Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální a makromolekulární chemie

Charles University in Prague, Faculty of Science

Department of Physical and Macromolecular Chemistry

Modelování chemických vlastností nano- a biostruktur

Modelling of Chemical Properties of Nano- and Biostructures

Autoreferát disertační práce

Summary of the Ph.D. Thesis

Iontově specifické hofmeisterovské efekty na peptidy a proteiny

Ion Specific Hofmeister Effects on Peptides and Proteins

Ing. Jana Hladílková

Ústav organické chemie a biochemie, AV ČR

Centrum biomolekul a komplexních molekulových systémů

Školitel/Advisor: Prof. Pavel Jungwirth, DSc.

Praha, 2014

Contents

1 Abstract in English **1**

1.1 Introduction to the Hofmeister series 1

1.2 Aims of the study 2

1.3 Methods 2

1.3.1 Molecular dynamics and methods of analysis 2

1.3.2 Experimental methods 3

1.4 Results and discussion 4

1.4.1 Ion-protein interactions 4

1.4.2 Ion-peptide interactions 6

1.5 Conclusions 8

2 Autoreferát v českém jazyce **9**

2.1 Úvod do Hofmeisterovy řady iontů 9

2.2 Cíle práce 10

2.3 Metody 10

2.3.1 Molekulová dynamika a analýza dat 10

2.3.2 Experimentální metody 11

2.4 Výsledky a diskuze 12

2.4.1 Interakce iontů s proteiny 12

2.4.2 Interakce iontů s peptidy 14

2.5 Závěr 16

References / Použitá literatura **17**

Curriculum vitae **19**

Selected Publications / Seznam publikací **20**

Title: Ion Specific Hofmeister Effects on Peptides and Proteins

Author: Ing. Jana Hladílková
Department: Physical and Macromolecular Chemistry
Advisor: Prof. Pavel Jungwirth, DSc., IOCB AS CR
Advisor's email address: pavel.jungwirth@uochb.cas.cz

Abstract: Classical molecular dynamics simulations in combination with advanced methods of analysis were used to shed light on missing parts of our molecular understanding of the Hofmeister series. In tandem with various experimental techniques, real proteins as well as model systems were investigated in aqueous salt solutions in order to identify and quantify ion-protein interactions either leading or not leading to the canonical cationic and anionic Hofmeister ordering.

The potassium cation was found to significantly enhance the BHMT enzymatic activity in contrast to the rest of the common monovalent cations. In the quest to rationalize this behavior, a key potassium binding site in the vicinity of the active site was discovered and described. Moreover, the exceptionally strong effect of K^+ on the enzymatic activity was explained by hydration properties of the cations within the limited space of the active site in interplay with their attraction to the nearby negatively charged residues. By contrast, only a small and indirect influence, which follows the cationic Hofmeister series, was established for the LinB dehalogenase. The binding hotspot for all the cations was assigned at the mouth of the tunnel leading to the active site. This assumption was further supported by single point mutations at the tunnel mouth of this enzyme.

A systematic study of anion-peptide interactions was realized for a variety of model systems with aid of NMR experiments. Examination of the $(VPGVG)_{120}$ polypeptide revealed a dominant role of anion-backbone interactions in neutral biological systems. On top of that, it was shown that anions are not attracted to the nonpolar side chains of residues like valine. In order to quantify our previous findings, capped triglycine was investigated as a model system for the peptide bond in aqueous solutions of five sodium salts. It was confirmed that the more weakly hydrated the anion is, the more it interacts with the peptide backbone ($SCN^- > I^- > Br^- > Cl^- > SO_4^{2-}$). Consequently, thiocyanate and iodide act like salting-in agents, bromide and chloride are neutral in contrast with sulfate which is repelled from the backbone surface and shows a salting-out behavior.

To capture the effect of charged residues, anion-peptide binding sites for uncapped aqueous triglycine were explored. In this case, charge-charge interactions dominate, resulting in a reversed Hofmeister series ($SO_4^{2-} > Cl^- > Br^- > I^-$), i.e., the more strongly hydrated the anion is, the larger its affinity to the positively charged N-terminus. Interestingly, SCN^- does not fully follow this rule as a consequence of a synergy between charge-charge and anion-backbone interactions of this non-spherical ion. A direct comparison of our results with experimental data published in the 1970s led to a discovery of an error in the original publication. It was proven that an inefficient synthetic procedure caused assignment of the measured salting-out constants to a fully capped triglycine molecule instead of a half-capped version, which matched with our computational results.

Finally, an innovative way of studying ion-protein interactions was demonstrated on the example of electrophoretic measurements and calculations of neutral model systems and electroosmotic flow markers.

Keywords: molecular dynamics, proteins, peptides, ions, Hofmeister series.

Název práce: Iontově specifické hofmeisterovské efekty na peptidy a proteiny
Autor: Ing. Jana Hladílková
Katedra: Fyzikální a makromolekulární chemie
Vedoucí doktorské práce: Prof. Pavel Jungwirth, DSc., ÚOCHB AV ČR
E-mail vedoucího: pavel.jungwirth@uochb.cas.cz

Abstrakt: V této dizertaci byla použita klasická molekulová dynamika s pokročilými metodami analýzy dat pro doplnění a zároveň objasnění jevů týkající se Hofmeisterovy řady iontů. V kombinaci se širokým spekterem experimentálních metod byly studovány jak reálné proteiny, tak i modelové systémy v roztocích hofmeisterovských solí. Cílem práce bylo identifikovat a kvantifikovat specifické interakce iontů s peptidy a proteiny, které způsobují výsledné hofmeistrovské řazení kationtů a aniontů, či které toto pravidlo porušují.

Příkladem nehofmeisterovského chování je zrychlení enyzmatické reakce BHMT transferázy pomocí draselných iontů, zatímco ostatní běžné monovalentní kationty nemají tento efekt. Molekulové simulace nám umožnily určit a detailně popsat vazebné místo poblíž aktivního místa enzymu, které bylo později krystalograficky potvrzeno. Specificita pro draselný kation byla vysvětlena na základě hydratačních vlastností jednotlivých kationtů a interakcí se záporně nabitými rezidui aktivního místa. Naproti tomu pouze malý efekt monovalentních kationtů na enzymatickou reakci, který odpovídá hofmeisterovskému řazení, byl pozorován pro LinB dehalogenázu. V tomto případě se kationty vážou u ústí tunelu vedoucího ke katalytické triádě, a proto pouze nepřímo ovlivňují rychlost reakce, což bylo podpořeno výpočty i měřením mutovaných variací tohoto enzymu.

Dále byla provedena systematická studie interakcí aniontů s peptidy na modelových strukturách různých velikostí s podporou dat z nukleární magnetické rezonance. Výsledky pro $(VPGVG)_{120}$ polypeptid nejen odhalily dominanci interakcí aniontů s páteří peptidu, ale navíc ukázaly, že anionty nejsou přitahovány k nepolárním částem reziduí, jakým je například valin. Následující analýza triglycinu s oběma chránícími skupinami, který byl zvolen jako model peptidové vazby, potvrdila, že čím slaběji je anion hydratován, tím silněji se váže na bílkovinovou páteř ($SCN^- > I^- > Br^- > Cl^- > SO_4^{2-}$). Ve výsledku se proto thiokyanát a jodid chovají jako vsolovací činidla, bromid a chlorid jako neutrální ionty, zatímco sulfát peptidy/proteiny vysoluje.

Efekt nabitých reziduí na interakce iontů s peptidy/proteiny byl kvantifikován na zwitteriontové (nechráněné) struktuře triglycinu. V tomto případě hraje hlavní roli interakce aniontů s pozitivně nabitým N-koncem molekuly, což vede k převrácení pořadí iontů v Hofmeisterově řadě ($SO_4^{2-} > Cl^- > Br^- > I^-$). Thiokyanát porušuje toto řazení, jelikož se jako jediný váže jak na pozitivně nabitý N-konec tripeptidu, tak i na peptidovou vazbu, což mu umožňuje jeho nekulový tvar. Při přímém srovnání našich výsledků s experimentálními daty publikovanými v 70. letech, se nám podařilo odhallit chybu v původní publikaci. Ukázali jsme, že otištěné vysolovací konstanty souhlasí s našimi výpočty pro molekulu triglycinu s jednou chránící skupinou na N-konci, zatímco se rozcházejí s výsledky pro autory uvedenou oboustranně chráněnou variantu. Náš předpoklad byl potvrzen nereprodukovatelností posledního syntetického kroku v publikovaném článku.

Jako ukázka nového přístupu jdoucí za jednoduché principy hofmeistrovského vázání kationtů a aniontů na peptidy a proteiny, byly uvedeny výpočty a měření elektroforetických dat pro neutrální molekuly včetně elektroforetických markerů.

Klíčová slova: molekulová dynamika, proteiny, peptidy, ionty, Hofmeisterova řada iontů.

1 Abstract in English

1.1 Introduction to the Hofmeister series

Franz Hofmeister is considered to be the first scientist who systematically studied ion-protein interactions[1]. As a professor of pharmacology at the German University in Prague he published a series of experiments on precipitation of the egg-white proteins from aqueous salt solutions[2,3]. These measurements enabled him to order the salts by their ability to precipitate the proteins. Moreover, using a common cation or anion for series of experiments, he ingeniously separated anionic and cationic effect, which resulted in the final series commonly known as the lyotropic or Hofmeister series:

$$F^- \approx SO_4^{2-} > HPO_4^{2-} > CH_3COO^- > Cl^- > NO_3^- > Br^- > ClO_3^- > I^- > ClO_4^- > SCN^-$$

$$NH_4^+ > K^+ > Na^+ > Li^+ > Mg^{2+} > Ca^{2+}$$

Hofmeister concluded that the ordering of the ions is caused by the water absorbing effects of the salts. His main idea was rephrased in 1930s as the kosmotropes/chaotropes theory[4,5]. According to that, kosmotropes have the ability to strongly organize water molecules not only in their close vicinity, but also in large distances[6]. Consequently, they 'steal' water molecules from the protein solvation shell, which results in precipitation of the protein from the aqueous solution (=salting-out effect). In contrast, chaotropes, do not have this ability[7,8], therefore the protein remains dissolved in the aqueous solution (=salting-in effect).

