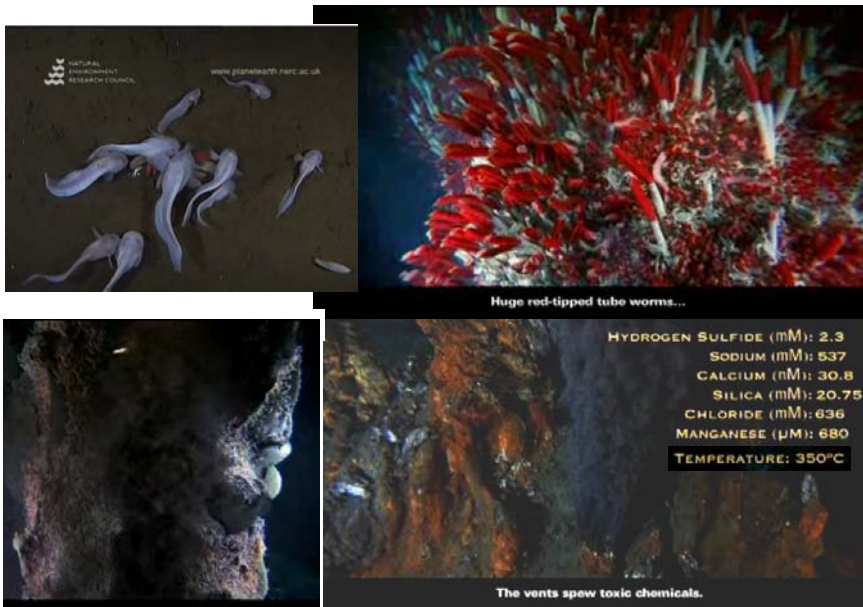


Fehérjék stabilitása:
stabilitási fázisdiagram,
extrém körülmények,
termofil és piezofil enzimek

Smeller László

Destabilizáló környezeti paraméterek

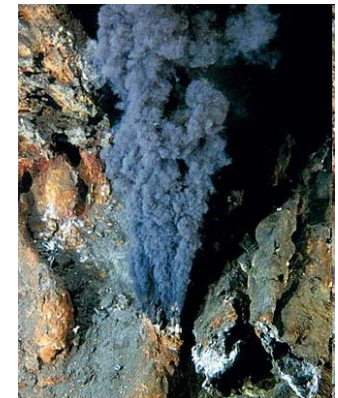
- Fizikai
 - magas hőmérséklet
 - alacsony hőmérséklet
 - nyomás
- Kémiai
 - urea (nagy koncentrációban)
 - GuHCl [guanidinium klorid] (nagy konc.)



<http://ocean.si.edu/ocean-videos/hydrothermal-vent-creatures>



Thermophiles, a type of extremophile, produce some of the bright colors of Grand Prismatic Spring, Yellowstone National Park



The first extremophile to have its genome sequenced was *Methanococcus jannaschii*, a microbe that lives near hydrothermal vents 2,600 meters below sea level, where temperatures approach the boiling point of water and the pressure is sufficient to crush an ordinary submarine. Image credit: NOAA

Fizikai paraméter: hőmérséklet

Kétállapotú modell: natív (N) és denaturált (D)

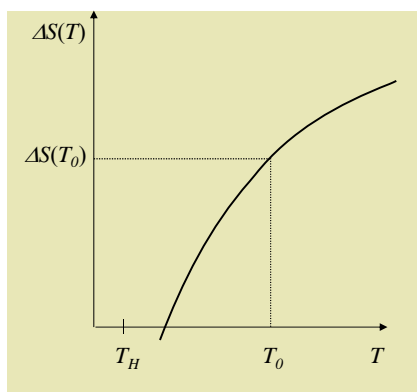
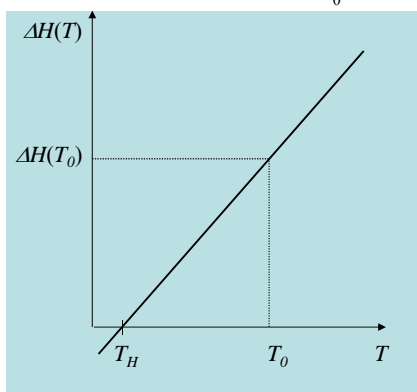
$$\Delta H(T) = H_D(T) - H_N(T)$$

$$\left. \frac{\partial \Delta H}{\partial T} \right|_p = \Delta C_p \quad \left. \frac{\partial \Delta S}{\partial T} \right|_p = \frac{\Delta C_p}{T}$$

$$\Delta H(T) = \Delta H(T_0) + \int_{T_0}^T \Delta C_p dT$$

$$\Delta S(T) = \Delta S(T_0) + \int_{T_0}^T \frac{\Delta C_p}{T} dT$$

$$\Delta H(T) = \Delta H(T_0) + \int_{T_0}^T \Delta C_p dT = \Delta H(T_0) + (T - T_0) \Delta C_p$$



$$\Delta S(T) = \Delta S(T_0) + \int_{T_0}^T \frac{\Delta C_p}{T} dT = \Delta S(T_0) + \Delta C_p \ln\left(\frac{T}{T_0}\right)$$

Válasszuk T_0 -t úgy, hogy $T_0 = 3n$:

$$G_N(T_0) = G_D(T_0)$$

$$\Delta G(T_0) = G_D(T_0) - G_N(T_0) = 0$$

(Azaz T_0 egy denaturációs hőmérséklet.)

$$\Delta G(T_0) = \Delta H_D(T_0) - T_0 \Delta S_N(T_0) = 0$$

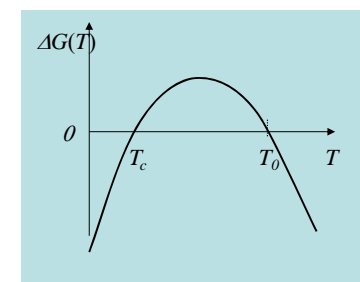
ha C_p független a hőmérséklettől:

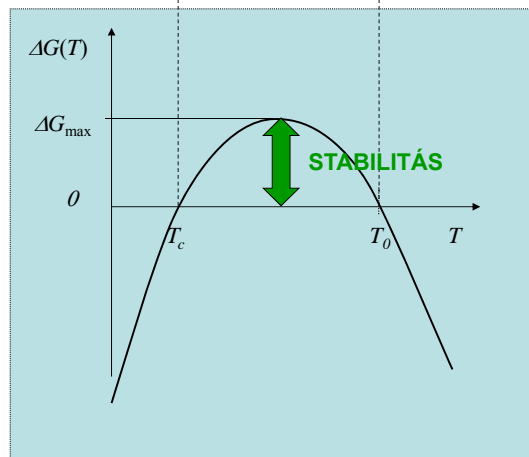
$$\Delta H(T) = \Delta H(T_0) + \int_{T_0}^T \Delta C_p dT = \Delta H(T_0) + (T - T_0) \Delta C_p$$

$$\Delta S(T) = \Delta S(T_0) + \int_{T_0}^T \frac{\Delta C_p}{T} dT = \Delta S(T_0) + \Delta C_p \ln\left(\frac{T}{T_0}\right)$$

$$\Delta G(T) = \Delta H(T) - T \Delta S(T) =$$

$$= (T - T_0)(\Delta C_p - \Delta S(T_0)) - \Delta C_p \ln\left(\frac{T}{T_0}\right) =$$





