

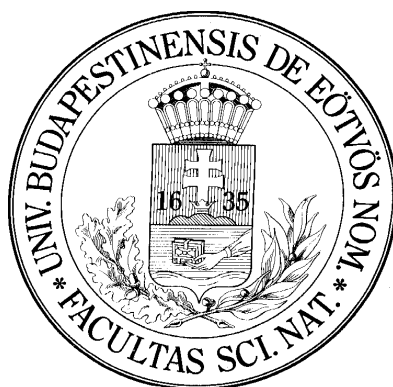
SZAKDOLGOZAT

# Fehérjeaggregátumok előállítása és vizsgálata

LAKATOS DÓRA

*Fizika BSc., biofizikus szakirány*

*III. évfolyam*



Témavezető:

DR. SMELLER LÁSZLÓ

*Semmelweis Egyetem, Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet*

Belső konzulens:

DR. DERÉNYI IMRE

*ELTE, Természettudományi Kar, Biológiai Fizika Tanszék*

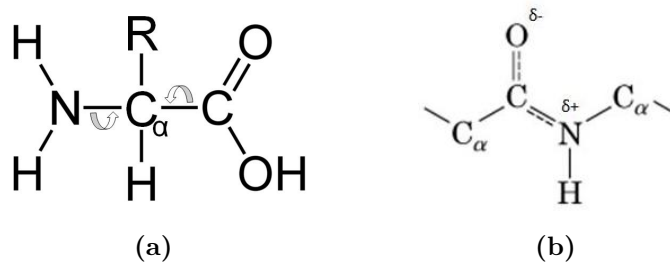
# Tartalomjegyzék

<b>1. Bevezetés</b>	<b>3</b>
1.1. A fehérjék szerkezete . . . . .	3
1.2. A fehérjék és a nyomás . . . . .	6
1.3. Infravörös spektroszkópia . . . . .	9
<b>2. Anyagok és módszerek</b>	<b>12</b>
2.1. A vizsgált fehérje . . . . .	12
2.2. Nagy nyomás előállítása és mérése . . . . .	12
2.3. Infravörös mérés . . . . .	13
2.4. Kiértékelés . . . . .	15
<b>3. Célkitűzések</b>	<b>16</b>
<b>4. Eredmények és diszkusszió</b>	<b>17</b>
4.1. Mérési eredmények . . . . .	17
4.2. Illesztések . . . . .	21
4.3. Modell . . . . .	23
<b>5. Összefoglalás</b>	<b>25</b>

# 1. Bevezetés

## 1.1. A fehérjék szerkezete

A biológiai rendszerekben fellelhető makromolekulák egyik nagy és fontos csoportját a fehérjék alkotják. A fehérjék lineáris polimerláncának kialakításában 20 fajta  $\alpha$ -aminosav játszik szerepet. Ezek a monomerek szomszédos amino és karboxil csoportjaik között létrejövő peptidkötésekkel kapcsolódnak egymáshoz, így kialakítva a molekula vázát. A peptidkötés két kettőskötéses határszerkezet rezonancia-szerkezeteként írható le, ahol a karboxilos szén atom és a nitrogén atom között delokalizált kettőskötés alakul ki, ezért a kötés körül rotáció nem lehetséges. A kötés planáris és dipólusmomentuma van. A fehérje gerincét alkotó, de a peptidkötésben részt nem vevő atomok között ( $C_\alpha-C$ ,  $N-C_\alpha$ ) egyszeres kovalens kötések vannak, ami körül szabad rotáció jöhet létre, ezért aminosavanként két forgási lehetőség adódik.

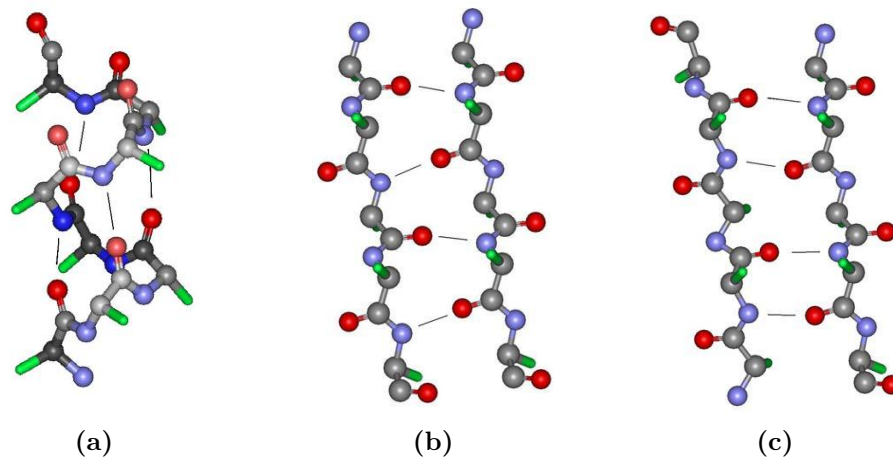


1. ábra. Aminosav, peptidkötés. a) Általános  $\alpha$ -aminosav, ahol R tetszőleges oldalláncot jelent; b) a peptidkötés szerkezete.

A fehérjék térszerkezetében négy fő szintet különböztetünk meg. A polipeptidlánc aminosav sorrendje által meghatározott szerkezetet elsődleges szerkezetnek nevezzük.

Másodlagos szerkezeti szinten a fehérjelánc hidrogénkötések által stabilizált, lokális (tipikusan 10-20 aminosavra kiterjedő) rendezettségét értjük. A peptidlánc konformációját a peptidsíkok egymáshoz képest történő elfordulásával, azaz a  $\phi$  ( $CN-C_\alpha C$ ) és  $\psi$  ( $NC_\alpha-CN$ ) torziós szögekkel jellemezhetjük. A másodlagos szerkezeti elemeknek két fő típusa van, a helikális és a lemezes struktúra.

A helikális szerkezetek közül a jobb menetes  $\alpha$ -hélix a leggyakoribb, melyben teljes fordulatonként 3,6 aminosav csoport található és menetemelkedése 5,4 Å. A hidrogén-



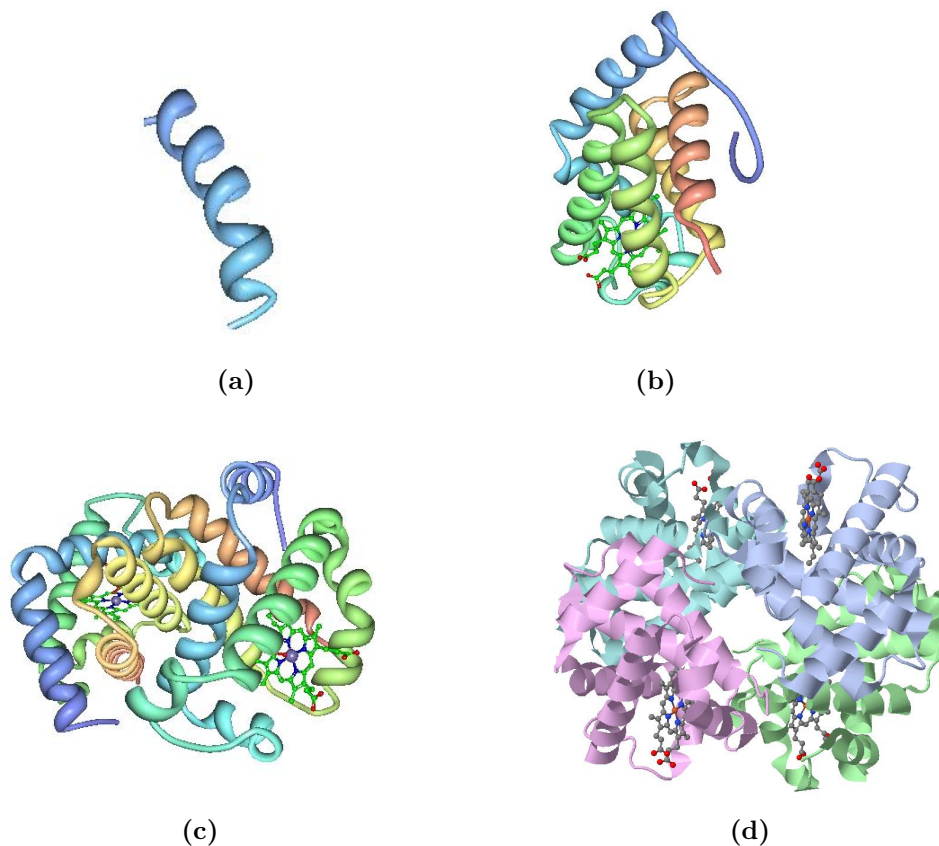
2. ábra. Másodlagos szerkezeti elemek. a) Az  $\alpha$ -hélix, b) a  $\beta$ -parallel és c) a  $\beta$ -antiparallel lemez. A vonalak a polipeptidláncok közötti hidrogénkötéseket, a golyók az atomokat (a szürke a szén, a kék a nitrogén, a piros az oxigén), a zöld rudak pedig az oldalláncok kapcsolódási pontját jelölik.

