

Fehérjék nyomás által indukált szerkezetváltozásainak jellemzése infravörös és fluoreszcencia spektroszkópiai módszerekkel

Doktori értekezés

Somkuti Judit

Semmelweis Egyetem
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Smeller László, egyetemi tanár, az MTA doktora

Hivatalos bírálók: Dr. Páli Tibor, tudományos tanácsadó, az MTA doktora
Dr. Müllner Nándor, egyetemi docens, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Monos Emil, professzor emeritus,
az MTA doktora

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Vásárhelyi Barna, egyetemi tanár,
az MTA doktora
Dr. Kovács Mihály, tudományos főmunkatárs,
az MTA doktora

Budapest
2013

Tartalomjegyzék

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
2. BEVEZETÉS	6
2.1 A FEHÉRJÉK FELÉPÍTÉSE.....	7
2.1.1 <i>A fehérjeszerkezet szintjei</i>	7
2.1.2 <i>A fehérjék másodlagos szerkezete</i>	9
2.2 INFRAVÖRÖS SPEKTROSKÓPIA.....	11
2.2.1 <i>Fehérjék infravörös spektroszkópiája</i>	13
2.3 FLUORESCENCIA.....	16
2.4 A NAGY NYOMÁS HATÁSA A FEHÉRJÉKRE.....	19
2.5 A VIZSGÁLT FEHÉRJÉK IRODALMI HÁTTERE.....	22
2.5.1 <i>Parvalbumin</i>	22
2.5.2 <i>Titin</i>	23
2.5.3 <i>Rv3221c</i>	25
3. CÉLKITŰZÉSEK	26
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	28
4.1 A VIZSGÁLT FEHÉRJÉK ELŐÁLLÍTÁSA.....	28
4.1.1 <i>Parvalbumin</i>	28
4.1.2 <i>Titin</i>	28
4.1.2.1 <i>A titin fragmentumok előállításához használt anyagok</i>	28
4.1.2.2 <i>A titin fragmentumok előállításához használt módszerek</i>	30
4.1.3 <i>Rv3221c</i>	36
4.2 INFRAVÖRÖS SPEKTROSKÓPIA.....	36
4.3 FLUORESCENCIA SPEKTROSKÓPIA.....	39
4.4 HOMOLÓGIA MODELLEZÉS.....	39
4.5 IGE ELISA.....	40
4.6 ADATOK ÉRTÉKELÉSE.....	40
5. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS	42
5.1 PARVALBUMIN.....	42
5.1.1 <i>A Ca²⁺ ion hatása a Gad m 1 parvalbumin szerkezetére</i>	45
5.1.2 <i>A hőmérséklet változás hatása a Gad m 1 szerkezetére</i>	47
5.1.3 <i>Nyomás változás hatása a Gad m 1 szerkezetére</i>	52
5.1.4 <i>Ca²⁺-kötés a különböző konformációkban</i>	55
5.1.5 <i>Az átalakulások reverzibilitása</i>	59
5.1.6 <i>A parvalbumin nyomás-hőmérséklet fázisdiagramja</i>	60
5.1.7 <i>Allergenitási tesztek</i>	61
5.2 TITIN.....	62

5.2.1	<i>A PolyE PEVK fragmentum</i>	62
5.2.1.1	Nagy nyomás hatása a polyE PEVK fragmentum szerkezetére különböző oldatokban	62
5.2.1.2	A polyE PEVK fragmentum különböző hőmérsékleteken	65
5.2.2	<i>Immunoglobulin 27</i>	65
5.2.2.1	Nagy nyomás hatása a titin I27 szerkezetére.....	66
5.2.2.2	A hőmérséklet változás hatása a titin I27 szerkezetére	68
5.3	<i>Rv3221c</i>	73
5.3.1	<i>Az Rv3221c szerkezete</i>	73
5.3.2	<i>Nagy nyomás hatása az Rv3221c szerkezetére</i>	75
5.3.3	<i>Hőmérséklet változás hatása az Rv3221c szerkezetére</i>	77
6.	KÖVETKEZTETÉSEK	80
6.1	PARVALBUMIN	80
6.2	TITIN	81
6.2.1	<i>PolyE</i>	81
6.2.2	<i>Immunoglobulin 27</i>	81
6.3	<i>Rv3221c</i>	82
7.	ÖSSZEFOGLALÁS	83
8.	SUMMARY	84
9.	IRODALOMJEGYZÉK	85
10.	SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	94
11.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	95

1. Rövidítések jegyzéke

2xYT	kétszeres élesztőkivonat (yeast) és tripton tápoldat
A	abszorbancia
Bis-Tris	bisz-(2-hidroxietyl)-amino-trisz-(hidroximetil)-metán
CAPS	3-(ciklohexilamino)-1-propánszulfonsav
CD	cirkuláris dikroizmus
D	deutérium
DEAE	dietil-aminoetil
DNS	dezoxiribonukleinsav
EDTA	etilén-diamin-tetraacetát
EGTA	etilén-glikol-tetraacetát
ELISA	enzimhez kötött ellenanyag-vizsgálat (enzyme-linked immunosorbent assay)
Fn	fibronektin
FPLC	gyors fehérje-folyadékkromatográfia (fast protein liquid chromatography)
FTIR	Fourier transzformációs infravörös (infrared)
He-Ne	hélium-neon
HEPES	4-(2-hidroxietyl)-1-piperazin-etánszulfonsav
Ig	immunoglobulin
IPTG	izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozid
IR	infravörös (infrared)
LB	lizogén tápoldat (lysogeny broth) másik nevén Luria-Bertani tápoldat
MCT	higany-kadmium-tellúr (mercury-cadmium-telluride)
Ni-NTA	nikkel-nitrilo-triacetát komplex
NMR	magmágneses rezonancia (nuclear magnetic resonance)

OD	optikai denzitás
p	nyomás (p ressure)
PAGE	p oliakrilamid- g élelektroforézis
pD	d eutériumion kitevő (p ondus)
RCF	relatív centrifugális erő (r elative c entrifugal f orce)
RPM	fordulat/perc (r evolutions p er m inute)
SDS	nátrium (sodium)- d odecil-szulfát
T	hőmérséklet (t emperature)
TFE	t rifluoroetanol
TBS	trisszel pufferelt sóoldat (t ris- b uffered s aline)
TMAO	t rimetilamin N-oxid

Aminosavak rövidítései:

Alanin	A	Izoleucin	I
Arginin	R	Leucin	L
Aszparagin	N	Lizin	K
Aszparaginsav	D	Metionin	M
Cisztein	C	Prolin	P
Fenil-alanin	F	Szerin	S
Glicin	G	Tirozin	Y
Glutamin	Q	Treonin	T
Glutaminsav	E	Triptofán	W
Hisztidin	H	Valin	V

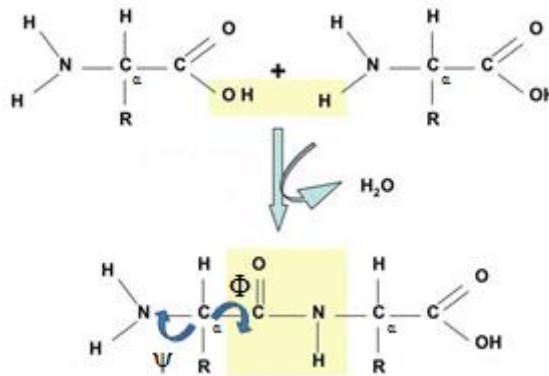
2. Bevezetés

A fehérjék az élő szervezetben fontos funkciókat betöltő makromolekulák, melyeknek vannak általános, minden fehérjére jellemző és egyedi tulajdonságaik is. A különböző funkciók betöltésének gyakran elengedhetetlen feltétele a megfelelő fehérjeszerkezet kialakulása. A hőmérséklet és a pH megváltozása, a szerves és szervetlen denaturáló szerek jelenléte köztudottan befolyásolják a fehérjék szerkezetét. A nyomás a hőmérséklettel egyenrangú termodinamikai paraméter, amelynek változása szintén hat a fehérjék szerkezetére, de ezt mégis sokkal ritkábban vizsgálják. Ennek okai a nyomás-kísérletekkel kapcsolatos technikai nehézségek, valamint az, hogy a nyomás által indukált szerkezetváltozásokhoz a fiziológiás tartományon kívül eső, sokszor igen magas nyomásértékek szükségesek. A fehérjék tulajdonságairól azonban azáltal is többet megtudhatunk, ha az élő szervezetétől eltérő fizikai paraméterek között vizsgáljuk azokat. Először 1914-ben Bridgman közölt eredményeket a nyomás növekedés fehérjére gyakorolt hatásáról (1). Kísérleteiben azt tapasztalta, hogy a tojásfehérje nagy nyomáson (szobahőmérsékleten) is koagulálódik, azonban az nem volt egyértelmű, hogy ez a látszatra hasonló koaguláció valóban ugyanolyan természetű-e, mint ami főzés során bekövetkezik. A nagy nyomás fehérjékre kifejtett hatásának vizsgálata hosszabb szünet után az 1990-es években indult újra, azóta kutatják a különböző alkalmazási lehetőségeket is. Ezek közé tartozik pl. a fehérjeaggregátumok (illetve inklúziós testek és amiloidok) disszociálása. Különféle élelmiszeripari technológiákban is alkalmazható a nagy nyomás, pl. az enzimaktivitás módosítására vagy a mikroorganizmusok inaktiválására (2). Ezen kívül használható a virális oltóanyagok előállításánál is, valamint fagyasztás során képes megvédeni az emlős sejteket a károsodástól. Az utóbbi évek felfedezése, hogy viszonylag alacsony nyomású kezeléssel a sejteket „edzeni” lehet. Így pl. a nyomáskezelést túlélő mikroorganizmusok ellenállóbbak a további élelmiszertechnológiai kezelésekkal szemben, illetve egyes nyomáskezelt növényi magoknak magasabb a hozamuk (3).

A nagy nyomású kutatásokba bekapcsolódva főleg infravörös illetve kisebb részben fluoreszcencia spektroszkópiával vizsgáltam néhány kiválasztott fehérje tulajdonságait különböző nyomás és hőmérséklet értékek mellett.

2.1 A fehérjék felépítése

A fehérjék aminosavakból felépülő biológiai makromolekulák. A lineáris polimer láncot 20féle aminosav alkothatja, amelyek peptid kötéssel kapcsolódnak egymáshoz (1. ábra). Ezek a peptid kötések hozzák létre a molekula vázát. A fehérje molekulákat általában 100 — néhány 100 aminosav alkotja, de pl. a teljes titin molekula több mint 38000 aminosavból áll.

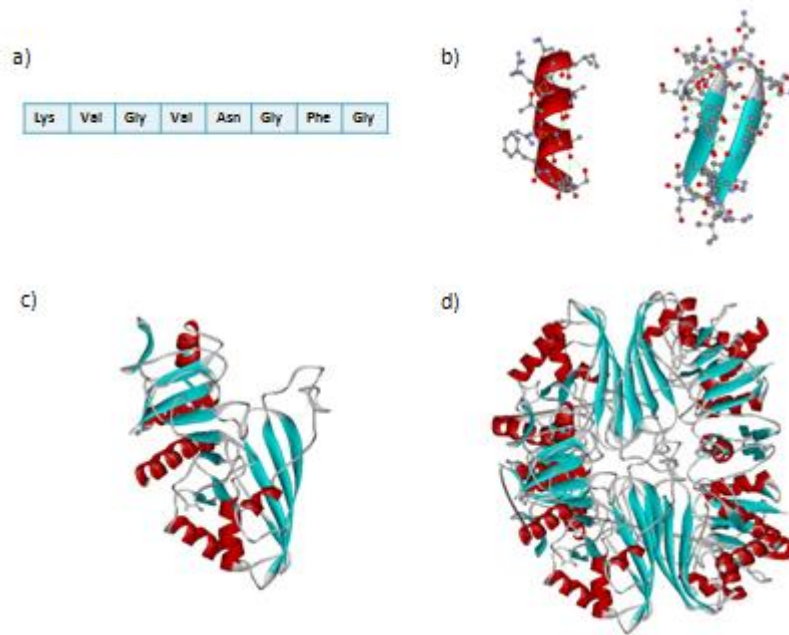


1. ábra A peptid kötés kialakulása

2.1.1 A fehérjeszerkezet szintjei

A fehérjék szerkezeti vizsgálatánál az alábbi szinteket különböztetjük meg (2. ábra):

- Elsődleges szerkezet: a fehérje szekvenciája, a fehérjét alkotó aminosavak sorrendje a láncban.
- Másodlagos szerkezet: a fehérjelánc hidrogénkötések által kialakított, általában rövidtávú, 10-20 aminosavra kiterjedő rendezettségét írja le. A kialakított szerkezet leggyakrabban helikális vagy lamelláris struktúra.
- Harmadlagos szerkezet: a másodlagos szerkezeti elemek által kialakított térbeli alakzat, amit Van der Waals kölcsönhatások, hidrogénhidak, töltött aminosavak közötti ionos kötések és cisztein aminosavak között kialakuló diszulfid hidak stabilizálnak. Ezek a szekvenciában egymástól távol eső, de a térszerkezet kialakulása során egymáshoz közel került aminosavakat kötik össze.
- Negyedleges szerkezet: több különálló fehérjeláncból felépülő fehérjék esetén beszélhetünk róla, az alegységek egymáshoz rendeződése alakítja ki.



2. ábra A fehérjeszerkezet szintjei a gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz példáján.

a) elsődleges b) másodlagos c) harmadlagos d) negyedleges szerkezet

A fehérjéhez kötődhetnek nem fehérje természetű molekulák is (pl. fémionok), amelyek befolyásolják a szerkezetet. Ezeket, ha erősen kötődnek prosztetikus csoportnak nevezzük. A peptid kötés körül nem, azonban a molekula gerincét alkotó többi kötés körül a rotáció megengedett. Aminosavanként két rotációs lehetőség van, emiatt a fehérjeláncnak elméletileg sokféle konformációja alakulhat ki. A sok konformáció közül csak néhány stabil, amelyeket a következő csoportokba sorolhatunk: natív, köztes (intermedier) és denaturált állapotok.

Natív szerkezet esetén a fehérje biológiailag aktív, képes a feladatát elvégezni (pl. enzimaktivitást mutat). Általában ennél a konformációnál a legalacsonyabb a szabadentalpia és ennél a legmagasabb a másodlagos kötések száma. Natív állapotban a fehérje apoláris oldalláncai a fehérje belsejében találhatóak, a poláris oldalláncok a molekula külső felszínén a vízzel és egymással hoznak létre hidrogénhidakat.

A köztes (intermedier) állapotoknak több fajtája lehetséges. Itt általában a harmadlagos szerkezet rendezetlen, a másodlagos szerkezeti elemek egy része megtalálható. Az intermedier állapot egyik formája az „olvadt gombóc”, amelynek topológiája a natív szerkezethez hasonló, azonban „olvadt” jellegű, vagyis nincs merev harmadlagos szerkezete, az oldalláncok nem illeszkednek szorosan egymáshoz (4).

A denaturált konformációkban a fehérje egyáltalán nem, vagy a natívhoz képest csak nagyon kevés másodlagos szerkezeti elemet tartalmaz, kitekeredett állapotban van.

A fehérjék denaturációja gyakran oldhatóságuk csökkenéséhez majd aggregátumok keletkezéséhez vezet. A fehérjék aggregálódása során a molekulák főleg intermolekuláris hidrofób kölcsönhatások által kapcsolódnak össze, nagyobb részecskéket hoznak létre. Ezek lehetnek rendezetlenek (amorf aggregátum), de bizonyos körülmények között béta redőkben gazdag lineáris aggregátumok (amiloidok) is keletkezhetnek.

2.1.2 A fehérjék másodlagos szerkezete

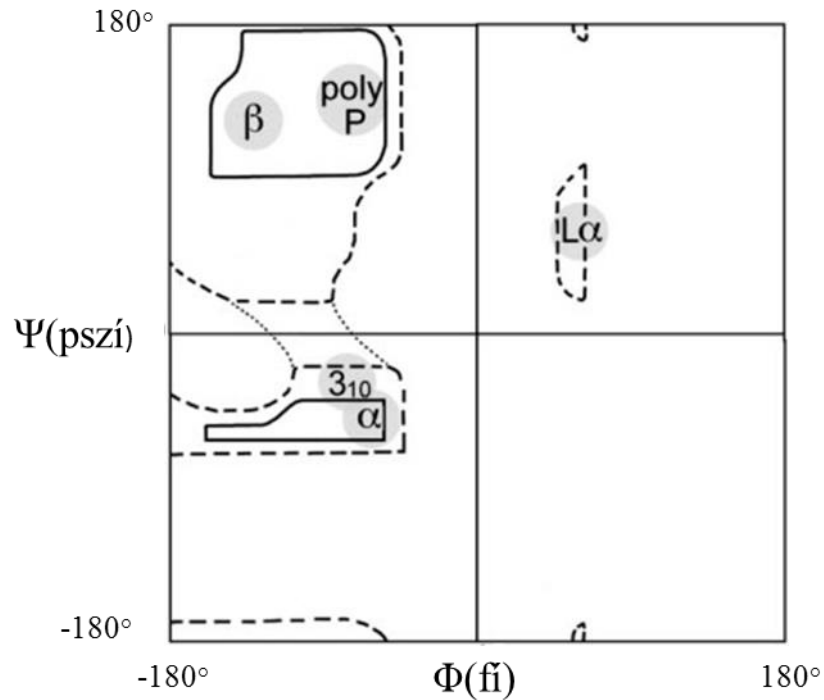
Infravörös spektroszkópiával elsősorban a fehérjék másodlagos szerkezetét tudjuk vizsgálni, ezért ezeket a szerkezeti elemeket részletesebben ismertetem. Az aminosavakat összekapcsoló peptidkötés általában merev, azonban az alfa szénatom (C_α) melletti két kötés körül a molekula elfordulhat. Az elfordulás a Φ ($CN-C_\alpha C$) és Ψ ($NC_\alpha-CN$) torziós szögekkel jellemezhető (1. ábra). A peptidláncok konformációja a peptidsíkok egymáshoz képest történő elfordulásától függ. A Ramachandran diagram ábrázolja az alfa szénatom körüli forgásszögek megengedett értékeit, egymás függvényében (3. ábra). A megengedett tartományokhoz másodlagos szerkezeti elemek rendelhetők, melyeknek két legfőbb típusa a helikális és a lemezes struktúra.

A leggyakoribb helikális szerkezet az alfa hélix. Menetenként 3,6 aminosavat tartalmaz, a hélix emelkedése aminosavanként 1,5 Å. Az n-edik oxigénatom és az n+4-edik nitrogénatom között hidrogénhid található. Az alfa hélix stabil, energetikailag kedvező, ezért gyakori szerkezeti elem. Egy elem átlagosan 3 menetből áll, az oldalláncok kifelé állnak.

A hélixek egy másik fajtája a ritkán, többnyire alfa hélixek utolsó fordulataként előforduló 3_{10} hélix. Ebben teljes fordulatonként 3 aminosav található, a hidrogénkötések pedig 10 atomot fognak közre. A hidrogénhidak az n-edik aminosav oxigénje és az n+3-adik aminosav nitrogénje között találhatók. Ezek a hidrogénhidak torzultak, a szerkezet energetikailag kedvezőtlen, ezért ritkán fordul elő.

A π hélixes szerkezeti elemek menetenként 4,4 aminosavat tartalmaznak, menetemelkedésük 1,2 Å aminosavanként. A hidrogénhidak az n-edik aminosav oxigénje és az n+5-ödik aminosav nitrogénje között találhatók.

A hélixek általában jobb menetesek, a balmenetesek az oldalláncok ütközései miatt energetikailag kedvezőtlenebbek. Ritkán balmenetes hélixek is létrejönnek, ilyen pl. a poliprolin II hélix (poly P). Ennek emelkedése aminosavanként 3,1 Å, hidrogénhidakat nem tartalmaz. Előfordulhatnak balmenetes α hélixek ($L\alpha$) is.



3. ábra Vázlatos Ramachandran diagram, a másodlagos szerkezeti elemek kialakulása a torziós szögek függvényében ((5) alapján)

Béta lemezek esetén a nyújtott polipeptid láncok egymással párhuzamosan helyezkednek el. A láncok irányultsága szerint létezik párhuzamos, antipárhuzamos és vegyes lemezes szerkezet.

Párhuzamos lemez esetén a láncok azonos irányba futnak, a hidrogénhidak egyenletesen helyezkednek el, az egymás utáni C_{α} atomok közötti távolság 3,2 Å. Az ellentétes irányultságú láncokból álló antipárhuzamos lemezek esetén a hidrogénhidak elhelyezkedése kevésbé szabályos, a C_{α} atomok távolsága nagyobb, 3,4 Å. A láncok kissé csavarodnak, a béta lemezekben gyakran balcsavar van. Az oldalláncok változva a lemez két oldalán kifelé állnak.

Gyakran előforduló elem a béta kanyar, ami olyan nem helikális tetrapeptid rész, amelynél az első és negyedik C_{α} atom távolsága 7 Å-nél kisebb. Az első aminosav

oxigénjét és a negyedik aminosav nitrogénjét hidrogénhíd köti össze, a második aminosav gyakran prolin.

A kanyarodásra egy másik lehetőség a γ kanyar, ami egy olyan tripeptid rész, ahol az első és az utolsó aminosav között található hidrogénhíd.

Ezekén kívül előfordulnak még felszíni hurkok, nem szabályosan feltekeredett coil szerkezetek, és szerkezet nélküli random coil részek.

2.2 Infravörös spektroszkópia

Az infravörös spektroszkópia a molekulák rezgéseinek gerjesztésén alapul. Az ehhez szükséges energia az elektromágneses sugárzás 800 nm—1 mm-es hullámhossz tartományába esik.

A molekulák állandóan mozgásban vannak, e mozgásoknak három jellegzetes típusa van:

- transláció: a molekula atomjai azonos sebességgel egy irányba haladnak
- rotáció: a molekula adott tengely körül azonos szögsebességgel forog
- vibráció: az atomok egymáshoz képest rezegnek

A transláció és rotáció kevesebb energiát igényel, ezeknél a mozgásoknál az atomok közötti távolságok és szögek változatlanok a molekulában, míg vibráció során az atomok közötti távolságok és sok esetben a szögek is változnak.

Egy N atomból álló molekulának $3N-6$ (lineáris molekula esetén $3N-5$) független rezgése van (normálrezgés). A háromszoros szorzó a tér három irányából (x , y , z), a -6 abból a $3+3$ esetből adódik, amikor az egész molekula egy irányba (x , y , z) mozdul el (transzláció) vagy egy térbeli tengely (x , y , z) körül forog (rotáció). A rezgés során az összes atom ugyanazzal a frekvenciával, azonos vagy ellentétes fázisban, és többnyire különböző amplitúdóval rezeg. Egy atom elmozdulása a molekula összes többi atomjára hat, de minél távolabb vannak egymástól, annál kisebb mértékben. Az infravörös spektrumban általában molekulánként kevesebb, mint $3N-6$ rezgést tudunk megkülönböztetni. Ennek a következő okai lehetnek:

- szimmetria okok miatt azonos normálfrekvenciák jönnek létre
- a rezgés nagyon kis intenzitású

- nem minden rezgés IR aktív

Az IR aktivitás feltétele, hogy a rezgés során a molekula dipólus momentuma változzon. A sugárzás csak akkor képes megrezgetni a molekulát, ha annak töltései a rezgés során átrendeződnek.

A rezgési sávok számát növelhetik a felhangok illetve a kombinációs és differenciasávok, azonban ezek általában kis intenzitásúak.

A rezgések lehetnek vegyértékrezgések, amikor két atom közötti kötés nyúlik vagy rövidül, illetve deformációs rezgések, amelyek során a vegyértékszög változik. Mindkét típusú rezgés lehet szimmetrikus vagy antiszimmetrikus. A deformációs rezgések lehetnek síkbeli (ollózó és kaszáló) vagy síkra merőleges (bólogató és torziós) rezgések. A vegyérték rezgések sávjai mindig magasabb hullámszámú tartományban találhatók, mint a deformációs rezgések, mivel a kötés nyújtáshoz-rövidüléshez nagyobb energia szükséges, mint a kötésszög változáshoz.

Bizonyos atomcsoportok, kötésmódok frekvenciája gyakran nagyjából azonos, a molekula többi részétől függetlenül. Ezeket karakterisztikus-, csoport- vagy kötési frekvenciának hívják.

Infravörös abszorpció során az anyag az IR sugárzásból a rezgéseire jellemző frekvenciájú komponenseket elnyeli, ami a spektrumban abszorpciós sávok megjelenését eredményezi. A spektrum függőleges tengelyén az abszorbanciát, vízszintes tengelyén a hullámhossz reciprokát, a hullámszámot (cm^{-1}) ábrázoljuk. Az abszorbanciát (A) az átengedett (I) illetve a belépő (I_0) sugárzás intenzitásának hányadosából számoljuk:

$$A = -\lg \frac{I}{I_0}$$

Az infravörös tartomány három fő részre osztható:

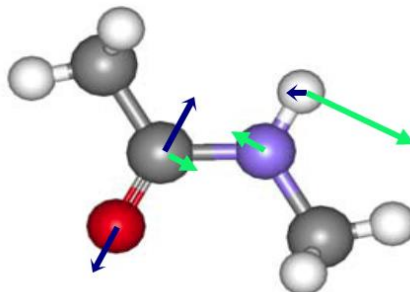
- közeli (NIR, 800 nm—2,5 μm ill. 4000—12500 cm^{-1}): itt főleg a felhangok és kombinációs sávok találhatók;
- közép (MIR, 2,5 μm —50 μm ill. 200—4000 cm^{-1}): ez a vegyérték és deformációs rezgések fő tartománya;
- távoli (FIR, 50 μm —1 mm ill. 10—200 cm^{-1}): torziós rezgések, kristályrács rezgések és egyes forgási átmenetek tartománya.

Az általunk végzett kísérletekben a közép IR tartományt használtuk, itt gerjesztődnek azok a molekularezgések melyek segítségével vegyületeket lehet azonosítani, illetve amelyek tudósítanak a molekuláris környezet változásáról.

2.2.1 Fehérjék infravörös spektroszkópiája

Az infravörös spektroszkópia érzékeny a fehérjék globális másodlagos szerkezetére, és az aggregáció is nyomon követhető vele. Különösen hasznos módszer a nagy nyomáson történő mérések esetén, ahol a másodlagos szerkezet meghatározására hagyományosan használt cirkuláris dikroizmus (CD) nem alkalmazható az optikai ablak nyomástól függő kettőtörése miatt.

A fehérjék makromolekulák, ezért nagyon sok normálrezgésük van. A másodlagos szerkezet által leginkább befolyásolt rezgések az amid rezgések. Ezen rezgésekben a fehérjelánc gerincét, azaz a peptidvázat alkotó atomok vesznek részt. A fehérjék szerkezetére vonatkozó legfontosabb információ az amid I sávban rejlik (6). Az amid I rezgés energiájának kb. 85%-a a peptid váz C=O csoportjának nyújtásából származik (4. ábra).



4. ábra Az N-metilacetamid modellszék amid I (kék nyilak) és amid II (zöld nyilak) rezgései. A szürke golyók a szén, a kék a nitrogén, a piros az oxigén a fehér a hidrogén atomokat jelzik (7).

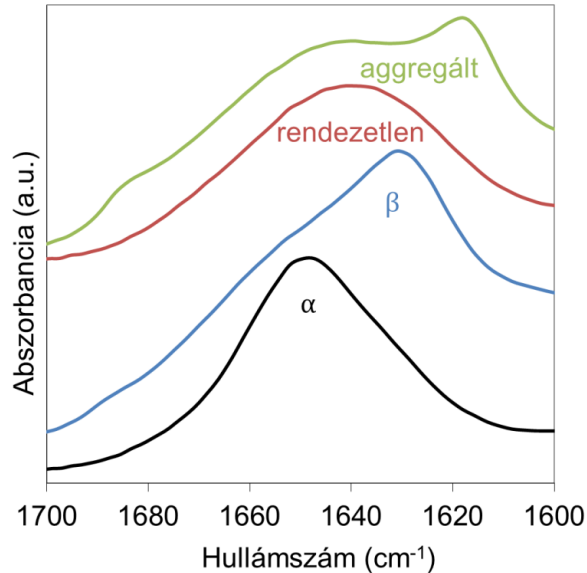
A C=O csoport oxigénje és a fehérje egy másik aminosavából származó N-H csoport hidrogénje között hidrogénhid jöhet létre, melynek erőssége függ a fehérje konformációjától. Denaturált fehérjéknél az oldószer hidrogénjével jön létre hidrogénkötés. Minél erősebb a hidrogénhid, annál jobban gyengíti a C=O kötést, így csökkentve az amid I sáv frekvenciáját. Emiatt az amid I rezgés igen érzékeny a fehérje

szerkezetére. A különféle amid I sáv frekvenciákhoz különböző másodlagos szerkezeti elemek rendelhetők (1. táblázat).

1. táblázat Az amid I sáv komponenseinek hozzárendelése a másodlagos szerkezeti elemekhez (a feltüntetett hullámszámok az infravörös abszorpciós csúcsok maximum pozíciói)

másodlagos szerkezet	hullámszám (cm ⁻¹)
rendezetlen	1645 (8)
alfa hélix	1654 (8)
béta szerkezet (kinyújtott láncok)	1624-1637 és 1675 (8)
intermolekuláris béta szerkezet (aggregátum)	1616 és 1685 (9)
hajlatok, hurkok	1663-1670 és 1683-1694 (8)
3 ₁₀ hélix	1662 (10)

A frekvenciákon kívül a spektrum alakja is jellemző az egyes szerkezeti elemekre. A rendezett szerkezetek élesebb, a rendezetlenek szélesebb csúcsot adnak (5. ábra).

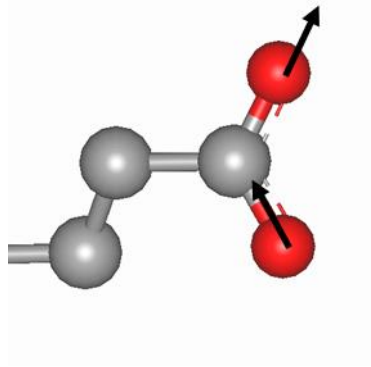


5. ábra A különböző másodlagos szerkezeti elemekhez tartozó jellemző infravörös spektrumok (α : lószív mioglobín atmoszférikus nyomáson, szobahőmérsékleten; β : α kristallin atmoszférikus nyomáson, szobahőmérsékleten; rendezetlen: lószív mioglobín nagy nyomáson; aggregált: lószív mioglobín magas hőmérsékleten)

A különböző másodlagos szerkezeti elemek relatív mennyiségét az amid I sáv analíziséből, dekonvolúcióval és illesztéssel határozhatjuk meg (11-14).

Az amid I rezgésből való szerkezeti meghatározást nehezíti a víz deformációs rezgése, ami 1645 cm^{-1} -nél, az amid I sáv közepén található (15). Emiatt az infravörös fehérjeméréseket nehézvízben (D_2O) végezzük, ahol a víz rezgése eltolódik, és már nem lapol át az amid I sávval. A polipeptidlánc gerincét alkotó nitrogénekhez kötődő hidrogénatomok nehézvízben kicserélődhetnek deutériumra, emiatt az amid sávok eltolódhatnak. Ez az eltolódás főleg az amid II rezgésnél (4. ábra) jelentős (100 cm^{-1}). Az eredeti amid II sáv (1550 cm^{-1}) amplitúdójának csökkenéséből illetve eltűnéséből arra következtethetünk, hogy a polipeptidlánc gerincét alkotó nitrogénekhez kötődő hidrogénatomok elérhetővé váltak a nehézvíz számára és kicserélődtek deutériumra. Ez sokszor csak a fehérje kitekeredését követően megy végbe teljesen. Az amid II sáv a hidrogén-deutérium kicserélődésről és ebből következően a fehérje flexibilitásáról szolgáltat információt.