$$\frac{w_D}{w_N} = e^{-\Delta G / RT}$$

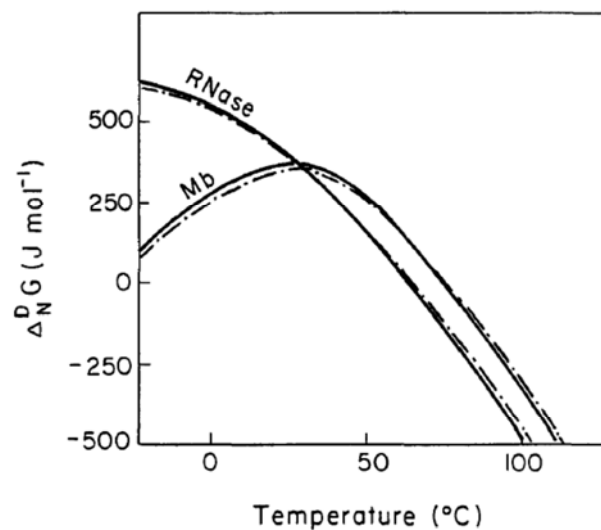
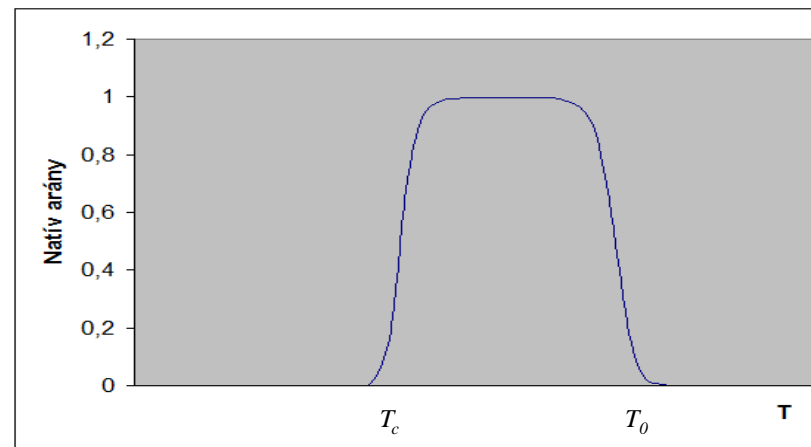
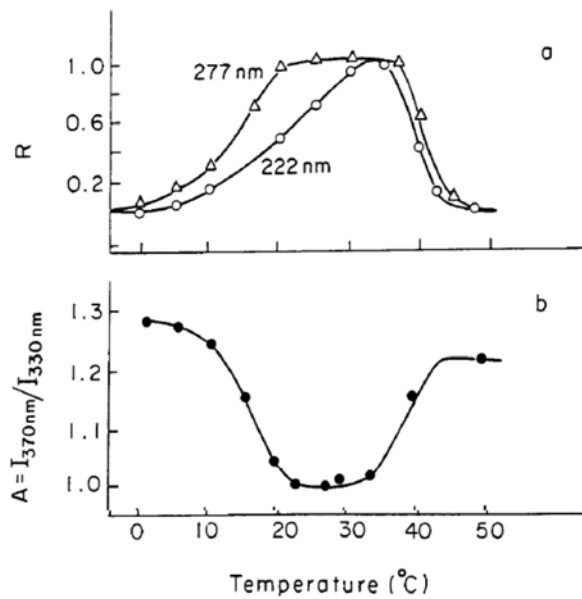


FIGURE 7. The $\Delta_N^D G$ function for RNase and Mb for the same conditions as in Figure 6 calculated from the assumption that $\Delta_N^D G_p$ is temperature independent (dot-dash line) and temperature dependent (dashed line).¹¹⁴

Hideg denaturáció

- Gyakran 0°C alatt
- Méréstechnikai problémák
- Megoldás:
 - más denaturáló ágens használata: destabilizáció, T_c emelkedik.
 - a víz fázisdiagramjának kihasználása: nyomás alatt akár -20 °C-ig le lehet menni



PGK



FIGURE 23. Temperature dependence of (a) relative changes (R) of phosphoglycerate kinase ellipticity at 222 nm (○) and 277 nm (Δ), (b) tryptophan emission spectrum maximum containing 0.7 M GuHCl.¹³³

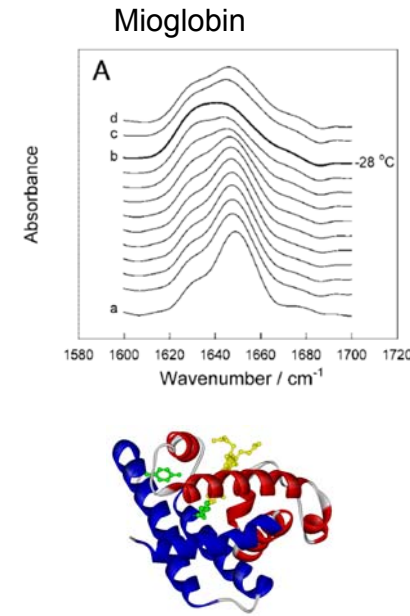


FIGURE 3 (A) Stacked plot of the deconvoluted 1600 to 1700 cm⁻¹ region of myoglobin upon cold unfolding. The sequence of the spectra is from bottom to top. All spectra were taken at 2 kbar except for the bottom [a] and top [d] spectrum, which are taken at atmospheric pressure and 20°C before and after the cold unfolding, respectively. The temperatures at which each spectrum was taken are 20, 15, 11, 5, 0, -5, -10, -15, -20, -25, [b] -28, [c] 10, and [d] 20°C. Spectrum [c] is taken at 2 kbar and 10°C after the cold unfolding. (B) Intensity of the band at 1650 cm⁻¹ versus decreasing temperature. Dots are the experimental data, and the full line is the fitted curve.

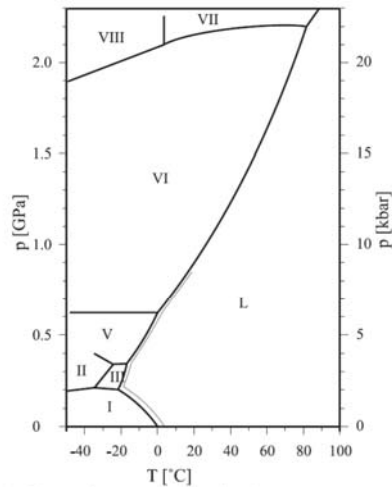
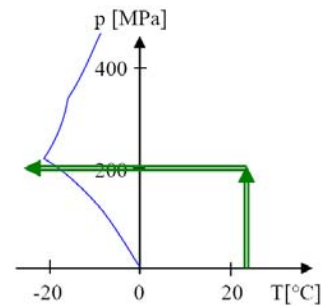


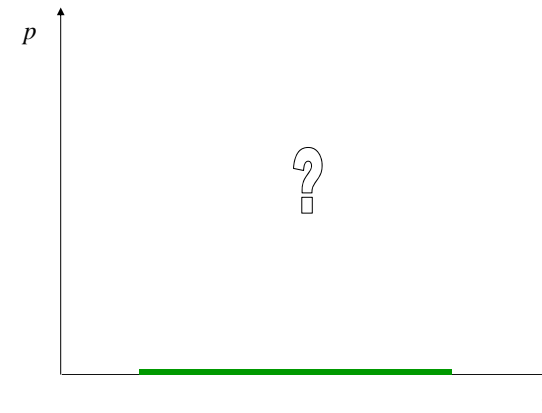
Fig. 1. Phase diagram of water in the temperature range of -50 to +100°C up to a pressure of 2.2 GPa. L refers to the liquid phase; roman numbers (I-VIII) show the different ice phases. The dotted line shows the melting curve of heavy water.