However, there are several problems within this theory, which cannot be ignored. Firstly, no long-range organization of water molecules exists, as numerous experimental and theoretical publications have shown[9,10]. Secondly, the role of the protein is completely excluded, therefore, according to this theory the results should not differ with various proteins or protein mutants. Finally, frequently measured violations of the Hofmeister ordering cannot be explained by such a simple theory. One of the striking examples is the lysozyme precipitation from the aqueous salt solution. While at high pH and high ionic strength the ions follow the Hofmeister series, at low pH and moderate salt concentration a reversed Hofmeister series is observed[11,12].

Because of the weak points in the theory mentioned above, the main scientific interest shifted from the ion-water to ion-protein interactions in the late 1950s. Thermodynamic measurements of small model systems were at basis of the experimental approach. Simple molecules were easier for interpretation of the data. Therefore, N-methyl acetamide (NMA) was, for example, examined as a model for the protein backbone[13,14], followed by a systematic study of polyglycine oligomers[15,16]. A general conclusion was that weakly hydrated anions (I^-, SCN^-, etc.) interact with the peptide bond, while strongly hydrated anions do not. The opposite is true for cations; strongly hydrated cations interact with the backbone unlike weakly hydrated cations. The lack of sufficient resolution and sensitivity of the experimental techniques in the 1970s and 1980s led the topic to fall out of interest for the next two decades.

A period of 'Rennaisance for Hofmeister' started in 2004, when the first modern Hofmeister conference was organized. The original Hofmeister papers were translated into English[17], and more importantly, the key questions were formulated. Finally, the advanced experimental and computational techniques have allowed a new look into the Hofmeister problem.

1.2 Aims of the study

While no universal answer for all the related questions concerning ion-protein interactions exists, the goal of this thesis is to provide some of the missing pieces of the Hofmeister puzzle. We focus mainly on the ion-protein and ion-peptide interactions using molecular simulations with a substantial support from experimental techniques. The latest studies[18-21] showed that ion-protein/peptide interactions consist of two key ingredients which are roughly equally important – ion-backbone interactions and ion-side chain binding. We apply a reductionist approach to qualify and quantify both effects while we address the following question – where exactly and how strongly the Hofmeister ions bind to the backbone or to the side chains. Therefore, mainly model systems are investigated to provide general conclusions allowing for generalizations of our results.

In addition, we also investigate real proteins to capture the complexity of the topic. In this quest, we mainly seek to rationalize experimental observations, but on top of that, we aim to predict additional information, i.g., which mutations can considerably change the enzymatic activity, or which parts of the protein are not involved in ion binding at all. The atomistic insight helps to understand experimental data as we offer a detailed view of specific binding sites and explanation of various ionic effects on the enzymatic activity.

Finally, we attempt to go beyond the classical approach and try to connect cationic and anionic Hofmeister series. It is well known that anions have more significant effects than cations, however, the importance of the counter ion for ionic binding is not fully explored yet. Therefore, we try to gain new information about the ratios of cationic and anionic bindings by applying nontraditional computational and experimental techniques, such as electrophoresis.

1.3 Methods

1.3.1 Molecular dynamics and methods of analysis

Classical molecular dynamic (MD) simulations were primarily used to achieve the goals listed above. Empirical force fields for proteins, peptides, ions, and water molecules were chosen in a way to capture best the observed properties of the studied systems, alternatively, more of them were used and compared. Primarily, we focused on the thermodynamic quantities and statistical sampling, therefore, both data convergence and evaluation of the error bars were major issues. Following methods of analysis were then applied to obtain quantities which are directly or indirectly comparable with experiments. On top of that, advanced visualization techniques were employed to display statistical properties that help understanding the results.

The best way how to visualize ion binding sites is to calculate the spatial distribution function, i. e., the ion map around the investigated molecule. From that, it is relatively easy to identify which parts of the molecule are involved in or excluded from the interactions with ions. By adjusting the iso-value of the visualization level, we obtain an overall picture of the importance of different molecular features. However, to be able to quantify our observations, other types of analysis need to be applied.

A standardized way of data processing from MD simulations is the evaluation of the radial distribution function g(r), which is calculated by integration of the spatial distribution function over the angular coordinates. However, not all the targeted molecules have a spherical shape, therefore, sometimes it is very useful to go beyond this approach. The proximal distribution function[22] turns out to be a good alternative. Here, the molecular surface and the corresponding spatial volume is divided

into several parts selected by our needs for a better comparison with various experiments (see the spatial division of the uncapped triglycine surface in Fig. 1). Furthermore, by integration of the proximal distribution functions in every spatial part, the number of ions ($N_{proximal}^{ion-group}$) and water molecules ($N_{proximal}^{water-group}$) belonging to a defined center are obtained. Finally, the preferential binding coefficient I^{region} can be calculated applying Eq. 1:

$$I^{region}(r) = N_{proximal}^{ion-group}(r) - \frac{N_{total}^{ions} - N_{proximal}^{ion-group}(r)}{N_{total}^{water} - N_{proximal}^{water-group}(r)} \times N_{proximal}^{water-group}(r) \qquad (1)$$

where N_{total}^{ions} and N_{total}^{water} stand for the total number of ions and water molecules in our systems. The preferential binding coefficient[23] defines, whether in the selected region preferential ion binding ($\Gamma > 0$) or preferential hydration, i.e., ion depletion ($\Gamma < 0$) is observed (cartoon explanation in Fig. 1). It should be emphasize that the thermodynamic property we want to compare with experiment is not the function $\Gamma(r)$ itself, but its limiting value at large distances (12 Å in our case).

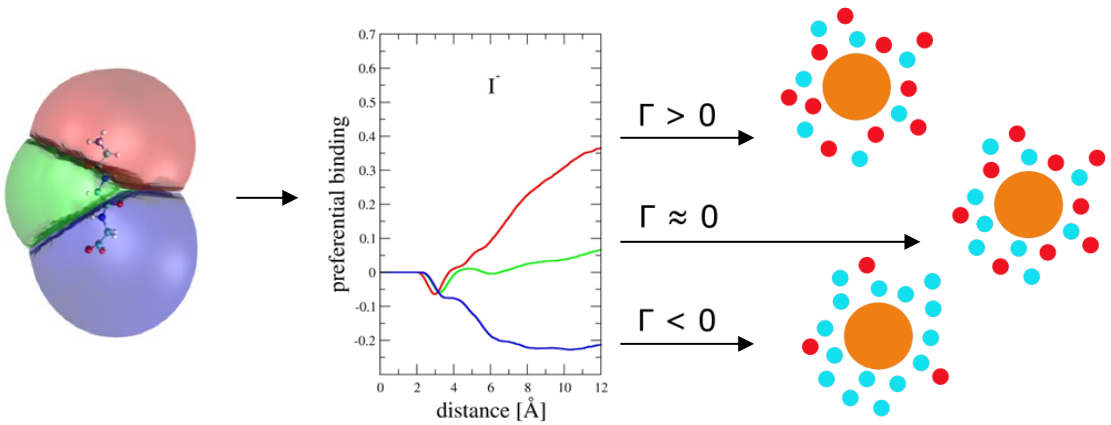


Fig. 1: Visualization of the spatial division around an uncapped glycine trimer and the corresponding iodide preferential binding coefficients for each of the spatial parts (the color notation being the same for the left and center figures). Additionally, the meaning of the Γ coefficient is schematically explained by cartoons demonstrating the preferential binding of ions (red) vs. the preferential hydration (water molecules in blue) of an investigated region (orange).

A direct way to compare computational results with the experiment is via the evaluation of the salting-out constant k_s, i.e. the overall effect of the salt on a biomolecule[24]. The more positive the k_s value, the better salting-out agent the salt is. Conversely, the more negative k_s value, the more sating-in behavior of the salt is observed. The relation between the preferential binding coefficient and the salting-out constant is given in Eq. 2:

$$k_s = -\frac{\Gamma_{salt}}{2.303 \times c_{salt}} \qquad (2)$$

1.3.2 Exprimental methods

The experimental definition of the salting-out constant k_s is based on solubility measurements[16]. An investigated molecule's solubility (S) is determined in pure water and in a salt

solution with concentration of c_{salt} allowing for evaluation of the k_s values as $k_s = \log(S_{water}/S_{salt})/c_{salt}$. A direct comparison of the measured and calculated k_s values is then possible.

Another way how to monitor the overall effect of salts on the peptide structure is determination of the lower critical solution temperature (LCST). Elastin-like polypeptides undergo an inverse temperature transition[25,26]. Below the critical temperature, the polypeptide is dissolved in the aqueous solution, while above this temperature it experiences a hydrophobic collapse, forming a separate phase. The LCST can be shifted by adding various salts in different concentrations and the temperature dependence is then recorded. We are able to distinguish between linear and nonlinear influence of salts on the LCST and assume that the nonlinear part can be fitted to a binding isotherm. Consequently, the dissociation constant K_D can be calculated from the curvature of the ΔT dependence of the non-linear part, with $K_D = \infty$ for purely linear behavior.

Similarly, a peak shift $\Delta\delta$ in ^1H NMR spectra can be monitored as a function of salt concentration. In analogy to LCST measurements, the curves are subsequently divided into linear and nonlinear contributions and the dissociation constant K_D is obtained from the fitted data. The changes in chemical shifts lie at the limits of measurability, therefore, high demands on the experimental equipment and precision of data collecting are posed. Nevertheless, this technique allows us to determine individual dissociation constants for different parts of the molecule containing non-exchangable protons. On the other hand, exchangeable protons are problematic to measure. Finally, we note that the determined NMR effects are very local (r^{-4} dependence)[27,28].

Infrared spectroscopy (IR) can be used in a similar way as described for NMR measurements. The changes in frequencies are recorded as a function of salt concentration, and the dissociation constant can be then inferred from the data. The local character of the measurement remains[29], but other functional groups than protons can be examined. Finally, we note that the protein crystal geometries, obtained from the X-ray spectroscopy, serve as a starting point for most of the MD simulations. The crystal is, however, a product of specific crystallization conditions, which may differ significantly from the situation in solvent. On top of that, sodium cations may easily be misinterpreted as water molecules due to their similar electron densities. Nevertheless, the combination of all the above listed spectroscopic methods is crucial for making connection with theoretical calculations and for their benchmarking.

1.4 Results and discussion

1.4.1 Ion-protein interactions

The first half of the results is dedicated to specific ion effects on protein structures and enzymatic activity. The first enzyme we examined was betaine-homocysteine *S*-methyltransferase (BHMT), which is produced in liver and kidney tissues of monogastric animals[30]. It catalyses a methyl transfer from betaine to homocysteine at the active site containing a zinc cation, resulting in production of methionine in our bodies[31]. Colleagues from our institute performed a detailed experimental study on the influence of monovalent cations on the BHMT activity[32]. They found out that potassium enhances the activity significantly, rubidium and ammonium mildly, while the rest of the investigated cations had no effect. This blatant violation of the cationic Hofmeister series led us to setting up MD simulations and seeking for an explanation.

