredmények peptidekre is kiterjeszhetők.

A harmadik, igen fontos kérdéskör az ütközések során bekövetkező energiaváltozások vizsgálatára és leírása. Egy holland kutatócsoporttal (Prof. Ron Heeren, FOM AMOLF, Amsterdam, Hollandia) együttműködve Fourier-transzformációs tömegspektrométeren speciális kísérleteket végeztünk el, amelyben egy peptid (leucin ekefalin) fragmentációját vizsgáltuk különböző hőmérsékleten és ütközési energián. A kísérleti adatokat a MassKinetics program segítségével modelleztük, amelyből a gázfázisú ion-molekula ütközések során bekövetkező gerjesztés, valamint - a fotonkibocsátás hatására bekövetkező - hűlés mértékét határoztuk meg. Az így meghatározott paramétereket a peptidek tömegspektrumának elméleti számításánál használtuk fel.

A fenti kutatások megerősítették, hogy az eredeti kutatási koncepció megvalósítható, így áttértünk a peptidfragmentáció gyakorlati leírására. Ehhez két jelentős programfejlesztést is el kellett végeznünk. Új, a MassKinetics-hez kapcsolódó és ezt kiegészítő programcsomagot fejlesztettünk ki, mely alkalmas volt a peptidfragmentáció során fellépő igen nagyszámú (peptidenként akár több száz) párhuzamos és konszekutív reakcióútból kezelésére. Másrészt, a peptidfragmentáció általunk kidolgozott modellje igen nagyszámú (több száz, vagy akár ezer) paramétert alkalmaz, melyet empirikusan kívántunk meghatározni. E nagy számú paraméter egyidejű optimalására egy újabb programcsomagot dolgoztunk ki.

A peptidszekvenáló program kidolgozásához szükséges kísérleti adat meghatározására nagyszámú, közel 10.000 tandem tömegspektrometriás mérést végeztünk el. A kísérletekhez szükséges mintegy 300 peptidet részben fehérjék tripszines emésztésével, részben szilárd fázisú peptidszintézissel állítottuk elő. A kísérletekhez olyan peptid-csoportokat szintetizáltunk, amelyek segítségével egy-egy adott aminosav mellett bekövetkező hasadás jól vizsgálható. Az így mért energiafüggő tandem tömegspektrumok segítségével meghatároztuk a spektrumok becsléséhez szükséges paramétereket. A paraméterek egy része a tömegspektrométerre ill. a kísérleti körülményekre jellemzőek, más részük a peptidfragmentáció fizikai-kémiai paramétereit tartalmazza. Az általunk kidolgozott program a paraméterkészlet segítségével képes a peptidek tandem tömegspektrumának becslésére.

Az eredményeket összefoglalva és értékelve kidolgoztuk a peptidfragmentáció egységes elméleti modelljét, amely a tömegspektrométerben lejátszódó folyamatok reakciókinetikai leírására szolgáló „MassKinetics” modellen, a peptidfragmentáció irodalomból ismert empirikus és kvantumkémiai leírásán, valamint saját kutatásainkon alapul. A modell alkalmazásához és teszteléséhez több száz peptid energiafüggő tömegspektrumát határoztuk meg és kidolgoztuk a számítások elvégzéséhez szükséges programcsomagot. A kidolgozott program lényegesen pontosabb eredményeket szolgáltat, mint az irodalomban peptidek spektrumának előrejelzésére leggyakrabban használt SEQUEST program (<http://fields.scripps.edu/sequest/>). A pontosságot „hasonlósági index-szel”, 0 és 1 közötti skálán jellemezve (ahol 1 jelenti a kísérleti

spektrummal való teljes egyezést), az általunk készített program hasonlósági indexe 0.76, míg a SEQUEST esetében ez 0.37.

A kutatás eredménye mind elméleti, mind pedig gyakorlati szempontból rendkívül jelentős. Elméleti eredmény a tömegspektrométerben lejátszódó peptid fragmentáció részletesebb leírása, és az ehhez szükséges molekuláris paraméterek meghatározása. A feladat megoldásának igazán átütő eredménye azonban a peptidszekvenálás megkönnyítése és automatizálása, mely a proteomika, és ezen belül az ú.n. *de-novo* peptidszekvenálás legfontosabb gyakorlati problémái közé tartozik. A kidolgozott módszer és programcsomag jelenleg szabadalmazás alatt áll, ezt követően publikáljuk.

## **b. Terápiásan alkalmazható polipeptid hordozók tömegspektrometriai jellemzése**

Munkánk során olyan új MALDI-TOF tömegspektrometrián alapuló módszert dolgoztunk ki, amely alkalmas polilizin polimerek analitikai jellemzésére. A MALDI-TOF tömegspektrometria nagy előnye, hogy segítségével széles tömegtartományban detektálhatunk egyszeresen töltött molekulaionokat, amelyek gyakorlatilag nem fragmentálódnak. Kísérleteink során részletesen tanulmányoztuk a mintaelőkészítés hatását, amelynek során ioncserélő, illetve fordított fázisú kromatográfiás hordozókat vizsgáltunk. Megvizsgáltunk különböző típusú MALDI mátrixként alkalmazható vegyületet, és azt tapasztaltuk, hogy a különböző polimerizációs fokú polilizin polimerek  $\alpha$ -ciano-4-hidroxi-fahéjsav (CCA) mátrix alkalmazásával jól definiálható, polimerekre jellemző eloszlást adnak a spektrumban. A detektálható ionok egyszeresen protonáltak, azonban nagyobb polimerizációs fokú polimereknél a spektrumban kétszeresen protonált ionok is megjelennek. A többszörösen töltött ionok megjelenése függ a mátrix összetételétől. A mérések során meghatározható volt a polimerek végcsoportjának összetétele is, amelynek segítségével mellékreakciókat tudtunk azonosítani.