A víz fázis-diagramja



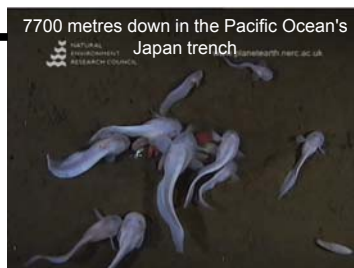
37. ábra. A hideg denaturációs útvonal a p - T síkon. A kék görbe jelzi a desztillált víz fagyásgörbéjét, amit Bridgmann (1935) mérései alapján rajzoltunk meg.

A nyomás-hőmérséklet fázisdiagram

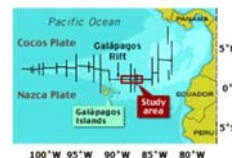


Miért érdekes a nagy nyomás?

- Miért ne?
termodin. param.
 T, p, \dots
- A bioszférában
 $p=1 \text{ bar} \dots 1 \text{ kbar}$
- Olyan adatok nyerhetők amelyek 1bar-on is értelmezhetőek
- Technikailag nehéz
- $p=1 \text{ bar}$ -os atmoszférában élünk



1 bar = 0,1 MPa 1 kbar = 100 MPa 10 kbar = 1GPa 1Mbar=100GPa



Huge red-tipped tube worms...



The vents spew toxic chemicals.

<http://ocean.si.edu/ocean-videos/hydrothermal-vent-creatures>

Milyen nagy nyomás?



emberi élet 1 bar 100 kPa



max. nyomás a bioszférában: 1 kbar 100 MPa
(mélytengerek)



fehérje szerkezetváltozások 5-10 kbar 0.5-1 GPa



a víz megfagy szobahőm.-en ≈10 kbar 1GPa



a bolygók központjában ~ Mbar 100 GPa



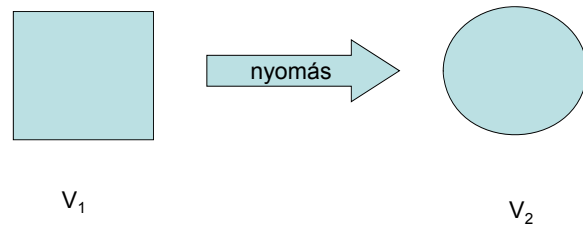
a laboratóriumban elért néhány Mbar n.100 GPa



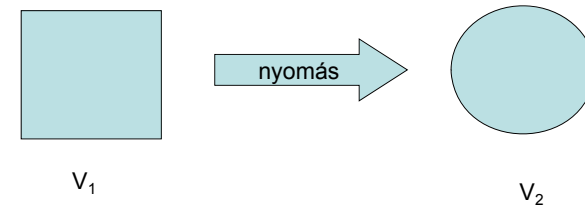
Milyen hatása van a nyomásnak?

Le-Chatelier-Braun-elv

nyomás <-> térfogat



nyomás <-> térfogat



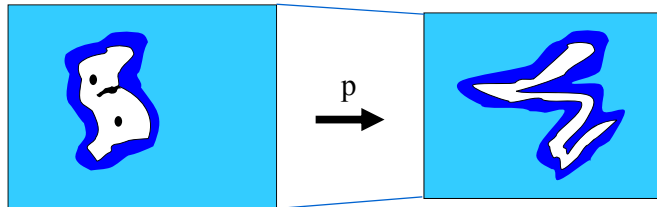
$$\left(\frac{\partial \Delta G}{\partial p}\right)_T = -RT \left(\frac{\partial \ln K}{\partial p}\right)_T = \Delta V$$

$$\ln K = -\frac{p\Delta V}{RT} + konst.$$

Milyen hatása van a nyomásnak a
fehérjékre?

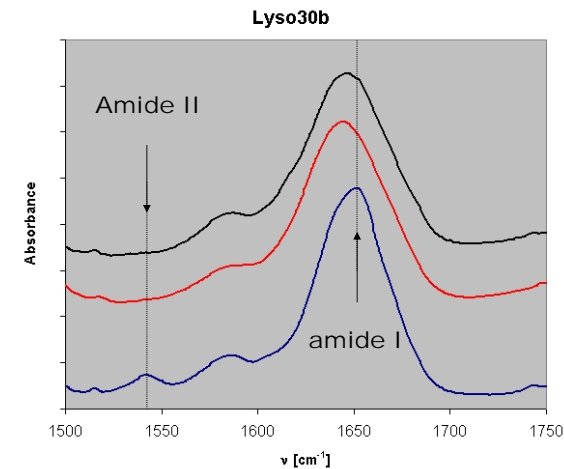
Nyomásdenaturáció

Fehérje oldatok



$$V_{\text{protein}} = V_{\text{atom}} + V_{\text{void}} + \Delta V_{\text{hydration}}$$

Nyomásdenaturáció: lizozim

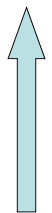


75mg/ml

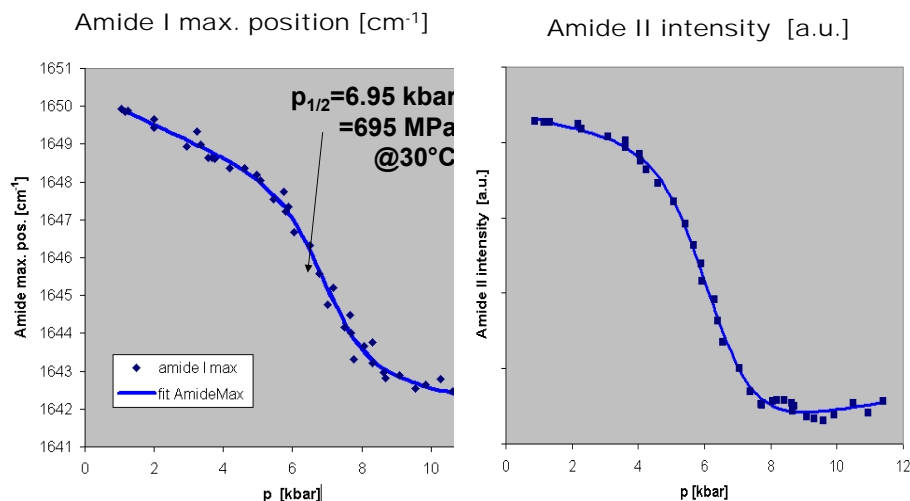
back to
0.1 MPa

900 MPa

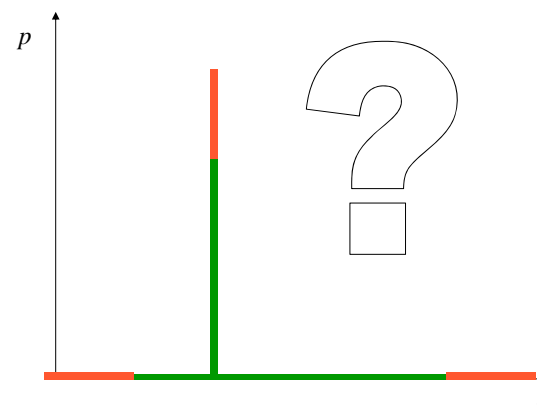
0.1 MPa



Nyomásdenaturáció: lizozim



A nyomás-hőmérséklet fázisdiagram



A hőmérsékleti és nyomásdenaturáció egységes termodinamikai leírása

A kétállapotú modell: $N \leftrightarrow D$

$$\Delta G(T) = G_D(T) - G_N(T)$$

Egy T_0 p_0 referenciapontból indulva integráljuk ki a

$$d(\Delta G) = -\Delta S dt + \Delta V dp$$

mennyiséget a T, p pontig:

