

# AZ IZOPROPILMALÁT DEHIDROGENÁZ HŐSTABILITÁSA: DENATURÁCIÓS-RENATURÁCIÓS MEGKÖZELÍTÉSEK

**Doktori (Ph. D.) értekezés**

**GRÁCZER ÉVA LAURA**

**Okleveles biológus**

Témavezető:

Kazinczyné Dr. Vas Mária, tudományos tanácsadó, az MTA doktora

Készült:

*Magyar Tudományos Akadémia SzBK Enzimológiai Intézetében*

és

*Eötvös Loránd Tudományegyetem Biológia Doktori Iskolájában*

Vezetője: Prof. Dr. Erdei Anna, akadémikus

*Szerkezeti Biokémia Program keretében*

Programvezető: Prof. Dr. Gráf László, akadémikus



**Budapest, 2009**

# TARTALOMJEGYZÉK

<b>1. BEVEZETÉS</b>	<b>1</b>
<b>2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS</b>	<b>3</b>
2.1. A fehérjék térszerkezet kialakulásának mechanizmusa	3
2.1.1. Anfinsen kísérlete és a Levinthal paradoxon	3
2.1.2. A Levinthal paradoxon feloldása: A térszerkezet kialakulási modellek	4
2.1.3. Kísérleti lehetőségek a térszerkezet kialakulás mechanizmusának vizsgálatára	7
2.1.4. Az alegységek és domének szerepe a térszerkezet kialakulás folyamatában	11
2.1.4.1. Az alegységek szerepe a natív térszerkezet elérésében	11
2.1.4.2. A domének szerepe a natív térszerkezet elérésében	14
2.1.4.3. Van-e általánosítható különbség a kisméretű egyszerű és a nagyméretű összetett szerkezetű fehérjék térszerkezet kialakulási folyamatában?	15
2.2. A fehérjék szerkezeti stabilitásának elméleti és gyakorlati vonatkozásai	16
2.2.1. Hőstabil fehérjék ipari jelentősége	16
2.2.2. A fehérjék stabilitását meghatározó szerkezeti tényezők	18
2.2.3. A szerkezeti stabilitás energetikai megközelítése	21
2.2.4. A szerkezeti stabilitás kinetikai megközelítése	25
2.3. Az IPMDH, mint a szerkezeti stabilitás vizsgálatának modellje	27
2.3.1. Az IPMDH szerepe az élő szervezetben	27
2.3.2. Az IPMDH szerkezeti felépítése	29
2.3.3. A szubsztrátok kötődésének fehérjeszerkezeti háttere	32
2.3.4. Az IPMDH által katalizált reakció kinetikai mechanizmusa	35
2.3.5. Az IPMDH szerkezeti stabilitása és térszerkezet kialakulási mechanizmusának kérdései	36
2.3.5.1. Mutagenézis kísérletek a hőstabilitás vizsgálatára	37
2.3.5.2. A flexibilitás-aktivitás összefüggés tanulmányozása	38
2.3.5.3. A térszerkezet kialakulásának tanulmányozása	39
<b>3. CÉLKITŰZÉS</b>	<b>41</b>
<b>4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</b>	<b>43</b>
4.1 Anyagok	43
4.2 Módszerek	43
4.2.1. DNS szintű munkák a mutáns Tt IPMDH enzimek előállítására	43
4.2.2. A különböző vad típusú és mutáns IPMDH-k homogén formában történő előállítása	44
4.2.2.1. Transzformálás	44
4.2.2.2. A fehérje termeltetése	45
4.2.2.3. A fehérje tisztítása	46
4.2.3. Az IPMDH és a NAD <sup>+</sup> koncentrációjának meghatározása	48
4.2.4. Az IPMDH enzimaktivitásának meghatározása	49
4.2.5. Az enzimszerkezet stabilitásának meghatározása	50
4.2.5.1. Differenciális pásztázó mikrokalorimetria (DSC)	50
4.2.5.2. CD spektroszkópia	50
4.2.5.3. Natív gélelektroforézis	50
4.2.6. Az IPMDH egyensúlyi denaturációja és renaturációja	51
4.2.6.1. CD és fluoreszcencia spektroszkópia	51
4.2.6.2. Ureagradiens gélelektroforézis	52
4.2.7. Az IPMDH denaturációjának és renaturációjának kinetikája	53
4.2.7.1. Enzimaktivitás változásának követése	53
4.2.7.2. Tiol-csoport hozzáférhetőség változásának követése	54
4.2.7.3. CD spektroszkópia vizsgálatok	54
4.2.7.4. Fluoreszcencia spektroszkópia vizsgálatok	55
4.2.8. Molekuláris grafikai analízis	57
4.2.9. Kontaktusrend meghatározása	58

<b>5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTELMEZÉSŰK</b>	<b>59</b>
5.1. A térszerkezet kialakulás és felbomlás kapcsolata a hőstabilitással	59
5.1.1. Egyensúlyi vizsgálatok	59
5.1.2. Kinetikai vizsgálatok	63
5.1.2.1. Különböző hőstabilitású IPMDH enzimek denaturációs kinetikája	63
5.1.2.2. Különböző hőstabilitású IPMDH enzimek renaturációs kinetikája	67
5.1.3. A denaturáció és renaturáció kinetikai adatainak értelmezése a térszerkezeti adatok alapján	70
5.1.3.1. A szubsztrátok stabilizáló hatása a denaturáció folyamán	70
5.1.3.2. Különböző natív szerkezetű IPMDH enzimek „topológiájának” meghatározása és összefüggése a hőstabilitással	72
5.1.3.3. Az eltérő hőstabilitásért felelős szerkezeti különbségek	74
5.2. Az IPMDH, mint modell dimer enzim térszerkezet kialakulási mechanizmusa	78
5.2.1. A renaturáció során kialakuló intermedier kinetikai jellemzése	78
5.2.2. Az alegységek szerepe a térszerkezet kialakulás folyamatában	82
5.2.3. A domének szerepe a térszerkezet kialakulás folyamatában	84
5.2.3.1. A Thermus thermophilus IPMDH Trp mutánsok jellemzése	84
5.2.3.2. A Trp mutánsok renaturációs folyamatainak kinetikai összehasonlítása	86
5.2.4. Szerkezeti magyarázat az alegységek és domének együttműködésére a térszerkezet kialakulása során	92
<b>6. ÖSSZEFOGLALÁS</b>	<b>96</b>
<b>7. KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE</b>	<b>99</b>
<b>8. IRODALMI HIVATKOZÁSOK</b>	<b>101</b>

## Ábrák jegyzéke

1. ábra	A térszerkezet kialakulás nukleációs mechanizmusa	4
2. ábra	A térszerkezet kialakulás folyamatát szemléltető tölcserdiagram	6
3. ábra	Dimer fehérjék térszerkezet felbomlási és kialakulási mechanizmusa	11
4. ábra	A hőstabilitás kialakulásának termodinamikai modelljei	24
5. ábra	Az IPMDH alegységszerkezete (A) és a térszerkezetek összehasonlítása alapján készített szekvencia összerendezés (B)	29
6. ábra	Az IPMDH „folding topológiája”	30
7. ábra	Az alegységek kapcsolódási módja az IPMDH dimerben	31
8. ábra	Az IPM és NAD <sup>+</sup> kötődésének szerkezeti részletei	33
9. ábra	Az IPM kötődésére bekövetkező doménzáródás az IPMDH alegységében	34
10. ábra	Az IPMDH frakciók tisztaságának ellenőrzése SDS gélelektroforézis segítségével a Sephacryl S-200 gélzűrűs kromatográfia után	48
11. ábra	Az IPMDH spektrális tulajdonságai	59
12. ábra	A Trp oldalláncok elhelyezkedése a Tt, Ec és Vib IPMDH-ban	60
13. ábra	Tt, Ec és Vib IPMDH egyensúlyi denaturációja CD spektroszkópiával (A) és Trp fluoreszcenciával (B) követve	61
14. ábra	Tt (A, B), Ec (C, D) és Vib (E, F) IPMDH ureagradiens gélelektroforézise	62
15. ábra	A különböző hőstabilitású IPMDH enzimek denaturációs kinetikájának összehasonlítása	64
16. ábra	A ciszteinil oldalláncok elhelyezkedése az Ec és Vib IPMDH enzimekben	65
17. ábra	A különböző hőstabilitású IPMDH enzimek renaturációs kinetikájának összehasonlítása	68
18. ábra	A konzervatív oldalláncok harmadlagos szerkezet kialakításában betöltött szerepe	71
19. ábra	A különböző hőstabilitásért felelős szerkezeti különbségek	77
20. ábra	Az IPMDH renaturációjának kinetikája (A) és a kialakuló intermedier fluoreszcenciás spektruma (B)	79
21. ábra	A natív IPMDH-t jellemző FRET jelenség	80
22. ábra	A különböző hőstabilitású natív IPMDH enzimek (Tt, Ec és Vib) IPM-kötő képessége (A) és az IPM-kötő képesség kialakulása a Tt IPMDH renaturáció során (B)	81
23. ábra	A különböző hőstabilitású IPMDH enzimek renaturációjának követése (A) megállított áramlásos módszerrel és anizotrópia (B) segítségével	83
24. ábra	A mutációk hatása a Tt IPMDH harmadlagos szerkezetére (A), a hőstabilitására (B) és a hidrodinamikai térfogatára (C)	85
25. ábra	A vad típusú és mutáns Tt IPMDH renaturációs kientikáinak összehasonlítása	87
26. ábra	A NAD és Trp molekulák elhelyezkedése a Tt IPMDH (PDB kód: 1HEX) nyitott szerkezetében	88
27. ábra	Az IPMDH konformációs változása az IPM kötődés hatására	90
28. ábra	Alegység kontaktusok összehasonlítása a különböző hőstabilitású IPMDH enzimek esetén	95
29. ábra	A doménfelszínen lévő kölcsönhatások összehasonlítása különböző hőstabilitású IPMDH enzimek esetén	95