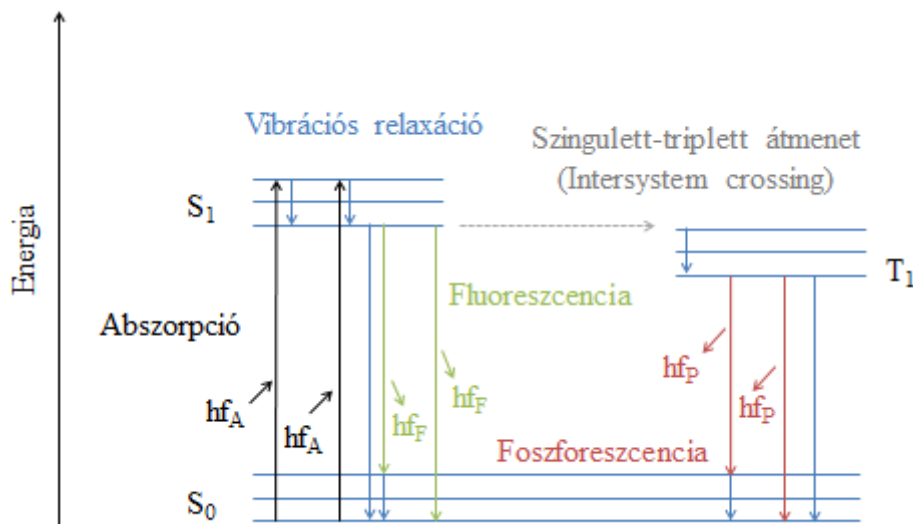
A sok glutaminsavat és aszparaginsavat tartalmazó fehérjékben a spektrumon láthatóvá válik a COO^- antiszimmetrikus nyújtási rezgés (6. ábra) abszorpciós sávja is, amik különösen informatív akkor, ha a fehérje Ca^{2+} -ot köt, amely kötésben részt vesznek a COO^- csoportok (16, 17).



6. ábra A COO^- antiszimmetrikus nyújtási rezgés. A szürke golyók a szén, a pirosak az oxigén atomokat jelzik

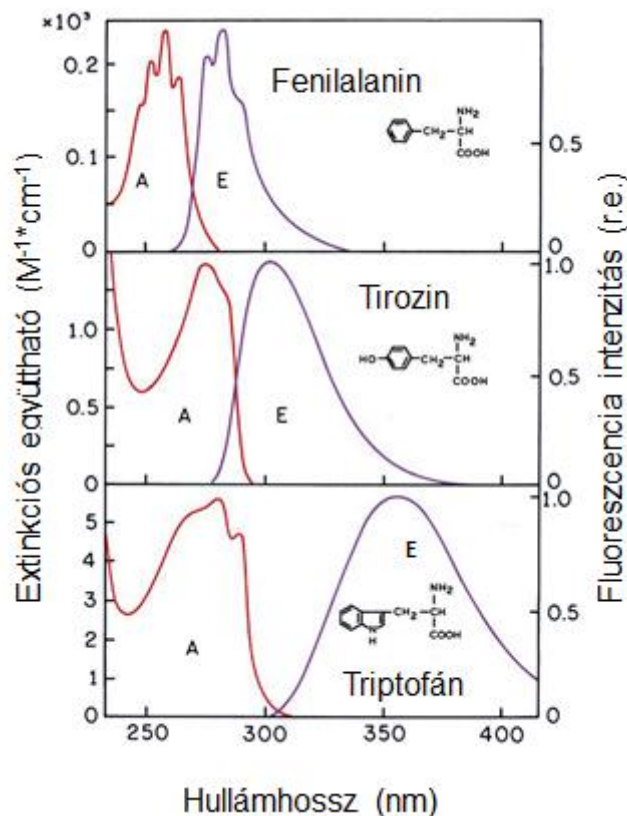
2.3 Fluoreszcencia

A fluoreszcencia a lumineszcencia egy fajtája. A lumineszcencia a gerjesztett elektron állapotban bekövetkező fényemisszió, ami a gerjesztett állapot természete szerint lehet fluoreszcencia vagy foszforeszcencia. Az alapállapotban (S_0) lévő molekula először adott energiájú fényt nyel el (abszorpció), majd femtoszekundumnyi idő alatt átrendeződik, és gerjesztett állapotba kerül ($S_1, S_2 \dots$). Az abszorpció során a molekula általában olyan vibrációs szintre jut, ami nem felel meg a környezettel való termikus egyensúlynak, ezért pikoszekundumnyi idő alatt bekövetkezik a termikus, vibrációs relaxáció, amivel a molekula az S_1 gerjesztett állapot legalsó vibrációs szintjére kerül. Innen fluoreszcenciával, belső konverzióval vagy foszforeszcenciával kerülhet vissza az alapállapotba. Fluoreszcencia során a gerjesztett elektron néhány nanoszekundumnyi idő után egy lépésben tér vissza az alapállapotba, a különbségi energia pedig foton formájában sugárzódik ki. Belső konverzió során a gerjesztési energia hővé alakul át, nem történik fotonemisszió. Foszforeszcencia történik amennyiben a molekula a szingulett (S) - triplett (T) átmenetet követően a triplett állapotból tér vissza fotonkibocsátás közben az (S_0) alapállapotba. A szingulett (S) - triplett (T) átmenet során az eredő spinquantumszám változik meg, mintha a gerjesztett elektron spinállapota átfordulna. A gerjesztést követően végbemenő lehetséges folyamatokat a Jablonski diagram szemlélteti (7. ábra).



7. ábra Jablonski-féle energiadiagram

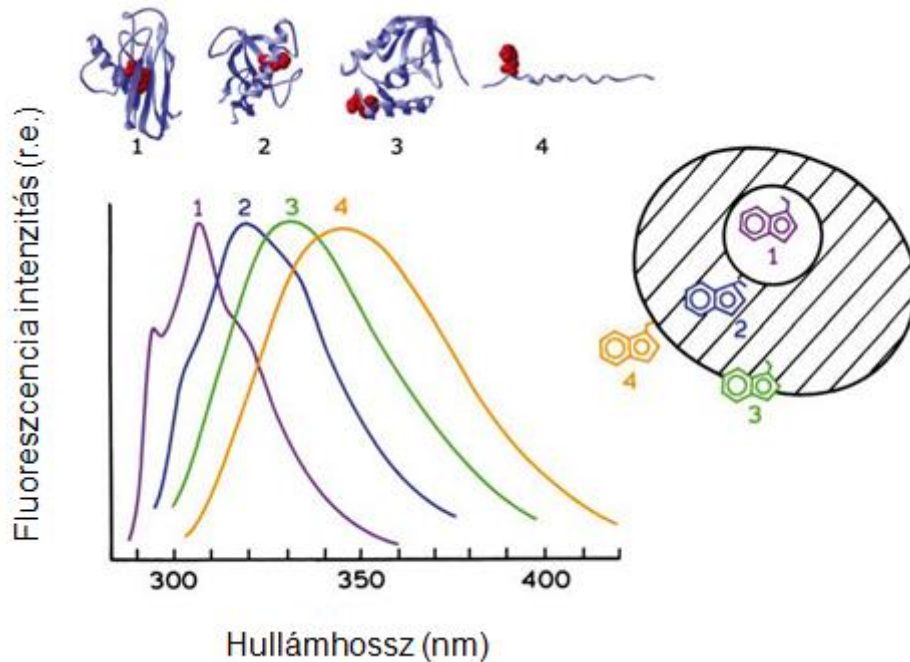
A fluoreszcencia spektroszkópia érzékeny a fluorofór (fluoreszcenciára képes molekula) környezetének polaritásváltozására, ezáltal a helyi szerkezetváltozásokra is. A biopolimerek között a fehérjék egyik különleges tulajdonsága az, hogy egyes aminosavak saját fluoreszcenciáját is használhatjuk a spektroszkópai mérésekhez, így nem szükséges külső jelölő fluorofór molekulák alkalmazása. A fehérjéket felépítő 20 aminosavból 3 fluoreszkál (triptofán, tirozin és fenilalanin), ezek azonban ritkán fordulnak elő a többi aminosavhoz képest. A legjelentősebb, legnagyobb extinkciós együtthatójú saját fluorofór a triptofán, ami az aminosavak kb. 1%-át teszi ki. A következő ábrán a három fluoreszkáló aminosav abszorpciós és emissziós spektruma látható (8. ábra). Ha a fehérjében található triptofán, akkor a fluoreszcenciát ez határozza meg, mivel ennek extinkciós együtthatója lényegesen nagyobb a másik két aminosavénál. Mivel a triptofánnak van a legnagyobb hullámhossznál az abszorpciós maximuma a másik két aminosav által elnyelt energia is gyakran energiatranszferrel a triptofánra kerülhet.



8. ábra A fluoreszcens aminosavak gerjesztési és emissziós spektruma ((18) alapján)

A saját fluoreszcencia jól kihasználható tulajdonsága, hogy a triptofán nagyon érzékeny a lokális környezet megváltozására. A konformációs átalakulások, az alegységek összekapcsolódása, a szubsztrátok kötődése vagy a denaturáció megváltoztathatják a triptofán emissziós spektrumát, mivel befolyásolhatják a triptofán indol gyűrűjének környezetét. A fehérje fluoreszcencia interpretációját bonyolultabbá teszi, ha egyszerre több fluoreszkáló aminosav is található a molekulában. Minden egyes fluoreszkáló aminosav környezete és ezáltal spektrális tulajdonságaik is különbözőek lehetnek. A triptofánok abszorpciós és emissziós spektrumai átlapolhatnak és nehéz lehet különválasztani az egyes triptofánokból származó jeleket. További bonyolító körülmény, hogy a triptofánnak két közel azonos energiaszintű gerjesztett állapota létezik, ami még komplexebb spektrális tulajdonságokat eredményez.

Az általunk használt 290 nm-es gerjesztési hullámhosszon a három fluoreszkáló aminosav közül főleg a triptofán gerjesztődik, aminek emissziós maximuma vízben 350 nm körül van. Ez az érték azonban nagyon erősen függ a lokális környezet polaritásától. Az emisszió nagyon érzékeny az imino csoport hidrogénkötésére. Ha a triptofán a fehérjében hidrogénkötésben vesz részt vagy víznek van kitéve, akkor az emisszió a nagyobb hullámhosszak felé tolódik, teljesen apoláros környezetben pedig az kisebb hullámszámok felé. Ha több triptofán van jelen a fehérjében, akkor ezek mind hozzájárulnak a spektrumhoz, bár nem feltétlenül egyenlő mértékben. Feltekeredett fehérjékben a triptofán sokszor a molekula belsejében, apoláros környezetben található, a denaturáció során azonban hozzáférhetővé válik a vizes oldószer számára, környezetének polaritása megváltozik, ami a spektrum eltolódását eredményezi. Az emissziós spektrum változásának megfigyelése emiatt alkalmas a fehérje konformációs változásának nyomon követésére (9. ábra).



9. ábra A triptofán emissziós spektruma különböző polaritású környezetekben (a polaritásnövekedés iránya:1→4) ((18) alapján)

2.4 A nagy nyomás hatása a fehérjékre

A hőmérséklet függvényében már sok biokémiai, biofizikai kutatást végeztek, a nyomás azonban sokkal kevésbé ismert és ritkábban használt termodinamikai paraméter. Ennek egyik oka, hogy technikailag nehéz a változások megfigyeléséhez elegendően nagy nyomást előállítani. A nyomás, mint termodinamikai paraméter a térfogattal párosítható, a nyomás változás hatásának vizsgálatával térfogati információkat nyerhetünk a rendszerről (19). Egy kétállapotú (V_1 ill. V_2 térfogattal rendelkező) rendszer egyensúlya nyomás változás hatására eltolódik. Állandó hőmérsékleten az egyensúlyi állandó a következőképpen fejezhető ki:

$$K = e^{-\left(\frac{\Delta G}{RT}\right)}$$

ahol K azon valószínűségeknek az aránya, hogy a rendszert a 2. illetve az 1. állapotban találjuk ($K=w_2/w_1$), ΔG a szabadentalpia megváltozása ($\Delta G=G_2-G_1$), R az egyetemes gázállandó, T pedig a hőmérséklet. A Le Chatelier-Braun elv alapján, ha a nyomást növeljük, akkor ez az egyensúlyi rendszert a térfogatcsökkenés irányába tolja el.

Annak a valószínűsége, hogy a rendszert az 1. állapotban találjuk:

$$w_1 = \frac{1}{\left(1 + e^{-\frac{\Delta G}{RT}}\right)} = \frac{1}{\left(1 + e^{-(\Delta E - T\Delta S + p\Delta V/RT)}\right)}$$

ahol Δ a 2. és az 1. állapot közötti különbségekre utal, E: belső energia, S: entrópia.

A térfogatváltozás nagysága kulcsfontosságú a nyomás változás hatásának szempontjából. A vizsgált biokémiai rendszerek általában folyékony környezetben találhatóak. A folyadékok kompresszibilitása általában nagyon kicsi, szinte összenyomhatatlanok. Azokban a rendszerekben azonban, melyekben valamilyen rendezett makromolekulák vannak jelen, gyakran találhatóak üregek. Az üregek jelenléte lehetőséget ad arra, hogy nagyobb nyomás alkalmazásával megváltoztassuk ezen rendszereket. A spontán keletkezett kettősrétegű lipidmembránok esetén a nagyobb nyomás alkalmazása elősegíti a rendezettebb gél fázis kialakulását a kevésbé rendezett folyadékkristályos fázissal szemben (20). Fehérjék esetén az ellenkezője történik: a legtöbb esetben a rendezettebb, natív állapot nagyobb nyomás hatására destabilizálódik, a nagy nyomás a rendezetlen állapotnak kedvez. ennek oka az, hogy a rendezett, natív állapotban „csomagolási hibák”, üregek találhatóak, a rendezetlen polipeptidlánc jobban illeszkedik az oldószerhez. Egy vizes fázisban található fehérje térfogata a következőképpen írható fel (19):

$$V_{\text{fehérje}} = V_{\text{atomok}} + V_{\text{üregek}} + \Delta V_{\text{hidratációs réteg}}$$

Mivel az atomok szinte összenyomhatatlanok a biológiailag érdekes nyomástartományban a másik két tag játszik fontos szerepet. A hidratációs réteg térfogatváltozása abból ered, hogy a fehérje körül lévő hidratációs rétegben a víz sűrűbb (ezáltal kisebb térfogatú), mint az oldószerben (21, 22), ennek a sűrűbb rétegnek a mennyisége pedig a fehérje szabad felszínének nagyságától függ.

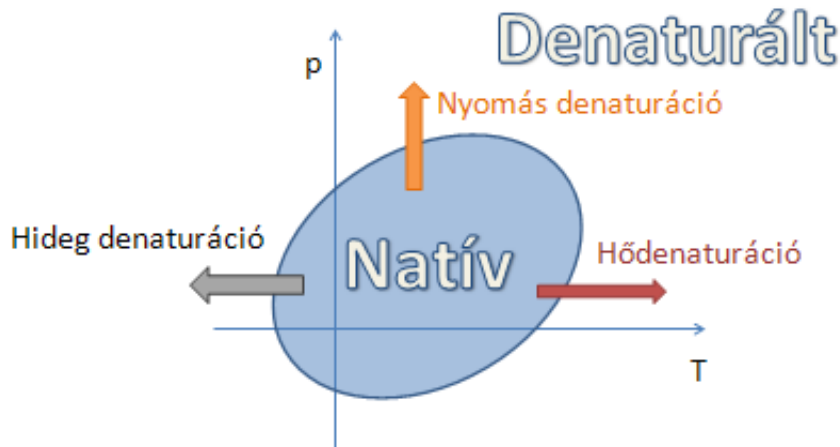
A nyomás változás fehérjére gyakorolt hatása függ a nyomás nagyságától. Az alacsonyabb nyomástartományban az elasztikus hatások érvényesülnek, vagyis az elsődleges és másodlagos kötések reverzibilisen torzulnak. Az elsődleges kémiai kötések összenyomódása nagyon kicsi, a rendszer térfogatváltozása szempontjából elhanyagolható. A hidrogénkötések összenyomása a konformáció torzulásához vezethet, ami csökkentheti a fehérje belsejében található üregek méretét. Általában 2 kbar körüli nyomáson az intermolekuláris kölcsönhatások és a negyedleges szerkezet

destabilizálódik (23, 24). Ez azzal magyarázható, hogy az oligomerek ill. aggregátumok között lévő üregek monomer állapotban megszűnnek, oldószerrel betölthetők lesznek, valamint megnövekszik a molekula felszíne, így nagyobb mennyiségben lehet jelen a sűrűbb hidratációs réteg. Nagyobb nyomás a fehérje kitekeredéséhez vezethet. A denaturációs nyomás tipikusan 5 kbar körül van, de fehérjénként változik 1-10 kbar között, illetve különleges esetekben ennél nagyobb is lehet. A fehérjék nagy nyomás hatására létrejövő denaturációja már régóta ismert, azonban a mechanizmus még nem teljesen tisztázott. Bár a natív szerkezet kompaktnak tűnik, különböző méretű üregeket tartalmaz, amik nem tölthetők be víz illetve oldószer molekulákkal, ezért növelik az ösztérfogatot. Ezeknek az üregeknek a megszűnése lehet a nyomás által indukált kitekeredés egyik hajtóereje (25, 26). Nem hanyagolhatjuk el a fehérje környezetére kifejtett hatását sem. A molekulák vizes oldatban találhatóak, ahol az oldószerrel hidratációs burkon keresztül vannak kapcsolatban. A víz sűrűsége a fehérje körüli vékony rétegben nagyobb. Kitekeredés során a polipeptidlánc szabad felszíne megnő, nagyobb mennyiségben lehet jelen ez a sűrűbb vízréteg, ami hozzájárul a denaturáció során bekövetkező negatív térfogatváltozáshoz (27):

$$\Delta V = V_{denaturált} - V_{natív} < 0 .$$

A nagy nyomás hatására bekövetkező denaturáció reverzibilitása fontos kérdés. A hőközlés hatására bekövetkező denaturációt általában irreverzibilis aggregáció követi. Nagy nyomás alatt ez a nyomás molekula disszociáló hatása miatt nem következik be, emiatt a nyomás csökkentése után a fehérje többé-kevésbé visszatekeredhet, de létrejöhetnek aggregációra hajlamos intermedierek is.

A fehérjék magas és alacsony hőmérsékleten is denaturálódhatnak, ez utóbbi a hideg-denaturáció (28). A nyomás változás és hőmérséklet változás hatására bekövetkező denaturációkat egységesen a Hawley-féle elliptikus fázisdiagram foglalja össze (29) (10. ábra).



10. ábra Hawley-féle elliptikus fázisdiagram

Az elliptikus fázisdiagram alkalmazhatóságának korlátja, hogy kétállapotú rendszert feltételez (csak natív és denaturált állapotokat tartalmaz, intermedier és aggregált állapotokat nem), valamint, hogy a denaturáció folyamatát reverzibilisnek tekinti.

2.5 A vizsgált fehérjék irodalmi háttere

2.5.1 Parvalbumin

A parvalbumin sok halfajtában megtalálható, különösen gyakori allergén (30). A halnak fontos szerepe van az egészséges táplálkozásban, hiszen értékes forrása a fehérjéknek, az omega-3 többszörösen telítetlen zsírsavaknak és a zsírban oldódó vitaminoknak. A megnövekedett halfogyasztást és haltermék előállítását figyelembe véve a halallergia nemrég megállapított 2%-os értéke a jövőben várhatóan növekedni fog (31-33). Az élelmiszer allergia egy tartós immun rendellenesség, jelenleg nincsen elérhető rutin immunterápia, amivel kezelni lehetne ezt a gyakran súlyos, néha halálos betegséget. A jelenlegi megoldás az allergiát okozó étel fogyasztásának kerülése. Emiatt már sok kísérletet tettek hipoallergén élelmiszer előállítására alkalmas módszerek fejlesztésére. Az élelmiszeriparban a szavatossági idő növelésére és mikrobiológiai minőség javítására a hőkezelés mellett már nagy nyomásos kezelést (5-700 MPa-ig) is használnak. A kezelés alapja a fehérjék nagy nyomás hatására történő denaturációja,

ami tipikusan ebben a nyomástartományban következik be. Ez a jelenség vezetett arra, hogy a Gad m 1 allergén fehérje nagy nyomás hatására történő kitekeredését vizsgáljam.

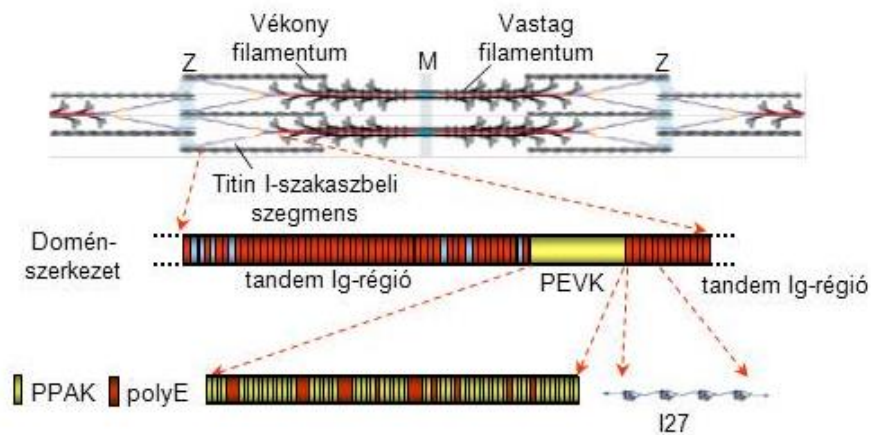
A parvalbumin Ca^{2+} -kötött formája meglehetősen stabilnak mutatkozik (34, 35). A halak főzése és sütése elvezethet molekuláris fehérje aggregátumok keletkezéséhez, és az IgE reaktivitás növekedéséhez, ahogy ezt kimutatták a tonhalra, a lazacra, a tőkehalra és lepényhalra (35, 36). Az IgE egy olyan immunoglobulin antitest csoport, amely többek között élelmiszer allergia esetén az antigénhez kötődik. Az IgE reaktivitás növekedéséből tudják kimutatni az allergénitás növekedését illetve csökkenését.

A parvalbumin általában a halak fehér izmában található, ahol az izomrostok relaxációjáért felelős. A pontyból származó parvalbumin szerkezetét először Kretsinger és társai határozták meg, ez volt az elsőként leírt EF kar motívum (37). Az EF-karú Ca^{2+} -kötő fehérjéknek sok fontos funkciója van, mint pl. az izomösszehúzódnak szabályozása [76], a citoszol kalciummal való pufferelem (38) és a sejtrészek közötti jelátvitel (39). Mivel ezen fehérjék funkcióját a kalcium szabályozza, fontos tudni, hogyan van kötve a Ca^{2+} a különböző konformációkban.

Az általunk vizsgált Gad m 1 az atlanti tőkehalban (*Gadus morhua*) található legfőbb allergén (40). 109 aminosavat tartalmaz, a kristályszerkezete nem ismert, a homológia modellezés alapján a molekulának globuláris alakja van, 6 rövid hélixszel és két Ca^{2+} -kötőhellyel. A parvalbumin a Ca^{2+} -kötő fehérjék jó modellje, az EF-karú fehérjék családjának jellegzetes tagja.

2.5.2 Titin

A titin a természetben található legnagyobb fehérje, molekulatömege meghaladja a 3 millió daltont (11. ábra). Tipikusan a harántcsíktal izomban található, ahol a fél szarkomert átíveli (41). Az izom nyújtása közben passzív erő keletkezik, ami létfontosságú a szarkomer integritásának megőrzésében (42, 43). A titin felelős a passzív rugalmasságért, ami megvédi a szarkomert a túlnyújtástól [49]. A molekula a szarkomer „Z” és „M” vonalaihoz van horgonyozva (41). A titin templátként szolgál a vastag filamentum összeállításához (44), továbbá szerin/treonin kináz doménnel is rendelkezik (45, 46). Meglepő módon a nukleuszban is találtak titint, ahol valószínűleg kromoszómális szerkezet templátként funkcionál (47).



11. ábra A titin óriásmolekula felépítése

A titin két strukturálisan és mechanikailag elkülönülő részből áll. A molekulatömeg több, mint 90 %-át az immunoglobulin (Ig) és fibronectin III (Fn) domének alkotják (48, 49). Az immunoglobulin domének általában 7-8 antiparallel szálat tartalmazó szendvicsben elhelyezkedő béta lemezekből állnak. A titin Ig domén stabil magja 7 antiparallel béta szálból áll, amelyeket flexibilis hurkok kötnek össze (50). Az Ig és Fn doméneken kívül a titin megmaradó kb. 10 %-át egyedi szekvenciák alkotják. A legismertebb és talán funkcionálisan a legfontosabb egyedi szekvencia a PEVK domén (49). A PEVK domén a nemrég leírt rendezetlen fehérjék családjának tagja. A PEVK név a prolin (P), glutaminsav (E), valin (V) és lizin (K) aminosavak túlsúlyára (kb. 75%) utal (49).

Feltételezések szerint a PEVK túlnyomórészt random szerkezetű, de kis arányban rendezett másodlagos szerkezeti elemeket is tartalmazhat, mint pl. poliprolin II hélixet (51, 52). A PEVK doménben két ismétlődő motívumot találtak. Az egyiket PPAK-nak nevezték el az első néhány aminosaváról, a másikat polyE-nek a szekvenciában található sok glutaminsavról (53). Feltételezések szerint a PEVK domén nem képes stabil háromdimenziós szerkezet kialakítására a töltéssel rendelkező aminosavak magas aránya miatt (49). A PEVK domén entrópiás rugóként működik, rugalmassága a fűgyszerű lánc modellel írható le (54). Mind az Ig domének, mind a PEVK régió hozzájárul a titin rugalmasságához. Míg kis mechanikai erőknél a PEVK entrópiás rugó tulajdonsága dominál, nagy külső erőknél az Ig domének kitekeredése adhat extra megnyújthatóságot (55).

A titin és fragmentumainak mechanikai erőkkel szembeni konformációs stabilitását többen tanulmányozták már egyedi molekula kísérletekkel (54, 56-60). Az általunk használt izotróp nyomás azonban feltehetően más mechanizmusokon keresztül hat, mint az egy-molekula kísérletekben alkalmazott egy tengely mentén kifejtett mechanikai erő. A titin illetve fragmentumainak izosztikus nyomással szembeni stabilitását még nem vizsgálták. Nem ismerjük továbbá egyik titin molekularésznek sem a nyomástól függő viselkedését, sem a nyomás-hőmérséklet fázisdiagramját.

2.5.3 Rv3221c

Az Rv3221c a *Mycobacterium tuberculosis* egyik fehérjéje. Ez világszerte az egyik legelterjedtebb fertőző ágens, a tuberkulózis egyik kórokozója, ami leggyakrabban a tüdőt támadja meg. Világszerte több, mint 1 milliárd ember fertőzött, de csak 10%-uknál jelentkeznek a betegség tünetei. 2011-ben 8,7 millió új esetet regisztráltak és 1,4 millióan haltak meg tuberkulózisban, a nők között az egyik vezető halálok volt 2011-ben, a halálesetek 95%-a a fejlődő országokban történt (61).

Az Rv3221c fehérjét a *Mycobacterium tuberculosis* teljes génszekvenálása során fedezték fel (62). Ez egy biotin kötő fehérje, aminek szekvenciája a *Mycobacteriumok* között erősen konzervált (63). Ez a konzerváltság arra utal, hogy a fehérjének fontos funkciója lehet. Ez a funkció egyelőre ismeretlen, annyit tudunk, hogy a *Mycobacterium tuberculosis* kultúra felülúszójában kiválasztva megtalálható a fehérje (64). Az Rv3221c háromdimenziós szerkezetét még nem határozták meg sem röntgenkristallográfiával sem NMR-rel. Egy korábbi tanulmány szerint a fehérje fiziológias körülmények között rendezetlen (65), magasabb hőmérsékleten azonban rendezett struktúrát vesz fel. TFE hozzáadásával a rendeződési hőmérséklet csökkent. Ez a különleges tulajdonság inspirált minket arra, hogy megmérjük az Rv3221c fázisdiagramját, mivel egyelőre nincs olyan fiziológiásan rendezetlen fehérje, melynek ismert lenne a p-T fázisdiagramja, amely a rendezetlentől eltérő fázisokat is tartalmaz.

3. Célkitűzések

1. A Gad m 1 fehérje egy gyakori allergén, ezért szerkezeti tulajdonságainak jobb megismerése különösen fontos lehet. Amennyiben a racionálisan elérhető nyomás-hőmérséklet tartományban a fehérje denaturálódik, fontos kérdés az átalakulások reverzibilitásának vizsgálata, mivel csak a konformáció irreverzibilis változása vezethet az allergenitás csökkenéséhez. Ha a spektroszkópai módszerekkel érzékelt szerkezeti változások csökkent IgE kötéssel járnak együtt, akkor a nyomáskezelés alkalmas lehet csökkentett allergenitású élelmiszerek előállítására. Mivel a parvalbumin az egyik gyakran használt modell Ca^{2+} -kötő fehérje, a Ca^{2+} -kötés szempontjából is érdekes a nyomás hatására történő változások vizsgálata.

A **Gad m 1** fehérje vizsgálata során az alábbi célokat tűztem ki:

- **a fehérje nyomás által indukált szerkezeti változásainak, illetve stabilitásának vizsgálata „in situ” nagy nyomású spektroszkópai módszerek felhasználásával**
- **a p-T fázisdiagram meghatározása, továbbá az ennek során talált szerkezeti átalakulások reverzibilitásának megállapítása**

2. A fehérjék nagy nyomás hatására bekövetkező denaturációja már régóta ismert, de a mechanizmusával kapcsolatban még vannak tisztázatlan kérdések. A nyomás-hőmérséklet fázisdiagramja viszonylag kevés fehérjének ismert. Ezekből a diagramokból, főleg, hogy ha eltér a Hawley-féle hagyományos elliptikus diagramtól, a fehérjéknek új tulajdonságai is felfedezhetők. Olyan fehérjéket kerestünk, melyek p-T fázisdiagramja várhatóan eltér a szokványostól.

A polyE az eddig rendezetlen szerkezetűnek ismert PEVK titin domén része, amiről az utóbbi időben többen feltételezték, hogy mégis tartalmazhat másodlagos szerkezeti elemeket. Felmerült, hogy a fehérje bizonyos körülmények között esetleg rendeződik, pl. hogy a p-T síkon a natív állapot ellipszise eltolódott, és a fehérje a szokásostól eltérő nyomás-hőmérséklet értékek mellett rendezett fázisban található. Különböző paraméterek változtatásával tanulmányoztam a polyE fehérje stabilitását.

Célom az volt, hogy megállapítsam, hogy az alábbi **fizikai-kémiai paraméterek változtatása indukál-e rendeződést a PEVK fragmentum szerkezetében:**

- pD változtatása
- nyomás növelése
- hőmérséklet növelése illetve csökkentése
- kozmotróp anyagok hozzáadása

Összehasonlításképp a titin egy másik jellegzetes doménjét, az **Immunoglobulin 27**-et is vizsgáltam, amely az izom mechanikai rugalmasságában játszik szerepet. Ennek a doménnek a lineáris megnyúlását, kitekeredését már korábban vizsgálták, célkitűzésim között az eddig nem **ismert izotróp nyomástól függő válasza és p-T diagramjának felderítése** szerepelt.

Az **Rv3221c** fehérjéről olyan adatokat publikáltak, miszerint szobahőmérsékleten rendezetlen szerkezetű, magasabb hőmérsékleten azonban rendeződik. Ez a tulajdonság érdekes, a szokásostól eltérő p-T fázisdiagramot sejtetett, ezért tűztem ki célul e fehérje **p-T fázisdiagramjának meghatározását** is.

