

A foszfoglicerátkináz szerkezetváltozásainak vizsgálata folding és amiloidképződés során

Doktori értekezés

Agócs Gergely

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Osváth Szabolcs egyetemi adjunktus, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Kardon Tamás egyetemi adjunktus, Ph.D.
Dr. Grama László egyetemi adjunktus, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Ligeti Erzsébet egyetemi tanár, D.Sc.
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Geiszt Miklós egyetemi docens, Ph.D.
Dr. Nagy László egyetemi docens, Ph.D.

Budapest, 2012

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	1
Rövidítések jegyzéke	3
1. Bevezetés	5
1.1. <i>A fehérjék szerkezete</i>	5
1.1.1. Előzmények.....	5
1.1.2. A fehérjék szerkezeti hierarchiája.....	6
1.1.3. A fehérjék szerkezeti állapotai.....	8
1.2. <i>A fehérjék általános szerkezeti kinetikája</i>	11
1.2.1. A natív szerkezet kialakulásának kinetikája.....	11
1.2.2. A misfolding és amiloidképződés kinetikája	15
1.2. <i>Fehérjeszerkezet-kutatási méréstechnikák</i>	18
1.2.1. A fehérjék természetes fluoreszcenciája	18
1.2.2. A tioflavin-T fluoreszcenciaváltozása	22
1.2.3. A kongóvörös festék kettőtörése	23
1.2.4. Dinamikus fényszórás	24
1.2.5. Átalakulási hőmérséklet.....	24
1.3. <i>Fehérjekifejezési technikák</i>	25
1.4. <i>Az élesztőfosfoglicerátkináz mint a fehérjekinetikai vizsgálatok modellje</i>	26
1.4.1. Az élesztő PGK foldingja	28
1.4.2. Az élesztő PGK amiloidképzése.....	29
2. Célkitűzések	32
3. Anyagok és módszerek	34
3.1. <i>Anyagok</i>	34
3.1.1. Fehérjekifejezés során használt anyagok	34
3.1.2. Fehérjetisztítás során használt anyagok	35
3.1.3. Aktivitásméréshez használt anyagok	35
3.1.4. Energiafelszín-méréseknél felhasznált anyagok	36
3.2. <i>Módszerek</i>	37
3.2.1. Fehérjekifejezés	37
3.2.2. Fehérjetisztítás	37
3.2.3. Spektrofotometriás koncentrációmeghatározás	40
3.2.4. Doménkölcsonhatások kinetikai vizsgálata.....	41
3.2.5. Aktivitásmérés.....	41
3.2.6. Fényszórásmérés.....	45
3.2.7. Cirkuláris dikroizmus mérése.....	45
3.2.8. Tioflavin-T fluoreszcenciaváltozásának mérése.....	45
3.2.9. Átalakulási hőmérséklet meghatározása	46
3.2.10. A pH konformációs energiafelszínre gyakorolt hatásának vizsgálata	46
3.2.11. Elektronmikroszkópia	48
4. Eredmények	49
4.1. <i>Doménkölcsonhatások befolyása az amiloidképződésre</i>	49
4.2. <i>Natív szerkezet helyreállítása amiloidból</i>	59
4.2.1. Az amiloid kialakulása.....	59
4.2.2. A natív szerkezet helyreállítása	62
4.3. <i>A pH hatása a konformációs energiafelszínre</i>	64
4.3.1. Triptofánfluoreszcencia-változás a korai folyamatok során	64
4.3.2. A triptofánfluoreszcencia megváltozása a kései folyamatokban.....	75

4.3.3. ThT-fluoreszcencia változása a kései folyamatokban	77
5. Megbeszélés	80
5.1. A doménkölsönhatások amiloidképződésre gyakorolt hatása.....	80
5.2. Aktív PGK helyreállíthatósága amiloidból.....	82
5.3. A PGK energiafelszíneinek vizsgálata	84
6. Következtetések	90
7. Összefoglalás.....	93
8. Summary	94
9. Irodalomjegyzék.....	95
10. Saját publikációk jegyzéke	104

Rövidítések jegyzéke

Rövidítés	Feloldás angolul	Feloldás magyarul
2×YT	<i>double yeast extract and tryptone broth</i>	kétszeres élesztőkivonat és tripton (tápoldat)
3-PG	<i>3-phosphoglycerate</i>	3-foszfoglicerát (PGK-szubsztrát)
ATP	<i>adenosine-5'-triphosphate</i>	adenozin-5'-trifoszfát (a PGK szubsztrátja)
β-ME	<i>β-mercaptoethanol</i>	β-merkaptóetanol (redukálószer)
BL21	<i>a λ-phage sensitive E. coli strain</i>	egyfajta λ-fágérzékeny <i>E. coli</i> törzs
CD	<i>circular dichroism</i>	cirkuláris dikroizmus
C_p	<i>isobaric heat capacity</i>	hőkapacitás állandó nyomáson
CR	<i>Congo red</i>	kongóvörös (festék)
DE3	<i>a λ prophage carrying the T7 RNA polymerase gene</i>	egy λ profág, mely a T7 fág RNS-polimerázának génjét hordozza
DLS	<i>dynamic light scattering</i>	dinamikus fényszórás
DSC	<i>differential scanning calorimetry</i>	differenciál pásztázó kalorimetria
DTT	<i>dithiothreitol</i>	ditio-treitol (redukálószer)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> Castellani et Chalmers	
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetate</i>	etilén-diamin-tetraacetát (kelátképző)
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>	gyors fehérje-folyadékkromatográfia
GAPDH	<i>d-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	D-gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (segédenzim)
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i>	nagynyomású folyadékkromatográfia
IPTG	<i>isopropyl β-d-1-thiogalactopyranoside</i>	izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranozid (laktózanalóg)
k_{cat}	<i>apparent unimolecular catalytic rate constant</i>	látszólagos (avagy összetett) katalitikus sebességi állandó
K_M	<i>Michaelis constant</i>	Michaelis-konstans
lacUV5	<i>a mutated version of lac promoter</i>	a lac promoter egyik mutáns változata
LB	<i>lysogeny broth</i>	lizogén tápoldat
Lon	<i>an ATP-dependent protease of E. coli</i>	<i>E. coli</i> -ban előforduló ATP-függő proteázok egyike
m	<i>critical monomer number</i>	kritikus monomerszám
mAU	<i>milli absorbance unit</i>	ezred-abszorbanciaegység
NADH	<i>reduced nicotinamide adenine dinucleotide</i>	redukált nikotinamid-adenindinukleotid (GAPDH szubsztrátja)
NATA	<i>N-acetyl-l-tryptophanamide</i>	N-acetil-l-triptofánamid (triptofánanalóg)
Ni-NTA	<i>nickel nitrilotriacetic acid</i>	nitrilo-triacetsav nikkellekomplexe (kromatográfiai állófázis)

NZY	<i>N-Z-Amine and yeast extract broth</i>	<i>N-Z-Amine</i> –élesztőkivonat-táppoldat
OmpT	<i>Escherichia coli outer membrane protein that cleaves T7 RNA polymerase</i>	<i>Escherichia coli</i> külső membránfehérjéje, amely a T7 fág RNS-polimerázát hasítja
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>	poli(akrilamid)-gélelektroforézis
pET	<i>a T7 promoter controlled plasmid</i>	egy plazmid, melynek expressziója a T7 fág promotor kontrollja alatt áll
PGK	<i>phosphoglycerate kinase</i>	foszfoglicerátkináz
RCF	<i>relative centrifugal force</i>	relatív centrifugális erő
R_h	<i>hydrodynamic radius</i>	hidrodinamikai sugár
[S]	<i>substrate concentration</i>	szubsztrátkoncentráció
t_c	<i>coagulation time constant</i>	koagulációs időállandó
ThT	<i>thioflavin T</i>	tioflavin-T (festék)
T_m	<i>thermal transition midpoint</i>	átalakulási hőmérséklet
Tris	<i>tris(hydroxymethyl)-aminomethane</i>	trometamol (pufferképző)
UV	<i>ultraviolet radiation</i>	ultraibolya sugárzás
v	<i>initial catalytic rate</i>	kezdeti katalitikus sebesség
v_{max}	<i>maximum initial catalytic rate</i>	maximális kezdeti katalitikus sebesség

1. Bevezetés

A fehérjék, idegen szóval proteinek irányított heteropolimerek, melyek a 22 proteinogén aminosav¹ peptidkötéssel történő összekapcsolásával jönnek létre; a víz után a legnagyobb számban fordulnak elő az élő szervezetben. A fehérjék rendkívül változatos szerepet betöltő biomolekulák: lehetnek az élő szervezet biokémiai reakcióinak katalizátorai, hormonok, jelátvivők, részt vehetnek az immunválasz kialakulásában, alkothatnak viszonylag passzív szerkezeti elemeket, de biomotorokként is működhetnek. Ezt a sokféle funkciót finoman hangolt kölcsönhatásokon keresztül képesek megvalósítani, amit a kémiai sokféleség és a változatos térszerkezet tesz lehetővé.

Molekuláris szinten valamennyi élettani és kórélettani folyamatban részt vesznek fehérjék, ezért a gyógyszeres terápia célpontjai is javarészt proteinek. A betegségek egy jól körülhatárolt csoportja kifejezetten a fehérjék térszerkezetében bekövetkező változásokkal hozható összefüggésbe. E változások fizikai alapjainak megismerése kulcsfontosságú lépés a hatékony oki terápiák kidolgozásának útján.

1.1. A fehérjék szerkezete

1.1.1. Előzmények

A fehérjéket elsőként *Mulder* írta le, a protein elnevezést *Berzelius* javasolta. Az aminosavak mint építőkövek felismerése *Hlasiwetz* és *Habermann* munkásságához köthető (1873), a peptidkötés leírásában *Hofmeisteré* volt a főszerep (1902). Az első fehérje, melynek sikeresen megállapították az aminosavsorrendjét, az inzulin volt (1955, *Sanger*), ezzel végleg tisztázódott, hogy a fehérjék lineáris polimerek. Nagy előrelépést jelentett a fehérjék molekuláris jellegének megismerése útján a krisztallizáció: 1926-ban *Sumner* sikeresen kristályosította az ureáz enzimet. A fehérjekristályosítás lehetővé tette a XX. század áttörő szerkezetkutatói módszerének, a röntgen-krisztallográfiának az alkalmazását a fehérje-térszerkezet feltérképezésére. Elsőként az ámbráscet mioglobinjának sikerült megállapítani a háromdimenziós struktúráját 1958-ban (*Perutz* és *Kendrew*). Később a krisztallográfia mellett a magmágnesesrezonancia-

¹ Az alapkészletet alkotó 20 aminosav mellett a speciálisan kódolt pirrolizin és szelenocisztein is ide sorolható

spektroszkópiát is sikeresen alkalmazták a fehérjekonformáció kutatására. A szerkezetmegismerés ütemét jelzi, hogy a *Protein Data Bank* 1971-es létrehozásakor mindössze hét térszerkezetet tartalmazott, 2012 novemberében több mint nyolcvanhatezret.

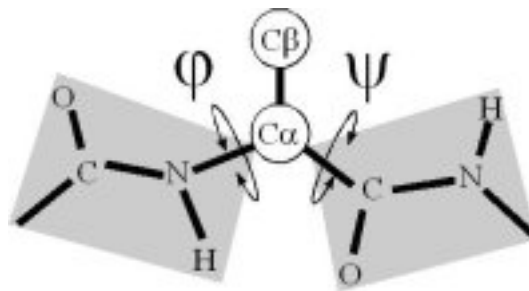
1.1.2. A fehérjék szerkezeti hierarchiája

A fehérjeszerkezet leírása során négy fokát különítjük el a rendezettségnek (Lehninger és mtsai 2008).

Az elsődleges szerkezet a fehérje tulajdonképpeni aminosavsorrendje. A fehérjemolekulák 22-féle természetesen előforduló L- α -aminosavból, az úgynevezett proteínogén aminosavakból épülnek fel. Ezek felépítésére jellemző, hogy az α -szénatomhoz kapcsolódik egy aminocsoport, egy karboxilcsoport, egy hidrogén és a 22 lehetséges oldallánc valamelyike. A fehérjelánc ezen aminosavak polikondenzációjával származtatható, az ismétlődő $[-N-C_{\alpha}-C-]$ szakasz alkotja a fehérjelánc gerincét. A fehérje irányított polimer, az elejének az N-terminálist (a szabad aminocsoportot tartalmazó véget), a végének a C-terminálist (a szabad karboxilcsoportot tartalmazó véget) tekintjük, és ennek megfelelően számozzuk az aminosavakat, illetve a fehérjeszekvencia leírásánál is ezt a sorrendet követjük. Az aminosavak között peptidkötés jön létre (innen ered a polipeptid elnevezés), amely lényegében savamidkötés. A peptidkötés a π -elektronrendszer delokalizációja miatt egyrészt rigid, vagyis a C–N-kötés rotációja gátolt, másrészt planáris, vagyis a benne résztvevő négy atom (a karbonilcsoport szén- és oxigénatomja, valamint az amidcsoport nitrogén- és hidrogénatomja) egy síkban helyezkedik el.

A másodlagos szerkezet alatt lokális, legalább négy aminosavra kiterjedő rendezettséget értünk, melyet a gerincatomok közötti hidrogénkötések stabilizálnak (Pauling és Corey 1951a; Pauling és Corey 1951b). A gerinc két egymást követő kötése egy síkot határoz meg, három egymást követő kötés pedig két síkot, melyek által bezárt szög a torziós vagy diéderszög. Ezt a szögértéket a síkok metszési egyenesére eső kötéshez rendeljük. A C–N–C $_{\alpha}$ –C torziós szög jele ϕ , a N–C $_{\alpha}$ –C–N szögé ψ , a C $_{\alpha}$ –C–N–C $_{\alpha}$ szögé ω (1. ábra). A rigid peptidkötéshez tartozó ω -szög az esetek 99,6%-ában transz állapotú (180°), igen ritkán cisz (0°). A ϕ - és ψ -szögek első közelítésben bármilyen értéket felvehetnek, a kötések körül szabad a rotáció. Akadályt közvetlenül a

prolin amidnitrogént magában foglaló gyűrűs oldallánca, közvetve az oldalláncok sztérikus vagy elektrosztatikus gátlása jelent. A másodlagos szerkezetek főbb típusai a hélixek (például 3_{10} -, α -, és π -hélix), kanyarok (β -kanyar) és redők (paralel és antiparalel β -redő), mindezek megadhatók a jellemző ϕ - és ψ -szögekkel. A fehérjeláncnak lehetnek másodlagos szerkezettel nem rendelkező, úgynevezett rendezetlen szakaszai is (Echenique 2007).



1. ábra. A peptidkötést jellemző torziós szögek.

A peptidkötésben lévő aminosav α -szénatomja és a hozzákapcsolódó nitrogén közötti kötés torziós szöge ϕ , az α - és karboxilszénatomja közötti kötésé pedig ψ . E torziós szögek értékeivel adható meg a polipeptidlánc térszerkezete. A peptidkötéshez tartozó ω szög (nincs feltüntetve) szinte mindig 180° -os.

A harmadlagos szerkezet a fehérjelánc teljes térszerkezetét jelenti. Ez az esetek többségében egy vagy néhány hasonló szerkezetet jelent, melyek stabilitása mindenekelőtt hidrofób kölcsönhatások eredménye. A fehérje természetes közege többnyire valamilyen vizes oldat, kivételt képeznek a membránba ágyazott szakaszok. A vizes közeggel érintkező hidrofób csoportok körül a víz rendezettsége és ezzel együtt a rendszer szabadentalpiája² magas. A rendszer igyekszik e csoportok elrejtésével, a fehérje belsejébe zárásával minimalizálni a szabadentalpiáját, eközben az elsődleges szerkezetet tekintve távol eső aminosav-oldalláncok kerülnek közel egymáshoz. Emellett jelentőségében csekélyebb a kovalens (diszulfidkötés) és az ionos (sóhid) kapcsolatok szerepe. Az élettani körülmények között kialakuló konformáció a natív térszerkezet, mely szolúbilis fehérjék esetében globuláris szerkezet. Sok esetben nem egyetlen gömbbe van behajtvva a fehérje, hanem több, viszonylag különálló egységbe,

² Élettani és a jelen dolgozat kísérleteinek körülményei között a folyamatok állandó nyomáson és hőmérsékleten zajlottak, amikor a rendszer energiájának megváltozása azonos a szabadentalpia megváltozásával.

melyeket doméneknek nevezünk. A fehérje funkciójának ellátásához, biológiai aktivitásához a meghatározott aminosavsorrend mellett a natív térszerkezet is szükséges (Baldwin 2007).

A több polipeptidláncból álló fehérjekomplexeknek negyedleges szerkezete is van, mely az egyes láncok (elnevezésük: alegység) térbeli elrendeződését jelenti. A fehérjekomplexek legalább két, de akár több tíz alegységből is állhatnak, melyeket elsősorban másodlagos kötések tartanak össze, és amelyek igen határozott szerkezetet vehetnek fel, mint ami például a víruskapszid esetében is megfigyelhető.

1.1.3. A fehérjék szerkezeti állapotai

Natív fehérje. Az egyszerűség kedvéért szolúbilis (tehát például nem membrán-) fehérjékre korlátozva a vizsgálódásunkat, élettani körülmények között a proteinek hidrofil felszínnel rendelkező globuláris, biológiailag aktív formában találhatók, amit natív szerkezetnek nevezünk. Valamennyi fehérje a riboszómából „kinövő” lineáris polipeptidláncként kezdi a létét, amely a szintézis során és után natív szerkezetté hajtogatódik. A natív szerkezet stabilitása fehérjénként változik, bizonyos esetekben a környezeti tényezők akár enyhe megváltoztatása is a szerkezet funkcióvesztést okozó átalakulásához vezet (Scharnagl és mtsai 2005).

Denaturált fehérje. A fehérje térszerkezetének funkcióvesztéssel járó megváltozását denaturációnak nevezzük. A denaturált fehérje még nem feltétlenül veszti el teljesen a natív szerkezetét, gyakran a natív szerkezetet részben megtartó állapotok jönnek létre. Az egyik legegyszerűbb denaturációs eljárás a hőközlés. Egyes hőtűrő baktériumok fehérjéi a víz forróján is megtartják natív szerkezetüket. A hőt kevésbé toleráló baktériumok homológ fehérjéihez képest olykor alig néhány aminosav az eltérés, de ezek az apró különbségek drasztikusan megnövelik a hőstabilitást (Szilagyi és Zavodszky 2000). A fehérjék denaturálhatók ezenkívül hűtéssel, a nyomás növelésével, a pH változtatásával, vízzel elegyedő szerves oldószerek, szerves sók, detergensok, karbamid vagy guanidínium-klorid hozzáadásával (Damaschun és mtsai 1998; Smeller 2002; Chen és mtsai 2008).

A hőmérséklet növelése a hidrogénkötéseket és az apoláris kölcsönhatásokat felszakíthatja, mivel felerősödnek a molekularezgések. Az alkohol protondonorként az intermolekuláris hidrogénkötéseket szakítja fel. Más szerves oldószerek, karbamid és detergensok a hidrofób kölcsönhatásokat gyengítik, ezáltal lecsökken a belső hidrofób

mag stabilitása. A nehézfém sók irreverzibilisen reagálnak a cisztein merkaptocsoportjával, illetve felbontják a diszulfidkötéseket. Végül a pH extrém megváltoztatása az aminosav-oldalláncok protonálásán, illetve deprotonálásán keresztül megnöveli a fehérje nettó pozitív, illetve negatív töltését, ezáltal felerősödik az elektrosztatikus taszítás. A különféle denaturáló körülmények más-más fehérjekonformációt eredményezhetnek (Dill és Shortle 1991).

Amorf aggregátum. A fehérjék natív térszerkezetének felbomlása gyakran az első lépése az oldhatóság drasztikus csökkenésének. Ha a fehérje nem képes egy hidrofób magba rejteni apoláris oldalláncait, akkor hasonló fehérjékkel találkozva intermolekuláris kölcsönhatások fogják átvenni a főszerepet. A fehérjék gyors aggregálódása szerkezet nélküli, a tér minden irányába növekedő részecskék létrejöttét eredményezi. Létrejöttében főleg az intermolekuláris hidrofób kölcsönhatások dominálnak. Az amorf fehérjeaggregátumok képződésének nagy a gyakorlati jelentősége: betegséghez vezethet a szemlencsében (szürkehályog), gondot okozhat az élelmiszeriparban (például fehérborok zavarosodása), megnehezíti a fehérjepreparálást (Stranks és mtsai 2009).

Fehérjekristály. Jelen dolgozatnak nem tárgya a kristályosítás technikája vagy kinetikája, azonban meg kell említeni, hogy a fehérjekristályok növesztése volt a bizonyíték azok molekuláris jellegére, és ezek felhasználásával vált lehetővé a fehérjeszerkezet-kutatások alapját jelentő röntgenkrisztallográfia (McPherson 1991).

Amiloid aggregátum. Instabillá vált fehérjékből nagy szerkezeti rendezettséget mutató, β -redőkben gazdag lineáris aggregátumok is létrejöhetnek. Az amiloid³ elnevezést *Rudolph Virchow* német (porosz) patológus vezette be a szövettanban 1854-ben, miután megfigyelte, hogy az agyban előforduló viaszos állagú abnormális képletek jóddal – a keményítőhöz hasonlóan – kékre festődnek. *Virchow* azt feltételezte, hogy az amiloidot ténylegesen keményítő alkotja, de 1859-ben *Nicolaus Friedreich* német (bajor) patológus és *August Kekulé* német vegyész vizsgálatai bebizonyították, hogy valójában fehérjéből áll. Később megfigyelték az amiloid anizotrópiáját, amely kongóvörössel való festés után felerősödött, így vált az amiloid azonosításának elsőként elfogadott hisztopatológiai követelményévé a kongóvörössel

³ Jelentése: keményítőszerű (a latin *amylum*, illetve ógörög *αμυλον* [amilon] kifejezésből), először *Matthias Jakob Schleiden* használta növényteni szöveggörnyezetben

való festés után fellépő almazöld kettőstörés (Sipe és Cohen 2000). Elektronmikroszkópos vizsgálatok 1959-ben igazolták a különféle eredetű amiloidok fibrilláris szerkezetét, amely így a második kritériummá vált (Cohen és Calkins 1959). A szerkezet további vizsgálata kiderítette, hogy a fibrillumok β -redős szerkezetben gazdagok (Bonar és mtsai 1969), biokémiai kutatások pedig azt igazolták, hogy a különféle eredetű amiloidokat más-más fehérje alkotja (Benditt és mtsai 1971; Glenner és mtsai 1971). Az amiloid szerkezetét röntgenkristallográfiával tárták fel. A β -redős szerkezetek a redők síkjára merőleges tengelyű protofibrillumokat alkotnak, amelyek egybefonódva képezik az érett amiloidfibrillumot, ami plakkokban rakódik le. A testszerte lerakódó amiloid tömege akár több kilogrammot is kitehet (Sawaya és mtsai 2007).

Az amiloid a klasszikus, hisztopatológiai definíció szerint olyan *in vivo* kialakuló extracelluláris fehérjelerakódás, melyet β -redőkben gazdag szerkezet, kongóvörös festés során fellépő kettőstörés, sajátos elektronmikroszkópos megjelenés és szintén sajátos röntgenszórési mintázat jellemez. Ez a definíció kizárja az intracelluláris aggregátumokat és az *in vitro* képződő fibrillumokat, utóbbira az amiloidszerű elnevezést tartja helyesebbnek. A modern, biofizikai megközelítésű definíció valamennyi *in vivo* és *in vitro* formálódó β -redős szerkezetű fehérjefibrillumot magában foglalja. Az amiloidok így meghatározott köre általában (de korántsem feltétlenül) a szokásos hisztokémiai reakciókat mutatja (Westermarck és mtsai 2005; Pepys 2006; Fandrich 2007). Jelen dolgozatban az amiloid kifejezést a modern, biofizikai értelemben használom, mivel a két megközelítés közötti határvonal egyre inkább elmosódik, és mert a dolgozat az amiloidképződést biofizikai aspektusból vizsgálja.

Az amiloidok *in vivo* előfordulása főként betegségekhez kötődően ismert, melyeket együttesen amiloidózisnak nevezünk. A több mint 25 amiloidózis közé tartoznak olyan ismert betegségek, mint az Alzheimer-kór, a Parkinson-kór és a különféle prionbetegségek. (Chiti és Dobson 2006) Előfordulásuk szerint egyaránt vannak sporadikus, örökletes és ragályos betegségek. Az amiloidlerakódások helye szerint megkülönböztetünk szisztémás és adott szervre lokalizált amiloidózisokat. Az amiloidok egyes esetekben szövődményként jelentkeznek, más betegségeknél bizonyított oki szerepük (Westermarck és mtsai 2007). Közös vonásuk, hogy

visszafordíthatatlan lefolyásúak és nincs ismert gyógymód. Az amiloidok és amiloidózisok emiatt egyaránt intenzív kutatási területei a patológiának és a biofizikának.

A kórszövettani mintákból izolált amiloid plakkok fő komponense a fehérjefibrillum. Alapesetben egy amiloidózishoz egy meghatározott fehérje köthető, amely mellett esetleg egyéb komponensek (glükózaminoglikánok, apolipoprotein E, szérum amiloid P komponens, fémionok) is előfordulhatnak.

Egyre több, amúgy lerakódással járó betegséghez nem köthető fehérjéről bizonyosodik be, hogy megfelelő kísérleti körülmények között olyan fibrilláris aggregátumokat képeznek, amelyek morfológiájuk, szerkezetük és festődésük alapján amiloid fibrillumnak tekinthetők.

1.2. A fehérjék általános szerkezeti kinetikája⁴

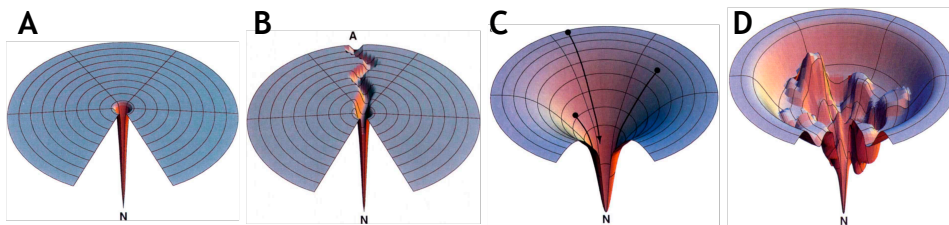
1.2.1. A natív szerkezet kialakulásának kinetikája

Adott aminosavszekvenciával rendelkező fehérjék natív körülmények között meghatározott térszerkezetet vesznek fel. Ennek a biológiailag aktív, natív konformáció a szerkezet nélküli fehérjeláncból való kialakulása az úgynevezett *folding* (kb. hajtogatódás, gombolyodás). Kézenfekvő a kérdés, hogy mi irányítja a szerkezet kialakulását. A két lehetséges válasz: vagy spontán módon tekeredik fel a fehérje, vagy valamilyen külső segítséget vesz igénybe. A kérdés eldöntése érdekében fontos lépés volt *Anfinsen* ribonukleáz-A renaturációjára vonatkozó kísérlete (*Anfinsen és mtsai* 1961). Az alaposan megtisztított fehérjét a diszulfidhidak redukálása után karbamiddal denaturálta, amely a katalitikus aktivitás teljes elvesztését eredményezte. A redukáló és denaturáló szerek eltávolítása után a fehérje tökéletesen visszanyerte aktivitását és helyreállt az eredeti szerkezet, utóbbira a bizonyítékot az szolgáltatta, hogy a diszulfidkötések az eredeti pozíciókban álltak helyre. A sikeres renaturáció már viszonylag meggyőző bizonyíték az önálló *folding* mellett, azonban még a legkörültekintőbb tisztítás is hagy némi kételyt, hogy csekély, katalitikus mennyiségben maradhatott a *folding*ot segítő ágens a vizsgált fehérje mellett. A döntő bizonyítékot az jelentette, amikor a szintetikus úton előállított ribonukleáz is natív szerkezetet vett fel. Ekkor vált egyértelművé, hogy a fehérje térszerkezetét az aminosavszekvencia

⁴ A molekuláris térszerkezet-változásoknál a *kinetika* és a *dinamika* fogalma körülbelül ugyanazt takarja, csak az előbbit inkább a kísérletezők, az utóbbit a számítógépes szimulációval foglalkozók használják.

határozza meg. Később kiderült, hogy ez csak a kisebb fehérjékről mondható el általánosan, a nagyobbak olykor segítségre szorulnak.

A spontán folding néhány másodpercnyi vagy percnyi idő alatt lezajlik. Felmerül a kérdés, hogy miként találja meg a helyes konformációt a kitekert fehérje. Tételezzük fel, hogy egy száz aminosavból álló fehérje minden aminosav-csoportja két térbeli állapotot vehet fel, ekkor $2^{100} \approx 10^{30}$ térszerkezet lehetséges. Tegyük fel továbbá, hogy a fehérje minden aminosavcsoportja végigpróbálgatja a lehetséges állapotokat, és azt is tegyük fel, hogy ehhez egyenként körülbelül 10^{-12} másodpercre van szükség (egyetlen molekularezgés ideje). Ez 10^{10} év nagyságrendű időt igényelne, vagyis egyértelmű, hogy a natív szerkezet kialakulása nem véletlen próbálgatás eredménye, hanem léteznie kell egy vagy több foldingútvonalnak (Finkelstein és Galzitskaya 2004). Az ellentmondást felvetője után Levinthal-paradoxonnak nevezték el (Levinthal 1969), feloldására pedig több modell is készült. Egy általános modell szerint a kitekert, másodlagos szerkezet nélküli, nagy szabadentalpia-tartalmú szerkezetekből egyenes út vezet az alacsony szabadentalpia-tartalmú, kompakt natív szerkezet felé. A modellt közelebb viszi a valósághoz, ha megengedjük átmeneti termékek kialakulását.



2. ábra. Különböző foldingkinetikai modellek energiafelszínei.

(A) A Levinthal-paradoxon nagy számú, azonos energiájú térszerkezetet és egy alacsony energiájú natív szerkezetet (N) feltételez, melynek megtalálása véletlenszerű. (B) A paradoxon egyik lehetséges feloldása: egy útvonal (A) feltételezése a felszínen. (C) Az ideális tölcsérmodell szerint bármely szerkezeti állapotból egy lépésben halad a fehérje az energiaminimumnak megfelelő natív szerkezet felé. (D) A rücskös felszínű tölcsérmodell lokális energiaminimumokat tartalmaz, az ezeknek megfelelő térszerkezetek átmenetileg felhalmozódhatnak, ilyenkor a foldingkinetika többlépéses (Dill 1997).

Mindezek a foldingútvonal-modellek jól szemléltethetők energiafelszínekkel, amik olyan függvények grafikonjai, melyek a térszerkezethez szabadentalpiatartalmat rendelnek (2. ábra).

A következő kérdés, hogy melyek azok az alapvető folyamatok, amelyek során

az elsődleges szerkezet megszabja a folding folyamatát. A folding igen összetett lehet egy nagyobb molekulában, az azt irányító tényezők csak részben ismertek. Általánosan elmondható, hogy első lépése egy gyors kollapszus, ami több átmeneti állapot kialakulásán keresztül vezető folyamat, és amelynek végére egy többé-kevésbé a natív állapotra emlékeztető, de még dinamikusan változó, egymásba alakuló intermedier szerkezetek halmaza alakul ki, amelyet olvadt gombócnak, idegen szóval *molten globule*-nak neveznek. Számítógépes szimulációk azt sugallják, hogy az intermedier felé vezető úton a közel eső aminosavak közötti kölcsönhatásokkal stabilizált másodlagos szerkezetek alakulnak ki először, majd ezután nő meg a távolabbi aminosavak közötti apoláris, dipól-dipól stb. kölcsönhatások jelentősége (Ptitsyn 1995; Finkelstein és Galzitskaya 2004).

A következő szakaszban az olvadt gombóc egy lépésben tovább alakul a natív szerkezetbe, ami a rendszer élettani körülmények között elérhető legalacsonyabb szabadentalpiáját jelenti. A natív szerkezet kialakulásához szükséges, hogy élettani körülmények között ennek legyen a legalacsonyabb szabadentalpiája, ettől lényegesen eltérő szerkezetek ne rendelkezzenek hasonlóan alacsony szabadentalpiával, végül pedig hogy a szerkezet kialakulásának útjában ne legyen nagy energiagát, azaz drasztikus konformációváltozást igénylő lépés (Jahn és Radford 2005).

A natív szerkezet kialakulásában a leggyorsabb lépés az α -hélixek (100 ns) és β -kanyarok (1 ms) létrejötte. Kis, főként hélixekből álló fehérjék foldingja akár 50 μ s alatt is lezajlik, míg a nagyobb β -redős szerkezetek kialakulásához nagyságrendekkel több időre van szükség (Eaton és mtsai 2000).

A foldingkinetika tanulmányozásában úttörő szerepe volt a mutációknak a kis fehérjék (kevesebb mint 100 aminosav) foldingjára gyakorolt hatásának. A kisméretű fehérjék kevés lépésben hajtogatódnak, így nem kell számolni intermedierek felhalmozódásával, másfelől az egyetlen aminosavban eltérő mutáns változatok előállításával lehetővé vált meghatározott aminosavak szerepének vizsgálata (Fersht és mtsai 1992). Ezen módszer segítségével térképezték fel azokat az állapotokat, amelyeken mindenképpen át kell haladnia a fehérjének a folding során. Végeredményben az valószínűsíthető, hogy kisszámú aminosav-oldallánc kölcsönhatásával kialakul egy foldingnukleációs mag, mely köré nagy sebességgel rendeződik a fehérje fennmaradó része (Fersht és Daggett 2002).

Az átmeneti szerkezetek vizsgálata arra enged következtetni, hogy azok a nagyfokú rendezetlenség dacára a másodlagos szerkezetek tekintetében nagyjából a natív szerkezetre hasonlítanak. A kulcsfontosságú aminosavak közötti kölcsönhatások révén hamar natív-szerű szerkezetet vesz fel a fehérje. Ezen hidrofób és poláris aminosavak egy speciális elrendeződési mintázatot hoznak létre, amely igen kedvező kölcsönhatások kialakulását teszi lehetővé, miközben a fehérje egyre kompaktabbá válik (Baldwin 2007). Ezen szerkezet kialakulása után már csak kisebb lépések szükségesek a natív szerkezet kialakulásához. A nukleációs mag jelentőségét alátámasztja, hogy kialakulásának elmaradása esetén nem történik folding. További felismerés, hogy minél távolabbi oldalláncok kerülnek közel egymáshoz a foldingnukleációs mag kialakulása során, annál tovább tart a nukleáció: a véletlenszerű keresési folyamat több időt vesz igénybe, ha távolabbi aminosavaknak kell közel kerülnie egymáshoz (Grantcharova és mtsai 2001).

Nagyobb, több száz aminosavból álló fehérjék esetében több-kevesebb köztes állapoton keresztül halad a folding. Az még nem egyértelmű, hogy a foldingintermedierek kialakulása segíti-e a helyes foldingútvonal követését, vagy inkább akadályt jelent. Akár az előbbi, akár az utóbbi az igazság, mindenképpen lényeges következtetést lehet levonni a szerkezetükből. A nagyobb fehérjék foldingja modulárisan megy végbe, az egyes szakaszok (nevük kinetikai szempontból foldingegység, szerkezeti szempontból domén) viszonylag függetlenül hajtogatódnak. A kulcsszerepet betöltő aminosav-oldalláncok közel kerülve az egyes doméneken belül hoznak létre natívszerű szerkezetet. Ezután a teljes natív szerkezet kialakulásához egy végső kooperatív lépésben a domének között is létre kell jönnie a natívszerű kapcsolatoknak. Ez a moduláris mechanizmus azért is vonzó feltételezés, mert a bonyolultabb szerkezetek kialakulását jobban kézben tartható egységekre bontja (Baldwin és Rose 1999a; Baldwin és Rose 1999b).

A natív szerkezet létrejötte végbemehet a transzlációval egy időben, a transzláció után a citoplazmában, vagy még később, a megfelelő sejtkompartmentbe való szállítás után.

A részleges folding során olyan csoportok helyezkednek el a fehérjefelszín közelében, amelyek natív állapotban egyébként a belsejébe lennének temetve. Ez az átmeneti szerkezet a zsúfolt környezetben nem megfelelő kölcsönhatások kialakulásával

fenyeget. A sejt ez ellen legjellemzőbben molekuláris csaperonokkal védekezik. A csaperonok valamennyi sejt valamennyi organelumában megtalálható molekulák, melyek a riboszómából kinövő vagy már kész fehérjékhez kapcsolódnak. A molekuláris csaperonok önmagukban nem növelik meg a folding sebességét, inkább a mellékfolyamatokat, például a hibás szerkezetek kialakulását és az aggregációt előzik meg. Egyértelmű bizonyíték erre, hogy stressz körülmények között (például hősokk) megnő a csaperonok mennyisége. Bizonyos molekuláris csaperonok nem csupán a hibás szerkezetek kialakulását akadályozzák meg, de a rosszul hajtogatott, olykor még az aggregált fehérjéket is meg tudják menteni újabb esélyt adva a helyes szerkezet kialakítására. A fehérjefoldingba való aktív beavatkozás energiát igényel, így a legtöbb molekuláris csaperon működéséhez ATP-re van szükség (Grantcharova és mtsai 2001; Hartl és Hayer-Hartl 2009).

1.2.2. A misfolding és amiloidképződés kinetikája

A folding során a szervezet csodálatos önszervező képessége nyilvánul meg, amely lehetővé teszi akár a legbonyolultabb fehérjék harmadlagos szerkezetének is a spontán kialakulását. A zsúfolt biológiai környezetben csak a helyesen hajtogatott fehérjék tudják hosszú távon megőrizni stabilitásukat. Ezek tudatában nem meglepő, hogy a fehérje hibás foldingja vagy a natív szerkezet felbomlása egy sor patológiai következménnyel járhat (Dobson 2003).

Valamennyi amiloidbetegség (más néven amiloidózis) elsősorban egy meghatározott fehérje aggregációjával jár, habár egyéb fehérjék és szénhidrátok is megtalálhatók az *in vivo* létrejövő amiloidokban. A neurodegeneratív betegségtől szenvedőkben lerakódó aggregátumok mennyisége gyakran kimutathatatlanul csekély, míg egyes szisztémás betegségekben több kilogramm amiloid rakódik le. Az amiloidózisokban lerakódó több mint húszféle fehérje szolúbilis alakja igen változatos, a szabályos globuláris szerkezettől a rendezetlen peptidekig terjed (Chiti és Dobson 2006). Ennek ellenére a belőlük kialakuló amiloidok sok hasonlóságot mutatnak. Jellemző a kongóvörös festék kötése és az ennek következtében kialakuló kettőstörés. Az amiloid lerakódások hosszú, elágazásmentes, gyakran csavart fibrillumokból (rostokból) állnak, melyeket a fibrillum tengelyére merőleges síkban elhelyezkedő β -redők rétegei alkotnak (Bennett és mtsai 2006). Az amiloidstruktúra kialakításának képessége nem korlátozódik az amiloidózisokban előforduló kisszámú fehérjére.