## Táblázatok jegyzéke

1. táblázat	Kísérleti lehetőségek a fehérjemolekulák térszerkezet kialakulásának vizsgálatára	8
2. táblázat	A fehérjemolekulák stabilitását meghatározó szerkezeti tényezők	18
3. táblázat	A dimer fehérjék két-, ill. háromállapotú mechanizmus szerint végbemenő denaturációját leíró egyenletek	23
4. táblázat	Dekarboxilezést végző dehidrogenázok, szubsztrátjaik és szerepük az élő szervezetben	28
5. táblázat	Az ismert vad típusú IPMDH kristályszerkezetek összefoglalása	32
6. táblázat	Az IPMDH kinetikai állandói	36
7. táblázat	Az irányított mutagenézishez használt „forward”, ill. „reverz” primerek DNS szekvenciája	44
8. táblázat	A különböző forrásból származó IPMDH-k specifikus aktivitás értékei	49
9. táblázat	A Tt, Ec és Vib IPMDH-k egyensúlyi denaturációját jellemző paraméterek	61
10. táblázat	A különböző hőstabilitású IPMDH-k denaturációjának sebességi állandói (perc-1)	66
12. táblázat	A különböző hőstabilitású IPMDH-k denaturációjának sebességi állandói (perc-1)	70
13. táblázat	A konzervatív oldalláncok szerepe az IPMDH harmad- és negyedleges szerkezetének kialakításában és a szubsztrát kötésében	72
14. táblázat	Különböző IPMDH-k relatív és abszolút kontaktusrendjeinek meghatározása	73
15. táblázat	A nem konzervatív oldalláncok szerepe az IPMDH-k eltérő szerkezeti stabilitásában	75
16. táblázat	A Trp oldalláncok távolsága a kötött NAD-tól a nyitott és IPM-et kötő zárt Tt IPMDH szerkezetében	89
17. táblázat	A három különböző hőstabilitású IPMDH alegységfelszínén lévő kölcsönhatásai	93
18. táblázat	A három különböző hőstabilitású IPMDH doménfelszínén lévő kölcsönhatásai	94

## Rövidítések jegyzéke

AFM	atomi erő mikroszkópia
ANS	8-anilino-naftalin szulfonsav
CD	cirkuláris dikroizmus
CO	kontaktusrend
DEAE	dietil-amino-etil
DTNB	5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoát)
DTT	ditiotritol
Ec	<i>Escherichia coli</i>
ESI MS	elektrospray ionizációs tömegspektrometria
FRET	Förster (fluoreszcencia) rezonancia energia transzfer
FTIR	Fourier transzformációs infravörös spektroszkópia
ICDH [EC 1.1.1.42]	izocitrát dehidrogenáz
IPM	3-izopropil-maleinsav
IPMDH [EC 1.1.1.85]	3-izopropilmalát dehidrogenáz
IPTG	izopropil- $\beta$ -D-tiogalaktopiranozid
NMR	magmágneses rezonancia
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
SAXS	kisszögű röntgenszórás
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Tf	<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>
Tt	<i>Thermus thermophilus</i>
Vib	<i>Vibrio</i> sp. 15

## **Köszönetnyilvánítás**

Köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek, Kazinczyné Dr. Vas Máriának munkám során nyújtott sokrétű és önzetlen segítségéért, útmutatásaiért.

Köszönet illeti Matkovicsné Dr. Varga Andrea kolléganőmet a kísérleti munka során nyújtott segítségéért és tanácsaiért.

Hálás vagyok az Intézet igazgatójának, Dr. Závodszy Péter akadémikusnak, hogy lehetőséget biztosított számomra, hogy kutatómunkámat a Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Központjának Enzimológiai Intézetében végezhettem és lehetővé tette laboratóriumában a DNS-szintű munkák kivitelezését. Köszönöm továbbá, hogy munkámat mindvégig figyelemmel kísérte és értékes tanácsaival segítette. Köszönettel tartozom Dr. Hajdú Istvánnak ezen DNS munkák kivitelezése során nyújtott segítségéért, a *Thermus thermophilus* és *Escherichia coli* IPMDH His-taggal rendelkező formájának elkészítéséért, valamint Dr. Szilágyi Andrásnak az IPMDH kontaktusrendek meghatározásáért.

Köszönetemet fejezem ki a Nemzeti Fejlesztési Ügynökségnek, hogy munkámat a KMOP-1.1.2-07/1-2008-0003 pályázat keretein belül támogatta.

Köszönöm szüleimnek, családomnak, valamint leendő férjemnek, Kulla Henrik Jánosnak önzetlen szeretetét, tanácsait és támogatását, hogy bármiben számíthattam rájuk.

## 1. BEVEZETÉS

„A világegyetemben nincsenek nagy rejtélyek,  
csupán a mi ismereteinkben vannak nagy hézagok.”

*Edgar Mitchell*

Az élet elképzelhetetlen fehérjék létezése nélkül. Szerepük van az élőlények felépítésében, biztosítják az anyagcsere folyamatok lépéseinek megfelelő sebességgel történő végbemenetelét és azok szabályozását is. Ezt a komplex szerepet tükrözi pl. az agy vagy az izmok felépítése és működése, a hormonok hatásának megnyilvánulása vagy akár az immunrendszer szabályozása. Mindezen folyamatokban kulcsfontosságú szerephez jut a különféle enzimfehérjék katalitikus hatása.

Az enzimek megfelelő működéséhez elengedhetetlen a helyes térszerkezet kialakulása, melyben a kovalens kötéssel összetartott lineáris polipeptidláncok globuláris fehérjék esetén (melyek a fehérjék túlnyomó többségét teszik ki) térbeli gombolyaggá állnak össze. A térszerkezetet az aminosavmaradékok között kialakuló hidrogénhidak, elektrosztatikus és hidrofób kölcsönhatások stabilizálják. Így az elsődleges szerkezetben a szekvenciában egymástól távollévő aminosavmaradékok térben akár egészen közel is kerülhetnek egymáshoz. Míg a szerkezetben a polipeptidlánc feltekeredési folyamatát gyakran egyéb fehérjék, úgynevezett chaperonok is segítik, a fehérjék natív térszerkezete *in vitro* körülmények között is ki tud alakulni. Anfinsen ribonukleázval végzett korai kísérlete bizonyította, hogy az elsődleges szerkezet, vagyis az aminosav sorrend egyértelműen meghatározza a harmadlagos szerkezetet. E meghatározó szerep mikéntjét, a térszerkezet kialakulás mechanizmusát azonban mindeddig még nem sikerült egyértelműen felderíteni, bár annak tanulmányozása – Anfinsen kísérletét alapul véve – *in vitro* körülmények között is lehetséges és már számtalan ilyen tanulmányt közöltek is különböző fehérjéknél.