$$\Delta G(T, p) = \Delta G_0 + \int_{T_0}^T \int_{p_0}^p -\Delta S dt + \Delta V dp$$

$$\begin{aligned} \Delta G = & \frac{\Delta \beta}{2} (p - p_0)^2 + \Delta \alpha (p - p_0) (T - T_0) - \\ & - \Delta C_p \left[T \left(\ln \frac{T}{T_0} - 1 \right) + T_0 \right] \\ & + \Delta V_0 (p - p_0) - \Delta S_0 (T - T_0) + \Delta G_0 \end{aligned}$$

ahol: $\beta = (\partial V / \partial p)_T$ az ún. kompresszibilitási faktor,
 $\alpha = (\partial V / \partial T)_p = -(\partial S / \partial p)_T$ a hőtágulási együttható,
 $C_p = T(\partial S / \partial T)_p$ az állandó nyomáson mért fajhő

$T \approx T_0$ esetén:

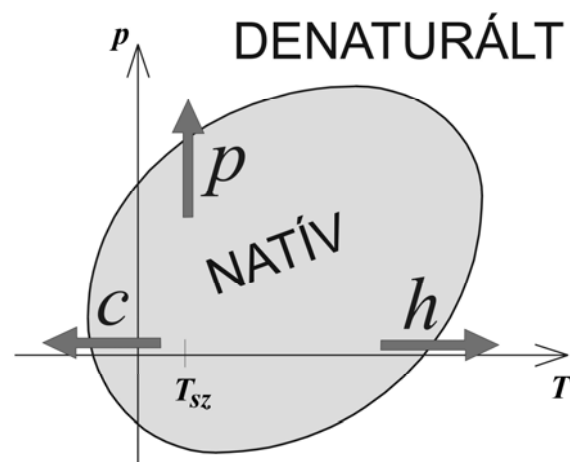
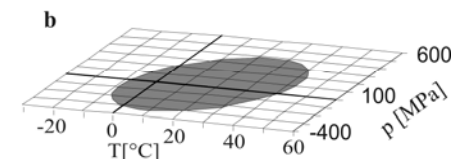
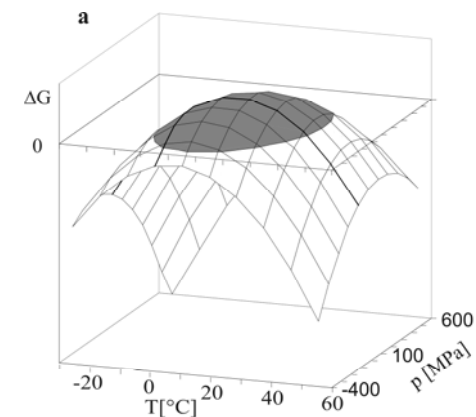
$$T \left(\ln \frac{T}{T_0} - 1 \right) + T_0 \approx \frac{(T - T_0)^2}{2T_0}$$

$$\Delta G = \frac{\Delta \beta}{2} (p - p_0)^2 + \Delta \alpha (p - p_0)(T - T_0) - \frac{\Delta C_p}{2T_0} (T - T_0)^2 + \Delta V_0 (p - p_0) - \Delta S_0 (T - T_0) + \Delta G_0$$

Másodfokú T-ben is és p-ben is!

A denaturációs pontokon: $\Delta G = 0$

Ha $\Delta \alpha^2 > \Delta C_p \Delta \beta / T_0$, akkor a $\Delta G(T, p) = 0$ pontok a T p síkon egy ellipszist határoznak meg



Mennyire igaz ez a kétállapotú modell a valódi fehérjékre, fehérjeoldatokra?

Csak egy denaturált állapot létezik?
Intermolekuláris kölcsönhatások?