Számos nem patogén fehérjéből is tudtak előállítani amiloidot *in vitro*. Ma már úgy tűnik, hogy az amiloidképzés a polipeptidláncok általános tulajdonsága (Chiti és mtsai 1999; Damaschun és mtsai 1999).

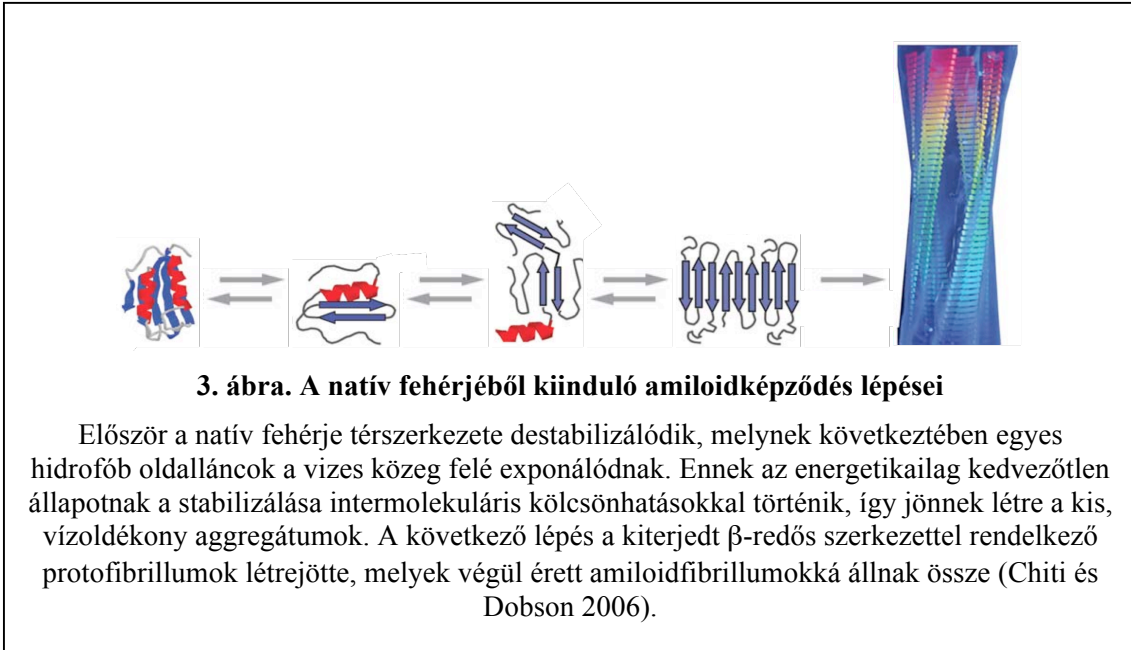
Röntgenszórásos, krioelektronmikroszkópos és szilárd fázisú NMR-vizsgálatok meggyőző bizonyítékot szolgáltatottak egy szerkezeti modell felállításához. Az amiloidfibrillumok alapját jelentő β -redős szerkezetet a fehérjegerinc atomjai közötti hidrogénkötések stabilizálják. Mivel a gerinc minden polipeptidben azonos, ez megmagyarázza a különféle fehérjékből létrejövő amiloidok hasonlóságát. Egyes esetekben a fehérjeláncnak csak egy kis része épül be az amiloidba, máskor a teljes fehérje lerakódik. Összességében elmondható, hogy az amiloidstruktúra szöges ellentétben áll a lerakódó fehérjék egyedi szerkezetével, ahol az oldalláncok közötti kölcsönhatás jelentősége nagyobb a gerincatomok közötti kapcsolatoknál (Chiti és Dobson 2006; Perczel és mtsai 2007).

Az amiloid fibrillumok *in vivo* képződésének általános mechanizmusa nem ismert. Csak annyit tudunk, hogy a fehérjék a polipeptidgerinc hidrogénkötésein keresztül összekapcsolódnak. Az amiloidképződés folyamatával és kinetikájával kapcsolatos ismereteink *in vitro* vizsgálatokból származnak (Westermarck és mtsai 2007).

Az amiloidképzési képesség általánosnak tűnik, de a különféle fehérjék azonos körülmények között eltérő mértékben hajlamosak rá, és ez a hajlam bizonyos fizikokémiai paraméterekkel, mint a töltés, hidrofobicitás, másodlagosszerkezet-képzési hajlam stb. korrelál. A legtöbb globuláris fehérjében a hidrofób oldalláncok és a gerinc el van rejtve a molekula belsejébe, és csak a natív struktúra felbomlása vagy feldarabolódás során kerül felszínre, és ekkor válik lehetővé az amiloidképződés. A kísérletek arra utalnak, hogy a képződés kezdetén van egy késlekedési fázis, amelyet gyors növekedés követ. Ez a fajta kinetika jellemző a nukleációs folyamatokra. Ha aggregátumok hozzáadásával beoltjuk az oldatot, a kristályképződésnél ismerteknek megfelelően eltűnik a késlekedési fázis. Ehhez hasonló módon indíthatják be az amiloidképződést például az oxidatív stressz során létrejövő iniciátorok is.

A különféle fehérjék esetében nemcsak az amiloid fibrillumok morfológiájában, hanem a kialakulás mechanizmusában is szembetűnő a hasonlóság (3. ábra). Először általában nonspecifikus kölcsönhatások eredményeként vízdékony oligomerek

képződnek. A legelső, már elektron- vagy atomerő-mikroszkóppal látható objektumok kis gyöngyszerű struktúrák. Ezek határozottabb morfológiájú, rövid, vékony protofibrillumokká állnak össze, melyekből az érett amiloidfibrillumok keletkeznek (Chiti és Dobson 2006).



Az amiloid csak egyike azon aggregátumoknak, amelyek egy fehérjéből kialakulhatnak, de különlegessé teszi az a kiemelkedő stabilitás, amely a nagy számú hidrogénkötésnek köszönhető. Így ha egyszer kialakult, hosszú időn át képes fennmaradni, lehetővé téve, hogy újabb és újabb fehérjemolekulák beépülésével kiterjedt lerakódások jöjjenek létre. Ez érthetővé teszi, hogy az amiloid kialakulására való hajlam egyike a fehérjeevolúciót irányító szelekciós tényezőknek. Ennek ellenére egyes fajoknál megfigyelhető az amiloidszerkezetű fehérjék szabályozott felhasználása, például *E. coli* baktériumoknál inert felületek benépesítésekor a tapadás segítésére (Chiti és Dobson 2006).

Szekvenciaelemzések arra utalnak, hogy az evolúciós szelekció során kiküszöbölődtek azok a fehérjeszekvenciák, amelyek hajlamosabbak amiloidogén szerkezetek kialakítására. Ilyen például a váltakozó hidrofób és poláris oldalláncok, amelyek kedveznek az amiloid fibrillumokban is megtalálható β -redős szerkezet létrejöttének. Ráadásul bizonyos eredmények arra utalnak, hogy az aggregáció a

foldinghoz hasonló nukleációval indul, csak a kritikus oldalláncok máshol helyezkednek el. Az evolúció során tehát azok a fehérjék maradtak meg, amelyek a foldingot részesítették előnyben az amiloidképződéssel szemben. Emellett a szelekció mellett az élőlények egy kiterjedt szabályozó rendszert is fenntartanak a fehérjefolding regulálására csaperonok és lebontómechanizmusok segítségével, melynek meghibásodása fehérjeaggregációhoz vezethet (Hartl és Hayer-Hartl 2009).

1.2. Fehérjeszerkezet-kutatási mérés technikák

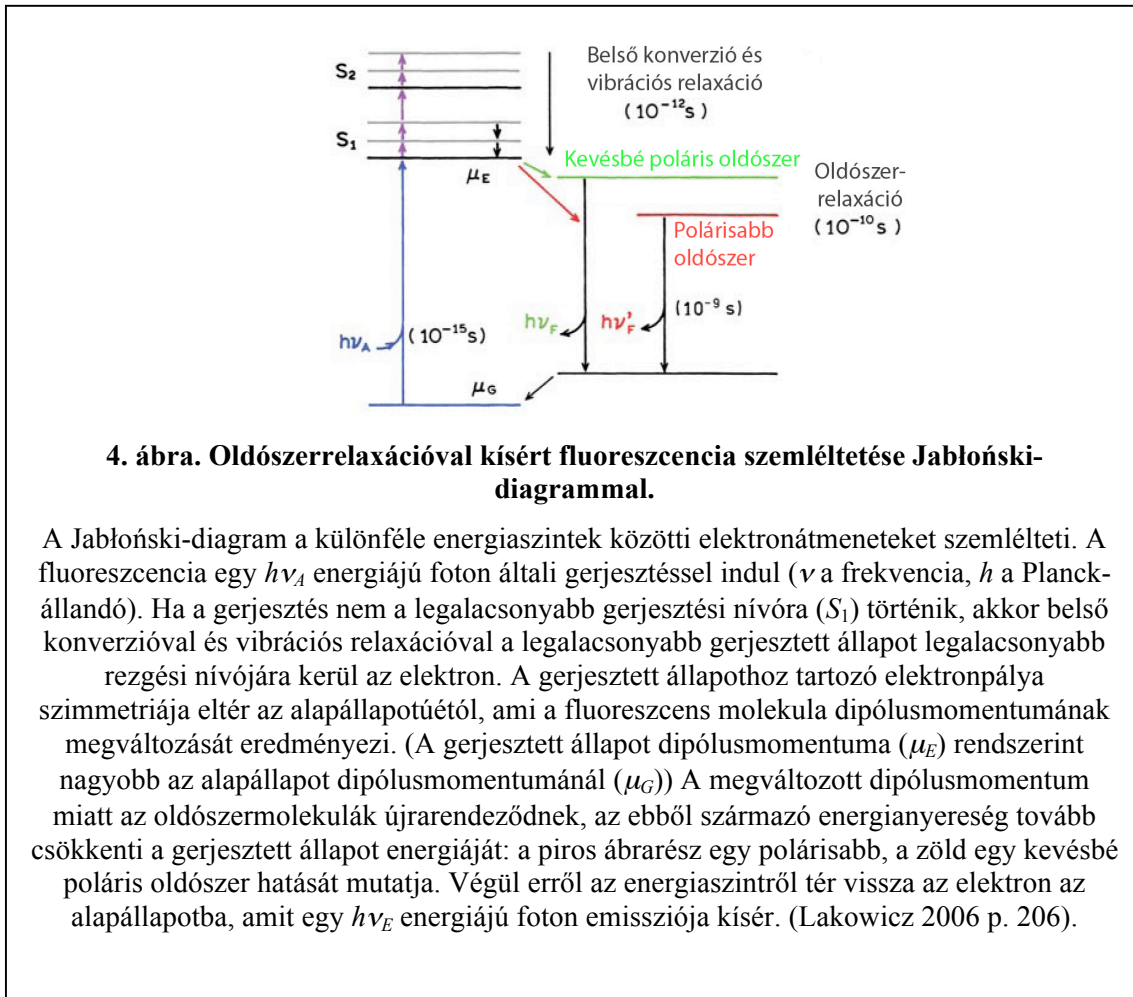
A röntgenkristallográfia és a krioelektronmikroszkópia utat nyitottak a fehérjék térszerkezetének atomi szintű megismeréséhez. E módszerek azonban statikus képet adnak, a molekulák térszerkezetének változásáról inkább csak sejtéseink lehetnek az általuk nyert adatok alapján. A fehérjeszerkezet időbeli változása, azaz a fehérjekinetika nyomon követése új módszereket igényel. Egyfelől olyan kölcsönhatásokat kell kiaknáznunk, amelyek a molekulászerkezet megváltozásáról informálnak, másfelől olyan technikára is szükségünk van, amellyel időzíteni tudjuk a molekuláris szintű folyamatok indítását (Bartlett és Radford 2009).

1.2.1. A fehérjék természetes fluoreszcenciája

A fluoreszcencia fényel gerjesztett elektron relaxációját kísérő rövid élettartamú fényemisszió. Az elnyelt foton energiájával gerjesztett elektron valamely betöltetlen pályára jut. Ha ez nem a legalacsonyabb energiájú gerjesztett állapot, akkor az elektron a legalacsonyabb energiájú gerjesztett állapot legalacsonyabb rezgési szintjére kerül (előbbi neve belső konverzió, az utóbbié vibrációs relaxáció). Ebben az állapotban a molekula polaritása (dipólusmomentuma) többé-kevésbé eltér az alapállapotútól. Ennek következtében a kémiai környezetet képező oldószer-molekulák újraszerveződnek, amivel csökkentik a gerjesztett elektron energiáját (oldószer-relaxáció). Végül ebből az állapotból történik az átmenet az alapállapotba, amit fluoreszcenciafoton kibocsátása kísér. Az emittált foton energiája az alap- és a gerjesztett állapot energiakülönbségével egyenlő. Ezt az energiát csökkenti az oldószer-molekulák újraszerveződése. A csökkenés mértéke az alap- és gerjesztett állapotú fluorofor dipólusmomentuma közötti eltéréstől, valamint az oldószer-molekulák dipólusmomentumától függ (4. ábra).

Gyakorlati szempontból a $\pi^*(p^*) \rightarrow \pi(p)$ átmenettel rendelkező molekulákat

vagy csoportokat tekintjük fluoreszcensnek: ezeknek mind elnyelési, mind emissziós spektruma a látható és UV-tartományban van. Ilyen könnyen gerjeszthető elektronok vannak például a delokalizált elektronrendszerekben. A többi biomolekulával



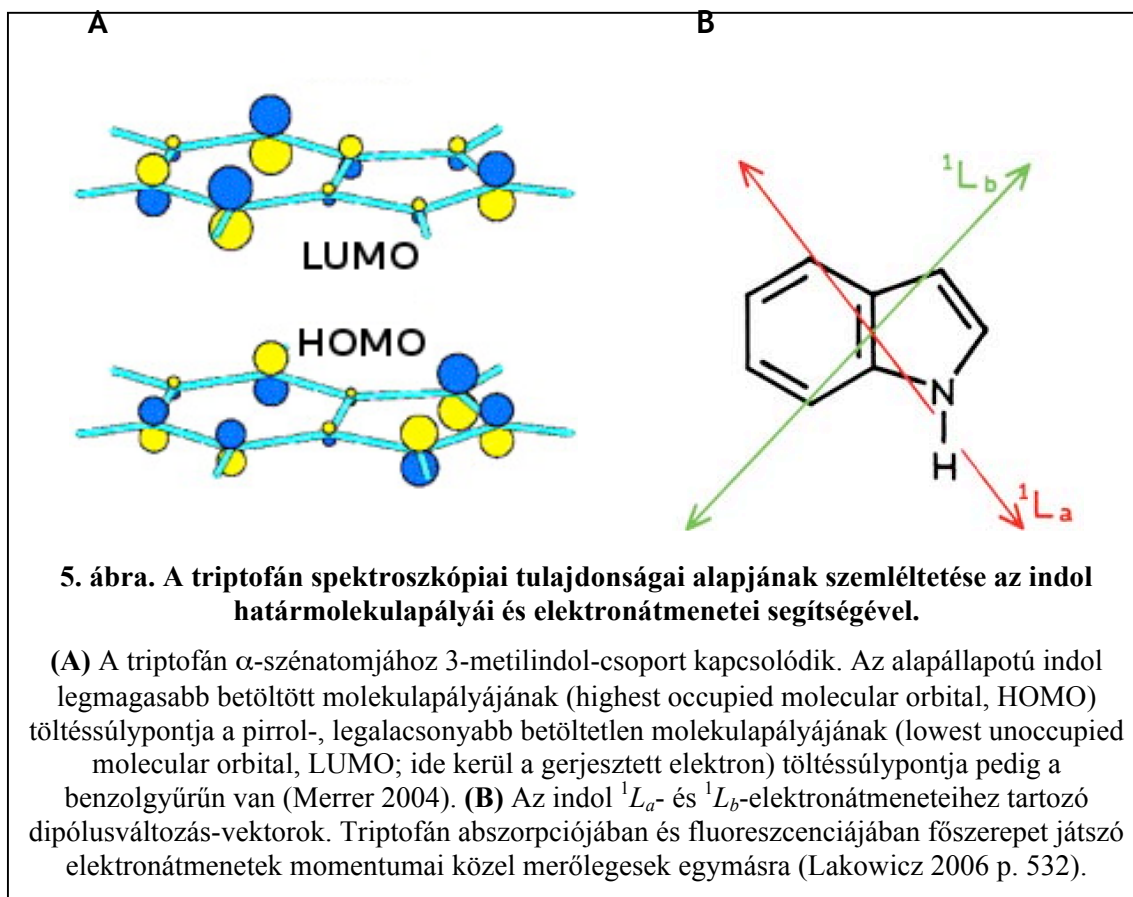
4. ábra. Oldószerrelaxációval kísért fluoreszcencia szemléltetése Jablonski-diagrammal.

A Jablonski-diagram a különféle energiaszintek közötti elektronátmeneteket szemlélteti. A fluoreszcencia egy $h\nu_A$ energiájú foton általi gerjesztéssel indul (ν a frekvencia, h a Planck-állandó). Ha a gerjesztés nem a legalacsonyabb gerjesztési nívóra (S_1) történik, akkor belső konverzióval és vibrációs relaxációval a legalacsonyabb gerjesztett állapot legalacsonyabb rezgési nívójára kerül az elektron. A gerjesztett állapothoz tartozó elektronpálya szimmetriája eltér az alapállapotútétól, ami a fluoreszcens molekula dipólusmomentumának megváltozását eredményezi. (A gerjesztett állapot dipólusmomentuma (μ_E) rendszerint nagyobb az alapállapot dipólusmomentumánál (μ_G)). A megváltozott dipólusmomentum miatt az oldószermolekulák újrarendeződnek, az ebből származó energianyereség tovább csökkenti a gerjesztett állapot energiáját: a piros ábrarész egy polárisabb, a zöld egy kevésbé poláris oldószer hatását mutatja. Végül erről az energiaszintről tér vissza az elektron az alapállapotba, amit egy $h\nu_E$ energiájú foton emissziója kísér. (Lakowicz 2006 p. 206).

ellentétben a legtöbb fehérje természetes fluoreszcenciával rendelkezik, ami az aromás aminosavaknak, mindenekelőtt a triptofánnak, kisebb mértékben a tirozinnak és a fenilalaninnak köszönhető. A fluoreszcenciaemisszió javarészt a triptofánhoz köthető, mivel ennek az aminosavnak a legnagyobb az extinkciós együtthatója, ennek az abszorpciós spektruma van a legnagyobb hullámhosszknál, ami miatt az egyazon fehérjében lévő fenilalanin vagy tirozin által elnyelt energia gyakran áttevődik a triptofánra (Lakowicz 2006 pp. 530-1).

A triptofán emissziós spektrumát és fluoreszcenciakioltását elterjedten használják fehérjekinetikai vizsgálatokra, mivel a triptofán spektroszkópiai viselkedése

igen érzékenyen és összetetten reagál a környezet változására, illetve viszonylag ritka aminosav, ami megkönnyíti a fluoreszcenciaváltozások értelmezését (Lakowicz 2006 p. 529). Az érzékenység egyik oka, hogy a gerjesztés során jelentős töltéssúlypont-



áthelyeződés történik a pirrolgyűrűről a benzolgyűrűre (Vivian és Callis 2001) (5. ábra, A); másik oka, hogy a protondonor iminonitrogénen keresztül hangsúlyosan érvényesül a hidrogénkötést kialakító oldószer hatása. Az összetettség oka pedig a triptofán gerjesztett állapotainak degeneráltsága. A triptofán, illetve a fluorofor alapvegyület indol gerjesztése összetett folyamat, melynek során a szinglet alapállapotból (S_0) két, spektroszkópiailag elkülönülő, közeli energiájú szinglet gerjesztett állapotba is kerülhet, melyeket hagyományosan 1L_a és 1L_b állapotoknak nevezünk (Platt 1949). A lehetséges $S_0 \leftrightarrow ^1L_a$ és $S_0 \leftrightarrow ^1L_b$ átmeneteket kísérő dipólusváltozás vektora merőleges egymásra (5. ábra, B). Gerjesztés során a megvilágító fény hullámhosszától függ, hogy az egyes átmenetek mekkora súllyal jutnak szerephez. A relaxációs elektronátmenet viszont (esetleges $^1L_a \leftrightarrow ^1L_b$ belső konverzió után) a legalacsonyabb energiaszintről történik

(Kasha-szabály), és a két gerjesztett állapot közötti kis energiakülönbség miatt döntő szerephez jut a kémiai környezet hatása. Mivel az $S_0 \leftrightarrow {}^1L_a$ elektronátmenet dipólusváltozás-vektora halad át a nitrogénen, ez lesz érzékenyebb a környezetre, és vizes közegben (amikor érvényesül a hidrogénkötés stabilizáló hatása) ezen az átmeneten keresztül megy végbe az emisszió. Egészen apoláris környezetben az $S_0 \leftrightarrow {}^1L_b$ átmenet a kedvezőbb, azonban ez fehérjékben ritka (Lakowicz 2006 pp. 531-4). Habár az iminonitrogén hidrogénjén keresztül érvényesül a legfontosabb stabilizáló hatás, amely eldönti, hogy melyik állapotból történjen a relaxációs elektronátmenet, egyéb másodlagos kölcsönhatások is befolyásolhatják a két szinglet gerjesztett állapot viszonylagos energiatartalmát. Általánosan fogalmazva a helyi elektromos mező indolgyűrűre vetített hatása fogja meghatározni az energiaszintek felhasadását, végső soron pedig a triptofán emissziós spektrumának maximumhelyét (Callis és Burgess 1997). A triptofánfluoreszcencia emissziós spektruma tehát a kémiai környezethez igazodva változik, de a változás iránya az elektronátmenetek összetettsége miatt sokszor nehezen értelmezhető, és még kevésbé jósolható. Például egyes fehérjék emissziós maximumhelye az unfolding során vörös, másoké kék irányba tolódik el, értéke 308 és 355 nm között változhat (Vivian és Callis 2001).

A triptofánfluoreszcencia másik értékes tulajdonsága, hogy a fluoreszcencia-hatásfok is függ a kémiai környezettől, mindenekelőtt a közeli aminosav-oldalláncok típusától és az oldatban lévő ionoktól, molekuláktól. Némelyik csoport (hisztidin, lizin, illetve a polipeptidlánc amidcsoportjai) vagy molekula részlegesen ki tudja oltani a fluoreszcenciát⁵, így az intenzitáscsökkenés információt adhat a kioltó aminosav-oldalláncok távolságáról, illetve a triptofán oldatkörnyezet számára való hozzáférhetőségéről (Chen és Barkley 1998; Lakowicz 2006 pp. 546-51).

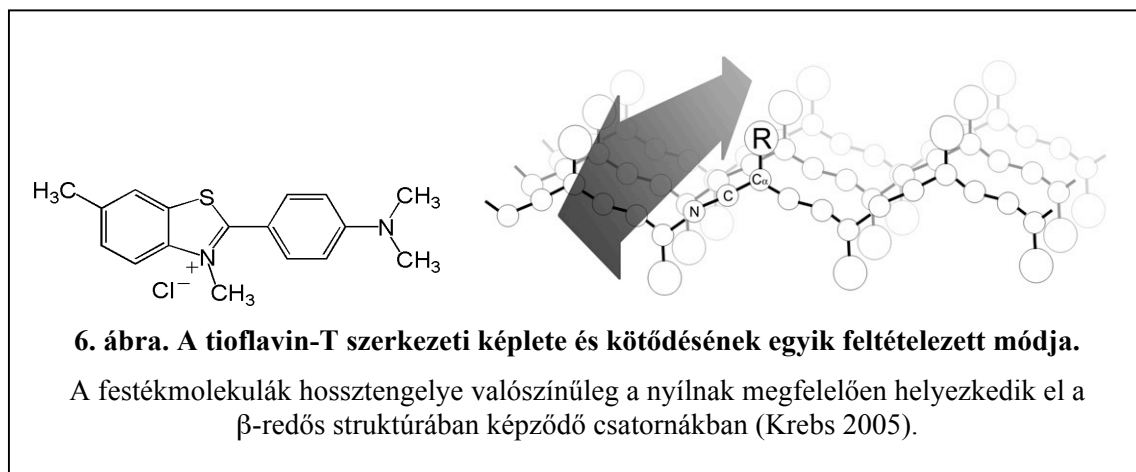
A triptofánfluoreszcencia nem csak a környezetről nyújtott sokrétű információ miatt kedvelt fehérjekinetika-követési eszköz, hanem a triptofán viszonylagos ritkasága miatt is: átlagos előfordulási gyakorisága a fehérjemolekulákban egy mólszázalék körüli (Lakowicz 2006 p. 529). Sok fehérjében csupán egyetlen triptofán van, így annak környezetéről könnyen értelmezhető jelet kapunk a spektrumból. Ha egy fehérjében több triptofán van, azok spektruma eltérően reagálhat a környezet megváltozására, ami

⁵ a folyamat elterjedt angol neve *quenching*, a kioltásért felelős csoport vagy molekula neve pedig *quencher*.

megnehezíti a spektroszkópai adatok értelmezését. Végül a triptofánok viszonylag csekély mértékben befolyásolják a fehérjekonformáció stabilitását, így azt (helyspecifikus mutagenézissel⁶) a vizsgálni kívánt pozícióba helyezhetjük vagy eltávolíthatjuk.

1.2.2. A tioflavin-T fluoreszcenciaváltozása

A tioflavin-T (ThT) egy kationos benzotiazolfesték (6. ábra), mely amiloidtartalmú szövetmintákhoz kötődve megnövekedett fluoreszcenciát mutat. 1959 óta használják a hisztopatológiában, miután kimutatták, hogy amiloidtartalmú



vesemintákhoz nagy specificitással kötődik (Vassar és Culling 1959). Patológusok további vizsgálatokat folytattak negatív és pozitív szövetmintákon, mely még inkább megerősítette a ThT kiemelkedő amiloidérzékenységét (Saeed és Fine 1967). A porc mátrixhoz, rugalmas rostokhoz és mukopoliszacharidokhoz, valamint a DNS-hez és RNS-hez való kötődés sem elhanyagolható, ezért a pH csökkentésével módosították a festési eljárást, mely tovább növelte a specificitást (Kelenyi 1967). A ThT specifikus amiloidkötődését számos területen alkalmazzák: fluoreszcenciamikroszkópos szövetdiagnosztikában (Hobbs és Morgan 1963), szövetből kivont és *in vitro* létrehozott amiloidfibrillumok fluoreszcenciaspektroszkópai vizsgálatánál (Naiki és mtsai 1989; LeVine 1993), és az amiloidfibrillumok növekedésének direkt megfigyelésénél (Ban és mtsai 2003).

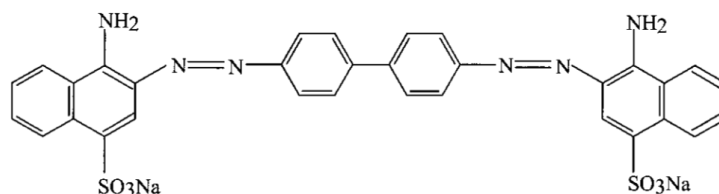
A ThT poláris és apoláris csoportokat is tartalmaz, ennek köszönhetően a festési

⁶ angolul: *site-directed mutagenesis*

eljárások során használt koncentrációknál (10-20 μM) vizes oldatban micellákat képez, a kritikus micellaképzési koncentráció 4 μM . Már 4 μM alatt is tapasztalható némi fluoreszcencianövekedés amiloidok jelenlétében, de e fölött igen intenzív, 5-50-szeres növekedés tapasztalható (Khurana és mtsai 2005). Az egyik vélemény szerint a planáris ThT-molekula az amiloidstruktúrában létrejövő csatornában helyezkedik el (Krebs és mtsai 2005) (6. ábra). Ezt a feltételezést mások elvetik, és pusztán ionos kölcsönhatásnak tulajdonítják a kapcsolatot, ezzel magyarázva a ThT nem amiloidspecifikus kötődésének eseteit (Khurana és mtsai 2005). Újabban azt találták, hogy az amiloidok sztérikus és elektronikus kölcsönhatásokkal stabilizálják az alapállapotú ThT elektronszerkezetét, és ez idézi elő a nem-radiatív relaxációs utak arányának csökkenését (Wolfe és mtsai 2010).

1.2.3 A kongóvörös festék kettőstörése

A kongóvörös (CR) szerkezetileg az azofestékek csoportjába tartozik (7. ábra); eredetileg textilipari célokra fejlesztették ki 1883-ban (Steensma 2001). Az 1920-as



7. ábra. A kongóvörös szerkezeti képlete.

években kimutatták, hogy a kongóvörös kötődik a szövetmintákban található amiloidhoz, emiatt polarizált fényben vizsgálva jellegzetes sárgászöld kettőstörés jön létre, így az amiloidkimutatás sztenderd hisztokémiai módszerévé vált (Benhold 1922; Divry 1927). Hogy megértsék a festék és az amiloid kölcsönhatása folytán létrejövő optikai anomáliát, elvégezték a szuszpendált amiloidkivonatok CD-spektroszkópiai tanulmányozását. A spektrumok jellegzetessége az 500 nm körüli határozott negatív ellipticitás (Benditt és mtsai 1970). A festék kötődésének módja még nincs tisztázva. Feltehetően mind hidrofób, mind elektrosztatikus kölcsönhatások részt vesznek a kötődésben, és a molekula planáris jellege is lényeges. A kongóvörös nem csupán amiloidokhoz, hanem oligomerekhez vagy akár monomer fehérjékhez is kötődhet,

azonban az utóbbiak esetében sokkal gyengébb a kötődés, és a CD-spektrumokban bekövetkező változás is eltérő.

1.2.4 Dinamikus fényszórás

Az elektromágneses hullámok képesek a dipólusokat indukálni, melyek ezután újra kisugározzák az elnyelt sugárzást, e jelenséget rugalmas szórásnak nevezzük. Ennek megfelelően a fény diszperz rendszeren áthaladva szóródik a diszpergált részecskéken. A diszperz rendszer részecskéi kellően kis méretűek a Brown-mozgás létrejöttéhez, ami a köztük lévő távolság folyamatos változásához vezet. Ha a megvilágító fény koherens és monokromatikus (például lézer), akkor a megvilágítási zónába eső, egymáshoz közeli, mozgó részecskék által szórt fénysugarak között időben változó interferencia lép fel, amely az intenzitás, egyúttal az elektromostérerősségvektor ingadozását okozza a detektorsíkban. Mivel az ingadozás a részecskék mozgásának következménye, ezért információt hordoz arról. Az elektromos térerősség időbeni változását autokorrelációval vizsgáljuk. Minél intenzívebb a részecskék a Brown-mozgása, annál gyorsabb a térerősség ingadozása és annál hamarabb cseng le az autokorrelációs függvény. A lecsengés sebességéből tehát következtethetünk a mozgékonyyságra, amiből kiszámolható a diffúziós állandó, abból pedig (a közeg viszkozitásának és hőmérsékletének ismeretében) a Stokes–Einstein-egyenlettel kiszámolhatjuk a részecskék hidrodinamikai sugarát (Berne és Pecora 2000).

1.2.5. Átalakulási hőmérséklet

A szerves kémiában az olvadáspont-mérés a vegyületazonosítás régóta alkalmazott, egyszerű és pontos módszere. Hasonlóan jellemző az adott fehérjeszerkezetre is az átalakulás (denaturáció, „olvadás”) hőmérséklete. A mérés klasszikus módja a kalorimetria, melynek során a hőkapacitás hőmérséklettől való függését detektáljuk. Az azonosítandó fehérjeszerkezet rendszerint vizes oldatban áll rendelkezésre többnyire néhány μM -os koncentrációban. A jelenlévő víz hőkapacitása nagyságrendekkel meghaladja a fehérjéét, ami elfedve a fehérje okozta változásokat igen megnehezítené a közvetlen mérést. E probléma megoldásaként használjuk a differenciál pásztázó kalorimetriát (DSC), amely egy referenciához viszonyítja a fehérjetartalmú oldat hőkapacitás-változását, így sokkal érzékenyebb mérés hajtható végre. A hőmérséklet emelésével egy adott ponton érzékelhetően elkezd nőni a

denaturált forma részaránya, végül a fehérje teljes mennyisége denaturálódik. Átalakulási hőmérsékletnek (T_m) a maximális hőkapacitáshoz tartozó hőmérsékletet tekintjük. A denaturáció sokszor irreverzibilis, ekkor nem egyensúlyi állapotokon keresztül jutunk el a teljes denaturációhoz, ezért az átalakulási hőmérséklet függ a hőmérsékletemelés sebességétől (Privalov és Dragan 2007).

1.3. Fehérjekifejezési technikák

A fehérjekifejezéshez szükség van a kívánt fehérjét kódoló DNS-szekvenciára, egy organizmusra, amellyel megtermeltetjük a fehérjét (gazda), egy vektorra, amellyel bejuttatjuk a fehérjét az organizmusba és amely tartalmazza a kifejezés lebonyolításához szükséges DNS-szekvenciákat is, valamint egy tisztítási eljárásra, amellyel el tudjuk választani a célfehérjét a sejt többi anyagától. Ma már kipróbált technológiák állnak rendelkezésre a fehérjepreparáláshoz, így csupán a megfelelő eljárás kiválasztására van szükség a célfehérje tulajdonságainak ismeretében. Az egyik leghatékonyabb és emiatt legelterjedtebb fehérjeexpressziós rendszer vektorként pET plazmidot, gazdaként *Escherichia coli* baktériumot használ, mely alkalmas olyan fehérjék kifejezésére, ahol nincs szükség poszttranszlációs modifikációra vagy splicingra.

A biotechnológiában számos *E. coli* sejtvonalat használnak, közülük kiemelkedő a BL21, amely érzékeny λ -fágra, és mentes az OmpT (UniProt P09169)⁷ és a Lon (UniProt P0A9M0)⁸ nevű proteázoktól, amelyek lebonthatják az expresszált fehérjét. (Grodberg és Dunn 1988; Sugimura és Nishihara 1988; Fu és mtsai 1997) Ebből származik a BL21(DE3) sejtvonat, ahol a DE3 kód azt jelzi, hogy a sejt kromoszómája tartalmazza a λ DE3 profágot (ami a T7 RNS-polimeráz lacUV5 promoter kontrollja alatt álló génjét tartalmazó rekombináns fág), így alkalmas a pET vektorba klónozott, T7 promoterral rendelkező gének kifejezésére. Azonban a polimeráznak indukció nélkül is van egy csekély szintű átíródása, ezért létrehozták a BL21(DE3)pLysS vonalat, amely a T7 bakteriofág lizozimjét kódoló plazmidot tartalmaz (ezt jelöli a pLysS kód) (Zhang és Studier 1997). A plazmid megtartásáról klóramfenikolrezisztencia-gén gondoskodik. A T7 bakteriofág lizozimje a T7 RNS-polimerázához kötődve gátolja a transzkripció iniciációját, így visszaszorítja a T7 fág polimerázának indukció előtti működését, ami

⁷ Weblink: <http://www.uniprot.org/uniprot/P09169>. A fehérje neve az angol *outer membrane protease T* elnevezés rövidítése

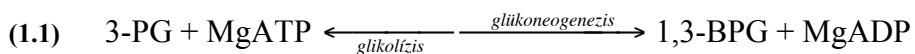
⁸ Weblink: <http://www.uniprot.org/uniprot/P0A9M0>. A fehérje teljes neve ATP-dependens proteáz La.

stabilizálja a pET-vektort hordozó sejtet, lehetővé téve a túlélést és a növekedést. A Novagen annyiban fejlesztette tovább ezt a vonalat (melyet Rosetta™ néven forgalmaz), hogy a T7 lizozim plazmidján az eukarióta génekben gyakori, de a prokariótákban ritka kodonokhoz tartozó tRNS-ek génjét is hordozza azok természetes promoterével, ami drasztikusan megnövelte az ilyen kódokat tartalmazó gének kifejezésének hatékonyságát (Kane 1995).

A vektorként használt pET28 vektor őse az *E. coli* eredetű pET vektor, amely a T7 bakteriofág rendkívül aktív RNS-polimerázát alkalmazza. A T7 RNS-polimerázának promoterét az *E. coli* gazdasejt RNS-polimeráza nem ismeri fel, így anélkül tartható fenn a célgént hordozó DNS jelenléte, hogy az akár csak csekély mértékben is kifejeződne. A vektor tartalmaz még egy lac-promotert és operátort, amellyel kontrollálható a célgén kifejezése, egy polilinkerrégiót, ahova klónozás során a célgén beépül, valamint a plazmid fenntartását garantáló ampicillinrezisztencia-gént. A pET28 vektor ehhez képest abban tér el, hogy egy hat hisztidinből és trombin vágóhelyből álló szakasszal bővíti a célfehérje génjét, illetve az ampicillin helyett kanamicinra érzékeny a rezisztencia-gén.

1.4. Az élesztőfoszfoglicerátkináz mint a fehérjekinetikai vizsgálatok modellje

A foszfoglicerátkinázok (PGK) (EC 2.7.2.3)⁹ olyan transzferázok, melyek az alábbi reverzibilis reakcióban katalizálják a foszforiltranszfert:



E reakció a glikolízis, illetve a glükoneogenezis részét képezi; alapvető szerepe van az ATP-szintézisben, a fermentációban és a szénmegkötésben. A PGK izoenzimek valamennyi élőlényben megtalálhatók, szekvenciájuk – különösen a szubsztrátkötő régiókban – és térszerkezetük meglehetősen konzervatív (Blake és Rice 1981; Mori és mtsai 1986).

A különféle PGK izoenzimek mintegy 400 aminosavból álló monomer fehérjék, hozzávetőleges relatív tömegük 45 000. Térszerkezetük két nagyobb szerkezeti egységből, az N- és a C-doménből áll, a két domént egy körülbelül öt aminosavnyi lánc

⁹ Az EC-szám (*Enzyme Commission number*) az *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* nevezéktani bizottsága által létrehozott, a katalizált reakció típusát alapul vevő konvenció az enzimtípusok jelölésére

kapcsolja össze. A C-terminális 15 aminosavnyi szakasz visszanyúl az N-doménbe annak szerves részét képezve, a megelőző tíz aminosav pedig α -hélixszé pöndörödve a két domén között helyezkedik el. Mindkét domén központjában található egy α -hélixekkel körülvett, hat szakaszból álló paralel β -redő. Az N-domén β -redőjében a szakaszok primer szekvenciában való előfordulásuk szerinti sorrendje 3-4-2-1-5-6, míg ugyanez a C-doménben 3-2-1-4-5-6. A két domén foldingegységként is működik, amit az egyetlen natív szerkezetű domént tartalmazó foldingköztitermékek létezése igazol (Yon és mtsai 1990).