A térszerkezettel szorosan összefüggő kérdés a fehérjék szerkezeti stabilitása. Bizonyos fehérjék léteznek különböző környezeti feltételek között, pl. eltérő hőmérsékleten élő szervezetekben megtalálhatóak ugyanazon fehérjének eltérő stabilitású formái. Az eltérő stabilitás szerkezeti és energetikai alapjait – számos összehasonlító vizsgálat ellenére – még ma sem értjük teljesen.

Értekezésemben a fehérje térszerkezet kialakulás és felbomlás folyamatának kérdéseit vizsgáltam különböző hőstabilitású izopropilmalát dehidrogenáz (IPMDH) enzimeken. Az IPMDH a leucin bioszintézisében résztvevő enzim, melynek molekulája

két azonos alegységből, alegységenként pedig két szerkezeti doménből épül fel. Mindeztáig igen kevés irodalmi adat van a több polipeptidláncból felépülő fehérjék szerkezetének kialakulásáról. Az IPMDH vizsgálatával közelebb juthatunk mind az alegységek, mind a domének szerepének tisztázásához a térszerkezet kialakulás folyamatában.

Az IPMDH vizsgálata lehetőséget teremt a hőstabilitás és a szerkezet kialakulás általános összefüggéseinek felderítésére is. Az ilyen jellegű ismeretek potenciálisan felhasználhatóak lesznek arra, hogy csupán az aminosav sorrend, a szekvencia alapján képesek legyünk az eddiginél stabilabb térszerkezetű fehérjéket tervezni, és ezek ipari alkalmazására gondolni.

Doktori értekezésemben azt a kérdést vizsgáltam, hogy oligomer fehérjék esetén, mint pl. az IPMDH is, az egyes alegységek elősegítik-e egymás térszerkezetének kialakulását, a lánc feltekeredését, azaz a polipeptidláncok asszociációjának már a feltekeredés korai szakaszában be kell-e következnie vagy pedig a már megfelelő térszerkezettel rendelkező alegységek képesek csak összekapcsolódni. Hasonlóan, vizsgáltam az egyes domének szerepét is az alegység natív térszerkezetének kialakulásában: válasz kívántam adni arra a kérdésre, hogy az IPMDH doménjei önállóan képesek-e felvenni natív térszerkezetüket vagy pedig csak egymással együttműködve, kooperatív módon tudják azt kialakítani.



## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1. A fehérjék térszerkezet kialakulásának mechanizmusa

#### 2.1.1. Anfinsen kísérlete és a Levinthal paradoxon

Anfinsen ribonukleázal végzett kísérlete során azt tapasztalta, hogy a denaturált fehérje - melyben redukálószerrel a diszulfidhidakat is felbontották - a denaturálószer és a redukáló ágens eltávolítása után képes volt teljesen visszanyerni aktivitását. E kísérlet alapján Anfinsen levonta azt az egyértelmű következtetést, hogy az aminosav sorrendben kódolva van minden olyan információ, ami a fehérje natív térszerkezetének kialakulásához szükséges [1].

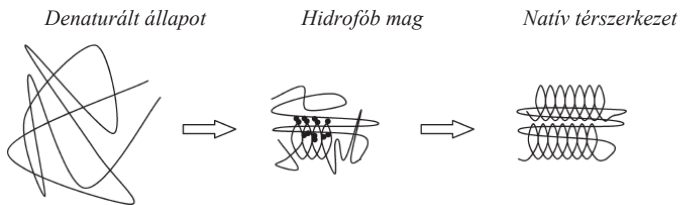
A mai napig kérdéses viszont, hogyan rejti magában az aminosav sorrend a feltekeredésre vonatkozó információkat, vagyis milyen módon határozzák meg az egyes oldallancok a térszerkezet kialakulását. Az sem tisztázott még, mi indítja el a folyamatot, mi a kezdő lépés és milyen egymás utáni lépésekben zajlik le a polipeptidlánc feltekeredése. Bár a szervezetben a fehérjék térszerkezetének kialakításában chaperonok is részt vesznek, a helyes térszerkezet *in vitro* körülmények között is kialakul. Ez lehetőséget ad arra, hogy *in vitro* körülmények között vizsgálhassuk a térszerkezet kialakulását és következtethessünk a szerkezet kialakulásának fő szabályaira [2, 3].

Anfinsen nagyjelentőségű megfigyelése azonban még nem tette lehetővé, hogy magáról a térszerkezet kialakulás folyamatáról is megállapításokat tudjunk tenni. Ha feltételezzük, hogy a fehérje molekulának az összes lehetséges konformációs állapotot „ki kell próbálnia” a feltekeredés folyamán, akkor rögtön ellentmondásba keveredünk, ezt nevezzük Levinthal paradoxonnak. Ha pl. veszünk egy 100 aminosavból álló polipeptidláncot és az azt felépítő mindegyik aminosav esetén csupán 3 különböző konformációs állapotot tételezünk fel (bár azok száma valójában végtelen), akkor ez már  $3^{100}$ -on állapotot jelent. Ha feltételezzük továbbá, hogy egy konformációs állapot  $10^{-13}$  másodperc alatt alakul ki, akkor a végleges térszerkezet kialakulás ideje  $3^{100} \cdot 10^{-13} = 5 \cdot 10^{34}$  másodperc, ami  $1,6 \cdot 10^{27}$  évet jelent. A valóságban azonban a fehérjék térszerkezete sokkal rövidebb idő, percek, sőt néha másodpercek alatt is kialakul. Az ellentmondás azonban csak látszólagos és megoldására számos elképzelés, feltételezés látott napvilágot az évek folyamán.

## 2.1.2. A Levinthal paradoxon feloldása: A térszerkezet kialakulási modellek

A fenti ellentmondás feloldásához hosszú elméleti és kísérleti kutatómunka vezetett. Ennek alapján megszülettek azok a modellek, amelyek már érthetővé teszik, hogy miért nem tart végtelen hosszú ideig a fehérje térszerkezet kialakulása.

A *klasszikus nukleációs modell* [4, 5] azt tételezi fel, hogy a szekvenciálisan közel lévő aminosavak oldalláncai ki tudják alakítani a natív állapotban létező másodlagos szerkezeti elemek darabjait, majd ezekből a kristályosodási góckhoz hasonlóan létrejön a végleges, natív szerkezet. A *nukleációs kondenzációs modell* [6-8] szerint a másodlagos és harmadlagos szerkezet kialakulása nem választható el egymástól, a feltekeredési magokat nagy hatótávolságú kölcsönhatások stabilizálják. A folyamatot nem kíséri köztitermék kialakulása. Ezen modellek vázlata látható az 1. ábrán.



**1. ábra A térszerkezet kialakulás nukleációs mechanizmusa** A „folding” során először egy hidrofób mag alakul ki, mely nagymértékben lecsökkenti a felvehető konformációs állapotok számát. Az ábra Nölting összefoglaló munkája [8] alapján készült.

Az előző elmélettel szemben a *szekvenciális és hierarchikus modell* esetében létezik egy jól meghatározott köztitermék, mely natív másodlagos szerkezeti elemekkel bír [9]. Ezen elképzelés szerint a térszerkezet kialakulás első lépése a nukleáció, ezt követi a másodlagos szerkezeti elemek kialakulása, majd pedig a szubdomének, domének, ill. monomerek, esetleg a még összetettebb szerkezetű oligomerek megjelenése, azaz a natív állapotú fehérje létrejötte. Lényegében itt a térszerkezet kialakulásának lépéseiben a fehérje hierarchikus szerkezeti rendje tükröződik. A hasonló „*framework*” modell [10, 11] szerint a másodlagos szerkezet szintén igen korán kialakul és egy köztitermék, az úgynevezett „molten globula” képződik. Ennek szerkezete már lényegesen kompaktabb a denaturált állapoténál, de még kb. 30 %-kal nagyobb térfogatú a natív állapotú molekulához képest [12]. A „molten globula” állapotban a másodlagos szerkezeti elemek elrendeződése már a natív állapothoz hasonló, de annál sokkal flexibilisebb, mivel a specifikus oldallánc-kölcsönhatások még nem alakultak ki benne. Bizonyos

esetekben a „molten globula” intermedier állapot jelenlétét kísérletesen is sikerült kimutatni [13, 14]. A harmadlagos szerkezet kialakulása csak ezután következik be.