Kísérleti eredmények T-p fázisdiagramokra

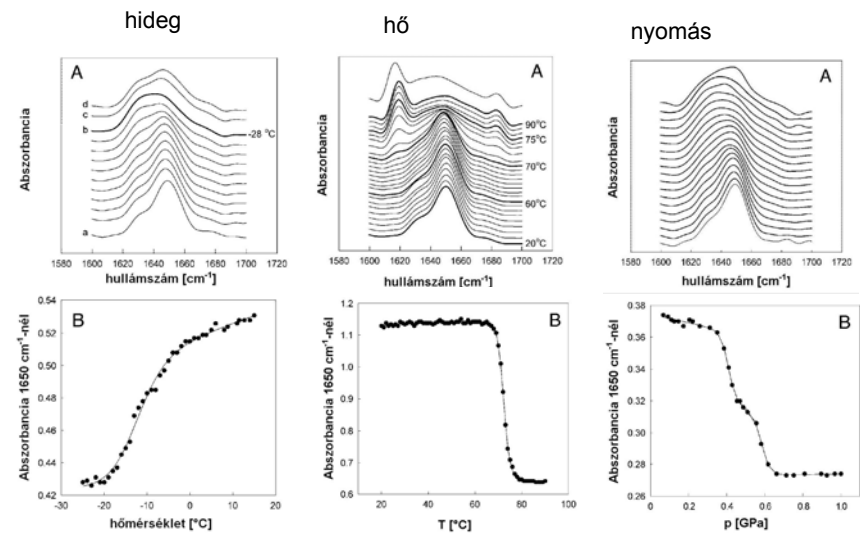
Mioglobin



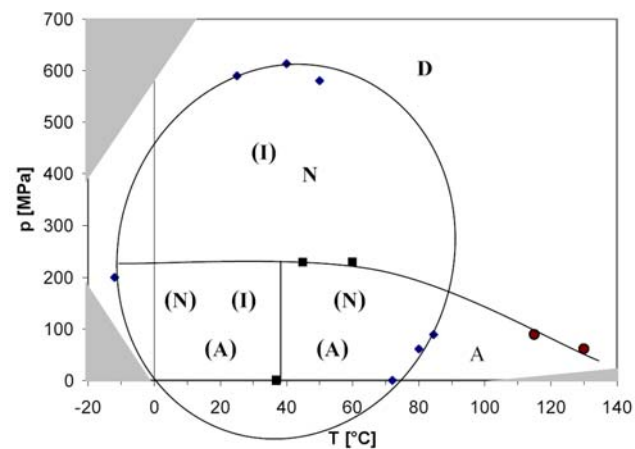
Lizozim



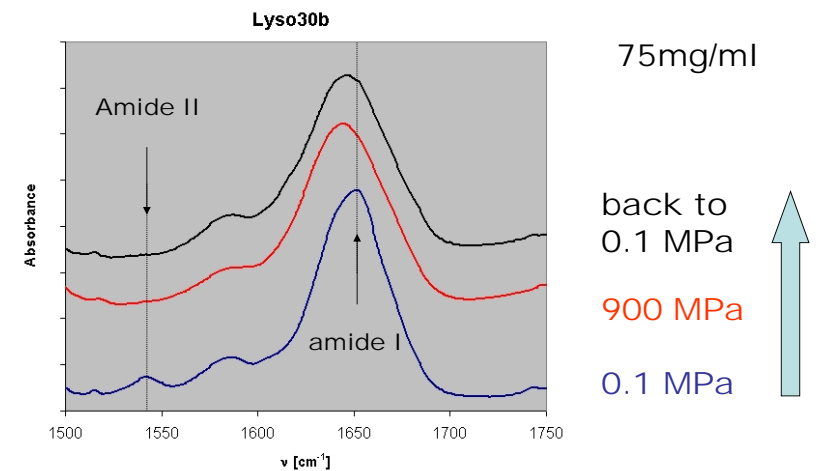
Mioglobin: FTIR spektroszkópia



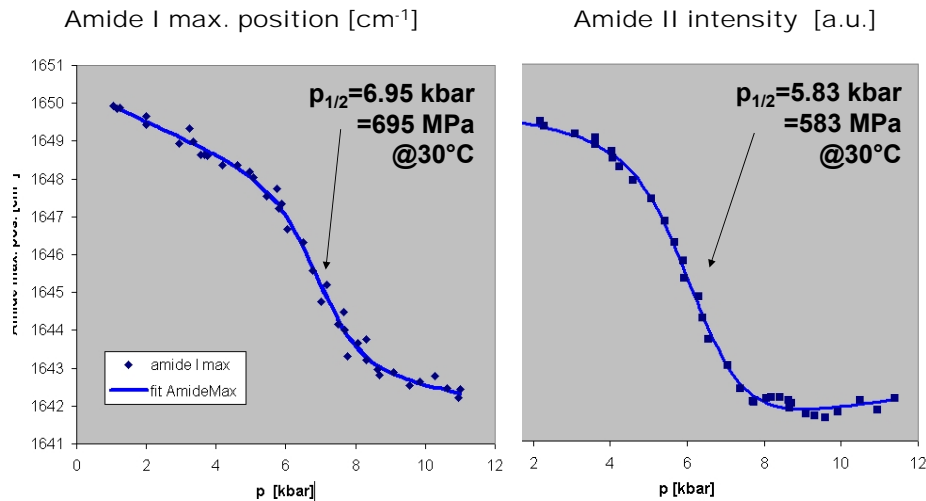
Mioglobin: fázisdiagram



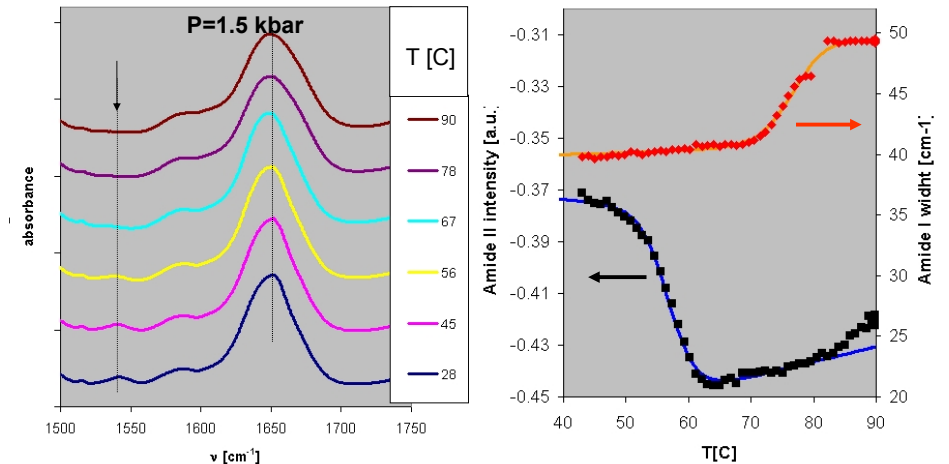
Lizozim: FTIR Spektroszkópia



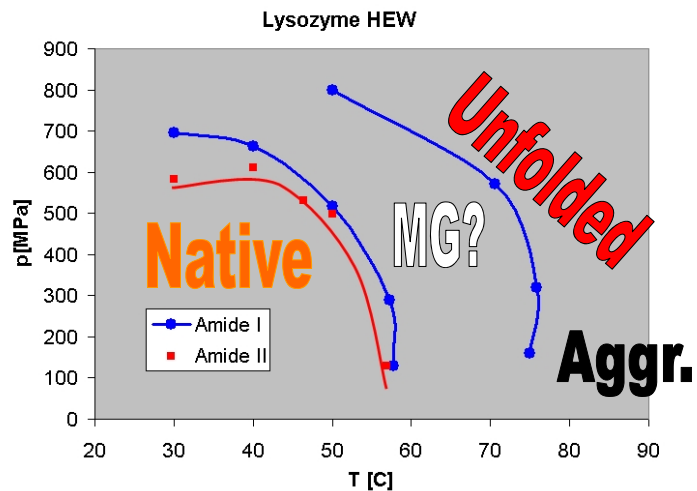
Lizozim: nyomásdenaturáció



Lizozim: hődenaturáció

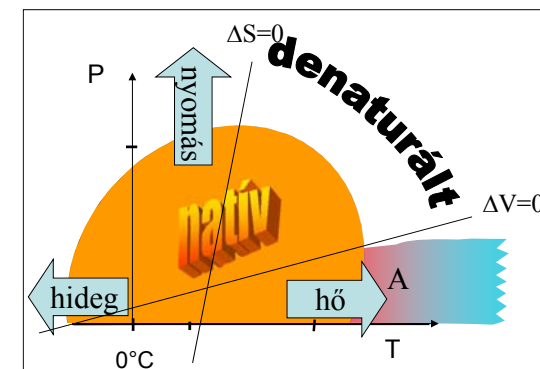


Lysozim: T-p fázisdiagram



Nyomás-hőmérséklet fázisdiagram: a valóság

$$\Delta G = \Delta G_0 - \Delta S_0(T - T_0) - \frac{\Delta C_p}{2T_0}(T - T_0)^2 + \Delta V_0(p - p_0) + \frac{\Delta \beta}{2}(p - p_0)^2 + \Delta \alpha(p - p_0)(T - T_0) + \dots$$

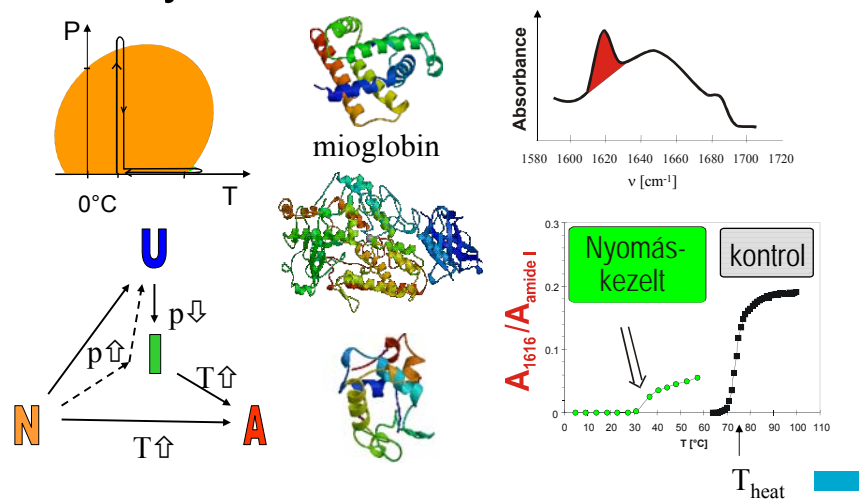


intermolekuláris kh.:
aggregáció (conc!)

