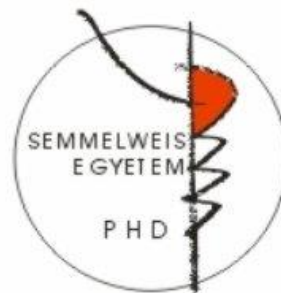


Fehérjék nyomás által indukált szerkezetváltozásainak jellemzése infravörös és fluoreszcencia spektroszkópiai módszerekkel

Doktori tézisek

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

1. 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 fiziológias 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. 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. 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.

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

2. Célkitűzések

2.1. 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**

2.2. 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, amelyről 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 szokásostól eltérő nyomás-hőmérséklet értékek mellett található rendezett állapotban. Különböző paraméterek változtatásával tanulmányoztam a polyE fehérje stabilitását.

Céлом 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.

A *Mycobacterium tuberculosis*ban található **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.

3. Módszerek

A titin fehérje fragmentumait rekombináns fehérje expresszióval állítottam elő *Rosetta* sejtben, majd Ni^{2+} -affinitás és ioncserélő oszlopokon kromatográfiásan tisztítottam. A másik két fehérje liofilizált formában állt rendelkezésemre.

A fehérjék szerkezetének vizsgálatához nagy nyomással kombinált infravörös spektroszkópiát valamint a fehérjék triptofánjainak saját fluoreszcenciáját használtam.

Az infravörös spektroszkópiai mérésekhez egy sugárfókuszálóval (Bruker A525) rendelkező Bruker Vertex80v (Bruker Optics, Billerica, MA) FTIR spektrométert. A jel/zaj viszonyt 256 spektrum átlagolásával javítottam. A spektrumok felbontása 2 cm^{-1} . Az FTIR spektroszkópiát egy nagy nyomású gyémánt cellával (Diacell, Leicestershire, UK) kombináltam, így a fehérjék másodlagos szerkezetéről a nyomáskezelés közben

nyerhettem információt. A mintát a két gyémánt közé helyezett lyukas acéllemezbe töltöttem, a nyomást belső kalibráns, BaSO₄ segítségével mértem.

A fűtést 0,2 °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 fehérjéket közvetlenül a mérés előtt 75 mg/ml-es koncentrációban oldottam fel. Az infravörös spektroszkópiai méréseknél mindig nehézvizet (D₂O) használtam könnyű víz (H₂O) helyett, mert a könnyű víznek viszonylag nagy abszorpciós csúcsa van 1645 cm⁻¹-nél, ami átfed a fehérjék amid I csúcsával.

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

A fluoreszcencia spektrumok felvételéhez egy házi gyártmányú hőmérsékletszabályzóval ellátott Fluorolog-3 (Horiba Jobin Yvon) spektrométert használtam. A fehérjék koncentrációja az infravörös méréshez képest 50-szer alacsonyabb volt (1,5 mg/ml) Az optikai úthossz 3 mm volt. 290 nm-es gerjesztési hullámhosszat alkalmazva az emissziót 300-540 nm-ig detektáltam, 2 nm-es felbontással. A fluoreszcencia méréseket atmoszférikus nyomáson a hőmérséklet függvényében végeztem.

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:

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

a nyomás által indukált átmenetekre, és

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

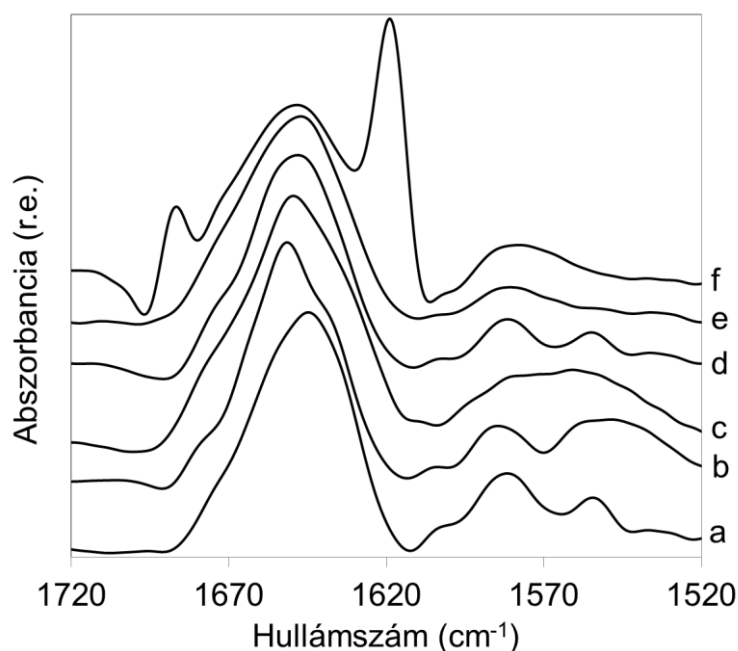
a hőmérséklet által indukáltakra.