We used crystal structures of rat[33] and human[34] BHMT (tetramer), from which selected a single monomer and established using simulations the crucial sites for cationic binding. While at the

protein surface all the binding sites followed the Hofmeister series ($Na^+ > K^+ > Rb^+$), close to the active site of the enzyme we detected an exceptional site (see the spatial distribution function of K^+ in Fig. 2A). When we calculated the average number of cations at the active site, we found out that potassium binds to the negatively charged residues (Asp26 and Glu159) the strongest, rubidium less so and sodium the least, which is in good agreement with experimental results. The reason for this raises from different hydration properties of these cations. The sodium cation keeps very strongly its solvation shell of six water molecules. Consequently, it has the largest hydration sphere, which does not interact with carboxylic groups of the negatively charged residues at the active site very efficiently. The potassium cation easily loses two of its water molecules, binding strongly to the carboxylic groups while oscillating between Asp26 and Glu159. Finally, Rb^+ also easily abandons two water molecules, but being larger than K^+, the charge-charge interaction weakens.

To answer the question whether and how the binding situation changes when a substrate approaches the active site[35], additional simulations with an added inhibitor were performed. In this case one of the binding sites (Glu159) is sterically hindered by the inhibitor, therefore, Asp26 remains to be the only residue cations are strongly bound to (Fig. 2B). Our collaborators prepared and measured several mutants of the BHMT enzyme where the closest residues to the potassium binding site were altered. All the mutants had low or zero activity but some of them were expressed in very low yields, which points to their importance in protein folding. In contrast, when a residue not directly bound to the potassium cation was mutated, the activity of the enzyme remained significant. Eventually, crystallographers succeeded in structure determination and confirmed the potassium binding site predicted by MD simulations.

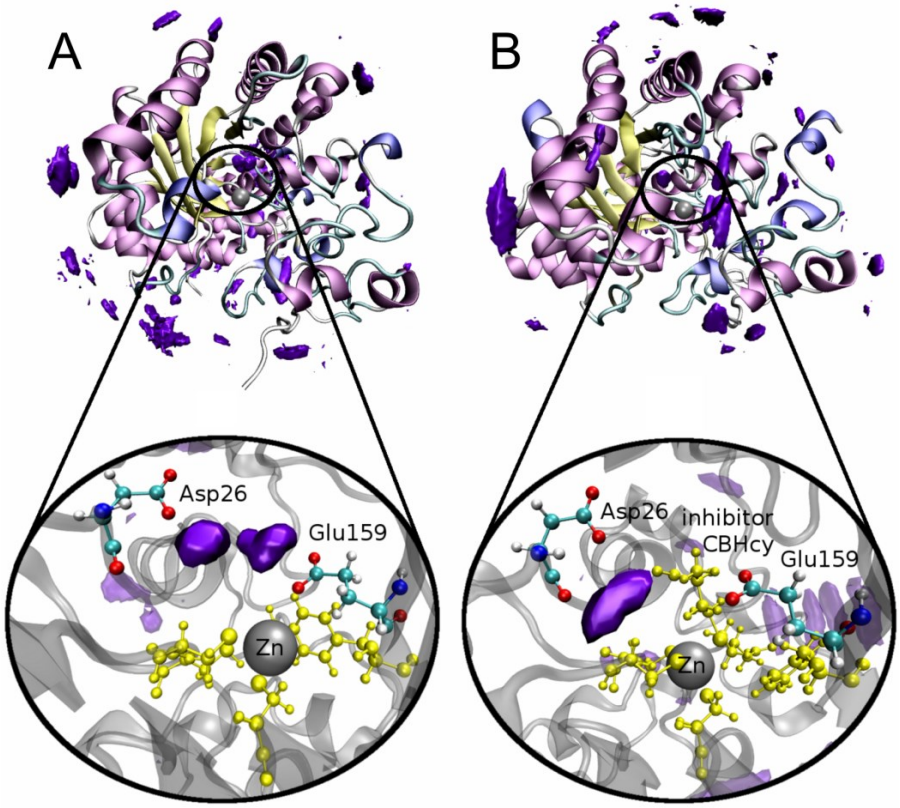


Fig. 2: Isosurfaces of the spatial distribution function of the potassium ion (in purple) calculated around the BHMT monomer with an isovalue=10. Part A shows the identified binding sites near the Asp26 and Glu159 residues. Part B demonstrates how the binding site is shifted toward Asp26 when the inhibitor CBHcy is present at the active site. Zinc ion is coloured in grey and its ligand resiudes (Cys247, Cys299, Cys300, and Tyr160) together with the inhibitor in yellow.

In contrast to BHMT, the enzymatic activity of the LinB dehalogenase is influenced by ions according to the Hofmeister ordering ($Na^+ > K^+ > Rb^+ > Cs^+$). Moreover, the ion effect is rather small in this case. In a similar fashion as described above, we took the structure of LinB and sampled where the hotspots for cationic binding are located. We observed no penetration of any of the investigated cations to the active site. On the other hand, we identified a possibly important binding site at the mouth of the tunnel leading to the active site. By various mutations at the tunnel mouth, we showed both computationally and experimentally the importance of this region[36]. When we increased the negative charge at the tunnel mouth, we locally increased cationic binding, while when we decreased the negative charge, the cationic hotspot vanished. In contrast, the overall cationic spatial distribution function was not affected by this local change. It was experimentally shown that substrate inhibition decreases with the introduced negative charge at the tunnel mouth and vice versa, which is in line with the computational observations.

LinB catalyses, in the absence of any cofactor, the conversion of haloalkanes to alcohols[37]. Halide anions and protons are released as side products. To better quantify this process, free energy profiles of halide ions (Cl^-, Br^-, and I^-) leaving the LinB active site were calculated. We were confronted with the uncertainty of the protonation state of the catalytic His272, and consequently, we had to perform two sets of free energy calculations. In the vicinity of the catalytic triade at the active site of the enzyme, the halide-stabilizing site takes place[38]. We showed[39] that halides are stable at this site in the following order: $I^- > Br^- > Cl^-$. This pondering was also supported by stopped-flow fluorescence experiments. Moreover, we found out that all the anions leave the active site through the same tunnel having very similar free energy profiles, being better stabilized by the halide-stabilizing residues than in the bulk. Interestingly, the protonation state of His272 has a non-negligible impact on the halide free energy profiles. Namely, doubly protonated His has an additional stabilizing effect on all three anions, while singly protonated His does not. The possible ways of the proton release from the active site are being investigated at present.

1.4.2 Ion-peptide interactions

In contrast to the case studies described in the previous part, a systematic study of the binding patterns of the Hofmeister ions at the peptide surfaces is presented in this section. First, a biopolymer $(VPGVG)_{120}$ known as elastin-like polypeptide (ELP) was experimentally investigated by our colleagues using LCST and NMR measurements[40]. Shifts in the clouding temperature (ΔT) and proton chemical shifts ($\Delta\delta$) as a function of salt concentration were measured in three sodium salts – NaSCN, NaCl, and Na_2SO_4. It follows from the LCST data that only for NaSCN a nonlinear behavior is observed and, therefore, specific ion-peptide interactions are deduced. Calculated K_D constants from the NMR experiments suggest that Cα protons are influenced by SCN^- the most, by Cl^- only mildly, while a purely linear dependence is measured for SO_4^{2-}. In contrast, valine side chain protons show linear behavior in all three salts.

To examine molecular mechanisms of ion binding at the ELP surface, we performed classical MD calculations of the VPGVG monomer in the same salt solutions. From the spatial distribution functions, proximal distribution functions, and mainly from the preferential binding coefficients (Γ), we can conclude the following: SCN^- is attracted to the ELP surface interacting mainly with the NH group of the peptide bonds and the adjacent Cα protons, while it is depleted from the nonpolar parts of the valine residues. This is in contrast to Cl^- and even more to SO_4^{2-}, which show repulsion from all the spatial parts of the molecule, most strongly from the valine residues.

The finding that the anion-backbone interactions dominate in neutral systems like ELP led us to examine the ionic effects on the backbone separately. We chose a capped (terminated) triglycine molecule (GGG) as a model system for the backbone more representative than the frequently used N-methyl-acetamide (which does not contain any alpha carbon). Similarly to ELP, we ran MD simulations of the capped GGG in five sodium salt solutions (NaSCN, NaI, NaBr, NaCl, and Na_2SO_4) for which dissociation constants K_D from the NMR proton shifts were available. The results[41] validated and extended our previous observations: the more weakly hydrated the anion, the more it interacts with the backbone ($SCN^- > I^- > Br^- > Cl^- > SO_4^{2-}$). Namely, SO_4^{2-} , as a strongly hydrated anion, is depleted from the backbone, which results in a salting-out behavior of sulfate salts. Cl^- and Br^- act like neutral agents with no or only minor interactions with the peptide bonds. I^- and even more so SCN^- bind significantly to the peptide/protein backbone. Calculated spatial distribution functions of all anions around capped GGG are shown in Fig. 3.

To capture the effect of charged residues on ion-specific interactions, we investigated also the uncapped (non-terminated) version of triglycine[41]. The uncapped N-terminus serves as a model binding site for positively charged residues (Lys), while the uncapped C-terminus represents negatively charged residues (Asp or Glu). The results revealed that in contrast to the capped GGG the charge-charge interactions dominate here. Therefore, the anion with the biggest charge density SO_4^{2-}, exhibits the strongest affinity, followed by $Cl^- > Br^- > I^-$. However, a more complex situation is observed for SCN^-, where both charge-charge and anion-backbone interactions play a significant role, resulting in a synergic effect enhancing the SCN^- binding to the uncapped GGG molecule. The reversal of the Hofmeister series in terms of spatial distribution functions is depicted in Fig. 3.