kötések az  $n$ -edik aminosav oxigénje és az  $n + 4$ -edik aminosav nitrogén atomjához kapcsolódó hidrogén között jönnek létre. Az aminosavak oldalláncai kifelé állnak, a hélix belsejében a térkitöltés maximális.

Lemezes szerkezet esetén az egyes nyújtott polipeptid láncok ( $\beta$ -láncok) egymással párhuzamosan helyezkednek el. Ezen láncok irányultsága szerint megkülönböztethetünk parallel, antiparallel és vegyes lemezes szerkezeteket. Parallel lemez esetén a láncok azonos irányba futnak, az egymást követő  $C_\alpha$  atomok távolsága  $3,2 \text{ \AA}$ , a H-hidak egyenletesen helyezkednek el. Antiparallel lemeznél a láncok ellentétes irányultságúak, az egymást követő  $C_\alpha$  atomok távolsága  $3,4 \text{ \AA}$ , a H-hidak elhelyezkedése rendezetlenebb. A  $\beta$ -lemezben általában balkezes csavar van, mert a láncok maguk is csavarodnak.

Harmadlagos szerkezetnek a polipeptidlánc térbeli konformációját, és ezen belül a másodlagos szerkezeti elemek térbeli elhelyezkedését hívjuk. Ezt a szerkezetet a van der Waals kölcsönhatások, a hidrogénhid kötések, a negatívan és pozitívan töltött aminosavak közötti ionos kötések és a cisztein aminosavak között kialakuló diszulfidhidak stabilizálják.

Negyedleges szerkezeti szintről a több polipeptidláncból felépülő, azaz többalegyszerűs, oligomer fehérjék esetén beszélhetünk. Az oligomerek legkisebb ismétlődő szer-



3. ábra. Másodlagos, harmadlagos, negyedleges fehérjeszerkezet a hemoglobin példáján. a) A hemoglobin láncleje, helikális típusú, másodlagos szerkezeti eleme szalag ábrázolásban; b) a molekula  $\alpha$  alegységének teljes, harmadlagos térszerkezete; c) a hemoglobin protomerjének, mely 1-1  $\alpha$  és  $\beta$  alegységből áll, konformációja; és d) a két protomerből felépülő hemoglobin negyedleges szerkezete. (Az ábra a Protein Data Bank 3AOG fájlából az RCSB-Protein Workshop program használatával készült.)

kezeti egységei a protomerek, ezek térbeli elhelyezkedése különböző szimmetriákkal adható meg.

Az egyszerű fehérjék csak aminosavakból épülnek fel. Az összetett fehérjék azonban tartalmazhatnak egyéb szerves vagy szervetlen alkotórészeket is, ezeket nevezzük prosztetikus csoportnak. A leggyakrabban előforduló prosztetikus csoportok a lipid, szénhidrát, foszfátcsoporthoz, nukleinsav, vas-porfirin és különböző fém ionok ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ).

Egy átlagos fehérje néhány száz aminosavból épül fel, így a polipeptidláncnak elméletileg rendkívül sok konformációja lehetséges [12], ezek közül azonban csak néhány állapot stabil. Ezeket az állapotokat három csoportra bonthatjuk: natív, köztes (intermedier), kitekeredett (denaturált).

Natív szerkezetben a molekula biológiailag aktív. Ez általában a legalacsonyabb szabadentalpiájú konformáció, melyben a másodlagos kötések száma közel maximális. Natív szerkezetben az apoláros oldalláncok nagy része a molekula belsejében található, míg a poláros oldalláncok inkább a felszíni részeken helyezkednek el, ahol a vízzel és egymással létesítenek H-hídakat.

A köztes állapotoknak is több fajtája van. Általános jellemzőjük, hogy van másodlagos szerkezet, de nem mindig hasonlít a natívhoz, a harmadlagos szerkezet pedig nagyrészt rendezetlen és fluktuál.

Kitekeredett állapotban minden konformáció közel azonos szabadentalpiájú. A fehérje poláros részei a vízmolekulákkal létesítenek H-hidas kölcsönhatást, az apoláros részek körül pedig klatrátburok képződik a vízből. Nagy koncentrációjú fehérje oldatok esetén a polipeptidláncok között intermolekuláris kölcsönhatások is felléphetnek.

## 1.2. A fehérjék és a nyomás

A nyomás hatását legegyszerűbben a kétállapotú, állandó összetételű rendszereken tanulmányozhatjuk. A Le Chatelier-Braun elv alapján a nyomás növelése a rendszert egyensúlyi helyzetéből a térfogatcsökkenés irányába tolja el. Egyensúlyra vezető reakció esetén  $\Delta G = -RT \ln K$  ahol  $K$  az egyensúlyi állandó,  $\Delta G$  pedig a szabadentalpia változás. A rendszer moláris térfogatváltozása felírható

$$\Delta V = \left( \frac{\partial \Delta G}{\partial p} \right)_T = -RT \left( \frac{\partial \ln K}{\partial p} \right)_T \quad (1)$$

alakban. Negatív  $\Delta V$  esetén a termék kisebb térfogatú, mint a kiindulási anyag, ekkor

$$\left( \frac{\partial \ln K}{\partial p} \right)_T \geq 0,$$

a nyomás növelésével tehát  $K$  nő, vagyis az egyensúly a kevesebb reagens irányába tolódik el.

Nagy nyomás hatására a fehérjék natív szerkezete felbomlik, denaturálódnak. Kísérleti eredmények igazolják, hogy számos fehérje esetén a denaturáció néhány száz MPa nyomáson bekövetkezik [7]. A fehérjék magas és alacsony hőmérsékleten is denaturálódnak, utóbbit hideg-denaturációnak nevezzük [14]. A három fajta denaturáció egységesen írható le a Hawley-féle elliptikus fázisdiagrammal [6], mely kétállapotú rendszert feltételez (natív (N) és denaturált (D) állapotot) és a denaturáció folyamatát reverzibilisnek tekinti. A kitekeredést kísérő szabadentalpia változást ekkor:

$$\Delta G = G_D - G_N \quad (2)$$

alakban írhatjuk fel. A differenciális alakot

$$d(\Delta G) = -\Delta S dT + \Delta V dp \quad (3)$$

tetszőleges  $T_0$ ,  $p_0$  pontból kiindulva kiintegrálva az alábbi egyenletet kapjuk:

$$\begin{aligned} \Delta G = \Delta G_0 - \Delta S_0(T - T_0) - \Delta C_p \left[ T \left( \ln \frac{T}{T_0} - 1 \right) + T_0 \right] + \\ + \Delta V_0(p - p_0) + \frac{\Delta \beta}{2}(p - p_0)^2 + \Delta \alpha(p - p_0)(T - T_0), \end{aligned} \quad (4)$$

$$C_p = T \left( \frac{\partial S}{\partial T} \right)_p \quad \text{és} \quad \beta = \left( \frac{\partial V}{\partial p} \right)_T, \quad (5)$$

$$\alpha = \left( \frac{\partial V}{\partial T} \right)_p = - \left( \frac{\partial S}{\partial p} \right)_T, \quad (6)$$

ahol  $C_p$  az állandó nyomáson mért fajhő,  $\beta$  a kompresszibilitási faktor,  $\alpha$  pedig a hőtágulási együttható.  $T_0$ -hoz közeli  $T$  értékek esetén az alábbi közelítést alkalmazhatjuk:

$$T \left( \ln \frac{T}{T_0} - 1 \right) \cong \frac{(T - T_0)^2}{2T_0}, \quad (7)$$

ami azonos eredményre vezet a szabadentalpia változás  $p$  és  $T$  szerinti másodfokú