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.

A homológia modellezést a Swissmodel Protein Modeling Serverrel végeztem (<http://swissmodel.expasy.org>).

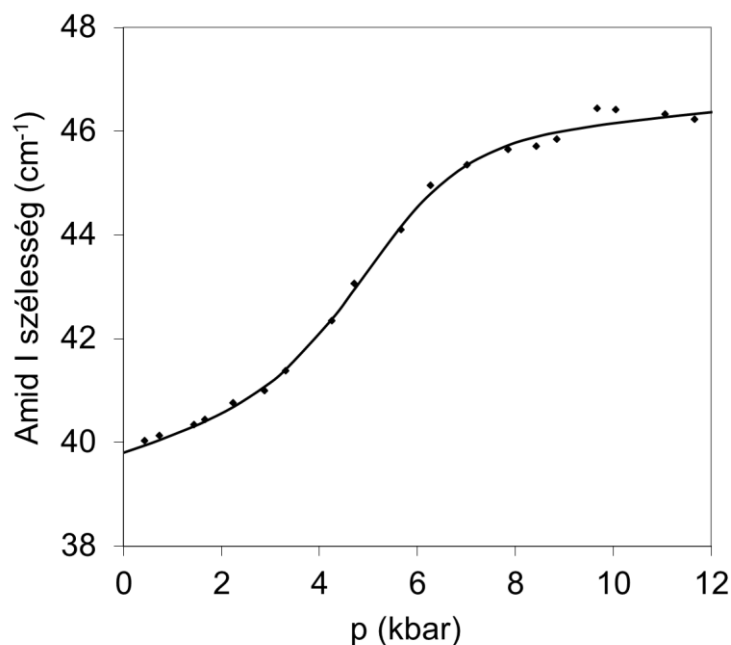
4. Eredmények

Az egyes fehérjék spektrumát különböző nyomás-hőmérséklet értékeken mérve a fehérjéket különböző szerkezeti fázisokban találtam. A Gad m 1 fehérje különböző fázisaira jellemző spektrumokat az 1. ábra mutatja.

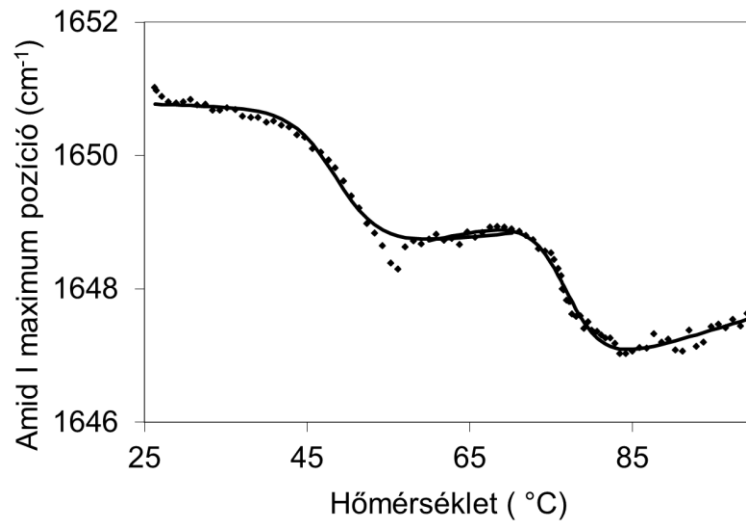


1. ábra A Gad m 1 jellegzetes dekonvolvált FTIR spektrumai: a) hozzáadott Ca²⁺ nélkül, 28 °C-on, atmoszférikus nyomáson (Ca²⁺ hiányos állapot), b) 0,2 M CaCl₂-dal, 28 °C-on, atmoszférikus nyomáson (natív), c) 28 °C-on, 8,9 kbar-on (részlegesen kitekeredett), d) 60 °C-on, atmoszférikus nyomáson („olvadt gombóc” szerű), e) 80 °C on, 2 kbar-on (denaturált), f) 90 °C-on, atmoszférikus nyomáson (aggregált).