A *moduláris modell* [15, 16] szerint mind a domének, mind a szubdomének önálló „folding” egységnek tekinthetők, melyek a natív szerkezet elérése után kapcsolódnak össze, ezáltal alakítva ki a fehérje végső szerkezetét.

A *diffúziós ütközési modell* [17, 18] mikrostruktúrák létrejöttét feltételezi, melyek véletlen ütközések során találkoznak, szerencsés esetben összekapcsolódnak és így létrehozhatnak egy már magasabb szerkezeti szintet.

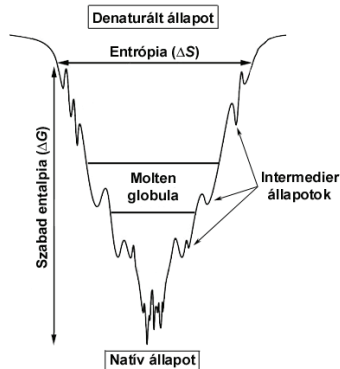
A *hidrofób összeomlási modell* [16, 19] pedig a hidrofób kölcsönhatások szerepét hangsúlyozza a térszerkezet kialakulásában, melynek során egy olyan kompakt szerkezet jön létre, melyben az oldalláncok védettek az oldószer molekuláitól.

A *jigsaw modell* [20, 21] Harrison és Durbin állította fel 1985-ben. Eszerint sokféle feltekeredési útvonal létezik, melyek mind ugyanahhoz a végállapothoz vezetnek. A hipotézis az intermediereket inkább kinetikai megközelítéssel írja le, nem pedig szerkezetileg. Lényegében minden intermedier gyors egyensúlyban lévő, különböző szerkezetű molekulákat foglal magában.

A fenti elméletek - bár bizonyos mértékig egymással átfednek - mindegyike feltételez egy jól meghatározott reakcióutat, melyen a molekulának végig kell haladnia a natív térszerkezet eléréséhez. Ez tehát már feloldaná a Levinthal paradoxon ellentmondásait, ugyanis nem szükséges a molekulának az összes lehetséges konformációs állapotot kipróbálnia a térszerkezet kialakulása során. A fenti modelleket jól kiegészíti az utóbbi tíz évben kialakult „*új szemléletmód*”, amely egy tölcser alakú energiafelület segítségével írja le a térszerkezet kialakulás folyamatát [22-24]. Ezt a folyamatot szemlélteti az 2. ábra.

A tölcser peremén létező denaturált állapotok sokféleségéből kiindulva haladunk a tölcser alja felé, miközben a szabadentalpia egyre csökken. A tölcser alján található a legalacsonyabb energiaállapotú szerkezet, a natív konformáció, amit már sokkal kisebb számú populáció képvisel, de természetesen ez sem egyetlen konformációt jelent. A térszerkezet kialakulás folyamata során a fehérje konformációinak száma egyre csökken, ami a konformációs entrópia csökkenését is maga után vonja. Így minden molekula más és más reakcióutat járhat be, azaz az átmeneti állapot vagy köztítermék nem egyetlen szerkezetet, hanem a szerkezetek sokaságát jelenti. Ha a fehérje feltekeredése intermedierek nélkül zajlik le (kétállapotú modell), ezt egy sima falú tölcser modellezi a legjobban. Ebben az esetben a térszerkezet kialakulás folyamata

gyorsan lezajlik, mivel csak kisszámú állapoton kell áthaladnia molekulának. Egy sok állapotos feltekeredési folyamat viszont inkább hasonlítható egy olyan tölcserhez, melynek falában mélyedések is találhatóak, melyek lokális energiaminimumokat jelképeznek és amelyek intermedier állapotokat képviselnek.



2. ábra A térszerkezet kialakulás folyamatát szemléltető tölcserdiagram. A modell sémája Hill összefoglaló munkája [25] alapján készült. Az ábrán viszonylag széles energiasáv jelöli a „molten globula” nevezetű köztiterméket.

A tölcser modellel szemben a Levinthal paradoxont egy olyan helyzettel szemléltethetjük, amikor egy teljesen sík golfpályán a játékos bekötött szemmel, meghatározatlan irányba üti el a labdát. Annak az esélye, hogy így beletalál a lyukba, elenyészően kicsi, azaz a kezdeti nagyszámú denaturált, azonos energiájú fehérje molekula igen kis valószínűséggel jut csak el a legalacsonyabb energiaszintű natív állapotba.

A Levinthal paradoxonra a fent említett modellek megoldást kínálnak. Érthetővé teszik, hogy a térszerkezet kialakulása korántsem véletlenszerűen zajlik, hanem belátható időn belül, jól meghatározott reakcióútvonal mentén megy végbe. A különböző elméleti megfontolások bizonyítására számos módszer áll rendelkezésünkre, melyek segítségével a fehérje szerkezetének kialakulása nyomon követhető.

### 2.1.3. Kísérleti lehetőségek a térszerkezet kialakulás mechanizmusának vizsgálatára

A fehérje térszerkezet kialakulásának vizsgálatához, megértéséhez olyan módszerekre van szükség, melyekkel nyomon követhető mind a másodlagos és a harmadlagos szerkezeti elemek létrejötte, a polipeptidlánc alakjának változása, azonosítható és jellemezhető az intermedier állapot vagy akár tanulmányozható a szubsztrát(ok) kötőhelyének kialakulása is. Ilyen jól ismert módszer pl. a CD-spektroszkópia, amely a távoli ultraibolya tartományban felvett spektrum alapján felvilágosítást ad a másodlagos szerkezeti elemek mennyiségéről. A fehérjék triptofán- és tirozin-tartalmukból eredően jellegzetes spektrális tulajdonságokkal (UV abszorpció, CD és fluoreszcencia spektroszkópia) rendelkeznek, melyek szintén felhasználhatóak a natív térszerkezet kimutatására. Azon fehérjék esetén, melyek ilyen oldalláncokkal nem rendelkeznek, hasonló céllal alkalmazhatóak a különböző fluoreszcens jelölési technikák (pl. ANS). Az ANS hidrofób festéket közkedvelten alkalmazzák a fehérjék térszerkezet-kialakulási folyamatának vizsgálatára, ugyanis ez a vegyület a „molten globula” állapotban lévő fehérjemolekula felszínén lévő hidrofób régióihoz jól kötődik és kötődése jellegzetes fluoreszcencia-változással jár. A denaturált vagy intermedier állapotból a natív állapotba való átmenetet általában jellegzetes spektrális változás követi (akár a fluoreszcenciáért felelős oldalláncok mikrokörnyezetének megváltozása, akár a kötött ANS molekulák disszociációja következtében). Ezek a változások általában fluoreszcenciás technikákkal jól követhetőek.

A fentiekén kívül minden olyan módszer, ami alkalmas oldatban lévő fehérjemolekulák szerkezetvizsgálatára (így pl. SAXS, NMR, FTIR, H-D kicserélődés stb.) felhasználható a térszerkezet kialakulás ill. felbomlás folyamatának tanulmányozására. Az 1. táblázat ezen kísérleti lehetőségeket foglalja össze.

A térszerkezet kialakulás folyamata vizsgálatának két alapvető módja van: az *egyensúlyi* és a *kinetikai* mérések. Az egyensúlyi kísérletek esetén különböző denaturálószer koncentrációk jelenlétében határozzuk meg a fenti módszerek valamelyikével, hogy az adott fehérjemolekula populációnak hányadrésze natív ill. denaturált állapotú. A kinetikai kísérletek esetén pedig a natívból denaturált, ill. a denaturáltból natív állapotba való átalakulás időbeli folyamatát tanulmányozhatjuk, a denaturálószer koncentráció hirtelen megváltoztatását követően. Erre elvileg szintén használhatóak a fenti módszerek, amennyiben azokat kinetikai vizsgálatokra alkalmassá

tesszük. A műszerezettség mai fejlettségi szintjén a „stopped-flow” technika ms-s időskáláján túlmenően a nyomás- vagy hőmérséklet-ugrásos („pressure-jump”, T-jump” vagy az ún. „turbulens áramlásos”) technikákkal akár  $\mu$ s ill. ns-s felbontásban is követhetők az egyes szerkezeti jellemzők változásai.