4. Anyagok és módszerek

4.1 A vizsgált fehérjék előállítása

4.1.1 Parvalbumin

A Gad m 1 fehérje liofilizált formában állt rendelkezésemre. A fehérjét a Bécsi Orvostudományi Egyetem, Orvosi Biotechnológia Intézetében tisztították a következő módszerrel. Az atlanti tőkehal (*Gadus morhua*) izmát háromszoros mennyiségű extraháló pufferrel (20 mM Bis-Tris, 3 mM NaN₃, pH 7) homogenizálták, majd 3 órán át 4 °C-on kevertették. Centrifugálás után a felülúszót Miracloth szűrőn szűrték, hogy a sejttörmelékeltávolítsák. Az oldatot DEAE Sepharose oszlopra vitték fel 20 mM Bis-Tris, pH 7 kötőpufferben, majd az elúciós puffer (20 mM Bis-Tris, pH 7, 1 M NaCl) lineárisan 0-25 %-ig növekvő gradiensevel mosták le a kikötött fehérjéket. A megfelelő fehérjét tartalmazó frakciókat gélszűréssel tisztították tovább. A Gad m 1 -et tartalmazó frakciókat liofilizálás előtt desztillált vízben dializálták.

A Gad m 1 fehérje aminosav szekvenciája:

MAFAGILADADCAA AVKACEAAESFSYKAFFAKCGLSGKSADDIKKAFF
VIDQDKSGFIEEDELKFLQVFKAGARALTAETKAFLKAGDSGDGAIGVGE
WAVLVKA

4.1.2 Titin

4.1.2.1 A titin fragmentumok előállításához használt anyagok

➤ *Víz:* Az oldatokhoz Millipore rendszeren átszűrt vizet használtam. Ennek fajlagos vezetőképessége kisebb, mint 0,055 µS/cm, kórokozóktól, pirogénektől és fehérjeszennyeződésektől mentes.

➤ *Kompetens sejtek készítésekor használt oldatok:* 100 mM CaCl₂, 100 mM MgCl₂, 85% 100 mM CaCl₂ + 15% glicerin. A kész oldatokat autoklávoztam, vagy steril szűrőn átszűrtem.

➤ *Plazmid:* Az N terminálison hexahisztidin taggel rendelkező polyE és I27 fragmentumokat kódoló szekvenciák pET 28a vektorban (T7 alapú, IPTG indukálható rendszer) álltak rendelkezésemre az NheI és XhoI valamint az NheI és BamHI hasítóhelyek közé illesztve. A 171 aminosavból álló polyE egy ikermolekula, amely

kétszer tartalmazza a titin 6769-6840 aminosavakat. Ezeket az EcoRI restrikciós enzim egy hasítóhelye választja el egymástól. Erre azért volt szükség, mert az egyszeres fragmentum túl rövid lett volna az expresszáshoz. A plazmidok az alábbi fehérjeszekvenciákat kódolták:

❖ polyE:

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASEEEVLFEEEEIVPEEEVLPEEEVLPEE
EEVLPEEEVLPEEEIPPEEEVPPEEEYVPEEEFVPEEEVLPEFEEVLFEIEIV
PEEEVLPEEEVLPEEEVLPEEEVLPEEEIPPEEEVPPEEEYVPEEEFVPEEE
VLPCC

❖ titin I27:

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASLIEVEKPLYGVEVVFVGETAHFEIELS
EPDVHGQWKLKGQPLAASPDCEIIEDGKKHILILHNCQLGMTGEVSFQAANTKS
AANLKVKELGSEFELRRQACGRTRAPPPPLRSGC

- *Mikroorganizmus:* a fehérje kifejezéshez *Rosetta* BL21 (DE3) pLysS (Merck) sejteket használtam, melyek kloramfenikolra rezisztensek, ezzel szelektálhatók.
- *Kloramfenikol törzsoldat (1000x):* milliliterenként 34 mg kloramfenikolt etanolban oldottam, felhasználásig -20°C-on tároltam.
- *Kanamicin törzsoldat (1000x):* kanamicin-szulfátból 30 mg/ml-es vizes oldatot készítettem, 0,22 µm-es szűrőn átszűrtem, felhasználásig -20°C-on tároltam.
- *Folyékony LB tápoldat:* 1,0% tripton, 0,5% élesztőkivonat, 1,0% NaCl, pH 7, autoklávban sterilizve (121 °C, 45 perc). Ioncserélt csapvíz is megfelelő hozzá.
- *LB lemez:* az LB tápoldaton kívül 1,5% agart is tartalmaz. Autoklávban steriliztem, amikor kézmeleg akkor keverhető bele az antibiotikum
- *IPTG törzsoldat (1000x):* 200 mg/ml-es vizes oldatot készítettem, 0,22µm-es szűrőn átszűrtem, felhasználásig -20°C-on tároltam
- *2×YT (kétszeres Yeast-Trypton) tápoldat:* 1,6% tripton, 1,0% élesztőkivonat, 0,5% NaCl, pH 7, autoklávban sterilizve. Ioncserélt csapvíz is megfelelő hozzá.
- *Proteáz inhibitor tableta:* Complete, EDTA-free (Roche)

- *Fehérje-kezelő oldat SDS-PAGE-hez:* 10 ml 3×-os Laemmli Solubilization Buffer, pH 6,8 + 15 µl β- merkaptotanol
- *SDS-poliakrilamid gél:* A fehérje elektroforézisek során 10 %-os töménységű géleket használtam. Szeparáló gél: 10% (pH 8,8; 0,375 M Tris-HCl), seprőgél: 4% (pH 6,8; 0,125 M Tris).
- *SDS-PAGE futtató puffer:* 14,4 g glicin, 3 g Tris-HCl, 5 ml 20%-os SDS, 1 liter vízben oldva.
- *Poliakrilamid gélhez használt festék:* Page Blue Protein Staining Solution, Commassie-kék festéket tartalmaz.

4.1.2.2 *A titin fragmentumok előállításához használt módszerek*

Kompetens *Rosetta* sejtek előállítása

- 1) 50 ml LB tápoldathoz 50 µl kloramfenikol törzsoldatot adtam, majd beoltottam egy telep *Rosetta* sejttel. Egy éjszakán át 250 RPM-mel rázattam 37 °C-on.
- 2) Az egyéjszakás kultúrából 4 ml-t átoltottam 400 ml LB tápoldatba, melyhez előzőleg 40 µl kloramfenikol törzsoldatot adtam, majd 37 °C-on tovább rázattam, míg a 600 nm-en mért abszorbancia el nem érte a 0,3-0,4 értéket.
- 3) A kultúrát centrifuga csövekbe mértem szét és 5-10 percig jégen tartottam. (E lépés után a sejteket mindvégig hidegen kell tartani.)
- 4) A sejteket 7 percen át 10000 RCF-fel 4 °C-on centrifugáltam.
- 5) A felülúszót leöntöttem és a leülepedett sejteket óvatosan 100 ml 100 mM-os hideg MgCl₂ oldatban szuszpendáltam és 5 percig jégen állni hagytam.
- 6) A sejteket 10 percen át 3000 RCF-fel centrifugáltam 4 °C-on. A felülúszó leöntése után a sejteket ismételten óvatosan szuszpendáltam 20 ml hideg 100 mM CaCl₂ oldatban, majd jégen állni hagytam 20 percig.
- 7) A sejteket újból 5 percen keresztül centrifugáltam 300 RCF-fel 4 °C-on. A felülúszót leöntöttem és a csapadékot óvatosan, de alaposan 4 ml hideg 15% glicerin és 85% 100 mM CaCl₂ tartalmú oldatban szuszpendáltam.
- 8) A sejteket tartalmazó oldatot jégen tartva 50 µl-es mennyiségekre mértem szét, majd folyékony nitrogénben fagyasztottam, és felhasználásig -80 °C-on tároltam.

Transzformálás

- 1) A $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tartott kompetens sejteket jégre tettem és megvártam, míg felolvadnak. A sejtek nem melegedhetnek fel szobahőmérsékletűre és a felolvadt sejtek már nem fagyaszthatók vissza.
- 2) $50\text{ }\mu\text{l}$ sejt kultúrához hozzá adtam $1\text{-}10\text{ ng}$ plazmid DNS-t, ez megfelelő töménységű oldatból $1\text{-}2\text{ }\mu\text{l}$.
- 3) A sejteket óvatosan felráztam ügyelve arra, hogy ne melegedjenek fel.
- 4) A sejteket 30 percig jégen állni hagytam, ennyi idő alatt a plazmid DNS kötődik a sejtmembránokhoz.
- 5) A sejteket egy percre $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os termosztátba helyeztem. A sejtmembrán a hő sokk miatt fluiddá válik így a hozzákötődött vektor bejuthat a sejtbe.
- 6) A hő sokkon átesett sejteket 2 percre visszatettem jégre, ekkor a membrán ismét rigidebb lett.
- 7) A sejtekhez steril fülkében $900\text{ }\mu\text{l}$ LB tápoldatot adtam.
- 8) Az elegyet 1 órán át 250 RPM -mel ráztam $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, közben az LB lemezeket is ugyanennyi ideig inkubáltam $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on.
- 9) A sejteket steril fülkében kloramfenikol és kanamicin antibiotikumokat tartalmazó előmelegített lemezre szélesztettem, és $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on egy éjszakán át inkubáltam.

A sejtbe bejuttatott plazmid kanamicin rezisztenciagént hordoz, ami szelekciós markerként használható. A kanamicint tartalmazó LB lemezekeken csak az antibiotikum rezisztenciával rendelkező sejtek tudnak szaporodni. A lemezek a kinőtt telepekkel $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on egy-két hétig is eltarthatók.

Indítótenyészet készítése

- 1) 40 ml LB tápoldathoz $40\text{ }\mu\text{l}$ kanamicint és $40\text{ }\mu\text{l}$ kloramfenikolt adtam.
- 2) Steril fülkében ezt egyetlen izolált telepről vett sejtekkel beoltottam.
- 3) A sejteket $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on egy éjjelen át ráztam 250 RPM -mel.

Fehérje expresszálas

- 1) 4×1 liter 2xYT tápoldathoz steril fülkében hozzáadtam literenként 1 ml kanamicint, 1 ml kloramfenikolt és 10 ml egyéjszakás indítótenyészetet.

- 2) 37 °C-on, 250 RPM-mel rázattam kb. 4 órán át, amíg 600 nm-en mért abszorbancia el nem érte a 0,8-as értéket.
- 3) Hozzáadtam literenként 1 ml, 200 mg/ml koncentrációjú filter steril IPTG-t. Ez indukálta a fehérje expressziót.
- 4) Tovább tenyésztetem 37 °C-on, 250 RPM-mel, 4 órán át.
- 5) Centrifugálással szüreteltem a sejteket 3000 RCF-en, 20 percig, 2 °C-on (Hermle Z 383 K centrifuga). A felülúszót leöntöttem.
- 6) Egy proteáz inhibitorokat tartalmazó tablettát desztillált vízben feloldottam és a rendszerint kb. 10 g nedves ösztömögű sejtet szuszpendáltam benne. A végső térfogatot 35 ml-re állítottam.
- 7) Felhasználásig -80 °C-os hűtőben tároltam a sejteket.

Fehérjetisztítás

- 1) A célfehérjét tartalmazó sejtsuszpenziót hideg vízbe téve felolvasztottam, majd jégre tettem.
- 2) A sejteket jégen tartva ultrahanggal feltörtem (SANYO MSE Soniprep 150; 2*2 perc, 23 kHz, amplitúdó: 20 µm).
- 3) A sejttörmelékét 59 percig, 27000 RCF-en, 2°C-on centrifugáltam (Hermle Z 383 K centrifuga), a felülúszót tartottam meg, és ezt újra ugyanígy centrifugáltam.
- 4) A felülúszót 0,22 µm-es (Millex) szűrőn átszűrtem, ez tartalmazza a célfehérjét.
- 5) Ezután a megfelelő „A” pufferrel (fehérjénként különböző, később részletezve) addig hígítottam, amíg a pH legalább 7 lett.
- 6) A célfehérjét folyadékkromatográfiával választottam el a többitől, FPLC berendezés segítségével (ÄKTA purifier, GE Healthcare).

A készülék két pár beszívó csővel és két pumpával rendelkezik, amely lehetővé teszi a folyadékok közti gyors váltást és a két folyadék („A” és „B” puffer) fokozatosan változó arányú keverését.

A minták először His Trap FF (GE Healthcare) 1 ml-es Ni²⁺ affinitás kromatográfiás oszlopon lettek tisztítva. Ez specifikusan köti a polihisztidint tartalmazó fehérjéket, melyek aztán az imidazol koncentrációt növelve leszoríthatók az oszlopról.

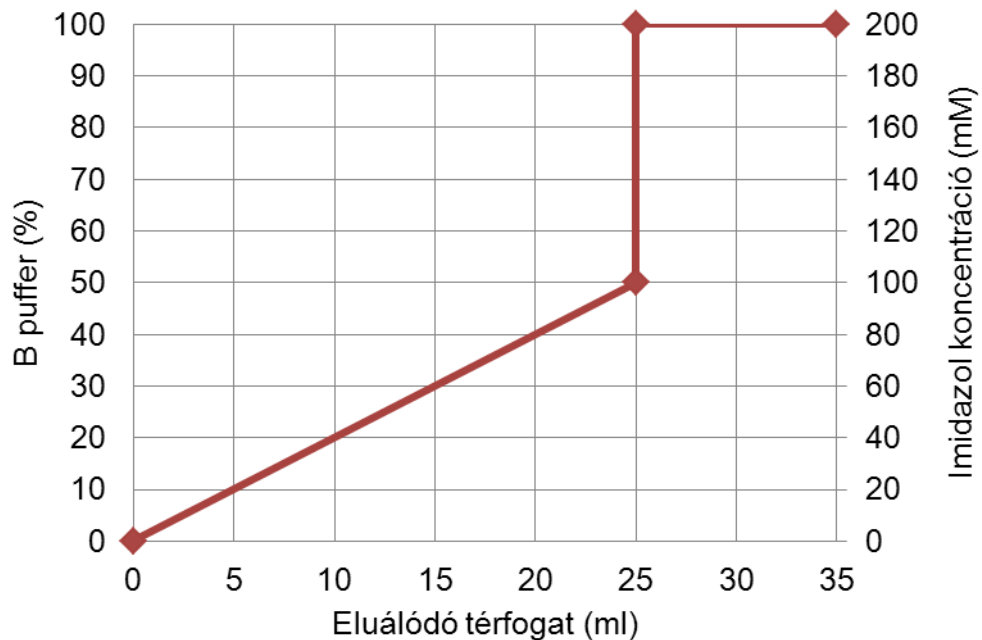
Mintafelvétel után 20 ml „A” puffert folytattam át az oszlopon a nem specifikusan kötődő komponensek eltávolítására. Ezután az alábbi puffereket és elúciós programokat használtam, 1 ml-es frakciókat szedve (12. ábra-14. ábra):

➤ titin I27 esetén:

A puffer: 0,5 M NaCl, 0,1 M NaH₂PO₄, pH=8

B puffer: 0,5 M NaCl, 0,1 M NaH₂PO₄, 0,2 M imidazol, pH=8

Mintafelvétel és eluálás sebessége: 1 ml/perc



12. ábra A titin I27 tisztításához használt elúciós program Ni²⁺ affinitás oszlopon

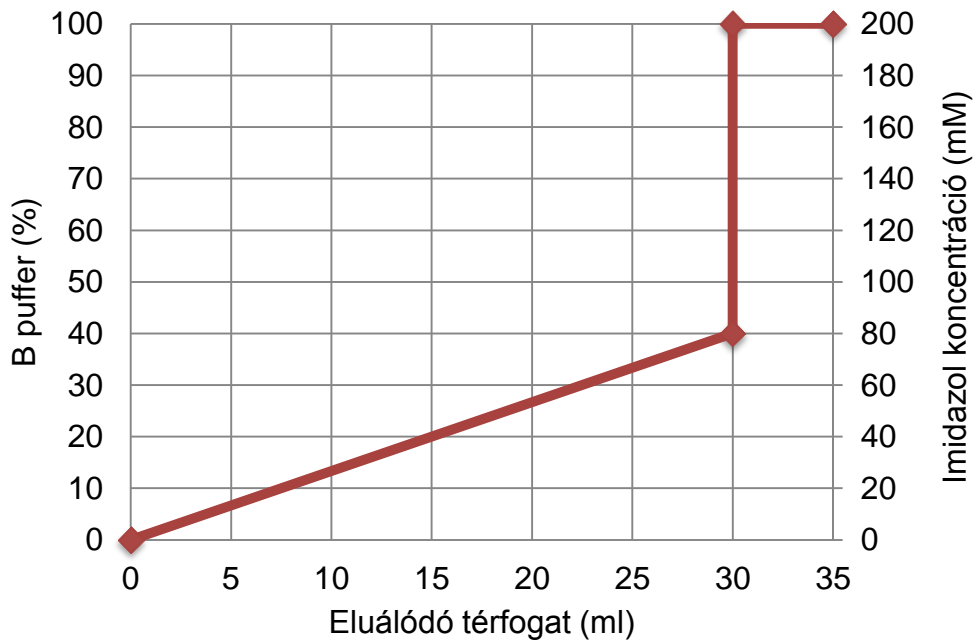
A titin I27 kb. 80mM imidazol koncentrációnál mosódott le az oszlopról.

➤ polyE esetén:

A puffer: 0,3 M NaCl, 0,1 M NaH₂PO₄, pH=8

B puffer: 0,3 M NaCl, 0,1 M NaH₂PO₄, 0,2 M imidazol, pH=8

Mintafelvétel és eluálás sebessége: 0,5 ml/perc



13. ábra A polyE tisztításához használt elúciós program Ni²⁺ affinitás oszlopon

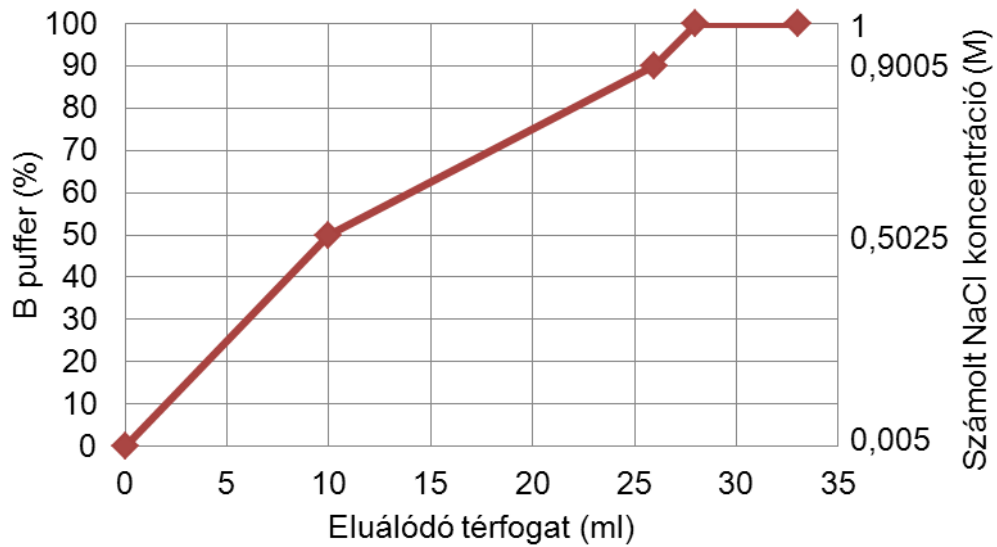
A polyE kb. 20 mM imidazol koncentrációnál kezdett lemosódni az oszlopról, azonban nem vált el tökéletesen a többi fehérjétől, ezért további tisztításra volt szükség. Ehhez ugyanezen FPLC rendszeren Hi Trap Q HP (GE Healthcare) 1 ml-es ioncserélő oszlopot használtam. Erről az oszlopról a kikötődött fehérjéket a sókoncentráció növelésével tudtam leszorítani.

Mielőtt a mintát az ioncserélő oszlopra felvittem, a fehérjét tartalmazó frakciókat az ioncserélő oszlopnak megfelelő „A” pufferbe dializáltam.

A puffer: 20 mM Bis-Tris, 5mM NaCl, pH=6,34

B puffer: 20 mM Bis-Tris, 1 M NaCl, pH=6,34

Mintafelvétel és eluálás sebessége: 0,5 ml/perc



14. ábra A polyE tisztításához használt elúciós program Q anion cserélő oszlopon (A jobb oldali skála azért nem 0-ról indul, mert már az „A” puffer is tartalmazott 5 mM NaCl-t.)

A polyE kb. 0,55 M NaCl koncentrációnál mosódott le az oszlopról.

Fehérje elektroforézis

A frakciók abszorbanciáját az FPLC készülék 280 nm-en detektálta, ez alapján ki tudtam választani a fehérjét tartalmazó frakciókat. A frakciók tisztaságát elektroforézissel ellenőriztem. A futtatni kívánt frakciókból 20-20 μ l-t kivéve 10-10 μ l fehérjekezelő oldatot adtam hozzájuk. A mintákat 5 percig 90 °C-on inkubáltam, majd 10%-os SDS poliakrilamid gélen SDS-PAGE futtató pufferben 140 V feszültségen futtattam, kb. 1 órán át. A fehérjéket Coomassie-kék festékkel hívtam elő és ismert molekulatömegű standard (Fermentas, PageRuler Prestained Protein Ladder) segítségével azonosítottam.

Dialízis és liofilizálás

A tiszta fehérjeoldatot tartalmazó frakciókat regenerált cellulózból készült dialízismembránban dializáltam (ZelluTrans, határmolekulatömeg: 8000-10000 dalton),

I27 esetén 10 mM NaCl tartalmú oldatba, polyE esetén tiszta vízbe, 4 °C-on. A mintákat ezután liofilizáltattam és felhasználásig liofilizált formában -20°C-on tároltam.

4.1.3 Rv3221c

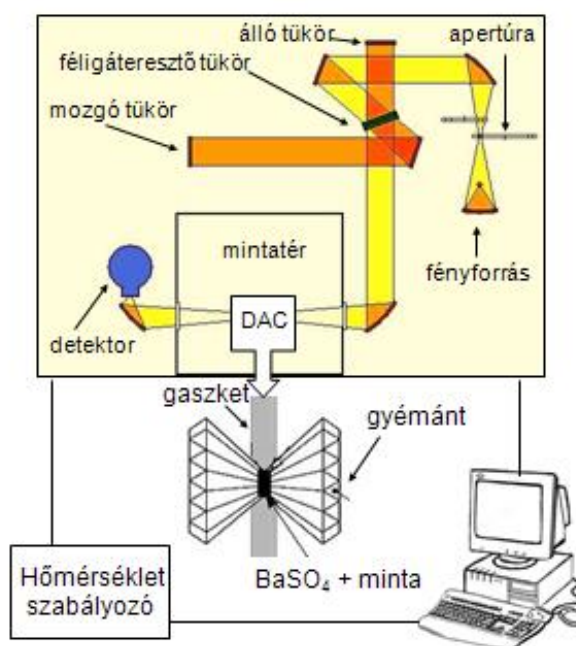
Az Rv3221c fehérje liofilizált formában állt rendelkezésemre. A fehérjét az indiai Council of Scientific and Industrial Research (CSIR) Institute of Genomics & Integrative Biology (IGIB) munkacsoportjában állították elő a következő módszerrel. A *Mycobacterium tuberculosis* TB7.3 Rv3221c fehérje szekvenciáját pProExHTc plazmid vektorba klónozták. A rekombináns plazmidot *Escherichia coli* BL21 (DE3) kompetens sejtbe transzformálták és expresszálták. A fehérjét Ni²⁺ affinitás kromatográfiás oszlopon 20mM Tris-HCl, pH 8, 0,5 M NaCl, 100 mM imidazol tartalmú pufferrel tisztították. Az Rv3221c-t tartalmazó frakciókat liofilizálás előtt desztillált vízben dializálták.

Az Rv3221c fehérje aminosav szekvenciája:

MSYYHHHHHDYDIPTTENLYFQGAMGIRMAEKSGVMMMAEDVRAEIVA
SVLEVVVNEGDQIDKGDVVVLLLESMKMEIPVLAEAAGTVSKVAVSVGDVIQA
GDLIAVISNSKAYVDELTSRGRPRI

4.2 Infravörös spektroszkópia

A mérésekhez egy sugárfókuszálóval (Bruker A525) rendelkező Bruker Vertex80v (Bruker Optics, Billerica, MA) FTIR spektrométert használtam (15. ábra). Ez az összes frekvenciához tartozó IR intenzitás értéket egyszerre gyűjti össze. Fourier transzformációs infravörös spektroszkópiánál a spektrumot két lépésben kapjuk meg. A műszer először egy interferogramot vesz fel, majd ezt Fourier transzformációval energia spektrummá alakítja. Az interferogram felvételéhez Michelson-féle interferométert használt. Ebben a fényforrás után az állítható apertúra nyíláson keresztülhaladva a fény egy féligáteresztő tükörrre érkezik. Ez a fény kb. 50%-át az álló, 50%-át a mozgó tükörrre engedi tovább. Az álló és mozgó tükörről reflektált fénysugarak a detektor felé haladó sugárnyaláiban egyesülnek, és a két sugármenet pillanatnyi útkülönbségének megfelelően interferálnak.



15. ábra Az infravörös spektroszkópiai mérésekhez használt berendezés vázlatos felépítése

A spektrumokon ábrázolt abszorbanca a minta nélkül ($I_0(\nu)$) illetve a mintával együtt ($I(\nu)$) mért intenzitásokból számolható:

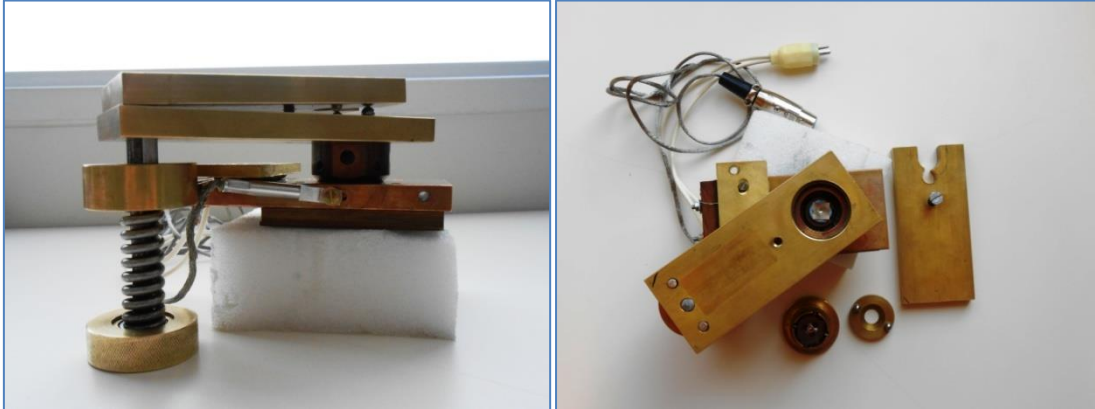
$$A = \lg \frac{I_0(\nu)}{I(\nu)}.$$

A detektáláshoz egy nagy érzékenyséű folyékony nitrogén hűtésű 0,25*0,25 mm-es MCT detektort használtam. A mintavételezés szinkronizálása egy 632,8 nm-es He-Ne lézer segítségével történt.

Többszöri spektrumfelvételnél N mérés esetén a zaj \sqrt{N} -szeresre, a jel N -nel arányosan nő, emiatt a jel/zaj arány \sqrt{N} -szeres javulása várható. A jel/zaj viszonyt 256 spektrum átlagolásával javítottam. A spektrumok felbontása 2 cm^{-1} .

Az FTIR spektrométert egy nagy nyomás előállítására alkalmas gyémántcellával kombináltam (Diacell, Leichestet, UK). A cellával a nagy nyomást nagyon kis (~50 nl) térfogatban állítjuk elő. A mintát két oldalról gyémánt veszi körül, amely egyrészt kéménysége miatt alkalmas, mert ellenáll a nagy nyomásnak, másrészt átlátszósága miatt lehetővé teszi az optikai méréseket. A gyémántcellába egy 0,5 mm átmérőjű lyukkal rendelkező rozsdamentes acéllemez tömítést (gaszket) helyeztem. A gaszketeket a mérések előtt előzetesen összenyomtam a gyémántcellában, hogy mérés

közben már ne szenvedjenek jelentős deformációt. Összenyomás után a gaszketek vastagsága, így az optikai úthossz is $50\ \mu\text{m}$. A nyomást a két gyémántra kifejtett erővel tudtam növelni (16. ábra).



16. ábra Az infravörös mérésekhez használt gyémántcella

A nyomás mérésére belső kalibránst, BaSO_4 -ot használtam. Ennek infravörös csúcsa ismert mértékben tolódik el a nyomás függvényében (66), a fehérje mintákkal pedig nem lép reakcióba, mert vízben oldhatatlan.

A nyomást az alábbi képlettel számoltam:

$$p = 0,031 * \Delta\nu^2 + 2,097 * \Delta\nu,$$

$$\text{ahol } \Delta\nu = \nu_k - \nu_0$$

ν_0 : referencia hullámszám, a BaSO_4 csúcsának atmoszférikus nyomáson mért értéke

ν_k : a mért hullámszám hőmérséklettel korrigált értéke.

A hőmérsékletkorrekcióra az alábbi kalibrációs egyenesből származtatható egyenletet használtam:

$$\nu_k = \nu_m - 0,0175 * \Delta T$$

ahol ν_m a mért hullámszám, ΔT pedig a referenciaméréshez képest a hőmérséklet különbség. A nyomás meghatározás statisztikus hibája $\sim 0,2$ kbar.

A fűtést $0,2\ \text{°C/perc}$ sebességgel, Eurotherm (typ 2216e, Durrington, UK) hőmérsékletszabályzóval végeztem, közben termopárral (OMEGA Engineering, Stamford, CT) mértem a hőmérsékletet. A nyomás beállítása kézi szabályozással történt. A liofilizált fehérjét közvetlenül a mérés előtt $75\ \text{mg/ml}$ -es koncentrációban különféle D_2O pufferekben oldottam fel. Az infravörös spektroszkópiai méréseknél

mindig nehézvizet (D₂O) használtam könnyű víz (H₂O) helyett, mert mint korábban említettem (2.2.1. fejezet) a könnyű víznek viszonylag nagy abszorpciós csúcsa van 1645 cm⁻¹-nél, ami átfed a fehérjék amid I csúcsával. A különböző pD-jű mérésekhez 1M HEPES (pD=3), 1 M Bis-Tris (pD=7) és 0,6 M CAPS (pD=10,5) oldatokat használtam. Néhány mérésnél ezekhez 0,2 M CaCl₂, 3 M CaCl₂, 0,5 M KNO₃, 0,25 M NaCl, vagy 50 % glicerint is hozzáadtam. A pufferek pD-jét deuterált vegyszerekkel (DCl és NaOD) N₂ áramoltatás alatt állítottam be, hogy a hidrogén szennyezést elkerüljem. A látszólagos pH-t mértem, és ebből a pD-t a következő összefüggéssel számítottam: pD=pH+0,4 (67).

Alapvetően két különböző fajta méréssorozatot végeztem: a nyomáskísérleteknél állandó hőmérsékleten emeltem a nyomást, míg a hőmérséklet-kísérleteknél állandó nyomáson emeltem a hőmérsékletet.

4.3 Fluoreszcencia spektroszkópia

A fluoreszcens spektrumok felvételéhez egy házi gyártmányú hőmérsékletszabályozóval ellátott Fluorolog-3 (Horiba Jobin Yvon) spektrométert használtam. Fluoreszcens méréseket csak a Gad m 1 és a titin I27 fehérjén végeztem, mivel ezek tartalmazzak gerjeszthető triptofán aminosavakat. A fehérjék és a puffer koncentrációja az infravörös méréshez képest 50-szer alacsonyabb volt: 1,5 mg/ml fehérje koncentráció, 20 mM Bis-Tris, pH 7 puffer. Az optikai úthossz 3 mm volt. 290 nm-es gerjesztési hullámhosszat alkalmazva az emissziót 300-540 nm-ig detektáltam, 2 nm-es felbontással. A méréseket atmoszférikus nyomáson a hőmérséklet függvényében végeztem.