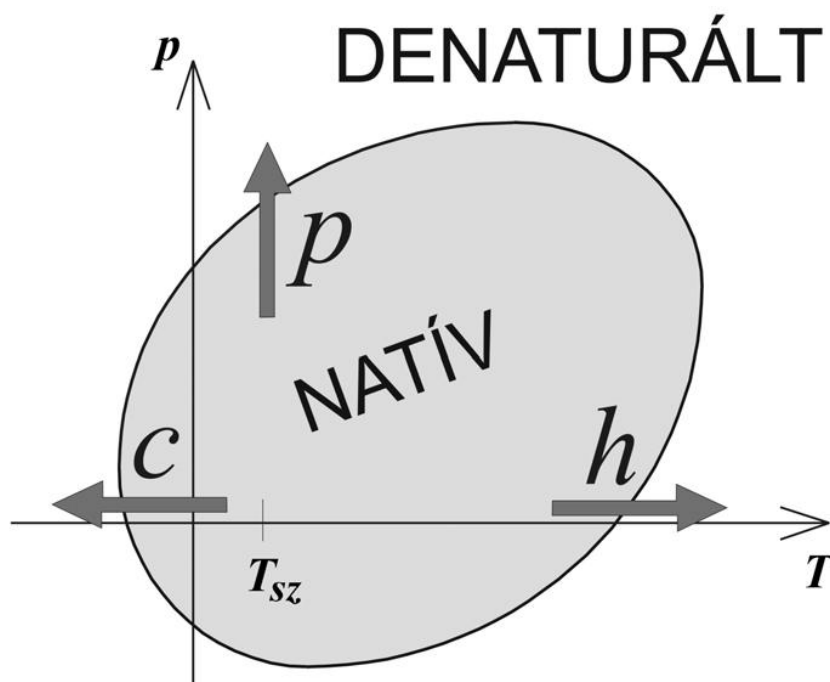
közelítésével:

$$\Delta G = \Delta G_0 - \Delta S_0(T - T_0) - \frac{\Delta C_p}{2T_0}(T - T_0)^2 + \Delta V_0(p - p_0) + \frac{\Delta \beta}{2}(p - p_0)^2 + \Delta \alpha(p - p_0)(T - T_0). \quad (8)$$

A denaturáció átalakulási pontjában  $\Delta G = 0$ . Amennyiben

$$\Delta \alpha^2 > \frac{\Delta C_p \Delta \beta}{T_0} \quad (9)$$

egyenlőtlenség fenn áll, akkor a  $\Delta G = 0$  pontok egy elliptikus görbét adnak a  $p$ - $T$  síkon (4. ábra), ahol a görbén belüli terület a natív állapotot jelenti. Hawley 2-es pH értékű oldatban lévő fehérjékre (krimotripszinogén és ribonukleáz) kimérte ezt a görbét. Az alacsony pH értékre azért volt szükség, mert nem tudott a denaturációhoz elegendően nagy nyomást előállítani, így ezzel destabilizálta a fehérjéket.



4. ábra. Hawley-féle elliptikus fázisdiagramm. Az ábrán  $c$  a hideg-,  $p$  a nyomás-,  $T$  a hődenaturációt,  $T_{sz}$  a szobahőmérsékletet jelöli.



A Hawley-féle modell azonban túlságosan leegyszerűsített, hiszen a denaturáció koránt sem mindig reverzibilis, valamint a folyamat nem kétállapotú, mert a fehérje kitekeredése közben kialakulnak intermedier állapotok is. A modell ezenkívül nem különbözteti meg az egyes denaturációs termékeket, így az aggregációt sem és figyelmen kívül hagyja a fehérjék közti kölcsönhatást [16].

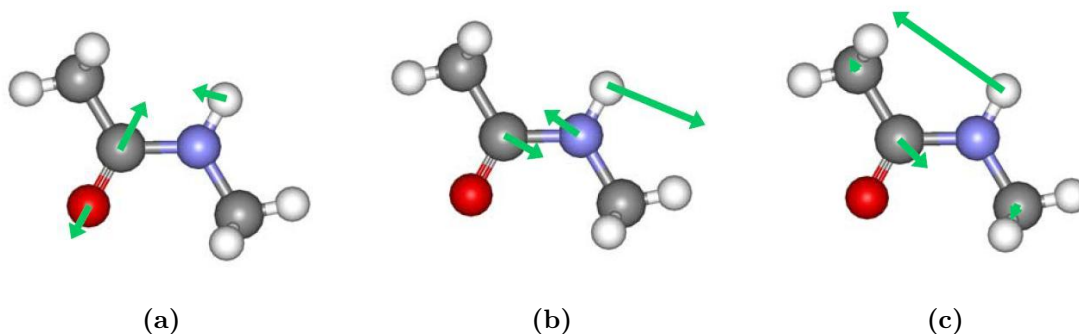
### 1.3. Infravörös spektroszkópia

Az elektromágneses sugárzás  $0,8 \mu\text{m} - 1 \text{ mm}$  közötti hullámhosszúságú tartományát infravörös sugárzásnak nevezzük, mellyel a molekulák rezgési és rotációs állapotai gerjeszthetők. Az infravörös tartományt, a látható fény spektrumához viszonyított helyzete alapján, spektroszkópiai szempontból három részre osztjuk:

- közeli infravörös (NIR):  $0,8 - 2,5 \mu\text{m}$ ,
- közép-infravörös (MIR):  $2,5 - 25 \mu\text{m}$ ,
- távoli infravörös (FIR):  $25 - 1000 \mu\text{m}$ .

A távoli infravörös tartomány deformációs spektroszkópiára használható, a molekulák konformációjára jellemző rezgések a közép-infravörös tartományban detektálhatóak, a közeli infravörös tartományban pedig a felharmonikusok jelennek meg. Az infravörös spektroszkópiában a hullámhossz reciproka, a hullámszám használatos. A fehérjék térszerkezetének vizsgálatához szükséges közép-infravörös tartomány a  $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$  hullámszám tartományban helyezkedik el.

A legegyszerűbb rezgő mozgásra is képes rendszer a kétatomos molekula. Ennek teljes leírása a klasszikus fizikában és a kvantummechanikában is egyaránt ismert. Többatomos molekulák rezgései néhány paraméter (kötési állandók, egyensúlyi koordináták) ismeretében kiszámolhatóak. Makromolekulák esetén a rendkívül nagy atomszám és a térszerkezet ismeretének hiánya miatt a rezgések számolása gyakorlatilag kivitelezhetetlen. A molekulában ellenben kialakulnak csoportrezgések, melyekben csak néhány atom vesz részt. Ezeknek a vibrációknak a frekvenciája kis mértékben függ a rezgő csoport környezetétől. Az így létrejövő frekvencia eltolódás mértékéből a makromolekula térszerkezetére következtethetünk. Fehérjék konformáció változásáról például az amid csoport rezgéseiből nyerhetünk információt.



5. ábra. N-metilacetamid molekula szerkezete és legfontosabb normálrezgései. a) Az amid-I, b) amid-II és c) amid-III normál módusok [1]. A golyók az atomokat (a szürke a szén, a piros a oxigén, a kék az nitrogén és a fehér a hidrogén), a nyilak az atomok elmozdulási irányát és azok relatív amplitúdóját jelölik.