Az egyes fázisok közötti átmenetek vizsgálatához a spektrumok jellegzetes paramétereit (pl. amid I csúcs maximum pozíciója, amid I csúcs szélessége, csúcok alatti terület) ábrázoltam a nyomás (2. ábra), illetve a hőmérséklet (3. ábra) függvényében. Ezekből illesztéssel meghatároztam a fázisátalakulásokhoz tartozó középpontokat. Különböző állandó nyomásokon végeztem hőmérséklettől függő kísérlet sorozatokat és különböző állandó hőmérsékleten nyomástól függő kísérlet sorozatokat. A bemutatottakhoz hasonlóan megillesztettem az átalakulások középpontjait és ezekből megszerkesztettem a fehérjék nyomás-hőmérséklet fázisdiagramját.

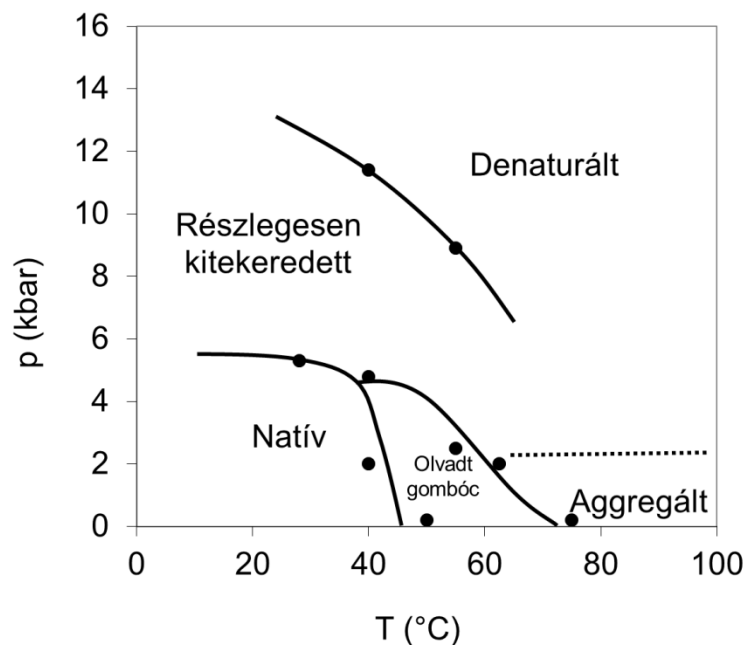


2. ábra A Gad m 1 nyomásindukált átalakulása, az amid I sáv szélessége a nyomás függvényében, szobahőmérsékleten.

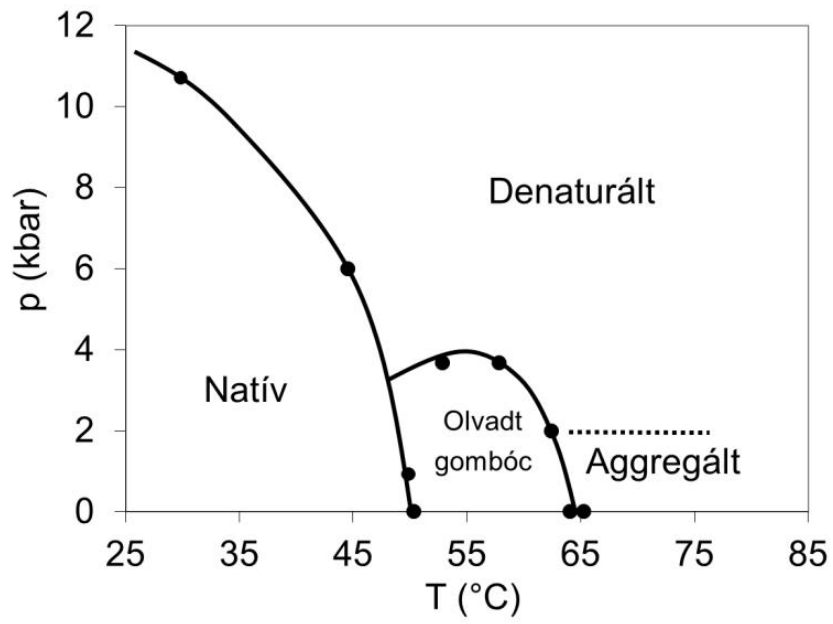


3. ábra A Gad m 1 hődenaturációja, az amid I sáv maximum pozíciója a hőmérséklet függvényében, atmoszférikus nyomáson