4.4 Homológia modellezés

A homológia modellezést a Swissmodel Protein Modeling Serverrel végeztem (<http://swissmodel.expasy.org>) (68-70), ami a következő PDB kódú templátokat találta legmegfelelőbbnek:

- titin I27: 1titA
- polyE: nem talált templátot
- Gad m 1: 1a75B
- Rv3221c: 1z6hA

4.5 IgE ELISA

Az ELISA kísérleteket a Bécsi Orvostudományi Egyetem, Orvosi Biotechnológia Intézetében végezték.

A mintákat gumidugóval lezárt üvegcsövekben hő illetve nyomáskezelttem. A csöveket egy termosztált nagy nyomású cellába helyeztem (U-103, Unipress, Varsó). A nyomást Nova Swiss kézipumpával növeltem. Nyomásközvetítő közegnek vizet használtam.

Az ELISA kísérlethez a mikrotitráló lemezeket zsebenként 1 μ g kezeletlen, hőkezelt (80 °C) illetve nyomás- és hőkezelt (3 kbar, 80 °C) Ca²⁺-kötött parvalbuminnal vonták be. Ezután 0,5 v/v % Tween 20-t és 3 w/v % sovány tejport tartalmazó TBS oldattal blokkolták. A lemezekre felvitték a halra allergiás páciensektől származó négyszeres hígítású szérumokat és egy éjszakán át 4 °C-on inkubálták. Mosás után 1000-szeres hígítású, alkalikus foszfáttal összekapcsolt emberi IgE ellen egérben termelt ellenanyagokkal (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) inkubálták a lemezt szobahőmérsékleten, 2 órán át. A színreakciót dinátrium-4-nitrofenil-foszfát szubsztrát tablettával (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) vitték véghez. Az optikai denzitást 405 nm-en mérték. Az eredményeket pozitívnak értékelték amennyiben az OD értékek legalább a szórás háromszorosával meghaladták a negatív kontrollok OD értékeinek átlagát.

4.6 Adatok értékelése

A spektrumok értékelését az OPUS szoftver (Bruker), a szigmoid görbék illesztését az Origin 7 szoftver (OriginLab Corporation) „non-linear curve fit” funkciójának segítségével végeztem. A nyomás- és hőmérséklet által indukált átmeneteket a következő szigmoid görbékkel illesztettem, melyek kétállapotú átmeneti modelltől származtathatók (71):

$$y(p) = a + bp + \frac{\Delta a + \Delta bp}{1 + \exp\left(\frac{(p - p_{1/2})\Delta V}{RT}\right)}$$

a nyomás által indukált átmenetekre, és

$$y(T) = a + bT + \frac{\Delta a + \Delta bT}{1 + \exp\left(\frac{\Delta H}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{1/2}}\right)\right)}$$

a hőmérséklet által indukáltakra.

Az egyenletekben y az illesztendő fizikai paraméter (pl. a spektrum csúcspozíciója), a és b paraméterek $y(p)$ és $y(T)$ lineáris függvényt jellemzik az átmenet előtt, Δa és Δb az a és b paraméterek megváltozása az átmenet során, T a hőmérséklet, p a nyomás, $p_{1/2}$ és $T_{1/2}$ az átmenetek középpontjai, V a térfogat, R az egyetemes gázállandó, H pedig az entalpia.

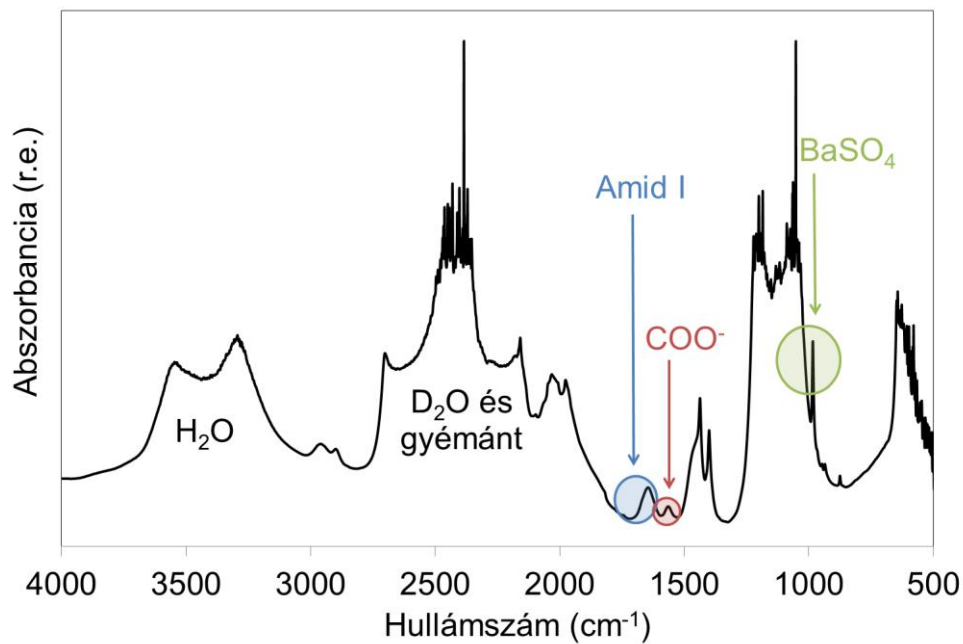
Az infravörös spektrumok Fourier-féle öndeconvolúciójához a következő paramétereket használtam az OPUS (Bruker) szoftverben: sávszélesség: $5,2 \text{ cm}^{-1}$; felbontást növelő faktor: 1,84; Lorentz „vonallak”.

A deconvolvált spektrumokat Gauss görbékkel illesztettem az egyes másodlagos szerkezeti elemek becslésére (13, 72, 73). Az illesztéshez a legkisebb négyzetek módszerét alkalmazva az Excel szoftver (Microsoft) „Solver” funkcióját használtam.

Ugyanezen módszerrel illesztettem a titin I27 fluoreszcencia mérése esetén a víztől származó Raman csúcsokat, melyeket kivontam a spektrumokból.

5. Eredmények és megbeszélés

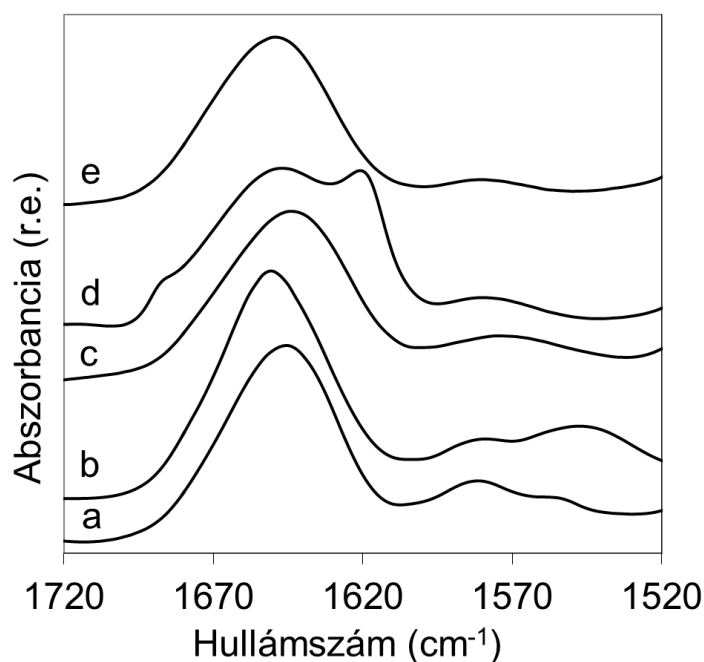
A következő ábra egy, a gyémántcellánkban mért tipikus fehérjespektrumot ábrázol a közép infravörös régióban (17. ábra). Megkülönböztethető rajta a víz és nehézvíz csúcsa, az amid I sáv, a COO^- rezgés, valamint a nyomásméréshez használt bárium-szulfát csúcsa. Minden mérésnél a teljes spektrumot felvettem és vizsgáltam, azonban a későbbiekben csak a fehérjeszerkezetre jellemző amid I sávokat ábrázolom.



17. ábra A gyémántcellában mért tipikus fehérjespektrum jellegzetes abszorpciós sávjai

5.1 Parvalbumin

A 18. ábra a Gad m 1 különböző körülmények között felvett infravörös spektrumait mutatja (a: Ca^{2+} hiányos; b: natív; c: nyomás által denaturált; d: hőközléssel denaturált és aggregált; e: hőközléssel aggregáció nélkül denaturált). A b görbén jól látható az amid I, amid II és COO^- abszorpciós sáv (natív állapot, atmoszférikus nyomás, szobahőmérséklet).



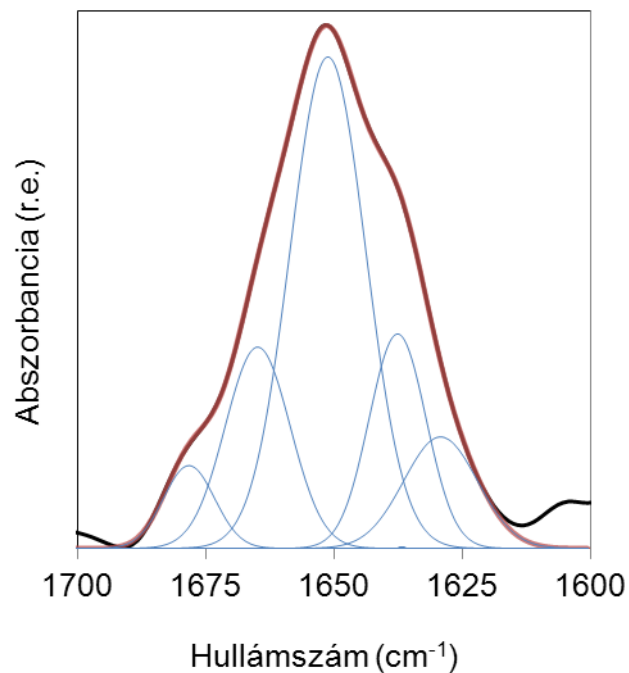
18. ábra A Gad m 1 jellegzetes FTIR spektrumai (1M Bis-Tris, pD=7): a) hozzáadott Ca^{2+} nélkül, 27 °C-on, atmoszférikus nyomáson, b) 0,2 M CaCl_2 -dal, 27 °C-on, atmoszférikus nyomáson, c) 0,2 M CaCl_2 -dal, 40 °C-on, 16 kbar-on, d) 0,2 M CaCl_2 -dal, 90 °C-on, atmoszférikus nyomáson, e) 0,2 M CaCl_2 -dal, 90 °C-on, 2 kbar-on

A fehérje főleg alfa hélixet tartalmaz, ahogy ez az amid I sáv pozíciójából ($\sim 1652 \text{ cm}^{-1}$) látható. Az amid I sáv összetettsége miatt a spektrumokat először dekonvolváltam, majd Gauss görbékkel illesztettem (19, 21, 22, 24, 25, 30. ábrák). Az illesztés alapján a Gad m 1 natív állapotban (18b, 19. ábrák) 50% alfa hélixet, 16% rendezetlen részt és 34% hurkot tartalmaz (2. táblázat). Ezek a számok elég jól egyeznek a homológia modellezés eredményeivel (31. ábra), ahol a 109 aminosavból 54 vesz részt a hélixképzésben, a hélixek nagy hurkokkal vannak összekötve.

Az amid II sáv gyenge, de látható 1546 cm^{-1} -nél. Ez a csúcs átlapol a COO^- csoport antiszimmetrikus nyújtási rezgésével, így egy széles csúcsot adnak 1549 cm^{-1} -nél (18. ábra b görbe). Az amid II sáv jelenléte szintén feltekeredett állapotra utal. Ha ugyanis az amid II sáv jelen van, akkor a fehérje belsejében lévő hidrogének nem tudtak kicserélődni deutérium ionokra, tehát nem érhetőek el a víz számára.

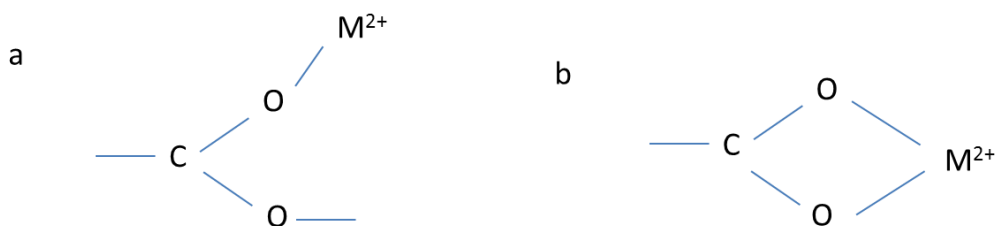
2. táblázat A másodlagos szerkezetek százalékos aránya a Gad m 1 különböző fázisaiban. Az értékek a Gad m 1 dekonvolvált infravörös spektrumainak Gauss komponensekkel való illesztéséből származnak.

fehérje fázis	alfa hélix (%)	hurkok és kanyarok (%)	rendezetlen (%)	intermolekuláris béta lemez (%)
natív (19. ábra)	50	34	16	–
„olvadt gombóc” (24. ábra)	23	43	34	–
részlegesen kitekeredett (30. ábra)	4	32	64	–
denaturált (25. ábra)	–	17	83	–
aggregált (22. ábra)	–	2	73	25
Ca ²⁺ hiányos (21. ábra)	5	29	66	–



19. ábra A natív szerkezetű Gad m 1 parvalbumin IR spektrumának amid I sávja (közel atmoszférikus nyomás, 28 °C) és ennek Gauss komponensei (a dekonvolvált IR spektrumot fekete, a Gauss komponenseket kék, a Gauss komponensek összegét piros vonal jelöli)

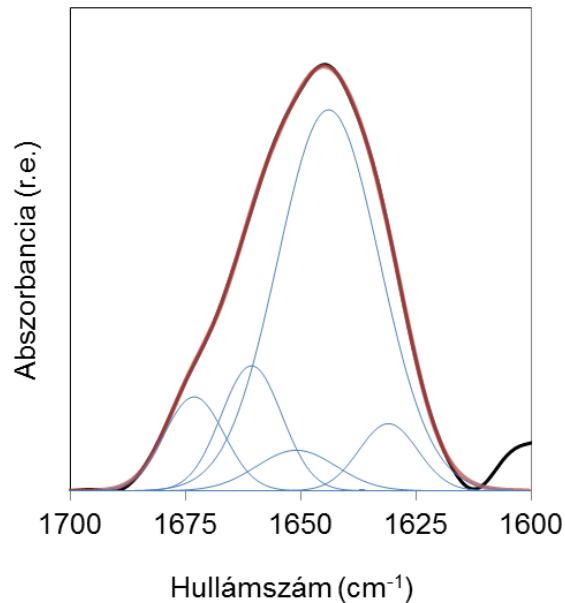
Az 1583 cm^{-1} -es csúcs és az 1549 cm^{-1} -es csúcs egy része a glutaminsav és aszparaginsav aminosavak COO^- csoportjainak antiszimmetrikus nyújtási rezgéséből származik. Az 1549 cm^{-1} -es csúcsot dekonvolúcióval két komponensre tudtam bontani: az 1546 cm^{-1} -es amid II sávra és egy 1553 cm^{-1} -es COO^- csúcsra. Ez utóbbi a két fogú, Ca^{2+} -kötött glutaminsavaknak tulajdonítható (20. ábra) (17). Az átlapolás miatt nehéz megmondani a szabad és a kötött karboxilsavak arányát.



20. ábra A COO^- oldalláncok egyfogú (a) és két fogú (b) koordinációs kötése (M²⁺ kétértékű fémionokat jelöl)

5.1.1 A Ca^{2+} ion hatása a Gad m 1 parvalbumin szerkezetére

A Gad m 1 natív állapotban két Ca^{2+} iont köt. Emiatt érdekes kérdés lehet, hogy mennyire destabilizálódik a fehérje szerkezete, ha nem áll rendelkezésére elegendő Ca^{2+} ion. Ca^{2+} -hiányos állapotban (Ca^{2+} hozzáadása nélkül, de az eleve a fehérjében lévőket nem eltávolítva) a Gad m 1-nek széles amid I sávja van 1646 cm^{-1} -es maximum pozícióval (18. ábra, a). A pozíció és az illesztés eredménye is (2. táblázat, 21. ábra) inkább nagyrészt rendezetlen, mint helikális szerkezetre utal.



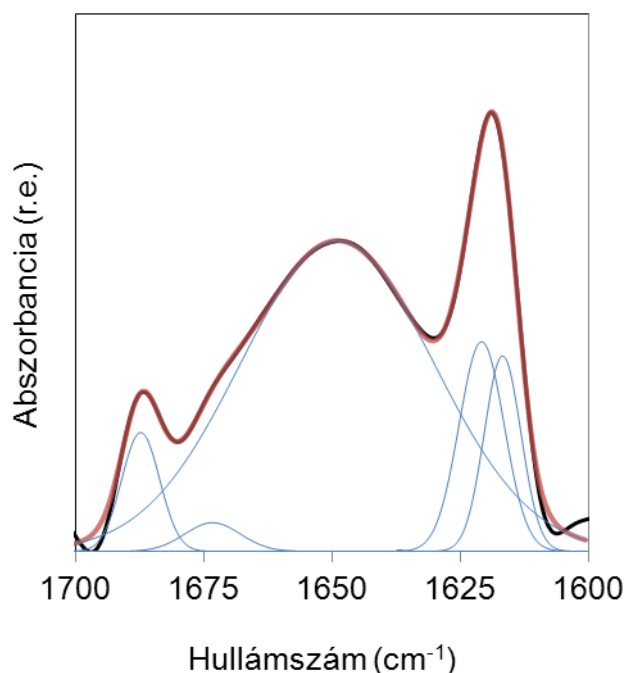
21. ábra A Ca^{2+} -hiányos Gad m 1 parvalbumin IR spektruma (közel atmoszférikus nyomás, 28 °C) és ennek Gauss komponensei (a dekonvolvált IR spektrumot fekete, a Gauss komponenseket kék, a Gauss komponensek összegét piros vonal jelöli)

Az amid II sáv hiánya szintén azt mutatja, hogy nincs a fehérjének oldószer számára hozzáférhető belső magja. A Ca^{2+} -hiányos fehérjében a kicserélhető hidrogének elérhetőek voltak az oldószer számára, ami a harmadlagos szerkezet gyengülésére utal.

Permyakov CD spektroszkópai kísérleteiből szintén arra a következtetésre jutott, hogy a Ca^{2+} -hiányos csuka parvalbumin rendezetlen állapotban volt (74). A csuka parvalbumin és a tőkehal parvalbumin (Gad m 1) közti szekvencia azonosság nagyobb, mint 70 %. Ennek ellenére mégis van arra mutató jel, hogy a Ca^{2+} -hiányos parvalbumin nem teljesen rendezetlen. Az amid I sáv 2 kbar-os átalakulási középponttal kiszélesedett, más változás 11 kbar-ig növelve a nyomást nem volt megfigyelhető. Ebből és az illesztési adatokból (2. táblázat) arra a következtetésre jutottam, hogy a fehérje Ca^{2+} hozzáadása nélkül részlegesen kitekeredett állapotban van, ami kis részben tartalmaz rendezett szerkezeteket is, amelyek 2 kbar-on rendezetlenné válnak. Hasonló jelenséget figyeltek meg a Troponin C fehérjénél, ahol az apo állapotú fehérjét viszonylag alacsony nyomással (1 kbar alatt) denaturálni tudták, de a Ca^{2+} -kötött fehérje kitekeréséhez nagyobb nyomás és ureás kezelés kombinációjára volt szükség (75-77).

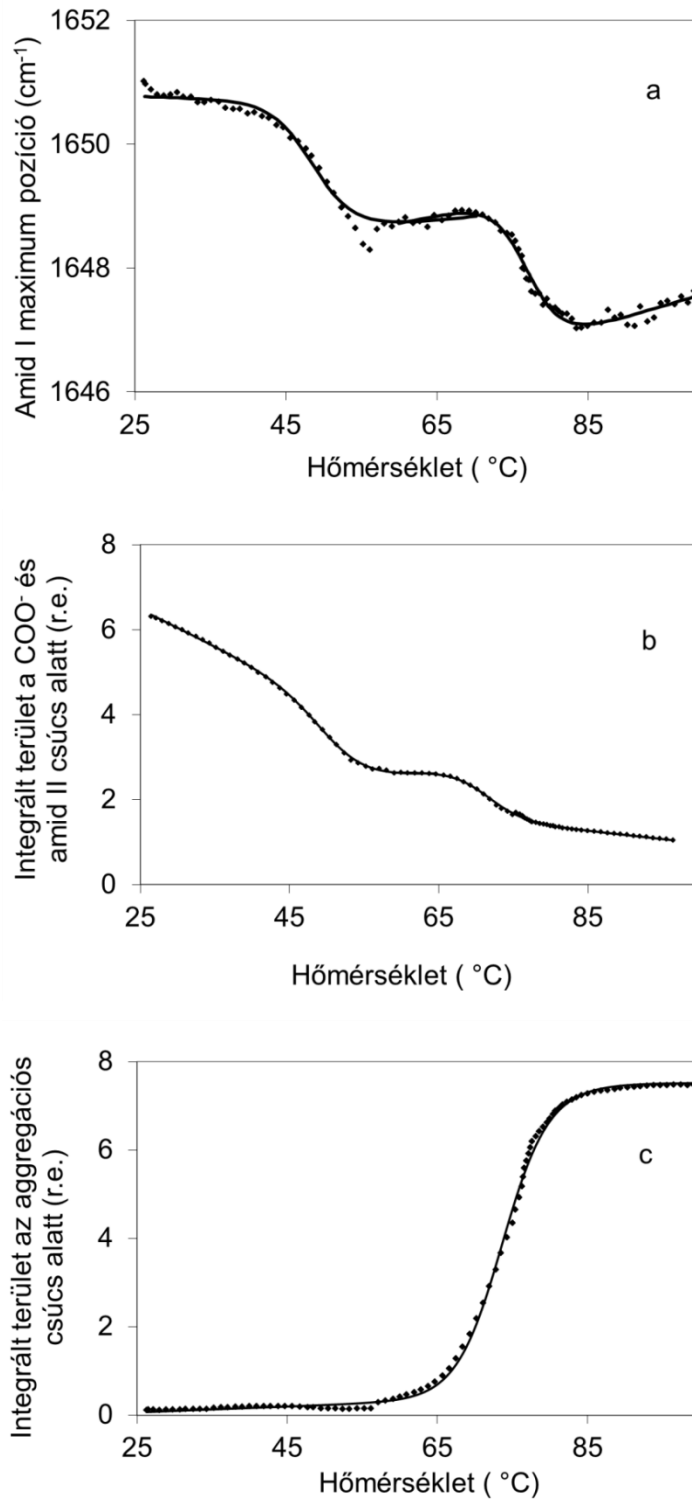
5.1.2 A hőmérséklet változás hatása a Gad m 1 szerkezetére

A következő kísérleteket már mind 0,2 M CaCl₂ jelenlétében végeztem. A 18. ábra d görbéje a Gad m 1 magas hőmérsékletre jellemző spektrumát mutatja. A maximum pozíció (1647 cm⁻¹) és az illesztési eredmények (2. táblázat) alapján a fehérje nagy része (73 %) kitekeredett állapotban van. Az 1618 és 1688 cm⁻¹-nél megjelent csúcsok az intermolekuláris antiparallel béta lemezekre jellemzőek (78) és azt mutatják, hogy az aminosavak 25 %-a az aggregátumok stabilizálásában vesz részt 90 °C-on, ami jóval a denaturációs hőmérséklet felett van (22. ábra).

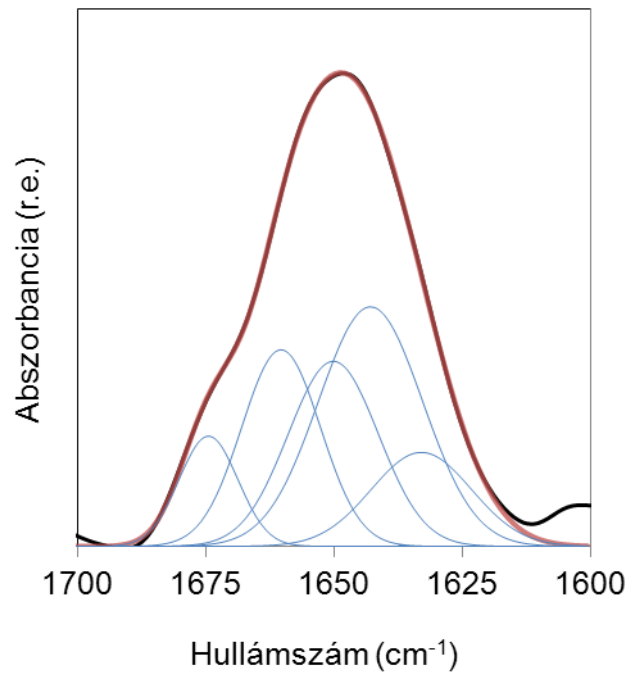


22. ábra Az aggregált állapotú Gad m 1 parvalbumin IR spektruma (közel atmoszférikus nyomás, 90 °C) és ennek Gauss komponensei (a dekonvolált IR spektrumot fekete, a Gauss komponenseket kék, a Gauss komponensek összegét piros vonal jelöli)

A karakterisztikus spektrum jellemzőket a hőmérséklet függvényében ábrázolva két fázisátalakulást találtam (23. ábra). Az első átalakulásnál az amid II sáv eltűnik, és az amid I sáv pozíciója eltolódik. Az átalakulás középpontja $50,8 \pm 0,2$ °C. (A megadott hibák minden esetben az Origin programmal történő illesztés hibái.) A dekonvolált spektrumok illesztése alapján a hélixek aránya csökken, a rendezetlen részek és a hurkok aránya nő a natív szerkezethez képest (2. táblázat, 24. ábra).



23. ábra A Gad m 1 hődenaturációja. a) Amid I maximum pozíció, b) A COO⁻ és az amid II csúcsok alatti integrált terület, c) az aggregációs csúcs (1619 cm⁻¹) alatti integrált terület

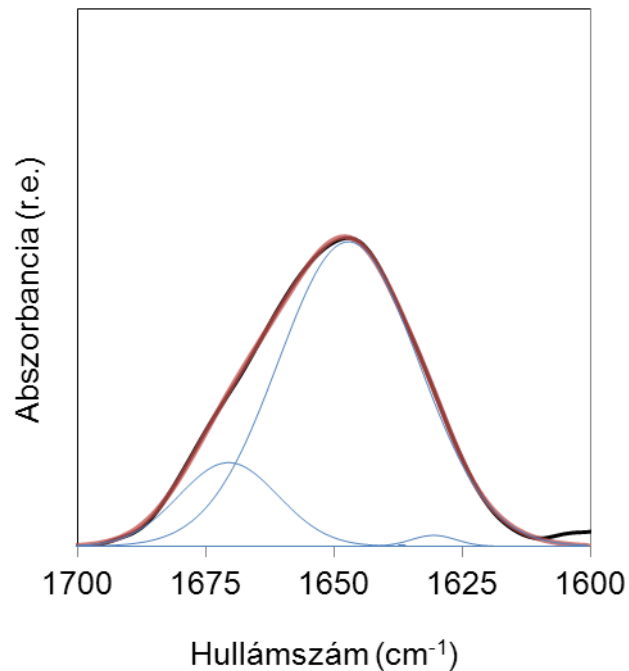


24. ábra Az „olvadt gombóc” szerű állapotban lévő Gad m 1 parvalbumin IR spektruma (közel atmoszférius nyomás, 60 °C) és ennek Gauss komponensei (a dekonvolvált IR spektrumot fekete, a Gauss komponenseket kék, a Gauss komponensek összegét piros vonal jelöli)

Ezek a spektrális változások mind abba az irányba mutatnak, hogy az 50 °C-nál bekövetkező első átalakulás egy „olvadt gombóc” szerű állapotba vezet. Az átalakulás során a fehérje flexibilitása megnő, amit az mutat, hogy a hidrogén/deutérium kicserélődés teljesen végbemegy, mivel a harmadlagos szerkezet felbomlása miatt a fehérje belseje is elérhetővé vált az oldószer számára.

Az amid I pozíciója 75,6±0,3 °C-os középponti hőmérséklettel tovább tolódik a rendezetlen fehérjékre jellemző értékek felé, a fehérje denaturálódik majd aggregálódik. Az aggregációs csúcs (1618 cm⁻¹) alatti területet figyelve szintén szigmoid görbét kaptam a hőmérséklet függvényében, 73,7±0,1 °C-os középponti hőmérséklettel. A kitekeredés és az aggregáció irreverzibilis.

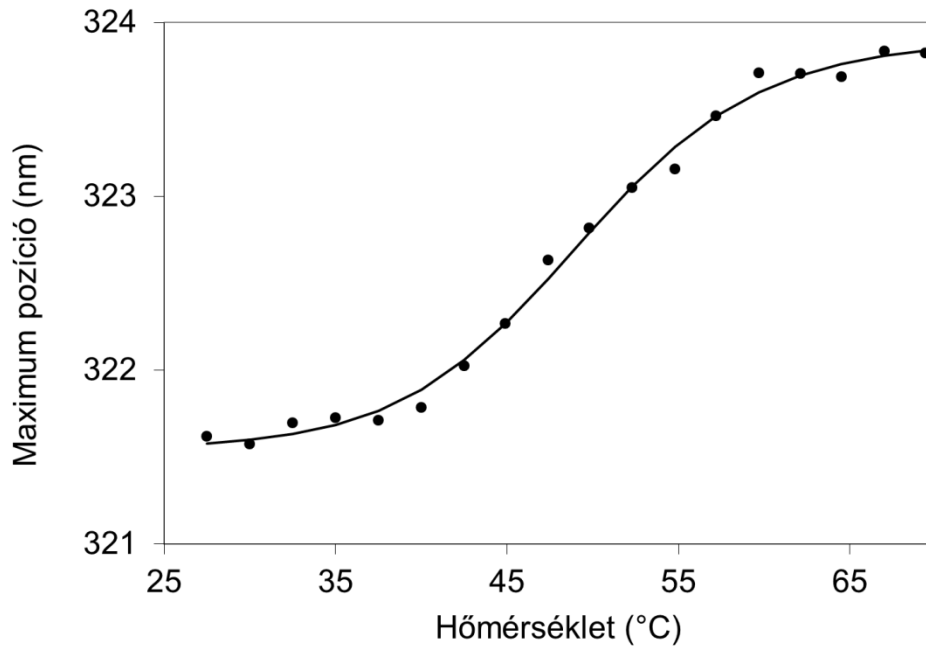
A hődenaturációt megvizsgáltam magasabb nyomáson is. 2 kbar-on is ugyanezeket az átalakulásokat találtam, de a nyomás megvédte a fehérjét az aggregációtól (18. ábra, e, 25. ábra). Az átalakulási hőmérsékletek alacsonyabbak voltak, mint atmoszférius nyomáson (39,8±0,7 °C illetve 62,4±0,2 °C).