A fehérjék polipeptidláncának rezgései első közelítésben az N-metilacetamid molekula normálrezgéseivel írhatók le, mert a molekula sajátrezgései a terminális C atomokat lényegében nem érintik [13]. Pontosabb számolások igazolják, hogy az N-metilacetamid erőállandói átvihetők polipeptidekre [11]. Ezáltal a fehérje csatolt rezgő rendszerként írható le, ahol minden aminosavhoz egy normálrezgés rendelhető. A peptid kötések egymással elektromágneses kölcsönhatásban vannak, ami átmeneti dipól csatolást eredményez [17]. Ez függ a dipólok orientációjától, tehát a fehérje másodlagos szerkezetétől is. Az N-metilacetamid normálrezgései közül két okból kifolyólag az amid-I rezgés a legérzékenyebb a konformáció-változásra. Egyrészt az amid-I rezgés energiájának nagy része a C=O kötés nyújtási módusából ered [1], melynek erőállandója, a kötés részleges delokalizáltsága miatt kisebb, mint más C=O kötésé. Másrészt a C=O csoport O atomja akceptorként játszik szerepet egy másik aminosav N–H csoportjával kialakított hidrogénkötésben, így a másodlagos szerkezetet megváltozása kihatással van az amid-I rezgésekre (1. táblázat).

A fehérjék másodlagos szerkezeti összetételének az amid-I rezgésekből való meghatározását azonban gátolja a víz deformációs rezgése, ami  $1645\text{ cm}^{-1}$ -nél található [3], így egybeesik az amid-I normálrezgéssel. Ennek a problémának a megoldására a méréseket nehézvízben végzik, aminek a deformációs rezgése  $1215\text{ cm}^{-1}$ -nél van az izotóp-eltolódás miatt. A nehézvízes fehérje oldatokban a polipeptidlánc gerincét alkotó N atomokhoz

hullámszám [cm <sup>-1</sup> ]	másodlagos szerkezet
1616	intermolekuláris $\beta$ -szerkezet [8]
1624 – 1637	kinyújtott láncok ( $\beta$ -szerkezet) [2]
1645	rendezetlen [2]
1654	$\alpha$ -hélix [2]
1662	$3_{10}$ -hélix [5]
1663 – 1670	hajlatok, hurkok [2]
1675	kinyújtott láncok ( $\beta$ -szerkezet) [2]
1683 – 1694	hajlatok, hurkok [2]
1685	intermolekuláris $\beta$ -szerkezet [8]

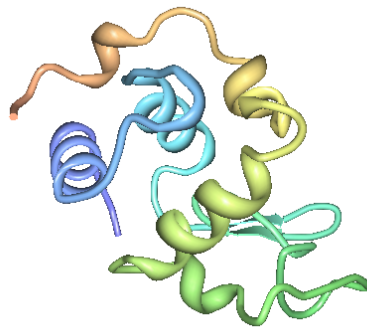
1. táblázat. Az amid-I sáv komponenseinek hozzárendelése a különböző másodlagos szerkezeti elemekhez.

kapcsolódó H kicserélődhet  $^2_1\text{D}$  atomra, emiatt az amid sávok eltolódhatnak. Ez a jelenség csak az amid-II sávnál jelentős (100 cm<sup>-1</sup>-es eltérés), ezért ezt használják a hidrogén-deutérium (H/D) kicserélődésének tanulmányozására.

## 2. Anyagok és módszerek

### 2.1. A vizsgált fehérje

A mérések során a lizozim enzimet vizsgáltuk, ami a baktériumok sejtfalát hidrolízissel bontja. Nagy mennyiségben megtalálható a szervezet különböző váladékaiban, a fehérvérsejtek, köztük a granulociták citoplazmájában és a tojásfehérjében, fontos szerepet tölt be az immunrendszer működésében. A méréshez 75 mg/ml-es tojásfehérje lizozim oldatot használtunk, ennek előállításához a ICN Biomedicals INC (USA) cégtől beszerzett fehérjéből 15,64 mg-ot oldottunk 208  $\mu$ l a Sigma cégtől vásárolt BES puffert (N,N-Bisz(2-hidroxiethyl)-2-aminoetánszulfonsav,  $C_6H_{15}NO_5S$ ) tartalmazó nehézvizes oldatban (pD=7,0). Az oldat pD értékét a pH mérőről leolvasott értékhez 0,4-et hozzáadva határoztuk meg [4].



6. ábra. Lizozim molekula röntgenkristallográfiával meghatározott térszerkezete a Protein Data Bank adatbázis alapján. Az ábra a 3A8Z pdb fájlból, a RCSB-Protein Workshop program használatával készült.

### 2.2. Nagy nyomás előállítása és mérése

A nagy nyomás előállításához gyémánt cellát [9] (Diamond Anvil Cell, Diacell Products) használtunk. A cellában két gyémánt között egy rozsdamentes acél lemez van, melynek közepén egy 0,5 mm átmérőjű, fúrt lyuk található, ebben helyezkedik el a minta (7. ábra). Az elrendezésnek köszönhetően, így egyszerre végezhetünk optikai

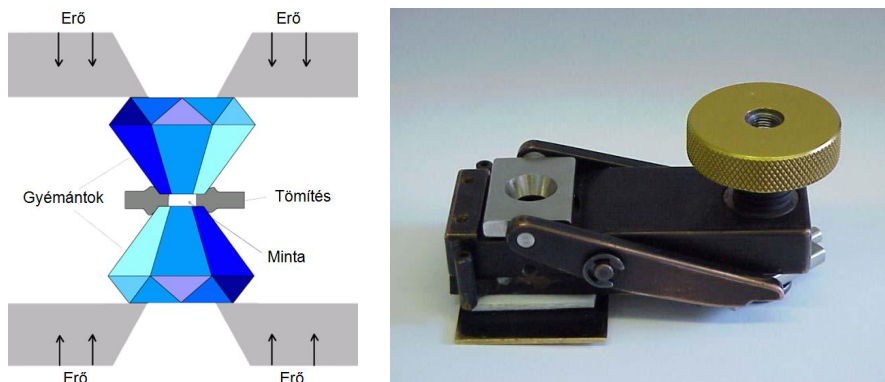
méréseket és fejthetünk ki nagy nyomást a vizsgált anyagra. A módszer lényege, hogy az eszköz kis térfogatban ( $\sim 50$  nl) állítja elő a nyomást, melynek nagysága a két gyémántra kifejtett nyomóerővel növelhető. A nyomás méréséhez a mintatérben elhelyezett belső kalibráns használata szükséges. Spektroszkópiai szempontból ez olyan anyagot jelent, melynek vonaleltolódása ismert a nyomás függvényében. Infravörös méréseknél a bárium-szulfát ( $\text{BaSO}_4$ )  $983\text{ cm}^{-1}$ -es vonala alkalmas erre a célra [18], melyből a nyomás az alábbi képlettel számolható:

$$p = 0,031\Delta\nu^2 + 2,097\Delta\nu , \quad (10)$$

ahol  $\Delta\nu$  a hőmérséklettel korrigált ( $\Delta\nu_k$ ) és a referencia hullámszám ( $\Delta\nu_0$ ) különbsége. A hőmérséklet korrekció pedig így írható fel:

$$\Delta\nu_k = \Delta\nu_m - 0,0175\Delta T, \quad (11)$$

ahol  $\Delta\nu_m$  a bárium-szulfát mért hullámszáma.

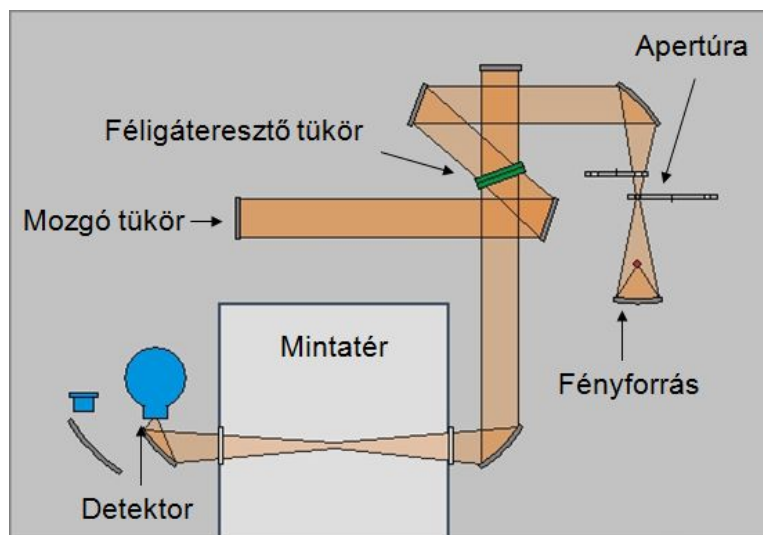


7. ábra. A gyémánt cella felépítése.