**I. táblázat** Kísérleti lehetőségek a fehérjemolekulák térszerkezet kialakulásának vizsgálatára [26]

MÓDSZER	IDŐ- SKÁLA	VIZSGÁLT SZERKEZETI JELLEMZŐ	Hiv.
<b>Fluoreszcencia</b>			
Trp (Tyr) fluoreszcencia	ns-s	Trp és Tyr környezete	[27-29]
ANS kötés		Felszínen lévő hidrofób régiók	
Szubsztrát/inhibitor kötés		Aktív hely kialakulása	
FRET		Aminosavak közötti távolság	
Anizotrópia		Korrelációs idő	
<b>CD</b>			
Távoli UV	ns-s	Másodlagos szerkezet kialakulása	[30, 31]
Közeli UV		Harmadlagos szerkezet kialakulása	
<b>Mutáció analízis</b>	detektálás technikájától függ	Egyes aminosavak szerepe az intermedier és az átmeneti állapot stabilizálásában	[32]
<b>SAXS</b>	$\geq$ ms	Molekula alak és méret	[33]
<b>Abszorbancia (Közeli UV)</b>	ns-s	Aromás oldalláncok és a kofaktor környezete	[27]
<b>FTIR</b>	ns-s	Másodlagos szerkezet kialakulása	[34]
<b>NMR</b>	ms-s	Egyes aminosavak környezete	[35]
<b>Hidrogén-Deutérium kicserélődés</b>			
Natív állapot esetén	perc-hónap	Globális stabilitás és metastabil állapotok	[36-38]
H-D kicserélődés – NMR	ms-s	H-kötés képződés	
H-D kicserélődés – ESI MS	ms-s	„Folding” populációk vizsgálata	
<b>AFM</b>	s	Egyes molekulák kitekeréséhez szükséges erő, a le- és feltekeredés sebességének meghatározása	[39]

Mind egyensúlyi, mind kinetikai módszerrel lehetséges pl. intermedier állapotok kimutatása a térszerkezet kialakulása során. Az egyensúlyi és kinetikai módszerrel kimutatható intermedier állapotok azonban nem feltétlenül felelnek meg egymásnak, mivel a kinetikai intermedierek, melyek általában a „folding” korai szakaszában, 2-5 ms-on belül jönnek létre, nem elég stabilak ahhoz, hogy egyensúlyi módszerekkel

kimutathatóak legyenek [40]. Intermediér állapot a 100 aminosavnál kisebb fehérjék térszerkezetének kialakulása esetén általában nem is mutatható ki, mivel a natív és a denaturált fehérjemolekulák képviselnek csak jelentős populációt. Ebben az esetben kétállapotú átmenetről ( $N \rightleftharpoons D$ ) beszélünk.

Nagyobb fehérjék esetén a térszerkezet kialakulása során az intermediér állapotú molekulák nagyobb valószínűséggel halmozódhatnak fel ( $N \rightleftharpoons I \rightleftharpoons D$ ). A különböző fehérjék intermediér molekulái jelentősen eltérhetnek konformációs tulajdonságaikban és stabilitásukban. Előfordulnak közöttük egészen natívyszerűek, mint pl. CD2 fehérjénél [41], mások natívyszerű régiókat tartalmaznak, melyek megfeleltethetők a natív fehérje doménjeinek vagy szubdoménjeinek, mint az apomioglobinnal [42] vagy pedig alig rendelkeznek natívyszerű szerkezettel, mint ahogyan a  $\beta$ -laktoglobulinnál találták [43].

A fenti kísérleti módszerekkel sok esetben nemcsak az intermediér állapotok mutathatók ki, hanem az előző fejezetben bemutatott „folding” modellek érvényessége is vizsgálható. Néhány kis fehérje esetében az első ms-okban megfigyelhető a kezdeti összeomlás (hidrofób kollapszus) jelensége, mely a polipeptidlánc nem-specifikus kölcsönhatásainak szerepét tükrözi a térszerkezet kialakulás kezdeti fázisában [44]. Más, hasonló méretű fehérjéknél pedig ugyanezen időskálán már stabil szerkezeti elemek (pl. hélixek) is képződnek (a „framework” modellnek megfelelően), azaz specifikus kölcsönhatások már a térszerkezet kialakulás korai fázisában létrejöhetnek [45]. Ennek megfelelően a maximálisan elérhető fehérje térszerkezet kialakulás sebességére, a másodlagos szerkezeti elemek létrejöttének sebességéből következtetni lehet. Hőmérsékletugrás és fotodisszociációs technika segítségével Eaton és mti. [46] kimutatták, hogy az  $\alpha$ -hélixek egyes esetekben akár néhány ns alatt, míg mások csak  $\mu$ s vagy még hosszabb idő alatt alakulnak ki, a környező aminosav szekvenciától függően. Van arra is példa, hogy egy  $\beta$ -hajtókanyar körülbelül 10  $\mu$ s, bizonyos hurkok pedig 1  $\mu$ s alatt létrejönnek. Energia átadason alapuló mérések szerint az intramolekuláris diffúzió 20 ns-ot vesz igénybe, meghatározva ezzel a térszerkezet kialakulás lehetséges maximális sebességét, amennyiben az a diffúziós ütközési modell szerint zajlik [47].

Az ultragyors keverési technikákat, az ún. megállított áramlásos módszerrel kiegészítve lehetőség nyílik egy teljes térszerkezet kialakulási folyamat követésére  $\mu$ s-  
időskálán átölelve. A citokróm c fehérjével és a protein G B1 doménjével végzett mérések [48, 49] során az addig nem vizsgálható gyors szakaszok is követhetővé váltak ezen módszerek használatával. Az ultragyors keverési technikát SAXS mérésekkel együtt alkalmazva közvetlenül mérhetővé vált a citokróm c fehérje girációs sugara a

térszerkezet kialakulás kezdetétől számított 150-500  $\mu$ s-nál, mely szerkezet térfogata csupán 30 %-kal nagyobb a natív szerkezeténél [50]. Ez valószínűleg megfelel a „molten globula” intermedier állapotnak (ld. „framework” modell). Ezzel szemben a protein G immunoglobulin-kötő doménjének girációs sugara a „folding” kezdete után 100 ms-nál még megkülönböztethetetlen a 4M GuHCl-ben denaturált fehérje sugarától [51]. Ebben az esetben polipeptidlánc nem alakít ki specifikus kölcsönhatásokat, valamint nem csökken le a térfogata, tehát a szerkezet kialakulásának kezdetén a fehérjeláncok gyors összeomlása nem minden fehérje jellemzője.

A dimer 4 hélix köteges ROP (Repressor Of Primer) fehérje esetében „stopped-flow” és mutációs kísérletek alapján megállapították, hogy hurok záródás szükséges az intermedier kialakulásához [52]. Ez a diffúziós ütközési modellt támasztja alá, ugyanis a hosszabb hurok lecsökkenti a térszerkezet kialakulás sebességét, azáltal hogy nagyobb flexibilitást és ezzel együtt több konformációs lehetőséget biztosít a fehérje számára. Habár ezzel a modellel egyes kisméretű helikális fehérjék „foldingja” jól leírható, nagyobb ill. komplexebb topológiával rendelkező helikális fehérjéknél inkább alkalmazható a nukleációs-kondenzációs vagy a hidrofób kollapszus modell [53, 54].

Egyes fehérjék esetében az intermedier és natív fehérje közötti átmenet különböző „folding” útvonalakon keresztül történik, amint azt H-D kicserélődéses vizsgálatokkal kimutatták a lizozim esetében [55]. Ennél a fehérjénél a kezdeti összeomlás egy homogén, kompakt intermedierhez („molten globula”) vezetett, ahol az  $\alpha$ -domén 4 db hélixéből 3 hélixben az amidcsoportok védve voltak a kicserélődéstől. A további átmenet a natív állapot felé viszont már számos intermediert eredményezett, amelyek amid csoportjai különböző mértékben voltak hozzáférhetőek a deutérium számára. Ez a mechanizmus alátámasztja a „jigsaw” modell érvényességét, azaz a molekulák ugyanazt a végső natív szerkezetet különböző útvonalakon képesek elérni.