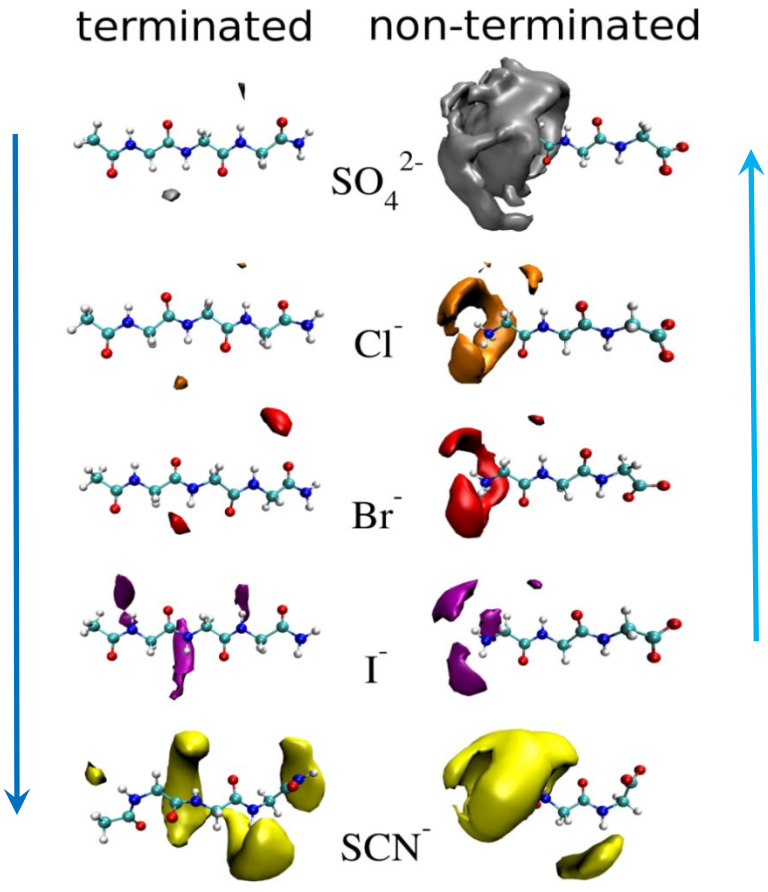


Fig. 3: Density maps of SO_4^{2-}, Cl^-, Br^-, I^-, and SCN^- around terminated (left column) and non-terminated (right column) triglycine at an isovalue of 3.

In order to compare our results with additional experimental data, salting-out constants k_s for seven sodium salts (Na_2SO_4, NaF, NaCl, NaBr, NaI, NaSCN, and $NaClO_4$) were calculated from MD simulations. Nandi and Robinson established salting-out constants[16] for capped triglycine from solubility measurements for the purpose of ordering Hofmeister salts in the 1970s. Our data were in good agreement with their results except from NaF and Na_2SO_4. After a proper check of our force fields and the methods used in the original publication, we were able to show[42] that the k_s constants for a half-capped version of GGG perfectly match with the experimental data of Nandi and Robinson. Our experimental colleagues then confirmed that the synthetic procedure of the final capping published by Nandi is irreproducible, therefore, the salting-out constants were assigned to an invalid structure. Interestingly, we were able to reveal this fact due to a mismatch for the strongly hydrated anions as they were more repelled from the charged C-terminus than the weakly hydrated ones, therefore, the effect for them was more pronounced.

Finally, we attempted to go beyond standard approaches and connect the cationic and anionic Hofmeister series by an unconventional electrophoretic (EOF) separation of neutral analytes. Usually, electrophoresis is used for charged species[43]. Moreover, the reported electrophoretic mobility values are in fact differences between the mobilities of the analyte and the EOF marker[44]. Commonly used EOF markers like dimethylsulfoxide (DMSO) or thiourea (TUR), however, interact with the EOF salts in an uneven way. As a result, they move in the electric field with different velocities, which violates the commonly applied assumption that EOF markers behave like immobile species independently on the used electrolyte[45]. We quantified these effects for both cations and anions using MD simulations with support of EOF experiments[46]. On top of that, we examined the ion binding to NMA in EOF electrolytes and were able to establish cationic and anionic effects at the same time. As an example, NMA moves as an almost neutral analyte in LiAc aqueous solution, from which we conclude that in average Li^+ binds in a similar amount to NMA as Ac^- does, which is not true either for DMSO or for TUR. An atomistic view of the simulations allowed us to rationalize experimental observations. At the same time, experimental data served as a good benchmark for testing empirical force fields employed in MD.

1.5 Conclusions

In the present thesis we demonstrate how efficient a combined computational and experimental approach can be for obtaining complex answers to biologically relevant questions such as ion-specific effects on proteins and peptides. In the first part, selected enzymes were investigated as experimental data were collected and rationalized by MD simulations. Various binding motifs were identified in the enzymatic structures and key cationic binding sites were specified. On top of that, based on our simulations, several mutations were suggested to influence the enzymatic activity. Interestingly, both Hofmeister following and Hofmeister violating effects were observed.

A systematic study of the ion-peptide interactions demonstrates the strength of a reductionist approach which divides ion-protein effects into backbone and side-chain contributions. The fact that the Hofmeister series can be reversed by uncapping the triglycine molecule indicates the possibility of reaching the desired properties of targeted enzymes in a given salt by simple point mutations or pH titration. Finally, future development should go beyond the simplifying concept of separate anionic and cationic Hofmeister series as the anion-cation attraction both in bulk and at the protein surface can play an important role. Innovative experimental setups armoured with a computational insight provide a fresh look into the topic as we demonstrated by electrophoretic measurements and related calculations.

2 Abstrakt v českém jazyce

2.1 Úvod do Hofmeisterovy řady iontů

Franz Hofmeister je považován za prvního vědce, který systematicky studoval interakce iontů s proteiny[1]. Jakožto profesor farmakologie na pražské Německé univerzitě publikoval sérii článků o srážení (vysolování) vaječného bílků ze solných roztoků[2,3]. Na základě těchto experimentů seřadil soli podle síly jejich účinku na vysrážení vaječných proteinů. Tím, že použil různé soli se stejným kationtem či aniontem, dokázal oddělit vysolovací efekt pro anionty a kationty zvlášť, čímž získal výslednou lyotropickou či po autorovi pojmenovanou Hofmeisterovu řadu iontů:

$$F^- \approx SO_4^{2-} > HPO_4^{2-} > CH_3COO^- > Cl^- > NO_3^- > Br^- > ClO_3^- > I^- > ClO_4^- > SCN^-$$

$$NH_4^+ > K^+ > Na^+ > Li^+ > Mg^{2+} > Ca^{2+}$$

Hofmeister vysvětlil svá experimentální pozorování na základě hydratačních vlastností iontů. Jeho hlavní myšlenka byla parafrázována ve 30. letech jako teorie kosmotropních a chaotropních činidel[4,5]. Kosmotropy jsou ionty/molekuly, které silně vážou molekuly vody, což jim umožňuje organizovat strukturu vody na velké vzdálenosti[6]. Díky tomu se obklopují maximálním možným počtem vod, v důsledku čehož si přivlastní i tu vodu, která rozpouší protein v roztoku, čímž protein z roztoku vysráží (vysolovací efekt). Chaotropy jsou naopak ionty/molekuly, které tuto vlastnost nemají[7,8], a proto zůstává protein rozpuštěn i v přítomnosti těchto činidel (vsolovací efekt).

Teorie se ukázala jako neplatná z několika důvodů. Zaprvé neexistuje iont ani molekula, která by dokázala organizovat vodu na velké vzdálenosti, což podpořila řada experimentálních i teoretických prací[9,10]. Zadruhé v této teorii nehraje protein žádnou roli. To by znamenalo, že všechny proteiny či jejich mutace by byly vysolovány naprosto stejně, což víme, že není pravda. V neposlední řadě je nutno říci, že takto jednoduchá teorie nedokáže vysvětlit případy, které tato pravidla porušují. Dobrým příkladem je lysozom, což je protein, který je vysrážen ze solného roztoku podle Hofmeisterových pravidel, pokud jsou pH nebo síla roztoku vysoké. Při nízkém pH nebo nízkých koncentrací solí je naopak pozorována převrácená Hofmeisterova řada[11,12].

Díky těmto zjištěním se v 50. letech upustilo od výzkumu hydratace iontů a pozornost se zaměřila na interakce iontů s proteiny. Nejběžnějším způsobem získávání dat bylo měření termodynamických veličin malých modelových systémů, které byly snadné na realizaci i interpretaci. N-methylacetamid (NMA)[13,14] či později glycinové oligomery[15,16] byly studovány jako modely peptidové vazby. Jednoznačným výsledkem bylo, že slabě hydratované anionty (jodid, thiokyanát) se vážou na peptidovou vazbu, zatímco silně hydratované anionty (sulfát, fluorid) ne. Přesný opak platí pro kationty: silně hydratované kationty (vápenatý, hořečnatý) interagují s peptidovou vazbou narozdíl od slabě hydratovaných kationtů (draselný, cesný). Bohužel nedostatečná technická vyspělost experimentálních i výpočetních metod 70. a 80. let způsobila, že se toto téma dostalo na více než dvacet let mimo zájem vědecké veřejnosti.

Hofmeisterovská resenance začala konferencí pořádanou v roce 2004, na které se znovu otevřelo téma hofmeisterovských efektů. Původní Hofmeisterovy publikace z 19. století byly přeloženy do angličtiny[17], klíčové otázky byly formulovány společně s novými směry výzkumu pro komplexní systémy jako jsou proteiny, peptidy, membrány či iontové kanály. Díky nejnovějším experimentálním technikám, výpočetnímu výkonu i pokročilým metodám analýzy se otevřel nový prostor pro hofmeisterovské bádání.

2.2 Cíle práce

Jelikož neexistuje žádná teorie vysvětlující všechny pozorované interakce iontů s biomolekulami, cílem této dizertační práce je poskytnout odpovědi na některé z hofmeisterovských záhad. Hlavním nástrojem pro zodpovězení těchto otázek je klasická molekulová dynamika s podporou širokého spektra experimentálních metod. Nejnovější tematické studie[18-21] ukazují, že interakce iontů s proteiny či peptidy se dají rozdělit na dva přibližně rovnoměrné příspěvky, tj. interakce iontů s páteří proteinů a s postranními řetězci aminokyselin. My aplikujeme tzv. redukcionistický přístup, tedy že zmíněné dva příspěvky lze studovat separátně, abychom zodpověděli následující otázku – kde přesně a jak silně se Hofmeisterovy ionty vážou na proteinovou páteř ve srovnání s postranními řetězci. Proto jsme zvolili zejména modelové systémy různých velikostí, abychom mohli vyvodit obecné závěry z našich výpočtů a pozorování.

Abychom však nezůstali pouze u modelových případů, je potřeba studovat rovněž reálné proteiny. U vybraných struktur lze snadno monitorovat vliv iontů na enzymatickou aktivitu a díky simulacím tato pozorování vysvětlit na molekulové úrovni. Dále jsme schopni předpovídat, které mutace by mohly mít pozitivní/negativní vliv na enzymatickou aktivitu, kde se nacházejí vazebná místa pro interagující ionty či na které části molekuly se ionty vůbec nevážou.