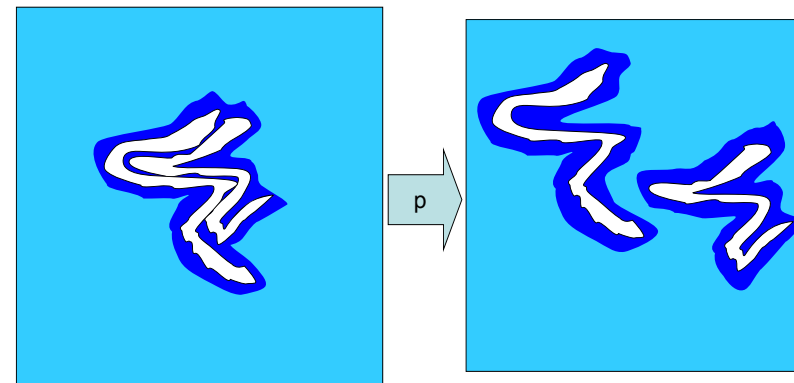
nyomás- és hideg-
denaturáció: ΔV

hődenaturáció: ΔS

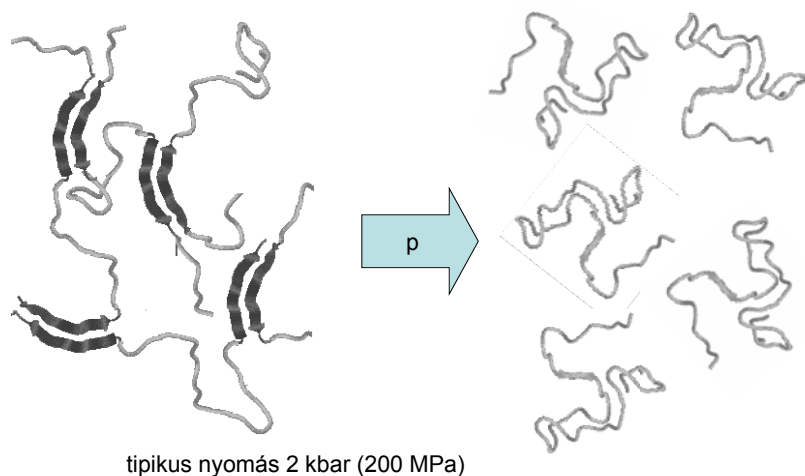
Aggregációra hajlamos intermedierek keletkezése nyomáskezelés hatására



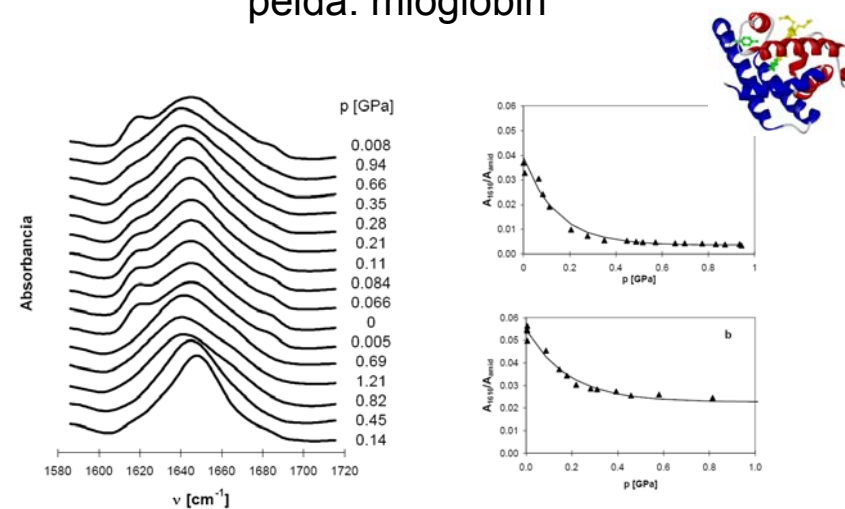
Intermolekuláris kölcsönhatások és a nyomás



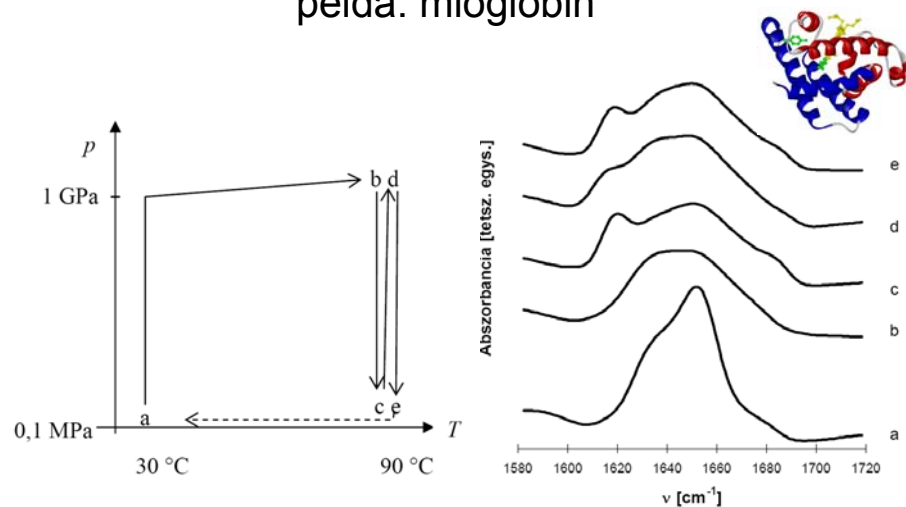
Intermolekuláris kölcsönhatások és a nyomás



Aggregátumok disszociációja nyomással
példa: mioglobin

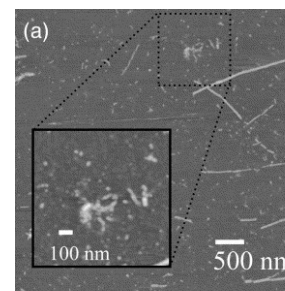


Aggregátumok disszociációja nyomással példa: mioglobin

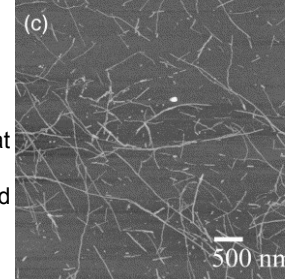


Aggregátum és Fibrillum

Day 1: (a) AFM (b) amide I band of TTR105–115 at 0.1 MPa (full line), 550 MPa (broken line) and 0.1 MPa after decompression (dotted line).