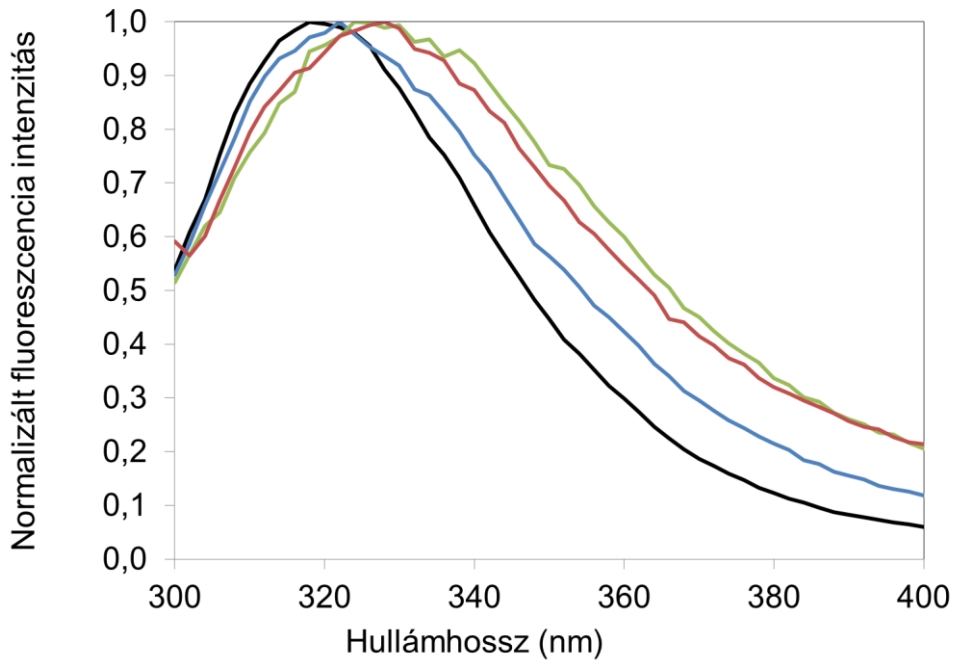
25. ábra A denaturált (aggregáció mentes) Gad m 1 parvalbumin IR spektruma (2 kbar, 80 °C) és ennek Gauss komponensei (a dekonvolvált IR spektrumot fekete, a Gauss komponenseket kék, a Gauss komponensek összegét piros vonal jelöli)

Atmoszférikus nyomáson a hőmérséklet denaturációt fluoreszcencia méréssel is meg tudtam vizsgálni, mivel a Gad m 1 tartalmaz egy triptofán aminosavat. A fluoreszcencia emissziós spektrum maximum pozíciója $49,2 \pm 2$ °C-os átalakulási középponttal szigmoid átalakulással a magasabb hullámhosszak felé tolódott. Az átalakulás középpontja majdnem ugyanott található (26. ábra), mint az infravörös mérések esetén (50,8 °C).

Az infravörös méréseknél megfigyelt második denaturációs átalakulás a fluoreszcencia méréseknél nem látszik egyértelműen, mivel a triptofán környezetének változása főleg akkor jelentős, amikor a vízmolekulák bekerülnek a molekula belsejébe. A denaturációs átalakulásnál irreverzibilis változások történtek. Sem a maximum pozíció sem az intenzitás nem tért vissza az eredeti értékre lehűtés után (27. ábra).



26. ábra A Gad m 1 fluoreszcencia spektrumának maximum pozíciója a hőmérséklet függvényében

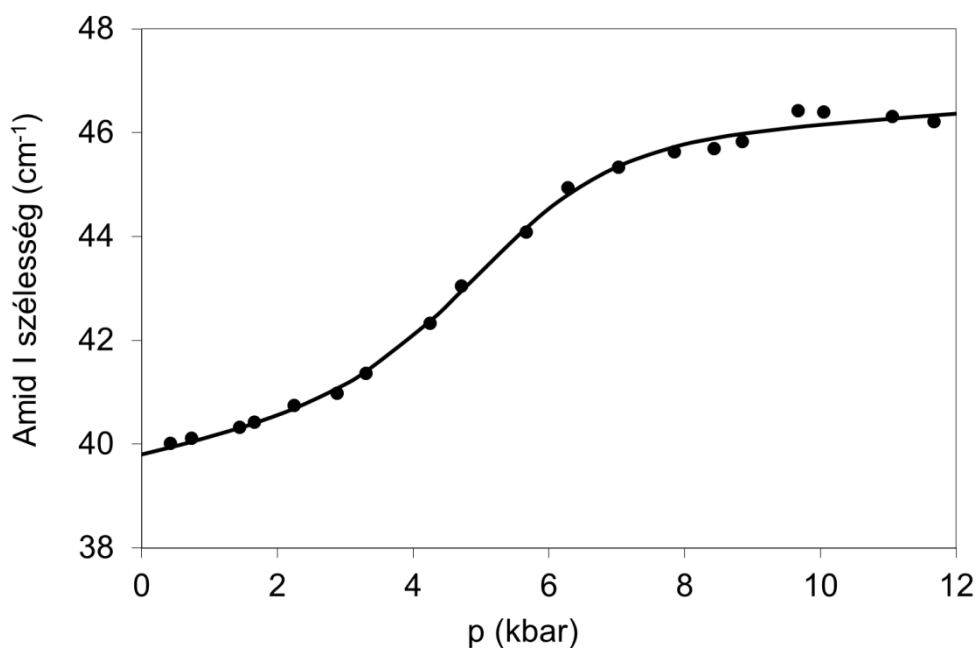


27. ábra A Gad m 1 normalizált fluoreszcencia intenzitása 290 nm-es gerjesztésnél légköri nyomáson: 30 °C-on a hőkezelés előtt (fekete); 67 °C-on (kék); 89 °C-on (piros) és 30 °C-on a kezelés után (zöld).

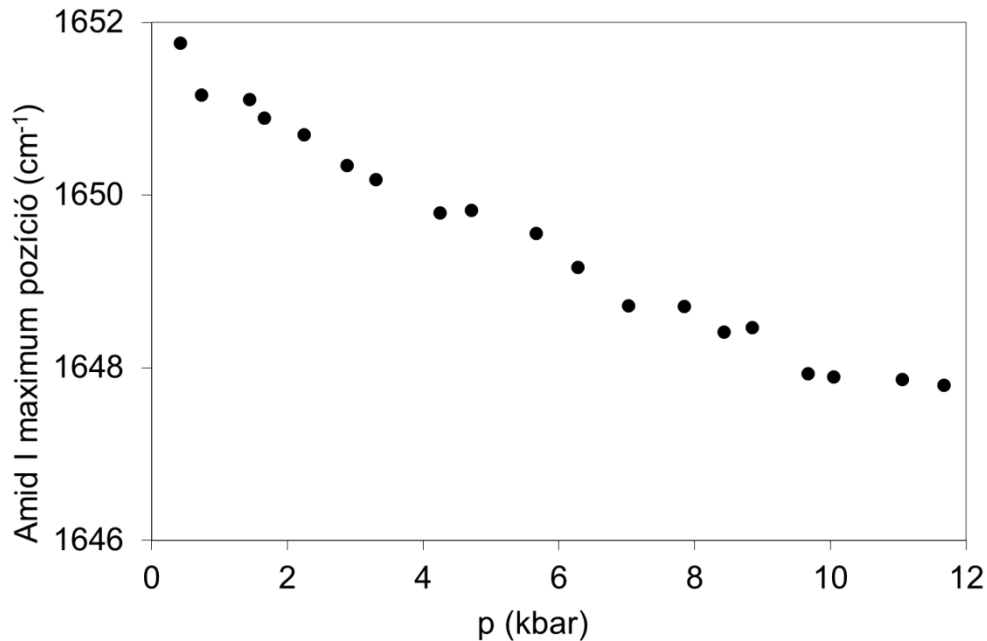
5.1.3 Nyomás változás hatása a Gad m 1 szerkezetére

Vitás kérdés, hogy a nyomás által denaturált fehérje elveszíti-e teljesen a másodlagos szerkezetét, vagy maradnak másodlagos szerkezeti elemek a nyomás által kitekert fehérjében (79, 80).

A Gad m 1 esetén szobahőmérsékleten (27 °C) végzett nyomáskísérletnél egy fázisátmenetet figyeltem meg $5,2 \pm 0,3$ kbar átalakulási középponttal. A növekvő nyomás hatására az amid I sáv kiszélesedik (28. ábra), az amid II pedig eltűnik. Ezzel egy időben az amid I maximum pozíciója az alfa hélixre jellemző pozícióról (1652 cm^{-1}) alacsonyabb hullámszámok felé tolódik (29. ábra). Megfigyelhető, hogy az amid I maximum pozíció a nyomás függvényében nem mutat lépcsőszerű változást, ez azonban nem zárja ki a fázisátalakulást.



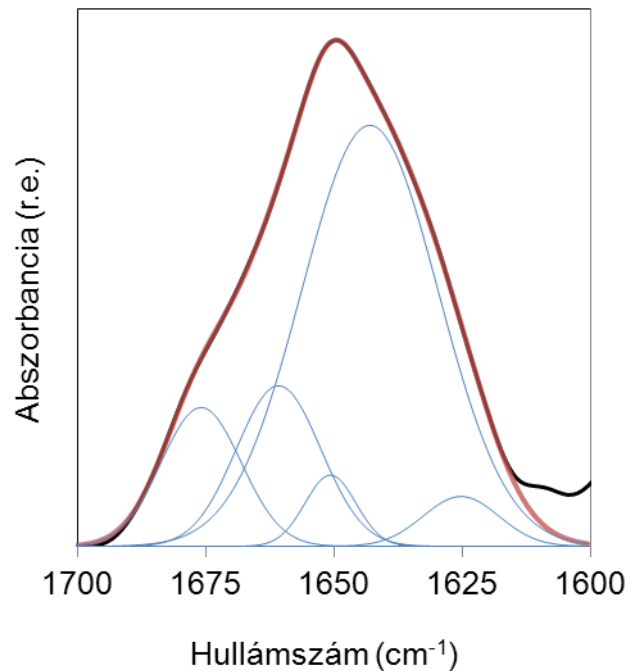
28. ábra A Gad m 1 nyomásindukált átalakulása, az amid I sáv szélessége a nyomás függvényében, szobahőmérsékleten.



29. ábra A Gad m 1 nyomásindukált átalakulása, az amid I sáv maximum pozíciója a nyomás függvényében, szobahőmérsékleten

Az amid I sáv meglehetősen komplex, több átlapoló különböző szerkezetekre jellemző komponenset tartalmaz. Az átalakulás (5,2 kbar) után az amid I sáv pozíciója az alfa helikális és a denaturált között helyezkedik el. 5,2 kbar felett tovább tolódik és közelíti a kitekeredett fehérjékre jellemző értéket, de nem éri el azt. Ez alapján a fehérje 5,2 -12 kbar között elveszíti a maradék rendezettségének nagy részét is. Ezt a Gauss illesztési eredmények is alátámasztják (30. ábra), amelyek szerint nagy nyomáson (~12 kbar) csak kevés helikális szerkezet marad, a hurkok és a rendezetlen részek aránya pedig megnő (2. táblázat, részlegesen kitekeredett állapot).

A mérési eredmények alapján a másodlagos szerkezeti elemek nagy része eltűnt a nyomáskezelés hatására, de szobahőmérsékleten nem sikerült elérni a teljesen denaturált állapotot. A víz szobahőmérsékleten 10 kbar felett fagy meg, míg a fehérje oldataink a puffertől, a fehérje fajtájától és a koncentrációtól függően 10-15 kbar felett. Ez behatárolja, hogy mekkora nyomást lehet alkalmazni. A víz fagyási nyomása a hőmérséklet emelésével nő, ezért magasabb hőmérsékleten nagyobb nyomáson is tudtam kísérleteket végezni.



30. ábra A részlegesen kitekeredett állapotban lévő Gad m 1 parvalbumin IR spektruma (8,9 kbar, 28 °C) és ennek Gauss komponensei (a dekonvolvált IR spektrumot fekete, a Gauss komponenseket kék, a Gauss komponensek összegét piros vonal jelöli)

40 °C-on a nyomás függvényében megtaláltam ugyanezt a fázisátalakulást, csak valamivel alacsonyabb nyomáson, $4,8 \pm 0,1$ kbar-on. A maximum pozíció azonban itt egy második szigmoid jellegű fázisátalakulás során elérte a teljesen kitekeredett fehérjékre jellemző 1644 cm^{-1} -es értéket. Ennek a fázisátalakulásnak a középpontja $11,4 \pm 0,1$ kbar.

Az 55 °C-on végzett nyomáskísérlet során is két fázisátalakulást észleltem. Ezen a hőmérsékleten a fehérje már eleve az „olvadt gombóc” szerű állapotban van, mivel a hőmérséklet függvényében az első fázisátmenet 50 °C-on található. Az első átalakulás során (2,2 kbar) az „olvadt gombóc” szerű állapotból a részlegesen kitekeredett állapotba került a fehérje, a második átalakulással (8,9 kbar) pedig a teljesen denaturált állapotba.

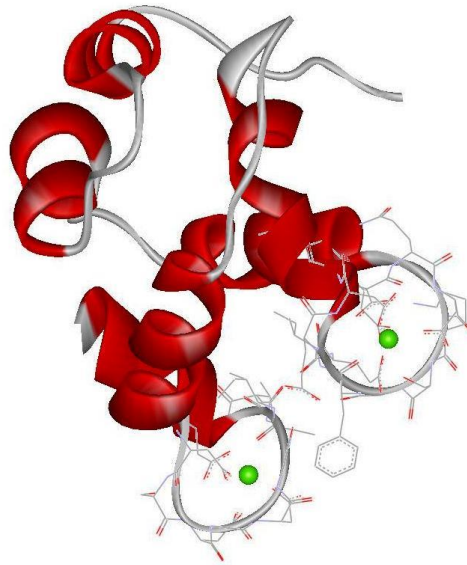
A hőmérséklet és nyomáskísérletek alapján a natív és a denaturált fázison kívül a Gad m 1-nek létezik egy „olvadt gombóc” szerű és egy részlegesen kitekeredett állapota is. Az állapotok közötti különbség leginkább a szerkezeti elemek összetételéből (2. táblázat) valamint a Ca^{2+} -kötés analizálásán keresztül mutatható be.

5.1.4 Ca²⁺-kötés a különböző konformációkban

Ahogy azt az 5.1.1 fejezetben láttuk a parvalbuminnak Ca²⁺-ra van szüksége a natív, feltekeredett állapothoz. A parvalbumin a Ca²⁺ ionokat az aszparagin- és glutaminsav oldalláncok COO⁻ csoportjaival tudja kötni (3. táblázat, 31. ábra). A Ca²⁺-kötőhelyek az 51-63 és a 91-102 aminosavakra lokalizálódnak a homológia modellezés alapján (34).

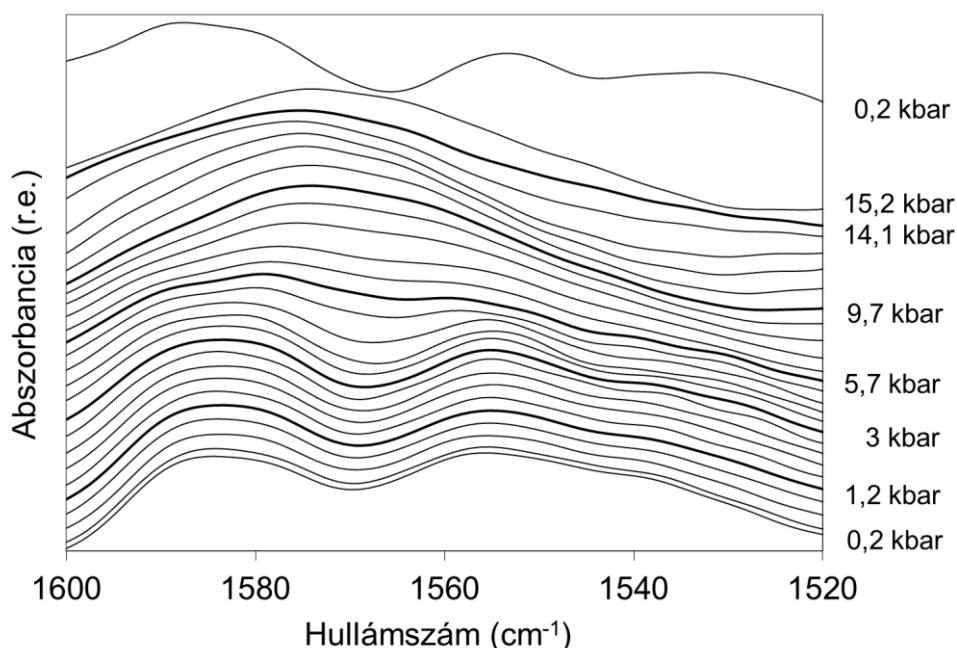
3. táblázat A COO⁻ csoportot tartalmazó aszparaginsavak és glutaminsavak eloszlása a parvalbuminban

COO ⁻ csoportok	Összes	Ca ²⁺ -kötésben résztvevő
Aszparaginsav (D)	11	5
Glutaminsav (E)	8	3



31. ábra A Gad m 1 homológia modellezéssel jósolt szerkezete. A piros szalagok az alfa hélix szerkezetet a zöld golyók a Ca²⁺ ionokat jelölik

Nara és Tanokura hasonló kötőzsebet találtak a csuka parvalbumin esetén is (17). A 32. ábra és a 33. ábra az infravörös spektrum, azon részét mutatja, mely a COO⁻ csoport antiszimmetrikus nyújtási rezgésére jellemző. Ez a rezgés érzékeny a Ca²⁺ kötésre.



32. ábra A Gad m 1 dekonvolvált FTIR spektrumainak COO⁻ régiója 40 °C-on, nyomások alulról felfelé: 0,2; 0,4; 0,45; 0,95; 1,2; 1,45; 1,8; 2,15; 2,7; 3; 3,5; 3,8; 4,4; 5,1; 5,7; 6,55; 7,1; 8,1; 8,9; 9,7; 10,65; 11,40; 12,1; 13,8; 14,1; 15,2 kbar és 0,2 kbar visszafelé

A 32. ábra egy 40 °C-on végzett nyomáskísérlet dekonvolvált spektrumainak részletét mutatja. Az alacsony nyomásokon talált 1554 cm⁻¹-es csúcs a glutaminsav kétfogú Ca²⁺ kötéseinek feleltethető meg. Ez kicsit nagyobb, mint a Nara és Tanokura által mért 1553 cm⁻¹(17), de ez az eltolódás adódhat a kicsit magasabb hőmérsékleten való mérésből (40 °C szobahőmérséklet helyett). A csúcs kiszélesedése az alacsonyabb hullámszámok felé az amid II sáv maradványának köszönhető. Az 1585 cm⁻¹-es csúcs két rezgésből tevődik össze (1579 és 1590 cm⁻¹), amik csak erősebb dekonvolúcióval vagy a spektrumok második deriváltjából határozhatók meg. Ezen rezgések az aszparaginsav COO⁻ csoportjából származnak. A COO⁻ csoport antiszimmetrikus rezgése kétfogú kötés hatására az alacsonyabb hullámszámok felé, egyfogú kötés hatására a szabad állapothoz képest magasabb hullámszámok felé tolódik (81). Emiatt a magasabb hullámszámnál lévő komponens az egyfogúan kötött aszparaginsavnak, az alacsonyabb pedig az aszparaginsav szabad COO⁻ csoportjainak tulajdonítható. Meg kell jegyezni, hogy mind a glutaminsavnál mind az aszparaginsavnál a fehérje belsejében lévő szabad COO⁻ csoportok rezgési frekvenciája különbözhet a vizes

környezetben lévő csoportokétól. A fehérje belsejében lévő COO^- csoportok kötődhetnek más töltött csoportokhoz vagy hidrogénhidakat hozhatnak létre. Emiatt a ténylegesen szabad COO^- rezgések mennyisége nehezen becsülhető. Nyomáskezelés hatására a 4,8 kbar-nál található első fázisátalakulásnál az 1590 cm^{-1} -es komponens csökken, az 1579 cm^{-1} -es komponens növekvő tendenciát mutat. Ezzel egyszerre az 1554 cm^{-1} -es csúcson csökken, 1565 cm^{-1} -nél pedig növekszik az abszorbancia, ami a szabad glutaminsavakra jellemző (4. táblázat (17)).

4. táblázat A Ca^{2+} -kötéshez tartozó csúcspozíciók (Az aszparaginsav nem kötődik két foggal, az egy foggal kötött glutaminsavra jellemző pozíció pedig kérdéses, valószínűleg kis intenzitású.)

COO^- csoport abszorpciós maximumai a parvalbuminban (cm^{-1})

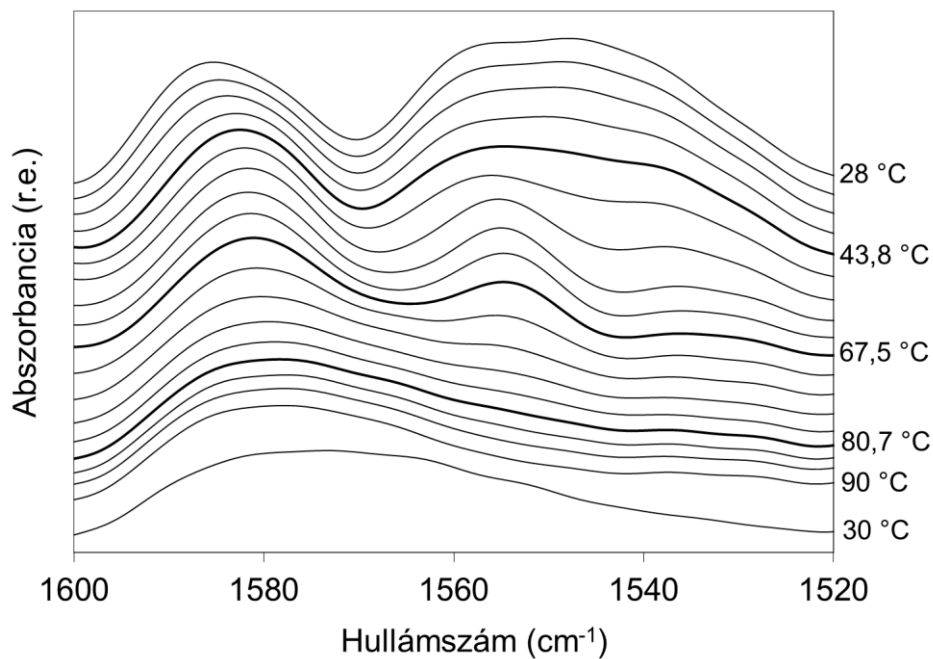
	Aszparaginsav (D)	Glutaminsav (E)
Szabad	(1575-)1579	1565
Egy foggal kötött	1590	?
Két foggal kötött	-	1553

E részleges kitekeredés során a Ca^{2+} -kötőhelyek destabilizálódtak. Ennek legvalószínűbb magyarázata az lehet, hogy a két kötőhely egyike elveszítette a Ca^{2+} -ot a fázisátalakulás során, és a részlegesen kitekeredett fehérje már csak egy Ca^{2+} -ot köt molekulánként. Dzwolak és Taniguchi hasonló jelenséget figyeltek meg az alfa laktalbuminnál (82). A denaturált állapothoz képest a részlegesen kitekeredett állapotban a hurkok nagyobb aránya szintén összhangban van azzal a feltételezéssel, hogy az egyik Ca^{2+} -kötőhely még megőrződött (2. táblázat).

Magas nyomáson (11,4 kbar felett) a COO^- régióban csak egy csúcs található 1573 cm^{-1} -nél. Ez dekonvolúcióval egy 1565 és egy 1575 cm^{-1} -es csúcsra bontható fel, mindkettő a szabad aminosavakra jellemző. Ez alátámasztja azt, hogy a fehérje 11,4 kbar felett teljesen denaturált állapotban van, mindkét Ca^{2+} iont elvesztve. Ez alapján szoros összefüggés van a fehérje denaturálódása és a Ca^{2+} ionok elvesztése között. A teljes denaturáció csak akkor lehetséges, ha a fehérje elengedi az egyébként erősen kötött Ca^{2+} ionokat.

Az atmoszférikus nyomáson végzett hőmérséklettől függő kísérletek sorozatban tisztán láthatjuk az amid II sáv eltűnését 50 °C -on (1550 cm^{-1}) (33. ábra). E hőmérséklet

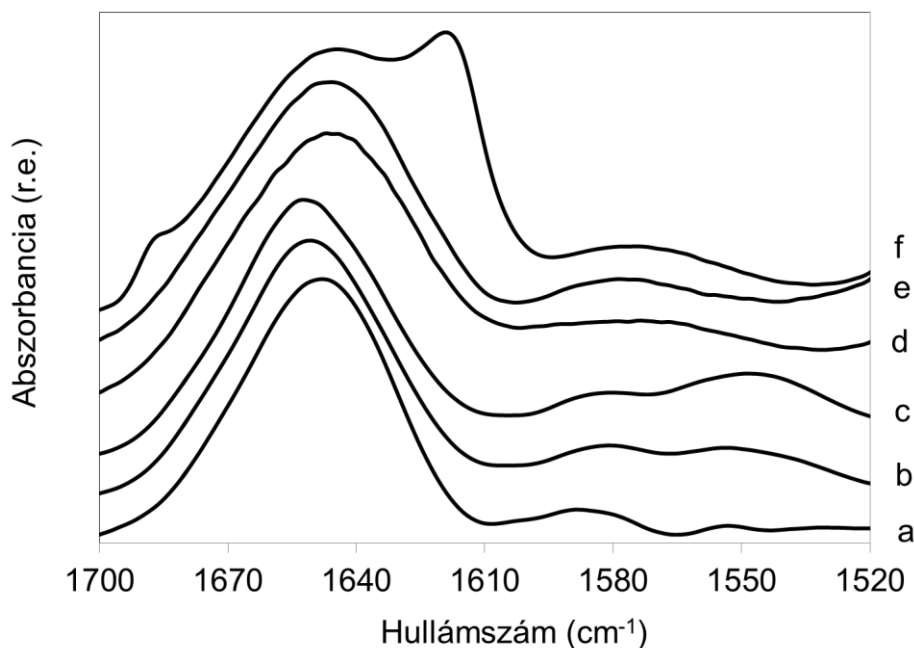
fölött a fehérje „olvadt gombóc” szerű állapotba kerül, ahogy azt az amid I sáv elemzéséből megtudtuk. Ebben az állapotban egy erős abszorpciós sávot figyelhetünk meg 1553 cm^{-1} -nél, ami arra utal, hogy a Ca^{2+} ionok kétfogú kötéssel kapcsolódnak a glutaminsavakhoz. Az aszparaginsavak COO^- rezgése eközben alacsonyabb hullámszámok felé tolódott, ami a kötőhely gyengülésére utal. A hőmérséklet-indukált „olvadt gombóc” szerű állapotban a kötőhelyek megmaradtak, bár az eredetihez képest némileg gyengülhettek. Az 1553 cm^{-1} -es csúcs a denaturációs hőmérsékleten (75 °C) eltűnik, ezzel együtt a szabad glutaminsavakra jellemző csúcs (1565 cm^{-1}) abszorbanciája megnő. A szabad aszparaginsavra jellemző komponens (1576 cm^{-1}) szintén nő az átalakulás során. A kitekeredett, aggregált állapotban a szabad komponensek dominálnak, a fehérje a Ca^{2+} -okat elvesztette. Ez a magasabb nyomáson aggregáció nélkül hő hatására denaturált fehérjére ugyanúgy igaz ($p > 2\text{ kbar}$, $T > 75\text{ °C}$).



33. ábra A Gad m 1 dekonvolvált FTIR spektrumainak COO^- régiója atmosfériikus nyomáson, a hőmérsékletek időrendben, felülről lefelé: 28; 29,8; 34,3; 39; 43,8; 48,5; 53,3; 58,1; 62,8; 67,5; 71,9; 75,4; 76,9; 78,6; 80,7; 83,5; 87,7; 90 °C és 30 °C visszafelé

5.1.5 Az átalakulások reverzibilitása

Ahhoz, hogy az allergént inaktíválni lehessen irreverzibilis szerkezetváltozások szükségesek, emiatt vizsgáltam a reverzibilitás kérdését. A szobahőmérsékleten (27 °C) végzett nyomásciklus után a részlegesen kitekeredett állapotból visszatérve a fehérje újra megkötötte a Ca²⁺-okat. Az amid I pozíció is visszatért az eredeti helyére, ami szintén a fehérje visszatekeredésére utal (34. ábra b, c).



34. ábra A Gad m 1 FTIR spektrumai

a) 40 °C-os nyomáskezelés után , a nyomás által denaturált állapotból visszatérve, b) szobahőmérsékletű nyomáskezelés után, a részlegesen kitekeredett állapotból visszatérve, c) kezelés előtt, d) 2 kbar-on történő hőkezelés után, a hődenaturált állapotból visszatérve, e) 55 °C-ig való fűtési ciklus után, az „olvadt gombóc”-szerű állapotból visszatérve, f) atmoszférikus nyomáson való hőkezelés után, az aggregált állapotból visszatérve

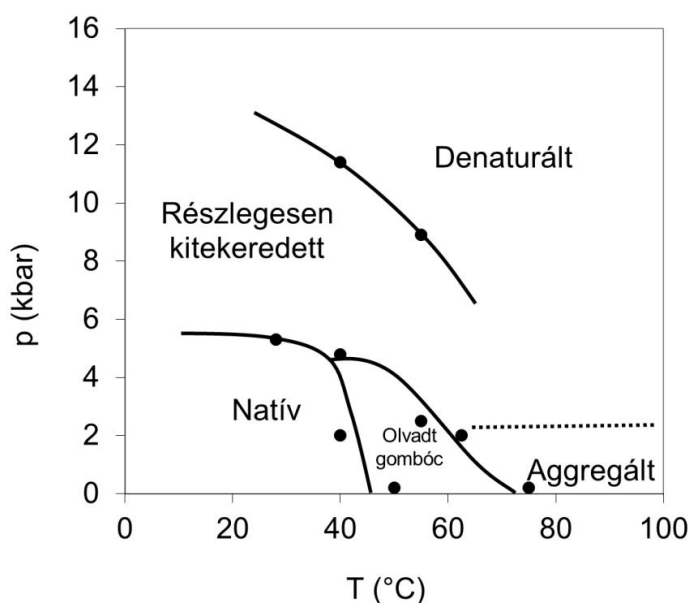
A natívból a részlegesen kitekeredett állapotba való átmenet nagyrészt reverzibilisnek tekinthető. A spektrumokban jelentkező különbség az amid II sáv eltűnéséből adódik. Az amid II sáv eltűnése a H/D kicserélődés következménye, ami teljes visszatekeredés esetén sem jelenik meg ismét a spektrumban. 40 °C-on, nagy nyomáson a teljesen kitekeredett állapotot elérve és onnan visszatérve légköri nyomásra a fehérje nem nyerte vissza eredeti natív állapotát (34. ábra a). Sem a konformáció

változás sem a Ca^{2+} -kötés nem teljesen reverzibilis. Ez is alátámasztja a különbséget a részlegesen és teljesen kitekeredett állapot között. Nyomásciklus után mind az amid I pozíció, mind a spektrum COO^- régiója a Ca^{2+} hiányos fehérjéhez hasonló.

A hőmérsékletciklus után, amikor aggregáció következett be, a fehérje nem tudta visszakötni a Ca^{2+} -ot (34. ábra f). A 2 kbar-on végzett hőmérsékletciklusnál, ahol nem történt aggregáció a fehérje részlegesen visszatekeredett és visszakötött valamennyi Ca^{2+} -ot is (34. ábra d), a spektrum a Ca^{2+} -hiányos fehérjéhez volt hasonló. Ha a hőmérsékletciklusban csak 55 °C-ig emeltem a hőmérsékletet, ami az „olvadt gombóc” szerű állapotnak felel meg, a szerkezetváltozás és a Ca^{2+} -kötés változása akkor is irreverzibilis volt. A visszatérési állapot szintén a Ca^{2+} -hiányoshoz volt hasonló, amely egyébként nagyban hasonlít az „olvadt gombóc” szerű állapothoz (34. ábra e). A hő hatására bekövetkező denaturálás tehát irreverzibilis függetlenül attól, hogy aggregáció bekövetkezett-e.

5.1.6 A parvalbumin nyomás-hőmérséklet fázisdiagramja

A különböző állandó nyomásokon végzett hőmérséklettől függő kísérlet sorozatok és a különböző állandó hőmérsékleten végzett nyomástól függő kísérlet sorozatok átalakulási pontjaiból megszerkesztettem a Gad m 1 nyomás-hőmérséklet fázisdiagramját (35. ábra).