Kísérleteink során megfigyeltük, hogy a tömegspektrumban detektálható molekulaionok eloszlása függ a polimer koncentrációjától. Az észlelt koncentrációfüggést szintetikus peptidek alkalmazásával modelleztük. Szilárdfázisú peptidszintézis és oldatfázisú fragmenskondenzáció kombinálásával különböző tagszámú oligolizin peptideket állítottuk elő. ( $n = 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50$ ). Az előállított peptidek keverékén vizsgáltuk a koncentráció változtatásának hatását a peptidek relatív intenzitására. A mérések során azt tapasztaltuk, hogy a peptidek keverékében kis koncentráció esetén ( $<1$  pmol/mL) a kisebb molekulatömegű peptidek intenzívebben jelentkeznek, de a koncentráció növelésével gyorsan növekszik a nagyobb peptidek intenzitása, és a spektrumban a legnagyobb tömegű peptid csúcsa válik uralkodóvá. Hasonló jelenség észlelhető a polimerizációval előállított polilizin minták esetén is, ezekben az esetekben a spektrumban észlelhető eloszlás szélessége változik a polimer koncentrációjától, az eloszlás maximuma azonban nem.

### **c. Intermolekuláris kölcsönhatások, szupramolekuláris komplexek vizsgálata.**

A harmadik kutatási területen molekuláris komplexek tömegspektrometriás vizsgálatát valósítottuk meg. Megjegyezzük, hogy ez a fent tárgyalt, proton által összetartott komplexek tömegspektrometriás vizsgálatához szorosan kapcsolódik.

Módszert dolgoztunk ki szolvatált ionok előállítására kereskedelmi forgalomban kapható hármass kvadupol típusú készüléken. Változatos szerkezetű klaszterionokat állítottunk elő, melyeket részletesen megvizsgáltunk. A kísérletek során a készülék gázbeeresztő rendszerét módosítva ion-molekula reakciók véghezvitelét tettük lehetővé az atmoszférikus interface-ben. Egy adott fémsó vizes oldatának elektropray ionizációjával, majd az így előállított gáz fázisú fémion illékony oldószer gőzével történő reagáltatásával nagy méretű és változatos összetételű szolvatált ionokat képeztünk. Vizsgáltuk az így keletkező ionok képződésének útját és folyadékfázissal való kapcsolatát, az eredményeket publikáltuk.

A kidolgozott módszer arra is lehetőséget nyújtott, hogy a tömegspektrométerben lejátszódó gyors reakciókat vizsgáljunk. Ez lett az alapja annak az új gáz fázisú hidrogén/deutérium csere módszernek, amelyet a klaszterek előállításával párhuzamosan kidolgoztunk. Ez az új technika lehetővé teszi, hogy az általunk alkalmazott tömegspektrométerben egy vizsgálandó molekula labilis (heteroatomokhoz kötött) hidrogénjeit deutériumra cseréljük. A csere mértékéből következtetni lehet a molekula szerkezetére, amelyet az azonos nominális tömeggel rendelkező glutamin és lizin megkülönböztetésével bizonyítottunk, mely eredményeket publikáltuk.

Az amerikai Purdue egyetemmel (Prof. R. Graham Cooks) együttműködve tanulmányoztuk a szerin asszociációjával létrejövő oktamer szerkezetű komplex hidrogén/deutérium cseréjét. Az eredményeket közösen publikáltuk, bemutatva elképzeléseinket a komplex szerkezetéről.

Tanulmányoztuk továbbá makromolekuláris komplexeket mind elektropray ionizáció, mind MALDI ionizáció segítségével. Az elektropray ionizációs kísérletek során vizsgáltuk a cisz-parinársav komplexképzését  $\beta$ -laktoglobulinnal, továbbá meghatároztuk a fehérje kötőhelyét liminált tripszines emésztés segítségével. A MALDI ionizációs kísérletekben modell rendszerként ellenanyag-antigén komplex képződését vizsgáltuk. A mérések során elsőként sikerült egy poliklonális ellenanyag és egy fehérje között létrejövő specifikus komplex képződését MALDI ionizációval igazolni. Egy spanyol kutatócsoporttal (Dr. Mercedes de Frutos, Madrid) együttműködve a tömegspektrometriás kísérleteket ELISA mérésekkel párhuzamosan végeztük annak érdekében, hogy a nem-specifikus komplexek képződését ki tudjuk zárni. Az eredményeket mindkét esetben publikáltuk.

A molekuláris kölcsönhatások vizsgálata témakörben tanulmányoztuk ún. „minor groove binding” proteinek oligonukleotidokkal alkotott komplexeit. Új módszert dolgoztunk ki molekuláris komplexek kimutatására, mely szilárd fázisú hordozó (magnetic beads) alkalmazásán alapul.