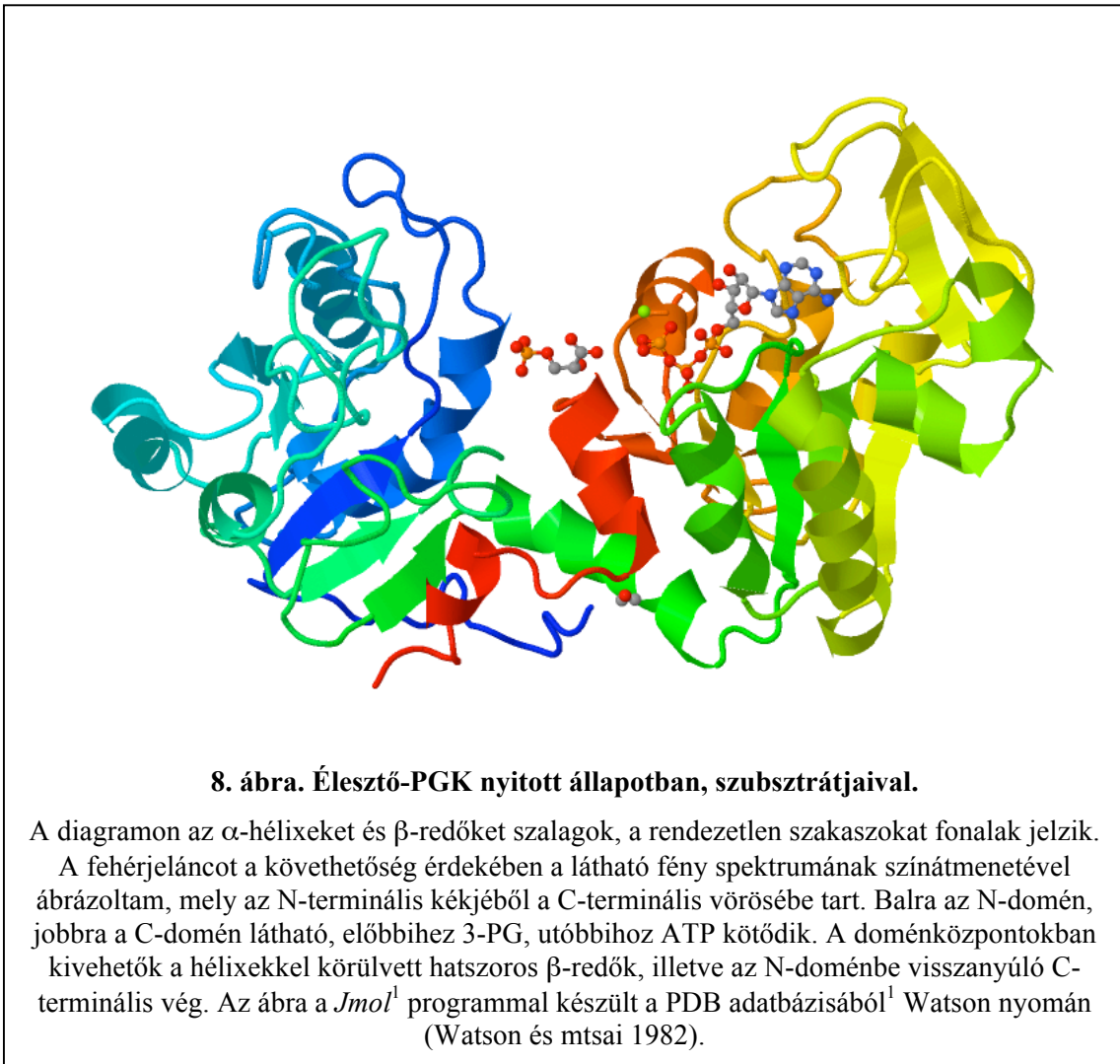
A 3-foszfoglicerát, illetve 1,3-biszfoszfoglicerát az N-doménbe, míg a nukleotid a C-doménbe kötődik. A fiziológias körülményeknek megfelelő pH-n három-négy nettó negatív töltéssel rendelkező triózsármazék kötőhelyét három argininoldallánc alkotja, míg a nukleotidkötő helyet egy lizin és egy glutamát (továbbá fajtól függően egy aszparagin) oldallánca és egy glicin karbonilcsoportja képezi. Az enzim működését élénk konformációváltozás, a domének csuklószerű mozgása kíséri. Szubsztrátok hiányában a két domén egymástól távol, nyitott állapotban helyezkedik el. A szubsztrátok bekötődése után a domének összecukódnak, ami lehetővé teszi a katalitikus reakció lezajlását. A domének záródása nem csak a szubsztrátok közelítése miatt fontos, hanem azért is, mert így kiszorul a víz a reakciócentrumból megteremtve az ideális dielektromos környezetet és csökkentve a hidrolitikus mellékreakciók valószínűségét (Banks és mtsai 1979; Kumar és mtsai 1999).

A sörélesztő (*Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E. C. Hansen) foszfoglicerátkináz enzime (UniProt P00560)¹⁰ 415 aminosavból áll, relatív tömege 44 607 (Watson és mtsai 1982; Perkins és mtsai 1983).¹¹ Másodlagos szerkezetét 20 α -hélix, 19 β -redő és 3 kanyar alkotja (8. ábra). E fehérjét kiterjedten használják fehérjekinetikai vizsgálatok során, aminek oka többek között az alaposan feltárt és viszonylag stabil szerkezet; a kétdoménes térszerkezet, ami lehetőséget ad a csuklómozgás, illetve a foldingegységek kölcsönhatásának vizsgálatára; a denaturált fehérje renaturálhatósága, ami a refoldingkinetikai vizsgálatok alapja; végül pedig az, hogy – bár amiloidózisban nem érintett – lehetséges belőle amiloidaggregátumokat

¹⁰ Weblink: <http://www.uniprot.org/uniprot/P00560>. A UniProt (*Universal Protein Resource*) a legátfogóbb nemzetközi fehérjeadatbázis, mely a benne szereplő fehérjeszerkezeteket egy hat alfanumerikus karakterből álló hozzáférési kóddal (*UniProt accession number*) azonosítja

¹¹ Az N-terminális metionin posztranszlációs lehasítása után. A teljes fehérje 416 aminosavból áll, relatív tömege 44 738

előállítani, ami lehetővé teszi a misfolding- és amiloidképződés-kinetikai vizsgálatokat. A fehérje viszonylag jól tűri a mutációkat, így bevihető a fluorofor triptofán vagy a tiolreaktív fluoroforokkal jelölhető cisztein. A vad típusban két triptofán (W308 és W333, mindkettő a C-doménben) található, ezeket a harmadlagos szerkezet megtartásával le lehet cserélni spektroszkópiailag passzív fenilalaninra (Szpikowska és mtsai 1994).



1.4.1. Az élesztő PGK foldingja

Az élesztő-PGK natív konformációja többféle denaturált állapotból is helyreállítható, így hő, hideg, sav, urea és guanidínium-klorid okozta denaturáció után is renaturálható a fehérje (Damaschun és mtsai 1998; Gast és mtsai 1993; Missiakas és mtsai 1990). A renaturáció során lezajló folding gyors (néhány ms alatt lezajló)

kollapszussal kezdődik, kialakul egy hiperfluoreszcens átmeneti termék (olvadt gombóc), majd néhány percen belül létrejön a natív térszerkezet (Lillo és mtsai 1998; Ptitsyn és mtsai 1990; Betton és mtsai 1992).

A fehérjekinetika leírására használt energiefelszín-modellek közül az egyik legérdekesebb a hierarchikusan felépülő modell, amely elnyújtott, nem exponenciális foldingkinetikát eredményez. Az unfolded–intermedier átalakulásra például a következő képletek használhatók (Metzler és mtsai 1999), amelyek az átalakulási átmenetek N véges számú hierarchikus szintjét (ún. Debye-járulékát) feltételezik:

$$(1.2) \quad f(t) = \sum_{n=1}^N \frac{a_n}{\tau_n} e^{-t/\tau_n} = \sum_{n=1}^N \mu_n e^{-t/\tau_n}$$

$$(1.3) \quad a_n = a_1 \cdot \alpha^{n-1}$$

$$(1.4) \quad \tau_n = \tau_1 \cdot \lambda^{n-1}$$

ahol $f(t)$ a fehérje kiindulási állapotának (ez rendszerint a kitekert, avagy unfolded állapot) a koncentrációja a t időpontban, τ_n az átalakulás n -ik Debye-járulékának (szintjének) időállandója, a_n pedig az amplitúdója (az a_n / τ_n hányadost szokás μ_n -nel is jelölni), α és λ pedig az együtthatók skálafaktorai (tkp. a mértani sor kvóciensei). Ezt a modellt sikeresen használták a PGK-folding korai szakaszának leírására (Osvath és mtsai 2006a). Az intermedier továbbalakulása natív fehérjévé egy egylépéses exponenciális egyenlettel írható le.

1.4.2. Az élesztő PGK amiloidképzése

Az amiloidképződés során fellépő fehérjekoaguláció leírható mérettől független sebességi állandókat tartalmazó kinetikai egyenlettel (Smoluchowski 1917; Modler és mtsai 2003). A Smoluchowski-féle koagulációs egyenlet megadja az x monomerből álló aggregátum (továbbiakban x -mer) képződési sebességét a következő feltételek teljesülése esetén:

1. Bármely tetszőleges y és $x-y$ elemű aggregátum (továbbiakban y -mer, illetve $x-y$ -mer) egyesülésének $K_{y,x-y}$ sebességi állandója azonos, következésképpen, $K_{y,x-y} = K_{x-y,y}$ az y - és $x-y$ -merek ütközése során valamennyi lehetséges konfigurációs és orientációs állapotra vonatkozó sebességi állandók átlaga.

2. Az aggregátumokat összetartó kötések felbonthatatlanok, az aggregáció egyirányú.

3. A vizsgált rendszerben valamennyi aggregátum eloszlása egyenletes, vagyis a koncentráció a vizsgált minta minden pontjában azonos.

4. A reakcióelegy kellően híg ahhoz, hogy feltételezzük, három vagy több aggregátum nem ütközik egyszerre, vagyis valamennyi reakció „bimolekuláris”.

Az általános $a + b \rightarrow c$ bimolekuláris reakció kinetikai egyenlete:

$$(1.5) \quad \frac{\Delta n_c}{\Delta t} = K_{a,b} \cdot n_a \cdot n_b,$$

ahol n_a , n_b és n_c a reaktánsok és termékek koncentrációja, $K_{a,b}$ pedig a sebességi állandó. Az x monomerből álló aggregátumok (x -merek) koncentrációváltozási sebességének megadásakor figyelembe kell vennünk egyfelől x képződését y és $x-y$ merekből:

$$(1.6) \quad \frac{1}{2} \sum_{y=1}^{x-1} K_{y,x-y} \cdot n_y(t) \cdot n_{x-y}(t),$$

ahol $n_y(t)$ az y -merek, $n_{x-y}(t)$ az $x-y$ -merek koncentrációja a t időpillanatban, $K_{y,x-y}$ a sebességi állandó, y a futóindex, vagyis az összeg az összes olyan reakciót magában foglalja, amely az x két tagra bontásával (y és $x-y$) létrejövő számpárnak megfelelő monomerszámú reaktánsból indul ki. Mivel y értéke 1-től $x-1$ -ig nő, ezért $x-y$ értéke ezzel párhuzamosan $x-1$ -től 1-ig csökken, ami azt jelenti, hogy valamennyi lehetséges reakció kétszer fordul elő, ezért a kapott összeget el kell feleznünk.

Számolnunk kell továbbá az x -merek fogyásával is, ami más aggregátumokkal (jelöljük itt is y -nal) való egyesülésük, vagyis továbbnövekedésük miatt következik be. Ezen továbbnövekedés sebessége is bimolekuláris reakciókkal írható le:

$$(1.7) \quad \sum_{y=1}^{\infty} K_{x,y} \cdot n_x(t) \cdot n_y(t) = n_x(t) \cdot \sum_{y=1}^{\infty} K_{x,y} \cdot n_y(t),$$

ahol $n_x(t)$ és $n_y(t)$ ismét a reaktánsok t időpillanatban mért koncentrációját jelöli, $K_{x,y}$ pedig a sebességi állandót. Itt is y a futóindex, mely most egytől végtelenig nő. Mivel $n_x(t)$ értéke minden tagban ugyanaz, kiemelhető a szummajel elé. Az x -merek képződési és fogyási sebességének összege megadja az eredő koncentrációváltozási sebességet:

$$(1.8) \quad \frac{\Delta n_x(t)}{\Delta t} = \frac{1}{2} \sum_{y=1}^{x-1} K_{y,x-y} \cdot n_y(t) \cdot n_{x-y}(t) - n_x(t) \cdot \sum_{y=1}^{\infty} K_{x,y} \cdot n_y(t).$$

A K sebességi állandó, melynek a reaktánsok méretétől való függése bizonyos feltételek mellett elhanyagolható, az aggregációs mechanizmus minden fizikokémiai információját magában foglalja. Feltételezve, hogy a reaktánsok Brown-mozgást

végeznek, a sebességi állandó megadható a következő összefüggéssel:

$$(1.9) \quad K_{y,x-y} = 4\pi \cdot (R_{(g)y} + R_{(g)x-y}) \cdot (D_y + D_{x-y}),$$

ahol $R_{(g)}$ a geometriai sugár, D pedig a diffúziós koefficiens. A diffúziós koefficiensre érvényes a Stokes–Einstein-egyenlet:

$$(1.10) \quad D = \frac{k_B T}{6\pi \cdot \eta \cdot R_{(h)}},$$

ahol k_B a Boltzmann-állandó, T a hőmérséklet, η a közeg viszkozitása, végül $R_{(h)}$ a szóban forgó részecske hidrodinamikai sugara. Tegyük fel, hogy az aggregátumok monomerszámának növelésével mind a geometriai, mind a hidrodinamikai sugár hatványfüggvényt követve nő, vagyis a geometriai és a hidrodinamikai sugár a monomerszám valamekkora hatványa. Ez esetben a geometriai sugárról elmondható, hogy:

$$(1.11) \quad R_{(g)i} = R_{(g)1} \cdot i^{\frac{1}{d_{(g)}}},$$

ahol $R_{(g)1}$ egyetlen monomer, $R_{(g)i}$ pedig az i monomerből álló aggregátum geometriai sugara, $d_{(g)}$ a részecskék geometriai tulajdonságával kapcsolatos paraméter, végül i a futóindex. Hasonlóan jellemezhető a hidrodinamikai sugár viselkedése is:

$$(1.12) \quad R_{(h)i} = R_{(h)1} \cdot i^{\frac{1}{d_{(h)}}},$$

ahol $d_{(h)}$ a részecskék hidrodinamikai tulajdonságát jellemző paraméter. Ezt behelyettesítve a Stokes–Einstein-egyenletbe

$$(1.13) \quad D_i = \frac{k_B T}{6\pi \cdot \eta \cdot R_{(h)i}} = \frac{k_B T}{6\pi \cdot \eta \cdot R_{(h)1} \cdot i^{\frac{1}{d_{(h)}}}} = \frac{k_B T \cdot i^{-\frac{1}{d_{(h)}}}}{6\pi \cdot \eta \cdot R_{(h)1}}$$

formulát kapjuk. A (1.8), (1.9) és (1.13) egyenletekből levezethető a következő képlet:

$$(1.14) \quad n_i(t) = n_1(0) \cdot \frac{(t/t_c)^{i-1}}{(1+t/t_c)^{i+1}},$$

ahol $n_i(t)$ az i -merek koncentrációja a t időpontban, $n_1(0)$ a monomerek száma a 0 időpontban (vagyis a bemérési PGK-koncentráció), t_c pedig a koagulációs időállandó.

2. Célkitűzések

A ma ismert amiloidózisok mindegyike végzetes betegség függetlenül attól, hogy az amiloidok oki vagy kísérő tényezők. Az amiloidok képződésének és szétesésének vizsgálatával, e folyamatok irányát és kinetikáját meghatározó paraméterek megismerésével közelebb jutunk a farmakológiailag releváns támadáspontok azonosításához, ami megnöveli az esélyt az oki terápiák kidolgozására. Az élő szervezetben lejátszódó folyamatok molekuláris szinten csak rendkívül korlátozottan vizsgálhatók, ezért egy szerencsésen megválasztott modellfehérjén végzett *in vitro* kísérletek jelentik a kutatások kézenfekvő irányát.

A domének közötti kölcsönhatások szerepe a natív szerkezet elérésében már ismert. A polipeptidlánc távolabbi szakaszai közötti interakcióknak az amiloidképződésre is lehet hatása, hiszen ennek bevezető lépése a natív szerkezet felbomlása. Az amiloidok stabilitása közismert, bár újabban értek el sikeres diszaggregációt. A szétesés határfokát azonban még nem vizsgálták, pedig a natív formában visszanyerhető fehérje mennyisége és minősége árulkodhat az amiloidba zárt fehérje elsődleges szerkezetének stabilitásáról.

Egy denaturált fehérje esetében egyetlen paraméter megváltoztatásával is elérhetjük a natív konformációt, de az amiloidszerkezet kialakulását is. Ha megvizsgáljuk a paraméter változásának hatását mindkét folyamat kinetikájára, megtudhatjuk, hogy melyik vagy melyek azok a döntő tényezők, amelyek meghatározzák a szerkezetváltozás irányát.

Kutatásaim során a következő célokat tűztem ki:

- I. *A PGK doménjei közötti kölcsönhatások hatásának vizsgálata az amiloidképződésre.*
 - I.1. Amiloidok létrehozása a fehérjerendszer elemeiből: a fehérjedoménekből és a triptofánmutáns teljes fehérjékből.
 - I.2. Alkalmos matematikai modell keresése az amiloidképződés leírására az azt kísérő fluoreszcenciaváltozás mint jel alkalmazásával.
 - I.3. Az izolált domének és a teljes fehérje amiloidképzésének összevetése.
- II. *Natív fehérje visszanyerése a PGK-ból létrehozott amiloidfibrillumokból.*
 - II.1. Amiloid előállítása PGK-ból és az amiloiddá alakítás határfokának

megállapítása.

- II.2. Alkalmas körülmények keresése a PGK-amiloidok tökéletes elbontásához és a natív fehérje visszanyeréséhez.
 - II.3. A kiindulási és a visszanyert fehérje biológiai egyenértékűségének vizsgálata fizikai és biokémiai módszerekkel.
 - II.4. A működőképes fehérje visszanyerési határfokának meghatározása.
- III. Azon folyamatok kinetikájának vizsgálata, melynek során a savval denaturált PGK natív, illetve amiloid szerkezetté alakul.*
- III.1. Olyan oldatkörülmények létrehozása, melyben egyetlen paraméter megváltoztatásával befolyásolható, hogy a savval denaturált PGK natív vagy amiloidszerkezetté alakuljon.
 - III.2. A kialakuló szerkezet meghatározása a paraméter különféle értékeinél.
 - III.3. Matematikai módszer keresése a natív szerkezet és az amiloid kialakulásának leírásához valamely spektroszkópiával mérhető jel felhasználásával.
 - III.4. A natív szerkezet és az amiloid képződési kinetikájának elemzése a modell segítségével megállapított paraméterek alapján, különös tekintettel a folyamatok esetleges közös lépéseire, a szétválási pontra és a folyamat irányát megszabó tényezők azonosítására.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Anyagok

Az oldatkészítéshez használt víz ioncserélt csapvíz volt, melynek fajlagos vezetőképessége 0,056 $\mu\text{S}/\text{cm}$ alatti. Egyes esetekben ennél nagyobb tisztaságú, Millipore rendszeren szűrt vizet használtam, ez mikroorganizmusoktól, pirogének-től és fehérjeszennyeződésektől is mentes.

3.1.1. Fehérjekifejezés során használt anyagok

A vektor pET28a típusú plazmid, mely a célfehérje DNS-ét oly módon tartalmazza, hogy az N-terminálist megelőzően 6 hisztidin (és az ezek lehasítását lehetővé tevő trombinkötő vágóhely) is átíródjon, amely később a fehérjetisztítást segíti. A vektorokat témavezetőm, Osváth Szabolcs bocsátotta rendelkezésemre. Gazdasejtként BL21(DE3)pLysS (Rosetta™, Novagen) kompetens sejtet használtam.

A felhasznált tápoldatok és törzsoldatok készítése a következő:

LB¹²-tápoldat: literenként 10 g tripton (tripszinnel bontott kazein granulált formában; aminosavforrás), 5 g élesztőkivonatot (sörélesztő feltört sejtjeinek vizes kivonata granulált formában; aminosav-, szénhidrát- és vitaminforrás) és 10 g nátrium-kloridot mértem be, a vizet hozzáadtam, feloldás után a pH-ját 7,0-re állítottam. Autoklávozás után 4 °C-on tároltam.

LB-agar-táptalaj: az LB tápoldathoz hasonlóan literenként 10 g tripton, 5 g élesztőkivonatot és 10 g nátrium-kloridot mértem be, vizes oldás után beállítottam a pH-t 7,0-re. Ezután bemértem 15 g agart, amit keveréssel szuszpendáltam. Autoklávozás után kíméletes keverés mellett megfelelő ütemben hűlt ki az oldat. A hőérzékenység miatt a kívánt antibiotikum törzsoldatát csak 60 °C alatt adtam az oldathoz, majd steril Petri-csészékbe szétöltöttem. A lehűlt táptalajokat parafilm-mel védtem a kiszáradástól, 4 °C-on tároltam.

2×YT¹³-tápoldat: literenként 16 g tripton, 10 g élesztőkivonatot, 5 g nátrium-kloridot mértem be, vizet adtam hozzá és az oldat pH-ját 7,0-re állítottam. Autoklávozás után 4 °C-on tároltam.

¹² Az angol *lysogeny broth* (lizogén tápoldat) kifejezés rövidítése

¹³ A *yeast extract* (élesztőkivonat) és *tryptone* (tripton) kifejezések rövidítéséből

NZY¹⁴-tápoldat: literenként 10 g *N-Z-Amine*TM A-t (hidrolizált kazein; aminosavforrás), 5 g élesztőkivonatot, 10 g NaCl-t mértem be, vizet adtam hozzá. Az oldat pH-ját 7,5-re állítottam. Autoklávozás után 4 °C-on tároltam.

NZY+-tápoldat: 1 ml NZY tápoldathoz 12,5 µl 1 M-os sterilre szűrt (0,22 µm Millex Ø 33 mm hidrofil poli(éterszulfon) egyszer használatos membránszűrő, Millipore) MgCl₂-oldatot, 12,5 µl 1 M-os sterilre szűrt (Millex) MgSO₄-oldatot és 15 µl 20%-os sterilre szűrt (Millex) glükózoldatot adtam. Keverés után szűréssel (Millex) csíramentesítettem. Az oldatot felhasználás előtt frissen készítettem.

Klóramfenikol-törzsoldat (1000×): milliliterenként 34,0 mg klóramfenikolt mértem be, etanolban oldottam, -20 °C-on tároltam. Felhasználáskor a tápoldathoz literenként 1 ml antibiotikum-törzsoldatot adtam.

Kanamicin-törzsoldat (1000×): milliliterenként 30 mg kanamicin-szulfátot mértem be, majd vízzel végtérfogatra töltöttem, 0,22 µm szűrőn (Millex) szűrtem és -20 °C-on tároltam. Felhasználáskor 1 liter tápoldathoz 1 ml törzsoldatot adtam.

IPTG-törzsoldat (1000×): milliliterenként 200 mg izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranozidot mértem be, oldószerként vizet használtam, 0,22 µm szűrővel (Millex) szűrtem, tárolás -20 °C-on történt. Felhasználáskor 1 liter tápoldatra 1 ml törzsoldatot számítottam.

3.1.2. Fehérjetisztítás során használt anyagok

Kromatográfiához használt állófázis: Ni-NTA Superflow gyanta nikkelaaffinitás-kromatográfiához, mely szefaróz mátrixhoz kötött, nikkellel telített nitrilotriecetsavat tartalmaz vizes szuszpenzióban.

A-mosó: nátrium-kloridra nézve 0,5 M, nátrium-dihidrogénfoszfátra nézve 0,05 M koncentrációjú vizes oldat, pH = 8,0. Felhasználásig 4 °C-on tároltam.

B-mosó: mint az A-puffer, de 0,2 M imidazolt is tartalmaz; pH-ja szintén 8,0. 4 °C-on tároltam.

3.1.3. Aktivitásméréshez használt anyagok

A PGK aktivitásmérését sok tényező befolyásolja, így a felhasznált törzsoldatoknál nagy bemérési pontosságra kell törekedni, illetve célszerű egyszerre nagyobb mennyiséget készíteni, melyet aliquotokra osztunk szét. Ezeket a

¹⁴ Az *N-Z-Amine* és *yeast extract* (élesztő) kifejezésekből

komponensek bomlékonysága miatt alacsony hőmérsékleten ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) tarthatjuk el. Az oldatokat felhasználás során is jégen kell tartani. Többségük az újrafagyasztást rosszul tűri (bomlik, illetve kicsapódik), ezért célszerű kis térfogatú aliquotokat készíteni.

DTT törzsoldat (1 M): a ditio-treitol redukálószer vízzel készült törzsoldata.

Alappuffer: 50 mM Tris, 1 mM EDTA és 1 mM DTT tartalmú vizes oldat, pH-ja 7,0–7,5. A DTT-t csak a mérés megkezdése előtt adtam hozzá törzsoldatból.

ATP-törzsoldatsor (500 mM, 50 mM, 5 mM): az oldatsor elkészítésével széles koncentrációtartományban állt rendelkezésre a PGK egyik szubsztrátja. Először a legtöményebb (500 mM) törzset készítettem el: az ATP-t vízben oldottam, az eredetileg savanyú oldat pH-ját 7,0-re állítottam (a bomlékony ATP ezen a pH-n a legstabilabb). Az ATP-koncentrációt spektrofotométerrel ellenőriztem, majd elkészítettem a hígítási sort.

3-PG-törzsoldatsor (500 mM, 50 mM, 5 mM): a PGK másik szubsztrátjának vizesoldat-sora. Először az 500 mM-os törzset készítettem el, majd a hígításokat. Mivel a 3-foszfoglicerát extinkciója nem elegendő a koncentráció-meghatározáshoz, itt különösen ügyelni kellett a pontos bemérésre és oldatkészítésre.

MgCl₂-törzsoldat (500 mM): az ATP optimális működéséhez szükséges magnéziumionokat biztosítja; vizes oldással készül.

NADH-törzsoldat (10 mM): az igen bomlékony dinukleotid a GAPDH szubsztrátja, az aktivitásmérés során a spektroszkópiailag aktív komponens. A törzsoldat egyszerű vizes oldással készül.

GAPDH-törzsoldat (4 µg/ml): a segédenzim vizes oldata sem igényel pH-beállítást, pontos koncentrációját spektrofotométerrel határoztam meg. Lefagyasztása más fehérjemintákhoz hasonlóan körültekintést igényel: folyékony nitrogénbe merített centrifugacsőbe fecskendeztem kis részletekben.

3.1.4. Energiafelszín-méréseknél felhasznált anyagok

Pufferelt sóoldat: nátrium-kloridra nézve 200 mM-os, citrátra és foszfátra nézve 10–10 mM-os koncentrációjú vizes oldat. A citrátot citromsav-monohidrát, a foszfátot NaH₂PO₄ · H₂O formájában mértem be, majd beállítottam a kívánt pH-értéket. Az elkészített oldatrészleteket 0,22 µm-es szűrővel (Millex) sterilre szűrtem és lefagyasztás után $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltam.

Tioflavin-T-oldat: a vizes oldat ThT-re nézve 20 µM-os, foszfátra (amit

NaH₂PO₄ · H₂O formájában vittem be) nézve 200 mM-os, NaCl-ra nézve 100 mM-os. Az oldat pH-ját 7,25-ra állítottam.

3.2. Módszerek

3.2.1. Fehérjekifejezés

A transzformációt és kifejezést a kompetens sejt gyártója által ajánlott protokoll kisebb módosításával végeztem. 35 µL –80 °C-on tárolt kompetens sejtet jégen kásásodásig olvasztottam, majd 0,7 µL szintén –80 °C-on tárolt és felolvasztott plazmid hozzáadása után 30 percig jégen inkubáltam, majd 45 másodpercig 42 °C-os vízfürdőben rázogatva hőimpulzusnak tettem ki. Ezt követően ismét jégen tartottam 2 percig, majd 350 µL frissen készült steril NZY+ tápoldatot adtam hozzá. Ezt 1 órányi rázás követte 37 °C-on, majd kanamicint és klóramfenikolt tartalmazó steril LB-agar táptalajra szélesztettem, és egy éjszakán át hagytam nőni.

Másnap indítótenyészeteket készítettem: 40 ml steril 2×YT tápoldathoz kanamicint, klóramfenikolt és 2 ml 20%-os glükóz-oldatot adtam, a tenyészet egyetlen izolált telepéről vett sejtekkel beoltottam, és egy éjszakán át 37 °C-on rázatva tenyésztettem.

Következő nap indítottam a fehérjeexpresszáló tenyészeteket: 4×1 liter 2×YT táptalajhoz kanamicint, klóramfenikolt és 200 ml 20%-os glükóz-oldatot adtam, az indítótenyészetből inokuláltam, 37 °C-on rázattam. 4 óra után IPTG-vel indukáltam a fehérjeexpressziót, majd újabb 3,5-4 órás rázatás következett. Ezek után centrifugálással (Hermle Z 383 K, 3000 RCF¹⁵, 20 perc, + 4 °C) ülepítettem a sejteket (a nedves ösztömeg ekkor rendszerint 10-20 g körüli), majd proteázinhibitorokat tartalmazó tablettát (Complete, EDTA-free – Roche) A-mosóval készült oldatával szuszpendáltam és –80 °C-on tároltam.

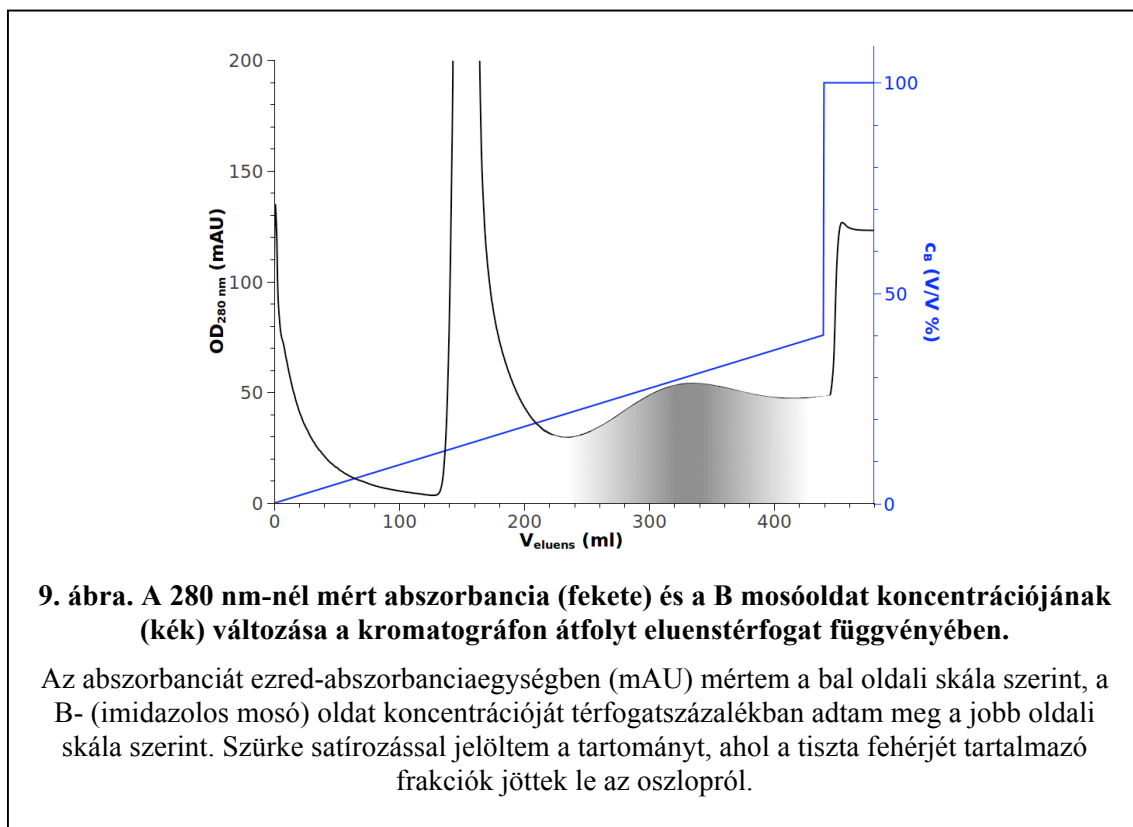
3.2.2. Fehérjetisztítás

A célfehérjét tartalmazó mélyhűtött sejtuszpenziót szobahőmérsékleten felolvasztottam, és a sejteket ultrahanggal feltörtem (SANYO MSE Soniprep 150; 2×2 perc, 23 kHz, amplitúdó: 20 µm, hűtés jégen). A sejtörmelékét 60 percig centrifugáltam, majd a felülúszót ismét 60 percig centrifugáltam (Hermle Z 383 K,

¹⁵ A *relative centrifugal force* (relatív centrifugális erő) angol kifejezés rövidítéséből, mely a centrifugális és a gravitációs gyorsulás arányával egyenlő

mindkét esetben 27 000 RCF, + 4 °C), ezután a felülúszót 0,22 µm-es szűrővel (Millex) szűrtem. A szűrlet tartalmazza a célfehérjét. Következőnek annyi A-mosóoldatot adtam hozzá, hogy a pH legalább 6,5 legyen. A célfehérjét folyadékkromatográfiával szeparáltam. Ehhez nagy teljesítményű FPLC berendezést (ÄKTApurifier, GE Healthcare) és nikkelaaffinitás-mátrixot (Ni-NTA, Qiagen) használtam.

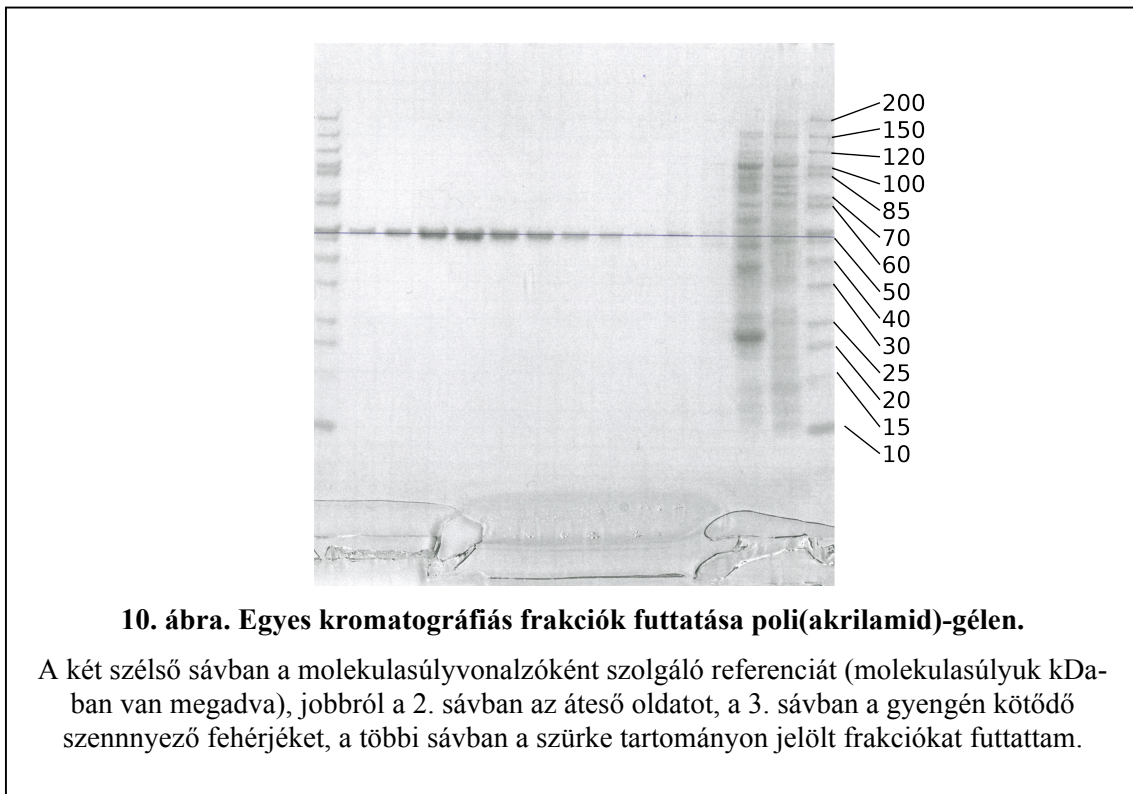
Az FPLC (*fast protein liquid chromatography*; gyors fehérje-folyadékkromatográfia) lényegében egy nagy teljesítményű HPLC (*high pressure liquid chromatography*; nagynyomású folyadékkromatográfia), melyet fehérjék preparatív mennyiségben történő tisztítására optimalizáltak. A készülék két pár beszívócsővel rendelkezik, amelyek lehetővé teszik a felszívandó folyadékok közti gyors váltást, és két folyadék fokozatosan változó arányú keverését, ami koncentrációgrádienses elúciót tesz lehetővé. A készülék egy kétegységes pumpával van felszerelve, ami egyenletes folyadékáramot tesz lehetővé. További alkatrészek a nyomásdetektor, az ionerősség és



pH-mérő, valamint egy UV-abszorpciómérő, amely 280 nm-nél detektál. Az állófázison, majd a detektorokon áthaladó folyadék egy frakciószedőbe kerül. Az egész

rendszer számítógéppel vezérelhető, valamint előre megírt kromatográfias programot is lehet rajta futtatni. A kromatográfia során a detektorok által mért értékekről adatfájl készül. A készüléket, az eluenspuffereket és a frakciószedőt – elkerülendő a fehérje bomlását – 4 °C-os hűtőben helyeztem el.

A mintegy 12 ml-nyi gyantával töltött oszlopra felvittem a fehérjét tartalmazó oldatot, majd annyi A-pufferrel mostam át az oszlopot, hogy a 280 nm-nél mért abszorbancia 0,1 alá csökkenjen, így eltávolítottam a nem specifikusan kötődő komponenseket. Ezután 0-tól 80 mM-ig növekvő imidazolgrádienssel szorítottam le a nikkellehez kötődő fehérjéket, végül 200 mM imidazzal (tiszta B-mosóoldat) mostam az oszlopot. A 9. ábra a 280 nm-en mért abszorbanciát és az imidazolos mosófolyadék koncentrációját mutatja az átfolyt eluenstérfogat függvényében.