### 2.3. Infravörös mérés

Az infravörös méréseket Bruker Vertex80v FTIR spektrométerrel végeztük, mely  $0,25 \times 0,25$  mm-es folyékony nitrogén hűtésű MCT detektorral rendelkezik. A spektrumok  $2\text{ cm}^{-1}$ -es felbontásúak, és zero-padding technikával lettek  $1\text{ cm}^{-1}$ -es lépéskö-

zúre kiegészítve. A spektrumokat az Opus 6.5 programcsomag segítségével vizsgáltuk, a jel/zaj arányt 256 spektrum átlagolásával javítottuk. A műszer alapja egy Michelson-interferométer, ami egy féligáteresztő tükör segítségével a beeső fényt két sugárra bontja. Az egyik egy rögzített, a másik egy mozgó tükörről verődik vissza, majd recombálódnak és az útkülönbség függvényében interferálnak (8. ábra). A fényintenzitást



8. ábra. Az FTIR készülék felépítésének sematikus rajza.

felírva az útkülönbség ( $x$ ) és a hullámszám ( $\nu$ ) függvényében:

$$I(x, \nu) = I(\nu)[1 + \cos(2\pi\nu x)], \quad (12)$$

ahol  $I(\nu)$  a spektrum, amit mérni szeretnénk. A detektorba jutó teljes intenzitás:

$$I(x) = \int_0^\infty I(x, \nu) d\nu = \int_0^\infty I(\nu)[1 + \cos(2\pi\nu x)] d\nu. \quad (13)$$

Ebből Fourier-transzformációval,  $I(\nu)$ -re az alábbi kifejezést kapjuk:

$$I(\nu) = 2 \int_0^\infty [2I(x) - I(x=0)] \cos(2\pi\nu x) dx. \quad (14)$$

A spektrumokon ábrázolt abszorbanca:

$$A = \ln \frac{I_0(\nu)}{I(\nu)}, \quad (15)$$

ahol  $I_0(\nu)$  a minta nélkül,  $I(\nu)$  pedig a gyémánt cellával és mintával együtt mért intenzitás.

## 2.4. Kiértékelés

A mérések kiértékelésénél az adatsorokat egy konstans alapvonal meghatározása után, Gauss-függvények összegével illesztettük meg. Az alapvonalat manuálisan határoztuk meg, úgy, hogy az illesztés a lehető leggyorsabban konvergáljon. A Gauss-görbék illesztésére Octave-ban írtunk programot, mert a Gnuplot által használt Levenberg-Marquardt algoritmus ilyen sok görbe illesztése esetén már nem konvergál. A programban a Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno (BFGS) módszert alkalmaztuk, ami felhasználja a függvény első és második deriváltjait is. A minimalizálandó függvény

$$\chi^2 = \sum_j (f(x_j) - y_j)^2, \quad (16)$$

ahol  $j$  a mérési pontokra összegez, azaz  $y_j$  az egyes  $x_j$  hullámhosszokon mért abszorbanciát,  $f(x_j)$  pedig az egyes  $x_j$  pontokhoz tartozó illesztett függvényértéket jelenti. Az illesztett Gauss-függvény az alábbi alakban írható fel:

$$f(x_j) = \sum_i \frac{e^{a_i}}{\sqrt{2\pi}\delta_i} e^{-\frac{(x_j - \mu_i)^2}{2\delta_i^2}}, \quad (17)$$

ahol  $\mu_i$  a várható érték,  $\delta_i$  a szórás és  $e^{a_i}$  a görbe alatti terület.  $i$  az egyes illesztendő csúcsokon fut végig. A görbe alatti területet csupán technikai okokból fejeztük ki exponenciális alakban, hogy ezzel kiküszöböljük a negatív értékeket.

### 3. Célkitűzések

A fehérjék nagy nyomás hatására denaturálódnak [19], atmoszférikus nyomásra visszatérve újragombolyodnak. A feltekeredés közben intermedier állapotok alakulnak ki, melyek fokozottan hajlamosak az aggregációra. Ezeknek az aggregátumoknak a többsége, újból nagy nyomás alá helyezve, már a denaturációs nyomásnál kisebb nyomás értéknél disszociál [15].

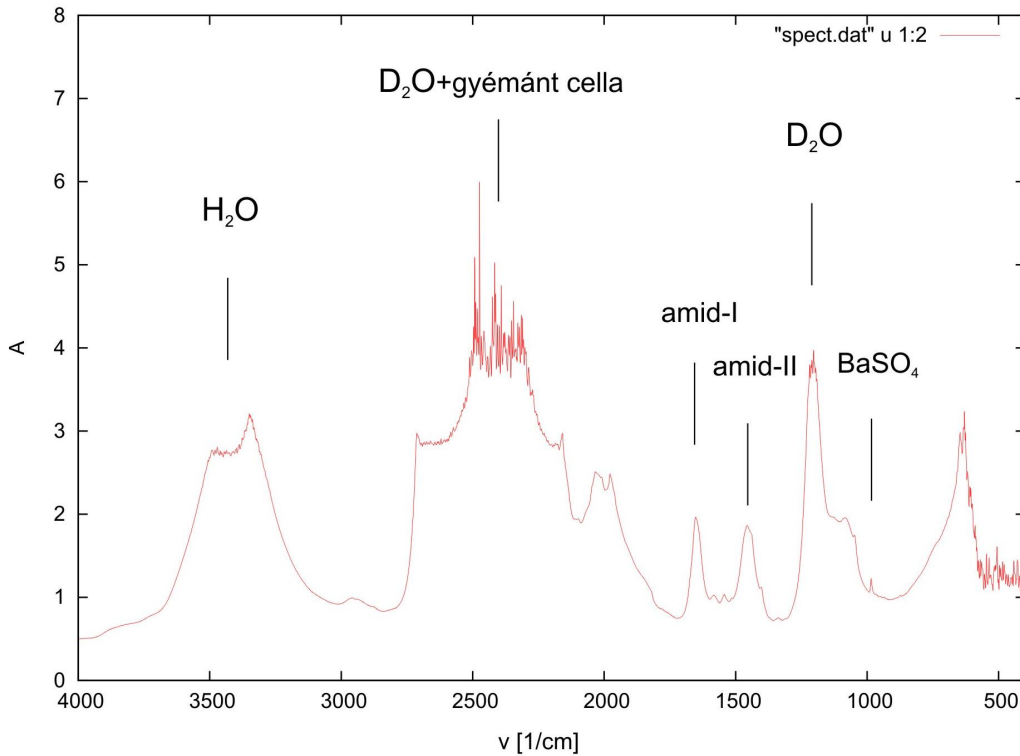
A fehérjék aggregációja egy több lépcsős folyamat, mely során különböző stabilitású aggregátumok alakulnak ki, de spektroszkópiai szempontból csak egy fajtát látunk. Az infravörös spektroszkópiai mérések során a célunk az volt, hogy ezeket a különböző stabilitású aggregátumokat a nyomás segítségével elválasszuk, ehhez a nyomás-denaturáció után a mintákat néhány óráig hagytuk aggregálódni. Ezt az aggregációs időt mindig másnak választottuk, hogy ezáltal megfigyelhessük a különböző stabilitású komponensek időbeli fejlődését, majd egy ismételt nyomásciklus során nyomásérzékenységüket.