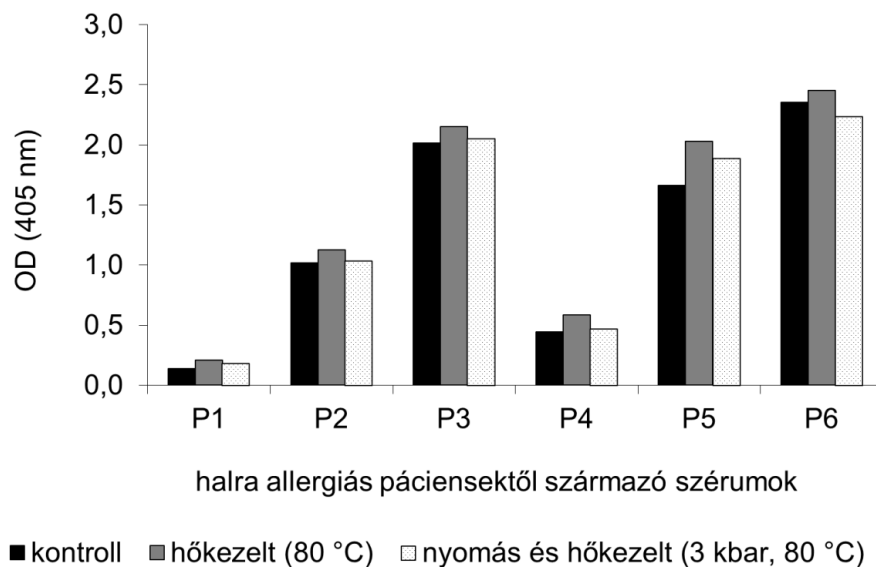


35. ábra A Gad m 1 nyomás-hőmérséklet fázisdiagramja

Ez a szokásoshoz képest meglehetősen komplex, a natív, denaturált és aggregált fázisokon kívül tartalmaz egy részlegesen kitekeredett és egy „olvadt gombóc” fázist is. A Hawley-féle elliptikus fázisdiagramra emiatt nem nagyon hasonlít.

5.1.7 Allergenitási tesztek

Az allergenitási kísérletekhez olyan kezeléseket választottam, ahol a változás az FTIR mérések alapján irreverzibilis. Három mintát kezeltem és küldtem a Bécsi Orvostudományi Egyetem Orvosi Biotechnológia Intézetébe az allergén tesztek elvégzésére: 1. kezeletlen kontroll, 2. atmoszférikus nyomáson hőkezelt minta (80 °C, 30 perc), 3. nagy nyomáson hőkezelt minta (80 °C, 3 kbar). A mintákat ELISA teszttel, 6 halra allergiás páciens szérumával vizsgálták, e méréseket nem én végeztem. A kontrollhoz képest a kezelt minták nem mutattak sem csökkent sem megnövekedett IgE-kötést (36. ábra).



36. ábra Halra allergiás páciensek (P1-P6) IgE reaktivitása a kontroll, a hőkezelt és a nyomás- és hőkezelt parvalbuminra. Az IgE-kötés ELISA-val lett meghatározva.

Habár az infravörös mérések eredménye alapján ezen kezelésekre hatására mind a másodlagos szerkezetben mind a Ca^{2+} -kötésben irreverzibilis változások lépnek fel, ezek a változások nem bizonyultak elégnek ahhoz, hogy csökkentsék a Gad m 1

allergenitását. Ennek oka az lehet, hogy az allergén reakció kialakulásához nem feltétlenül szükséges a natív szerkezet, bár gyakran van összefüggés a szerkezet és az allergenitás között. A ponty parvalbumin esetében pl. kimutatták, hogy EGTA kezelés hatására az allergén aktivitás csökkent (83), ami azt jelenti, hogy az allergenitáshoz legalább egy Ca^{2+} -ot tartalmaznia kellett a fehérjének. Az sem zárható ki teljesen, hogy a kezelés és az allergenitási teszt elvégzése között eltelt hosszabb idő alatt (néhány hét) a fehérje részben visszatekeredhetett, és az egyik Ca^{2+} -kötőhely az epitóppal együtt visszaépült.

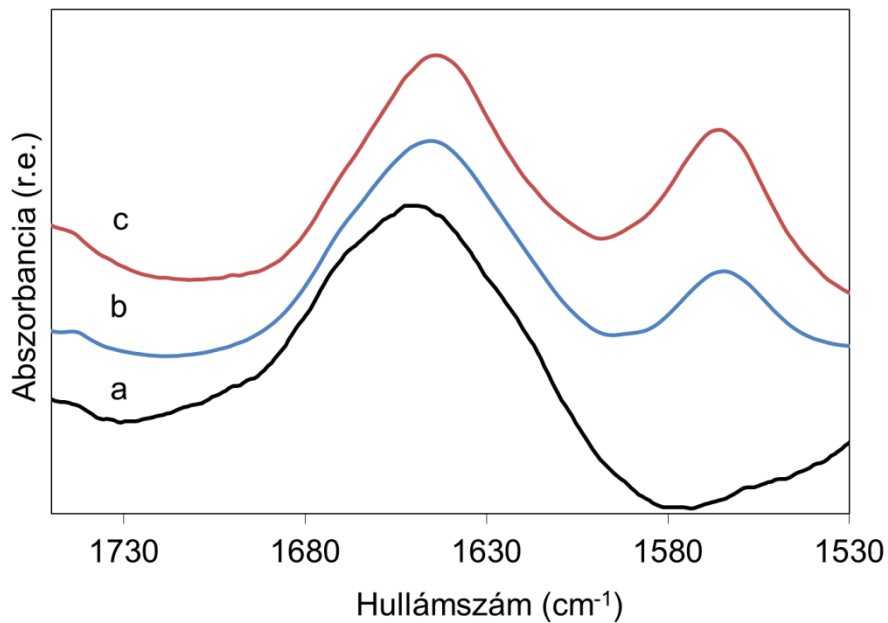
5.2 Titin

5.2.1 A PolyE PEVK fragmentum

A polyE a titin óriásmolekula eddig rendezetlennek ismert PEVK fragmentumának egy ismétlődő doménja. Az utóbbi időben végzett néhány kutatás alapján azonban elképzelhető, hogy a PEVK fragmentum mégis tartalmaz másodlagos szerkezeti elemeket, pl. gyenge helikális szerkezetű részeket (84, 85). A mérések során olyan különböző körülmények között vizsgáltam a fehérjét, amelyek megváltoztathatják a stabilitását, ezáltal a másodlagos szerkezeti elemek jelenlétét is befolyásolhatják.

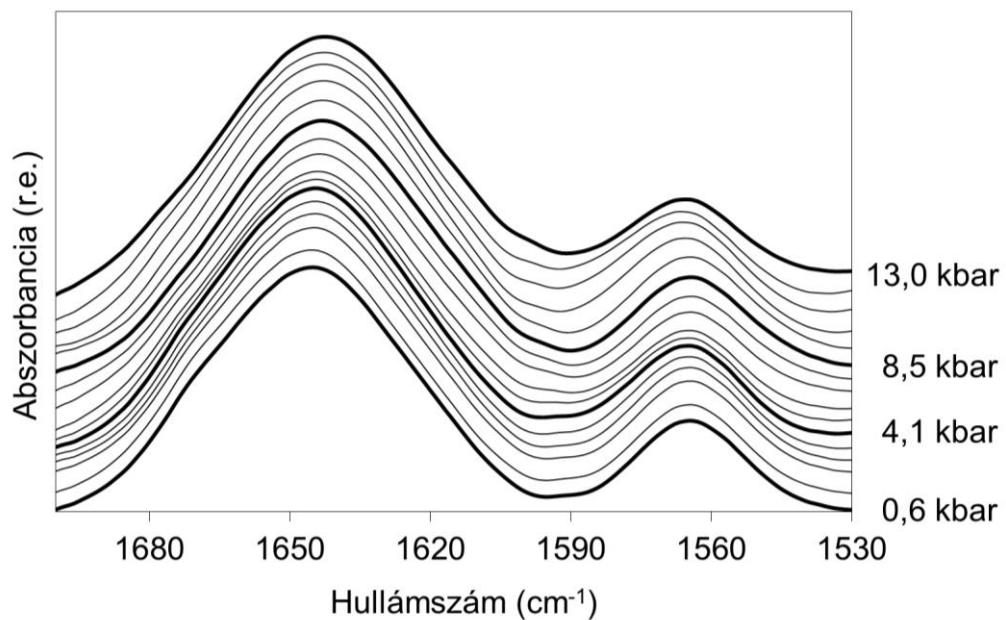
5.2.1.1 Nagy nyomás hatása a polyE PEVK fragmentum szerkezetére különböző oldatokban

Először a polyE domént különböző pD-ken vizsgáltam, hátha a pD változása elősegíti a rendezett szerkezet kialakulását. Az amid I sáv pozíciója minden vizsgált pD-n 1645 cm^{-1} (37. ábra), ami a rendezetlen fehérjékre jellemző (6, 86-89). A fehérje egy másik jellegzetes rezgését is azonosíthatjuk a spektrumon, mely pD=7 esetében 1565 cm^{-1} -nél található, pD=10,5-en pedig 1568 cm^{-1} -re tolódik. Ez a csúcs a fehérjében lévő glutaminsavak karboxil (COO^-) csoportjának antiszimmetrikus nyújtási rezgéséből származik (90). A polyE-ben ez a glutaminsavak átlagosnál lényegesen magasabb előfordulási arányának köszönhető (46%). Alacsony pD-n a COO^- csoporthoz egy deutérium ion is kapcsolódik és a karboxilcsoport szimmetriájában bekövetkező változások miatt a csúcs eltűnik.



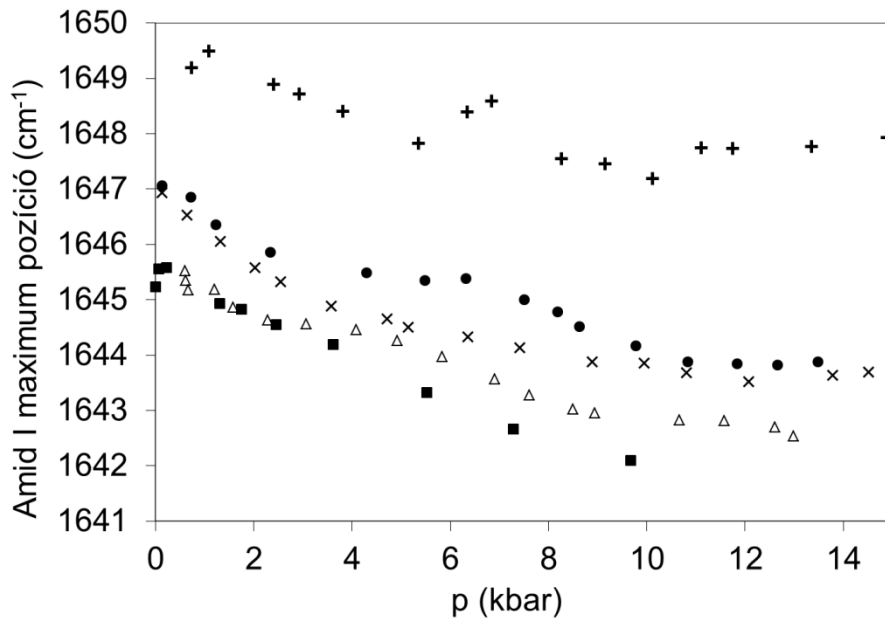
37. ábra A polyE FTIR spektrumai különböző pD-ken a) pD=3; b) pD=7; c) pD=10,5

A 38. ábra a polyE infravörös spektrumát mutatja pD=7-en, növekvő nyomásokon. A spektrum alakja a nyomás hatására nem változott jelentősen. pD=3-nál és pD=10,5-nél az eredmény hasonló volt.



38. ábra A polyE FTIR spektrumai pD=7-en növekvő nyomásoknál. Alulról felfelé a nyomásértékek: 0,6; 1,2; 1,6; 2,3; 3,1; 4,1; 4,9; 5,8; 6,9; 7,6; 8,5; 8,9; 10,7; 11,6; 12,6; 13,0 kbar

Az amid I csúcs pozíciója nem mutat lépcsőszerű változást, amiből kooperatív fázisátmenetre lehetne következtetni (39. ábra).



39. ábra A polyE amid I maximum pozíciói a nyomás függvényében pH=7-en hozzáadott ionok nélkül (Δ); 0,2 M CaCl_2 -dal(\bullet); 0,5 M KNO_3 -tal (\blacksquare); 50% glicerinnel (\times); 2M TMAO-val (+)

A csúcspozíció változásának meredeksége a nyomás függvényében a különböző pH-jú és iontartalmú oldatok esetén 0 és $-0,3 \text{ cm}^{-1}/\text{kbar}$ közé esik. Ez a viszonylag kis meredekség a víz és a karbonil csoport oxigénje közötti hidrogénhid fizikai összenyomásával magyarázható inkább, mint a fehérje másodlagos szerkezetének megváltozásával. A növekvő nyomás ugyanis a fehérjékben általában a rezgési frekvenciák emelkedésével jár együtt (91), de az amid I rezgésnél csökkenést tapasztaltunk. Növekvő nyomás hatására valószínűleg a megerősödő hidrogénhid jobban elvonja az elektronokat az oxigénatomtól, ezáltal gyengíti a C=O kötést, ami az amid I csúcst a kisebb frekvenciák irányába tolja el.

Mivel a kaotróp (struktúrabontó) ill. kozmotróp (struktúraépítő) vegyületek jelenléte szintén befolyásolhatja a fehérjék stabilitását, a polyE spektrumát pH=7-en különböző kozmotróp anyagok jelenlétében is felvettem. Kísérleteimben a glicerint, a KNO_3 és a CaCl_2 és TMAO jelenlétének hatását vizsgáltam. Az eddigi irodalmi adatok alapján a glicerint és a KNO_3 a *Staphylococcus* nukleáz fehérje esetén kozmotrópnek

bizonyult, növelte a stabilitást, ezért elképzelhető, hogy elősegíti a szerkezet kialakulását (92, 93). Bár a CaCl_2 ugyanezen fehérjénél kaotrópnak mutatkozott, más fehérjékre lehet, hogy ellentétes a hatása. A Ca^{2+} -kötő fehérjéknél a kötésben gyakran a COO^- csoportok vesznek részt. Mivel a polyE sok glutaminsavat és ezáltal sok COO^- csoportot tartalmaz, elképzelhető, hogy képes Ca^{2+} -ot is kötni, ami viszont rendezettebb szerkezetet eredményez. A TMAO szerkezet stabilizáló hatását szintén kimutatták (94). Ezenkívül a TMAO nagyobb koncentrációban van jelen a mélytengeri állatokban, aminek szerepe lehet a nyomással szembeni stabilitásban.

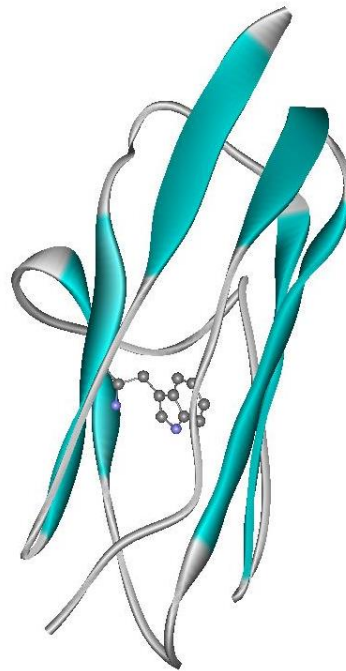
Minden esetben rendezetlen szerkezetre utaló spektrumokat kaptam, nyomásciklus hatására pedig nem tapasztaltam szerkezeti változást (39. ábra). Glicerol és CaCl_2 jelenlétében kissé, TMAO esetén jelentősen megnőtt az amid I maximum pozíció, ami utalhatna hélix képződésére. A nyomás függvényében azonban nem történt denaturációs átmenet 14 kbar felett sem, ami extrém stabilitást jelentene. Ez nagyon valószínűtlen egy normál körülmények között rendezetlen fehérjénél. Valószínűbb, hogy a fehérje rendezetlen szerkezetű maradt, az amid I maximum pozíciójának eltolódása pedig abból adódik, hogy az amid csoport oldószerrel alkotott hidrogénkötéseinek erőssége megváltozott.

5.2.1.2 A polyE PEVK fragmentum különböző hőmérsékleteken

A polyE spektrumát a hőmérséklet függvényében is vizsgáltam különböző pD-ken. 100 °C-ig melegítve semmilyen változást nem tapasztaltam a másodlagos szerkezetben. Mind az amid I, mind a COO^- csúcspozíciója lineárisan változott a hőmérséklet növelésével. Ez az eltolódás egy nem-specifikus hőmérsékleti hatás, amely nem jelent szerkezetbeli változást. A vizsgált körülmények között az FTIR mérések alapján a polyE fragmentum nem mutat globális rendeződést.

5.2.2 Immunoglobulin 27

A titin I27 domén homológia modellezéssel kapott szerkezete az irodalmi adatoknak megfelelően flexibilis hurkokkal összekötött béta szálakat tartalmaz, szendvicsszerű formában (50) (40. ábra).



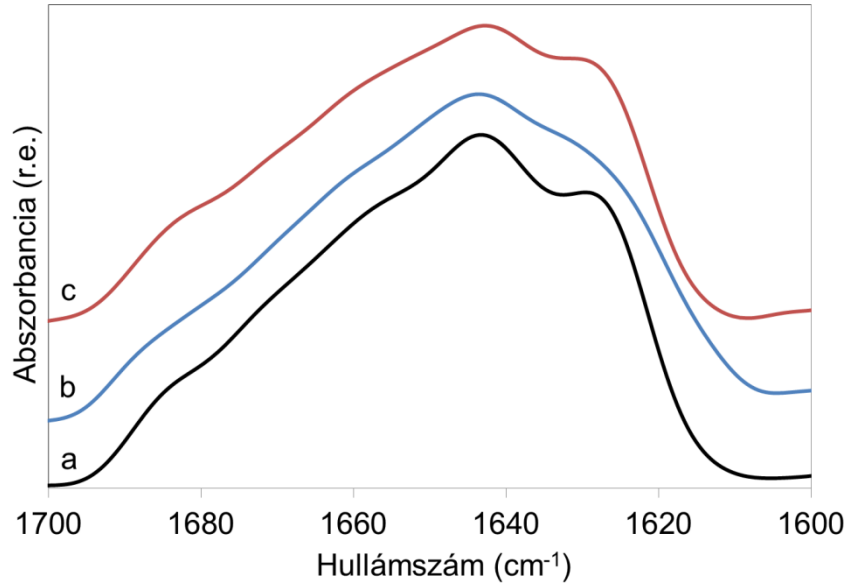
40. ábra A titin I27 homológia modellezéssel jósolt szerkezete (A kék szalagok a béta szerkezetet, a molekula közepén kirajzolt aminosav pedig a fluoreszcencia mérésekhez használt triptofán helyét jelölik.)

A szerkezet a nyomás illetve a hőmérséklet növelésével denaturálható. A titin I27 nyomás-hőmérséklet fázisdiagramját is infravörös spektroszkópia segítségével határoztam meg, különböző állandó hőmérsékleteken növelve a nyomást, illetve különböző nyomásokon növelve a hőmérsékletet. Az eredmények megerősítésére az atmoszférikus nyomáson végzett hőmérséklettől függő kísérlet sorozatot fluoreszcencia spektroszkópiával is elvégeztem. A fluoreszcencia spektroszkópiai mérésekben fontos szerepet játszó triptofán aminosav a molekula belsejében helyezkedik el, tehát natív állapotban inkább hidrofób környezetben van. Denaturáció során környezetének polaritása megváltozik, kapcsolatba kerülve az oldószerrel hidrofil környezetbe kerül, ezért az átalakulás nyomon követhető.

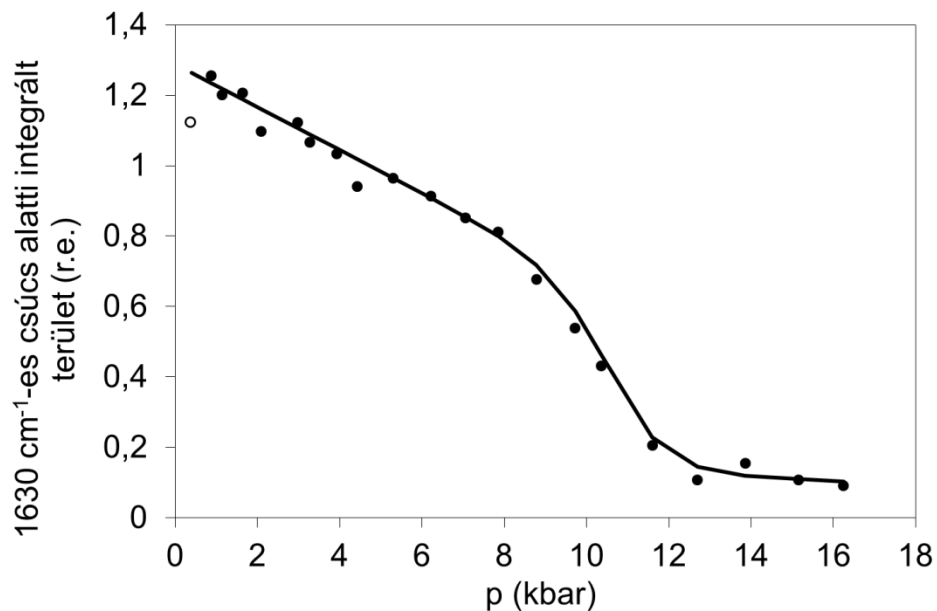
5.2.2.1 Nagy nyomás hatása a titin I27 szerkezetére

A 41. ábra a titin I27-es fragmentumának dekonvolvált spektrumait mutatja 30 °C-on a nyomáskezelés előtt (a), a legnagyobb nyomáson (b) és a kezelés után (c). Alacsony nyomáson az amid I sáv két fő összetevőt tartalmaz 1643 cm^{-1} -es és 1630 cm^{-1} -es csúcspozíciókkal (41. ábra a). Az előbbi rendezetlen, az utóbbi csúcs

intramolekuláris béta szerkezetre utal. Az 1630 cm^{-1} -es csúcs nyomáskezelés alatt eltűnt (41. ábra b). E komponens csúcs alatti területét a nyomás függvényében ábrázoltam, és szigmoid görbét illesztettem rá (42. ábra).



41. ábra A titin I27 dekonvolvált FTIR spektrumai (pD=7); a) a nyomáskezelés előtt; b) denaturált állapotban 16,3 kbar-on; c) a nyomáskezelés után



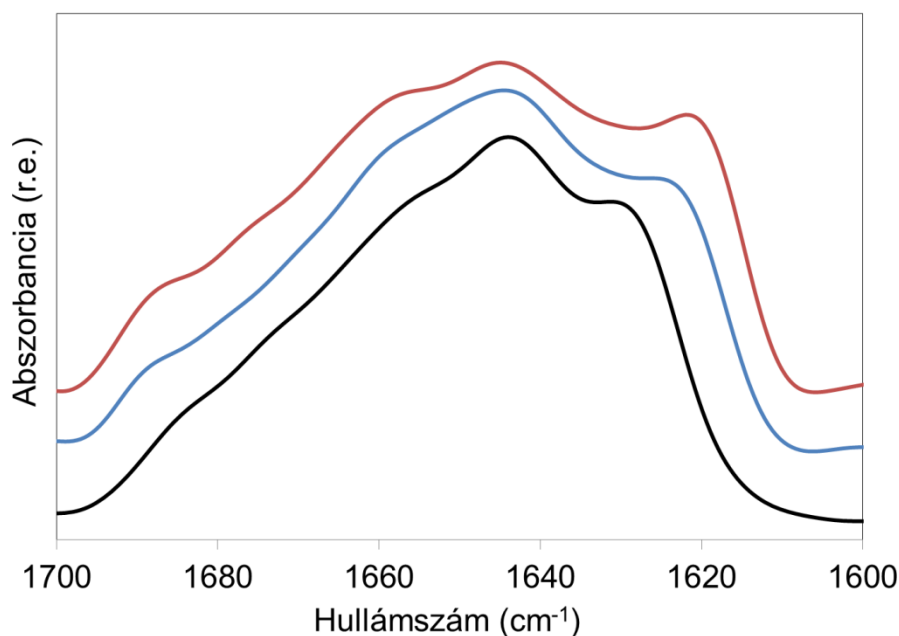
42. ábra A titin I27 béta szerkezetének eltűnése a nyomás függvényében

A szigmoid görbe átmeneti pontja $10,5 \pm 0,3$ kbar. A csúcs eltűnése a magasabb nyomáson a fehérje kitekeredésére utal. Amikor a nyomás visszaállt az atmoszférához közeli értékre a fehérje újra feltekeredett, az 1630 cm^{-1} -es csúcs ismét megjelent (41. ábra c). A csúcs alatti területből számolva a fehérje 95 %-a tekeredett vissza, tehát az I27 nyomás által indukált kitekeredése majdnem teljesen reverzibilis.

A nyomásciklust 50 °C -on is elvégeztem, ahol a fehérje nyomással szembeni stabilitása jelentősen csökkent. Az átmeneti pont $0,9 \pm 0,1$ kbar, ami egy nagyságrenddel alacsonyabb, mint 30 °C -on. A reverzibilitás hasonló, mint 30 °C -on. Nem történt aggregáció a nyomásciklus közben és utána, sem 30 °C -on, sem 50 °C -on. Ez azt jelenti, hogy a fehérje anélkül tekeredik vissza a natív állapotába, hogy előtte jelentős időt töltene aggregációra hajlamos átmeneti állapotban.

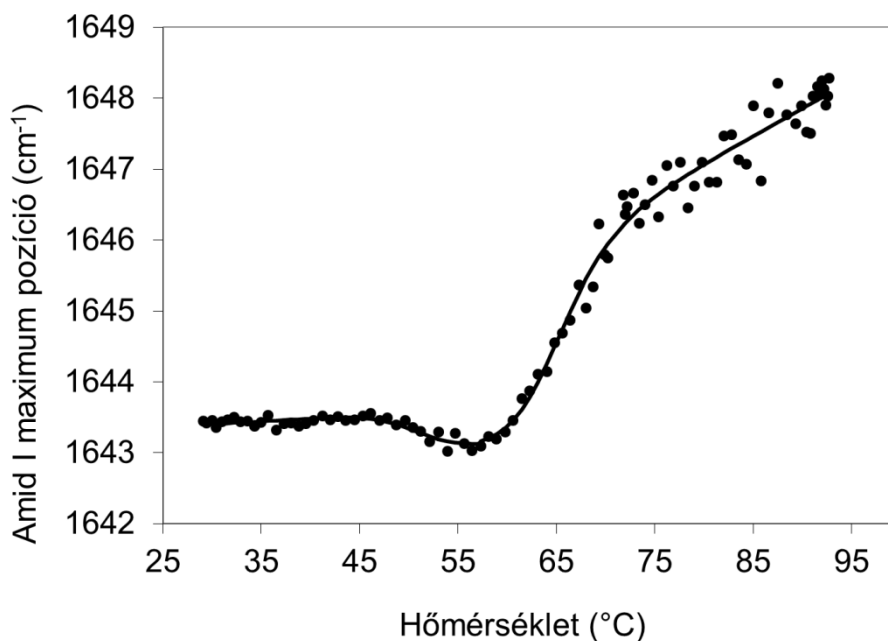
5.2.2.2 A hőmérséklet változás hatása a titin I27 szerkezetére

A 43. ábra a hőmérséklet változás hatását mutatja az I27 infravörös spektrumára. A hőmérséklet emelésével (30 °C -ról 90 °C -ra) az amid I csúcs pozíciója eltolódik és kiszélesedik, ami a fehérje kitekeredésére utal. A 44. ábra az amid I csúcs pozícióját mutatja a hőmérséklet függvényében. Az átalakulási hőmérséklet atmoszférához közeli nyomáson $65,2 \pm 1,7 \text{ °C}$ (44. ábra).

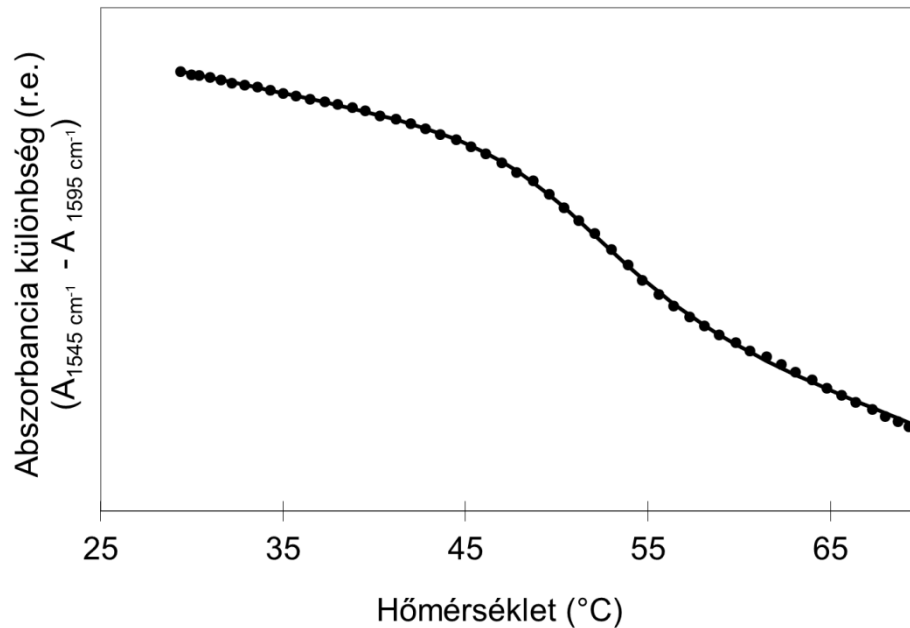


**43. ábra A titin I27 dekonvolvált FTIR spektrumai ($pD=7$);
a) 30 °C -on a hőkezelés előtt; b) 90 °C -on; c) 30 °C -on a hőkezelés után**

Az amid I pozícióban egy másik viszonylag kis eltolódás ($0,4 \text{ cm}^{-1}$) is megfigyelhető az $50,3 \pm 0,9 \text{ °C}$ -kal jellemzett átalakulási hőmérsékleten (44. ábra). ehhez hasonlóan az 1545 cm^{-1} -es csúcs abszorbanciája a hőmérséklet függvényében $52,8 \pm 0,2 \text{ °C}$ -os átmeneti hőmérséklettel szigmoid görbe szerint változott (45. ábra). Ez a csúcs az amid II sávnak feleltethető meg. Az amid II sáv a hidrogén/deutérium kicserélődésre érzékeny. Bár a fehérjézőn elhelyezkedő hidrogénatomok nagy része kicserélődött deutériumra még a mérés kezdete előtt, néhány a fehérje belsejében védett hidrogén kicserélésen maradt. Ezekből származik a gyenge amid II sáv alacsonyabb hőmérsékleten. 50 °C felett az amid II csúcs eltűnése a harmadlagos szerkezet gyengülésére utal, ami lehetővé teszi a fehérje belsejébe temetett protonok kicserélődését is. A denaturációs átmenetet ($65,2 \pm 1,7 \text{ °C}$) a fehérje aggregációja követte, amit egy új csúcs megjelenése jelez 1620 cm^{-1} -nél (43. ábra).