10. ábra. Egyes kromatográfias frakciók futtatása poli(akrilamid)-gélen.

A két szélső sávban a molekulatömegvonalzóként szolgáló referenciát (molekulatömegük kDa-ban van megadva), jobbról a 2. sávban az áteső oldatot, a 3. sávban a gyengén kötődő szennyező fehérjéket, a többi sávban a szürke tartományon jelölt frakciókat futtattam.

A következő lépés a célfehérjét tartalmazó frakciók azonosítása volt. A kromatográfia során rögzített abszorbancia–idő–függvény alapján kiválasztottam a valószínűsíthetően a célfehérjét tartalmazó frakciókat, majd kis részletüket poli(akrilamid) gélen megfuttattam. A futtatáshoz előre gyártott gélt (NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel, Invitrogen) használtam, a futtatást 100 mA áramerősség és 140 V

feszültség mellett végeztem egy függőleges elektroforézisrendszeren (Owl P8DS System, Thermo Scientific). Futtatás után Coomassie-kék festékkel hívtam elő a fehérjét, és a mintákkal párhuzamosan futtatott, ismert molekulatömegű fehérjék keverékéből álló fehérjevonalzó (PageRuler, Fermentas) segítségével, relatív molekulatömeg alapján azonosítottam a célfehérjét ténylegesen tartalmazó frakciókat (10. ábra). E frakciókat egyesítettem, ultrafiltrálással a kívánt koncentrációra töményítem. Ultrafiltráláshoz beépített mágneses keverővel ellátott nyomáscellát (Amicon 8200, Millipore) és regenerált cellulózból készült ultrafiltráló membránt (Amicon YM3, Millipore; határ-molekulatömeg: 3000 dalton) alkalmaztam, az ultrafiltráláshoz 3 bar nyomást használtam, az egész procedúrát + 4 °C-on és kevertetés mellett végeztem. A kapott fehérjeoldatot, mely még tartalmazta a kromatográfiánál használt kísérővegyületeket (mindenekelőtt az imidazolt), a kísérletekhez megkívánt oldatközegbe dializáltam. A dialízishez regenerált cellulózból készült dialízismembránt (ZelluTrans, Carl Roth; határ-molekulatömeg: 8000–10 000 dalton) használtam, mely glicerines oldattal átítatva kerül forgalomba; ezt és a gyártás során bekerülő egyéb anyagokat (pl. fémionok) a gyártó által előírt mosóoldattal távolítottam el, majd alapos vizes öblítés következett. Az előkészített membránba töltött fehérjepreparátumot többszöri (8–10) oldatváltással dializáltam a kívánt oldatközegbe (hőmérséklet: + 4 °C). Ezt követte egy koncentrációmérés, amelynek eredményét felhasználva a dializáló pufferrel a kívánt értékre állítottam a fehérjekoncentrációt. Végül a fehérjeoldatot 1 ml-es részletekben folyékony nitrogénben villámgyorsan lefagyasztottam és – 80 °C-on tároltam.

3.2.3. Spektrofotometriás koncentrációmeghatározás

Koncentráció-meghatározáshoz spektrofotometriás abszorbanciamérést használtam. A referenciaoldat a mérendő anyagot kivéve mindenben egyezett a mintával; a meghatározandó oldatot úgy hígítottam, hogy az abszorbancia 0,1–1,0 közé essen, mivel ebben a tartományban a műszer érzékenysége és linearitása is optimális. A méréseket egy látható és UV-fényben működő spektrofotométeren (Cary 4E UV-VIS spectrophotometer, Varian) végeztem. A koncentrációszámításhoz felhasznált extinkciós együtthatókat az 1. táblázat tartalmazza.

1. táblázat. Egyes anyagok extinkciós együtthatói.

Az első oszlopban szerepel a mérési hullámhossz (λ), a másodikban a vizes közegre érvényes dekadikus moláris extinkciós együttható (ϵ). Az ATP és a NADH abszorbanciája az irodalomból vett adat. (Glynn és Chappell 1964; Sanders és mtsai 1997) A fehérjékre vonatkozó értéket a bennük található triptofán-, tirozin- és cisztin-csoportok száma alapján becsültem. (Edelhoc 1967; Gill és von Hippel 1989; Pace és mtsai 1995)

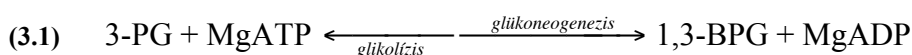
anyag	λ (nm)	ϵ ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$)
NADH	340	6220
ATP	259	15 400
vad típusú PGK	280	22 062
N-jelölt PGK	280	14 440
N-domén PGK	280	11 460
C-jelölt PGK	280	15 930
C-domén PGK	280	8480
GAPDH	280	31 689

3.2.4. Doménkölsönhatások kinetikai vizsgálata

A doménkölsönhatások vizsgálata során az amiloidképződést kézi keveréssel indítottam: a pH = 2 HCl-oldatba dializált PGK-preparátumhoz annyi NaCl-törzsoldatot ($c_{NaCl} = 4,2 M$) adtam, hogy a NaCl végkoncentrációja 0,2 M legyen. A keverés után a 17. perctől a 4. napig meghatározott időpontokban fluoreszcenciaspektrumokat vettem fel egy Edinburgh Analytical Instruments C-900 típusú luminométeren. A gerjesztés 295 nm-nél történt 5 nm-es fényforrásoldali résszélességgel, a detektálás 300-400 nm között 0,5 nm-es lépésekben 1 nm-es detektoroldali résszélességgel. A fluorofor a fehérjében található triptofán. A fluoreszcenciaspektrum-eltolódás kvantitatív kiértékeléséhez 310-320 nm és 360-370 nm közötti összintenzitások hányadosát használtam fel.

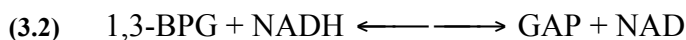
3.2.5. Aktivitásmérés

A PGK a glikolitikus és a glükoneogenetikus útvonal katalizátoraként működik, melyek során a következő megfordítható reakciót katalizálja:



Az aktivitás meghatározásához valamely szubsztrát vagy termék koncentrációváltozását kell mérni, ami célszerűen spektrofotometriával történik. Ennek a reakciónak azonban sem a szubsztrátjai, sem a termékei nem rendelkeznek kellő

mértékű abszorbanciával, így egy segédreakcióra van szükség. A GAPDH a fenti reakció egyik termékét az alábbi reverzibilis reakcióban alakítja tovább:



A NADH-nak már jelentős elnyelése van, így a PGK aktivitásának meghatározása GAPDH segédenzim jelenlétében a NADH fogyásának spektrofotometriás mérésén keresztül történhet.

A kezdeti katalitikus sebesség a Michaelis–Menten-egyenlet szerint függ a szubsztrátkoncentrációtól:

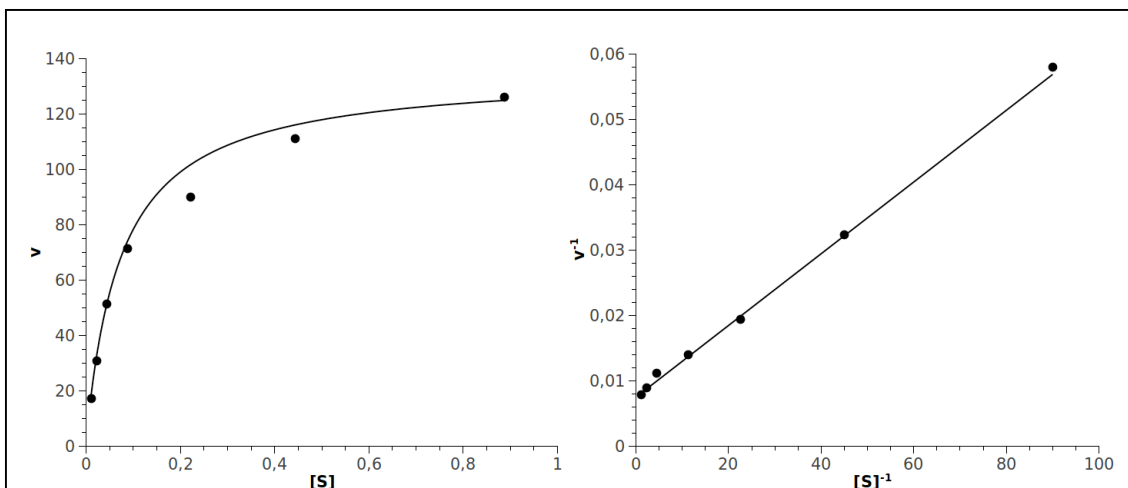
$$(3.3) \quad v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

A függvény két paramétere a maximális kezdeti katalitikus sebesség (v_{\max}) és a Michaelis-konstans (K_M , a maximális kezdeti katalitikus sebesség felének eléréséhez szükséges szubsztrátkoncentráció). Használatos még a k_{cat} paramétert (látszólagos vagy összetett sebességi állandó), mely a v_{\max} és a teljes enzimkoncentráció hányadosa, vagyis a jelenlévő enzimkoncentrációra vonatkoztatva adja meg a maximális kezdeti katalitikus sebességet. A paraméterek meghatározása történhet grafikus úton, ehhez célszerű a görbe egyenletét linearizálni, aminek klasszikus módja a Lineweaver–Burk-, más néven duplareciprok-egyenlet:

$$(3.4) \quad \frac{1}{v} = \frac{1}{[S]} \cdot \frac{K_M}{v_{\max}} + \frac{1}{v_{\max}}$$

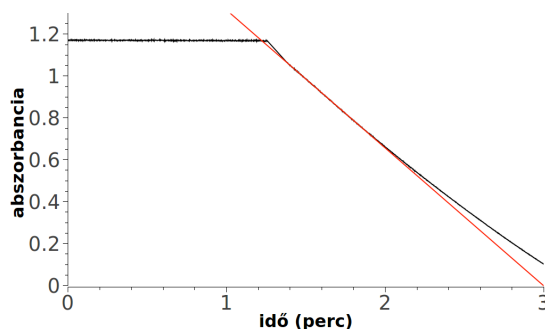
Eszerint a kezdeti sebesség reciprokát a szubsztrátkoncentráció reciprokának függvényében ábrázolva a pontok egy egyenes mentén szóródnak, mely egyenes x- és y-tengelymetszete $-1/K_M$ és $1/v_{\max}$. A paraméterek grafikus meghatározása ma már elavult, mert pontatlan és a transzformáció torzítja a hibát. Számítógéppel lehetséges az eredeti egyenlet közvetlen nemlineáris illesztése. Az értékek duplareciprok ábrázolásával viszont továbbra is szemléltethetjük a Michaelis–Menten-kinetika feltételeinek teljesülését (11. ábra).

Az ábrázolandó értékpárok meghatározását úgy végeztem, hogy különböző szubsztrátkoncentrációknál megmértem a kezdeti katalitikus sebességet (v), vagyis valamelyik szubsztrát vagy termék – esetünkben a NADH – koncentrációváltozását abszorbanciaméréssel. A küvettába (Rotilabo[®] egyszer használatos UV áteresztő poli(metil-metakrilát) küvetta 1 cm fényúttal, Carl Roth) valamennyi összetevőt



11. ábra. A kezdeti katalitikus sebesség hagyományos és dupla reciprok ábrázolása a szubsztrátkoncentráció függvényében.

A baloldali ábrán néhány szubsztrátkoncentrációnál felvett kezdeti katalitikus sebességeket ábrázoltam (mindkettőt relatív egységekben). Az illesztett görbe jól mutatja a függvény telítési jellegét. A jobb oldali ábra ugyanezen értékpárokat és illesztési görbét mutatja duplarciprok (Lineweaver–Burk-féle) ábrázolásban. Ekkor a pontok egy egyenes mentén szóródnak, mely adott esetben igazolja a Michaelis–Menten-kinetika érvényességi feltételeinek teljesülését.



12. ábra. A kezdeti katalitikus sebesség meghatározása.

A grafikonon feketével az abszorbanciát ábrázoltam az idő függvényében. A mérendő enzimminta hozzáadása 1,25 percnél történt, az elkeverés 0,15 percig tartott, az addig eltelt idő alatt mérés nem volt, a fekete vonal itt interpolációval készült. Pirossal a keverés utáni szakaszra illesztett egyenest ábrázoltam, amelynek meredeksége a kezdeti katalitikus sebességgel arányos.

bemértem a PGK kivételével, és elindítottam az abszorbancia időfüggésének mérését ($\lambda = 340 \text{ nm}$, $\Delta t = 1 \text{ s}$). Ha fél perc alatt az abszorbanciaváltozás elhanyagolhatóan csekély volt, akkor ki lehetett zárni a PGK-szennyeződés jelenlétét (ami adódhat például a mérések között nem megfelelően tisztított küvettaból vagy a nem kellően tiszta GAPDH-enzimpreparátumból). Miután erről meggyőződtem, a fotométert egy pillanatra

kinyitva gyors mozdulattal bekevertem a PGK-mintát (ez idő alatt a mérés megszakad, így a művelet kellő rutint és megfelelő keverőeszközt kíván meg). Az abszorbancia-időfüggvény görbéje esésnek indult, a folyamat néhány másodperc alatt lecsengve elérte az egyensúlyt. Az esési görbe elejére (ez azt a szakaszt jelenti, ahol a koncentráció csökkenése lineáris) egyenest illesztettem, és ennek meredeksége (dimenzió: abszorbancia / idő) adta a nyers adatot (12. ábra). A moláris abszorpciós együttható ismeretében az abszorbanciát átszámoltam koncentrációra.

A mérési reakcióelegy összeállításakor ügyelni kellett arra, hogy a katalitikus sebességet a PGK (és ne a GAPDH) aktivitása határozza meg. Ezt úgy lehetett ellenőrizni, hogy az első mérés során valamennyi komponenst telítési koncentrációban mértem be, majd a második mérésnél egyedül a PGK koncentrációját változtattam meg,

2. táblázat. Egy aktivitásmérés vázlatos jegyzőkönyve.

A legfelső sorban található a bemért oldatok elnevezése (a szubsztrátok háromféle hígításban), alatta az oldott anyagok törzsoldatbeli koncentrációja, majd az egyes mérésekhez szükséges bemérési térfogatok.

Oldat típusa	3-PG			ATP			MgCl ₂	NADH	GAPDH	Alappuffer	PGK	Leolvastott abszorbancia-változás (ΔA 1 cm / min)
	1x	10x	100x	1x	10x	100x						
Konc.	500 mM	50 mM	5 mM	500 mM	50 mM	5 mM	500 mM	10 mM	4 mg/L		0,4 μM	
No.	Bemérendő térfogat (μL)											
1	0	20	0	20	0	0	50	12	20	838	40	
2	0	20	0	20	0	0	50	12	20	858	20	
3	0	10	0	20	0	0	50	12	20	848	40	
4	0	5	0	20	0	0	50	12	20	853	40	
5	0	0	20	20	0	0	50	12	20	838	40	
6	0	0	10	20	0	0	50	12	20	848	40	
7	0	0	5	20	0	0	50	12	20	853	40	
8	0	0	2.5	20	0	0	50	12	20	855.5	40	
9	20	0	0	0	20	0	50	12	20	838	40	
10	20	0	0	0	20	0	50	12	20	858	20	
11	20	0	0	0	10	0	50	12	20	848	40	
12	20	0	0	0	5	0	50	12	20	853	40	
13	20	0	0	0	0	20	50	12	20	838	40	
14	20	0	0	0	0	10	50	12	20	848	40	
15	20	0	0	0	0	5	50	12	20	853	40	
16	20	0	0	0	0	2.5	50	12	20	855.5	40	

még hozzá a felére. Ha az első esetben valóban telítve volt a PGK, akkor a másodikban a kezdeti katalitikus sebességnek arányosan a felére kellett csökkennie.

Ezután mindkét szubsztrátra elvégeztem a katalitikus állandók meghatározását úgy, hogy az egyik szubsztrát koncentrációját fokozatosan, több nagyságrendet átfogva csökkentettem, míg a másik szubsztrát – és persze a többi komponens – koncentrációját telítésben tartottam. Később a másik szubsztráttal ugyanígy jártam el. Egy aktivitásmérési jegyzőkönyv vázlatát a 2. táblázat tartalmazza. Az abszorbanciaváltozásokat átszámoltam koncentrációváltozásra, majd a duplareciprok egyenlet szerint ábrázoltam az adatokat a linearitás ellenőrzésére, majd számítógépes illesztéssel (nemlineáris illesztés az eredeti adatpárookra) megállapítottam az enzimkinetikai paramétereket.

3.2.6. Fényszórásmérés

A dinamikus fényszórás mérését egy házi építésű készüléken végeztem. A 2,0-es pH-jú, 200 mM NaCl-ot tartalmazó minta fehérjekoncentrációja 40 μM volt. A mérés eredményeként megkaptam a szórt elektromos térerősség autokorrelációját alkotó komponensek relatív amplitúdóját (a_{Rh}) a hidrodinamikai sugár függvényében (R_h), ami a részecskékben tárolt fehérjetömeg eloszlásfüggvényét mutatta. Ha az a_{Rh} értéket osztottam a részecsketérfogattal és ezeket az értékeket ábrázoltam R_h függvényében, akkor a részecskeméret eloszlásfüggvényét kaptam meg.

3.2.7. Cirkuláris dikroizmus mérése

Az amiloidok azonosításának alapmódszere az optikai tulajdonságok kongóvörössel való festés hatására tapasztalható változásának vizsgálata. Ennek pontos meghatározása a cirkuláris dikroizmus (CD) mérésével történt. A mérőműszer egy JASCO 700 típusú CD-spektrométer volt, a küvetében a fényút hossza 10 cm. A minta PGK-koncentrációját 1 μM -ra állítottam, emellett kongóvöröst (30 μM), nátrium-acetátot (25 mM) és nátrium-kloridot (190 mM) tartalmazott; pH-ját 4,6-re állítottam. A CD-spektrum 300-650 nm-ig terjedt, a lépésköz 1 nm, a sáv szélesség 2 nm, a spektrum felvételének sebessége 50 nm/perc volt.

3.2.8. Tioflavin-T fluoreszcenciaváltozásának mérése

A tioflavin-T festék fluoreszcenciaintenzitása amiloidok jelenlétében jelentősen

megnő. Ennek kimutatásához ThT-re nézve 20 μM -os, foszfátra 100 mM-os, NaCl-ra nézve szintén 100 mM-os oldatot készíték, az oldat pH-ját 8,5-re állítom. Felveszem az oldat emissziós spektrumát, majd a vizsgálni kívánt oldatból akkora mennyiséget mérek be, hogy keverés után a fehérjekoncentráció (PGK-monomerre számolva) 4 μM legyen. Keverés után ismét felveszem az emissziós spektrumot. A spektrum felvétele során a gerjesztést 450 nm-en végeztem 4 nm-es sávszélességgel; az emissziót 458–530 nm között 1 nm-es lépésekben 2 nm-es sávszélességgel és 2 nm/s sebességgel rögzítettem. A fluoreszcencia-színkép felvételéhez egy Fluorolog-3 (Horiba Jobin-Yvon) típusú spektrofluorimétert használtam, mely fényforrásként xenonívlámpát tartalmaz, s mind a gerjesztési, mind az emissziós oldalon dupla monokromátorral rendelkezik.

3.2.9. Átalakulási hőmérséklet meghatározása

A fehérjeminta hőstabilitását differenciál pásztázó kalorimetriával (DSC) elemeztem. A mérés MicroCal VP-DSC típusú műszeren történt. A PGK 10 μM -os koncentrációban volt jelen egy 1 mM DTT, 1 mM EDTA és 50 mM Tris tartalmú oldatban. Állandó nyomáson, a hőmérséklet függvényében detektáltam a hőkapacitást (C_p), a pásztázás sebessége óránként 60 $^{\circ}\text{C}$ volt. A C_p vs. T függvény maximumhelye felel meg az átalakulási hőmérsékletnek (T_m), mely jellemző az adott fehérjeszerkezetre.

3.2.10. A pH konformációs energiefelzínre gyakorolt hatásának vizsgálata

A megnövekedett NaCl-koncentráció hatását a savdenaturált fehérjére a 2,0–7,0 pH-tartományon kívántam vizsgálni. Ahhoz, hogy a fehérjekonformáció-változásokat a legrövidebb időskálán is vizsgálni lehessen, az oldatközeg megváltoztatását pillanatszerűen kellett végrehajtanom, amire a közvetlen keverés volt a legalkalmasabb. Mivel a fehérje pufferkapacitása a mérések során alkalmazott koncentrációtartományban jelentős, ezért a cél-pH beállításához tízszeres térfogatú pufferelt sóoldatokat használtam. Pufferanyagként több-bázisú savak anionjait használtam, melyek pufferkapacitása lehetőleg minél nagyobb mértékben lefedi a 2,0–7,0 pH-tartományt. Erre ideálisnak mutatkozott a foszforsav és a citromsav, melyek disszociációs állandói viszonylag egyenletesen lefedik a vizsgált tartományt.

A konformációs energiefelzín vizsgálata során az egyes konformációs speciestek mennyiségi változásait fluoreszcenciaspektrumuk segítségével követtem. A vizsgálatokat úgy indítottam, hogy a kitekeredett fehérjét 120 μM -os koncentrációban

tartalmazó, steril, 2-es pH-jú sósavas oldatot az előre elkészített, 2,0–7,0 pH-jú, steril sós citrát-foszfát pufferek valamelyikével kevertem 1 : 10 arányban. A nagyobb pH-ugrást szobahőmérsékleten a fehérje rosszul tűri, ezért a kicsapódás elkerülése érdekében valamennyi keverést és mérést + 4 °C-on végeztem. A vizsgálatokat három időintervallumra bontottam.

A legkorábbi folyamatokat stopped-flow keveréssel történő indítás után a natívfluoreszcencia-intenzitás időfüggésével követtem egy Applied Photophysics PiStar-180 típusú, termosztátos mintatérrel rendelkező luminométeren. A gerjesztést 295 nm-es hullámhosszon végeztem 5 nm-es fényforrásoldali résszélességgel. A fluoreszcenciaintenzitás csekély volt, ezért egyfelől – a szóródó gerjesztő fény kivédésére beiktatott, 320 nm alatt vágó szűrő mellett – a fotoelektronsokszorozó teljes érzékenységi spektrumán detektáltam, másfelől a jel-zaj-arány javítására mintánként legalább 25 mérést végeztem. A méréseket 1 ms – 50 s időtartományban végeztem. A mérési időtartam növelését korlátozza, hogy – a kézi keveréssel kapott spektrumokkal összevetve – két-három perc után jelentősen torzultak a görbék, amit feltehetőleg az okoz, hogy a stopped-flow-keverő nyomás alatt tartott fecskendőből a mintakamrába szivárognak az oldatok. A méréseket pH 2,0–7,0 tartományon végeztem fél pH-egységnyi lépésekben, összesen 11 pH-értéken.

A következő időtartomány 30–1800 s között húzódik. A keverést kézzel hajtottam végre, és szintén a natív fluoreszcencia intenzitásának időfüggését detektáltam. A mérést egy egyedi gyártású termosztátos mintatartóval felszerelt Horiba Jobin-Yvon Fluorolog-3 típusú fluoriméteren végeztem. A gerjesztés 295 nm-en történt 0,25 nm fényforrásoldali résszélesség mellett, a detektálást 355 nm-en végeztem 12 nm detektoroldali résszélesség mellett; a mérési pontok egy szekundumonként felvett és egyszekundumos időtartamokra vonatkozó intenzitásértékek. A méréseket pH 2,0–7,0 tartományon végeztem fél pH-egységnyi lépésekben, összesen 11 pH-értéken. E mérés folytatásaként mértani sort követő időpontokban 2 napon keresztül natívfluoreszcenciaspektrumokat vettem fel ugyanezen a készüléken. A gerjesztés 295 nm-en történt 1 nm-es sáv szélességgel; a detektálást 305–400 nm között végeztem 1 nm lépésekkel 1 nm/s sebességgel és 1,5 nm-es sáv szélességgel.

A negyedik időtartomány néhány perctől 3 hétig terjedt. A minta itt is a savdenaturált fehérje és valamelyik pufferezt sósóoldat ismert időpontban előállított

keveréke volt. A mintát + 4 °C-on tároltam A mérés során meghatároztam ThT-tartalmú oldat spektrumát a minta hozzáadása előtt és után. A 20 µM ThT-t tartalmazó pufferelt oldatból 2625 µl-t mértem be egy 3 ml-es küvettába, majd felvettem a fluoreszcenciaspektrumát. Ezután a mintából steril körülmények között kimért 100 µl-nyi részletet elkevertem a küvettában lévő ThT-oldatban és ismét felvettem a fluoreszcenciaspektrumot. A méréseket a fentebb is említett Horiba Jobin Yvon készülékekkel végeztem; a gerjesztés 450 nm-en történt 4 nm-es spektrumszélességgel, a detektálást 458–530 nm között végeztem 2 nm-es sáv szélességgel, 1 nm-es lépésekben és 2 nm/s sebességgel. A kiértékelés során a minta hozzáadása előtti és utáni spektrumok numerikus integráljainak arányát vettem.

3.2.11. Elektronmikroszkópia

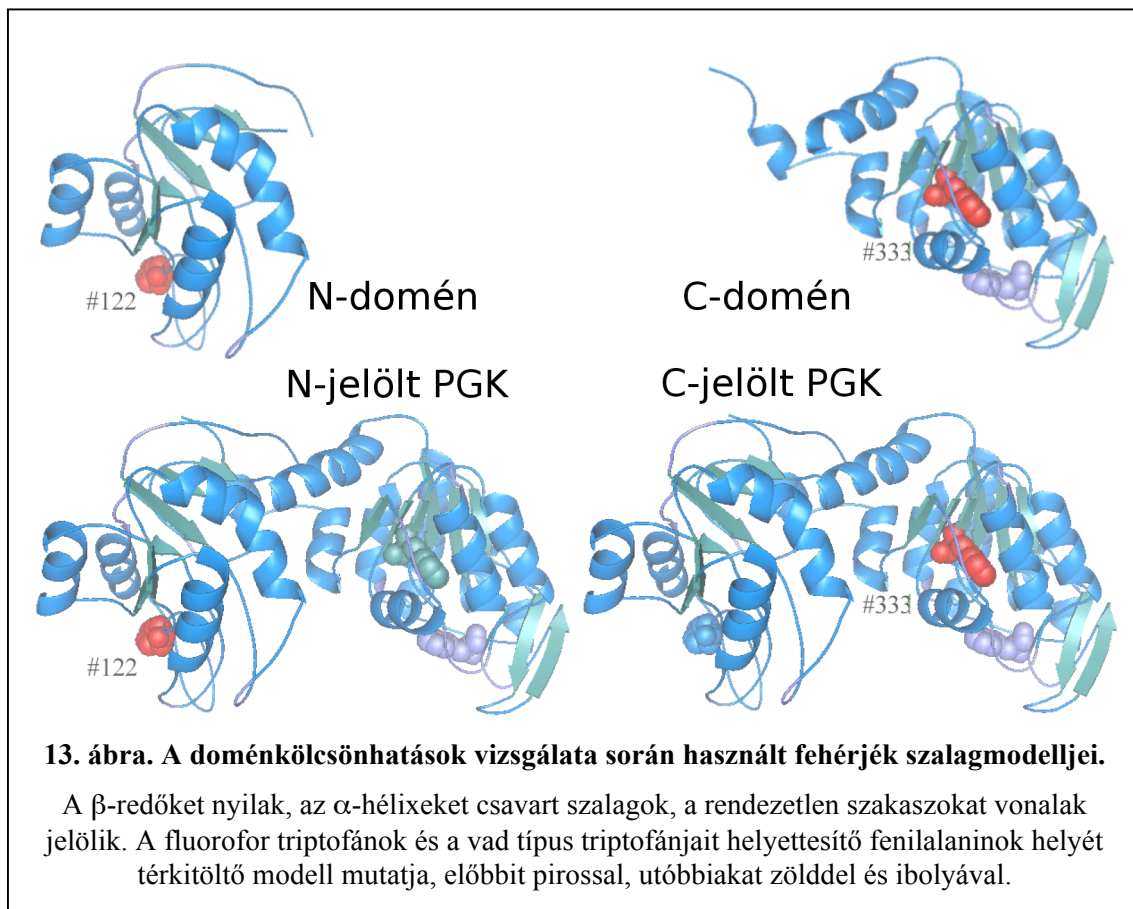
Az amiloidfibrillumok megjelenítésére elektronmikroszkópos felvételeket készítettünk negatív kontrasztolás után. A doménkölesönhatások vizsgálatokor az amiloidtartalmú oldat egy cseppjét (50 µl) Formvar[®] (polivinil-formal) hártával bevont rézgridre vittük fel, és azonos térfogatú 2%-os uranil-acetát kontrasztanyagot tartalmazó oldattal (50%-os metanolos-vizes oldatban) 15 percen át inkubáltuk, majd az oldat leitatása után még további 15 percig szárítottuk a mintát. Ezután a mintákat JEOL JEM-100B transzmissziós elektronmikroszkópban vizsgáltuk. Az amiloid-dezintegráció és az energiafelszín vizsgálatok során a mintákat egy Hitachi 7100 típusú készülékben vizsgáltuk.

4. Eredmények

4.1. Doménkölsönhatások befolyása az amiloidképződésre

A munkám első lépéseként natív fehérjékben megtalálható foldingegységek (domének) kölcsönhatásainak amiloidképződésre gyakorolt befolyását kívántam vizsgálni. Ehhez olyan vizsgálómódszert kell használni, amely alkalmas a lokális konformációváltozások követésére: ilyen módszer a triptofánfluoreszcencia idő függvényében történő változásának mérése. Másfelől egy olyan modellfehérje-rendszerre is szükség van, amely összekapcsolva és egymástól szétválasztva is tartalmazza a doméneket. A fehérje kiválasztásánál az is fontos szempont volt, hogy az izolált domének önállóan is képesek legyenek natív-szerű konformációba hajtogatódni. (Pecorari és mtsai 1996)

A vizsgálathoz négy PGK-mutánsból álló rendszert hoztunk létre, melynek

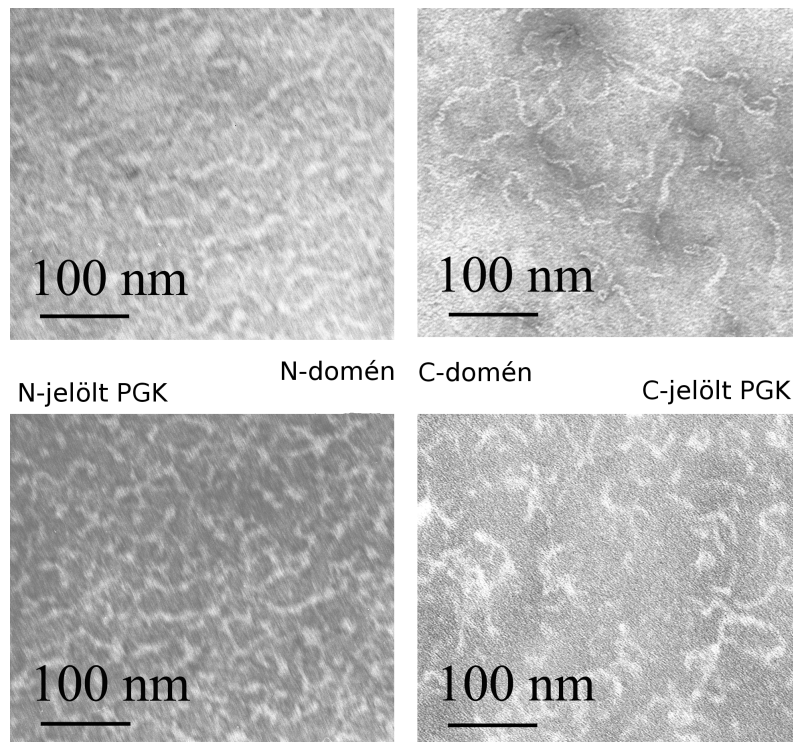


valamennyi tagja egyetlen triptofánt tartalmaz. A fehérjerendszer alkalmazhatóságának érdekében a triptofánok helyét úgy választottuk meg, hogy az ne rontsa a fehérje stabilitását. (Szpikowska és mtsai 1994; Cheung és Mas 1996; Szpikowska és Mas 1996) A négytagú rendszer két fehérjepárra osztható, melyek közül az egyik az egy triptofánt tartalmazó izolált domén, a másik a teljes fehérje, mely szintén egyetlen triptofánt tartalmaz, még hozzá a doménnel megegyező helyen. A doméneket a 185. aminosav után választottuk el. A triptofán fluoreszcenciaspektruma akkor árulja el a legtöbbet az amiloidképződést kísérő szerkezetváltozásokról, ha a triptofán a doménbe ágyazva helyezkedik el. A vad típusú fehérje két triptofánt tartalmaz: egy felszínhez közelebbit (W308) és egy beágyazottabbat (W333); mindkettő a C-doménben található. A mérés szempontjából az az ideális, ha fehérjénként csak egyetlen triptofán van. Témavezetőm a 308-as helyen lévő triptofánt fenilalaninnal helyettesítette, így a C-doménen jelölt teljes fehérje és az izolált C-domén is a 333 helyen hordozza a fluorofort. Mivel az N-doménben nincs triptofán, ezért ennek jelöléséhez a 122 pozícióban lévő tirozint helyettesíti triptofán. Az N-doménen jelölt teljes fehérjén emellett fenilalanin helyettesíti a vad típus mindkét triptofánját (3. táblázat). A fehérjéhez toldott hisztidin-szakaszt, amely az affinitáskromatográfiás tisztításhoz szükséges, a kifejezés után nem távolítottam el. A 13. ábra logikus elrendezésben mutatja a négy fehérjemutáns szalagmodelljét; az eredmények grafikus bemutatásakor a későbbiekben is ezt az elrendezést használom. A triptofánok helyét piros színnel jelöltem.

3. táblázat. A kísérletben használt PGK-mutánsok szekvenciájának összehasonlítása a vad típusúéval.

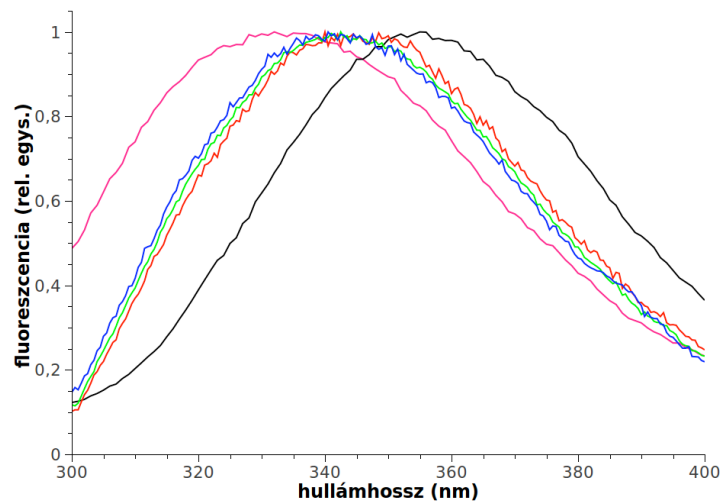
Az első sor a kifejezett fehérjeszakaszt mutatja a vad típusú PGK számozása szerint, a továbbiak pedig a 122-es, 308-as és 333-as pozícióan elhelyezkedő aminosavakat.

vad PGK	N-jelölt PGK	N-domén	C-jelölt PGK	C-domén
1-415	1-415	1-185	1-415	186-415
Y122	W122	W122	Y122	–
W308	F308	–	F308	F308
W333	F333	–	W333	W333



14. ábra. Elektronmikroszkópos felvételek a PGK-mutánsokból képzett amiloidokról.

A felvételek az amiloidképződés megindítását követő negyedik napon készültek 2%-os uranil-acetátos kontrasztosítás után. (A képek Jäckel Márta közreműködésével készültek).

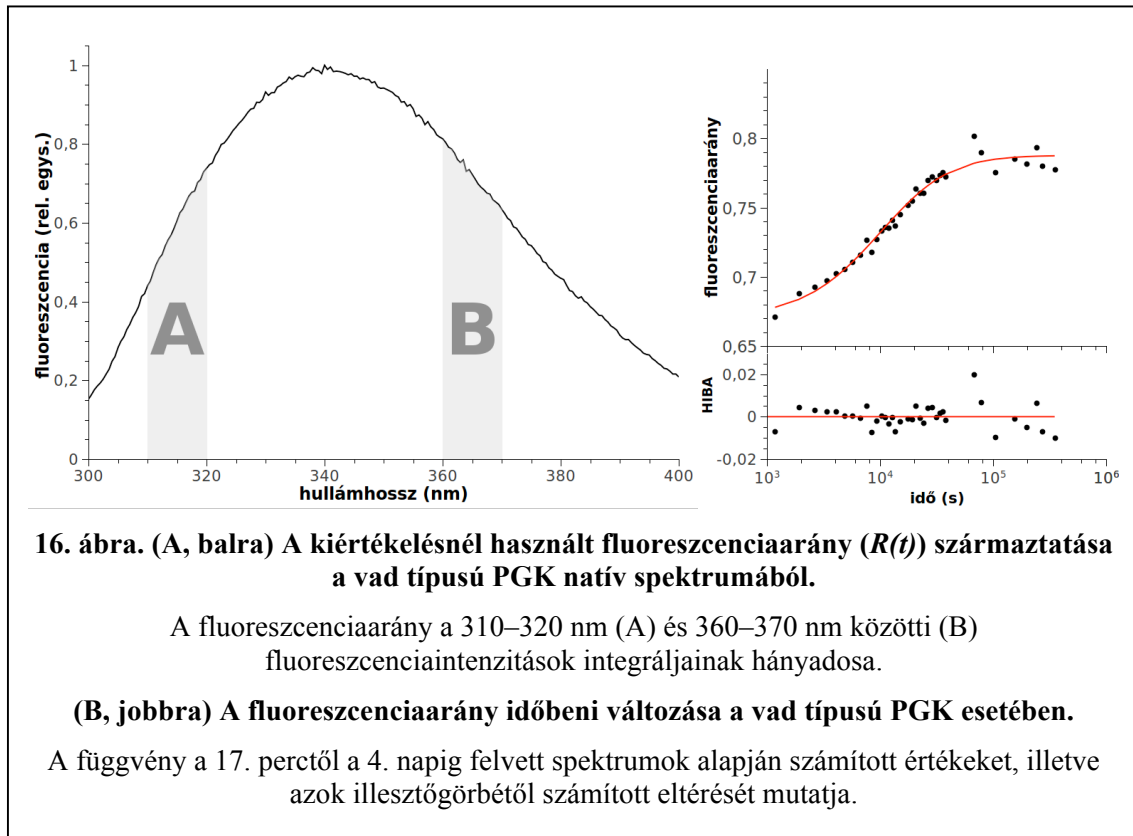


15. ábra. A vad típusú PGK különféle állapotaiban felvett fluoeszcenciaspektruma.