## 4. Eredmények és diszkusszió

### 4.1. Mérési eredmények

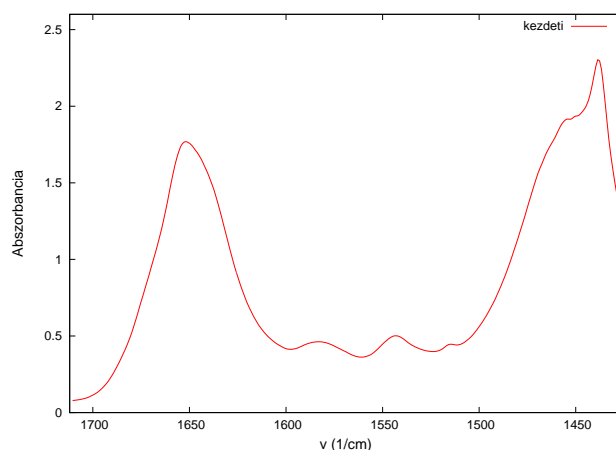
A mérések során a lizozim enzimet nehéz vizes oldatában vizsgáltuk infravörös spektroszkóppal. A nyomás méréséhez  $\text{BaSO}_4$ -ot tettünk a gyémánt cellába. A méréseket levákuozott mintatérben, folyamatosan regisztrált,  $40\text{ }^\circ\text{C}$  körüli hőmérsékleten végeztük. A minta abszorpcióját  $400 - 4000\text{ cm}^{-1}$  hullámszám értékeknél, a közép-infravörös tartományban mértük (9. ábra).



9. ábra. A minta teljes infravörös spektruma és a fontosabb abszorpciós csúcsok.

A fehérjék konformációs változásaira az amid-I sáv eltolódásából, amplitúdójának megváltozásából, valamint új sávok megjelenéséből lehet következtetni. Ezért a mért infravörös spektrumból az  $1450 - 1700\text{ cm}^{-1}$  hullámszám tartomány, valamint nyomás

mérés szempontjából a  $983\text{ cm}^{-1}$ -es  $\text{BaSO}_4$  csúcs érdekes. A lizozim röntgenkristallográfiával meghatározott konformációja alapján, natív állapotban a polipeptidlánc 41% -a helikális, 10% -a lemezes, a maradék pedig rendezetlen szerkezetű [10]. A  $100 - 200\text{ MPa}$  nyomáson mért infravörös spektrum esetén az amid-I sáv abszorpciós maximuma  $1650\text{ cm}^{-1}$ -nél helyezkedik el (10. ábra). Ez túlnyomórészt helikális és rendezetlen szerkezetet jelent, ami megfelel a kristallográfiai adatoknak.

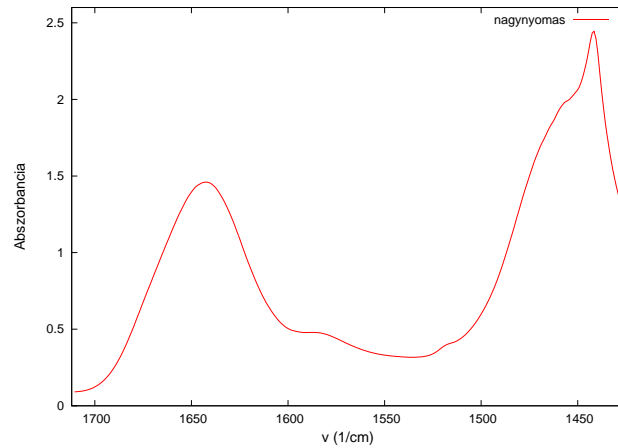


10. ábra. A natív állapotú lizozim infravörös spektruma. A mérést  $253\text{ MPa}$ -on,  $38,2\text{ °C}$ -on végeztük. Az amid-I sáv maximuma  $1650,6\text{ cm}^{-1}$ -nél helyezkedik el, félértékszélessége  $41,4\text{ cm}^{-1}$ .

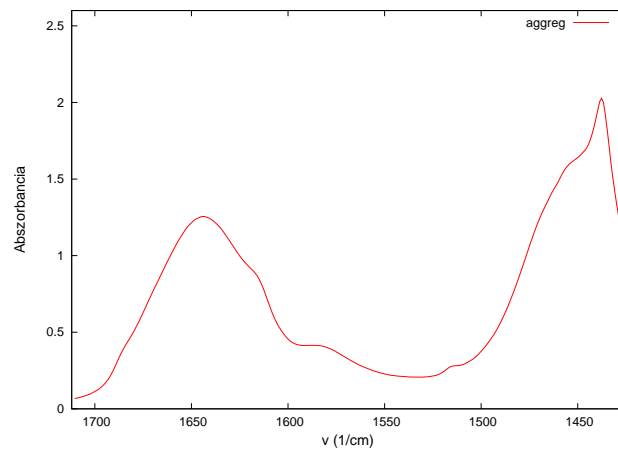
A nyomást növelve az amid-I sáv eltolódik ( $1642\text{ cm}^{-1}$ ) és kiszélesedik (11. ábra), ami rendezetlen szerkezetre, a polipeptidlánc kitekeredésére utal. A fehérje szerkezetének fellazulására az amid-II sáv eltűnéséből is következtethetünk, ami a H/D kicserélődés miatt eltolódott.

A denaturációt követően a nyomást az atmoszférikus érték közelébe csökkentve, jellemzően  $30 - 50\text{ MPa}$ ,  $1616\text{ cm}^{-1}$ -nél megjelenik az intermolekuláris  $\beta$ -szerkezetre jellemző oldalsáv (12. ábra), azaz a fehérje aggregálódik. Az oldalsáv intenzitása arányos az aggregátumokat stabilizáló hidrogénkötések számával.

Technikai okokból  $30 - 50\text{ MPa}$ -nál kisebb értékre nem tudtuk csökkenteni nyomást, mert a minta kifolyt volna. Ezenkívül az atmoszférikus nyomás közeli méréseknél a mintateret nem vákumozhattuk le, mert kiszívta volna a mintát a gyémánt cellából.



11. ábra. A denaturált lizozim infravörös spektruma. A mérést 964 MPa-on, 39,6 °C-on végeztük. Az amid-I sáv maximuma  $1642,9 \text{ cm}^{-1}$ -nél van, félértékszélessége  $53,2 \text{ cm}^{-1}$ .

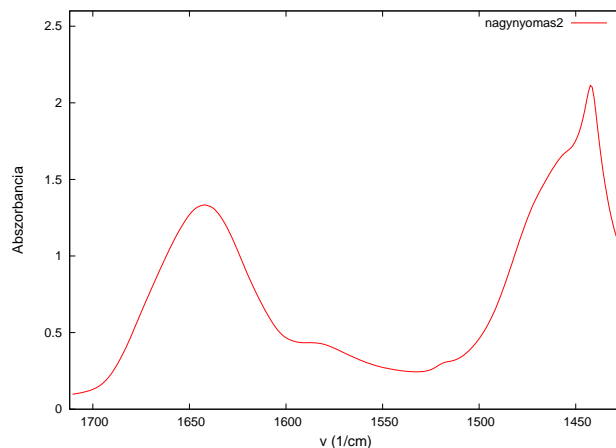


12. ábra. Az aggregálódott lizozim infravörös spektruma. A mérést 168 MPa-on, 39,9 °C-on, az alacsony nyomásra való visszerkezés után 5 órával végeztük. Az amid-I sáv maximuma  $1643,8 \text{ cm}^{-1}$ -nél található, félértékszélessége  $63,1 \text{ cm}^{-1}$ .

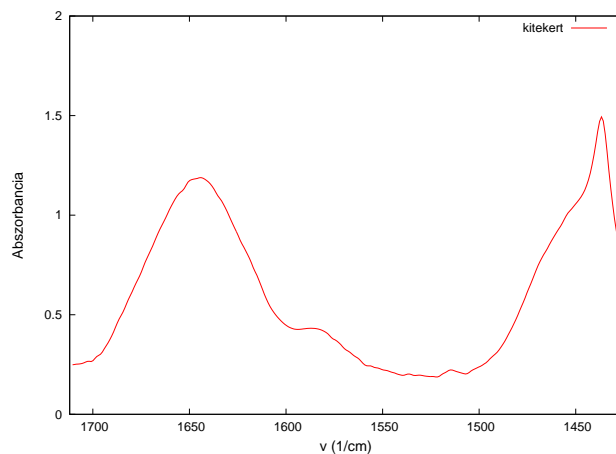
A nyomás ismételt növelésével az aggregációs oldalsáv nagy része eltűnik, de nem teljesen (13. ábra). Ebből arra következtethetünk, hogy a keletkezett aggregátum legalább két komponenst tartalmaz, egy nyomásfüggőt, mely a nyomás növelésével diszociál és egy nyomásstabil.