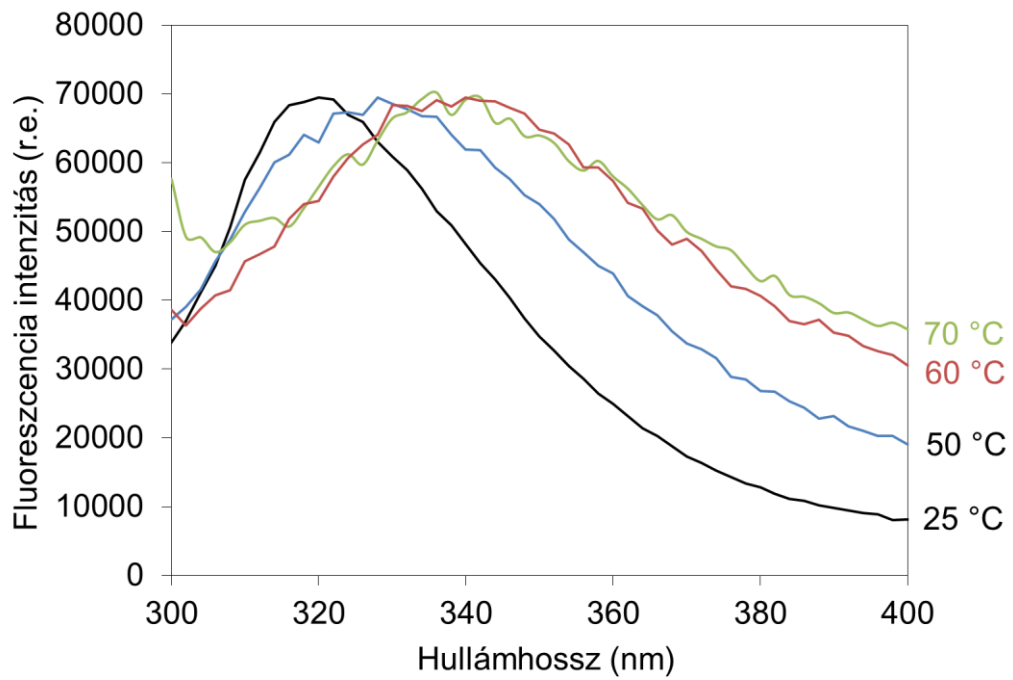


44. ábra A titin I27 amid I csúcsának maximum pozíciója a hőmérséklet függvényében

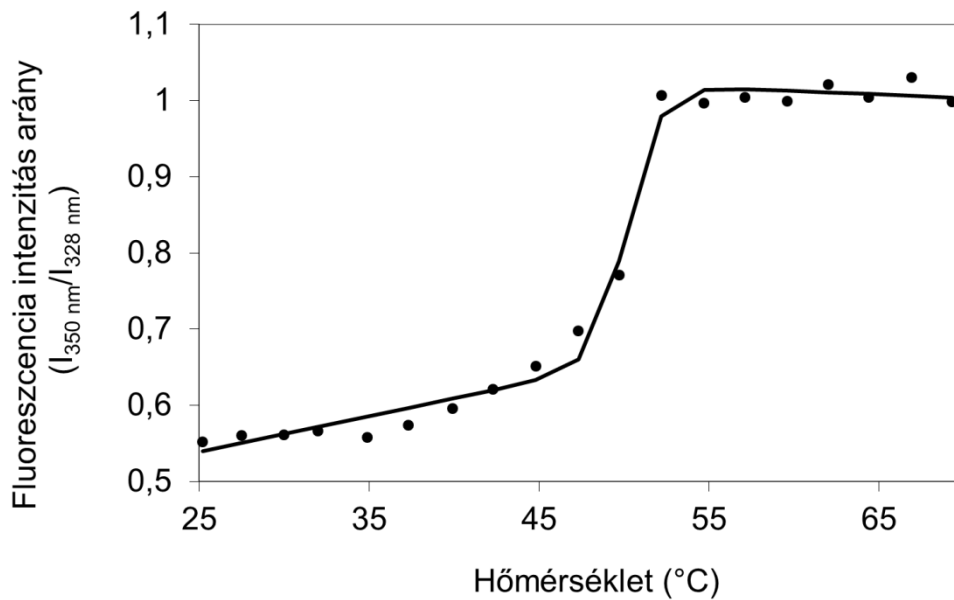


45. ábra A titin I27 amid II csúcsának eltűnése a hőmérséklet függvényében

Az 50 °C körüli átmenet a spektrumok paramétereinek változása alapján mindenképpen szerkezeti változásra utal, azonban a teljes denaturáció csak 65 °C körül ment végbe. Az első átalakulás egy intermedier, valószínűleg „olvadt gombóc” szerű állapotba történő átmenet. Ennek megerősítésére az átmenetet a triptofán fluoreszcencia emissziójának vizsgálatával is tanulmányoztam. A fehérje triptofán aminosava feltekeredett állapotban a fehérje belsejében helyezkedik el. A 46. ábra a jellemző fluoreszcencia emissziós spektrumokat mutatja különböző hőmérsékleteken. Szobahőmérsékleten (25 °C) az emissziós maximum 320 nm-nél van. Ez a hidrofób környezetben található triptofánra, tehát a feltekeredett fehérjére jellemző. A hőmérséklet emelésével a maximum pozíció szigmoid átmenettel 328 nm-re tolódik, $50,0 \pm 2,3$ °C-os középponttal (47. ábra). Az eltolódás arra utal, hogy a fehérje belsejében található triptofán környezetének polaritása megváltozott, amely alátámasztja az „olvadt gombóc” szerű állapot megjelenését 50 °C felett.



46. ábra A titin I27 fluoreszcencia emissziós spektruma 290 nm-en gerjesztve a natív állapotban 25 °C-on (fekete), az „olvadt gombóc” állapotban 50 °C-on (kék), 60 °C-on (piros) és a denaturált állapotban 70 °C-on (zöld), Raman korrekció után.



47. ábra A titin I27 fluoreszcencia inenzitás arányai a hőmérséklet függvényében

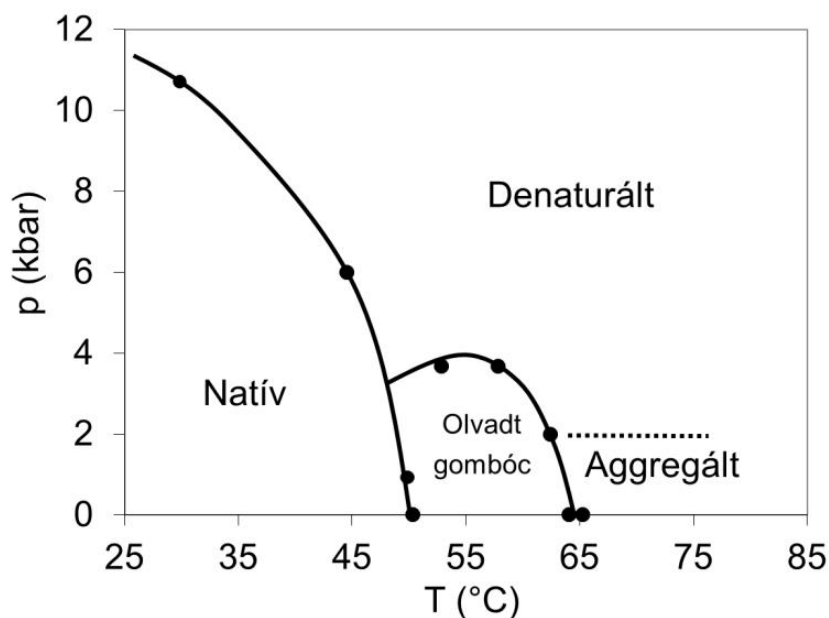
A triptofán emissziós maximumának pozíciója további hőmérséklet növekedés hatására 342 nm-re tolódott, ami a teljesen kitekeredett fehérjékre jellemző. Ezzel párhuzamosan a Rayleigh szórás megnőtt, amely a spektrumban az alacsonyabb hullámhosszaknál bekövetkező intenzitásnövekedésből látható (46. ábra). A szórás növekedése az aggregátumok megjelenésének tulajdonítható, amelyek szobahőmérsékletre való visszahűtés után is megmaradtak. Az infravörös spektrumban is megmaradt az aggregációs csúcs a hőkezelés után (43. ábra, 1620 cm^{-1}), az aggregáció tehát irreverzibilis. Amikor a hőmérsékletciklus után egy nyomásciklust is elvégeztem (30 °C -on), az aggregációs csúcs területe a nyomás emelésével folyamatosan csökkent. 11 kbar-on az aggregációs csúcs területe az eredeti 15%-ára csökkent, ez a 15% azonban a további nyomáskezelésnek (17 kbar-ig tudtam mérni) is ellenállt.

Ez a jelenség összhangban van a korábbi kutatásokkal, ahol már több fehérjénél tapasztalták, hogy a nyomáskezelés képes szétbontani az aggregátumokat (24, 95, 96). A nyomást csökkentve a fehérje részlegesen visszatekeredett, de egy része denaturált maradt és aggregálódott. Az aggregációs csúcs (1620 cm^{-1}) intenzitásának nyomásciklus előtti és utáni értékeit összehasonlítva 50%-ra becsültem a megmaradt aggregátum mennyiségét. Az aggregációs csúcs pozíciója (1620 cm^{-1}) a tipikus értéknél (1616 cm^{-1}) kicsit magasabb. Elképzelhető, hogy ez a csúcs két komponenset tartalmaz, egy 1616 cm^{-1} -es és egy magasabb hullámszámú komponenset. Az utóbbi amorf aggregátumból való amiloidképződésre utalna. Az amiloidképződésre jellemző tipikus pozíció 1625 cm^{-1} -nél található (97, 98). Ellenőriztem ezt a lehetőséget, de dekonvolúcióval az 1620 cm^{-1} -es csúcst nem tudtam több komponensre bontani. (A hőkezelt (90 °C) mintát atomerő mikroszkópiával is ellenőriztem, de nem találtam amiloid fibrillumokat.)

A hőmérséklettől függő kísérlet sorozatot magasabb nyomásokon is elvégeztem, a nyomás növelésével a denaturációs hőmérsékletek csökkentek. 2 kbar-on ($62,5\text{ °C}$ -os átalakulási hőmérséklet) kis aggregációt még tapasztaltam, de magasabb nyomásokon 3,7 kbar-on (58 °C -os átalakulási hőmérséklet) és 6 kbar-on ($44,5\text{ °C}$ -os átalakulási hőmérséklet) a fehérje már aggregáció nélkül denaturálódott.

A fázisátmeneti pontok megtalálásához a spektrumok néhány jellegzetes paraméterét használtam: amid I csúcs maximum pozíciója, amid I sáv szélessége, az 1630 cm^{-1} -es béta csúcs alatti integrált terület, az 1616 cm^{-1} -es aggregációs csúcs alatti

terület, a fluoreszcens spektrumok esetén az emissziós intenzitások aránya a karakterisztikus hullámhosszakon. Ezen mennyiségeket a nyomás illetve hőmérséklet függvényében ábrázolva és szigmoid görbéket illesztve az adatokra megkaptam az átmeneti pontokat. A különböző paraméterekből meghatározott átmeneti pontok elég jól egyeztek, ezekből megrajzolható az I27 nyomás-hőmérséklet fázisdiagramjának egy részlete (48. ábra). A nyomás-hőmérséklet paraméterektől és az előzetes kezelésektől függően az I27 fragmentum többféle szerkezetet vehet fel. A fázisdiagram jelentősen különbözik a Hawley-féle elliptikus fázisdiagramtól, mivel az általánosan előforduló natív és denaturált állapotokon kívül „olvadt gombóc” szerű és aggregált állapotokat is tartalmaz.



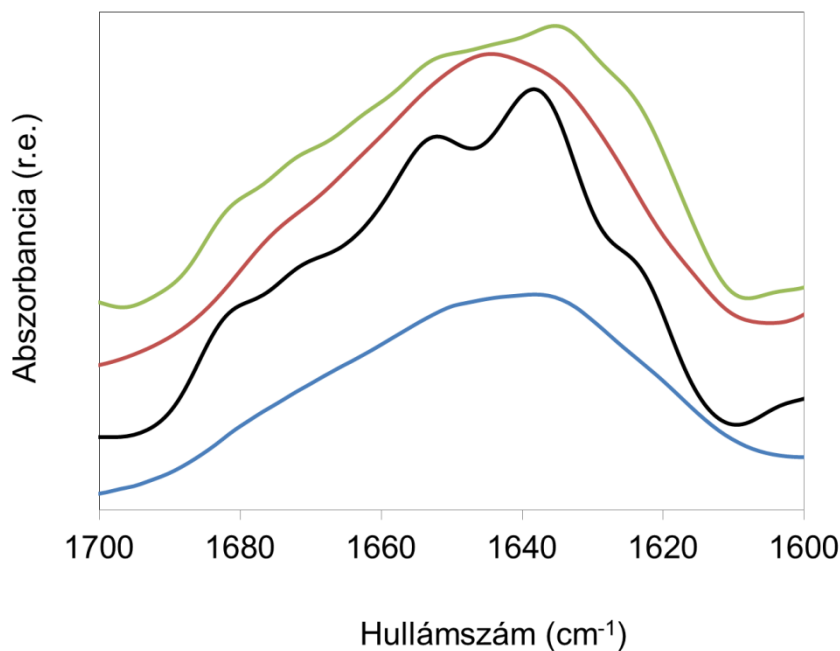
48. ábra A titin I27 nyomás-hőmérséklet fázisdiagramja

5.3 Rv3221c

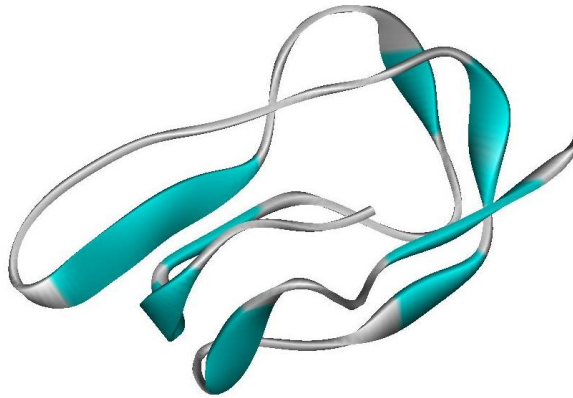
5.3.1 Az Rv3221c szerkezete

A korábbi tanulmányok alapján azt vártam, hogy az Rv3221c szobahőmérsékleten és atmoszférikus nyomáson rendezetlen szerkezetet mutat majd (65), a mérési eredmények azonban ennek ellentmondanak. Az amid I csúcs maximum pozícióját 1640 cm^{-1} -nek találtam (49. ábra, kék), Fourier öndeconvolúciót alkalmazva azonban ez a csúcs két jól elkülönülő komponensre bontható fel, melyeknek maximuma

1637 illetve 1652 cm^{-1} (49. ábra, fekete). Az 1637 cm^{-1} -es csúcs a béta lemezekre jellemző (továbbiakban béta csúcs). Ez egyezik az Exspasy szerverrel végzett homológia modellezés eredményével (50. ábra), ami szintén túlnyomórészt béta szerkezetet jósolt. Habár az 1652 cm^{-1} -es csúcs utalhatna alfa hélixre, figyelembe kell vennünk, hogy az Rv3221c egy biotinkötő fehérje. A biotin egyik karakterisztikus infravörös csúcsa 1650 cm^{-1} -nél található (99). Mivel az *Escherichia coli* sejtek és a tápközeg, amiben a fehérjét expresszálták jelentős mennyiségű biotint tartalmaz, a tisztított fehérje is biotinkötött állapotban van. Emiatt (és a csúcs viselkedése miatt) az 1652 cm^{-1} -es csúcsot a biotinnak és nem a fehérjének tulajdonítottam.



49. ábra Az Rv3221c infravörös spektrumai 30 °C-on: a nyomásciklus előtt (kék); dekonvolvált spektrum a nyomásciklus előtt (fekete); dekonvolvált spektrum 8 kbar-on a denaturált állapotban (piros) és dekonvolvált spektrum a nyomásciklus után (zöld)

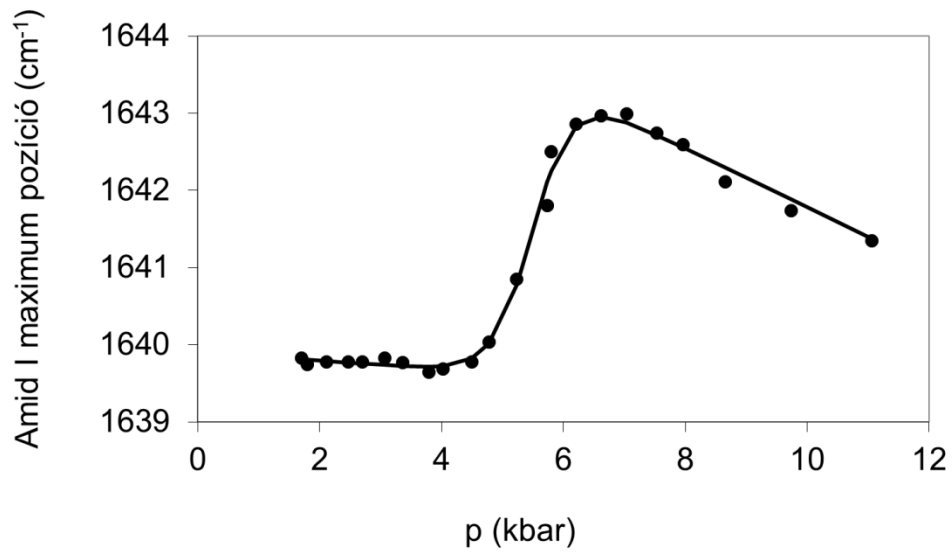


50. ábra Az Rv3221c homológia modellezéssel jósolt szerkezete. A kék szalagok a béta szerkezetet jelölik.

Az eredmények a másodlagos szerkezetet illetően (légköri nyomáson és szobahőmérsékleten) nem egyeznek a korábbi tanulmánnyal, ami rendezetlen szerkezetet jósolt (65). Erre a különbségre több magyarázat is adható. Egyrészt más oldószert használtam, valamint az infravörös mérésnél használt koncentráció lényegesen magasabb, mint amit a korábbi tanulmányban a CD kísérleteknél alkalmaztak. Ezenkívül nemrég kimutatták, hogy a biotinkötés jelentősen befolyásolhatja a fehérjék CD jelét (100), ami téves következtetések levonására adhat lehetőséget.

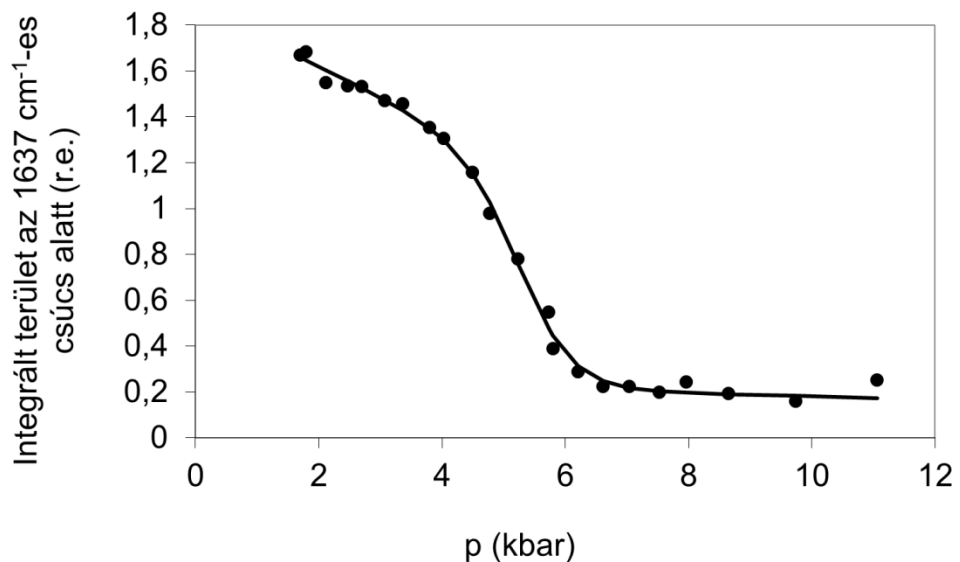
5.3.2 Nagy nyomás hatása az Rv3221c szerkezetére

Nyomáskezelés hatására az Rv3221c amid I sávja kiszélesedik és a pozíciója 1640 cm^{-1} -ről 1643 cm^{-1} -re tolódik, ami a rendezetlen szerkezetre jellemző. Az amid I maximum pozíció nyomástól való függése alapján az átalakulás középpontja $5,3 \pm 0,2$ kbar-nál található (51. ábra). Az átalakulási nyomás felett a görbe meredeksége $-0,38\text{ cm}^{-1}/\text{kbar}$, amely a rendezetlen fehérjékre jellemző. Hasonló értéket kaptam a rendezetlen polyE titin fragmentumra is (5.2.1.1 fejezet).



51. ábra Az Rv3221c amid I maximum pozíciójának változása a nyomás függvényében 30 °C-on.

A dekonvolvált spektrum (49. ábra, fekete) 1637 cm⁻¹-es komponense alatti területet ábrázolva hasonló szigmoid jellegű görbét kapunk azonos átalakulási középponttal (5,3±0,2 kbar) (52. ábra).



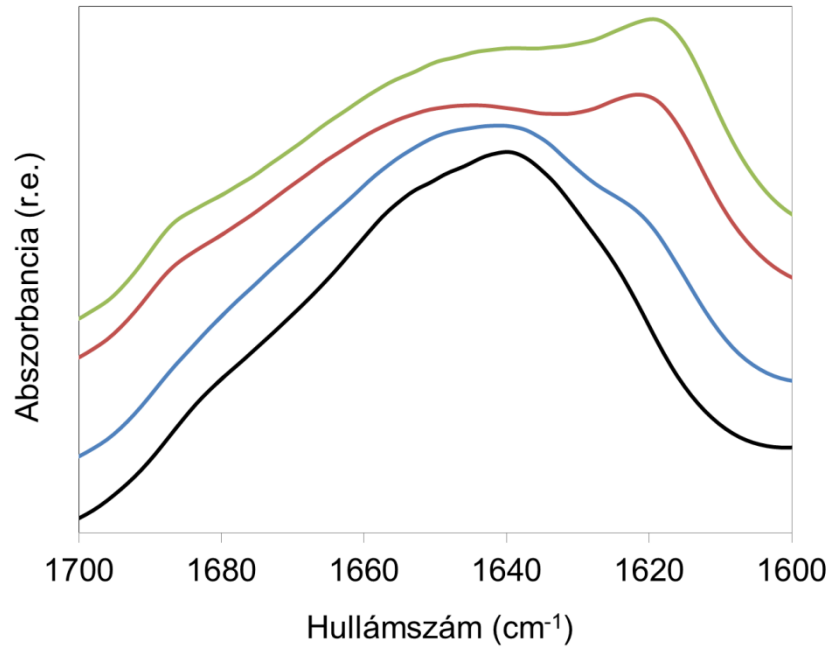
52. ábra Az Rv3221c béta csúcsának eltűnése a nyomás függvényében 30 °C-on.

Felmerül a kérdés, hogy a nyomáskezelés után a fehérje mennyire tekeredik vissza: visszatekeredik-e teljesen vagy megmarad egy köztes állapotban rövidebb ideig vagy akár „végleg”. A helyzetet tovább bonyolítja a biotin jelenléte, ami a feltekeredett fehérjéhez kötődik, de valószínűleg a kitekeredett fehérjéhez nem. A fehérje megfelelő konformációba való visszatekeredéséhez szükség van a biotin visszakötésére is. A nyomásciklus előtti és utáni légköri nyomáson felvett infravörös spektrumok jelentősen különböznek egymástól (49. ábra b és d). A dekonvolvált spektrumból kapott csúcspozíciók alapján a főkomponens csúcsa kissé eltolódott az alacsonyabb hullámszámok felé (1637-ről 1633 cm^{-1} -re), 1623 cm^{-1} -nél pedig egy új váll jelent meg a denaturált állapothoz képest. Ez utóbbi komponens aggregátumok keletkezésére utal (78, 101). A biotinnak tulajdonított csúcs szintén kevésbé éles és a csúcs alatti terület csökkent. Mindezek alapján a fehérje biztosan nem tekeredett vissza teljesen az eredeti konformációjába a nyomásciklus után.

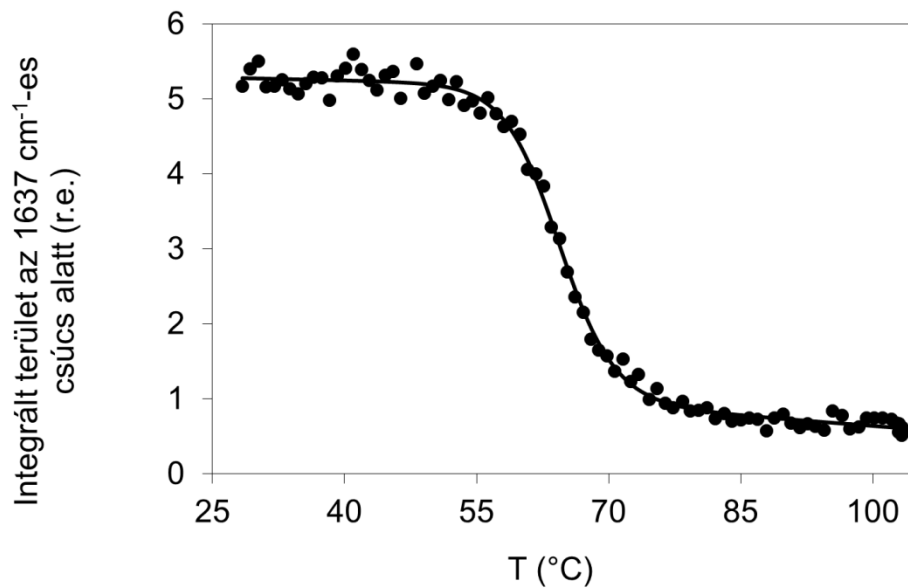
A legvalószínűbb magyarázat a nyomásciklus utáni spektrumra az lehet, hogy a fehérje egy része a biotint újrakötve visszatekeredett, míg a maradék része aggregálódott. Az aggregátumok jelenlétét az is alátámasztja, hogy az 1623 cm^{-1} -es csúcs a második nyomásciklus során eltűnik, ahogy ez várható a nyomáskezelés ismert disszociáló hatása miatt. Meglepő módon a második nyomásciklusban a denaturáló nyomás pontosan ugyanakkora, mint az elsőben. Ez azt jelentheti, hogy a fehérjének az a frakciója, ami visszatekeredett és újrakötötte a biotint, az eredeti helyes konformációt vette fel, és a stabilitása ugyanolyan, mint a nyomáskezelés előtt volt. Egy másik magyarázat az lehet, hogy a fehérje visszatekeredett a biotin visszakötése nélkül, egy másik alternatív konformációba. Ebben az esetben nagyon valószínűtlen lenne, hogy a második nyomásciklus során a denaturációs nyomás nem változik, még akkor is, ha a biotin-kötésnek nincs jelentős szerepe a stabilitásban.

5.3.3 Hőmérséklet változás hatása az Rv3221c szerkezetére

Hőkezelés hatására az Rv3221c egy lépésben denaturálódott, intermedier állapot nem volt megfigyelhető. A fehérje kitekeredését aggregáció kísérte, amit az 1618 cm^{-1} -es csúcs megjelenése jelzett (53. ábra). Az 1637 cm^{-1} -es béta szerkezetre jellemző csúcs területe a hőmérséklet emelésével folyamatosan csökkent, az átalakulás középpontja $64,4 \pm 0,2$ °C (54. ábra).

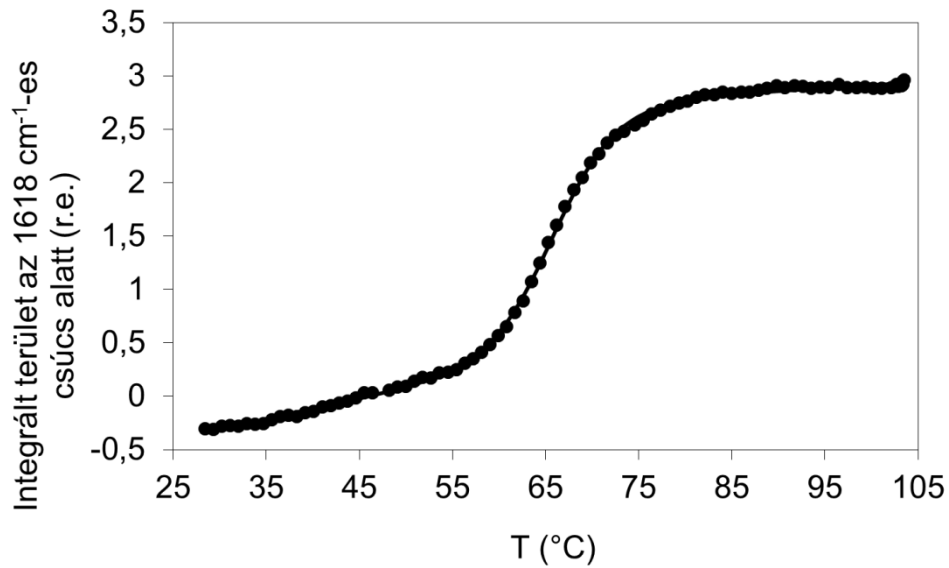


53. ábra Az Rv3221c infravörös spektruma különböző hőmérsékleteken: 30 °C-on a hőkezelés előtt (fekete), 64,4 °C-on (kék), 100 °C-on (piros), 30 °C-on a hőkezelés után (zöld)



54. ábra Az Rv3221c béta csúcsának eltűnése a hőmérséklet függvényében.

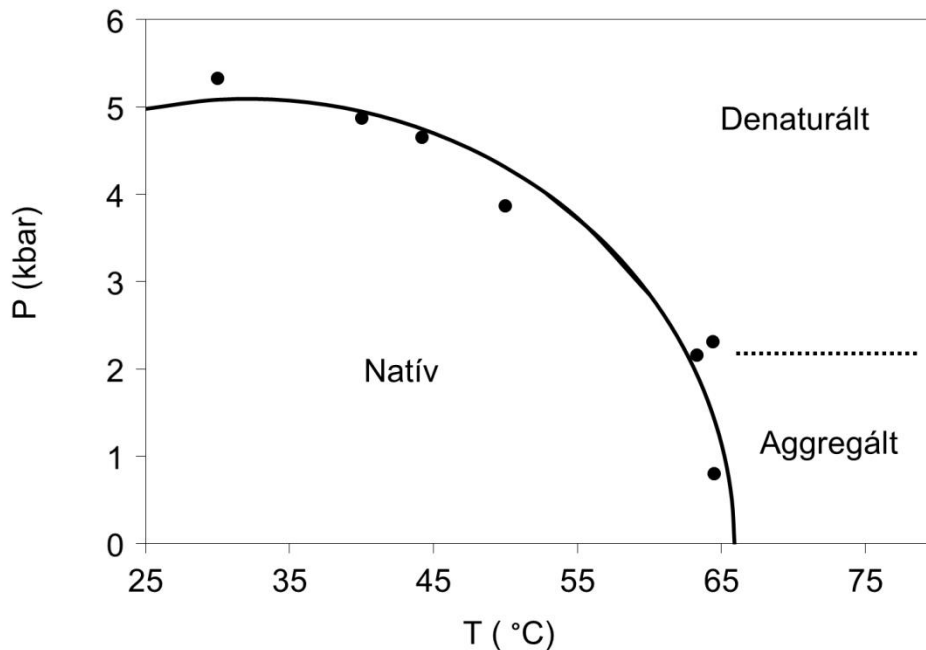
Az aggregáció folyamatának középpontja $66,1 \pm 0,3$ °C (55. ábra). Az átalakulás irreverzibilis volt, az aggregátumok megmaradtak a fehérje hőkezelése után is (53. ábra, zöld).



55. ábra Az Rv3221c aggregációs csúcsának kialakulása hőkezelés hatására

Magasabb nyomáson elvégezve a hőmérséklettől függő kísérletsorozatot a denaturációs átalakulásra jellemző hőmérséklet csökkent, 3,3 kbar-on $64,4 \pm 0,2$ °C-ról $44,2 \pm 0,5$ °C-ra.

Az átalakulási középpontokból meghatároztam az Rv3221c nyomás-hőmérséklet fázisdiagramját (56. ábra), ami jól illeszkedik a Hawley-féle elliptikus fázisdiagram elméletéhez (2.4 fejezet).