A natív fehérje spektrumát ibolya, a savdenaturált állapot spektrumát fekete vonal mutatja. Az amiloidképződés megindítása után 17 perccel, 3 órával és 4 nappal felvett spektrumokat rendre vörös, zöld és kék vonalak mutatják. A gerjesztés 295 nm-nél történt, fehérjekoncentráció $40 \pm 4 \mu\text{M}$.

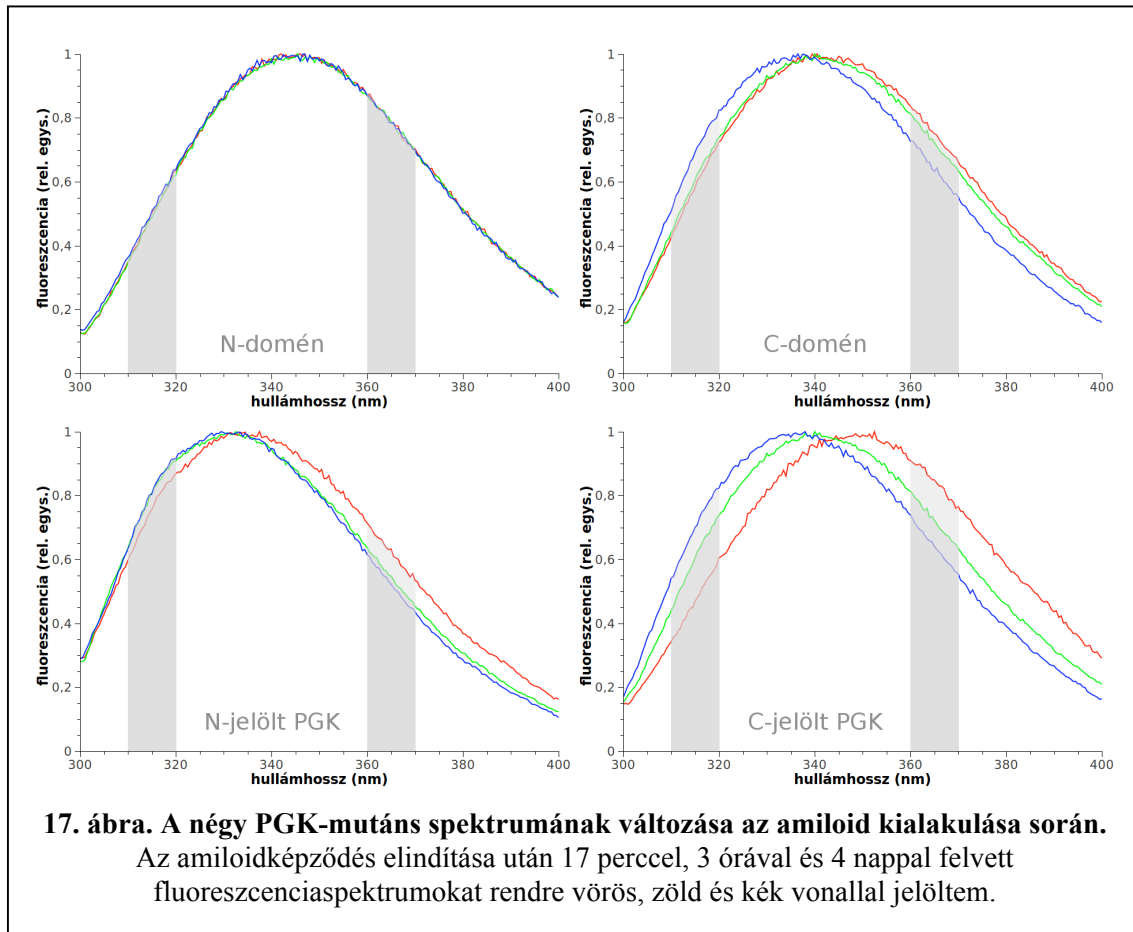
Az amiloidok képződését az eredetileg a vad típusú fehérjéhez kidolgozott

módszerrel kívántam elérni: pH = 2 sósavas oldatban kitekert fehérjeoldathoz 200 mM NaCl-ot adtam hozzá. A kísérleteket szobahőmérsékleten végeztem. Az amiloidok



jelenlétét négy nap után elektronmikroszkóppal ellenőriztem. Az amiloidok valamennyi fehérjemutánsból kialakultak, megjelenésük hasonló a vad típusú fehérjénél tapasztalttal (14. ábra). A PGK-mutánsok fluoreszcenciaspektrumainak változását négy napig követtük. Szemléltetésképpen bemutatom a vad típusú PGK fluoreszcenciaspektrumát 17 perc, 3 óra és 4 nap eltelte után (15. ábra), illetve összehasonlítás végett a natív és a savval denaturál fehérje szinképét is. Látható, hogy natív fehérjeszerkezetre jellemző spektrum maximuma a sav hatására bekövetkező denaturációval több mint 20 nm-rel a hosszabb hullámhosszak felé tolódott. A NaCl hozzáadása után megindul az amiloidképződés, ennek következtében a szinkép fokozatosan a rövidebb hullámhosszak felé mozdult el. A fluoreszcenciaintenzitást napokon át követni nehéz, mivel problémát okoz többek között a fluorofor égése, a gerjesztő fény intenzitásának ingadozása stb., ezért inkább a szinképgörbe alakjának változását analizáltam, amit az említett zavaró tényezők sokkal kevésbé befolyásolnak. Az eltolódás

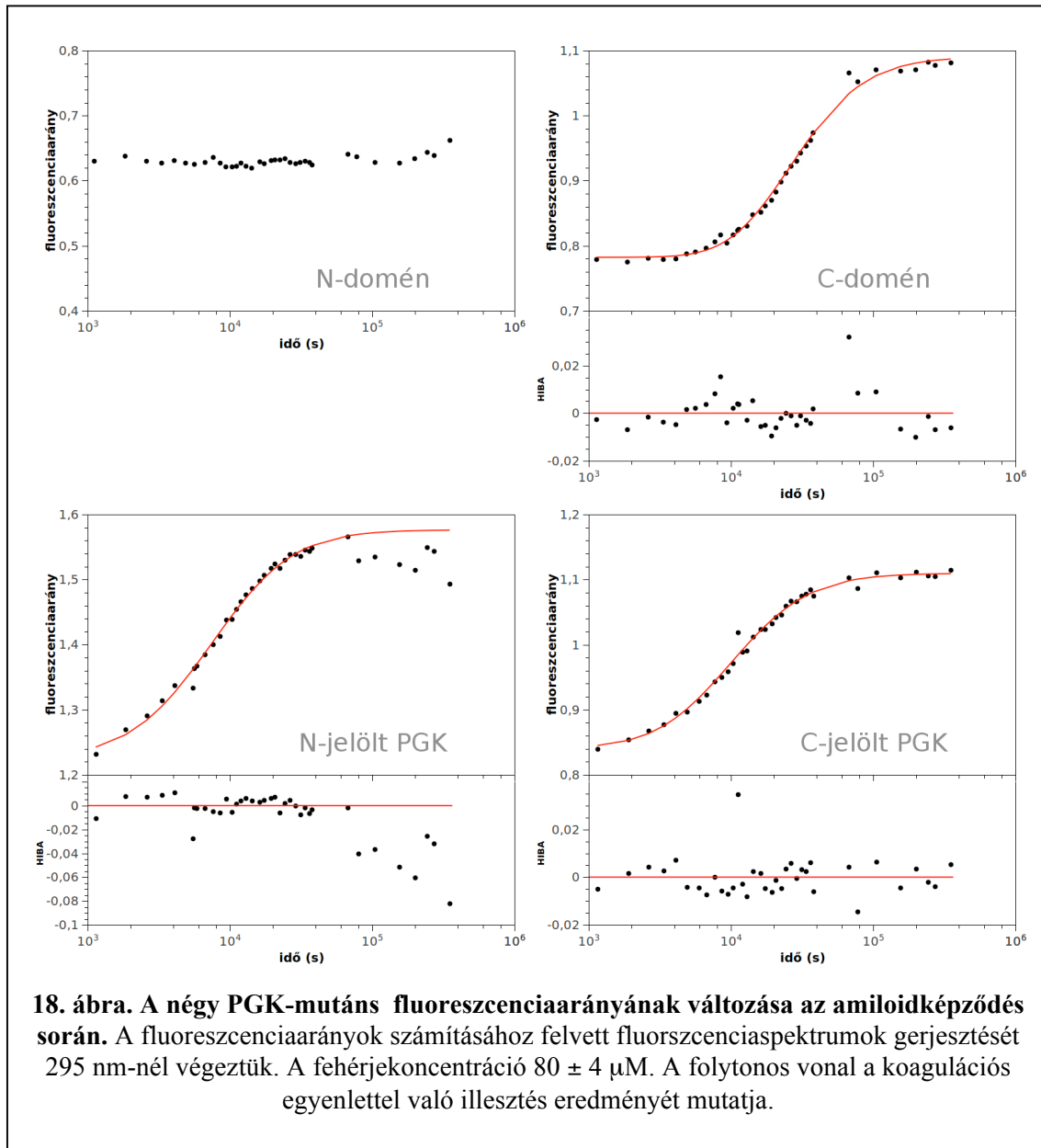
számszerűsítéséhez a görbe 310-320 nm illetve a 360-370 nm közötti numerikus integráljainak (vagyis az e tartományokban mért intenzitások összegének) arányát ($R(t)$)



használtam (16. ábra, A). Ezek a tartományok a folyamat teljes időtartama alatt a görbe meredek részén helyezkednek el, így a görbe alatti területek számértéke érzékenyen mutatja a spektrumeltolódás mértékét. Az arányszámokat az idő függvényében ábrázolva szemléletessé tehető az amiloidképződés előrehaladtát kísérő fluoreszcenciaváltozás, amit a vad típusú fehérje esetében a 16. ábra B részén szemléltetnek.

A 17. ábra a négy mutáns fluoreszcenciaspektrumát mutatja 17 perccel, 3 órával és 4 nappal az amiloidképződés megindítása után. Látható, hogy az izolált N-domén esetében a spektrum nem változik jelentősen, míg a többi mutáns (izolált C-domén, N- és C-doménon jelölt teljes fehérje) a vad típusú fehérjénél megismert kék irányú eltolódást mutatja. A mutáns PGK-k spektrumeltolódását az idő függvényében mutató

grafikonok a 18. ábrán láthatók. Amint azt már a spektrumoknál is láttuk, az izolált N-domén nem mutat eltolódást, míg a másik három fehérje kék irányú eltolódást mutat a



10^3 és $5 \cdot 10^4$ s közötti időtartományban. Az izolált C-domén és a C-doméneken jelölt fehérjék esetében ezután nem történt további változás, míg az N-doméneken jelölt PGK-nál valamelyes csökkenés következett be, azonban ez viszonylag kis mértékű és zajos volt ahhoz, hogy a kinetikát leíró modell megalkotásakor figyelembe vegyük. Az izolált N- és C-domén fluoreszcenciaváltozása erősen eltér egymástól, de jelentős az eltérés az egyes izolált domének és az azonos helyen jelölt teljes fehérjék között is. Az N- és C-

doménen jelölt teljes fehérjék triptofánfluoreszcenciája viszont a triptofánok környezetének hasonló változásról tanúskodik.

Kinetikai modell. A fluoreszcenciaváltozás-görbéket (az értékelhető változást nem mutató N-domén esetét kivéve) a Smoluchowski-féle koagulációs egyenletből levezethető, méretfüggetlen sebességi állandókat használó egyenlettel illesztettük, melynek a bevezetőben már említett egyenlete:

$$(1.14) \quad n_i(t) = n_1(0) \cdot \frac{(t/t_c)^{i-1}}{(1+t/t_c)^{i+1}}$$

ahol $n_1(0)$ az ekkor még teljes egészében monomerformában lévő fehérje kezdeti (bemérési) koncentrációja, $n_i(t)$ az i monomerből álló aggregátum koncentrációja a t időpillanatban, t_c pedig a koagulációs időállandó.

A későbbiekben nem a koncentrációra, hanem az i -merekben lévő fehérjemonomerek teljes fehérjekoncentrációra vetített hányadára lesz szükségünk:

$$(4.1) \quad f_i(t) = \frac{n_i(t)}{n_1(0)} = \frac{(t/t_c)^{i-1}}{(1+t/t_c)^{i+1}}.$$

Hogy a képletet az alábbi levezetésekben könnyebb legyen kezelni, vezessünk be egy α paramétert, melynek jelentése:

$$(4.2) \quad \alpha := \frac{(t/t_c)}{(1+t/t_c)},$$

illetve ebből:

$$(4.3) \quad 1 - \alpha = 1 - \frac{(t/t_c)}{(1+t/t_c)} = \frac{1}{(1+t/t_c)},$$

valamint:

$$(4.4) \quad \frac{1}{\alpha} - 1 = 1 - \frac{(1+t/t_c)}{(t/t_c)} = \frac{1}{(t/t_c)}$$

Eszerint átírva a fenti képletet:

$$(4.5) \quad f_i(t) = \frac{(t/t_c)^{i-1}}{(1+t/t_c)^{i+1}} = \frac{1}{(1+t/t_c)} \cdot \frac{1}{(t/t_c)} \cdot \frac{(t/t_c)^i}{(1+t/t_c)^i} = (1-\alpha) \cdot \left(\frac{1}{\alpha} - 1\right) \cdot \alpha^i$$

Az aggregáció és az azt kísérő fluoreszcenciaváltozás kapcsolata nem ismert, de jó egybeesést tapasztalunk a mérésekkel, ha feltételezzük, hogy egy kritikus monomerszám (m) fölött egy lépésben változik meg a spektrum. Ennek matematikai

leírásához ki kell fejeznünk ((4.6) - (4.26) egyenletek) a t időpillanatban legfeljebb m monomerből álló aggregátumokban lévő fehérjék monomerre vetített összkoncentrációját ($f_m(t)$), amit megkapunk abból az összegből, melynek tagjai rendre az 1-től m -ig terjedő PGK-ból álló aggregátumok monomerszámának és hányadának szorzata:

$$(4.6) \quad f_m(t) = \sum_{i=1}^m i \cdot f_i(t).$$

Helyettesítsük be a hányadra fentebb megadott (4.5) képletet:

$$(4.7) \quad f_m(t) = \sum_{i=1}^m i \cdot (1 - \alpha) \cdot \left(\frac{1}{\alpha} - 1\right) \cdot \alpha^i.$$

Emeljük ki az összegből a futóindexet (i) nem tartalmazó tényezőket:

$$(4.8) \quad f_m(t) = (1 - \alpha) \cdot \left(\frac{1}{\alpha} - 1\right) \cdot \sum_{i=1}^m i \cdot \alpha^i.$$

A képletben egy m elemű súlyozott mértani sor összege szerepel. A súlyozás nélküli mértani sor összegét az alábbi módon hozhatjuk egyszerűbb formára:

$$(4.9) \quad \sum_{i=1}^m \alpha^i = \alpha + \alpha^2 + \alpha^3 + \dots + \alpha^{m-1} + \alpha^m$$

$$(4.10) \quad \alpha \cdot \sum_{i=1}^m \alpha^i = \alpha^2 + \alpha^3 + \alpha^4 + \dots + \alpha^m + \alpha^{m+1}$$

$$(4.11) \quad (1 - \alpha) \cdot \sum_{i=1}^m \alpha^i = \sum_{i=1}^m \alpha^i - \alpha \cdot \sum_{i=1}^m \alpha^i = \alpha - \alpha^{m+1}$$

$$(4.12) \quad \sum_{i=1}^m \alpha^i = \frac{\alpha - \alpha^{m+1}}{1 - \alpha}.$$

Hasonló módszerrel a súlyozott mértani sor összegét is egyszerűbb alakra lehet hozni:

$$(4.13) \quad \sum_{i=1}^m i \cdot \alpha^i = \alpha + 2\alpha^2 + 3\alpha^3 + \dots + (m-1)\alpha^{m-1} + m\alpha^m$$

$$(4.14) \quad \alpha \cdot \sum_{i=1}^m i \cdot \alpha^i = \alpha^2 + 2\alpha^3 + 3\alpha^4 + \dots + (m-1)\alpha^m + m\alpha^{m+1}$$

$$(4.15) \quad (1 - \alpha) \cdot \sum_{i=1}^m i \cdot \alpha^i = \sum_{i=1}^m i \cdot \alpha^i - \alpha \cdot \sum_{i=1}^m i \cdot \alpha^i = \alpha + \alpha^2 + \alpha^3 + \dots + \alpha^m - m\alpha^{m+1}$$

$$(4.16) \quad (1 - \alpha) \cdot \sum_{i=1}^m i \cdot \alpha^i = \sum_{i=1}^m \alpha^i - m\alpha^{m+1}$$

$$(4.17) \quad \sum_{i=1}^m i \cdot \alpha^i = \frac{\sum_{i=1}^m \alpha^i - m\alpha^{m+1}}{1-\alpha}$$

Ebbe helyettesítsük be a mértani sor összegének egyszerűbb alakját (4.12):

$$(4.18) \quad \sum_{i=1}^m i \cdot \alpha^i = \frac{\frac{\alpha - \alpha^{m+1}}{1-\alpha} - m\alpha^{m+1}}{1-\alpha}$$

Ennek az egyszerűsített alaknak a segítségével átírhatjuk a (4.8) egyenletet:

$$(4.19) \quad f_m(t) = (1-\alpha) \cdot \left(\frac{1}{\alpha} - 1\right) \cdot \frac{\frac{\alpha - \alpha^{m+1}}{1-\alpha} - m\alpha^{m+1}}{1-\alpha}$$

Hozzuk egyszerűbb alakra:

$$(4.20) \quad f_m(t) = \left(\frac{1}{\alpha} - 1\right) \cdot \left(\frac{\alpha - \alpha^{m+1}}{1-\alpha} - m\alpha^{m+1}\right)$$

$$(4.21) \quad f_m(t) = \left(\frac{1-\alpha}{\alpha}\right) \cdot \left(\frac{\alpha - \alpha^{m+1} - (1-\alpha) \cdot m\alpha^{m+1}}{1-\alpha}\right)$$

$$(4.22) \quad f_m(t) = \frac{\alpha - \alpha^{m+1} - (1-\alpha) \cdot m\alpha^{m+1}}{\alpha}$$

$$(4.23) \quad f_m(t) = 1 - \alpha^m - (1-\alpha) \cdot m\alpha^m$$

$$(4.24) \quad f_m(t) = 1 - \alpha^m - m\alpha^m + \alpha \cdot m\alpha^m$$

$$(4.25) \quad f_m(t) = 1 - (m+1) \cdot \alpha^m + m\alpha^{m+1}$$

Végül helyettesítsük vissza α értékét (4.2):

$$(4.26) \quad f_m(t) = 1 - (m+1) \cdot \left(\frac{(t/t_c)}{(1+t/t_c)}\right)^m + m \cdot \left(\frac{(t/t_c)}{(1+t/t_c)}\right)^{m+1}$$

ahol tehát $f_m(t)$ a legfeljebb m monomerből álló amiloidokban lévő fehérjék összfehérjemennyiségre vetített aránya a t_c -vel jellemezhető sebességű amiloidképződés megindulása után t idővel.

A kinetika leírásához a 310–320 nm (A tartomány) és 360–370 nm (B tartomány) közötti fluoreszcenciaarányt használtam fel. A fluoreszcenciaarány a t időpillanatban a következőképpen adható meg:

$$(4.27) \quad R(t) = \frac{f_m(t) \cdot \Phi_{A,0} + (1-f_m(t)) \cdot \Phi_{A,\infty}}{f_m(t) \cdot \Phi_{B,0} + (1-f_m(t)) \cdot \Phi_{B,\infty}}$$

Ez a képlet is arra a feltételezésre épül, hogy az aggregátumok fluoreszcenciaspektruma

egy adott kritikus monomerszám (m) felett ugrásszerűen tér el a legfeljebb m monomert tartalmazó aggregátumokétól (ideértve természetesen a monomer fehérjét is). A számlálóban az A tartomány fluoreszcenciája szerepel, mely a kritikus monomerszám alatti fehérjefrakció ($f_m(t)$) és az A tartományban a kritikus monomerszám alatt érvényes fluoreszcencia-hatásfok ($\Phi_{A,0}$) szorzatának, illetve a kritikus monomerszám fölötti frakció ($1 - f_m(t)$) és az A tartományban a kritikus monomerszám fölött érvényes fluoreszcencia-hatásfok ($\Phi_{A,\infty}$) szorzatának összege. A nevezőben a B tartomány fluoreszcenciája szerepel, mely az előbbihez hasonlóan a kritikus monomerszám alatti fehérjefrakció ($f_m(t)$) és a B tartományban a kritikus monomerszám alatt érvényes fluoreszcencia-hatásfok ($\Phi_{B,0}$) szorzatának, illetve a kritikus monomerszám fölötti frakció ($1 - f_m(t)$) és a B tartományban a kritikus monomerszám fölött érvényes fluoreszcencia-hatásfok ($\Phi_{B,\infty}$) szorzatának összegéből adódik.

Alakítsuk át a képletet úgy, hogy abban a csak kritikus monomerszám alatti asszociátumokra jellemző R_0 intenzitáсарány és a csak kritikus monomerszám fölötti asszociátumokra jellemző R_∞ intenzitáсарány szerepeljen:

$$(4.28) \quad R_0 = \frac{\Phi_{A,0}}{\Phi_{B,0}}, \text{ ebből } \Phi_{A,0} = R_0 \cdot \Phi_{B,0},$$

$$(4.29) \quad R_\infty = \frac{\Phi_{A,\infty}}{\Phi_{B,\infty}}, \text{ amiből } \Phi_{A,\infty} = R_\infty \cdot \Phi_{B,\infty}.$$

Helyettesítsünk be ezeket a (4.27) egyenletbe:

$$(4.30) \quad R(t) = \frac{f_m(t) \cdot R_0 \cdot \Phi_{B,0} + (1 - f_m(t)) \cdot R_\infty \cdot \Phi_{B,\infty}}{f_m(t) \cdot \Phi_{B,0} + (1 - f_m(t)) \cdot \Phi_{B,\infty}}$$

A továbbalakításhoz vezessünk be egy β paramétert, mely kritikus monomerszám alatt és fölött érvényes B tartománybeli intenzitások aránya:

$$(4.31) \quad \beta = \frac{\Phi_{B,0}}{\Phi_{B,\infty}}, \text{ azaz } \Phi_{B,0} = \beta \cdot \Phi_{B,\infty}$$

Végezzük el ismét a behelyettesítést és egyszerűsítsünk $\Phi_{B,\infty}$ -nel:

$$(4.32) \quad R(t) = \frac{f_m(t) \cdot R_0 \cdot \beta \cdot \Phi_{B,\infty} + (1 - f_m(t)) \cdot R_\infty \cdot \Phi_{B,\infty}}{f_m(t) \cdot \beta \cdot \Phi_{B,\infty} + (1 - f_m(t)) \cdot \Phi_{B,\infty}}$$

$$(4.33) \quad R(t) = \frac{f_m(t) \cdot R_0 \cdot \beta + (1 - f_m(t)) \cdot R_\infty}{f_m(t) \cdot \beta + (1 - f_m(t))}$$

Átrendezéssel hozzuk egyszerűbb alakra:

$$(4.34) \quad R(t) = \frac{R_\infty - (R_\infty - \beta \cdot R_0) \cdot f_m(t)}{1 - (1 - \beta) \cdot f_m(t)}$$

4. táblázat. A koagulációs időállandó (t_c) és a kritikus monomerszám (m) változása a vad típusú és a mutáns PGK-k amiloidképzése során.

A paramétereket a (4.35) egyenletnek a 16. (B) ábrán (vad típus) és a 18. ábrán (mutánsok, kivéve az N-domént) látható fluoreszcenciaarány-görbékre történő illesztésével kaptam.

paraméter	vad típusú PGK	N-jelölt PGK	C-jelölt PGK	C-domén
t_c (10^3 s)	$13,4 \pm 6$	$6,4 \pm 2,5$	$7,0 \pm 2,2$	$8,6 \pm 3,0$
m	$1,5 \pm 0,7$	$2,1 \pm 0,8$	$2,7 \pm 0,8$	$5,6 \pm 1,8$

$f_m(t)$ értékét fentebb kifejeztük (4.26), behelyettesítve a fenti képletbe megkapjuk a mindenkor fluoreszcenciaarány függését a kritikus monomerszámtól (m) és a koagulációs időállandótól (t_c):

$$(4.35) \quad R(t) = \frac{R_\infty - (R_\infty - \beta \cdot R_0) \cdot \left(1 - (m+1) \cdot \left(\frac{t/t_c}{1+t/t_c} \right)^m + m \cdot \left(\frac{t/t_c}{1+t/t_c} \right)^{m+1} \right)}{1 - (1 - \beta) \cdot \left(1 - (m+1) \cdot \left(\frac{t/t_c}{1+t/t_c} \right)^m + m \cdot \left(\frac{t/t_c}{1+t/t_c} \right)^{m+1} \right)}$$

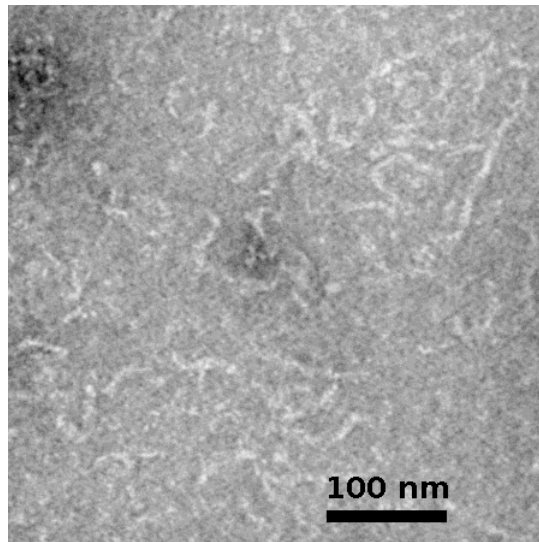
A Mathematica (Wolfram Research, USA) szoftver segítségével elvégeztem az intenzitásarány-idő-görbék illesztését. Az illesztés során a kritikus monomerszámra (m) és a koagulációs időállandóra (t_c) kapott értékeket a 4. táblázat foglalja össze. Megállapítható, hogy a fenti feltevés esetén a fluoreszcenciaváltozás már a folyamat elején, két monomer összekapcsolódásakor bekövetkezik a vad típus és a teljes mutánsok esetében is, míg a C-doménon ez valamivel később történik. A koagulációs időállandókban az eltérés nem ilyen jelentős: a vad típusnál valamivel hosszabb, mint a mutánsoknál.

4.2. Natív szerkezet helyreállítása amiloidból

4.2.1. Az amiloid kialakulása

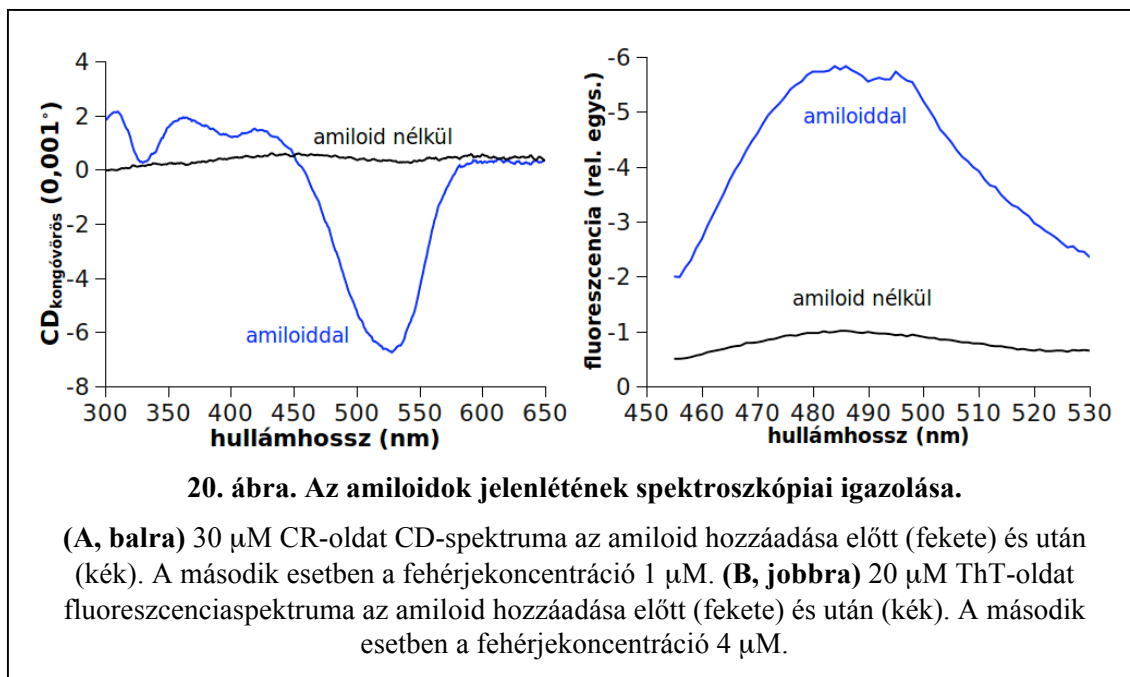
A sósavval denaturált fehérjéhez adott NaCl hatására a PGK csíramentes körülmények között hét nap alatt amiloiddá alakult. Az amiloidfibrillumok létrejöttét

transzmissziós elektronmikroszkópos felvétel, kongóvörös festés után felvett CD-spektrumok és a tioflavin-T hozzáadása után készült fluoreszcenciaspektrumok is igazolják. Az uranilos negatív festés után készült elektronmikroszkópos képen (19. ábra) $6,3 \pm 1,7$ nm átmérőjű fibrillumok láthatók, ami megegyezik a korábban tapasztaltakkal. (Damaschun és mtsai 2000; Osvath és mtsai 2006b) Ugyanilyen módszerrel készültek elektronmikroszkópos felvételek a natív és a savban denaturált PGK-ról is, ahol a fibrillumok teljesen hiányoztak. A NaCl-os-sósavas közegben tárolt fehérje hét nap után kongóvörös festéket tartalmazó oldatban az amiloidokra jellemző negatív dikroizmust mutatott 500 és 550 nm között. (Khurana és mtsai 2001) A kongóvörös önmagában vagy natív fehérje jelenlétében nem mutatott jelentős dikroizmust (20. ábra, A). Ugyancsak az amiloidokra jellemző

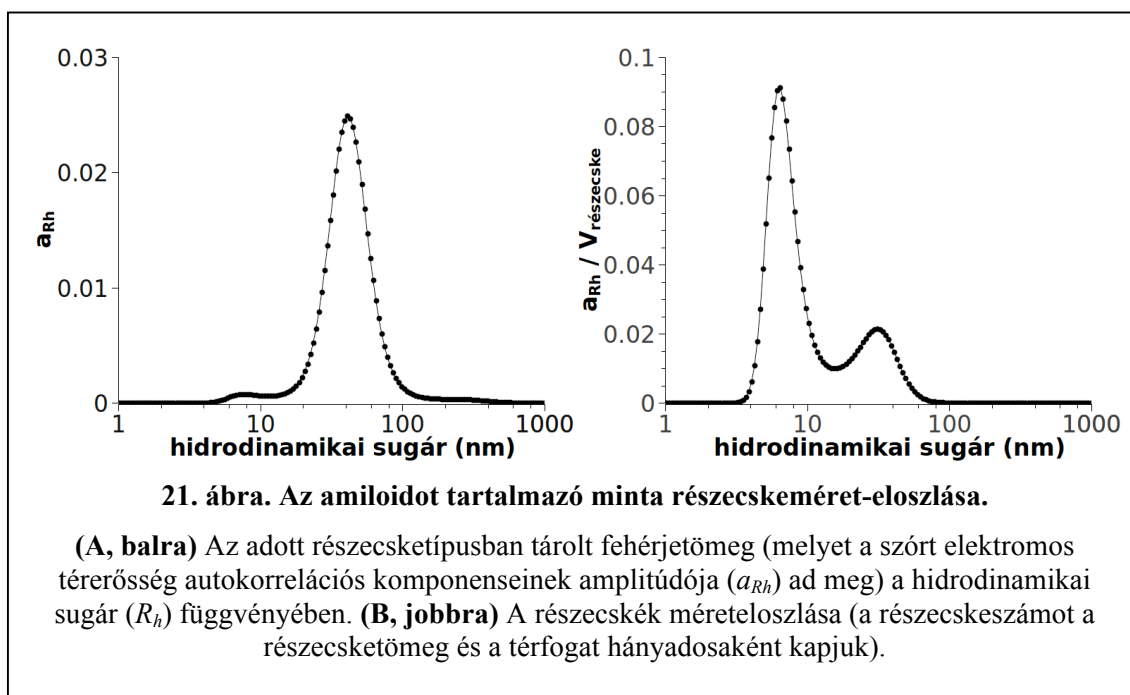


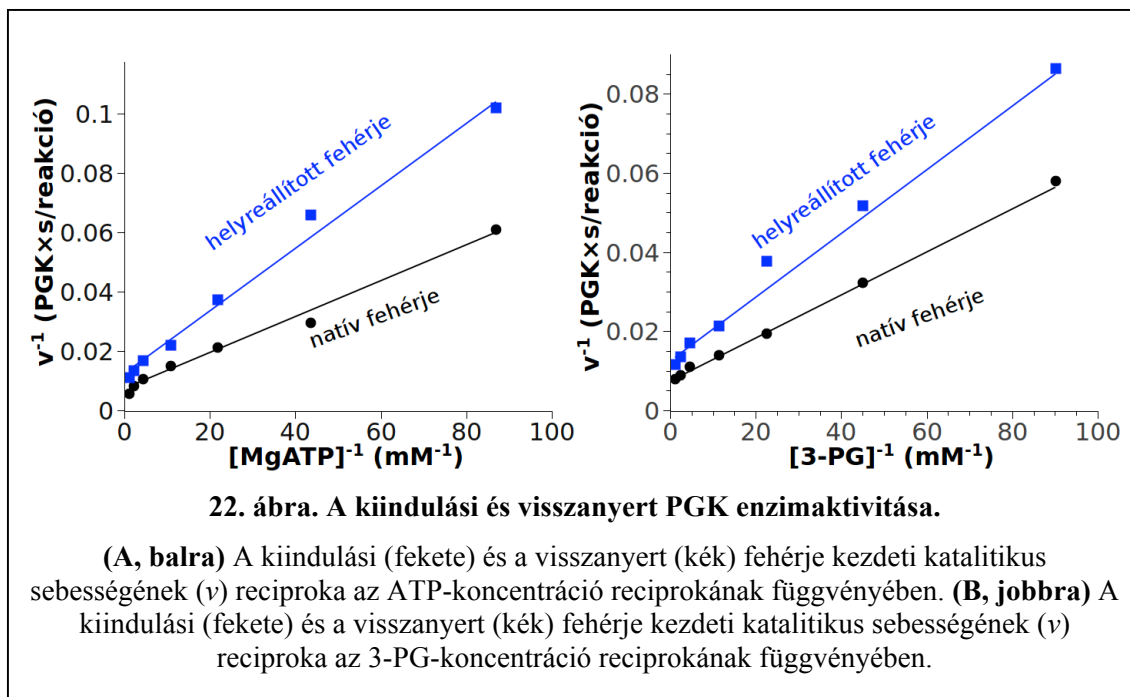
19. ábra. Az amiloidok elektronmikroszkópos képen.

A felvétel 2%-os uranil-acetátos kontrasztosítás után készült az amiloidképződés megindítása után 5 nappal. Az amiloidrostok vastagsága $6,3 \pm 1,7$ nm.



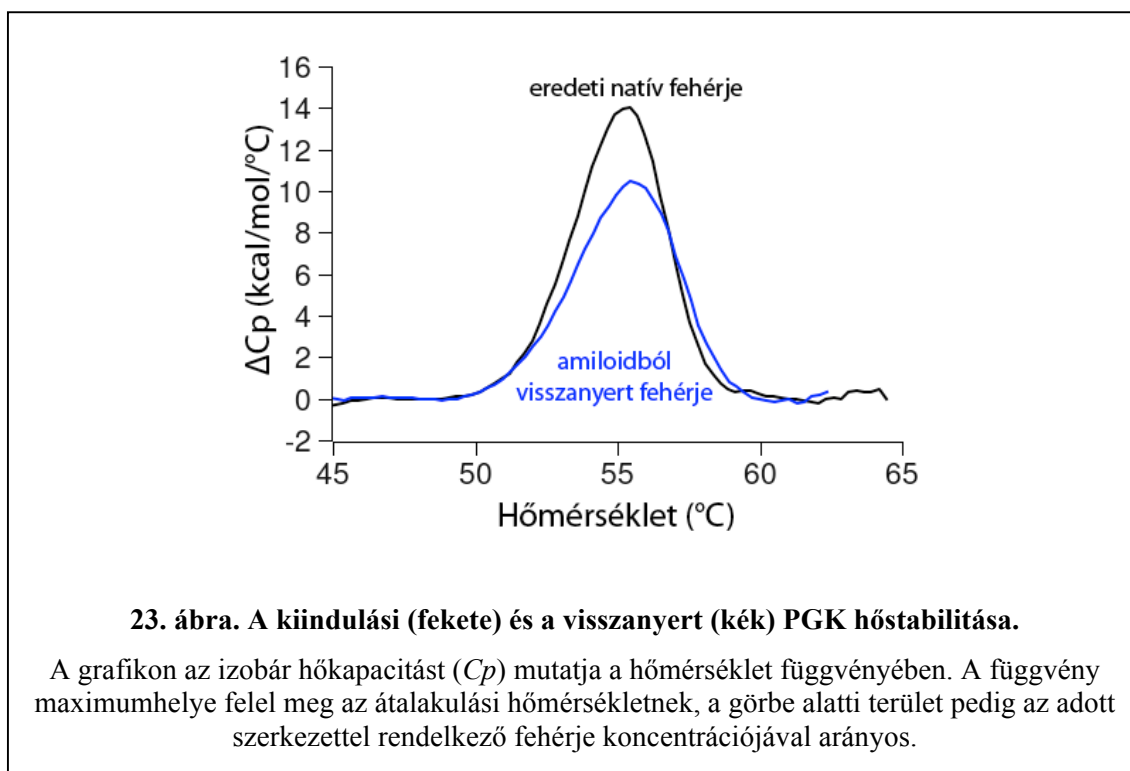
fluoreszcenciaspektrum-változást mutatott a sóval és savval kezelt fehérje tioflavin-T festéket tartalmazó oldatban (20. ábra, B). A fehérjék amiloiddá aggregálódásának hatásfokát dinamikus fényszórással állapítottam meg, mely szerint hét nap után a fehérjék $99,65 \pm 0,1\%$ -a amiloid formában volt jelen, az átlagos monomerszám pedig 194 ± 70 volt részecsként (21. ábra).