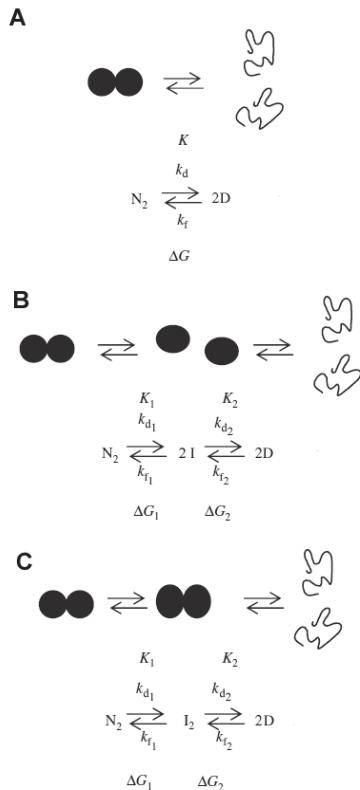
A számos eredmény ellenére még messze vagyunk attól, hogy az egyes fehérjék térszerkezet kialakulási folyamatának részleteit, a konkrét molekuláris kölcsönhatások létrejöttének sorrendjét és jelentőségét megértsük és abból általános következtetéseket vonhassunk le. Különösen érvényes ez az alább tárgyalt összetettebb szerkezetű, több doménből álló, ill. oligomer fehérjék esetére.



## 2.1.4. Az alegységek és domének szerepe a térszerkezet kialakulás folyamatában

### 2.1.4.1. Az alegységek szerepe a natív térszerkezet elérésében

A térszerkezet kialakulásáról és felbomlásáról eddig szerzett ismeretek többsége monomer fehérjék vizsgálatán alapszik, hiszen ezek tanulmányozása egyszerűbb, az eredmények könnyebben értelmezhetőek. Az *Escherichia coli* (Ec) fehérjéinek viszont csupán 19 %-a monomer felépítésű, s ez a szám a magasabb rendű élőlényekben még



tovább csökken. Az oligomer fehérjék közül, melyeket azonos vagy különböző alegységek is alkothatnak, a homodimer felépítésű fehérjék az elterjedtebbek, az Ec genomjának, mintegy 38 %-át teszik ki [56]. Mindez indokolja a monomer és dimer fehérjék térszerkezet kialakulásában mutatkozó azonosságok és különbségek felderítését.

A térszerkezet kialakulása monomer és dimer felépítésű fehérjék esetében is történhet egy vagy több lépésben, ez utóbbi esetben a natív molekula térszerkezete intermedier(ek)en keresztül alakul ki. Dimer fehérjék térszerkezet kialakulása mégis jóval összetettebb folyamat, mivel a polipeptidláncok összekapcsolódását megelőzően, ill. utána is kialakulhatnak intermedier állapotú molekulák. Ezek alapján egy dimer fehérje térszerkezet kialakulása, ill. felbomlása különböző mechanizmusok szerint mehet végbe.

**3. ábra** Dimer fehérjék térszerkezet felbomlási és kialakulási mechanizmusai: kétállapotú modell (A), háromállapotú modell: monomer intermedier (B) és háromállapotú modell: dimer intermedier (C) esetén [57];  $N_2$  a natív dimert,  $M$  a monomer intermediert,  $I_2$  a dimer intermediert és az  $U$  pedig a denaturált monomert jelképezi. A mechanizmusok az egyensúlyi állandó ( $K$ ), a szabadentalpia változás ( $\Delta G$ ) és a sebességi állandók ( $k$ ) segítségével írhatóak le.

A legegyszerűbb a *kétállapotú modell* (3A ábra), melynél a feltekeredett oligomer fehérje egyetlen lépésben alakul át denaturált monomerekké és fordítva. Erre találhatunk példát a GCN4-p1 leucin cipzár peptidnél [58], az *Allium sativum* agglutininnél [59] vagy a P22 Arc represszor esetében [60], melyek mind kis molekulatömegű peptidok, fehérjék. Míg a kétállapotú *egyensúlyi denaturációs-renaturációs* görbék alakja az egy polipeptidláncból felépülő fehérjék esetén szimmetrikus és nem függ a fehérje koncentrációtól, addig a több polipeptidláncból felépülő molekulák (mint pl. a jelen dolgozatban vizsgált IPMDH) esetén kisebb-nagyobb aszimmetriát mutatnak (elnyújtottak az alacsonyabb denaturálószer koncentrációk tartományában, ld. 13. ábra), másrészt nagyobb fehérjekoncentrációk esetén a denaturációs átmenetet jellemező koncentráció általában a nagyobb denaturálószer koncentráció felé tolódik el, amennyiben a denaturáció móltömegváltozással, azaz disszociációval jár együtt [57, 61]. Mindez a molekularitással magyarázható, vagyis egy dimer fehérje esetén a fel- és letekeredett molekulák aránya, így az egyensúlyi állandó is változik a fehérje koncentráció változásával, míg monomer fehérjék esetében ez állandó.

Az egyensúlyi kétállapotú modell esetén gyakran tapasztalható három- vagy több részfolyamatból álló *kinetika*, míg ha egyensúlyban háromállapotú mechanizmust figyelnek meg, akkor a kinetika csak legalább háromállapotú mechanizmussal írható le. Már a monomer fehérjék „folding” kinetikája is igen bonyolult lehet a prolin és diszulfid izomerizációnak, a parallel útvonalaknak, vagy az „on-”, és „off-pathway” intermediereknek köszönhetően [62, 63]. A több polipeptidláncból álló fehérjék esetén viszont még összetettebb folyamat figyelhető meg, mivel a láncok asszociációja, azaz egy bimolekuláris reakció is megtörténik a polipeptidláncok feltekeredése során. Ez pedig az időgörbék fehérjekoncentráció függését vonhatja maga után, valamint ezen görbék leírása is eltérhet az egyszerű exponenciális egyenlettől. A fehérjemolekulák letekeredése során – átmeneti denaturálószer koncentrációk esetén, ahol mind a letekeredett, mind a natív molekulák jelentős számban vannak jelen – szintén több esetben fehérjekoncentráció függés figyelhető meg [60], továbbá a kinetikai görbék itt sem írhatóak le exponenciális egyenlettel. Erősen denaturáló körülmények között viszont a kinetikák menete jól közelíthető exponenciális egyenlettel, azaz a meghatározott sebességi állandó is független a fehérje koncentrációtól, mivel ebben az esetben a fehérjemolekulák feltekeredése elhanyagolható.

Nagyobb oligomer fehérjék fel- és letekeredése általában *háromállapotú modell* segítségével jellemezhető (3B és 3C ábrák). Ezekben az esetekben intermedier alakul ki, amely lehet már bizonyos mértékig fellazult, de még oligomer szerkezetű, mint pl. a  $\beta$ B1-krisztallin [64], a bakteriális luciferáz [65], az aszpartát aminosztransferáz [66] esetében, vagy pedig részben vagy teljesen natív állapotú monomer formájában jelenik meg. Ez utóbbi mechanizmusra sokkal gyakrabban található példa az irodalomban [67-69].

Bizonyos esetekben a fehérje natív térszerkezetének kialakulásához nélkülözhetetlen a polipeptid láncok korai asszociációja, mint a foszfofruktokináz, az aszpartát-homoszerin dehidrogenáz, zsírsav szintetáz [70], Ec Trp represszor fehérjéje [67] vagy a  $\beta$ B1 krisztallin [64] esetében. Találhatunk az irodalomban olyan meggyőző kísérleti eredményeket is a korai asszociáció fontosságára, melyek szerint egy eredetileg dimer fehérje két alegységét kovalensen összekötve jelentősen megnövekedett a térszerkezet kialakulás sebessége [71] vagy mesterségesen előállított monomerek önmagukban nem tudták natív térszerkezetüket kialakítani [72].

Akár monomer, akár dimer intermedieren keresztül játszódik le egy folyamat az *egyensúlyi* görbe többlépcsős jellegéből következtetni lehet az intermedier jelenlétére. Általában a monomer intermedierek a fehérje koncentráció csökkenésével halmozódnak fel jelentős mértékben, míg a dimer intermedierek populációi nagyobb fehérje koncentrációnál válnak meghatározóvá [73]. Előfordulhat az is, hogy bizonyos fehérje koncentrációnál kizárólag a natív dimer és a denaturált monomer formák halmozódnak fel, így látszólag egyszerű kétállapotú egyensúlyi átmenetet figyelhetünk meg.

