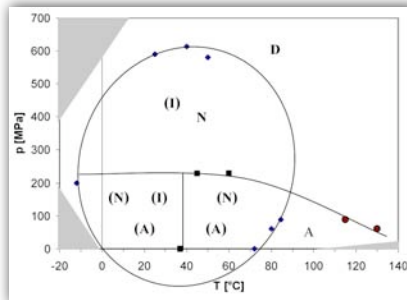


Smeller László

Fehérje folding és aggregáció vizsgálata infravörös spektroszkópia alkalmazásával valamint a nyomás, mint termodinamikai paraméter variálásával.

Biológiai rendszerekben a fehérjékhez köthető folyamatok általában állandó hőmérsékleten és nyomáson zajlanak le. Ez azonban nem zárja ki azt, hogy a fehérjék tulajdonságairól többet tudjunk meg azáltal, hogy a szervezetben uralkodótól eltérő fizikai paraméterek mellett vizsgáljuk azokat. A fehérjék hőmérséklettől függő tulajdonságainak vizsgálatára irányuló mérések a modern biofizika világában mindennaposak. Ehhez képest indokolatlanul kevés munka vizsgálja a másik – tulajdonképpen a hőmérséklettel egyenrangú – termodinamikai paraméternek, a nyomásnak a biológiai rendszerekre kifejtett hatását. A biofizikai mérések szempontjából releváns nyomástartomány az atmoszferikus nyomás ezer ill. tízezerszereséig terjed. Ebben a 100 MPa – 1 GPa nyomástartományban vizsgáltuk a nyomásnak a fehérjékre kifejtett különböző hatásait elsősorban infravörös spektroszkópiai mérésekkel. Az enzimfehérjék egyik sajátos tulajdonsága az, hogy nagy nyomás hatására ugyanúgy elveszítik az enzimműködéshez szükséges térszerkezetüket, ahogy az magas hőmérsékleten is bekövetkezik.

A kutatás egyik fő iránya ennek a nyomás-denaturációnak a jellemzése, termodinamikai paramétereinek meghatározása, valamint a fehérje szerkezetében nagy nyomás alatt létrejövő elasztikus és plasztikus konformáció-változásainak meghatározása. Megvizsgáltuk például, hogy a tormaperoxidáz enzim módosításai (szubsztrát kötés, a hem helyettesítése, Ca^{2+} eltávolítás, stb.) hogyan befolyásolják a fehérje stabilitását. A nyomás függvényében végzett hidrogén-deutérium kicserélődési mérésekkel kimutattuk azt is, hogy a fehérjének van egy stabil magja, amelynek natív állapotban nagyon korlátozott dinamikája van [1]. A vizsgálatok egy másik része a fehérjék általánosan elfogadott elliptikus fázisdiagramjának kiterjesztésére irányul, mely során figyelembe vettük az intermedier fehérje-konformációkat is, valamint megpróbáltuk leírni az egyedi fehérjeláncok közti kölcsönhatás révén létrejött aggregált állapotot is [2]. Megállapítottuk, hogy a nyomás a fehérjeaggregáció ellen hat, a már kialakult fehérje-aggregátumokat disszociálja.



A mioglobin vizes oldatának általunk kibővített fázisdiagramja. N: natív, D: denaturált, I: intermedier, A: aggregált. A zárójelben levő betűk metastabil fázisokat jelölnek. A szürke részek a jég ill. a gőz tartományai.

Ehhez kapcsolódott egy oligomer szerkezetű kis hőszokk fehérje, az alfa krisztallin vizsgálata, ahol szubdenaturáló nyomáskezeléssel a chaperon hatást növelni tudtuk. Egyidejűleg infravörös spektroszkópiával az intermolekuláris kölcsönhatások lazulását mértük a nyomás hatására. Ez arra engedett következtetni, hogy a chaperon hatás szempontjából az oligomeren belüli intermolekuláris kölcsönhatások meghatározóak, hőszokk vagy nyomás-sokk által okozott felszakadásuk előmozdítja a chaperon hatás kialakulását [3]. Természetesen a külső nyomás az enzimfehérjék működését és az enzimkinetikát abban a nyomástartományban is befolyásolja, ahol a fehérje még nem denaturálódik. A nagy nyomásnak a kinetikára gyakorolt hatásából olyan, az enzimműködésre jellemző termodinamikai paraméterek számíthatók ki, mint az aktivált állapothoz kapcsolódó térfogatváltozás, ill. a biokémiai folyamathoz tartozó térfogatváltozás. Ez nagyon jól példázza, hogy a fiziológiás körülményektől nagyon eltérő környezetben végzett mérések is adhatnak olyan információt, amely a fiziológiás körülmények között lezajló reakciók fontos tulajdonságait tárja fel. A sötétben nevelt (etioltált) búza POR enzime ideális volt ilyen mérésekre, mert az enzimátikus folyamatot fényrel kontrolláltan és szinkronizáltan tudtuk indítani az egész mintában. Így az enzim-kinetikából meghatároztuk a folyamat aktivációs térfogatát és ez alapján egy molekuláris modellt tudunk valószínűsíteni [4]. A nyomás által okozott denaturáció (kitekeredés) a nyomás aggregáció-gátló hatása miatt jól használható a fehérje tekeredési ill. aggregációs kinetikai mérésekben. A nyomás-denaturált fehérje a nyomás megszüntetése után visszaindul a natív állapotába, amelyet esetenként metastabil intermedier állapotokon keresztül ér el. A humán szérumbalbumin esetén különösen stabil intermedier konformációkat találtunk [5]. Összefoglalva, a nyomás egy ritkán használt extra paraméter, amelynek a változtatásával rendszerünkről olyan paraméterek határozhatók meg, amelyek a „normál” atmoszferikus nyomású rendszerekre is releváns információt szolgáltatnak. A nyomással denaturált fehérje alkalmas rendszer a refolding és aggregáció kinetikájának tanulmányozására.

1. L. Smeller, F. Meersman, J. Fidy, K. Heremans (2003) High pressure FTIR study of the stability of horseradish peroxidase. Effect of heme substitution, ligand binding, Ca⁺⁺ removal and reduction of the disulfide bonds *Biochemistry* **370**, 859-866..
2. L. Smeller (2002) Pressure-temperature phase diagram of biomolecules *Biophys. Biochim. Acta* **1595** 11-29.
3. Cs. Böde, F. G. Tölgyesi, L. Smeller, K. Heremans, S. V. Avilov, J. Fidy (2003) Chaperone-like activity of alpha-crystallin is enhanced by high pressure treatment *Biochem. J.* **370**, 859-866.
4. Solymosi, K., Smeller, L., Ryberg, M. C., Sundqvist, C. C. Fidy, J., Böddi, B. (2007) Molecular rearrangement in POR macrodomains as a reason for the blue shift of chlorophyllide fluorescence observed after phototransformation *Biochimica et Biophysica Acta* **1768**, 1650-1658.
5. Smeller, L., Meersman, F., Heremans, K., (2008) Stable misfolded states of human serum albumin revealed by high-pressure infrared spectroscopic studies *European Biophysics Journal* **37**, 1127-1132