A nyomást megint az atmoszférikus érték közelébe csökkentve, az amid-I sáv inter-

molekuláris  $\beta$ -szerkezeti kompenze ismét megjelenik (14. ábra), tehát az aggregátumok disszociációja is egy reverzibilis folyamat.



13. ábra. A második nyomásciklus során denaturált lizozim infravörös spektruma. A mérést 1058 MPa-on, 40 °C-on végeztük. Az amid-I sáv maximuma 1642,3 cm<sup>-1</sup>-nél található, félértékszélessége 56,5 cm<sup>-1</sup>.

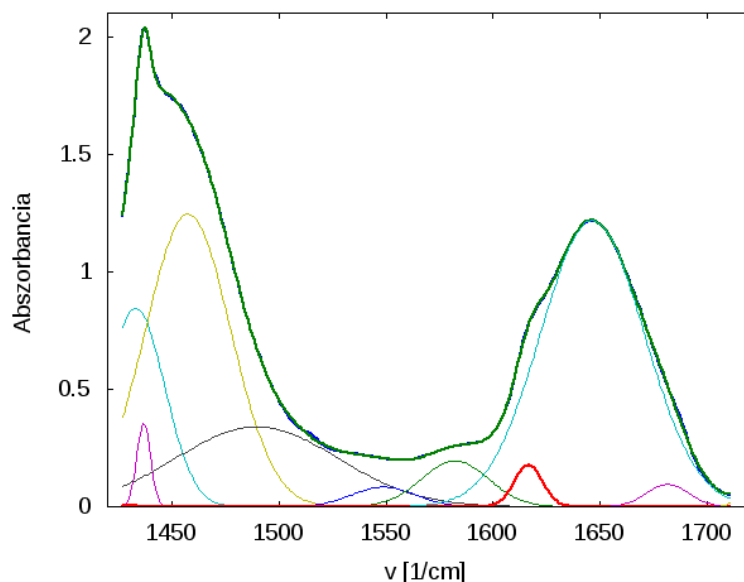


14. ábra. A második nyomásciklus után aggregálódott lizozim infravörös spektruma. A mérést 84 MPa-on, 39,7 °C-on, egyből az atmoszférikus nyomásra való visszaérkezés után végeztük. Az amid-I sáv maximuma 1645,3 cm<sup>-1</sup>-nél található, félértékszélessége 54,3 cm<sup>-1</sup>.

## 4.2. Illesztések

A mért spektrumokat egy konstans alapvonal meghatározása után, a 1420 – 1710  $\text{cm}^{-1}$  hullámszám intervallumban Gauss-függvények összegével illesztettük. Az illesztett függvény (17) gyorsan konvergált, 295 pont illesztése esetén a  $\chi^2$  értéke jellemzően 0,007 volt. Az illesztések során az aggregációs oldalsáv és az amid-I sáv területére voltunk kíváncsiak. Előbbire az aggregátum mennyiségének meghatározása, utóbbira pedig a normálás miatt.

A 15. ábrán látható, hogy az amid-I sáv 1616  $\text{cm}^{-1}$ -es aggregációs oldalsávja mellett, 1681  $\text{cm}^{-1}$ -nél egy másik oldalsáv is megjelenik. Ez azonban nem az 1685  $\text{cm}^{-1}$ -es intermolekuláris  $\beta$ -szerkezeti komponenshez, hanem a hajlatok, hurkok konformációs rezgéséhez tartozik.



15. ábra. A lizozim infravörös spektruma, illesztése és az illesztett összeg komponensei.

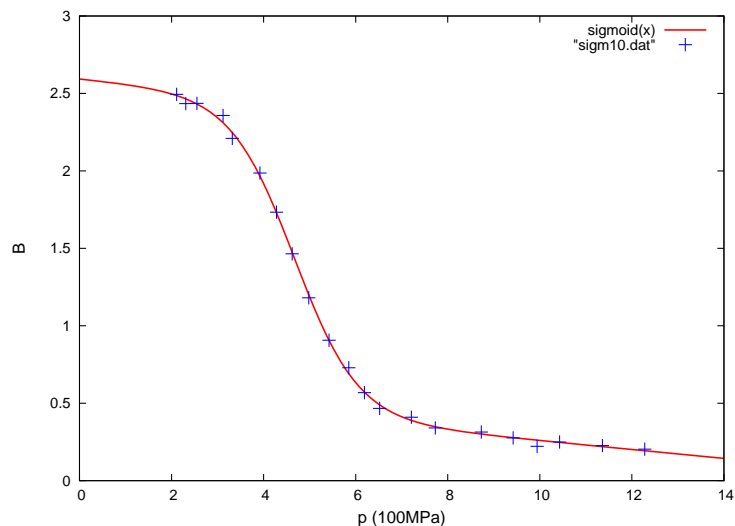
Az aggregációs oldalsáv területének nyomásfüggését, a fehérjék konformáció változási folyamatait általában jellemző, szigmoid típusú függvénynek vártuk:

$$B(p) = ap + b + \frac{\Delta b}{1 + e^{-(p-p_0)c}} \quad (18)$$

ahol

$$c = \frac{\Delta V}{RT} . \quad (19)$$

Itt  $p_0$  az átalakulási nyomás,  $\Delta V$  az aggregációs folyamat moláris térfogatváltozása. A szigmoid görbék illesztése esetén a  $\chi^2$  értéke jellemzően 0,009 volt 20 pont illesztése esetén.



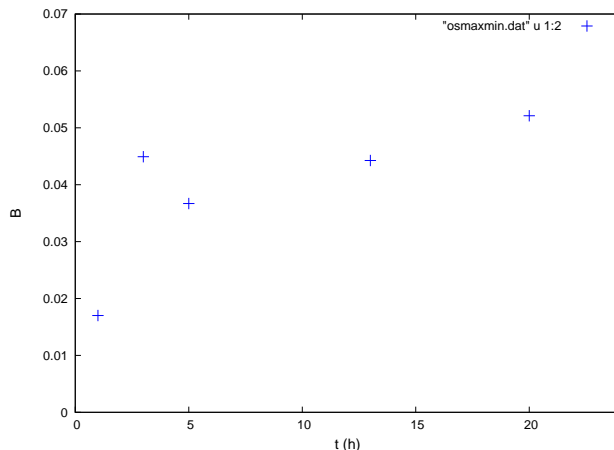
16. ábra. Az aggregációs oldalsáv területének nyomásfüggése szigmoid függvénnyel illesztve.

A különböző mérések oldalsáv területének szigmoiddal való illesztéséből a táblázatban látható értékeket kaptuk.

t [h]	T [°C]	$p_0$ [100MPa]	$\Delta V$ [ $\frac{\text{cm}^3}{\text{mol}}$ ]
1	40,1	$1,34 \pm 0,05$	$54 \pm 6,33$
3	39,8	$2,23 \pm 0,02$	$36,36 \pm 1,03$
5	40	$3,14 \pm 0,08$	$27,57 \pm 2,19$
13	39,7	$4,67 \pm 0,02$	$37,73 \pm 1,66$
20	39,7	$3,77 \pm 0,18$	$26,14 \pm 5,96$

2. táblázat. A szigmoid illesztéséből kapott valamint számolt értékek, ahol  $p_0$  az átalakulási nyomás,  $\Delta V$  pedig a (19) egyenlet alapján számolt moláris térfogatváltozás.