4.2.2. A natív szerkezet helyreállítása

A natív fehérje helyreállítását két lépésben végeztem. Elsőként egy éjszakán át dializáltam a PGK-amiloidot sómentes pH 2-es sósavoldatban, aminek hatására az amiloidfibrillumok szétestek denaturált fehérjemonomerekre. Amiloidot sem elektronmikroszkópos felvételekkel, sem kongóvörös-CD-vel, sem tioflavin-T



5. táblázat. A kiindulási és a visszanyert PGK enzimaktivitási és szerkezetstabilitási paramétereit.

Az első két sorban az ATP-re és 3-PG-re vonatkozó Michaelis-állandók (K_M), a harmadik sorban a látszólagos sebességi állandók (k_{cat}) szerepelnek. A negyedik sorban a hődenaturációhoz kapcsolódó átalakulási hőmérsékletek (T_m) láthatók.

paraméter	natív PGK	visszanyert PGK
K_M ($\mu\text{M ATP}$)	81 ± 17	82 ± 23
K_M ($\mu\text{M 3-PG}$)	76 ± 5	66 ± 7
$k_{cat} \left(\frac{n_{reakció}}{s \cdot n_{PGK}} \right)$	135 ± 23	80 ± 9
T_m ($^{\circ}\text{C}$)	$55,3 \pm 0,2$	$55,5 \pm 0,2$

fluoreszcencia segítségével nem lehetett kimutatni. Ezután a savdenaturált fehérjemintát 50 mM Tris-szel pufferezt pH 7,5-ös oldattal hígítottam. A funkció helyreállítását aktivitásméréssel vizsgáltam. A kezdeti katalitikus sebesség függését az egyes szubsztrátok koncentrációjától duplareciprokos ábrázolással az 22. *ábra* mutatja. A pontok az alkalmazott szubsztrátkoncentráció-tartományban egy egyenes mentén szóródnak, vagyis érvényesül a Michaelis–Menten-kinetika. A Michaelis-konstanst és a látszólagos sebességi állandót a Michaelis–Menten-egyenlet nem lineáris illesztésével határoztam meg (5. *táblázat*). A K_M mutatja a natív és a visszanyert fehérje biológiai egyenértékűségét, k_{cat} értéke a visszanyert enzimhányadról ad információt. A natív és a visszanyert fehérje K_M értéke mindkét szubsztrát esetében a mérési hibahatáron belül megegyezik. A visszanyert fehérje k_{cat} értéke mintegy 60%-a a kiindulási értéknek. Az eredeti natív térszerkezet és a visszanyert fehérje szerkezetének azonosságát a hődenaturációs átalakulási hőmérsékletek összehasonlításával ellenőriztem differenciál pásztázó kaloriméter segítségével. Az átalakulási hőmérséklet a natív és a visszanyert fehérje esetében mérési hibán belül azonos (23. *ábra*).

Lényeges, hogy ha a savas dialízist kihagyva rögtön a pH 7,5 Tris pufferbe vittük az amiloidot, akkor a visszaalakulás gyakorlatilag nem ment végbe. Még napok után is csak a kezdeti aktivitás 2%-ánál is kevesebb értéket tudtam csak kimutatni. A diszaggregáció tehát előfeltétele a natív szerkezet amiloidból történő visszaalakulásának és a funkcióképesség visszaszerzésének.

4.3. A pH hatása a konformációs energiafelszínre

A sterilre szűrt, pH = 2 sósavoldatba dializált vad típusú PGK-t a pufforsor magasabb pH-jú tagjaival keverve szobahőn kicsapódást észleltem. Ha a keverést + 4 °C-on hajtottam végre, akkor opálosodást nem tapasztaltam, és centrifugálás hatására nem képződött üledék. A puffer pH-eltolódása a savdenaturált fehérjét tartalmazó oldat hozzáadása után valamennyi pH-n elhanyagolható, mérési hibán belüli mértékű volt.

4.3.1. Triptofánfluoreszcencia-változás a korai folyamatok során

A stopped-flow mérések során pH 2–7 között fél pH-egységenként vettem fel a fluoreszcenciaintenzitás-görbéket 50 s ideig, mintánként 25 mérést átlagoltam, a kapott görbéket a 24. ábra mutatja. A görbék minden esetben növekvő fluoreszcenciát mutatnak, ami a hiperfluoreszcens köztitermék („olvadt gombóc”) kialakulását jelzi valamennyi pH-értéken.

Kinetikai modell. Az 50 s-ig zajló folyamatok kvantifikálására állítsunk fel egy modellt, mely feltételezi, hogy a kitekert fehérje (melynek fluoreszcenciaintenzitása Φ_U) egy egyelőre közelebbről meg nem határozott kinetikával intermedierré (más néven „olvadt gombóc”, melynek fluoreszcenciaintenzitása Φ_I) alakul, ami aztán szintén tovább alakul egy potenciálgát átlépésével a végleges szerkezetté (fluoreszcenciaintenzitása Φ_F). A végleges szerkezetnek a fehérje teljes mennyiségére vonatkoztatott hányadát ($f(t)$) megkapjuk, ha a teljes fehérjemennyiséget (1) kisebbítjük a kezdeti kitekert állapot ($U(t)$) és az intermediér hányadával ($I(t)$):

$$(4.36) \quad F(t) = 1 - I(t) - U(t)$$

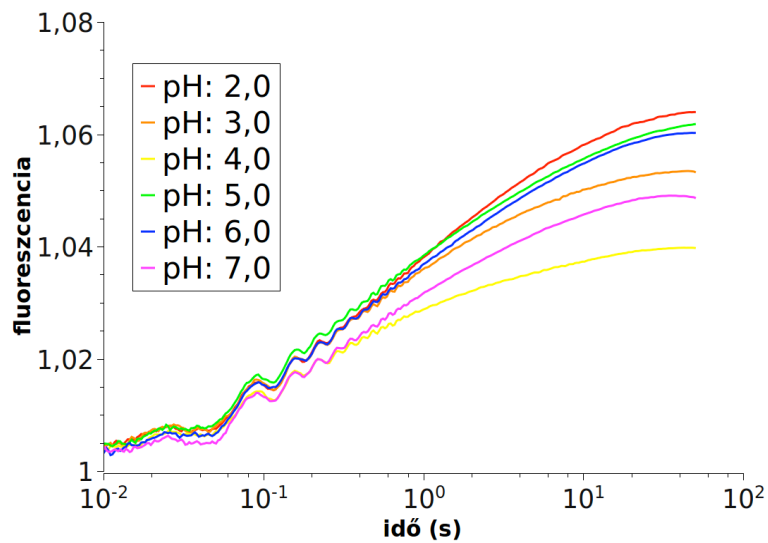
Tudjuk továbbá, hogy az intermedierek mennyiségének időbeli megváltozása ($dI(t)/dt$) egyenlő a kitekert fehérje fogyási sebességének (ez a negatív keletkezési sebesség ellentettje: $dU(t)/dt = U'(t)$) és az intermediér továbbalakulási sebességének (ami egy egyszerű monomolekuláris reakció: $k \cdot I(t)$) különbségével:

$$(4.37) \quad \frac{dI(t)}{dt} = -U'(t) - k \cdot I(t)$$

Átrendezve:

$$(4.38) \quad \frac{dI(t)}{dt} + k \cdot I(t) = -U'(t)$$

Ez egy első rendű inhomogén differenciálegyenlet, aminek általános alakja:



24. ábra. A PGK korai konformációváltozásait kísérő fluoreszcenciaintenzitásváltozás.

A savval denaturált vad PGK-t tízszeres térfogatú citrát–foszfát–pufferbe kevertem stopped-flow készülék segítségével közvetlenül a mintatérben. A fluoreszcenciaspektrumok felvétele során a gerjesztés 295 nm-en 5 nm résszélességgel történt, dektektáláskor a 320 nm fölötti teljes kibocsátást mértem 50 s-ig. Bekeverés utáni fehérjekoncentráció: 4 μ M. A kezdeti zaj a keverőgép okozta műtermék.

$$(4.39) \quad \frac{df(x)}{dx} + k(x) \cdot f(x) = g(x)$$

melyben x a független változó, $f(x)$ és $g(x)$ adott x argumentumú függvények, $df(x)/dx$ az $f(x)$ függvény x szerinti első deriváltja, végül $k(x)$ x -től függő együttható. Ezen általános alak megoldása:¹⁶

$$(4.40) \quad f(x) = \frac{\int e^{\int k(x) dx} \cdot g(x) dx + C}{e^{\int k(x) dx}}$$

Esetünkben x helyett t , $f(x)$ helyett $I(t)$, $g(x)$ helyett $-U'(t)$, végül $k(x)$ helyett $k(t)$ szerepelne, azonban k időben nem változik, azaz t -nek konstans függvénye, integrálja:

$$(4.41) \quad \int k(t) dt = kt + C$$

esetünkben $C = 0$, mivel $t(0) = 0$, így

$$(4.42) \quad \int k(t) dt = kt$$

Helyettesítsük be a fenti értékeket az általános megoldásba:

¹⁶ Lásd például: <http://www.sosmath.com/tables/diffeq/diffeq.html>

$$(4.43) \quad I(t) = \frac{\int_0^t e^{kt} \cdot (-U'(t)) dt + C}{e^{kt}}$$

Az integrálkifejezésből emeljünk ki -1 -et:

$$(4.44) \quad I(t) = \frac{C - \int_0^t e^{kt} \cdot U'(t) dt}{e^{kt}}$$

A képletben szereplő $U(t)$ függvényt egyelőre nem határoztuk meg, de célszerű megszabadulni az integrálképletben lévő deriváltjától. Ezt megtehetjük parciális integrálással,¹⁷ melynek általános szabálya:

$$(4.45) \quad \int_a^b f(x) \cdot g'(x) dx = [f(x) \cdot g(x)]_a^b - \int_a^b f'(x) \cdot g(x) dx$$

Ebben a szögletes zárójel a következő műveletet jelenti:

$$(4.46) \quad [f(x) \cdot g(x)]_a^b = f(b) \cdot g(b) - f(a) \cdot g(a)$$

Esetünkben $f(x)$ -nek e^{kt} , $f'(x)$ -nek ke^{kt} , $g(x)$ -nek $U(t)$, végül $g'(x)$ -nek $U'(t)$ felel meg.

Ennek megfelelően végezzük el a parciális integrálást:

$$(4.47) \quad I(t) = \frac{C - \left([e^{kt} \cdot U(t)]_0^t - \int_0^t ke^{kt} \cdot U(t) dt \right)}{e^{kt}}$$

$$(4.48) \quad I(t) = \frac{C - [e^{kt} \cdot U(t)]_0^t + \int_0^t ke^{kt} \cdot U(t) dt}{e^{kt}}$$

k -t kiemelhetjük az integrálkifejezésből:

$$(4.49) \quad I(t) = \frac{C - [e^{kt} \cdot U(t)]_0^t + k \int_0^t e^{kt} \cdot U(t) dt}{e^{kt}}$$

Oldjuk fel a szögletes zárójelet:

$$(4.50) \quad I(t) = \frac{C - (e^{kt} \cdot U(t) - e^{k \cdot 0} \cdot U(0)) + k \int_0^t e^{kt} \cdot U(t) dt}{e^{kt}}$$

$$(4.51) \quad I(t) = \frac{C + U(0) - e^{kt} \cdot U(t) + k \int_0^t e^{kt} \cdot U(t) dt}{e^{kt}}$$

Mivel itt $U(0)$ a kezdeti ($t = 0$) kitekertfehérje-frakciót jelöli, amelynek értéke 1,

¹⁷ Lásd például: <http://www.sosmath.com/calculus/integration/byparts/byparts.html>

összevonható a C konstanssal (legyen az új konstans jele K):

$$(4.52) \quad I(t) = \frac{K - e^{kt} \cdot U(t) + k \int_0^t e^{kt} \cdot U(t) dt}{e^{kt}}$$

$$(4.53) \quad I(t) = K \cdot e^{-kt} - U(t) + ke^{-kt} \int_0^t e^{kt} \cdot U(t) dt$$

Vizsgáljuk meg azt az esetet, amikor $t = 0$. Ekkor a fehérje teljes egészében unfolded állapotban van, vagyis $U(0) = 1$ (az unfolded fehérje hányada 1); viszont egyáltalán nincs jelen intermedier szerkezet, ezért $I(0) = 0$. Behelyettesítve:

$$(4.54) \quad \underbrace{I(0)}_0 = K \cdot \underbrace{e^{-k \cdot 0}}_1 - \underbrace{U(0)}_1 + k \underbrace{e^{-k \cdot 0}}_1 \underbrace{\int_0^0 e^{k \cdot 0} \cdot U(0) dt}_0$$

Ez alapján $K = 1$. Ennek figyelembe vételével az intermedier fehérjeállapot hányada a t időpillanatban:

$$(4.55) \quad I(t) = e^{-kt} - U(t) + ke^{-kt} \int_0^t e^{kt} \cdot U(t) dt$$

vagyis ezzel megadtuk az intermedierhányad időbeli változását.

Ezután fejezzük ki a mindenkor t időpillanatban mérhető össz-fluoreszcenciaintenzitást, amely az unfolded, az intermedier és a végleges szerkezetre jellemző részfluoreszcenciák (rendre Φ_U , Φ_I és Φ_F) frakciójuk szerint súlyozott összege:

$$(4.56) \quad Fluo(t) = \Phi_U U(t) + \Phi_I I(t) + \Phi_F F(t)$$

Helyettesítsünk be $F(t)$ helyébe a (4.36) egyenlőség szerint:

$$(4.57) \quad Fluo(t) = \Phi_U U(t) + \Phi_I I(t) + \Phi_F (1 - I(t) - U(t))$$

$$(4.58) \quad Fluo(t) = \Phi_U U(t) + \Phi_I I(t) + \Phi_F - \Phi_F I(t) - \Phi_F U(t)$$

$$(4.59) \quad Fluo(t) = \Phi_F + \Phi_U U(t) + (\Phi_I - \Phi_F) I(t) - \Phi_F U(t)$$

Helyettesítsük be (4.59)-be $I(t)$ fentebb (4.55) kifejezett értékét:

$$(4.60) \quad Fluo(t) = \Phi_F + \Phi_U U(t) + (\Phi_I - \Phi_F) \left(e^{-kt} - U(t) + ke^{-kt} \int_0^t e^{kt} \cdot U(t) dt \right) - \Phi_F U(t)$$

$$(4.61) \quad \begin{aligned} Fluo(t) &= \Phi_F + \Phi_U U(t) + (\Phi_I - \Phi_F) e^{-kt} - (\Phi_I - \Phi_F) U(t) + \\ &+ (\Phi_I - \Phi_F) ke^{-kt} \int_0^t e^{kt} \cdot U(t) dt - \Phi_F U(t) \end{aligned}$$

Összevonás után a következő alakra jutunk:

$$(4.62) \quad Fluo(t) = \Phi_F + (\Phi_I - \Phi_F)e^{-kt} + (\Phi_U - \Phi_I)U(t) + (\Phi_I - \Phi_F)ke^{-kt} \int_0^t e^{kt} \cdot U(t)dt$$

A fent levezetett képlet – mint az elején is említettem – semmilyen kikötést nem tartalmaz az $U(t)$ függvény alakjára, vagyis az unfolded–intermedier-átalakulás kinetikájára vonatkozóan.

Osváth és munkatársai már korábban bizonyították (Osvath és mtsai 2006a), hogy a fehérjekonformáció-változás e korai lépésének leírására használható a komplex rendszerek relaxációs folyamataira Metzler és munkatársai által bevezetett formula (Metzler és mtsai 1999):

$$(1.2) \quad f(t) = \sum_{n=1}^N \frac{a_n}{\tau_n} e^{-\frac{t}{\tau_n}}$$

Itt a_n az n -edik Debye-járulék amplitúdója, τ_n pedig ugyanennek időállandója, N a Debye-járulékok vagyis az átalakulási (relaxációs) útvonalak száma, végül $f(t)$ a kiindulási anyag frakciója (hányada) a t időpillanatban; az a_n és τ_n paraméterek hatványsorba illeszkednek:

$$(1.3) \quad a_n = a_1 \cdot \alpha^{n-1}$$

$$(1.4) \quad \tau_n = \tau_1 \cdot \lambda^{n-1}$$

ahol a_1 és τ_1 a mértani sor első elemei, α és λ pedig a skálafaktorai (kvóciensei). Ezeket behelyettesítve az (1.2) képlet a következőképpen alakul:

$$(4.63) \quad f(t) = \sum_{n=1}^N \frac{a_1 \cdot \alpha^{n-1}}{\tau_1 \cdot \lambda^{n-1}} e^{-\frac{t}{\tau_1 \cdot \lambda^{n-1}}}$$

A konzisztencia miatt $f(t)$ helyett használjuk a fentebb alkalmazott $U(t)$ jelölést a kiindulási (unfolded) állapot hányadára; a későbbi levezetések szempontjából pedig praktikusabb a futóindexet 0-tól indítani, ezért alakítsuk át a képletet úgy, hogy az index $n = 1$ -től N -ig helyett $i = 0$ -tól vég-ig változzon, az (1.3) és (1.4) alatti paraméterek pedig ennek megfelelően a

$$(4.64) \quad a_i = a_0 \cdot \alpha^i$$

$$(4.65) \quad \tau_i = \tau_0 \cdot \lambda^i = \tau / \lambda^{vég-i}$$

formát vegyük fel, ahol a_0 és τ_0 a sorozatok első, τ a második sorozat utolsó eleme, α és λ pedig továbbra is a kvóciensek:

$$(4.66) \quad U(t) = \sum_{i=0}^{vég} \frac{a_0 \cdot \alpha^i}{\tau_0 \cdot \lambda^i} e^{-\frac{t}{\tau / \lambda^{vég-i}}}$$

Jelöljük az a^i / τ^i hányadost μ^i -vel, az a_0 / τ_0 hányadost pedig ν -vel, utóbbi ki is emelhető, mivel nem függ i -től:

$$(4.67) \quad U(t) = \nu \cdot \sum_{i=0}^{\text{vég}} \mu^i \cdot e^{-\frac{t}{\tau/\lambda^{\text{vég}-i}}}$$

Továbbra is fennáll az a kezdeti feltétel, hogy kiinduláskor, vagyis a $t = 0$ időpillanatban $U(t) = 1$. Ez alapján kifejezhető ν értéke:

$$(4.68) \quad \underbrace{U(0)}_1 = \nu \cdot \sum_{i=0}^{\text{vég}} \mu^i \cdot \underbrace{e^{-\frac{0}{\tau/\lambda^{\text{vég}-i}}}}_1$$

$$(4.69) \quad 1 = \nu \cdot \sum_{i=0}^{\text{vég}} \mu^i$$

A képletben szereplő, nulladik elemtől (azaz 1-től) induló mértani sor összege a (4.9) – (4.12) alattiakkal analóg módon kifejezhető:

$$(4.70) \quad \sum_{i=0}^{\text{vég}} \mu^i = 1 + \mu + \mu^2 + \mu^3 + \dots + \mu^{m-1} + \mu^m$$

$$(4.71) \quad \mu \cdot \sum_{i=0}^{\text{vég}} \mu^i = \mu + \mu^2 + \mu^3 + \mu^4 + \dots + \mu^m + \mu^{m+1}$$

$$(4.72) \quad (1 - \mu) \cdot \sum_{i=0}^{\text{vég}} \mu^i = \sum_{i=0}^{\text{vég}} \mu^i - \mu \cdot \sum_{i=0}^{\text{vég}} \mu^i = 1 - \mu^{m+1}$$

$$(4.73) \quad \sum_{i=0}^{\text{vég}} \mu^i = \frac{1 - \mu^{\text{vég}+1}}{1 - \mu}$$

Eszerint folytatva (4.69) átalakítását:

$$(4.74) \quad 1 = \nu \cdot \frac{1 - \mu^{\text{vég}+1}}{1 - \mu}$$

$$(4.75) \quad \nu = \frac{1 - \mu}{1 - \mu^{\text{vég}+1}}$$

ezzel (4.67) alakja

$$(4.76) \quad U(t) = \frac{1 - \mu}{1 - \mu^{\text{vég}+1}} \cdot \sum_{i=0}^{\text{vég}} \mu^i \cdot e^{-\frac{t}{\tau/\lambda^{\text{vég}-i}}}$$

Ezek után tekintsük a (4.62) egyenletben lévő integrálkifejezést:

$$(4.77) \quad INT := \int_0^t e^{kt} \cdot U(t) dt$$

Helyettesítsük be $U(t)$ (4.67) alatt kifejezett alakját és átalakítások után végezzük el az integrálást:

$$(4.78) \quad INT = \int_0^t e^{kt} \cdot v \cdot \sum_{i=0}^{vég} \mu^i \cdot e^{-\frac{t}{\tau/\lambda^{vég-i}}} dt$$

$$(4.79) \quad INT = v \cdot \int_0^t e^{kt} \cdot \sum_{i=0}^{vég} \mu^i \cdot e^{-\frac{t}{\tau/\lambda^{vég-i}}} dt$$

$$(4.80) \quad INT = v \cdot \int_0^t \sum_{i=0}^{vég} \mu^i \cdot e^{kt} \cdot e^{-\frac{t}{\tau/\lambda^{vég-i}}} dt$$

$$(4.81) \quad INT = v \cdot \int_0^t \sum_{i=0}^{vég} \mu^i \cdot e^{\left(k - \frac{1}{\tau/\lambda^{vég-i}}\right)t} dt$$

$$(4.82) \quad INT = v \cdot \left[\sum_{i=0}^{vég} \frac{\mu^i \cdot e^{\left(k - \frac{1}{\tau/\lambda^{vég-i}}\right)t}}{k - \frac{1}{\tau/\lambda^{vég-i}}} + C \right]_0^t$$

$$(4.83) \quad INT = v \cdot \left(\sum_{i=0}^{vég} \frac{\mu^i \cdot e^{\left(k - \frac{1}{\tau/\lambda^{vég-i}}\right)t}}{k - \frac{1}{\tau/\lambda^{vég-i}}} - \sum_{i=0}^{vég} \frac{\mu^i}{k - \frac{1}{\tau/\lambda^{vég-i}}} \right)$$

$$(4.84) \quad INT = v \cdot \sum_{i=0}^{vég} \frac{\mu^i \cdot e^{kt} \cdot e^{-\frac{t}{\tau/\lambda^{vég-i}}}}{k - \frac{1}{\tau/\lambda^{vég-i}}} - v \cdot \sum_{i=0}^{vég} \frac{\mu^i}{k - \frac{1}{\tau/\lambda^{vég-i}}}$$

$$(4.85) \quad INT = v \cdot e^{kt} \cdot \sum_{i=0}^{vég} \frac{\mu^i \cdot e^{-\frac{t}{\tau/\lambda^{vég-i}}}}{k - \frac{1}{\tau/\lambda^{vég-i}}} - v \cdot \sum_{i=0}^{vég} \frac{\mu^i}{k - \frac{1}{\tau/\lambda^{vég-i}}}$$

Helyettesítsük vissza a (4.62) egyenletbe az integrálkifejezést és (4.69)-ből $U(t)$ -t:

$$(4.86) \quad \begin{aligned} Fluo(t) = & \Phi_F + (\Phi_I - \Phi_F)e^{-kt} + (\Phi_U - \Phi_I)v \cdot \sum_{i=0}^{vég} \mu^i \cdot e^{-\frac{t}{\tau/\lambda^{vég-i}}} + \\ & + (\Phi_I - \Phi_F)ke^{-kt} \left(v \cdot e^{kt} \cdot \sum_{i=0}^{vég} \frac{\mu^i \cdot e^{-\frac{t}{\tau/\lambda^{vég-i}}}}{k - \frac{1}{\tau/\lambda^{vég-i}}} - v \cdot \sum_{i=0}^{vég} \frac{\mu^i}{k - \frac{1}{\tau/\lambda^{vég-i}}} \right) \end{aligned}$$

$$(4.87) \quad \begin{aligned} Fluo(t) = & \Phi_F + (\Phi_I - \Phi_F)e^{-kt} + (\Phi_U - \Phi_I)v \cdot \sum_{i=0}^{vég} \mu^i \cdot e^{-\frac{t}{\tau/\lambda^{vég-i}}} + \\ & + (\Phi_I - \Phi_F)kv \cdot \sum_{i=0}^{vég} \frac{\mu^i \cdot e^{-\frac{t}{\tau/\lambda^{vég-i}}}}{k - \frac{1}{\tau/\lambda^{vég-i}}} - (\Phi_I - \Phi_F)ke^{-kt}v \cdot \sum_{i=0}^{vég} \frac{\mu^i}{k - \frac{1}{\tau/\lambda^{vég-i}}} \end{aligned}$$

Vonjuk össze a második és az utolsó tagot:

$$(4.88) \quad \begin{aligned} Fluo(t) = & \Phi_F + (\Phi_I - \Phi_F) \left(e^{-kt} - k e^{-kt} \nu \cdot \sum_{i=0}^{vég} \frac{\mu^i}{k - \frac{1}{\tau/\lambda^{vég-i}}} \right) + \\ & + (\Phi_U - \Phi_I) \nu \cdot \sum_{i=0}^{vég} \mu^i \cdot e^{-\frac{t}{\tau/\lambda^{vég-i}}} + (\Phi_I - \Phi_F) k \nu \cdot \sum_{i=0}^{vég} \frac{\mu^i \cdot e^{-\frac{t}{\tau/\lambda^{vég-i}}}}{k - \frac{1}{\tau/\lambda^{vég-i}}} \end{aligned}$$

Emeljük ki e^{-kt} -t a második tagból:

$$(4.89) \quad \begin{aligned} Fluo(t) = & \Phi_F + (\Phi_I - \Phi_F) \left(1 - k \nu \cdot \sum_{i=0}^{vég} \frac{\mu^i}{k - \frac{1}{\tau/\lambda^{vég-i}}} \right) e^{-kt} + \\ & + (\Phi_U - \Phi_I) \nu \cdot \sum_{i=0}^{vég} \mu^i \cdot e^{-\frac{t}{\tau/\lambda^{vég-i}}} + (\Phi_I - \Phi_F) k \nu \cdot \sum_{i=0}^{vég} \frac{\mu^i \cdot e^{-\frac{t}{\tau/\lambda^{vég-i}}}}{k - \frac{1}{\tau/\lambda^{vég-i}}} \end{aligned}$$

Alakítsuk át a második tag második tényezőjét a (4.69) egyenlet figyelembe vételével:

$$(4.90) \quad \begin{aligned} 1 - k \nu \cdot \sum_{i=0}^{vég} \frac{\mu^i}{k - \frac{1}{\tau/\lambda^{vég-i}}} &= \nu \cdot \sum_{i=0}^{vég} \mu^i - k \nu \cdot \sum_{i=0}^{vég} \frac{\mu^i}{k - \frac{1}{\tau/\lambda^{vég-i}}} \\ \nu \cdot \sum_{i=0}^{vég} \mu^i - k \nu \cdot \sum_{i=0}^{vég} \frac{\mu^i}{k - \frac{1}{\tau/\lambda^{vég-i}}} &= \nu \cdot \sum_{i=0}^{vég} \mu^i - k \frac{\mu^i}{k - \frac{1}{\tau/\lambda^{vég-i}}} = \\ (4.91) \quad &= \nu \cdot \sum_{i=0}^{vég} \mu^i - \frac{\mu^i}{1 - \frac{1}{k\tau/\lambda^{vég-i}}} = \nu \cdot \sum_{i=0}^{vég} \frac{\mu^i \left(1 - \frac{1}{k\tau/\lambda^{vég-i}} \right) - \mu^i}{1 - \frac{1}{k\tau/\lambda^{vég-i}}} = \\ &= \nu \cdot \sum_{i=0}^{vég} \frac{\left(-\frac{\mu^i}{k\tau/\lambda^{vég-i}} \right)}{\left(\frac{k\tau/\lambda^{vég-i} - 1}{k\tau/\lambda^{vég-i}} \right)} = \nu \cdot \sum_{i=0}^{vég} \frac{-\mu^i}{k\tau/\lambda^{vég-i} - 1} = \nu \cdot \sum_{i=0}^{vég} \frac{\mu^i}{1 - k\tau/\lambda^{vég-i}} \end{aligned}$$

Ez alapján a következő egyenlőségeket írhatjuk fel:

$$(4.92) \quad \nu \cdot \sum_{i=0}^{vég} \mu^i - k \nu \cdot \sum_{i=0}^{vég} \frac{\mu^i}{k - \frac{1}{\tau/\lambda^{vég-i}}} = \nu \cdot \sum_{i=0}^{vég} \frac{\mu^i}{1 - k\tau/\lambda^{vég-i}}$$

$$(4.93) \quad \nu \cdot \sum_{i=0}^{vég} \mu^i = \nu \cdot \sum_{i=0}^{vég} \frac{\mu^i}{1 - k\tau/\lambda^{vég-i}} + k \nu \cdot \sum_{i=0}^{vég} \frac{\mu^i}{k - \frac{1}{\tau/\lambda^{vég-i}}}$$

$$(4.94) \quad \nu \cdot \sum_{i=0}^{\text{vég}} \mu^i - \nu \cdot \sum_{i=0}^{\text{vég}} \frac{\mu^i}{1 - k\tau/\lambda^{\text{vég}-i}} = k\nu \cdot \sum_{i=0}^{\text{vég}} \frac{\mu^i}{k - \frac{1}{\tau/\lambda^{\text{vég}-i}}}$$

A (4.92)-t visszahelyettesítve a (4.89) egyenlet második tagjába:

$$(4.95) \quad \begin{aligned} Fluo(t) = & \Phi_F + (\Phi_I - \Phi_F) \left(\nu \cdot \sum_{i=0}^{\text{vég}} \frac{\mu^i}{1 - k\tau/\lambda^{\text{vég}-i}} \right) \cdot e^{-kt} + \\ & + (\Phi_U - \Phi_I) \nu \cdot \sum_{i=0}^{\text{vég}} \mu^i \cdot e^{-\frac{t}{\tau/\lambda^{\text{vég}-i}}} + (\Phi_I - \Phi_F) k\nu \cdot \sum_{i=0}^{\text{vég}} \frac{\mu^i \cdot e^{-\frac{t}{\tau/\lambda^{\text{vég}-i}}}}{k - \frac{1}{\tau/\lambda^{\text{vég}-i}}} \end{aligned}$$

Bontsuk fel a harmadik és negyedik tagot:

$$(4.96) \quad \begin{aligned} Fluo(t) = & \Phi_F + (\Phi_I - \Phi_F) \left(\nu \cdot \sum_{i=0}^{\text{vég}} \frac{\mu^i \cdot e^{-kt}}{1 - k\tau/\lambda^{\text{vég}-i}} \right) + \Phi_U \nu \cdot \sum_{i=0}^{\text{vég}} \mu^i \cdot e^{-\frac{t}{\tau/\lambda^{\text{vég}-i}}} - \\ & - \Phi_I \nu \cdot \sum_{i=0}^{\text{vég}} \mu^i \cdot e^{-\frac{t}{\tau/\lambda^{\text{vég}-i}}} + \Phi_I k\nu \cdot \sum_{i=0}^{\text{vég}} \frac{\mu^i \cdot e^{-\frac{t}{\tau/\lambda^{\text{vég}-i}}}}{k - \frac{1}{\tau/\lambda^{\text{vég}-i}}} - \Phi_F k\nu \cdot \sum_{i=0}^{\text{vég}} \frac{\mu^i \cdot e^{-\frac{t}{\tau/\lambda^{\text{vég}-i}}}}{k - \frac{1}{\tau/\lambda^{\text{vég}-i}}} \end{aligned}$$

A Φ_I tényezőt tartalmazó kifejezéseket vonjuk össze a (4.92) egyenlőség figyelembe vételével, a Φ_U tényezőt tartalmazót pedig pontsuk fel a (4.94) figyelembe vételével:

$$(4.97) \quad \begin{aligned} Fluo(t) = & \Phi_F + (\Phi_I - \Phi_F) \left(\nu \cdot \sum_{i=0}^{\text{vég}} \frac{\mu^i \cdot e^{-kt}}{1 - k\tau/\lambda^{\text{vég}-i}} \right) + \Phi_U \nu \cdot \sum_{i=0}^{\text{vég}} \mu^i \cdot e^{-\frac{t}{\tau/\lambda^{\text{vég}-i}}} - \\ & - \Phi_I \nu \cdot \sum_{i=0}^{\text{vég}} \frac{\mu^i \cdot e^{-\frac{t}{\tau/\lambda^{\text{vég}-i}}}}{1 - k\tau/\lambda^{\text{vég}-i}} - \Phi_F k\nu \cdot \sum_{i=0}^{\text{vég}} \frac{\mu^i \cdot e^{-\frac{t}{\tau/\lambda^{\text{vég}-i}}}}{k - \frac{1}{\tau/\lambda^{\text{vég}-i}}} \end{aligned}$$

$$(4.98) \quad \begin{aligned} Fluo(t) = & \Phi_F + (\Phi_I - \Phi_F) \left(\nu \cdot \sum_{i=0}^{\text{vég}} \frac{\mu^i \cdot e^{-kt}}{1 - k\tau/\lambda^{\text{vég}-i}} \right) + \Phi_U \nu \cdot \sum_{i=0}^{\text{vég}} \mu^i \cdot e^{-\frac{t}{\tau/\lambda^{\text{vég}-i}}} - \\ & - \Phi_I \nu \cdot \sum_{i=0}^{\text{vég}} \frac{\mu^i \cdot e^{-\frac{t}{\tau/\lambda^{\text{vég}-i}}}}{1 - k\tau/\lambda^{\text{vég}-i}} - \Phi_F \nu \cdot \sum_{i=0}^{\text{vég}} \mu^i \cdot e^{-\frac{t}{\tau/\lambda^{\text{vég}-i}}} + \Phi_F \nu \cdot \sum_{i=0}^{\text{vég}} \frac{\mu^i \cdot e^{-\frac{t}{\tau/\lambda^{\text{vég}-i}}}}{1 - k\tau/\lambda^{\text{vég}-i}} \end{aligned}$$

A fenti kifejezésben vonjuk össze a harmadik tagot az ötödikkel, illetve a negyedik tagot az utolsóval:

$$(4.99) \quad \begin{aligned} Fluo(t) = & \Phi_F + (\Phi_I - \Phi_F) \left(\nu \cdot \sum_{i=0}^{\text{vég}} \frac{\mu^i \cdot e^{-kt}}{1 - k\tau/\lambda^{\text{vég}-i}} \right) + (\Phi_U - \Phi_F) \nu \cdot \sum_{i=0}^{\text{vég}} \mu^i \cdot e^{-\frac{t}{\tau/\lambda^{\text{vég}-i}}} - \\ & - (\Phi_I - \Phi_F) \nu \cdot \sum_{i=0}^{\text{vég}} \frac{\mu^i \cdot e^{-\frac{t}{\tau/\lambda^{\text{vég}-i}}}}{1 - k\tau/\lambda^{\text{vég}-i}} \end{aligned}$$

Ebben a kifejezésben az $(\Phi_I - \Phi_F)$ tényezőt tartalmazó tagok összevonhatók:

$$(4.100) \quad \begin{aligned} Fluo(t) = & \Phi_F + (\Phi_U - \Phi_F) \nu \cdot \sum_{i=0}^{vég} \mu^i \cdot e^{-\frac{t}{\tau/\lambda^{vég-i}}} + \\ & + (\Phi_I - \Phi_F) \left(\nu \cdot \sum_{i=0}^{vég} \frac{\mu^i \cdot e^{-kt}}{1 - k\tau/\lambda^{vég-i}} - \nu \cdot \sum_{i=0}^{vég} \frac{\mu^i \cdot e^{-\frac{t}{\tau/\lambda^{vég-i}}}}{1 - k\tau/\lambda^{vég-i}} \right) \end{aligned}$$

$$(4.101) \quad Fluo(t) = \Phi_F + (\Phi_U - \Phi_F) \nu \cdot \sum_{i=0}^{vég} \mu^i \cdot e^{-\frac{t}{\tau/\lambda^{vég-i}}} + (\Phi_I - \Phi_F) \nu \cdot \sum_{i=0}^{vég} \frac{\mu^i \cdot \left(e^{-kt} - e^{-\frac{t}{\tau/\lambda^{vég-i}}} \right)}{1 - k\tau/\lambda^{vég-i}}$$

Az illesztés egyszerűsítése érdekében a konstans tagokat vonjuk össze paraméterekbe a következők szerint:

$$(4.102) \quad \begin{aligned} p_1 & := \Phi_F \\ p_2 & := (\Phi_U - \Phi_F) \nu \\ p_3 & := (\Phi_I - \Phi_F) \nu \end{aligned}$$

Az illesztésre használt egyenlet végső alakja tehát:

$$(4.103) \quad Fluo(t) = p_1 + p_2 \left(\sum_{i=0}^{vég} \mu^i \cdot e^{-\frac{\lambda^{vég-i} t}{\tau}} \right) + p_3 \left(\sum_{i=0}^{vég} \frac{\mu^i \cdot \left(e^{-kt} - e^{-\frac{\lambda^{vég-i} t}{\tau}} \right)}{1 - \frac{k\tau}{\lambda^{vég-i}}} \right)$$

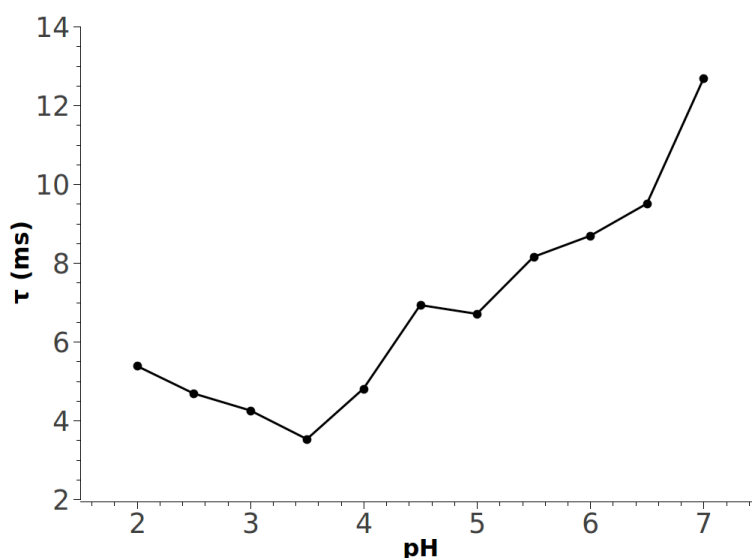
ahol $Fluo(t)$ a t időben detektált fluoreszcenciaintenzitás, k a monomolekuláris intermedier–folding-átalakulási reakció sebességi állandója, τ az unfolded–intermedier átalakulást leíró energiafelszín-modell Debye-járulékeinak időállandói közül a leghosszabb, λ a Debye-járulékok időállandóit leíró hatványsor kvóciense, μ^i a Debye-járulékok amplitúdóit és időállandóit leíró hatványsorok kvócienseinek aránya, $vég$ a Debye járulékok számánál eggyel kisebb szám, végül p_1 , p_2 és p_3 paraméterek.