56. ábra Az Rv3221c nyomás-hőmérséklet fázisdiagramja

6. Következtetések

6.1 Parvalbumin

A Gad m 1 mind az infravörös spektrumok alapján, mind pedig a homológia modellezés alapján 50%-ban alfa hélixet, ezenkívül hurkokat és rendezetlen részeket tartalmaz.

Ca^{2+} hiányos állapotban a szerkezet nagyrészt rendezetlen, kb. 5% hélixet tartalmaz, ami 2 kbar nyomásnál kitekeredik.

Hőkezelés hatására két átalakulás figyelhető meg, 50 °C-on a fehérje „olvadt gombóc” szerű állapotba kerül, 75 °C-on pedig teljesen denaturálódik. A denaturációt atmoszférikus nyomáson aggregáció kíséri, azonban 2 kbar nyomás már elegendő ahhoz, hogy megvédje a fehérjét az aggregációtól.

Szobahőmérsékleten végzett nyomástól függő kísérlet sorozatnál a fehérje 5,2 kbar-on fázisátalakuláson esik át, és részlegesen kitekeredett állapotba kerül. 40 °C-on két átalakulás figyelhető meg a nyomás függvényében: 4,8 kbar-on a fehérje részlegesen kitekeredett állapotba kerül, és egyik Ca^{2+} ionját elveszti, 11,4 kbar-on teljesen kitekeredik. 55 °C-on ezek az átalakulási nyomások alacsonyabbak (2,2 ill. 8,9 kbar).

A fehérje a natív és „olvadt gombóc” szerű állapotokban két Ca^{2+} -iont köt, a részlegesen kitekeredettben valószínűleg egyet, a denaturált és aggregált állapotokban pedig nem köt Ca^{2+} -iont.

A natívból a részlegesen kitekeredett állapotba történő átmenet reverzibilisnek, a többi átmenet részben vagy teljesen irreverzibilisnek bizonyult.

A nyomás-, hő- ill. kombinált kezelés se nem csökkentette se nem növelte a Gad m 1 fehérje IgE kötését.

Meghatároztam a Gad m 1 fehérje nyomás-hőmérséklet fázisdiagramját, ami ötféle állapotot tartalmaz, emiatt nem nagyon hasonlít a Hawley-féle kétállapotú elliptikus diagramra. Az általánosan jelenlévő natív és denaturált állapotokon kívül megfigyelhetők „olvadt gombóc” szerű, részlegesen kitekeredett és aggregált állapotok is.

6.2 Titin

6.2.1 PolyE

A polyE megőrzi rendezetlen szerkezetét széles nyomás (0-16 kbar), hőmérséklet (0-100 °C) és pD (3-10,5) tartományban, továbbá kozmotróp anyagok jelenlétében (CaCl₂, KNO₃, glicerin, TMAO) sem mutat rendeződést.

6.2.2 Immunoglobulin 27

Az infravörös spektrum alapján a titin I27 szerkezete főleg béta lemezeket tartalmaz, ami egybecseng az eddigi irodalmi adatokkal és a homológia modellezés eredményével.

Nyomáskezelés hatására az I27 30 °C-on 10,5±0,3 kbar-on, 50 °C-on 0,9±0,1 kbar-on denaturálódik.

A nyomás által indukált denaturáció 95 %-ban reverzibilis, atmoszférikus nyomáson a fehérje visszatekeredik eredeti szerkezetébe.

Hőmérsékletkezelés hatására két átmenet található. A másodlagos szerkezet gyengülése és „olvadt gombóc” szerű állapot kialakulása figyelhető meg 50 °C-on. A teljes denaturáció 65 °C-on megy végbe, melyet alacsony nyomáson aggregáció kísér.

Magasabb nyomásokon (>2 kbar) a nyomás megvédi a fehérjét az aggregációtól.

A hőkezelés hatására keletkezett aggregátumot nyomáskezelésnek alávetve 85%-a disszociálódott, és 50 % az atmoszférikus nyomásra történő visszatérés után is disszociált formában maradt.

Az előzőekben leírt eredmények alapján az I27 fragmentum a nyomás-hőmérséklet paraméterektől és az előzetes kezelésektől függően többféle szerkezetet vehet fel. A fázisdiagramja az általánosan előforduló natív és denaturált állapotokon kívül „olvadt gombóc” szerű és aggregált állapotokat is tartalmaz, emiatt jelentősen különbözik a Hawley-féle elliptikus fázisdiagramtól.

6.3 Rv3221c

Az Rv3221c amid I sávja két fő komponenst tartalmaz 1637 és 1652 cm^{-1} -nél, előbbi a béta szerkezetnek, utóbbi a fehérjéhez kötött biotinnak tulajdonítható. A béta szerkezet egyezik a homológia modellezések eredményeivel, azonban nem egyezik Kumar és társai CD mérési eredményeivel (65). Nyomáskezelés hatására szobahőmérsékleten a fehérje egy lépcsőben 5,3 kbar-nál denaturálódik. Nyomásciklus után a fehérje egy része visszatekeredett, másik része aggregálódott. Hőkezelés hatására az Rv3221c 64,4 °C-os átalakulási középponttal denaturálódott, majd aggregálódott. Az átalakulás irreverzibilis volt.

Különböző hőmérsékleteken és nyomásokon elvégezve a nyomás ill. hőmérséklet ciklusokat az átalakulások középpontja megváltozott, és ezekből meg tudtam határozni az Rv3221c nyomás-hőmérséklet fázisdiagramját. Az általam vizsgált fehérjék közül ez illeszkedik legjobban a Hawley-féle elliptikus fázisdiagram elméletéhez, mivel nem tartalmaz intermedier állapotokat.

7. Összefoglalás

A fehérjék rendkívül fontos biológiai funkciókat töltenek be az élő szervezetekben, amiben gyakran jelentős szerepet játszik a szerkezetük is. Munkám során fehérjék másodlagos szerkezetének stabilitását, változását vizsgáltam spektroszkópiai módszerekkel. A szokásosan alkalmazott hőkezelés mellett egy ritkán vizsgált denaturáló hatású paraméter, a nagy nyomás hatására bekövetkező szerkezetváltozásokat is tanulmányoztam molekuláris szinten. Az FTIR spektroszkópi spektroszkópia kiváló technika a fehérjék másodlagos szerkezetének meghatározására. A mérések során ezt egy nagy nyomású gyémánt cellával kombináltam, így a fehérjék másodlagos szerkezetéről a nyomáskezelés közben nyerhettem információt.

A vizsgálatokhoz a tőkehal parvalbuminját (Gad m 1), a titin izomfehérje egy rendezett és egy rendezetlen szerkezetű fragmentumát (I27 és polyE), és a *Mycobacterium tuberculosis*-ből származó Rv3221c fehérjét használtam. Meghatároztam a fehérjék nyomás-hőmérséklet fázisdiagramját, amelyben natív és denaturált állapotok mellett intermedier, valamint aggregált állapotok is jelen vannak.

A polyE fehérjét rendezetlennek találtam, és a nyomás, hőmérséklet paraméterek valamint az oldószer változtatása során is mindvégig rendezetlen maradt.

A másik három fehérje rendezett szerkezetű, denaturációs hőmérsékletük 65-75 °C, a denaturációt aggregáció kíséri. Az aggregáció mindhárom fehérjénél elkerülhető volt, amennyiben nagyobb nyomást (> 2 kbar) alkalmaztam. A parvalbumin és a titin I27 fehérjéknél a hőmérséklet hatására bekövetkező denaturáció két lépésben zajlott, mindkét fehérjénél megfigyelhető egy „olvadt gombóc” szerű állapot.

A parvalbuminnak ezen kívül nagyobb nyomáson egy részlegesen kitekeredett intermedier állapotát is megfigyeltem, valamint, hogy a különböző állapotokban különböző Ca^{2+} -kötő képességgel rendelkeznek. Nagy nyomás hatására legkönnyebben az Rv3221c denaturálódott (5,3 kbar), a titin I27 csak jelentősen magasabb nyomáson (10,5 kbar), a parvalbumint pedig szobahőmérsékleten nem is tudtam teljesen denaturálni, csak magasabb hőmérsékleten, egy intermedier állapoton keresztül.

A nyomás függvényében a fehérjék átalakulásai a paramétereket és az átalakulások jellegét tekintve kevesebb hasonlóságot mutatnak, mint a hőmérséklet függvényében. A nagy nyomásos kísérletek segítenek jobban megérteni az ezzel kapcsolatos mechanizmusokat.

8. Summary

Proteins have especially important biological functions in living organisms, and their structure has a crucial role in this. I investigated the stability and transitions of the secondary structure of proteins by spectroscopic methods. Besides the usual heat treatment I also applied high pressure, which is a rarely used method in this field.

Infrared spectroscopy is a powerful tool to determine the secondary structure of proteins especially under high pressure, where the CD spectroscopy cannot be used. I combined FTIR spectroscopy with a high pressure diamond anvil cell, thus I could obtain information about the secondary structure during the pressure treatment.

I investigated both ordered and intrinsically unordered proteins: the parvalbumin of cod (Gad m 1), an ordered and a disordered fragment from the giant muscle protein titin (I27 and polyE) and the protein Rv3221c from *Mycobacterium tuberculosis*. I determined the secondary structure as function of pressure and temperature and the midpoints of the transitions. From the transition midpoints I could determine the pressure-temperature phase diagrams of proteins which contain intermedier (molten globule-like and partially unfolded) and aggregated states besides the usually present native and denatured states.

The protein polyE is unordered at physiological conditions and it remained disordered in spite of all our efforts to induce structural changes in it by varying the temperature, the pressure and the solvent. The other three proteins have ordered structure with similar answers to heat. The denaturation temperature is between 65-75 °C; the denaturation is followed by aggregation. I could prevent all the three proteins from aggregation if I applied higher pressure (> 2 kbar). In the case of parvalbumin and titin I27 the heat denaturation has two steps; a molten globule-like phase can be observed above 50 °C.

The parvalbumin at higher pressure also contains a partially unfolded intermedier state, and it has different Ca²⁺-binding ability in the different states.

By high pressure the Rv3221c unfolded the most easily (5.3 kbar), the titin I27 unfolded at significantly higher pressure (10.5 kbar). The most stable one was the parvalbumin, I could not completely denature it by pressure at room temperature only at elevated temperature through an intermedier state.

As the function of pressure the nature of transitions of the proteins and the parameters contain less similarity than as function of temperature. Pressure unfolding studies can help to better understand the mechanisms of these transitions.

9. Irodalomjegyzék

- [1] Bridgman PW. (1914) The coagulation of albumen by pressure. *J Biol Chem*, 19:511-512.
- [2] Knorr D, Froehling A, Jaeger H, Reineke K, Schlueter O, Schoessler K. (2011) Emerging Technologies in Food Processing. *Annu Rev Food Sci T*, 2:203-235.
- [3] Aertsen A, Meersman F, Hendrickx ME, Vogel RF, Michiels CW. (2009) Biotechnology under high pressure: applications and implications. *Trends Biotechnol*, 27:434-441.
- [4] Ptitsyn OB. (1995) Molten globule and protein folding. *Adv Protein Chem*, Vol 47, 47:83-229.
- [5] Ramachandran GN, Ramakrishnan C, Sasisekharan V. (1963) Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J Mol Biol*, 7:95-99.
- [6] Barth A. (2007) Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1767:1073-1101.
- [7] Krimm S, Bandekar J. (1986) Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins. *Adv Protein Chem*, 38:181-364.
- [8] Byler DM, Susi H. (1986) Examination of the Secondary Structure of Proteins by Deconvolved Ftir Spectra. *Biopolymers*, 25:469-487.
- [9] Ismail AA, Mantsch HH, Wong PTT. (1992) Aggregation of Chymotrypsinogen - Portrait by Infrared-Spectroscopy. *Biochim Biophys Acta*, 1121:183-188.
- [10] Haris PI, Chapman D. (1988) Fourier-Transform Infrared-Spectra of the Polypeptide Alamethicin and a Possible Structural Similarity with Bacteriorhodopsin. *Biochim Biophys Acta*, 943:375-380.
- [11] Susi H, Byler DM. (1986) Resolution-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy of enzymes. *Methods Enzymol*, 130:290-311.
- [12] Smeller L, Meersman F, Heremans K. (2006) Refolding studies using pressure: The folding landscape of lysozyme in the pressure-temperature plane. *Biochim Biophys Acta*, 1764:497-505.
- [13] Smeller L, Goossens K, Heremans K. (1995) Determination of the secondary structure of proteins at high pressure. *Vib Spectrosc*, 8:199-203.

- [14] Smeller L, Meersman F, Fidy J, Heremans K. (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*, 42:553-561.
- [15] Eisenberg DS, Kauzmann W. The structure and properties of water. New York,: Oxford University Press; 1969.
- [16] Kaposi AD, Wright WW, Fidy J, Stavrov SS, Vanderkooi JM, Rasnik I. (2001) Carbonmonoxy horseradish peroxidase as a function of pH and substrate: Influence of local electric fields on the optical and infrared spectra. *Biochemistry*, 40:3483-3491.
- [17] Nara M, Tanokura M. (2008) Infrared spectroscopic study of the metal-coordination structures of calcium-binding proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, 369:225-239.
- [18] Lakowicz JR. Principles of fluorescence spectroscopy. Springer, New York, 2006:529-538.
- [19] Heremans K, Smeller L. (1998) Protein structure and dynamics at high pressure. *Biochim Biophys Acta*, 1386:353-370.
- [20] Winter R. (2001) Effects of hydrostatic pressure on lipid and surfactant phases. *Curr Opin Colloid In*, 6:303-312.
- [21] Merzel F, Smith JC. (2002) Is the first hydration shell of lysozyme of higher density than bulk water? *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99:5378-5383.
- [22] Smith JC, Merzel F, Verma CS, Fischer S. (2002) Protein hydration water: Structure and thermodynamics. *J Mol Liq*, 101:27-33.
- [23] Schay G, Smeller L, Tsuneshige A, Yonetani T, Fidy J. (2006) Allosteric effectors influence the tetramer stability of both R- and T-states of hemoglobin A. *J Biol Chem*, 281:25972-25983.
- [24] Smeller L, Rubens P, Heremans K. (1999) Pressure effect on the temperature-induced unfolding and tendency to aggregate of myoglobin. *Biochemistry*, 38:3816-3820.
- [25] Roche J, Caro JA, Norberto DR, Barthe P, Roumestand C, Schlessman JL, Garcia AE, Garcia-Moreno B, Royer CA. (2012) Cavities determine the pressure unfolding of proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109:6945-6950.
- [26] Heremans K. (2005) Protein dynamics: hydration and cavities. *Braz J Med Biol Res*, 38:1157-1165.

- [27] Royer CA. (2002) Revisiting volume changes in pressure-induced protein unfolding. *Biochim Biophys Acta*, 1595:201-209.
- [28] Privalov PL. (1990) Cold Denaturation of Proteins. *Crit Rev Biochem Mol*, 25:281-305.
- [29] Hawley SA. (1971) Reversible pressure--temperature denaturation of chymotrypsinogen. *Biochemistry*, 10:2436-2442.
- [30] Oneil C, Helbling AA, Lehrer SB. (1993) Allergic Reactions to Fish. *Clin Rev Allergy*, 11:183-200.
- [31] Sicherer SH. (2011) Epidemiology of food allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 127:594-602.
- [32] Pascual CY, Reche M, Fiandor A, Valbuena T, Cuevas T, Esteban MM. (2008) Fish allergy in childhood. *Pediatr Allergy Immunol*, 19:573-579.
- [33] P. F. Future prospects for fish and fishery products. Fish consumption in the European Union in 2015 and 2030: In: *FAO Fisheries Circular*. Rome: FAO;; 2007.
- [34] Ma Y, Griesmeier U, Susani M, Radauer C, Briza P, Erler A, Bublin M, Alessandri S, Himly M, Vazquez-Cortes S, de Arellano IRR, Vassilopoulou E, Saxoni-Papageorgiou P, Knulst AC, Fernandez-Rivas M, Hoffmann-Sommergruber K, Breiteneder H. (2008) Comparison of natural and recombinant forms of the major fish allergen parvalbumin from cod and carp. *Mol. Nutr. Food Res.*, 52:S196-S207.
- [35] Griesmeier U, Bublin M, Radauer C, Vazquez-Cortes S, Ma Y, Fernandez-Rivas M, Breiteneder H. (2010) Physicochemical properties and thermal stability of Lep w 1, the major allergen of whiff. *Mol. Nutr. Food Res.*, 54:861-869.
- [36] Bernhiselbroadbent J, Scanlon SM, Sampson HA. (1992) Fish Hypersensitivity 1. In vitro and Oral Challenge Results in Fish-Allergic Patients. *J Allergy Clin Immunol*, 89:730-737.
- [37] Kretsinger RH, Nockolds CE. (1973) Carp muscle calcium-binding protein. II. Structure determination and general description. *The J Biol Chem*, 248:3313-3326.
- [38] Skelton NJ, Kordel J, Akke M, Forsen S, Chazin WJ. (1994) Signal-Transduction Versus Buffering Activity in Ca²⁺-Binding Proteins. *Nat Struct Biol*, 1:239-245.
- [39] Kranz JK, Flynn PF, Fuentes EJ, Wand AJ. (2002) Dissection of the pathway of molecular recognition by calmodulin. *Biochemistry*, 41:2599-2608.

- [40] Das Dores S, Chopin C, Villaume C, Fleurence J, Gueant JL. (2002) A new oligomeric parvalbumin allergen of Atlantic cod (Gad mI) encoded by a gene distinct from that of Gad cI. *Allergy*, 57:79-83.
- [41] Furst DO, Osborn M, Nave R, Weber K. (1988) The Organization of Titin Filaments in the Half-Sarcomere Revealed by Monoclonal-Antibodies in Immunoelectron Microscopy - a Map of 10 Nonrepetitive Epitopes Starting at the Z-Line Extends Close to the M-Line. *J Cell Biol*, 106:1563-1572.
- [42] Horowitz R, Kempner ES, Bisher ME, Podolsky RJ. (1986) A physiological role for titin and nebulin in skeletal muscle. *Nature*, 322:160-164.
- [43] Wang K, McCarter R, Wright J, Beverly J, Ramirez-Mitchell R. (1991) Regulation of skeletal muscle stiffness and elasticity by titin isoforms: A test of the segmental extension model of resting tension. *P Natl Acad Sci USA*, 88:7101-7105.
- [44] Trinick J. (1994) Titin and nebulin: Protein rulers in muscle? *Trends Biochem Sci*, 19:405-409.
- [45] Mayans O, Van Der Ven PFM, Wilm M, Mues A, Young P, Fürst DO, Wilmanns M, Gautel M. (1998) Structural basis for activation of the titin kinase domain during myofibrillogenesis. *Nature*, 395:863-869.
- [46] Lange S, Xiang F, Yakovenko A, Vihola A, Hackman P, Rostkova E, Kristensen J, Brandmeier B, Franzen G, Hedberg B, Gunnarsson LG, Hughes SM, Marchand S, Sejersen T, Richard I, Edström L, Ehler E, Udd B, Gautel M. (2005) Cell biology: The kinase domain of titin controls muscle gene expression and protein turnover. *Science*, 308:1599-1603.
- [47] Machado C, Andrew DJ. (2000) Titin as a chromosomal protein. *Adv Exp Med Biol*, 481:221-236.
- [48] Labeit S, Barlow DP, Gautel M, Gibson T, Holt J, Hsieh CL, Francke U, Leonard K, Wardale J, Whiting A, Trinick J. (1990) A regular pattern of two types of 100-residue motif in the sequence of titin. *Nature*, 345:273-276.
- [49] Labeit S, Kolmerer B. (1995) Titins - Giant Proteins in Charge of Muscle Ultrastructure and Elasticity. *Science*, 270:293-296.
- [50] Improta S, Politou AS, Pastore A. (1996) Immunoglobulin-like modules from titin I-band: Extensible components of muscle elasticity. *Structure*, 4:323-337.

- [51] Wang K, Gutierrez-Cruz G, Van Heerden AH. (2001) Modular motif, structural folds and affinity profiles of the PEVK segment of human fetal skeletal muscle titin. *J Biol Chem*, 276:7442-7449.
- [52] Ma K, Kan LS, Wang K. (2001) Polyproline II helix is a key structural motif of the elastic PEVK segment of titin. *Biophys J*, 80:269a-269a.
- [53] Greaser M. (2001) Identification of new repeating motifs in titin. *Proteins*, 43:145-149.
- [54] Trombitas K, Greaser M, Labeit S, Jin JP, Kellermayer M, Helmes M, Granzier H. (1998) Titin extensibility in situ: Entropic elasticity of permanently folded and permanently unfolded molecular segments. *J Cell Biol*, 140:853-859.
- [55] Linke WA, Ivemeyer M, Mundel P, Stockmeier MR, Kolmerer B. (1998) Nature of PEVK-titin elasticity in skeletal muscle. *P Natl Acad Sci USA*, 95:8052-8057.
- [56] Kellermayer MS, Smith SB, Granzier HL, Bustamante C. (1997) Folding-unfolding transitions in single titin molecules characterized with laser tweezers. *Science*, 276:1112-1116.
- [57] Rief M, Gautel M, Oesterhelt F, Fernandez JM, Gaub HE. (1997) Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM. *Science*, 276:1109-1112.
- [58] Tskhovrebova L, Trinick J, Sleep JA, Simmons RM. (1997) Elasticity and unfolding of single molecules of the giant muscle protein titin. *Nature*, 387:308-312.
- [59] Linke WA, Stockmeier MR, Ivemeyer M, Hosser H, Mundel P. (1998) Characterizing titin's I-band Ig domain region as an entropic spring. *J Cell Sci*, 111 (Pt 11):1567-1574.
- [60] Kellermayer MS, Smith SB, Bustamante C, Granzier HL. (2001) Mechanical fatigue in repetitively stretched single molecules of titin. *Biophys J*, 80:852-863.
- [61] World HO. Global tuberculosis report. WHO Press, Geneva, 2012:3-5.
- [62] Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG. (1998)

Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, 393:537-544.

[63] Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, Honore N, Garnier T, Churcher C, Harris D, Mungall K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies RM, Devlin K, Duthoy S, Feltwell T, Fraser A, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Lacroix C, Maclean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Quail MA, Rajandream MA, Rutherford KM, Rutter S, Seeger K, Simon S, Simmonds M, Skelton J, Squares R, Squares S, Stevens K, Taylor K, Whitehead S, Woodward JR, Barrell BG. (2001) Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature*, 409:1007-1011.

[64] Skjot RLV, Oettinger T, Rosenkrands I, Ravn P, Brock I, Jacobsen S, Andersen P. (2000) Comparative evaluation of low-molecular-mass proteins from *Mycobacterium tuberculosis* identifies members of the ESAT-6 family as immunodominant T-cell antigens. *Infect Immun*, 68:214-220.

[65] Kumar N, Shukla S, Kumar S, Suryawanshi A, Chaudhry U, Ramachandran S, Maiti S. (2008) Intrinsically disordered protein from a pathogenic mesophile *Mycobacterium tuberculosis* adopts structured conformation at high temperature. *Proteins*, 71:1123-1133.

[66] Wong PTT, Moffat DJ. (1989) A new internal pressure calibrant for high-pressure infrared spectroscopy of aqueous systems. *Appl Spectrosc*, 43:1279-1281.

[67] Glasoe PF. (1979) Citation Classic - Use of Glass Electrodes to Measure Acidities in Deuterium-Oxide. *Cc/Phys Chem Earth*:12-12.

[68] Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. (2006) The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, 22:195-201.

[69] Schwede T, Kopp J, Guex N, Peitsch MC. (2003) SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res*, 31:3381-3385.

[70] Guex N, Peitsch MC. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, 18:2714-2723.

[71] Somkuti J, Houska M, Smeller L. (2011) Pressure and temperature stability of the main apple allergen Mal d1. *Eur Biophys J*, 40:143-151.

[72] Smeller L, Goossens K, Heremans K. (1995) How to minimize certain artifacts in Fourier self-deconvolution. *Appl Spectrosc*, 49:1538-1542.

- [73] Susi H, Byler DM. (1986) Resolution-Enhanced Fourier-Transform Infrared-Spectroscopy of Enzymes. *Methods Enzymol*, 130:290-311.
- [74] Permyakoy SE, Bakunts AG, Denesyuk AI, Knyazeva EL, Uversky VN, Permyakov EA. (2008) Apo-parvalbumin as an intrinsically disordered protein. *Proteins*, 72:822-836.
- [75] Foguel D, Suarez MC, Barbosa C, Rodrigues JJ, Sorenson MM, Smillie LB, Silva JL. (1996) Mimicry of the calcium-induced conformational state of troponin C by low temperature under pressure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 93:10642-10646.
- [76] Rocha CB, Suarez MC, Yu A, Ballard L, Sorenson MM, Foguel D, Silva JL. (2008) Volume and free energy of folding for troponin CC-domain: Linkage to ion binding and N-domain interaction. *Biochemistry*, 47:5047-5058.
- [77] Suarez MC, Rocha CB, Sorenson MM, Silva JL, Foguel D. (2008) Free-Energy Linkage between Folding and Calcium Binding in EF-Hand Proteins. *Biophys J*, 95:4820-4828.
- [78] Ismail AA, Mantsch HH, Wong PTT. (1992) Aggregation of chymotrypsinogen - Portrait by infrared-spectroscopy. *Biochim Biophys Acta*, 1121:183-188.
- [79] Meersman F, Smeller L, Heremans K. (2002) Comparative Fourier transform infrared spectroscopy study of cold-, pressure-, and heat-induced unfolding and aggregation of myoglobin. *Biophys J*, 82:2635-2644.
- [80] Floriano WB, Nascimento MAC, Domont GB, Goddard WA. (1998) Effects of pressure on the structure of metmyoglobin: Molecular dynamics predictions for pressure unfolding through a molten globule intermediate. *Protein Sci*, 7:2301-2313.
- [81] Nara M, Torii H, Tasumi M. (1996) Correlation between the vibrational frequencies of the carboxylate group and the types of its coordination to a metal ion: An ab initio molecular orbital study. *J Phys Chem*, 100:19812-19817.
- [82] Dzwolak W, Kato M, Shimizu A, Taniguchi Y. (1999) Fourier-transform infrared spectroscopy study of the pressure-induced changes in the structure of the bovine alpha-lactalbumin: the stabilizing role of the calcium ion. *Biochim Biophys Acta*, 1433:45-55.
- [83] Swoboda I, Bugajska-Schretter A, Verdino P, Keller W, Sperr WR, Valent P, Valenta R, Spitzauer S. (2002) Recombinant carp parvalbumin, the major cross-reactive fish allergen: A tool for diagnosis and therapy of fish allergy. *J Immunol*, 168:4576-4584.

- [84] Huber T, Grama L, Hetenyi C, Schay G, Fulop L, Penke B, Kellermayer MS. (2012) Conformational Dynamics of Titin PEVK Explored with FRET Spectroscopy. *Biophys J*, 103:1480-1489.
- [85] Ma K, Wang K. (2003) Malleable conformation of the elastic PEVK segment of titin: non-co-operative interconversion of polyproline II helix, beta-turn and unordered structures. *Biochem J*, 374:687-695.
- [86] Barth A, Zscherp C. (2002) What vibrations tell us about proteins. *Q Rev Biophys*, 35:369-430.
- [87] Goormaghtigh E, Ruyschaert JM, Raussens V. (2006) Evaluation of the information content in infrared spectra for protein secondary structure determination. *Biophys J*, 90:2946-2957.
- [88] Ruegg M, Metzger V, Susi H. (1975) Computer Analyses of Characteristic Infrared Bands of Globular Proteins. *Biopolymers*, 14:1465-1471.
- [89] Susi H, Byler DM. (1986) Resolution-Enhanced Fourier-Transform Infrared-Spectroscopy of Enzymes. *Methods Enzymol*, 130:290-311.
- [90] Nara M, Tanokura M. (2008) Infrared spectroscopic study of the metal-coordination structures of calcium-binding proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, 369:225-239.
- [91] Zakin MR, Herschbach DR. (1986) Vibrational Frequency-Shifts Induced by Molecular Compression of Pyridine in Solution. *J Chem Phys*, 85:2376-2383.
- [92] Ravindra R, Royer C, Winter R. (2004) Pressure perturbation calorimetric studies of the solvation properties and the thermal unfolding of staphylococcal nuclease. *Phys Chem Chem Phys*, 6:1952-1961.
- [93] Herberhold H, Royer CA, Winter R. (2004) Effects of chaotropic and kosmotropic cosolvents on the pressure-induced unfolding and denaturation of proteins: An FT-IR study on staphylococcal nuclease. *Biochemistry*, 43:3336-3345.
- [94] Krywka C, Sternemann C, Paulus M, Tolan M, Royer C, Winter R. (2008) Effect of Osmolytes on Pressure-induced Unfolding of Proteins: A High-Pressure SAXS Study. *Chemphyschem*, 9:2809-2815.
- [95] Silva JL, Cordeiro Y, Foguel D. (2006) Protein folding and aggregation: Two sides of the same coin in the condensation of proteins revealed by pressure studies. *Biochim Biophys Acta*, 1764:443-451.

- [96] Dirix C, Meersman F, MacPhee CE, Dobson CM, Heremans K. (2005) High hydrostatic pressure dissociates early aggregates of TTR105-115, but not the mature amyloid fibrils. *J Mol Biol*, 347:903-909.
- [97] Fink AL. (1998) Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Fold Des*, 3:R9-R23.
- [98] Zurdo J, Guijarro JI, Jimenez JL, Saibil HR, Dobson CM. (2001) Dependence on solution conditions of aggregation and amyloid formation by an SH3 domain. *J Mol Biol*, 311:325-340.
- [99] Swamy MJ, Heimburg T, Marsh D. (1996) Fourier-transform infrared spectroscopic studies on avidin secondary structure and complexation with biotin and biotin-lipid assemblies. *Biophys J*, 71:840-847.
- [100] Zsila F. (2009) Novel circular dichroism spectroscopic approach for detection of ligand binding of proteins: Avidin as example. *Anal Biochem*, 391:154-156.
- [101] Smeller L, Meersman F, Tolgyesi F, Bode C, Fidy J, Heremans K. (2002) From aggregation to chaperoning: Pressure effect on intermolecular interactions of proteins. *High Press Res*, 22:751-756.

10. Saját publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó publikációk:

1. Somkuti J, Bublin M, Breiteneder H, Smeller L. (2012) Pressure-temperature stability, Ca²⁺ binding, and pressure-temperature phase diagram of cod parvalbumin: Gad m 1. *Biochemistry*, 51:5903-5911.
2. Somkuti J, Martonfalvi Z, Kellermayer MS, Smeller L. (2013) Different pressure-temperature behavior of the structured and unstructured regions of titin. *Biochim Biophys Acta*, 1834:112-118.
3. Somkuti J, Jain S, Ramachandran S, Smeller L. (2013) Folding-unfolding transitions of Rv3221c on the pressure-temperature plane. *High Press Res*, 33:250-257.

A disszertációhoz nem kapcsolódó publikációk:

1. Somkuti J, Houska M, Smeller L. (2011) Pressure and temperature stability of the main apple allergen Mal d1. *Eur Biophys J*, 40:143-151.
2. Somkuti J, Smeller L. (2013) High pressure effects on allergen food proteins. *Biophys Chem*, 183:19-29.

11. Köszönetnyilvánítás

Ezúton is szeretnék köszönetet mondani:

- Dr. Smeller Lászlónak, témavezetőmnek, a munkám során nyújtott mérhetetlen segítségéért.
- Dr. Kellermayer Miklósnak, a Semmelweis Egyetem, Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet vezetőjének, az intézetben biztosított munkalehetőségért és tudományos munkám támogatásáért.
- Dr. Osváth Szabolcsnak és Dr. Herényi Leventének, hogy elolvasták a dolgozatomat és értékes megjegyzéseket fűztek hozzá.
- a Semmelweis Egyetem, Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet minden munkatársának, aki a munkám során támogatott és segített.