Na závěr bychom se rádi pokusili o alternativní přístup, který by nám umožnil propojení kationtové a aniontové Hofmeisterovy řady iontů. Je všeobecně známo, že anionty mají větší efekt na proteiny než kationty, jak se ale ukazuje, přítomnost protiiontů je v určitých případech mimořádně důležitá. Jak moc je interakce kationtů s anionty rozhodující anebo jak se mění poměry iontů vázaných na peptidovou vazbu, se pokusíme zodpovědět pomocí výpočtů i měření elektroforetických dat.

2.3 Metody

2.3.1 Molekulová dynamika a analýza dat

K dosažení vytyčených cílů jsme využili především simulací klasické molekulové dynamiky s empirickými parametry pro proteiny, peptidy, ionty i vodu. Správnou volbu parametrů jsme vždy ověřili srovnáním s experimentálními daty či použitím několika různých variant. Abychom získali platné termodynamické veličiny se statistickou přesností, museli jsme zajistit dobrou konvergenci výpočetních dat a určit směrodatnou odchylku našich výsledků. Různé statistické a vizualizační metody analýzy byly použity pro zpracování získaných dat tak, abychom byli schopni přímého či nepřímého srovnání s experimentem či abychom lépe porozuměli původu pozorovaných interakcí.

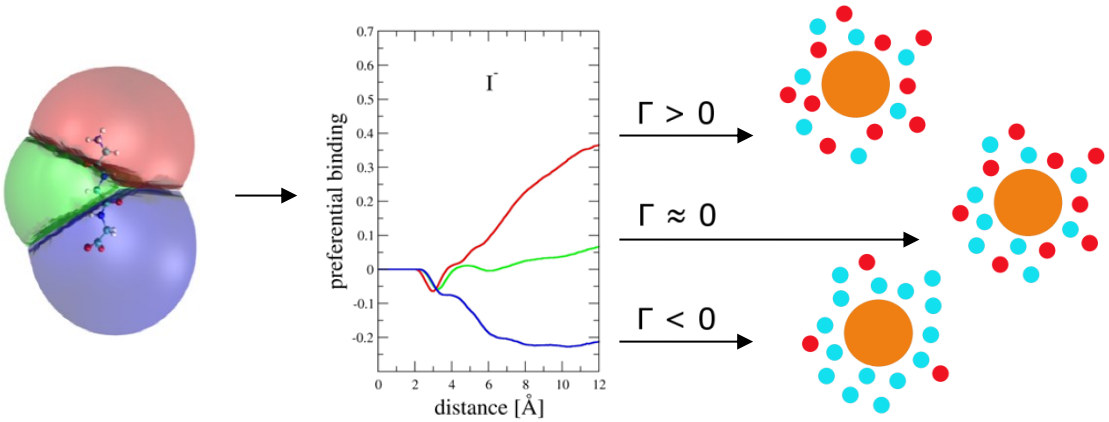
Nejlepší způsob jak zobrazit, kde se ionty na protein či peptid vážou, je pomocí tzv. 3D hustotních iontových map. Místa se zvýšenou pravděpodobností výskytu iontů se vykreslí kolem studované molekuly, zatímco místa s výskytem iontů nižším než zvolená hodnota zůstanou prázdná. Jednoduše lze tedy určit, které části molekuly interagují/neinteragují s ionty. Nicméně tyto mapy slouží pouze jako kvalitativní obrázek, abychom mohli určit sílu vázání jednotlivých iontů, je potřeba aplikovat jiné způsoby analýzy.

Jedním z nich je výpočet radiální distribuční funkce g(r), kterou získáme integrací hustotních iontových map podle všech úhlů prostoru. Jak název funkce napovídá, udává, s jakou pravděpodobností nalezneme ionty/molekuly ve vzdálenost r od centra studované molekuly. Ne všechny molekuly ale mají symetrický kulovitý tvar, proto je výhodné zavést novou veličinu – proximální distribuční funkci[22]. Při jejím výpočtu se povrch molekuly rozdělí na několik částí a pravděpodobnost výskytu

iontů se určí pro každou část zvlášť. Jak si povrch rozdělíme, záleží čistě na nás, pokud ale chceme naše výsledky srovnávat s experimentem, řídí se volba částí podle něj (na Obr. 1 je vyobrazeno rozdělení nechráněného triglycinu na 3 části podle NMR měření). Pokud zintegrujeme proximální distribuční funkce (tedy pravděpodobnosti výskytu iontů v jednotlivých částech), získáme počet iontů ($N_{proximal}^{ion-group}$) i vod ($N_{proximal}^{water-group}$) pro každou sledovanou část, z nichž již snadno dopočteme preferenční koeficient interakce (I^{region}), jak je uvedeno v rovnici 1:

$$I^{region}(r) = N_{proximal}^{ion-group}(r) - \frac{N_{total}^{ions} - N_{proximal}^{ion-group}(r)}{N_{total}^{water} - N_{proximal}^{water-group}(r)} \times N_{proximal}^{water-group}(r) \qquad (1)$$

ve které N_{total}^{ions} a N_{total}^{water} značí celkový počet iontů a vod v našem systému. Preferenční koeficient interakce[23] udává, zda se v dané oblasti k povrchu molekuly vážou převážně ionty (Γ > 0) či zda zde převažuje interakce s vodou, jinými slovy zda jsou ionty odpuzovány od studovaného povrchu (Γ < 0), jak je schematicky zobrazeno na Obr. 1. Je nutné zdůraznit, že pro srovnání s experimentální termodynamickou veličinou není důležitý celý průběh Γ funkce, ale pouze její limitní hodnota, kterou v našem případě odečítáme ve vzdálenosti 12 Å.



Obr. 1: Rozdělení prostoru kolem nechráněného triglycinu na 3 oblasti, pro které byl vypočten preferenční koeficient interakce Γ jodidového aniontu (barvy křivek odpovídají barvám jednotlivých částí prostoru). Dále je zde schematicky vysvětlen význam Γ koeficientu, jehož kladná hodnota značí přednostní vázání iontů (v červené barvě), záporná hodnota pak přednostní hydrataci (vodní molekuly naznačeny světle modře) povrchu molekuly (v oranžové barvě) v dané části prostoru.

Přímé srovnání výpočtů s experimentem umožňuje vysolovací koeficient[24] k_s, který udává, jaký má daná sůl celkový efekt na protein/peptid v solném roztoku. Čím kladnější hodnota k_s, tím účinnějším vysolovacím činidlem daná sůl je. Naopak čím zápornější vysolovací koeficient, tím lépe zvolená sůl vsoluje (= udržuje protein rozpuštěný v roztoku). Vztah mezi preferenčním koeficientem interakce Γ a vysolovacím koeficientem k_s v solném roztoku o koncentraci c_{salt} je dán rovnicí 2:

$$k_s = -\frac{\Gamma_{salt}}{2.303 \times c_{salt}} \qquad (2)$$

2.3.2 Experimentální metody

Vysolovací koeficient k_s se experimentálně zjišťuje na základě měření rozpustnosti[16] studovaného proteinu/peptidu v čisté vodě (S_{water}) a v solném roztoku (S_{salt}). Pomocí jednoduchého

vztahu $k_s = \log(S_{water}/S_{salt})/c_{salt}$ se vypočte hodnota vysolovacího koeficientu, kterou lze přímo porovnat s hodnotami získanými z molekulových simulací.

Další způsob jak zjistit celkový efekt soli na peptid je experimentální měření tzv. teploty zakalení roztoku (LCST). Polypetidy elastinového typu jsou za nízkých teplot plně rozpustné ve vodě, zatímco při překročení teploty zakalení dojde k hydrofobnímu kolapsu, tedy k vysrážení peptidu, čímž se zakalí do té doby čirý roztok[25,26]. Přidáním různých typů solí lze teplotu zakalení měnit - vysolovací činidla tuto teplou snižují, vsolovací činidla zvyšují. Výslednou závislost teploty zakalení na koncentraci soli (c_{salt}) lze rozdělit na lineární a nelineární část, přičemž z nelineární části lze vypočítat disociační konstantu K_D. Pokud je závislost LCST na c_{salt} čistě lineární, předpokládáme nekonečně velkou K_D, tedy nulovou interakci soli s peptidem.

Analogicky k LCST experimentům lze monitorovat posun pozic protonů v NMR spektrech (Δδ) jako funkci koncentrace solí. Opět se naměřená data rozdělí na lineární a nelineární část a vypočte se disociační konstanta. Oproti LCST experimentům má NMR tu výhodu, že rozlišuje chemicky odlišné protony v různých částech molekuly, tudíž lze pro každou takovou část vypočítat vlastní disociační konstantu a ne pouze sledovat efekt soli na celou molekulu. Bohužel NMR posuny protonů vlivem solí jsou na hraně měřitelnosti, a proto kladou obrovské nároky na technické vybavení a preciznost měření. Problém také způsobují vyměnitelné protony na heteroatomech (např. NH peptidové vazby) a fakt, že naměřené efekty solí na NMR spektra jsou velmi lokální (závislost r^{-4})[27,28].

Infračervená spektroskopie (IČ) představuje alternativu k NMR měřením, jelikož dokáže sledovat i jiné typy atomů v molekule než protony (např. kyslík v karbonylové či karboxylové skupině), lokální charakter měření ale zůstává[29]. Podobně jako v předchozím případě se zaznamenávají změny v posunech IČ spekter v závislosti na koncentraci solí, z nichž lze vypočítat disociační konstantu iontu k danému atomu či skupině atomů. Na závěr musíme uvést X-ray krystalografii, díky které máme k dispozici geometrická upořádání atomů studovaných proteinů, která slouží jako výchozí bod pro molekulové simulace. Je ale dobré zdůraznit, že krystalizace proteinů probíhá za specifických podmínek, tudíž výsledná geometrie nemusí odpovídat skutečnosti v roztoku. Navíc se sodné kationty často zaměňují za vodu, protože mají podobnou elektronovou hustotu. Nicméně při vhodném zkombinování výše uvedených metod a počítačových simulací lze dosáhnout těch nejlepších výsledků.