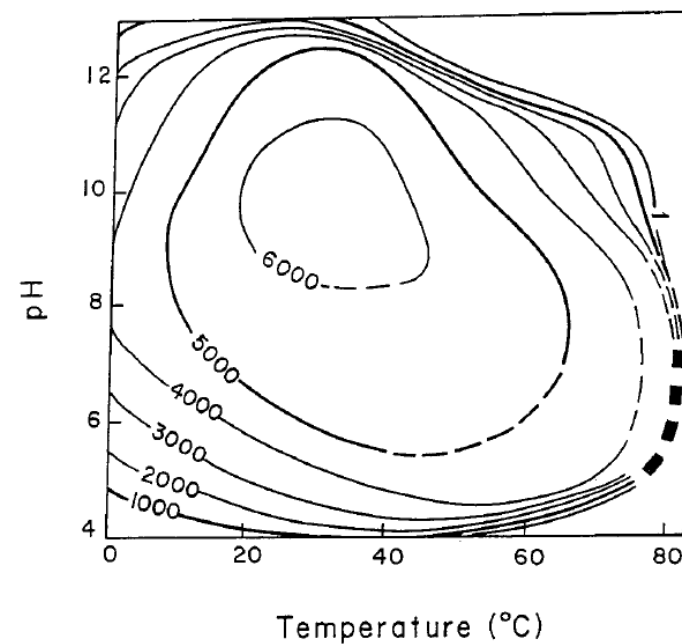
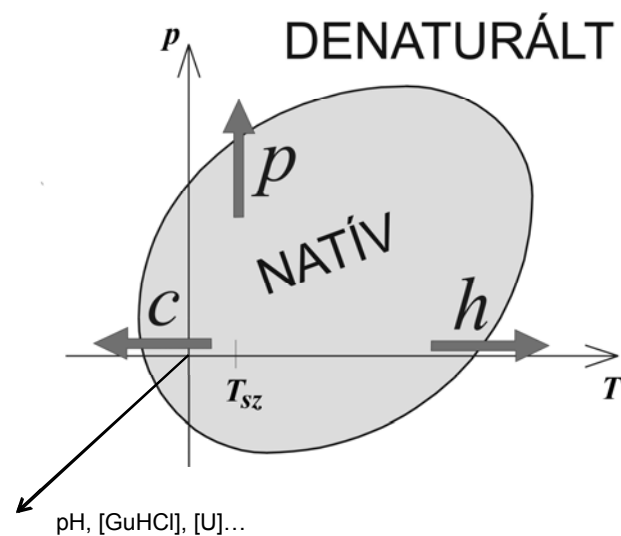


Day 4: (c) AFM (d) amide I band of TTR105–115 fibrils at 0.1 MPa (lower), 1.3 GPa (middle) and 0.1 MPa after decompression (upper).



From Dirix et al

A harmadik (negyedik...) dimenzió



A nagy nyomás technikája

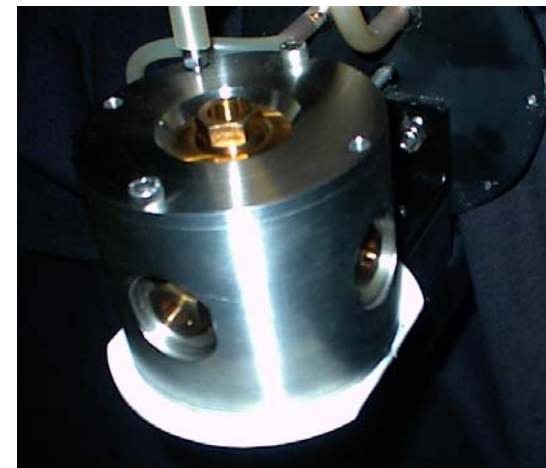
- vastag falú edény
- kis térfogatú gyémántcella

A nagy nyomás technikája

- **Nagyon vastag és szilárd falú edény (bomba)**

Ø kb 10 cm
minta Ø 10 mm

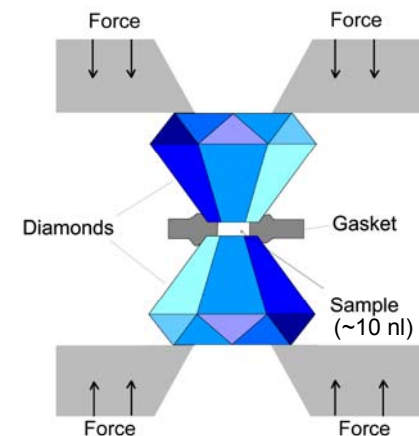
3 optikai ablak

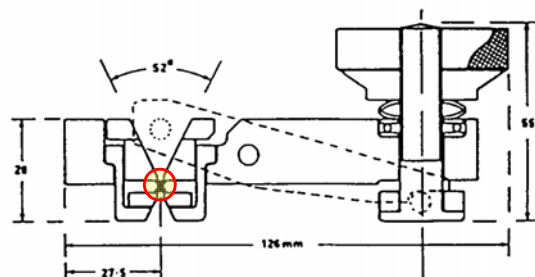
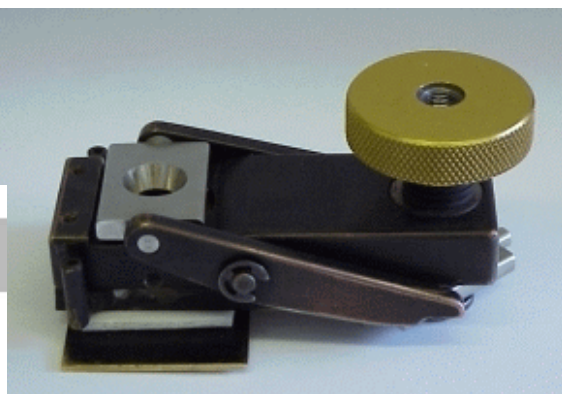
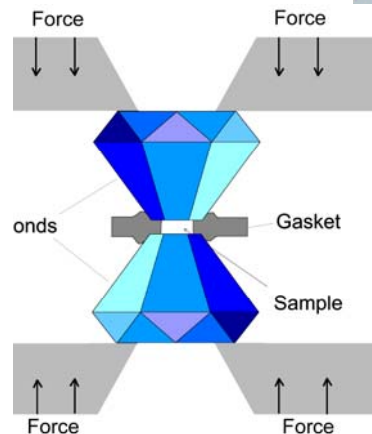


A nagy nyomás technikája

DAC
diamond anvil cell

- **Nagyon kicsi felület (ill. térfogat)**
Ø0,5mm





Alkalmazások



Nyomáskezelt pizza az egyik nagynyomásos konferencián

Nyomáskezelt élelmiszerek egy japán áruházban

Termofil és piezofil fehérjék

Extremofil mikroorganizmusok

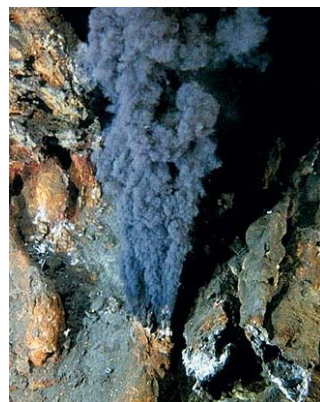
extrém hőmérsékleten ($T > 100\text{ C}$)
 extrém nyomáson (több 100 bar)
 extrém kémiai körülmények
 (savas v. lúgos) között
 élnek. (Pl. a tenger mélyén,
 hőforrások közelében, stb.)