A *kinetikai* görbék több állapotú modell esetén szintén igen összetettek lehetnek az intermedierek számától, természetétől, a folyamat egyes lépéseinek a sebességétől függően. Ha egy fehérjemolekula szerkezetének felbomlása során monomer intermedier képződik és a monomerek összekapcsolódásának sebessége viszonylag nagy az egyes monomerek kitekeredésének sebességéhez viszonyítva, akkor ez például csökkenteni fogja a dimer fehérje denaturációjának sebességét. A térszerkezet kialakulás során, *monomer intermedierek* esetén, ha a polipeptidláncok asszociációja nagyon gyors a további renaturációhoz képest, akkor a fehérje renaturációja egyetlen exponenciális időgörbével, azaz egyetlen elsőrendű folyamattal lesz leírható. Másrésztől, ha az egyes monomerek térszerkezet kialakulása zajlik nagyon gyorsan, akkor csak a másodrendű asszociációs lépés figyelhető meg. Megfelelő körülmények között mind az első-, mind a másodrendű folyamat követhetővé válhat [74, 75]. A másik lehetőség, mikor *dimer*

*intermediären* keresztül történik a fehérje feltekeredése. Itt szintén előfordulhat, hogy látszólag intermediér jelenléte nélkül alakul ki a fehérje térszerkezete és a feltekeredés folyamata egyetlen exponenciális egyenlet segítségével közelíthető. Ilyenkor a polipeptidláncok összekapcsolódása a „folding” igen korai szakaszában, a műszerek mérési tartományának holtidején belül kell, hogy megtörténjen.

#### 2.1.4.2. *A domének szerepe a natív térszerkezet elérésében*

Az oligomer fehérjék térszerkezet kialakulásának kérdéséhez hasonló a több doménből felépülő, ún. multidomén fehérjék térszerkezet kialakulásának kérdése [76]. Az ilyen több doménés fehérjék az élő szervezet fehérjéinek kb. 70-90%-át alkotják. A több doménés fehérjék közös vonása a moduláris szerkezet. Igen valószínű és általánosan elfogadott nézet, hogy a modulok, ill. domének önálló „folding” egységeknek tekinthetők. Az azonban jelenleg még nem eldöntött kérdés, hogy (hasonlóan az oligomer fehérjék alegységeihez) a modulok, azaz a „folding” egységek egymástól függetlenül alakulnak-e ki vagy a fehérje térszerkezet kialakulása inkább követ egy olyan mechanizmust, ahol a fehérje molekula egyes részei egymással szorosan együttműködve, egymásra utalva, párhuzamosan alakulnak ki. Ez utóbbi esetben *szimmetrikus vagy kooperatív* térszerkezet kialakulásról beszélhetünk, azaz a domének szerkezete egymással párhuzamosan, de kooperatívan, egymást elősegítve alakul ki, mint pl. a doktori munkám során vizsgált IPMDH enzim (ld. 5.2.3.2. fejezet) esetén is. A másik szélsőséges eset, amikor a domének szerkezete egymást követően, azaz szekvenciális mechanizmus szerint alakul ki. Ekkor lényegében az egyik domén – éppúgy, mint az oligomer fehérjék egyik alegysége – templátul szolgálhat a másik domén (alegység) natív térszerkezetének kialakulásához [77]. Ilyen *szekvenciális* mechanizmust követ pl. a 3-foszfoglicerát kináznál a két domén térszerkezet kialakulása [78]. Az eddig csak kis számban vizsgált több doménés fehérjék viselkedése alapján azt a tendenciát figyelték meg, hogy a domének térszerkezet kialakulása akkor független egymástól, ha a domének közötti határfelület kicsi és flexibilis [76]. Szorosan pakolt, hidrofób jellegű interdomén régiók esetében a domének térszerkezetének kialakulása egymásra támaszkodva, kooperatív módon zajlik. Azonban vannak kivételek is, mint pl. a spektrin, amelynél a domének határfelülete kicsi, doménjeinek térszerkezet kialakulása mégis nagymértékben kooperatív folyamat [79].

A domének együttműködésének a térszerkezet kialakulásban betöltött szerepére azonban további vizsgálatok szükségesek, különösen az oligomer fehérjék esetén, melyekre vonatkozóan jelenleg még csak igen kevés kísérleti adat áll rendelkezésünkre.

#### *2.1.4.3. Van-e általánosítható különbség a kisméretű egyszerű és a nagyméretű összetett szerkezetű fehérjék térszerkezet kialakulási folyamatában?*

Kisméretű monomer fehérjék feltekeredése sok esetben tipikusan kétállapotú mechanizmust követ [80], míg a nagyobb méretű fehérjéket – főleg melyek több doménből állnak – összetettebb kinetika jellemzi, melyben számos intermedier és párhuzamos „folding” útvonal szerepelhet [81]. A dimer fehérjék hasonló törvényszerűségeket követnek. Azok a több polipeptidláncból álló fehérjék, melyek térszerkezet kialakulása két részfolyamatból álló kinetikával írható le általában kicsik (polipeptidláncként kevesebb, mint 100 aminosavat tartalmaznak) és  $\alpha$ -helikális szerkezetűek, míg az intermediereken keresztül feltekeredők nagyobb méretűek. A kis méret viszont nem feltétlenül biztosítja a kétállapotú mechanizmust. A 37-37 aminosavat tartalmazó cFos-JunW „coiled-coil” szerkezetű fehérje dimer intermediereken keresztül éri el natív térszerkezetét [82], míg a 29-29 aminosavból álló leucin zipzár fehérje, aminosav szekvenciájától függően feltekeredhet intermedier nélkül vagy dimer intermedierrel [83].

Kérdésként merül fel, hogy az összetettebb, több doménből, illetve alegységből álló fehérjék térszerkezet kialakulását elősegíti-e az intermedier(ek) megjelenése. Monomer fehérjéknél megfigyelték, hogy az intermedier keletkezése elősegítheti, gyorsíthatja a polipeptidláncok feltekeredését [84], de vezethet akár aggregációhoz is [85]. A dimer szerkezetű fehérjék közül a DNS-kötő dimer fehérjéknél az intermedier a térszerkezet kialakulás folyamán a kinetikai gát csökkentésével elősegíti a natív szerkezet létrejöttét [86], ezzel ellentétben a bakterális luciferáznál az intermedierek működésképtelen, nem natív szerkezetű molekulákhoz vezetnek [87]. Tehát a dimer fehérjéknél éppúgy, mint monomer szerkezetűeknél az intermedierek hatása más és más lehet, mindig az adott fehérjére jellemző: egyes esetekben elősegíthetik, míg más esetekben akadályozhatják is a natív térszerkezet kialakulását.

Nagyobb fehérjék feltekeredése általában több időt vesz igénybe, mint a kisebb fehérjék natív szerkezetének kialakulása. Ez a szabályszerűség érvényesül mind a monomer, mind a dimer fehérjék térszerkezetének kialakulása folyamán [88]. Az egy és több polipeptidláncból álló fehérjéket összehasonlítva megállapítható, hogy a dimer

szerkezetű fehérjék lassabban tekerednek fel, mint a monomer fehérjék. Azaz kétállapotú térszerkezet kialakulást feltételezve a leggyorsabban (kb. 1 s alatt) feltekeredő dimer fehérje sohasem fog olyan gyorsan feltekeredni, mint egy monomer fehérje. Tehát az asszociációs lépés lassíthatja a dimer fehérjék térszerkezet-kialakulási folyamatát [88].

## **2.2. A fehérjék szerkezeti stabilitásának elméleti és gyakorlati vonatkozásai**

A fehérjék térszerkezet kialakulási mechanizmusa összefüggésbe hozható azok szerkezeti stabilitásával, ugyanis a térszerkezetet kialakító kölcsönhatások természete szabja meg alapvetően a natív szerkezet stabilitását (ld. 2.2.2 fejezet). Különösen érdekes ez a különböző hőmérsékletekre adaptálódott fehérjék összehasonlításakor, hogy vajon ezek térszerkezetét kialakító mechanizmusok mennyiben térnek el egymástól. Ilyen szempontból az energetikai faktorok figyelembe vétele is lényeges lehet (ld. 2.2.3. fejezet). Ezen mechanizmusok pontos megismerése elősegítheti olyan stabilabb térszerkezettel rendelkező fehérjék létrehozását, melyeknek széleskörű alkalmazására nyílik lehetőség az ipar különböző területein. Ilyen mechanizmusok vizsgálatára és összehasonlítására alkalmasnak látszott doktori munkám vizsgálati objektuma is, az IPMDH enzim, mivel három különböző hőmérsékleti tartományra adaptálódott formája állt rendelkezésemre.