2.4 Výsledky a diskuze

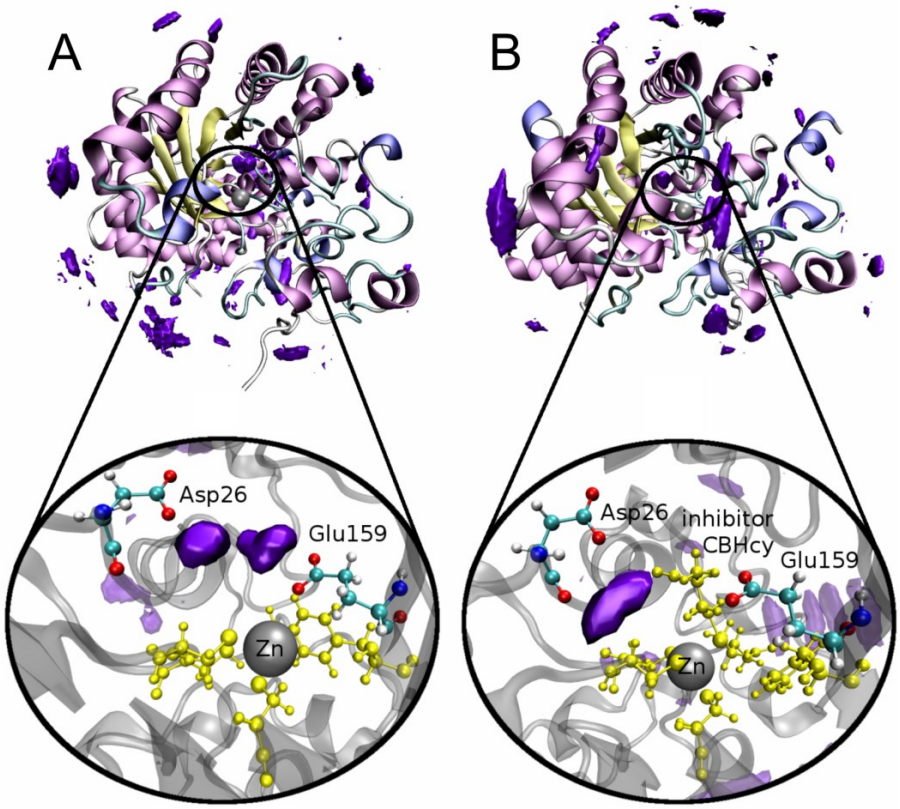
2.4.1 Interakce iontů s proteiny

První polovina výsledků je zaměřena na specifické interakce iontů s proteiny a ovlivnění enzymatické aktivity. Betain-homocystein-metyl-transferáza (BHMT) je enzym, který produkují játra a ledviny zvířat s jednokomorovým žaludkem[30]. BHMT katalyzuje metylaci homocysteinu v aktivním místě enzymu, které obsahuje zinečnatý kation, čímž vzniká metionin, látka potřebná pro náš organismus[31]. Naši kolegové z Ústavu organické chemie a biochemie měřili rychlost enzymatické reakce BHMT v různých solích a objevili nečekaný výsledek. Draselné ionty několikanásobně urychlují enzymatickou aktivitu BHMT, rubidné a amonné ionty mají pouze malý efekt, zatímco zbylé monovalentní kationty nemají účinek žádný[32]. Tento výsledek je v rozporu s Hofmeisterovou řadou kationtů, což nás motivovalo přijít s vysvětlením na základě molekulových simulací.

Vycházeli jsme z krysí[33] a lidské[34] krystalové struktury BHMT (tetramer), vybrali monomerickou část a molekulovou dynamickou vzorkovali, kde a jak silně se různé kationty vážou na strukturu BHMT. Zatímco všechna interakční místa nalezená na povrchu proteinu interagují s kationty

v souladu s Hofmeisterovou řadou (Na^+ > K^+ > Rb^+), v blízkosti aktivního centra enzymu jsme identifikovali vazebné místo, kde toto pravidlo neplatí (mapa draselných iontů kolem BHMT struktury je ukázána na Obr. 2A). Když jsme určili průměrný počet kationtů vazaných v blízkosti aktivního místa na negativně nabitá rezidua (Asp26 a Glu159), získali jsme výsledek odpovídající experimentálnímu pozorování – draselný kationt se v daném místě zdržuje nejvíce, rubidný kationt méně často a sodný kationt nejméně. Jak efektivně kationt interaguje s rezidui v blízkosti aktivního místa vychází z hydratačních vlastností každého kationtu. Na^+ je permanentně hydratován 6 vodami, v důsledku čehož se pohybuje a interaguje jako iont s největším hydratačním poloměrem. K^+ snadno obětuje 2 z jeho vodních molekul, díky čemuž má nejmenší hydratační poloměr a je schopný efektivně interagovat s negativně nabitými rezidui aktivního místa. Rb^+ také snadno ztrácí 2 molekuly vody, ale jeho atomový poloměr je větší než draslíku, tím pádem i hydratační poloměr je vyšší, což oslabuje jeho schopnost interakce s klíčovými rezidui[32].

V následných simulacích jsme prozkoumali, jak se situace v aktivním místě změní, pokud se do něj naváže substrát/inhibitor[35]. Z Obr. 2 vyplývá, že inhibitor stericky brání jedno z původních míst interakce s draselným kationtem (Glu159), proto jediným vazebným místem zůstává Asp26. Na základě tohoto výsledku jsme navrhli mutace okolních reziduí, které měli potvrdit, že právě toto místo je klíčové pro urychlení enzymatické aktivity BHMT v přítomnosti draselných kationtů. Všechny navržené mutované verze enzymu měly nulovou či velmi nízkou aktivitu, na rozdíl od případu, kdy bylo zmutováno reziduum v blízkosti aktivního místa ale nepodílející se na vázání draselného kationtu. Na závěr krystalografové potvrdili námi předpovězené vazebné místo pro K^+.



Obr. 2: Hustotní mapy draselného kationtu kolem BHMT enzymu jsou vykresleny fialovou barvou tak, že jsou zobrazena pouze místa, kde je pravděpodobnost výskytu minimálně 10x vyšší než v roztoku. Klíčová vazebná místa v blízkosti aktivního místa enzymu jsou zvětšena v části A pro samostatný enzym (Asp26 a Glu159), v části B za přítomnosti inhibitoru CBHcy (Asp26). Zinečnatý kationt (v šedé) a jeho ligandy včetně inhibitoru (žlutě) tvoří aktivní místo BHMT enzymu.

Na rozdíl od BHMT mají kationty na enzymatickou aktivitu dalšího studovaného enzymu, LinB dehalogenázy, pouze malý účinek, který odpovídá hofmeistrovskému řazení ($Na^+ > K^+ > Rb^+ > Cs^+$). Podobně jako v předchozím případě jsme zjišťovali pomocí molekulové dynamiky, kde kationty s enzymem interagují a jak mohou rychlost enzymatické reakce ovlivňovat. Ze simulací vyplývá, že kationty se skrz úzký tunel nedostanou až k aktivnímu místu a zůstávají pouze u ústí tohoto tunelu. Na základě mutací několika aminokyselin v ústí tunelu jsme ukázaly, že právě zde dochází ke klíčovému vázání kationtů[36]. Když jsme zvýšili negativní náboj u ústí tunelu, zvýšili jsme tím i počet navázaných kationtů a naopak, při snížení negativního náboje identifikované místo interakce zmizelo. Efekt je ale velmi lokální, protože uvedené mutace nezmění hustotní mapy kationtů ve zbylých částech enzymu. Experimentálně bylo dokázano, že zvýšením negativního náboje u ústí tunelu dochází ke snížení substrátové inhibice, což je v souladu s našimi pozorováními.

LinB dehalogenáza katalyzuje přeměnu alkylhalogenidů na alkoholy bez přítomnosti jakéhokoliv kofaktoru[37]. Vedlejšími produkty reakce jsou halogenidové ionty a protony, které musí před začátkem nového cyklu aktivní místo opustit. Abychom prostudovali tento proces, spočítali jsme profily volné energie halogenidových iontů (Cl^-, Br^- a I^-) opouštějících aktivní místo enzymu skrz tunel až do roztoku. Jelikož jsou možné dva protonační stavy histidinu v aktivním místě enzymu, provedli jsme dvě série výpočtů volných energií pro všechny halogenidy. V blízkosti aktivního místa jsou dvě rezidua, která stabilizují halogenid ihned po jeho vzniku[38], z výpočtů volných energií pak vyplývá, že v následujícím pořadí: $I^- > Br^- > Cl^-$. Tento výsledek byl potvrzen i experimentálně na základě fluorescentních měření[39]. Navíc jsme ukázali, že všechny halogenidy opouštějí aktivní místo stejným tunelem s podobnými profily volné energie, a že jsou více stabilizovány u aktivního místa enzymu než v roztoku. Protonační stav katalytického histidinu má nezanedbatelný efekt na profily volné energie halogenidů. Pokud je His272 pozitivně nabitý, vytváří další místo, kde jsou halogenidy stabilizovány na jejich cestě ven z nitra enzymu, pokud je His272 neutrální, žádná interakce s ionty není pozorována. V současné době zkoumáme, jak aktivní místo opouští vznikající protony.