Ezekből izolálhatók a termofil és piezofil fehérjék



Thermophiles, a type of extremophile, produce some of the bright colors of Grand Prismatic Spring, Yellowstone National Park



The first extremophile to have its genome sequenced was *Methanococcus jannaschii*, a microbe that lives near hydrothermal vents 2,600 meters below sea level, where temperatures approach the boiling point of water and the pressure is sufficient to crush an ordinary submarine. Image credit: NOAA

Nyomással növelt enzimaktivitás



Review

High pressure enhancement of enzymes: A review

Michael J. Eisenmenger, José I. Reyes-De-Corcuera *

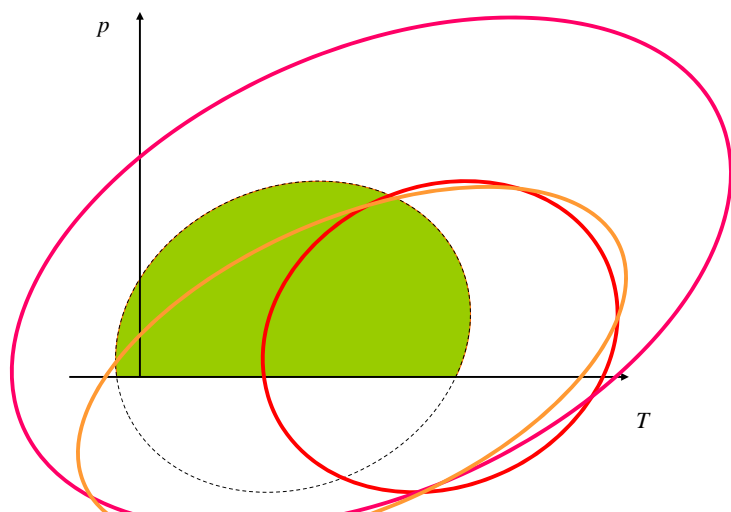
Citrus Research and Education Center, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, 700 Experiment Station Road, Lake Alfred, FL, USA

pl.:

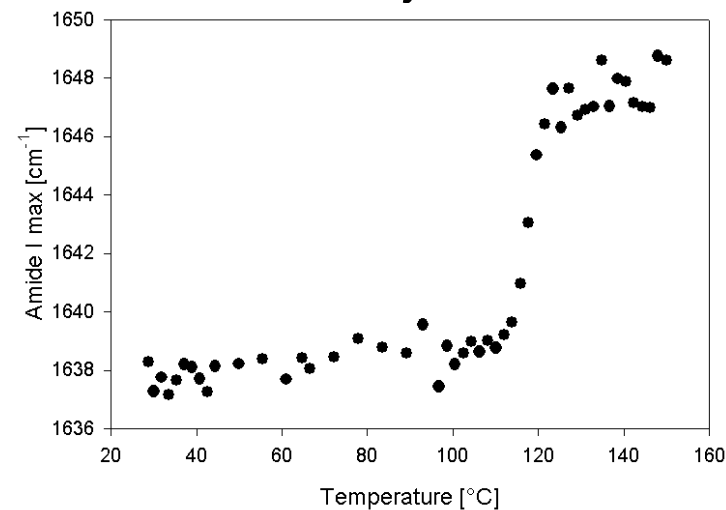
α -kimotripszin	0,1 MPa	=>	20°C	480 MPa	6,5x
polifeniloxidáz	0,1 MPa	=>		500 MPa	+40%
α -amiláz	59°C atm.p.	=>	64°C	152 MPa	+25%
pepsin	0,1 MPa	=>		300 MPa	270x

...

Hogyan változik a fázisdiagram?



Példa: SHSP16,5 fehérje a *Methanococcus jannaschii*-ből



Nyomástűrés

Nem túl nagy kihívás:

p bioszférában max. 1 kbar
normál fehérjestabilitás kb 5 kbar.



Mélytengeri élőlények

Enzimműködés és extrém körülmények

PI:

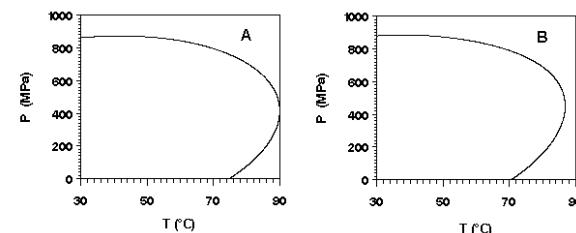


Figure 3. Heat-pressure iso-rate contour plots of 95 % inactivation of purified banana PME (in 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0) for a total process time of 30 min ($k = 0.099858 \text{ min}^{-1}$) based on (A) the 'classical' thermodynamic model (eq 4); (B) the third-degree thermodynamic model (eq 6);

From: *Binh Ly-Nguyen et al*, Effect of Mild-Heat and High-Pressure Processing on Banana Pectin Methylesterase: A Kinetic Study

Irodalom

- Privalov PL. Cold denaturation of proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1990;25(4):281-305.
- Meersman, F., Smeller, L., Heremans, K (2005) Extending the pressure-temperature state diagram of myoglobin *Helv. Chim. Acta* 88, 546-556
- Tölgyesi, F., Böde Cs., Smeller, L., Kim, K. K., Heremans, K., Fidy, J. (2004) Pressure activation of the chaperone function of small heat-shock proteins *Cell. Mol. Biol.* 50, 361-369.
- F. Meersmann, L. Smeller, K. Heremans (2002) A comparative study of cold-, pressure- and heat-induced unfolding and aggregation of myoglobin *Biophys. J.* 82 2635-2644.
- L. Smeller (2002) Pressure-temperature phase diagram of biomolecules *Biophys. Biochim. Acta* 1595 11-29.
- L. Smeller, P. Rubens, K. Heremans (1999) Pressure effect on the temperature induced unfolding and tendency to aggregate of myoglobin *Biochemistry* 38 3816-3820.
- Smeller László: A fehérjék konformációs és dinamikai tulajdonságai.
- Új eredmények nagy nyomással kombinált infravörös és fluoreszcencia spektroszkópiai módszerekkel. MTA doktori értekezés
- Ly-Nguyen B, Van Loey AM, Smout C, Verlent I, Duvetter T, Hendrickx ME. Effect of Mild-Heat and High-Pressure Processing on Banana Pectin Methylesterase: A Kinetic Study *J Agric Food Chem.* 2003 Dec 31;51(27):7974-9.
- <http://bartlettlab.ucsd.edu/Research.html>
- <http://ocean.si.edu/ocean-videos/hydrothermal-vent-creatures>
- <http://www.hiperbaric.com/en>
- Dirix, C; Meersman, F; MacPhee, CE; Dobson, CM; Heremans, K High hydrostatic pressure dissociates early aggregates of TTR105-115, but not the mature amyloid fibrils *J. Mol Biol.* 347 (2005) 903-909
- Eisenmenger, Michael J.; Reyes-De-Corcuera, Jose I. High pressure enhancement of enzymes: A review *Enzyme Microbial Technol.* 45 (2009) 331-347