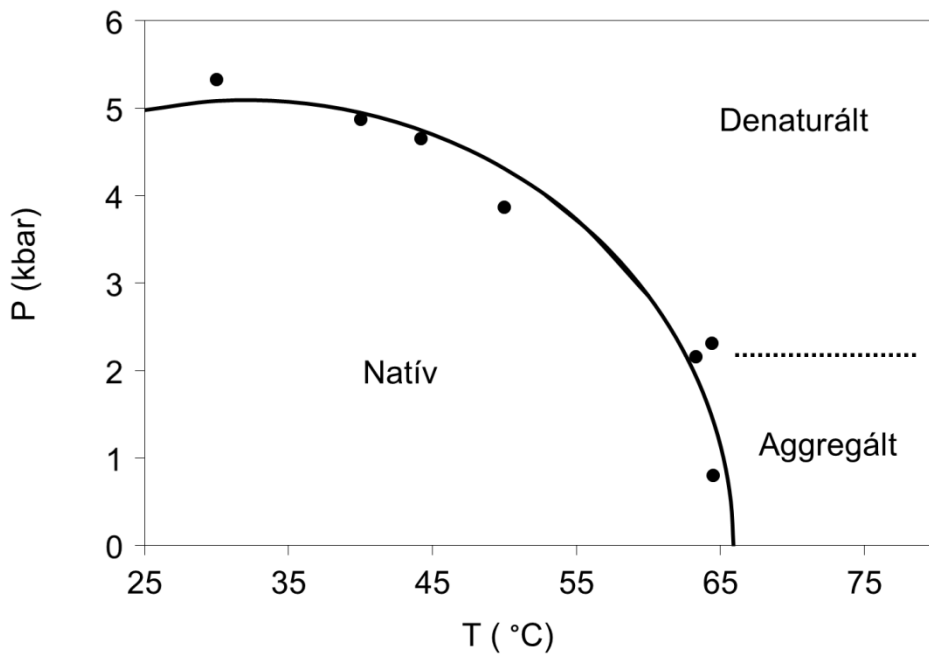
A különböző nyomás-hőmérséklet értékeken felvett spektrumokat elemezve a Gad m 1 parvalbumin, a titin Immunoglobulin 27 és az Rv3221c fehérjékre a következő ábrákon bemutatott nyomás-hőmérséklet fázisdiagramokat kaptam (4-6. ábra). A titin polyE fragmentuma minden vizsgált nyomás-hőmérséklet érték mellett rendezetlen volt.



4. ábra A Gad m 1 parvalbumin nyomás-hőmérséklet fázisdiagramja



5. ábra A titin Immunoglobulin 27 nyomás-hőmérséklet fázisdiagramja



6. ábra A *Mycobacterium tuberculosis*-ből származó Rv3221c nyomás-hőmérséklet fázisdiagramja

5. Következtetések

5.1. 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 hőmérséklet növelésének hatására bekövetkező denaturáció irreverzibilisnek, a nyomás hatására bekövetkező átalakulások reverzibilisnek bizonyultak.
- Meghatároztam a Gad m 1 fehérje nyomás-hőmérséklet fázisdiagramját (4. ábra), 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.

5.2. Titin

5.2.1. PolyE

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

5.2.2. Immunoglobulin 27

Az infravörös spektrum alapján a titin Immunoglobulin 27 szerkezete főleg béta lemezeket tartalmaz, ami egybeesik az eddigi irodalmi adatokkal és a homológia modellezés eredményével.

- Nyomáskezelés hatására az Immunoglobulin 27 30 °C-on 10,5 kbar-on, 50 °C-on 0,9 kbar-on denaturálódik.
- A nyomás által indukált denaturáció 95 %-ban reverzibilis, atmoszférikus nyomáson a fehérje visszatekerekedik 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 Immunoglobulin 27 fragmentum a nyomás-hőmérséklet paraméterektől és az előzetes kezelésektől függően többféle szerkezetet vehet fel. A fázisdiagramja (5. ábra) az általánosan előforduló natív és denaturált állapotokon kívül „olvadt gombóc” szerű és aggregált állapotokat is tartalmaz, emiatt jelentősen különbözik a Hawley-féle elliptikus fázisdiagramtól.

5.3. 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.

- 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 (6. ábra). Az általam vizsgált fehérjék közül ez illeszkedik legjobban a Hawley-féle elliptikus fázisdiagram elméletéhez, mivel nem tartalmaz intermedier állapotokat.

6. 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 szorosan 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.