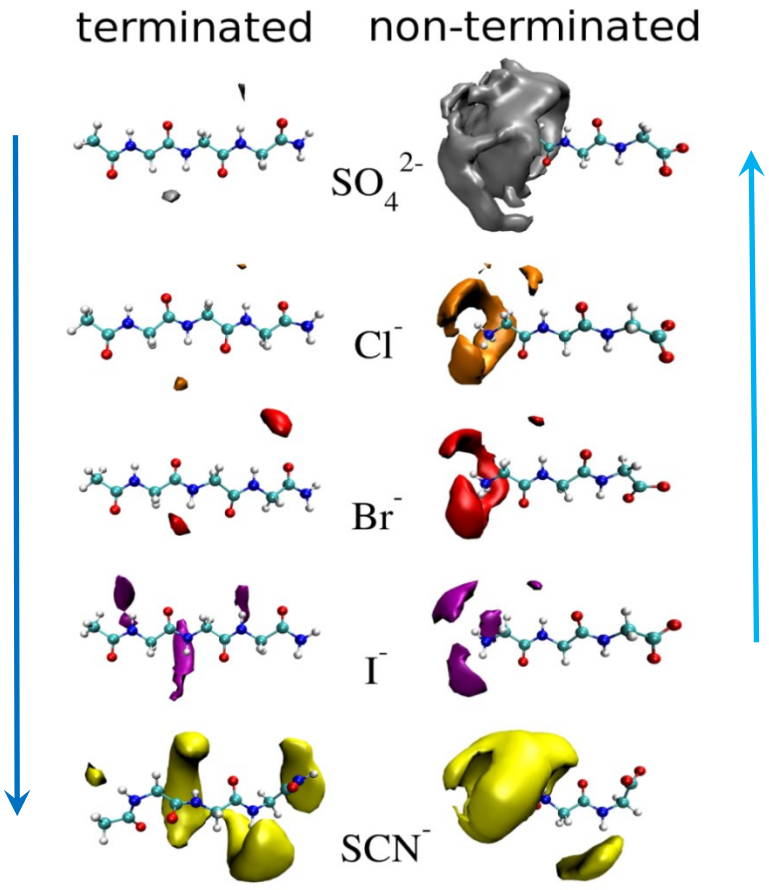
2.4.2 Interakce iontů s peptidy

Na rozdíl od předcházejích výsledků je tato část věnována systematické studii interakcí hofmeistrovských iontů s povrchy peptidů. Jako největší modelový systém byl experimentálně studován polypeptid elastinového typu $(VPGVG)_{120}$, na němž byla naměřena data pomocí LCST a NMR technik[40]. Získaná data vypovídají o tom, jak tři sodné soli (NaSCN, NaCl a Na_2SO_4) ovlivňují teplotu zakalení (ΔT) a posuny píků v NMR spektrech ($\Delta\delta$). LCST měření ukázala, že nelineární chování je pozorovatelné pouze v roztoku NaSCN, z čehož lze usuzovat na specifické interakce thiokyanátu s povrchem polypeptidu. NMR data navíc naznačují, že vodíky alfa uhlíku peptidové vazby vykazují nejvíc nelineární chování v NaSCN, lehce nelineární závislost v NaCl a čistě lineární křivku získáme v Na_2SO_4. Naopak lineární závislost ve všech studovaných solích získáme pro protony valinového postranního řetězce.

Abychom prostudovali interakce iontů s polypeptidem, použili jsme klasické molekulové simulace, které zmapovaly, se kterými částmi ELP monomeru anionty interagují. Z hustotních map aniontů, proximálních distribučních funkcí a Γ koeficientů jsme dospěli k těmto závěrům: SCN^- je přitahován k povrchu peptidu a intergauje především s peptidovou vazbou (NH skupinou a sousedící C_α), zatímco je odpuzován od nepolárních částí valinu. Cl^- a zejména SO_4^{2-} jsou v průměru odpuzovány od všech částí molekuly, nejvíce ale od povrchu valinových reziduí. Všechny výsledky jsou tak v souladu s experimentálními předpoklady, navíc ale poskytují informaci o vyměnitelných protonech (NH) a rozlišují nulovou interakci s peptidem od odpuzování iontů z povrchu peptidu.

Jak se ukázalo, v případě neutrálních polypeptidů dominuje interakce aniontů s peptidovou páteří, proto jsme se rozhodli kvantifikovat vázání hofmeisterovských aniontů na peptidovou vazbu separátně. Zvolili jsme si molekulu triglycinu s oběma chránícími skupinami jako model peptidové vazby a vzorkovali, kde se jednotlivé anionty vážou pro 5 různých sodných solí (NaSCN, NaI, NaBr, NaCl a Na_2SO_4). Naše výsledky jsme pak porovnali s disociačními konstantami získanými z NMR experimentů[41]. Vyvozené závěry potvrzují a rozšiřují předchozí pozorování: čím slaběji hydratovaný aniont, tím více se váže na peptidovou páteř ($SCN^- > I^- > Br^- > Cl^- > SO_4^{2-}$). Sulfát jakožto nejsilněji hydratovaný anion je dokonce odpuzován od peptidové páteře, čímž se stává dobrým vysolovacím činidlem. Chlorid a bromid se chovají jako neutrální anionty, které s peptidovou vazbou neinteragují vůbec nebo jen velmi zřídka. Jodid a nejvíce thiokyanát jsou silně přitahovány k peptidové páteři, proto s ní velmi intenzivně interagují, což způsobuje vsolovací efekt těchto sodných solí. Mapy všech aniontů okolo chráněného (terminated) triglycinu jsou ukázány na Obr. 3.

Většina proteinů a peptidů obsahuje kromě neutrálních částí také nabitá rezidua. Abychom určili, jak se anionty vážou v přítomnosti pozitivně nabitých (lysin) a negativně nabitých (aspartát a glutamát) reziduí, nechráněný triglycin posloužil jako modelový systém. Z výsledků plyne[41], že coulombické interakce (náboj-náboj) řídí intenzitu vázání studovaných aniontů, a proto se nejvíc váže anion s nejvyšší nábojovou hustotou, tedy SO_4^{2-}, následovaný $Cl^- > Br^- > I^-$. Pro thiokyanát je situace více komplexní, protože jak coulombické interakce tak vázání SCN^- na páteř peptidu jsou pozorovány ve velké míře, čímž vzniká synergický efekt, který thiokyanát řadí mimo ostatní anionty. Na Obr. 3 je ukázáno, jak se odchráněním tryglicinu převrací Hofmeisterova řada aniontů s výjimkou SCN^-.



Obr. 3: Hustotní mapy pro SO_4^{2-}, Cl^-, Br^-, I^-, and SCN^- okolo chráněného (terminated) a nechráněného (non-terminated) triglycinu demonstrují převrácení Hofmeisterovy řady iontů s výjimkou thiokyanátu.

Jak bylo uvedeno v sekci metod, přímé porovnání simulací s experimentem nabízí vysolovací konstanty k_s. Na základě publikace od Nandiho[16] ze 70. let jsme rozšířili náš výzkum na 7 sodných solí (Na_2SO_4, NaF, NaCl, NaBr, NaI, NaSCN, and $NaClO_4$) a spočítali vysolovací konstanty pro chráněný triglycin, abychom je mohli porovnat s těmi v publikaci. Naše výsledky se shodovaly s experimentálními v pěti případech[42], ne však pro sulfát a fluorid sodný. Při pátrání po důvodu této neshody jsme zjistili, že pro z poloviny odchráněný triglycin (nabitý C-konec) vysolovací konstanty souhlasí pro všechna experimentální data. Následně naši kolegové ověřili, že způsob, kterým autoři původní publikace chtěli ochránit C-konec je neúčinný a de facto tak potvrdili, že naměřené experimentální hodnoty k_s byli přisouzeny špatné sloučenině. Nám se tuto chybu podařilo odhalit na základě nesouhlasu našich dat pro silně hydratované anionty, jelikož ty jsou od nabitého C-konce odpuzovány nejvíce, a tudíž mají největší odchylku k_s konstant pro nechráněný a z poloviny chráněný triglycin.

Na závěr jsme se pokusili přijít s inovativním pohledem na interakce iontů s proteiny a navrhli jsme jak propojit kationtovou a aniontovou Hofmeisterovu řadu na základě elektroforetické (EOF) separace neutrálních molekul. Standardně se tato technika používá pro separaci nabitých částic[43] a publikované elektroforetické mobility studovaných analytů jsou vypočteny jako rozdíl elektroforetické mobilty analytu a kontrolního markeru[44]. Běžně používané markery jako dimethylsulfoxid (DMSO) nebo thiomočovina (TUR) mají ale také potenciál interagovat s ionty rozpuštěného elekrolytu[45]. My jsme ukázali, že všeobecně přijímaný předpoklad, že všechny markery se pohybují v elektrickém poli stejnou rychlostí, není pravdivý. Pomocí molekulových simulací jsme kvantifikovali, pro které soli jsou efekty zanedbatelné, a pro které je potřeba brát je v úvahu[46]. Dále jsme použili molekulu N-methylacetamidu (NMA) jako nejjednodušší model peptidové vazby, na níž jsme studovali účinek kationtů i aniontů současně. NMA se v roztoku LiAc pohybuje jako téměř neutrální molekula, z čehož vyvozujeme, že síla vázání lithného kationtu k peptidové vazbě je srovnatelná s interakcí acetátu. Tento závěr ale neplatí ani pro jeden elektroforetický marker, proto je výsledná rychlost v elektrickém poli různá pro všechny tři neutrální analyty. Molekulové simulace tak nabízejí detailní pohled a vysvětlení elektroforetických měření, na druhou stranu experimentální data umožňují ověření platnosti použitých parametrů pro ionty v počítačových simulacích.

2.5 Závěr

V této práci jsme ukázali, jak účinná může být spolupráce nejrůznějších experimentálních technik s molekulovými simulacemi, pokud se snažíme získat odpovědi na komplexní a biologicky relevantní otázky jako jsou specifické interakce iontů s proteiny a peptidy. V první části jsme se soustředili na vysvětlení experimentálních pozorování zahrnující ovlivnění enzymatické rychlosti pomocí monovalentních kationtů. Identifikovali jsme několik klíčových vazebných míst v proteinech i variaci motivů pro iontové interakce. Hofmeisterovské i nehofmeisterovské řazení iontů bylo vysvětleno pomocí molekulových simulací, navíc jsme byli schopni navrhnout účinné mutace ovlivňující enzymatickou aktivitu pro oba studované enzymy.

Ve druhé části jsme prezentovali systematickou studii na interakce aniontů s peptidy a kvantifikovali disociační konstanty iontů vázaných na páteř peptidu i postranní řetězce. Z faktu, že dokážeme převrátit Hofmeisterovu řadu aniontů odchráněním modelového triglycinu, dedukujeme, že lze dosáhnout žádaných vlastností proteinů pouhou změnou pH roztoku či bodovými mutacemi. Do budoucna je potřeba se zaměřit na další aspekty jdoucí za jednoduché principy Hofmeisterovy řady, jako jsou interakce kationtů s anionty v roztoku i na povrchu proteinů/peptidů. Inovativní přístupy pomáhají poskytnout nový svěží pohled na danou problematiku, jak jsme ukázali na příkladu elektroforetických měření a výpočtů.