A szigmoidok paramétereinek ismeretében atmoszférikus nyomáson meghatározhatóak az aggregációs oldalsáv területei, amiket technikai problémákból kifolyólag nem tudtunk mérni. A 17. ábrán látható, hogy a nyomás-denaturáció hatására a különböző

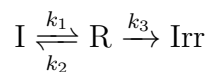


17. ábra. Az aggregációs oldalsáv számolt területe atmoszférikus nyomáson az aggregációs idő függvényében, amid-I sáv területtel normalva.

méréseknél nagyjából egyforma mennyiségű aggregátum keletkezett. Kivétel ez alól az 1 órás mérés, aminél az oldalsáv területe kisebb. Ennek az egyik lehetséges oka, hogy a spektrum azonos koncentrációjú, de máskor elkészített oldattal lett felvéve.

### 4.3. Modell

A mérések során a nyomás-denaturáció után keletkezett aggregátum nem volt homogén, csak egy része disszociált a nyomás növelésére. A legegyszerűbb modellt feltételezve tekintsük az aggregátumot két komponensűnek:



ahol I a nyomásdenaturáció után kialakuló, aggregációra hajlamos intermedier állapot, R a nyomásérzékeny aggregátum, Irr a nyomásstabil aggregátum,  $k_1, k_2, k_3$  pedig a sebességi állandók. Ha  $N_1, N_2, N_3$  rendre az I, R, Irr állapotban lévő molekulák száma,

akkor differenciálegyenlet rendszert az alábbi módon írhatjuk fel:

$$\frac{dN_1}{dt} = -k_1 N_1 + k_2 N_2 \quad (20)$$

$$\frac{dN_2}{dt} = +k_1 N_1 - (k_2 + k_3) N_2 \quad (21)$$

$$\frac{dN_3}{dt} = -k_3 N_2, \quad (22)$$

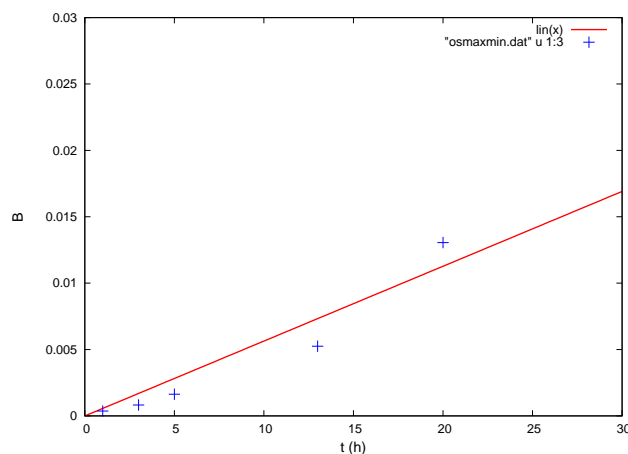
kezdeti feltételként pedig:

$$N_1 = 1, N_2 = 0 \text{ és } N_3 = 0, \quad (23)$$

adhatók meg. A differenciálegyenlet rendszert numerikusan megoldva, igen bonyolult eredményt kapunk. Azonban ha feltételezzük, hogy az aggregáció második lépése sokkal lassabb, mint az első, azaz  $k_1, k_2 \gg k_3$ , akkor  $N_3(t)$ -t egy egyszerű telítési görbével közelíthetjük:

$$N_3(t) = 1 - e^{-k_3 t}. \quad (24)$$

A görbe kezdeti szakaszát egyenessel közelíthetjük, melynek meredeksége megadja  $k_3$  értékét. Ahhoz, hogy  $k_3$ -at meghatározhassuk, olyan nyomás értéket kell választani,



18. ábra. Az aggregációs oldalsáv területe 800 MPa-n, ábrázolva az aggregációs idő függvényében.

ahol az aggregált oldalsáv területe nem változik jelentősen, azaz már csak a nyomás-



stabil aggregátumokat tartalmazza. A mérések esetén a 800 MPa-os érték megfelelőnek bizonyult. A szigmoidok paramétereiből számolt oldalsávterület értékeket tekinthetjük a kezdeti egyenes szakasznak. Az ezekre a pontokra illesztett egyenesből (18. ábra) az alábbi sebességi állandó értéket kaptuk:

$$k_3 = 5,63 \cdot 10^{-4} \pm 6,33 \cdot 10^{-5} \text{s}^{-1}. \quad (25)$$

## 5. Összefoglalás

A lizozim enzim nyomás-denaturációjának infravörös vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy nagy nyomás hatására a fehérje denaturálódik. Atmoszférikus nyomás közeli értékre visszatérve, az újragombolyodás során intermedier állapotok alakulnak ki, melyek hajlamosak az aggregációra. Az így keletkezett aggregátum stabilitás vizsgálatának céljából, azt ismét nagy nyomásnak tettük ki. Azt találtuk, hogy az aggregátum nem homogén. Egy része nagy nyomás hatására reverzibilisen disszociált, de volt egy nyomásstabil komponens is. Feltételezve, hogy a nyomásstabil aggregátum kialakulásának sebességi állandója jóval kisebb, mint a nyomásérzékeny komponensé, a nyomásstabil aggregátum mennyiségének időbeli fejlődését egyszerű telítési görbének kaptuk. A folyamat sebességi állandóját összevetve más fibrillumok kialakulásának sebességi állandójával nagyságrendileg hasonló értéket kaptunk.

### Köszönetnyilvánítás

Első sorban szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Smeller Lászlónak, hogy irányításával és segítségével betekentítést nyerhettem a nagy nyomással előállított fehérjeaggregátumok infravörös vizsgálatába, valamint hogy gyakorlati és elméleti tanácsaival segítette munkám elkészülését. Ezenkívül köszönöm a Mafihés irodalakovaknak a szakmai segítséget, és nem utolsó sorban barátaimnak és családtagjaimnak a türelmet.

## Hivatkozások

- [1] J. Bandekar. Amide modes and protein conformation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1992.
- [2] D. M. Byler and H Susi. Resolution-enhanced fourier transform infrared spectroscopy of enzymes. *Methods Enzimol*, 1995.
- [3] D. Eisenberg and W. Kauzmann. The structure and properties of water. *Clarendon Press*, 1969.
- [4] P. K. Glascol and F. A. Long. Use of glass electrodes to measure acidities in deuterium oxide. *J. Phys. Chem.*, 1960.
- [5] P. I. Haris and D. Chapman. Fourier-transform infrared-spectra of the polypeptide alamethicin and a possible structural similarity with bacteriorhodopsin. *Biochim. Biophys. Acta*, 1988.
- [6] S.A. Hawley. Reversible pressure-temperature denaturation of chymotrypsinogen. *Biochemistry*, 1971.
- [7] K. Heremans. High pressure effects on proteins and other biomolecules. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 1982.
- [8] A. A. Ismail, H. H. Mantsch, and P. T. T. Wong. Aggregation of chymotrypsinogen: Portrait by ft-ir spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, 1992.
- [9] A. Jayaraman. Ultrahigh pressures. *Rev. Sci Instrum*, 1986.
- [10] W. Kabsch and C. Sander. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, 1983.
- [11] S. Krimm and J. Bandekar. Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides and proteins. *Adv. Protein Chem.*, 1986.
- [12] C. Y. Levinthal. Are there pathways of protein folding? *J Chem. Phys.*, 1968.

- [13] T. Miyazawa, T. Shimanouchi, and S. I. Mizushima. Normal vibration of n-methylacetamide. *J. Chem Phys*, 1958.
- [14] P.L Privalov. Cold unfolding of proteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 1990.
- [15] J.L. Silva and G. Weber. Pressure stability of proteins. *Ann. Rev. Phys. Chem.*, 1993.
- [16] L. Smeller. Pressure temperature phase diagrams of biomolecules. *Biochim. Biophys. Acta*, 2002.
- [17] H. Torii and M. Tasumi. Model calculations on the amide-I infrared bands of globular proteins. *J. Chem Phys.*, 1992.
- [18] P. T. T. Wong and D. J. Moffat. A new internal pressure calibrant for high-pressure infrared spectroscopy of aqueous systems. *Appl. Spectrosc.*, 1989.
- [19] A. Zipp and W. Kauzmann. Pressure denaturation of metmyoglobin. *Biochemistry*, 1973.