A gyors fázist kísérő fluoreszcenciaváltozások kiértékelése során ezen egyenlet illesztésével nyertem ki a kinetikát leíró paramétereket. A formula optimális illeszkedést mutatott valamennyi pH-értéken $vég = 4$ esetén, vagyis öt Debye-járulékot feltételezve. Az illesztés során nyert legrövidebb időállandókat a 6. táblázat mutatja, míg az időállandók közül a legrövidebbet a koncentráció függvényében a 25. ábra foglalja össze. A folding sebességét jellemző időállandó a pH csökkenésével fokozatosan

6. táblázat. A nemexponenciális modellel történő illesztés során nyert adatokból számolt leggyorsabb komponens időállandója (egysége: ms).

Az illesztést a (4.103) egyenlettel végeztem a korai fluoreszcenciaváltozások görbéire, melyek közül az egész pH-kon mértéket a 24. ábra mutatja. A feltüntetett időállandók az illesztési egyenletben τ/λ^4 értékének felelnek meg.

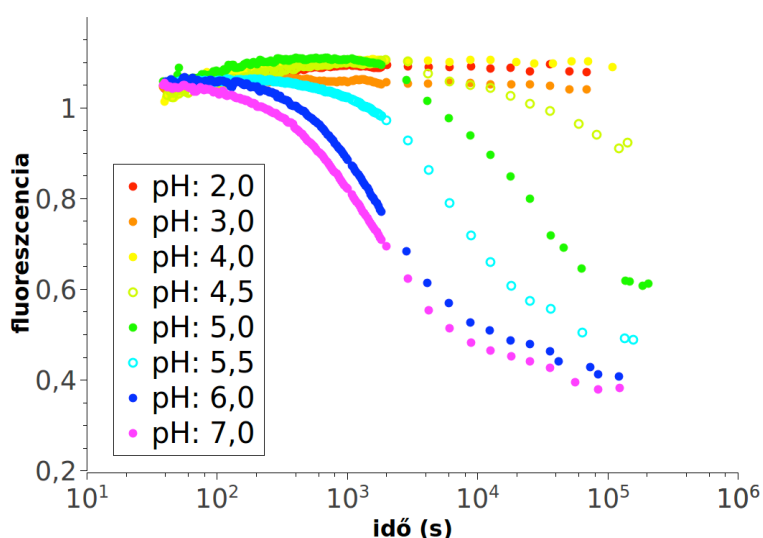
pH = 7,0	pH = 6,5	pH = 6,0	pH = 5,5	pH = 5,0	pH = 4,5
$12,7 \pm 4,0$	$9,5 \pm 1,8$	$8,7 \pm 1,2$	$8,2 \pm 1,0$	$6,7 \pm 0,7$	$6,9 \pm 1,3$
pH = 4,0	pH = 3,5	pH = 3,0	pH = 2,5	pH = 2,0	
$4,8 \pm 0,7$	$3,5 \pm 0,1$	$4,3 \pm 0,4$	$4,7 \pm 0,4$	$5,4 \pm 0,4$	



25. ábra. A korai hiperfluoreszcens termék kialakulásának sebessége különböző pH-értékeken.

A hiperfluoreszcens termékek kialakulását mutató 24. ábra görbéinek illesztését a (4.103) nem-exponenciális egyenlettel végeztem, majd a kinyert illesztési értékek közül az átalakulási sebességet legjobban jellemző legrövidebb értéket (6. táblázat, az ábrán τ -val jelölve, ami az egyenletben τ/λ^4 -nek felel meg) ábrázoltam a pH-érték függvényében.

csökken (ez a folding sebességének növekedését jelenti), és pH = 3,5-nél éri el a minimumát, majd a további alacsonyabb pH-értékeken nő. Valamennyi értéket egybevetve az is megállapítható, hogy a vizsgált koncentráció- és hőmérsékleti viszonyok között a legmagasabb pH-n, 7,0-n a halad a leglassabban az olvadt gombóc kialakulása.



26. ábra. A triptofánfluoreszcencia változása a keverést követő 2 napban.

A mérés kezdetekor a savval denaturált vad PGK-t tízszeres térfogatú citrát–foszfát-pufferrel kevertem el kézi módszerrel. A fluoreszcenciaintenzitás–idő-görbék felvétele során a gerjesztés 295 nm-en 0,25 nm résszélességgel történt, detektálást 355 nm-en végeztem 12 nm detektoroldali résszélesség mellett 1800 s-ig. A további értékeket adott időközönként felvett egyedi spektrumokból nyertem, ahol a gerjesztés 295 nm-en történt 1 nm-es sáv szélességgel; a detektálást 305–400 nm között végeztem 1,5 nm-es sáv szélességgel.

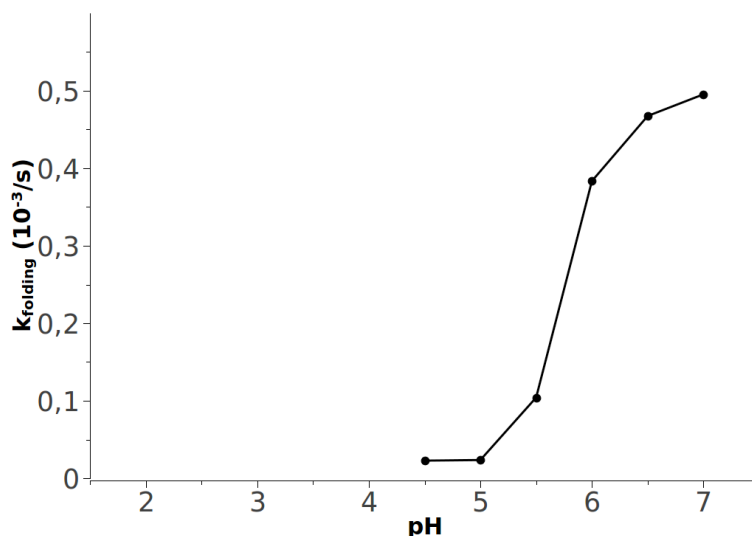
4.3.2. A triptofánfluoreszcencia megváltozása a kései folyamatokban

A vad típusú PGK natív fluoreszcenciáját kézikéveréses mérésindítással 1800 s-ig, illetve 2 napig követtem. A mérés első részében a fluoreszcenciaintenzitás időfüggését mértem, majd ehhez illesztettem a később felvett spektrumokból nyert

7. táblázat. Az egy lépéses foldingreakció illesztések alapján nyert sebességi állandója (k_{folding}) különböző pH-kon.

A sebességi állandót a 26. ábra pontjaira illesztett (4.104) egyenlet alapján kaptam.
Egysége 10^{-3} s^{-1} .

pH = 7,0	pH = 6,5	pH = 6,0	pH = 5,5	pH = 5,0	pH = 4,5
0,4955	0,4675	0,3835	0,1042	0,0235	0,0227



27. ábra. A hosszútávú mérések során felvett triptofánfluoreszcencia-görbékre illesztett monoexponenciális függvény időállandójának függése a pH-értéktől.

Az illesztést a 26. ábra görbéin végeztem a 4,0 fölötti pH-értékeken a (4.104) egyenlettel. A többi pH-n a változások csekély mértéke miatt az illesztés nem adott értelmezhető eredményt.

intenzitásértékeket. A görbéken (26. ábra) látható, hogy magas pH-értékeken, egészen 5,0 pH-ig bekövetkezik a foldingra jellemző fluoreszcenciacsökkenés, míg ennél alacsonyabb pH-kon a változás a kiértékelhető mértéket nem éri el.

Kinetikai modell. A mérési eredmények kiértékeléséhez a mért értékpárookra egy egy lépéses, monomolekuláris reverzibilis kémiai reakciónak megfelelő monoexponenciális függvényt illesztettem a *Mathematica* programmal:

$$(4.104) \quad \text{Fluo}(t) = p_1 + p_2 \cdot e^{-kt}$$

ahol $\text{Fluo}(t)$ a t időben mért fluoreszcenciaintenzitás, k az időállandó, p_1 és p_2 pedig paraméterek:

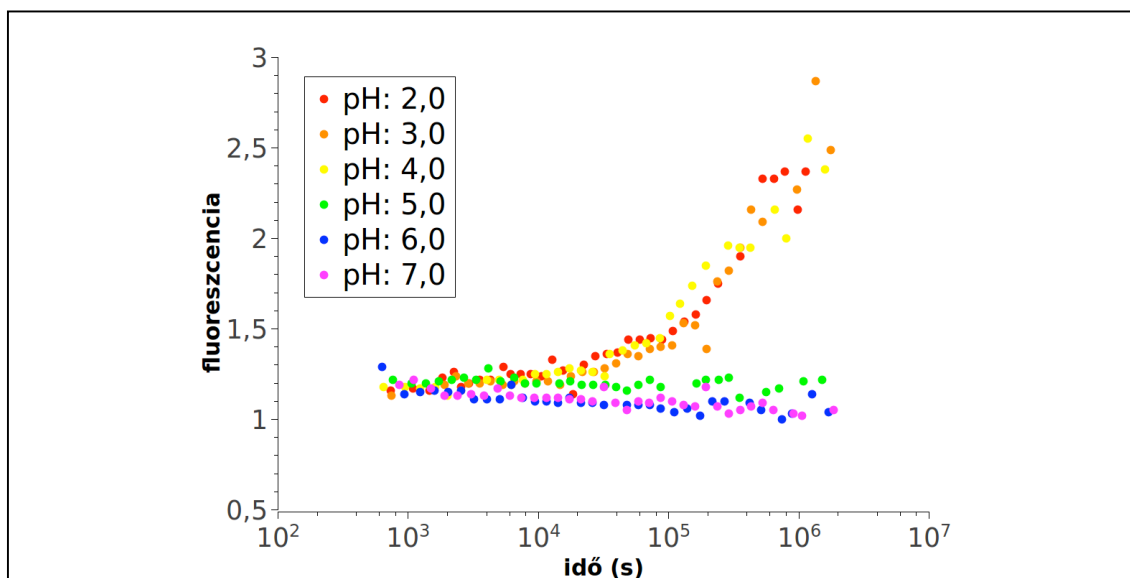
$$(4.105) \quad \text{Fluo}(t = 0) = p_1 + p_2$$

$$(4.106) \quad \text{Fluo}(t = \infty) = p_1$$

Az illesztéssel kapott időállandókat a 7. táblázat tartalmazza és a 27. ábra szemlélteti a pH függvényében. Az egy lépéses reakció sebessége a 7,0 pH-n a legnagyobb, majd pH = 6,0 alatt meredeken csökken, 5,0 alatt pedig nem lehet elvégezni az illesztést. Mindez arra utal, hogy csak a legalább 5,0 pH-értékű közegekben mehet végre folding a kísérleti körülmények között.

4.3.3. ThT-fluoreszcencia változása a kései folyamatokban.

Az olvadt gombóc továbbalakulását nem csak natív triptofánfluoreszcencia segítségével követtük nyomon, hanem az amiloidokra érzékeny tioflavin-T-festék fluoreszcenciájával is. A kézzel 1 : 10 arányban elkevert savval denaturált fehérje és



28. ábra. A ThT-fluoreszcenciaintenzitás–idő-függvény.

A savdenaturált fehérje és a citrát–foszfát–pufferek sterilén tárolt 1 : 10 arányú keverékéből 3 hét alatt adott időközönként vett részleteket adtam ThT-oldathoz, melynek a hozzáadás előtt és után is meghatároztam a fluoreszcenciaspektrumát. A mérések során gerjesztés 450 nm-en hajtottam végre 4 nm-es spektrumszélességgel, a fluoreszcens fény intenzitását 458–530 nm között mértem 2 nm-es sávzélességgel. A minta hozzáadása után felvett színekép görbe alatti területét (numerikus integrálját) osztottam a minta hozzáadása előttiével. A kapott arányokat pH-nként eltérő színnel az idő függvényében ábrázoltam.

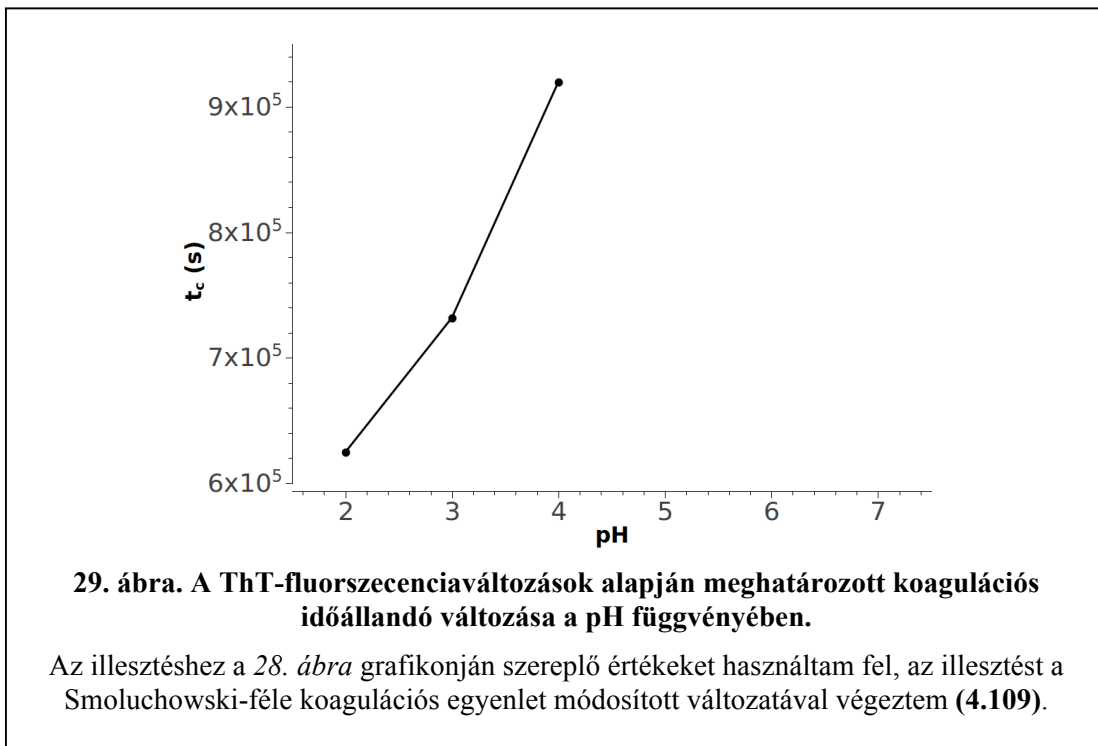
8. táblázat. A PGK amiloidképzése során felvett ThT-fluoreszcenciaintenzitás–idő-függvény Smoluchowski-modell szerinti illesztésével nyert koagulációs időállandó (t_c) és kritikus monomerszám (m) paraméterek értéke az egyes pH-kon.

A paramétereket a Smoluchowski modell (4.109) szerinti egyenletének a 28. ábrán látható ThT-fluoreszcenciaintenzitás–idő-függvény pontjaira való illesztésével nyertem.

paraméter	pH = 2,0	pH = 3,0	pH = 4,0
t_c (10^5 s)	6,25	7,32	9,20
m	1,14	1,32	0,76

citrát–foszfát–puffer változását 3 hétig követtem nyomon. Magas pH-n (5,0–7,0) nem következik be számottevő fluoreszcenciaváltozás a megfigyelési időszakban, hanem végig (söt, enyhe csökkenést mutatva) 1 közeli érték marad. Ezzel szemben 4,0; 3,0 és

2,0 pH-értékeken az időszak végére jelentősen megnő ez az érték (28. ábra).



Kinetikai modell. Az alacsonyabb pH-kon fellépő változások kiértékeléséhez elvégeztem a Smoluchowski-féle koagulációs egyenletből levezetett függvény illesztését. Tegyük fel, hogy a legfeljebb m monomerből álló aggregátumok nem befolyásolják a ThT-fluoreszcenciát, míg az m monomerszámot meghaladva az ugrásszerűen, egy lépésben megváltozik. A (4.26) egyenletből látható, hogy az m monomernél több egységből álló amiloidok hányada a t időpontban ($f_{i>m}(t)$):

$$(4.107) \quad f_{i>m}(t) = (m+1) \cdot \left(\frac{(t/t_c)}{(1+t/t_c)} \right)^m + m \cdot \left(\frac{(t/t_c)}{(1+t/t_c)} \right)^{m+1}$$

így az illesztést elvégezhetjük a következő egyenlettel:

$$(4.108) \quad Fluo(t) = p_1 + p_2(f_{i>m}(t))$$

$$(4.109) \quad Fluo(t) = p_1 + p_2 \left((m+1) \cdot \left(\frac{(t/t_c)}{(1+t/t_c)} \right)^m + m \cdot \left(\frac{(t/t_c)}{(1+t/t_c)} \right)^{m+1} \right)$$

ahol $Fluo(t)$ a t időpillanatban mért ThT-fluoreszcenciaarány, m a kritikus monomerszám, t_c a koagulációs időállandó, p_1 és p_2 pedig paraméterek (p_1 az

amiloidoktól függetlenül, pl. hígulásból adódóan fellépő fluoreszcenciaváltozás, míg p_2 az amiloidképződéshez köthető fluoreszcenciaváltozás). Az illesztés során kapott paramétereket a 8. táblázat tartalmazza, t_c értékét a különböző pH-kon pedig a 29. ábra szemlélteti. Amint látható, a koagulációs időállandó a pH emelkedésével nő, vagyis az amiloidképződés sebessége 2,0 pH-n a legnagyobb.

5. Megbeszélés

Habár vannak adatok az amiloidok funkcionális szerepére, ma az amiloidok leginkább betegségben történő előfordulásukról ismertek. Oki vagy kísérő tüneti szerepük még sok esetben nincs tisztázva, szerkezetük és szerkezeti kinetikájuk megismerése mégis a kutatások homlokterében helyezkedik el. Az amiloidaggregátumok *in vivo* kialakulásának megfigyelése sajnos leküzdhetetlennek tűnő akadályokba ütközik, de szerencsére lehetőségünk van a patológiás szövetekből izolált mintákkal azonos szerkezetű amiloidok *in vitro* előállítására. Mindez nyilvánvalóvá teszi a modellfehérjék jelentőségét az amiloidok szerkezeti kinetikájának kutatásában.

Az amiloidképződés vizsgálata során érdeklődésem fő iránya a nagyobb szerkezeti egységek kölcsönhatásainak amiloidképződésre gyakorolt hatása, a kialakult amiloidszerkezet megbontása és működőképes fehérje visszanyerése, illetve a fehérjeszerkezetet az amiloidképződés irányába mozdító erők megismerése felé mutatott.

5.1. A doménkölcsönhatások amiloidképződésre gyakorolt hatása

A nagyobb fehérjék natív szerkezetének kialakulását könnyíti, hogy a harmadlagos szerkezet kisebb egységekre, doménekre tagolódik, melyekben a folding viszonylagos önállósággal zajlik le. Más fehérjék mellett a PGK-ban is leírták domének közötti kölcsönhatások szerepét a fehérje globális foldingja során (Osvat és mtsai 2005). Ismert több amiloidlerakódással kísért betegség, melyben az aggregálódó fehérje natív szerkezete is doménekre oszlik. Ezen szerkezeti egységek közötti kölcsönhatást az amiloidképződés során mégsem kutatták, feltehetően amiatt, hogy az amiloidszerkezet kialakulását megelőzi a natív szerkezetben meglévő domének felbomlása, majd eltűnése. Ebből könnyen arra lehetne következtetni, hogy a fehérjelánc távolabbi régióinak kölcsönhatása nem bír jelentős hatással az amiloidképződésre. Kísérleteink eredménye ezzel ellentétben azt mutatja, hogy a PGK doménjei közötti kapcsolatok döntően befolyásolják az amiloidképződés kinetikáját és a kialakuló végső szerkezetet is. Ennek jelentős szerepe lehet az élő szervezetben végbemenő fehérjebontó mechanizmusok szempontjából, mivel az abban résztvevő proteázokkal szembeni rezisztencia nagyban függ a lebontandó fehérje harmadlagos szerkezetétől. Az

eltérésekre magyarázatot adhat, hogy a fehérjék foldingútvonalát jelentősen befolyásolja a doménegységek domének közötti kölcsönhatásokhoz viszonyított stabilitása (Brandts és mtsai 1989; Freire és mtsai 1992). Mivel az amiloidképződés gyakran a destabilizált natív szerkezetből vagy egy részlegesen hajtogatódott állapotból indul el, reális feltételezés, hogy az amiloidképződést megelőző misfolding irányításában meghatározó szerep jut a doméneket alkotó távolabbi fehérjelánc-részek közötti kölcsönhatásoknak. Ezt alátámasztják a PGK energiaszínének pH-függésén végzett vizsgálataink, ami azt igazolja, hogy a savdenaturált fehérjéből indulva a részlegesen hajtogatódott olvadt gombóc a szétválási pont a natív és az amiloid állapot irányába.

Az amiloidképződést azonos helyen egyetlen triptofánt tartalmazó teljes fehérje-domén párokon, illetve a vad típusú fehérjén vizsgáltam. A fluoreszcenciaszínképek alapján elmondható, hogy a szerkezetdestabilizáló keverés után 17 perccel létrejövő szerkezet triptofánjai jobban ki vannak téve a poláris oldószernek, mint a natív szerkezetben, viszont kevésbé, mint a savasan denaturált állapotban. A négy nap után felvett spektrumok eltérést mutatnak a teljes fehérje és a megfelelő domén között, tehát a létrejövő amiloidok végleges szerkezetét meghatározza a másik domén jelenléte. A 17. perc és a 4. nap között lezajló fluoreszcenciaváltozás számszerű nyomonkövetésére és az eltérések összehasonlítására elvégeztem a Smoluchowski-féle koagulációs egyenlet módosított változatának illesztését a mért értékekre. Az egyenlet alkalmazásakor feltételeztem, hogy a fluoreszcenciaváltozás egyetlen lépésben, ugrásszerűen változik meg egy bizonyos monomerszám fölött. Mindemellett nem zárható ki, hogy a folyamat nem egy lépésben, hanem fokozatosan, finomabb átmenetekkel megy végbe az általam meghatározott kritikus monomerszámot magában foglaló szélesebb mérettartományban.

Az egyenlet abban a három esetben, amikor számottevő fluoreszcenciaarány-változás következett be, meggyőzően írta le az átalakulás kinetikáját, megállapítható tehát, hogy azon mutánsok esetében, amelyeknél a triptofánfluoreszcencia kellő érzékenységet mutat a környezeti változásokra, az átalakulások során a Smoluchowski-féle koagulációs kinetika érvényesül. Az izolált C-doménben a triptofán $5,6 \pm 1,8$ monomerszámnál mutatja a környezet megváltozását. Ez a pont időben körülbelül a kritikusoligomer-képződés befejeződésének és a protofibrillum-összeszerelődés megindulásának felel meg. Ezzel ellentétben az ugyanitt jelölt teljes fehérjén $2,7 \pm 0,8$

monomerszámnál, vagyis az oligomerizáció első lépését követően következett be az ugrásszerűnek feltételezett fluoreszcenciaugrás. Az N-doménben lévő triptofán nem érzékelte az oldatkörnyezet megváltozását, míg a teljes fehérjében ugyanott elhelyezett triptofán a teljes fehérje C-doménjében elhelyezett triptofánhoz hasonló fluoreszcenciaváltozást mutatott a $2,1 \pm 0,8$ monomerszámnál.

Azon három mutáns esetében, ahol el tudtam végezni a az illesztést, a koagulációs időállandó mérési hibán belül megegyezett. A vad típusú PGK koagulációs időállandója a mutánsoknál talált érték mintegy kétszerese. Vegyük figyelembe, hogy a mérés során a mutánsok esetében $80 \mu\text{M}$, a vad típusú fehérjénél $40 \mu\text{M}$ volt a koncentráció. A fehérjekoncentráció feleződése következtében kétszeresére nyúló koagulációs időállandó összhangban van a máshol tapasztaltakkal. (Modler és mtsai 2003) A koagulációs időállandó kiszámolható a Boltzmann-állandó (k_B), a termodinamikai hőmérséklet (T), az oldatviszkozitás (η), a kiindulási fehérjemonomer-koncentráció (n_1) és a tapadási valószínűség (α) ismeretében:

$$(5.1) \quad t_c = \frac{3 \cdot \eta}{4 \cdot k_B \cdot T \cdot \alpha \cdot n_1(0)}$$

Mindezek alapján megalapozottan állíthatom, hogy a koagulációs időállandó valamennyi PGK-mutánsban megegyezik, következésképpen az oligomerizációs folyamat valamennyi fehérje esetében hasonló kinetika szerint zajlik. Eltérések csak az oligomerizáció következményeként fellépő strukturális változásokban vannak a triptofán fluoroforok környezetében. Tehát valamennyi fehérje esetében – függetlenül az elsődleges szerkezettől – kialakul a klasszikus β -redős amiloidstruktúra. Eredményeim azonban rámutatnak, hogy a szekvenciafüggő tulajdonságoknak, a polipeptidlánc távoli csoportjai közötti kölcsönhatásoknak meghatározó szerep jut az amiloidképződés során és befolyásolják az amiloidfibrillumok végső térszerkezetét is.

5.2. Aktív PGK helyreállíthatósága amiloidból

Munkám során az irodalomból ismert módszerrel sikerült előállítanom az élesztő-PGK-ból amiloid fibrillumokat, meghatároztam az amiloiddá alakulás hatásfokát, majd sikerült dezintegrálnom az amiloidfibrillumokat és helyreállítanom a natív szerkezetet, végül meghatároztam a helyreállítás hatásfokát is. Az amiloidok kimutatására használt klasszikus módszerek, mint a CR-festék CD-spektrumának változása $500\text{--}550 \text{ nm}$ között, a szintén jellegzetes változás a ThT $460\text{--}530 \text{ nm}$ közötti

fluoreszcenciaspektrumában, továbbá az elektronmikroszkópos felvételeken megfigyelhető fonálszerű képződmények mind az amiloidok jelenlétét igazolták. A kísérlet szempontjából lényeges volt, hogy a fehérje teljes mértékben amiloiddá alakuljon, ami a korábbi amiloidképződéssel foglalkozó munkákban nem volt szempont. Ehhez nem volt elegendő az amiloidok pusztá jelenlétének igazolása, azt is vizsgálni kellett, hogy teljes volt-e az átalakulás, maradt-e monomer fehérje, esetleg kialakult-e valamilyen más asszociátum. Ha az amiloid mellett más fehérjeaggregátum is képződött volna (például amorf aggregátum, amelynek közel sincs annyira dokumentálva a stabilitása, mint az amiloidnak), nem zárhattam volna ki, hogy a visszanyert működőképes fehérje abból is vagy kizárólag abból származik, ami bizonytalanná tette volna az amiloidból történő helyreállási hatások meghatározását. A dinamikus fényszórással meghatározott méreteloszlás azonban világosan mutatja, hogy a mintában lévő részecskék két mérettartományba estek. Az amiloidnak a nagyobb mérettartományba eső részecskék feleltek meg, emellett még egy intervallumban voltak részecskék, amely megfelelt a monomer fehérje méretének. Ezeken kívül további csúcsot nem lehetett azonosítani, az pedig elég valószínűtlen, hogy valamilyen eltérő mechanizmussal az amiloiddal azonos méreteloszlású aggregátumok keletkezzenek. Tehát nem csak arról bizonyosodtam meg, hogy amiloidok voltak jelen a mintában, hanem arról is, hogy a fehérje szinte 100%-ig amiloidfibrillumokká alakult, a maradék csekély rész pedig monomer fehérje.

A natív fehérje visszanyerésére a legkézenfekvőbb módszernek az tűnt, ha az amiloid mintát közvetlenül a natív szerkezet kialakulásának kedvező pufferbe hígítom. Így azonban a kiindulási aktivitás elenyésző, két százalékot sem elérő hányadát nyertem vissza. Ez az érték több nap elteltével sem javult. Ezt követően a módszert úgy módosítottam, hogy az amiloidot NaCl-mentes sósavoldattal (pH = 2) szemben dializáltam egy éjszakán át. A só eltávolításával lecsökken az ionerősség, mely az alacsony pH miatt jelentős nettó pozitív töltésű fehérjék közötti taszítást árnyékolja, emiatt számíthattam az aggregátumok szétesésére. Ezt alátámasztották az elektronmikroszkópos felvételek, amelyeken nem lehetett fibrillumokat azonosítani. A savanyú oldatot ezután kevertem a natív körülményeknek megfelelő 7,5-ös pH-jú Tris pufferbe. Az aktivitásmérés és a kalorimetriás vizsgálat azt bizonyította, hogy a kiindulási és a visszanyert fehérje mind szerkezetében, mind funkciójában egyenértékű.

Korábban már vizsgálták a natív szerkezet helyreállíthatóságának hatásfokát denaturált fehérjéből, ami 60–85% közé esett, az én eredményem ennek alsó határán van. Vegyük azonban figyelembe, hogy a fehérje egy hétig alacsony pH-n volt, így a nagyobb hatásfok elérését feltehetőleg az időközben végbemenő hidrolízis gátolta meg.

Ki kell még zárunk azt a lehetőséget is, hogy az amiloidok szétesését egyszerűen a hígítás okozta. A PGK-ból igen széles koncentrációtartományban, 0,36–155 μM között lehet amiloidot létrehozni, ebbe beleesik az a 0,4 μM érték is, ahol az enzimaktivitás helyreállítását mértem; ráadásul egy lépéses hígítással – kihagyva az alacsony pH-n végzett dialízist – nem lehetett funkcióhelyreállást elérni. Vizsgálataim alapján elmondható, hogy az amiloidok szétesése és az unfolding, majd a spontán folding mind lényeges lépései a szerkezethelyreállásnak.

Habár a PGK *in vivo* nem formál amiloidot, még is széles körben alkalmazzák a misfolding és amiloidképződés kutatásában. A kísérletekben az amiloid létrehozásakor alkalmazott körülmények legfeljebb szélsőséges esetben fordulhatnak elő az élő szervezetben, de hasonlóak a más, akár patogén fehérjék amiloiddá alakításakor használt laboratóriumi eljárásokhoz. A kísérletek során vegyi vagy fizikai úton destabilizálják a natív szerkezetet az amiloidok létrehozása érdekében, az élő szervezetben a destabilizációt mutáció vagy fragmentáció okozza. Arra számíthatnánk, hogy a natív szerkezetnek kedvező körülmények helyreállítása elegendő lehet a natív fehérje amiloidállapotból történő visszanyeréséhez. A leírt kísérlet azonban rávilágít, hogy a natív körülmények puszta helyreállítása nem elegendő a hatékony visszaalakuláshoz. Ehelyett az amiloidok teljes diszaggregációját kell elérni. Amint az monomerek újra kitekert fehérjeként állnak rendelkezésre, a natív körülmények megteremtése már kedvez a működőképes szerkezet kialakulásának. A natív szerkezet nem érhető el közvetlenül a jelen kísérlet körülményei között, amit feltehetőleg a két szerkezet közötti túlságosan magas energiagát okoz. Ennek közelebbi megismeréséhez a PGK energiefelzáró részének behatóbb vizsgálatára van szükség.

5.3. A PGK energiefelzáró részének vizsgálata

Mint fentebb már többször láttuk, korábbi vizsgálatok és saját méréseim alapján is bizonyos volt, hogy ha savval denaturált PGK-t NaCl-ot tartalmazó pH = 2 kémhatású oldatba keverünk, akkor abból néhány nap alatt amiloidfibrillumok képződnek. Másfelől korábbi refolding kísérletek alapján várható volt, hogy a pH-t a

natív állapotra jellemző 7,0-es értékre emeljük, akkor helyre áll a natív szerkezet. Ezeket a széles körben elfogadott tényeket szemügyre véve szembeötlő, hogy viszonylag kevés paraméter megváltoztatásával eldönthető, hogy a savas közegben kitekert fehérje milyen harmadlagos szerkezetet vegyen fel. Mivel a fehérje natív szerkezete pH = 7 kémhatású oldatban akkor is kialakul, ha az – az amiloidok kialakulását elősegítő savas oldathoz hasonlóan – 200 mM NaCl-ot tartalmaz, a fehérjekonformáció alakulásának irányát egyetlen paraméternek, a pH-nak a változtatásával is el lehet dönteni.

A fehérje natív szerkezetét mindenekelőtt az apoláris kölcsönhatások stabilizálják, az amiloid struktúrát viszont hidrogénkötések teszik ellenállóvá. Ha a protonkoncentráció változtatásával meg tudom határozni, hogy melyik irányba haladjon a folyamat, akkor kérdés, hogy az milyen módon befolyásolja az egyes reakciók sebességét, illetve hogy a két lehetséges termék közül melyik lesz a domináns. A közeg protonkoncentrációja nemcsak a lehetséges végtermékek energiatartalmát szabhatja meg (termodinamikai kontroll), hanem az átalakulás során leküzdendő energiagát méretét is (kinetikai kontroll). Ennek megismerése érdekében 2,0 és 7,0 között változó pH-jú, 200 mM NaCl-ot tartalmazó oldatkörnyezetbe vittem a savval denaturált PGK-t, és spektroszkópiai úton követtem nyomon a szerkezetváltozásokat.

A mérésindítás után egy intenzív fluoreszcencianövekedést tapasztaltam, ami a triptofán környezetének megváltozásával értelmezhető. A triptofán fluoreszcenciáját ugyanis a közeli oldószer-molekulák vagy egyes aminosav-oldalláncok kiolthatják; ha ezek kizáródnak a triptofán környezetéből, megnő a fluoreszcencia. (Ervin és mtsai 2002) Ez a hiperfluoreszcens köztitermék, mely megfeleltethető az olvadt gombóc néven ismert állapotnak, az általam vizsgált valamennyi pH-n kialakult, ami azt jelenti, hogy a kitekert fehérje mind a natív, mind az amiloid szerkezet felé ezen az állapoton keresztül halad. Mind a folding, mind a misfolding kitekert fehérjéből kiinduló útvonalán az olvadt gombóc az első, jól körülírható intermedier, amely a fehérjelánc gyors kollapszusával keletkezik. Az olvadt gombóc állapot natív konformációra jellemző másodlagos szerkezeti elemek már jórészt jelen vannak, de határozott harmadlagos szerkezet még nem jellemezhető. Ennek a terméknek a kialakulását sikeresen jellemezték korábban nem-exponenciális függvényekkel. Osváth és munkatársai először írták le a folding korai szakaszát olyan nem-exponenciális,

„elnyújtott” kinetikát alkalmazó energiafelszínekkel, melyekben az egyenlet nem tartalmazott a folding útvonalra vonatkozó előzetes megkötéseket. Ez a függvény alkalmas kiindulás volt valamennyi pH-értéken felvett adatsor illesztésére:

$$(1.2) \quad C(t) = \sum_{n=1}^N \frac{a_n}{\tau_n} e^{-t/\tau_n}$$

Osváth és munkatársai eredményeihez hasonlóan én is véges számú, öt exponenciális tag összegéből álló kinetikát kaptam, mely tagoknak mind időállandói (τ_n), mind Debye-járulékai (a_n) egy-egy mértani sorba illeszkednek. Ezt a paraméterek felsorolása helyett a következőképpen is meg lehet adni:

$$(1.3) \quad a_n = a_1 \cdot \alpha^{n-1}$$

$$(1.4) \quad \tau_n = \tau_1 \cdot \lambda^{n-1}$$

ahol α és λ a sorozatok kvóciensei. Az a tény, hogy a teljes vizsgált pH-tartományban érvényes az öt tagból álló „elnyújtott” kinetika, továbbá a paraméterek azonos módon (mértani sor szerint) változnak, alátámasztja, hogy nemcsak a köztitermékek, hanem a képződésükhöz vezető energiafelszín-struktúrák is hasonlóak. A köztitermékhez vezető lehetséges reakcióutak egy olyan energiafelszínen helyezkednek el, amely öt különböző mélységű és különböző gyakoriságú potenciálgödörrel van beborítva. Ez öt különböző időállandójú reakcióutat eredményez. Az öt lehetséges útból egy adott reakcióutat követő fehérjemolekulák száma arányos az a_n / τ_n értékkel. Mivel mind az időállandók, mind a Debye-járulékok amplitúdói mértani sorba illeszkednek, ezért az egyes pH-értékeken érvényes energiafelszín leírásához csupán négy paramétert kell ismerni: a_1 , τ_1 , α , λ .

A gyors kinetikák illesztését különböző számú tagból (n) álló illesztőegyenletekkel is elvégeztem. Mivel a paraméterek nem függetlenek, hanem mértani sorozatba illeszkednek, ezért n növelése nem vonta maga után a paraméterek számának növekedését (mindig elegendő volt a fentebb említett négy), csak a görbe alakja változott. Ezek közül valamennyi pH értéken $n = 5$ -nél volt a legkisebb az átlagos négyzetes eltérés. Ha az illesztéseket független (nem mértani sorba illeszkedő) paraméterekkel végezzük el, akkor sem tér el jelentősen a hiba, ami bizonyítja, hogy nem szükséges *a priori* kikötnünk a hierarchikus kapcsolatot, ami szintén alátámasztja az energiafelszín-modell érvényességét a vizsgált körülmények között.

A köztitermék kialakulási sebességét döntően a legrövidebb időállandójú (t_1)

reakcióút határozza meg. A legnagyobb sebességű és valószínűségű útvonalat jellemző t_1 értéke 3,5 pH-nál mutatott minimális értéket, vagyis ezen pH-n alakul ki a leggyorsabban az olvadt gombóc állapot. Ehhez képest a foldingnak kedvező pH irányába elmozdulva meredekebb, a misfoldingnak és amiloidképződésnek kedvező tartomány felé haladva enyhébb emelkedést tapasztalunk. Ennek tükrében elmondhatjuk, hogy a PGK energiafelszíne a pH-függvényében úgy változik, hogy a legrövidebb időállandót eredményező, vagyis „legsekélyebb” potenciálgödrök a 3,5-ös pH-értéknél vannak.

Az eddigiekben rámutattam, hogy bár eltérő időállandójú, de hasonló kinetikájú útvonalat követnek a különböző pH-jú környezetbe helyezett savdenaturált fehérjék a legrövidebb időtartományban, melynek végére valamennyinél kialakul egy hiperfluoreszcens köztitermék, melyet irodalmi adatok alapján az olvadt gombóccal azonosítunk. A hosszú távú mérésekkel feltárhattuk a későbbi változásokat, melyek során az eddig látottaknál sokkal szembetűnőbb eltérések mutatkoztak. Először értelmezzük a kézi keveréses natívfluoreszcencia-mérések során nyert adatokat.