References / Použitá literatura

1. Jungwirth, P., Cremer, P.: *Nature Chem.* **6**, 261-263 (2014).
2. Hofmeister, F.: *Arch. Exp. Pathol. Pharmakol. (Leipzig)* **24,** 247–260 (1888).
3. Hofmeister, F.: *Arch. Exp. Pathol. Pharmakol. (Leipzig)* **25,** 1–30 (1888).
4. Cox, W. M. & Wolfenden, J. H.: *Proc. R. Soc. London A* **145,** 475–488 (1934).
5. Gurney, R. W.: *Ionic Processes in Solution* (McGraw-Hill, 1953).
6. Marcus, Y.: *Chem. Rev.* **109,** 1346–1370 (2009).
7. Hribar, B., Southall, N. T., Vlachy, V. & Dill, K. A.: *J. Am. Chem. Soc.* **124,** 12302–12311 (2002).
8. Thomas, A. S. & Elcock, A. H.: *J. Am. Chem. Soc.* **129,** 14887–14898 (2007).
9. Omta, A. W., Kropman, M. F., Woutersen, S. & Bakker, H. J.: *Science* **301,** 347–349 (2003).
10. Funkner, S. *et al.: J. Am. Chem. Soc.* **134,** 1030–1035 (2012).
11. Rieskautt, M. M. & Ducruix, A. F.: *J. Biol. Chem.* **264,** 745–748 (1989).
12. Zhang, Y. J. & Cremer, P. S.: *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **106,** 15249–15253 (2009).
13. Bello, J. & Bello, H. R.: *Nature* **190,** 440–441 (1961).
14. Bello, J. & Bello, H. R.: *Nature* **194,** 681–682 (1962).
15. Robinson, D. R. & Jencks, W. P.: *J. Am. Chem. Soc.* **87,** 2470–2479 (1965).
16. Nandi, P. K. & Robinson, D. R.: *J. Am. Chem. Soc.* **94,** 1299–1308 (1972).
17. Kunz, W., Henle, J., Ninham B. W.: *Curr. Opin. in Colloid & Interf. Sci.* **9**, 19-37 (2004).
18. Baldwin, R. L.: *Biophys. J.* **71,** 2056–2063 (1996).
19. Street, T. O., Bolen, D. W. & Rose, G. D.: *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **103,** 13997–14002 (2006).
20. Pegram, L. M. & Record, M. T.: *J. Phys. Chem. B* **112,** 9428–9436 (2008).
21. Kalcher, I., Horinek, D., Netz, R. R. & Dzubiella, J.: *J. Phys. Condens. Matter* **21,** 424108 (2009).
22. P. K. Mehrotra, P. K., Beveridge, D. L.: *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 4287–4294 (1980).
23. Pierce, V., Kang, M., Aburi, M., Weerasinger, S., Smith, P.E.: *Cell Biochem. Biophys*. **50**, 1–22 (2008).
24. Smith, P. E., Mazo, R. A.: *J.of Phys.Chem. B* **112**, 7875-7884 (2008).
25. Meyer, D.E., Chilkoti, A.: *Nature Biotechnology*, **17**, 1112-1115 (1999).
26. Cho, Y.H., Zhang, Y.J., Christensen, T., Sagle, L.B. Chilkoti, A., Cremer, P.S.: *J. Phys. Chem. B*. **112**, 13765-13771 (2008).
27. Dengler, S., Klaus, A., Tiddy, G. J. T., Kunz, W.: *Faraday Discuss.* **160**, 121-133 (2012).
28. Holz, M., Grunder, R., Sacco, A., Meleleo, A.: *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **89**, 1215-1222 (1993).
29. Okur, H. I., Kherb, J., Cremer, P. S.: *J. Am. Chem. Soc*. **135**, 5062-5067 (2013).
30. Delgado-Reyes, C., Wallig, M. A., Garrow, T. A.: *Arch. Biochem. Biophys.* **393**, 184-186 (2001).
31. Petrossian, T. C., Clarke, S. G.: *Mol. Cel. Proteomics* **10**, 1-12 (2011).
32. Mladkova, J., Hladilkova, J., Diamond, C. E., Tryon, K., Yamada, K., Garrow, T. A., Jungwirth, P., Koutmos, M., Jiracek, J.: *Proteins*, in press (2014).
33. Gonzáles, B., Pajares, M.A., Matínez-Ripoll M.M., Blundell, T.L., Sanz-Aparicio J.: *J. Mol. Biol.* **338**, 771-782 (2004).
34. Evans, J. C., Huddler, D. P., Jiracek, J., Castro, C., Millian, N., Garrow, T. A., Ludwig, M. L.: *Structure* **10**, 1159-1071 (2002).

35. Jiracek, J., Collinsova, M., Rosenberg, I., Budesinsky, M., Protivinska, E., Netusilova, H., Garrow, T. A.: *J. Med. Chem.* **49**, 3982-3989 (2006).
36. Stepankova, V., Paterova, J., Damborsky, J., Jungwirth, P., Chaloupkova, R., Heyda, J.: *J. Phys. Chem. B* ***117***, 6394-6402 (2013).
37. Damborsky, J., Rorije, E., Jesenska, A., Nagata, Y., Klopman, G., Peijnenburg, W.: *Environ. Toxicol. Chem.* **20**, 2681-2689 (2001).
38. Chaloupkova, R., Sykorova, J., Prokop, Z., Jesenska, A., Monincovaa, M., Pavlova, M., Tsuda, M., Nagata, Y., Damborsky, J.: *J. Biol. Chem.* **278**, 52622-52628 (2003).
39. Hladilkova, J., Prokop, Z., Chaloupkova, R., Damborsky, J., Jungwirth, P.: *J. Phys. Chem. B* **117**, 14329-14335 (2013).
40. Rembert, K., Paterova, J., Heyda, J., Hilty, C., Jungwirth, P., Cremer, P. S.: *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 10039-10046 (2012).
41. Paterova, J., Rembert, K., Heyda, J., Kurra, Y., Okur, H. I., Liu, W. R., Hilty, C., Cremer, P. S., Jungwirth, P.: *J. Phys. Chem. B* **117**, 8150-8158 (2013).
42. Hladilkova, J., Heyda, J., Rembert, K., Okur, H. I., Kurra, Y., Liu, W. R., Hilty, C., Cremer, P. S., Jungwirth, P.: *J. Phys. Chem. Lett.* **4**, 4069-4073 (2013).
43. Ghosal, S.: *Electrophoresis* **25**, 214-228 (2004).
44. Williams, B. A., Vigh, C.: *Anal. Chem.* **68**, 1174-1180 (1996).
45. Beckers, J. L., Everaerts, F. M., Ackermans, M. T.: *J. Chromatogr.* **537**, 407-428 (1991).
46. Krizek, T., Kubickova, A., Hladilkova, J., Coufal, P., Heyda, J., Jungwirth, P.: *Electrophoresis* **35**, 617-624 (2014).

Curriculum vitae

Name: **Jana Hladílková**
Born: March 25, 1986 in Most
Email: jana.hladilkova@uochb.cas.cz
Adress: Vokrojova 8, Praha 12, 143 00

Education:

Since **2010**:
Ph.D. student at the Faculty of Science, Charles University in Prague, study program: Modeling of Chemical Properties of Nano- and Biostructures, advisor: Pavel Jungwirth

Since **2010**:
Member of the International Max Planck Research School "Dynamical Processes in Atoms, Molecules and Solids" in Dresden

2008 - 2010:
Master of Science, Studies in Organic Chemistry at the Faculty of Chemical Technology, Institute of Chemical Technology in Prague.
Diploma Thesis: *Imidazolium salts modified with perfluoropolyethers* (advisor: Doc. Jaroslav Kvíčala)

2008 - 2010:
Bachelor of Science, Studies in Pedagogy at the Faculty of Pedagogy, Institute of Chemical Technology in Prague.
Bachelor Thesis: *Family trough the eyes of today´s undergraduates* (advisor: Jaroslava Pstružinová PhDr. CSc.)

2005 - 2008:
Bachelor of Science, Studies in Organic Chemistry at the Faculty of Chemical Technology, Institute of Chemical Technology in Prague.
Bachelor Thesis: *Nucleophilic substitution of cyclic sulfates with perfluorinated organometallic reagents* (advisor Doc. Jaroslav Kvíčala)

Work experience:

- *Since **2010***: Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic
- ***Nov. 2012 / Sep. 2014**:* neutron scattering data measurements in Grenoble (advisor: Phil Mason)
- ***Dec. 2013 – Feb. 2014***: Lund University, Sweden (Dr. Mikael Lund)

Awards:

- Poster prize at the XIX. International Conference on "Horizons in Hydrogen Bond Research" in Goettingen, 2011
- Prize for the best oral contribution at the IOCB retreat, Czech Republic, 2014

Selected Publications / Seznam publikací

1. Rembert, K.; Paterová, J.; Heyda, J.; Hilty, C.; Jungwirth, P.; Cremer, P. S.: The Molecular Mechanisms of Ion-Specific Effects on Proteins. *Journal of the American Chemical Society*, **2012**, *134*, 10039.

2. Štěpánková, V; Paterová, J.; Damborský, J.; Jungwirth, P.; Chaloupková, R.; Heyda, J.: Cation Specific Effects on Enzymatic Catalysis Driven by Interactions at the Tunnel Mouth. *Journal of Physical Chemistry B*, **2013**, *117*, 6394.

3. Paterová, J.; Rembert, K.; Heyda, J.; Kurra, Y.; Okur, H. I.; Liu, W. R.; Hilty, C.; Cremer, P. S.; Jungwirth, P.: Reversal of the Hofmeister Series: Specific Ion Effects on Peptides. *Journal of Physical Chemistry B*, **2013**, *117*, 8150.

4. Hladílková, J.; Prokop, Z.; Chaloupková, R.; Damborský, J.; Jungwirth, P.: Release of Halide Ions From the Buried Active Site of the Haloalkane Dehalogenase LinB Revealed by Stopped-Flow Fluorescence Analysis and Free Energy Calculations. *Journal of Physical Chemistry B*, **2013**, 117, 14329.

5. Hladílková, J.; Heyda, J.; Rembert, K.; Okur, H. I.; Kurra, Y.; Liu, W. R.; Hilty, C.; Cremer, P. S.; Jungwirth, P.: Effects of End-Group Termination on Salting-Out Constants for Triglycine. *Journal of Physical Chemistry Letters* **2013**, *4*, 4069.

6. Křížek, T.; Kubíčková, A.; Hladílková, J.; Coufal, P.; Heyda, J.; Jungwirth, P.: Electrophoretic mobilities of neutral analytes and electroosmotic flow markers in aqueous solutions of Hofmeister salts. *Electrophoresis* **2014**, *35*, 617.

7. Mládková, J.; Hladílková, J.; Diamond, C. E.; Tryon, K.; Yamada, K.; Garrow, T. A.; Jungwirth, P.; Koutmos, M.; Jiráček, J.: Specific Potassium Ion Interactions Facilitate Homocysteine Binding to Betaine-Homocysteine *S*-Methyltransferase. *Proteins,* **2014**, in press (DOI: 10.1002/prot.24619).