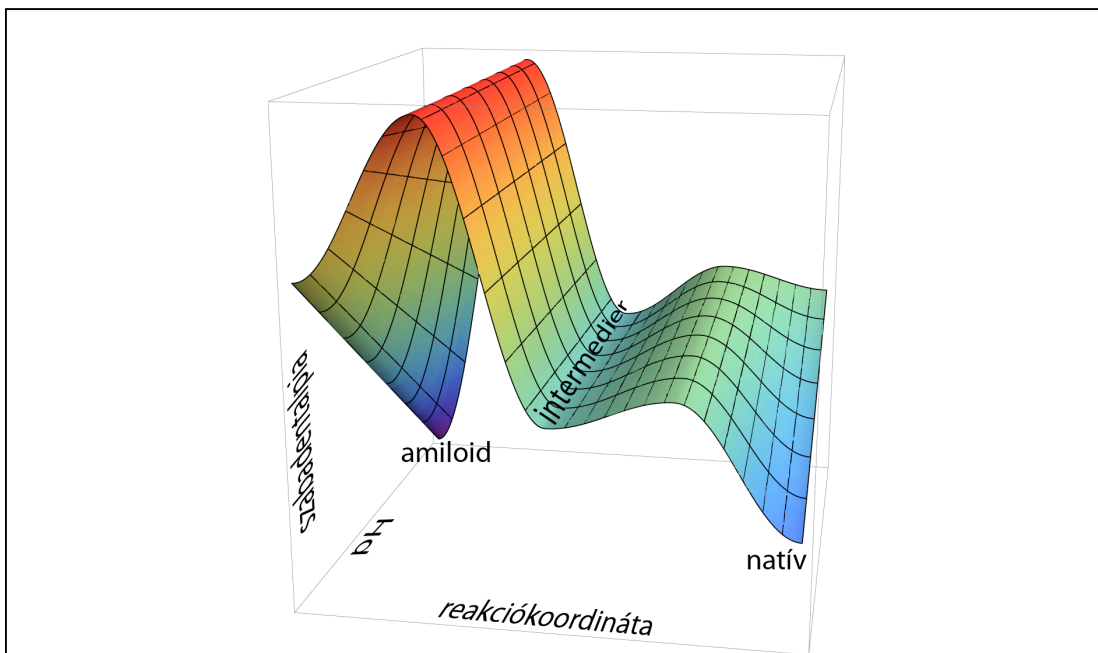
A spektrumokon látható, hogy a hiperfluoreszcencia a magasabb pH-kon 1000–10 000 s-os időskálán mérhető ütemben fokozatosan eltűnik, míg pH = 4-en vagy még savasabb közegekben már nem. A fluoreszcencia csökkenése a foldingra jellemző változás, amely így 4-es vagy az alatti pH-kon nem következik be. Ahol végbemegy, ott sem azonos sebességgel, hanem láthatóan lassuló tendenciát mutat. Az intermedier-natív átalakulást numerikus kiértékeléséhez egy egyszerű monomolekuláris reakciósémát alapul véve egy exponenciális egyenlettel illesztettem meg, melynek jellemző paramétere a k időállandó. Az fluoreszcenciaváltozást mutató grafikonon látottakat alátámasztva azt tapasztaltam, hogy az időállandó a legmagasabb vizsgált pH-értéken, 7,0-nál vesz fel maximális értéket, tehát itt lesz a leggyorsabb az átalakulás, míg a pH-t csökkentve meredeken csökken az időállandó, végül pH = 4,5 alatt már nem ad értékelhető eredményt az illesztés.

Az amiloidképződés nyomonkövetésére a tioflavin T fluoreszcenciaintenzitásának relatív megváltozását vettem alapul. Ez magasabb pH-kon alig változik a vizsgált időtartományban, míg a 2-3-4 pH-értékeken jelentős növekedést tapasztaltam. Az amiloidképződésre illesztett koagulációs kinetika segítségével kiszámoltam a koagulációs időállandót, mely enyhe időfüggést mutatott: a nagyobb pH-

k felé haladva csekély mértékben csökkent a reakciósebesség.

Mindent egybevetve megállapíthatunk egy alapsémát, mely szerint a savdenaturált fehérjéből valamennyi pH-n kialakul az intermedier, majd innen a pH függvényében vagy a folding, vagy a misfolding és amiloidképződés irányába tart tovább. A foldingkinetika pH-függése alapján kijelenthető, hogy a pH csökkenésével nő a natív állapot felé vezető útvonalon elhelyezkedő energiagát, ami lassítja az átalakulási sebességet. De még pH = 5-ön is egyértelműen a natív állapot az energetikailag kedvezményezett végállapot, tehát a reakció bár egyre lassul, az iránya nem változik. A 4-es pH-tól lefele azonban egyértelműen az amiloidképződés válik dominánssá, folding nem jelentkezik. Az amiloidképződés sebességére csak elenyésző hatással van a pH további csökkentése.

A folyamatok irányát az intermedier után tehát a lehetséges termékek energiataralma szabja meg, vagyis az átalakulás összességében *termodinamikai kontroll* alatt áll: a pH csökkenésével a natív fehérje energiataralma nő, stabilitása csökken, míg az amiloidstruktúra energiataralma egyre csökken, stabilitása pedig ennek



30. ábra. Az intermedier továbbalakulását a pH-függvényében jellemző sematikus energiafelszín.

Alacsony pH-kon (háttérben) az amiloid a termodinamikailag stabilabb termék, natív közeli pH-kon (előtérben) viszont a natív szerkezet. Az amiloid reakcióirányban natív pH-n is meglévő magas aktivációs gát az amiloidok itt is megtartott kinetikai stabilitására utal.

megfelelően fokozódik. E fő hatások mellett a reakciósebességét befolyásoló átalakulási aktiválási energia (potenciálgát) a foldingnál érzékelhetően emelkedik, ami így a reakciósebességet csökkentő *kinetikai kontrollként* jelentkezik. E hatás szerepe azonban csak másodlagos, mindössze a foldingsebességet kontrollálja. Egyidejű foldingot és amiloidképződést nem tapasztaltunk, ami megerősíti a termékek termodinamikai stabilitásának reakcióirányító szerepét (30. ábra).

6. Következtetések

Munkám során főként spektroszkópai módszerek segítségével széles időtartományban és változatos körülmények között vizsgáltam a modellfehérjének választott élesztő-foszfoglicerátkináz térszerkezetének változásait és e változások kinetikáját. Az elvégzett mérések kiértékelésére és elemzésére alapozva a következő megállapítások tehetjük:

I.1. A foldingegységek közötti kölcsönhatások vizsgálatára létrehozott *fehérjerendszer valamennyi tagja*, tehát mind a doménjeik egyikében triptofánt hordozó teljes fehérjemutánsok, mind az önmagukban álló, szintén egyetlen triptofánt tartalmazó doménmutánsok *képesek amiloidfibrillumokká aggregálódni*, amihez *megfelelő* a vad típusú PGK amiloidképzéséhez használt *200 mM NaCl-ot tartalmazó pH = 2-es sósavoldat*. Az amiloidképződés lezajlásához *hasonló nagyságrendű idő* kellett (mintegy 5 nap), mint amennyi a vad típusú fehérjénél. Az amiloidképződést valamennyi esetben *elektronmikroszkópos felvételek* bizonyítják.

I.2. A *Smoluchowski-féle koagulációs egyenlet* módosított változata, mely változóként a *koagulációs időállandót* és a *kritikus monomerszámot* tartalmazza, a vad típusú fehérje mellett a négy mutánsból háromra is alkalmazni tudtam, vagyis mindazon esetekben, ahol az amiloidképződést a *fluoreszcenciaspektrum számottevő eltolódása* kísérte. A hosszú távú fluoreszcenciamérést kísérő *intenzitásingadozásból* adódó problémákat a spektrum alakját figyelembe vevő, *eltolódásra érzékeny képlettel* küszöböltem ki. A fluoreszcencia megváltozását egy kritikus monomerszám feletti aggregátumnál *ugrásszerűnek* feltételező modellel valamennyi esetben *jó egyezést mutattak* a mérési eredmények.

I.3. Az izolált *domének* és az azonos pozícióban jelölt *teljes fehérjék* fluoreszcenciaváltozása között *határozott eltérések figyelhetők meg*, amikből eltérő kinetikájú folyamatokra következtethetünk. Míg az izolált *N-domén* gyakorlatilag *nem jelez változást*, addig *a másik három mutáns* fluoreszcenciaspektruma a vad típusnál tapasztaltnál hasonló *eltolódást mutat a rövidebb hullámhosszak irányába*. Míg a *koagulációs időállandókat* összevetve *ekvivalens* értékeket tapasztalunk, addig a *kritikus monomerszám* az izolált C-domén estében *jelentősen eltér* a mutáns vagy vad típusú teljes fehérjékétől. Megállapítható, hogy *a teljes fehérjék doménjei sokkal összehangoltabb kinetikával* alakulnak amiloiddá, mint az izolált domének, ami a

távolabbi csoportok közötti kölcsönhatások hiányával magyarázható. A kölcsönhatások hiánya nemcsak a kinetikákra, hanem a *végső szerkezetekre* is hatással van.

II.1. A PGK amiloiddá alakítására használt klasszikus módszer (pH = 2 HCl-oldat, 200 mM NaCl) hatékonyságát számos, eltérő elvre épülő módszerrel elemeztem. Az elektronmikroszkópos felvétel, a tioflavin-T oldatában megnövekedett fluoreszcencia, a kongóvörös jelenlétében kialakuló jellegzetes CD-spektrum mind megerősítette a β -redős amiloid struktúra jelenlétét. A dinamikus fényszórással nyert részecskeméreteloszlás-függvény arra ad bizonyítékot, hogy a jelenlévő fehérje több mint 99%-a egyetlen aggregátumféleség formájában van jelen. Az amiloidkimutatási módszerek pozitivitása és a méreteloszlási függvény együttesen igen erős bizonyíték arra, hogy a fehérje gyakorlatilag teljes mértékben amiloiddá alakult.

II.2. Az amiloidok diszaggregációja és az alkotó fehérjemolekulák primer szerkezeti épségének megőrzése egy kétlépéses folyamattal mutatkozott lehetségesnek: elsőként sómentes pH = 2 sósavoldattal szembeni dializálással denaturált fehérjemonomereket nyertem, majd ezeket natív körülmények közé juttatva bekövetkezett a natív szerkezetet eredményező refolding. Más módszerek, mint például a közvetlen natív körülmények közé hígítás nem mutatkoztak hatékonyak.

II.3. A kiindulási és a visszanyert fehérje biológiai egyenértékűségére enzimkinetikai és termoanalitikai bizonyítékokat is sikerült felmutatnom. A kinetikai vizsgálatok bizonyították, hogy a visszanyert preparátum katalizálja a 3-foszfoglicerát + MgATP \longleftrightarrow 1,3-biszfoszfoglicerát + MgADP reakciót, ami a biológiai ekvivalencia elsődleges követelménye. A kiindulási és a visszanyert fehérje átalakulási hőmérséklete hibahatáron belül azonos volt, ami a két fehérje szerkezeti (ideértve a térszerkezetet is) azonosságát támasztja alá.

II.4. A PGK-amiloidok növekedése és diszaggregációja az élettani viszonyokhoz képest szélsőséges (bár nem irreális) viszonyok között történt. Ennek ellenére az enzimkinetikai mérésekkel meghatározott aktív enzim hányada a sokkal kevésbé destruktív refolding kísérleteknél tapasztalt arányok alsó tartományába esik. Tehát nem csak az amiloidba zárt fehérje helyreállításának hatásfokát sikerült meghatároznom, de azt is megállapíthattam, hogy ez a hatásfok a PGK refoldinghatásfokával összemérhető érték.

III.1. A sósavval (pH = 2) denaturált PGK-t 200 mM NaCl-ot is tartalmazó

pH = 2 HCl-oldatba juttatjuk, akkor néhány nap alatt amiloiddá alakul. Ha NaCl-ra nézve ugyanekkora koncentrációjú, de pH = 7,0 oldatba juttatjuk a fehérjét, a natív szerkezet áll helyre. Így lényegében egyetlen paraméter, a pH modulálásával megválaszthatjuk a savdenaturált fehérje konformációváltásának irányát. A névleges pH keveredésből adódó változását a vizsgált pH tartományban jól pufferelő többértékű savak sóinak hozzáadásával csillapítottam.

III.2. Spektroszkópai bizonyítékok alapján kijelenthető, hogy a 7-5 pH tartományon a natív szerkezet kialakulásához vezető folding a kedvezményezett, míg 4-2 tartományban az amiloidfibrillumokat eredményező misfolding és aggregáció volt az előnyben részesített konformáció. A fluoreszcenciaváltozások időfüggése alapján megállapítható, hogy a natív szerkezet kialakulása pH = 7-nél, míg az amiloid kialakulása pH = 2-nél a leggyorsabb.

III.3. A fluoreszcenciajelet – bizonyos peremfeltételek megszabásával – alkalmassá tettem a fehérjék szerkezetváltozásának numerikus nyomonkövetésére. A savval denaturált–intermedier átalakulásra minden vizsgált pH-n alkalmazni tudtam a véges szintű hierarchikus energiefelszín-modellt, amelyre a korábban a folding leírásánál használt nemexponenciális függvényeket illesztettem. A monomolekuláris reakciónak feltett intermedier–natív átalakulást egyszerű exponenciális egyenlettel írtam le. Az intermedier–amiloid-transzformációt a Smoluchowski-féle méretfüggetlen koagulációs egyenlettel írtam le.

III.4. A hiperfluoreszcens köztitermék valamennyi pH-n kialakul a vizsgált körülmények között, minden esetben a hierarchikus energiefelszín követve, bár változó sebességgel. Ezen átmenet maximális sebességét a 3,5-ös pH-értéken éri el. A hiperfluoreszcens köztitermék továbbalakulása 7-hez közelebbi pH-kon egy egylépéses folyamatban juttat el a natív szerkezetig. Az alacsonyabb pH-kon a méretfüggetlen koagulációs kinetika dominál, amely végül az amiloidállapotba vezet el. A folding és az amiloidképződés tehát a hiperfluoreszcens intermedier kialakulásáig hasonló útvonalon jár, de az energiefelszínen elhelyezkedő potenciálgödrök mennyisége és mélysége függ a pH-tól. Ezután továbbalakulva a fehérje két útvonal közül alacsonyabb pH-kon az amiloidképződést, magasabb pH-kon a natív szerkezetbe hajtogatódást választja. Az útvonalválasztás kifejezetten vagylagos, foldingot és amiloidképződést egyidejűleg, azonos pH-n nem tapasztaltunk, a reakcióirány termodinamikai kontroll alatt áll.

7. Összefoglalás

Az Alzheimer-kór, Parkinson-kór vagy a fertőző szivacsos agysorvadás napjaink ismert gyógyíthatatlan betegségei, melyek az amiloidózisnak nevezett betegségek csoportjába tartoznak. E betegségek közös vonása a hatékony oki terápia hiányán kívül a fehérje egy nem élettani formájának, az amiloidnak a megjelenése. Az amiloidok rendkívül nagy ellenálló-képességükről ismert fehérjeaggregátumok, melyekben domináns a β -redős szerkezet, amit a fehérje gerincatomjai között létrejövő hidrogénkötések tesznek stabilá.

Növekvő klinikai jelentőségük miatt az amiloid aggregátumok az élettudományi kutatások homlokterében helyezkednek el. E kutatások részét képezik azok a biofizikai jellegű vizsgálódások, melyek a fehérjék amiloidképzési hajlamának okát, az amiloidképződés kinetikáját, az amiloidok stabilitását és esetleges diszaggregációjuk lehetőségeit kutatják.

Kutatásaim során spektroszkópai és biokémiai módszerek segítségével vizsgáltam egy kedvelt modellfehérje, az élesztő foszfoglicerátkináz viselkedését. Megállapítottam, hogy a fehérjehajtogatódás során szerephez jutó domének befolyásolják az amúgy szekvenciafüggetlen kapcsolódások létrejöttét az amiloid aggregációja során. A hatásokat az amiloidképződés kinetikáját leíró függvény paraméterei is jól mutatják.

Sikeres próbálkozást tettem foszfoglicerátkinázból előállított amiloidok diszaggregációjára, majd a natív, enzimatikusan aktív fehérje visszanyerésére, továbbá a visszaalakítás határfokának meghatározására is: a fehérjéből létrehozott amiloidot sikerült tökéletesen diszaggregálnom, majd a monomer fehérjékből ismét működőképes enzimet kialakítanom.

Végül a savban reverzibilisen denaturált fehérje folding és amiloidképződés felé is irányítható útját vizsgáltam. Sikerült egy olyan vizsgálati rendszert létrehoznom, melyben csupán egyetlen változó, a pH modulálásával megváltoztatható a fehérjeszerkezet-alakulás iránya. E rendszer segítségével megállapítottam, hogy a vizsgált körülmények között a fehérjeszerkezet alakulásának útját a termék (amiloid vagy natív fehérje) energiatartalma szabja meg, vagyis a folyamatok termodinamikai kontroll alatt állnak.

8. Summary

Alzheimer's disease, Parkinson's disease and transmissible spongiform encephalopathies are well known incurable illnesses and are member of the so called amyloidosis disease group. Besides the lack of effective causal therapy, they share the property of featuring the deposition of a non-physiologic protein structure: amyloid. Amyloids are protein aggregates known for their exceptional resistance. Its structure is dominated by β sheets that are stabilized by hydrogen bonds between the atoms of the polypeptide backbone.

Their increasing clinical significance moved the study of amyloid aggregates to the forefront of life science research. A portion of these investigations are made up by biophysical experiments searching for the cause of the tendency of proteins to form amyloid, the kinetics of amyloid formation, the stability of amyloids, and the eventual possibility to disaggregate amyloids.

Throughout my investigations, I applied spectroscopic and biochemical methods to study the behavior of yeast phosphoglycerate kinase, a well known protein in this field. I have concluded that the structural domains that originally play role in the formation of the sequence dependent native structure also influence the development of the otherwise sequence-independent secondary bonds during amyloid aggregation. The effects are also demonstrated by the parameters of the function describing the kinetics.

I conducted successful attempts to disaggregate amyloids formed of phosphoglycerate kinase, and furthermore, to restore the enzymatically active protein, as well as to characterize the efficiency of the restoration: I was able to completely disaggregate the amyloids into monomers and then to bring back these monomers in the enzymatically active form.

Finally, I investigated the path of structural changes of the acid-denatured form of phosphoglycerate kinase toward the native and the amyloid state. I have successfully constructed a system where I could determine the direction of structural changes by the modulation of a single parameter: the acidity. Using this setup, I concluded that the route of protein structure changes is governed by the energy content of the product (be it amyloid or native protein), that is, the process is under thermodynamic control.

9. Irodalomjegyzék

- Anfinsen CB, Haber E, Sela M, White FH Jr. (1961) The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 47:1309-14.
- Baldwin RL. (2007) Energetics of protein folding. *Journal of Molecular Biology* 371 (2):283-301.
- Baldwin RL, Rose GD. (1999a) Is protein folding hierarchic? I. Local structure and peptide folding. *Trends in Biochemical Sciences* 24 (1):26-33.
- Baldwin RL, Rose GD. (1999b) Is protein folding hierarchic? II. Folding intermediates and transition states. *Trends in Biochemical Sciences* 24 (2):77-83.
- Ban T, Hamada D, Hasegawa K, Naiki H, Goto Y. (2003) Direct observation of amyloid fibril growth monitored by thioflavin T fluorescence. *J Biol Chem* 278 (19):16462-5.
- Banks RD, Blake CC, Evans PR, Haser R, Rice DW, Hardy GW, Merrett M, Phillips A. W. (1979) Sequence, structure and activity of phosphoglycerate kinase: a possible hinge-bending enzyme. *Nature* 279 (5716):773-7.
- Bartlett AI, Radford SE. (2009) An expanding arsenal of experimental methods yields an explosion of insights into protein folding mechanisms. *Nature Structural & Molecular Biology* 16 (6):582-588.
- Benditt EP, Eriksen N, Berglund C. (1970) Congo red dichroism with dispersed amyloid fibrils, an extrinsic cotton effect. *Proc Natl Acad Sci U S A* 66 (4):1044-51.
- Benditt EP, Eriksen N, Hermodson MA, Ericsson LH. (1971) The major proteins of human and monkey amyloid substance: Common properties including unusual N-terminal amino acid sequences. *FEBS Lett* 19 (2):169-173.
- Benhold H. (1922) Specific staining of amyloid by Congo red. *Muenchen Med Wochenschr* 69:1537-1538.
- Bennett MJ, Sawaya MR, Eisenberg D. (2006) Deposition diseases and 3D domain swapping. *Structure* 14 (5):811-824.
- Berne BJ, Pecora R. *Dynamic light scattering: with applications to chemistry, biology,*

- and physics. General Publishing Company, Toronto, 2000.
- Betton J-M, Missiakas D, Yon JM. (1992) The slow-refolding step of phosphoglycerate kinase as monitored by pulse proteolysis. *Arch Biochem Biophys* 296 (1):95–101.
- Blake CC, Rice DW. (1981) Phosphoglycerate kinase. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 293 (1063):93-104.
- Bonar L, Cohen AS, Skinner MM. (1969) Characterization of the amyloid fibril as a cross-beta protein. *Proc Soc Exp Biol Med* 131 (4):1373-5.
- Brandts JF, Hu CQ, Lin LN, Mos MT. (1989) A simple model for proteins with interacting domains. Applications to scanning calorimetry data. *Biochemistry* 28 (21):8588-96.
- Callis PR, Burgess BK. (1997) Tryptophan fluorescence shifts in proteins from hybrid simulations: An electrostatic approach. *Journal of Physical Chemistry B* 101 (46):9429-9432.
- Chen Y, Barkley MD. (1998) Toward understanding tryptophan fluorescence in proteins. *Biochemistry* 37 (28):9976-82.
- Chen YW, Ding F, Nie HF, Serohijos AW, Sharma S, Wilcox KC, Yin SY, Dokholyan NV. (2008) Protein folding: Then and now. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 469 (1):4-19.
- Cheung CW, Mas MT. (1996) Substrate-induced conformational changes in yeast 3-phosphoglycerate kinase monitored by fluorescence of single tryptophan probes. *Protein Sci* 5 (6):1144-9.
- Chiti F, Dobson CM. (2006) Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annual Review of Biochemistry* 75:333-366.
- Chiti F, Webster P, Taddei N, Clark A, Stefani M, Ramponi G, Dobson CM. (1999) Designing conditions for in vitro formation of amyloid protofilaments and fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (7):3590-3594.
- Cohen AS, Calkins E. (1959) Electron microscopic observations on a fibrous component in amyloid of diverse origins. *Nature* 183 (4669):1202-3.
- Damaschun G, Damaschun H, Fabian H, Gast K, Krober R, Wieske M, Zirwer D. (2000) Conversion of yeast phosphoglycerate kinase into amyloid-like structure.

- Proteins 39 (3):204-11.
- Damaschun G, Damaschun H, Gast K, Zirwer D. (1998) Denatured states of yeast phosphoglycerate kinase. *Biochemistry-Moscow* 63 (3):259-275.
- Damaschun G, Damaschun H, Gast K, Zirwer D. (1999) Proteins can adopt totally different folded conformations. *Journal of Molecular Biology* 291 (3):715-725.
- Dill KA, Chan HS. (1997) From Levinthal to pathways to funnels. *Nat Struct Biol* 4 (1):10-9.
- Dill KA, Shortle D. (1991) Denatured states of proteins. *Annual Review of Biochemistry* 60:795-825.
- Divry P. (1927) Etude histo-chimique des plaques seniles. *J Belge Neurol Psychiatr* 27:643-657.
- Dobson CM. (2003) Protein folding and misfolding. *Nature* 426 (6968):884-90.
- Eaton WA, Munoz V, Hagen SJ, Jas GS, Lapidus LJ, Henry ER, Hofrichter J. (2000) Fast kinetics and mechanisms in protein folding. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29:327-59.
- Edelhoch H. (1967) Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry*. 6 (7):1948-54.
- Echenique P. (2007) Introduction to protein folding for physicists. *Contemporary Physics* 48 (2):81-108.
- Ervin J, Larios E, Osvath S, Schulten K, Gruebele M. (2002) What causes hyperfluorescence: folding intermediates or conformationally flexible native states? *Biophys J* 83 (1):473-83.
- Fandrich M. (2007) On the structural definition of amyloid fibrils and other polypeptide aggregates. *Cell Mol Life Sci* 64 (16):2066-78.
- Fersht AR, Daggett V. (2002) Protein folding and unfolding at atomic resolution. *Cell* 108 (4):573-582.
- Fersht AR, Matouschek A, Serrano L. (1992) The Folding of an Enzyme .1. Theory of Protein Engineering Analysis of Stability and Pathway of Protein Folding. *Journal of Molecular Biology* 224 (3):771-782.
- Finkelstein, AV, Galzitskaya OV. (2004) Physics of protein folding. *Physics of Life Reviews* 1 (1):23-56.
- Freire E, Murphy KP, Sanchez-Ruiz JM, Galisteo ML, Privalov PL. (1992) The

- molecular basis of cooperativity in protein folding. Thermodynamic dissection of interdomain interactions in phosphoglycerate kinase. *Biochemistry* 31 (1):250-6.
- Fu GK, Smith MJ, Markovitz DM. (1997) Bacterial protease Lon is a site-specific DNA-binding protein. *J Biol Chem* 272 (1):534-8.
- Gast K, Damaschun G, Damaschun H, Misselwitz R, Zirwer D. (1993) Cold denaturation of yeast phosphoglycerate kinase: kinetics of changes in secondary structure and compactness on unfolding and refolding. *Biochemistry* 32 (30):7747-52.
- Gill SC, von Hippel PH. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* 182 (2):319-26.
- Glenner GG, Terry W, Harada M, Isersky C, Page D. (1971) Amyloid fibril proteins: proof of homology with immunoglobulin light chains by sequence analyses. *Science* 172 (988):1150-1.
- Glynn IM, Chappell JB. (1964) A simple method for the preparation of ³²P-labelled adenosine triphosphate of high specific activity. *Biochem J* 90 (1):147-149.
- Grantcharova V, Alm EJ, Baker D, Horwich AL. (2001) Mechanisms of protein folding. *Current Opinion in Structural Biology* 11 (1):70-82.
- Grodberg J, Dunn JJ. (1988) ompT encodes the Escherichia coli outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J Bacteriol* 170 (3):1245-53.
- Hartl FU, Hayer-Hartl M. (2009) Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nature Structural & Molecular Biology* 16 (6):574-581.
- Hobbs JR, Morgan AD. (1963) Fluorescence Microscopy with Thioflavine-T in the Diagnosis of Amyloid. *J Pathol Bacteriol* 86:437-42.
- Jahn TR, Radford SE. (2005) The Yin and Yang of protein folding. *Febs Journal* 272 (23):5962-5970.
- Kane JF. (1995) Effects of Rare Codon Clusters on High-Level Expression of Heterologous Proteins in Escherichia Coli. *Current Opinion in Biotechnology* 6 (5):494-500.
- Kelenyi G. (1967) On the histochemistry of azo group-free thiazole dyes. *J Histochem Cytochem* 15 (3):172-80.

- Khurana R, Coleman C, Ionescu-Zanetti C, Carter SA, Krishna V, Grover RK, Roy R, Singh S. (2005) Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils. *J Struct Biol* 151 (3):229-38.
- Khurana R, Uversky VN, Nielsen L, Fink AL. (2001) Is Congo red an amyloid-specific dye? *J Biol Chem* 276 (25):22715-21.
- Krebs MR, Bromley EH, Donald AM. (2005) The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localisation and implications. *J Struct Biol* 149 (1):30-7.
- Kumar S, Ma B, Tsai CJ, Wolfson H, Nussinov R. (1999) Folding funnels and conformational transitions via hinge-bending motions. *Cell Biochem Biophys* 31 (2):141-64.
- Lakowicz JR. Principles of fluorescence spectroscopy. Springer, New York, 2006.
- Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. Lehninger principles of biochemistry. 5th ed. W.H. Freeman, New York, 2008.
- Levinthal C. How to Fold Graciously. In: DeBrunner JTP és Munck E: Mossbauer Spectroscopy in Biological Systems: Proceedings of a meeting held at Allerton House, Monticello, Illinois. University of Illinois Press, Urbana, 1969.
- LeVine H 3rd. (1993) Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci* 2 (3):404-10.
- Lillo P, Mas MT, Beechem JM. (1998) Characterization of the 3-D structure and psec/nsec rotational dynamics of the rapidly collapsed folded state in yeast phosphoglycerate kinase. *Biophys J* 74 (2):A168.
- McPherson, A. (1991) A Brief-History of Protein Crystal-Growth. *Journal of Crystal Growth* 110 (1-2):1-10.
- Merrill DC, Ozcetinkaya S, Shinnar AE. (2004) Experimental and theoretical ultraviolet spectra of haloindoles. *Tetrahedron Letters* 45 (25):4899-902.
- Metzler R, Klafter J, Jortner J. (1999) Hierarchies and logarithmic oscillations in the temporal relaxation patterns of proteins and other complex systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (20):11085-9.
- Missiakas D, Betton JM, Minard P, Yon JM. (1990) Unfolding-refolding of the domains in yeast phosphoglycerate kinase: comparison with the isolated engineered domains. *Biochemistry* 29 (37):8683-9.

- Modler AJ, Gast K, Lutsch G, Damaschun G. (2003) Assembly of amyloid protofibrils via critical oligomers--a novel pathway of amyloid formation. *J Mol Biol* 325 (1):135-48.
- Mori N, Singer-Sam J, Riggs AD. (1986) Evolutionary conservation of the substrate-binding cleft of phosphoglycerate kinases. *FEBS Lett* 204 (2):313-7.
- Naiki H, Higuchi K, Hosokawa M, Takeda T. (1989) Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T1. *Anal Biochem* 177 (2):244-9.
- Osvath S, Herenyi L, Zavodszky P, Fidy J, Kohler G. (2006a) Hierarchic finite level energy landscape model - To describe the refolding kinetics of phosphoglycerate kinase. *Journal of Biological Chemistry* 281 (34):24375-24380.
- Osvath S, Jackel M, Agocs G, Zavodszky P, Kohler G, Fidy J. (2006b) Domain interactions direct misfolding and amyloid formation of yeast phosphoglycerate kinase. *Proteins* 62 (4):909-17.
- Osvath S, Kohler G, Zavodszky P, Fidy J. (2005) Asymmetric effect of domain interactions on the kinetics of folding in yeast phosphoglycerate kinase. *Protein Sci* 14 (6):1609-16.
- Pace CN, Vajdos F, Fee L, Grimsley G, Gray T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci* 4 (11):2411-23.
- Pauling L, Corey RB. (1951a) Atomic coordinates and structure factors for two helical configurations of polypeptide chains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 37 (5):235-40.
- Pauling L, Corey RB. (1951b) The pleated sheet, a new layer configuration of polypeptide chains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 37 (5):251-6.
- Pecorari F, Guilbert C, Minard P, Desmadril M, Yon JM. (1996) Folding and functional complementation of engineered fragments from yeast phosphoglycerate kinase. *Biochemistry* 35 (11):3465-76.
- Pepys MB. (2006) Amyloidosis. *Annu Rev Med* 57:223-41.
- Perczel A, Hudaky P, Palfi VK. (2007) Dead-end street of protein folding: thermodynamic rationale of amyloid fibril formation. *J Am Chem Soc* 129 (48):14959-65.
- Perkins RE, Conroy SC, Dunbar B, Fothergill LA, Tuite MF, Dobson MJ, Kingsman SM, Kingsman AJ. (1983) The complete amino acid sequence of yeast

- phosphoglycerate kinase. *Biochem J* 211 (1):199-218.
- Platt JR. (1949) Classification of Spectra of Cata-Condensed Hydrocarbons. *J Chem Phys* 17:484-95.
- Privalov PL, Dragan AI. (2007) Microcalorimetry of biological macromolecules. *Biophysical Chemistry* 126 (1-3):16-24.
- Ptitsyn OB. (1995) Molten globule and protein folding. *Advances in Protein Chemistry*, Vol 47 47:83-229.
- Ptitsyn OB, Pain RH, Semisotnov GV, Zerovnik E, Razgulyaev OI. (1990) Evidence for a molten globule state as a general intermediate in protein folding. *FEBS Lett* 262 (1):20-24.
- Saeed SM, Fine G. (1967) Thioflavin-T for amyloid detection. *Am J Clin Pathol* 47 (5):588-93.
- Sanders SA, Eisenthal R, Harrison R. (1997) NADH Oxidase Activity of Human Xanthine Oxidoreductase. Generation of Superoxide Anion. *Eur J Biochem* 245 (3):541-8.
- Sawaya MR, Sambashivan S, Nelson R, Ivanova MI, Sievers SA, Apostol MI, Thompson MJ, Balbirnie M, Wiltzius JJW, McFarlane HT, Madsen AO, Riek C, Eisenberg D. (2007) Atomic structures of amyloid cross-beta spines reveal varied steric zippers. *Nature* 447 (7143):453-457.
- Scharnagl C, Reif M, Friedrich J. (2005) Stability of proteins: Temperature, pressure and the role of the solvent. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* 1749 (2):187-213.
- Sipe JD, Cohen AS. (2000) Review: history of the amyloid fibril. *J Struct Biol* 130 (2-3):88-98.
- Smeller L. (2002) Pressure-temperature phase diagrams of biomolecules. *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1595 (1-2):11-29.
- Smoluchowski M. (1917) Versuch einer mathematischen Theorie der Koagulationskinetik kolloider Lösungen. *Z Phys Chem* 92:129-68.
- Steensma DP. (2001) "Congo" red: out of Africa? *Arch Pathol Lab Med* 125 (2):250-2.
- Stranks SD, Ecroyd H, Van Sluyter S, Waters EJ, Carver JA, von Smekal L. (2009) Model for amorphous aggregation processes. *Physical Review E* 80 (5):-.

- Sugimura K, Nishihara T. (1988) Purification, characterization, and primary structure of *Escherichia coli* protease VII with specificity for paired basic residues: identity of protease VII and OmpT. *J Bacteriol* 170 (12):5625-32.
- Szilagyi A, Zavodszky P. (2000) Structural differences between mesophilic, moderately thermophilic and extremely thermophilic protein subunits: results of a comprehensive survey. *Structure* 8 (5):493-504.
- Szpikowska BK, Beechem JM, Sherman MA, Mas MT. (1994) Equilibrium unfolding of yeast phosphoglycerate kinase and its mutants lacking one or both native tryptophans: a circular dichroism and steady-state and time-resolved fluorescence study. *Biochemistry* 33 (8):2217-25.
- Szpikowska BK, Mas MT. (1996) Urea-induced equilibrium unfolding of single tryptophan mutants of yeast phosphoglycerate kinase: evidence for a stable intermediate. *Arch Biochem Biophys* 335 (1):173-82.
- Vassar PS, Culling CF. (1959) Fluorescent stains, with special reference to amyloid and connective tissues. *Arch Pathol* 68:487-98.
- Vivian JT, Callis PR. (2001) Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins. *Biophys J* 80 (5):2093-109.
- Watson HC, Walker NP, Shaw PJ, Bryant TN, Wendell PL, Fothergill LA, Perkins RE, Conroy SC, Dobson MJ, Tuite MF, Kingsman AJ, Kingsman SM. (1982) Sequence and structure of yeast phosphoglycerate kinase. *EMBO J* 1 (12):1635-40.
- Westermarck P, Benson MD, Buxbaum JN, Cohen AS, Frangione B, Ikeda S, Masters CL, Merlini G, Saraiva MJ, Sipe JD. (2005) Amyloid: toward terminology clarification. Report from the Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis. *Amyloid* 12 (1):1-4.
- Westermarck P, Benson MD, Buxbaum JN, Cohen AS, Frangione B, Ikeda S, Masters CL, Merlini G, Saraiva MJ, Sipe JD. (2007) A primer of amyloid nomenclature. *Amyloid* 14 (3):179-83.
- Wolfe LS, Calabrese MF, Nath A, Blaho DV, Miranker AD, Xiong Y. (2010) Protein-induced photophysical changes to the amyloid indicator dye thioflavin T. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (39):16863-8.
- Yon JM, Desmadril M, Betton JM, Minard P, Ballery N, Missiakas D, Gaillard-Miran

S, Perahia D, Mouawad L. (1990) Flexibility and folding of phosphoglycerate kinase. *Biochimie* 72 (6-7):417-29.

Zhang X, Studier FW. (1997) Mechanism of inhibition of bacteriophage T7 RNA polymerase by T7 lysozyme. *Journal of Molecular Biology* 269 (1):10-27.

10. Saját publikációk jegyzéke

Cikkek:

Agócs G, Szabó BT, Köhler G, Osváth S. (2012) Comparing the folding and misfolding energy landscapes of phosphoglycerate kinase. *Biophys J* 102 (12):2828-34.

Agócs G, Solymosi K, Varga A, Módos K, Kellermayer M, Závodszky P, Fidy J, Osváth S. (2010) Recovery of functional enzyme from amyloid fibrils. *FEBS Lett.* 584 (6):1139-42.

Osváth S, Jäckel M, Agócs G, Závodszky P, Köhler G, Fidy J. (2006) Domain interactions direct misfolding and amyloid formation of yeast phosphoglycerate kinase. *Proteins* 62 (4):909-17.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek, Osváth Szabolcsnak, aki már TDK-munkámat is vezette és mindig számíthattam rá, bármilyen kérdéssel fordulhattam hozzá. Lelkesedése, szorgalma, szemléletformáló gondolkodása, alázata példaként áll előttem. Neki köszönhetem a természet megismerhetőségébe vetett hitem.

Köszönettel tartozom Kellermayer Miklós professzornak, a Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet igazgatójának és Fidy Judit professzor asszonynak, az intézet korábbi igazgatójának, hogy lehetővé tették számomra a tudományos munkát az intézetben.

Köszönet illeti Blaskó Katalin nyugalmazott docenst, aki hallgatóként megszerettette velem a biofizikát, és akinek támogatását mindvégig magaménak tudhattam.

Köszönet illeti Estók Katalin asszisztenst, tapasztalatával és példás megbízhatóságával sokat volt segítségemre.

Szerencsésnek tartom magam, amiért olyan emberekkel dolgozhattam együtt, mint akiket az intézetben megismertem: valamennyien jóindulattal voltak irántam, bármikor számíthattam segítségükre, gondolatébresztő tudományos diskurzusra. Bennük nem csak munkatársakra, hanem barátokra is találtam, ami miatt mindig jó érzéssel fogok gondolni a doktori tanulmányokkal töltött évekre.

Köszönettel tartozom Szőke Éva professzor asszonynak, a Gyógyszertudományok Doktori Iskola vezetőjének, hogy az iskola hallgatója lehettem.

Végül legnagyobb hálámat szüleimnek és testvéremnek szeretném kifejezni, akik mind erkölcsileg, mind anyagilag támogatták tanulmányaimat és biztosították azt a nyugodt háttérrel, amivel sikereimet elértem.