### **2.2.1. Hőstabil fehérjék ipari jelentősége**

Az ipar és a tudományos világ egyre nagyobb érdeklődéssel fordul a termofil és hipertermofil enzimek felé. A nagy hőstabilitással rendelkező enzimek használatával számos művelet gyorsabban és egyszerűbben megoldható. Ma már számos gyakorlati alkalmazás [89] látott napvilágot, melyekre az alábbiakban mutatok be néhány példát.

A molekuláris biológiai munkákban termofil enzim alkalmazására kerül sor a PCR technológia során (*Thermus aquaticus* (Taq) polimeráz), a ligáz lánc reakcióban (*Pyrococcus furiosus* (Pfu) DNS ligáz), a DNS és RNS tisztítása alkalmával (*Thermus* Rt41A szerin proteáz), vagy a fehérje szekvenálása előtt a fragmentek eltávolítása érdekében (Pfu proteáz S). További hipertermofil enzimeket használnak a fehérjék C- és N-terminális szekvenálása során (*Sulfolobus solfataricus* karboxipeptidáz, Pfu metionin aminoszintetáz).

Az iparban a keményítő feldolgozás során hidrolízissel glükóz-, maltóz- és oligoszacharid szirupot állítanak elő, majd ezeket fermentációs alapanyagként használják különböző kémiai anyagok termeléséhez (pl. etanol, lizin, citromsav). A keményítő feldolgozás első lépésében már most is hőstabil  $\alpha$ -amilázt alkalmaznak, azonban a további reakciókat katalizáló enzimek a jelenlegi technológia szerint mezofil szervezetekből származnak. Ha azonban hőstabil pullulanáz, izoamiláz,  $\beta$ -amiláz és glükooamiláz használatát vezetnék be, akkor reakciók hőmérsékletének növelésével csökkenhetne az elegy viszkozitása, ezáltal a pumpa működtetésének költsége is. Hőstabil enzimek használata esetén csökkenne továbbá a bakteriális szennyeződés veszélye, a kezelési idő, valamint növelhető lenne a reakció sebessége, így sokkal gazdaságosabbá válna a technológia.

Termofil, hipertermofil enzimek pl. endoglukanázok és cellobiohidrolázok további ipari alkalmazására nyílik lehetőség az etanol előállításánál is. Ilyenkor a keményítő és a cellulóz bomlási termékei szolgálhatnak tápanyagként a gombák számára az etanolos erjesztés során. A papírgyártás során pedig a hipertermofil *Thermotogales* hemicelluláz enzimet használják.

Az édesítőszerként használt dipeptid aszpartám (N-L- $\alpha$ -aszpartil-L-fenilalanin 1-metil észter) előállítása az egyetlen kémiai szintézis az iparban, mely egy hőstabil enzim, a termolizin alkalmazásával történik, de számos más felhasználási lehetőség is kínálkozik. Sok termofil enzim mutat régió és/vagy sztereoselektív reakciómechanizmust (Pfu  $\beta$ -glükozidáz, *Sulfolobus solfataricus* citokróm P450), mely a szintetikus kémiában igen fontos szerepet tölt be.

A pektinolitikus enzimeket is széles körben használják az élelmiszeriparban gyümölcslé nyeresre, viszkozitás csökkentésre és a színyanyagok kinyerésére a gyümölcsök héjából. Ezen enzimeknek szintén termofil formái alkalmasabbak az ipari felhasználásra.

A takarmányok kezelése is előnyös a termofil arabinofuranozidáz és fitáz enzimet használni. A kezeléssel növelhető azok emészthetősége és tápértéke. Az enzimek működését biztosító magas hőmérséklet ugyanakkor a virális és mikrobakteriális szennyeződések is inaktíválni képes. Tehát a hőstabil enzimek használatának előnye, hogy mindkét folyamat végbemenetelét egy lépésben biztosítja.

## 2.2.2. A fehérjék stabilitását meghatározó szerkezeti tényezők

A hőstabil enzimek számos alkalmazási lehetősége kapcsán felmerül a kérdés, hogy mitől válik egy fehérje szerkezete stabilabbá, milyen *szerkezeti, ill. energetikai* faktorok tehetők felelőssé a hőstabilitás kialakulásáért. Az 2. táblázatban láthatóak összefoglalva a megnövekedett hőstabilitásért felelőssé tehető szerkezeti tényezők.

2. táblázat A fehérjemolekulák stabilitását meghatározó szerkezeti tényezők

AMINOSAV PREFERENCIA	KÖLCSÖNHATÁSOK SZÁMA	TOVÁBBI STABILIZÁLÓ TÉNYEZŐK
Lys → Arg csere	Elektrosztatikus kölcsönhatások	Oligomerizáció
Gly → Ala csere	H-híd kialakítása	Kompaktság
Magasabb Pro tartalom	Hidrofób kölcsönhatások	Rövidebb hurkok
Magasabb aromás aminosav tartalom	Diszulfid hidak	$\alpha$ -hélixek C és N terminális végeinek stabilizálása
Kevesebb Asn, Gln, Cys, Met, Ser		Fehérjeláncok C és N terminális végeinek rögzítése

Egy fehérje nagyobb stabilitásáért számos szerkezeti tényező tehető felelőssé. A termofil, hipertermofil fehérjék felszínén gyakran *Lys* (pK=10,5) helyett az *Arg* (pK=12,5) gyakoribb előfordulását [90] figyelték meg, ami annak köszönhető, hogy az *Arg* magasabb savi disszociációs állandó értékének megfelelően kevésbé reaktív és a  $\delta$ -guanido csoportja révén nagyobb lehetősége van ionos, poláros kölcsönhatás kialakítására.

Fehérjék esetében a magasabb hőmérséklet gyakran jár *dezaminációval*, melynek során az Asn és Gln aminosavakból Asp és Glu (azaz töltés nélküliből negatív töltésű oldallánc) keletkezik. Ez nagymértékben megváltoztathatja a harmadlagos vagy negyedleges szerkezet kölcsönhatásait, ezáltal a fehérjék akár el is veszíthetik funkcionális tulajdonságaikat. Csökkent „chaperon” aktivitást és fokozott aggregációt figyeltek meg pl. a szemlencsét alkotó krisztallinok esetében, melyek dezaminációja hozzájárul a szemlencse öregedéséhez [91]. Ezeknek a folyamatoknak az ellensúlyozására különböző stratégiákat találhatunk a fehérjék világában [89]. A hipertermofil enzimek több esetben kevesebb Asn-t tartalmaznak, mint mezofil társaik. A *Pyrococcus woisei* baktériumból származó 3-foszfoglucirát kináz kevesebb Asn-nal rendelkezik, mint a mezofil *Methanobacterium bryantii* homológ fehérjéje [92]. Más hipertermofil enzimekben ugyanannyi Asn található, mint a mezofil szervezetekből



származó megfelelő fehérjékben, de ezek az érzékeny aminosavak olyan helyzetben és konformációban vannak, mely nem teszi lehetővé a dezaminációt.

A *ciszteinil aminosavmaradék* magasabb hőmérsékleteken igen érzékeny az oxidációra, így előfordulása termofil, hipertermofil enzimekben kevésbé várható [93]. A mégis előforduló Cys aminosavak gyakran specifikus stabilizáló kölcsönhatásokban vesznek részt, például diszulfid hidakat alakítanak ki vagy fém kötésében van szerepük.

A hőstabilitás kialakulásában fontos szerepe lehet a *hidrofób kölcsönhatásoknak* is, a különböző oldalláncok, ill. az egész fehérjemolekula kompaktságának. Egy fehérjében minél több hidrofób kölcsönhatás alakul ki, annál stabilabb térszerkezet jön létre. A szerin hidroximetil-transzferáz enzim esetében megfigyelték például, hogy a fehérje mag hidrofóbicitásának növekedése hozzájárul a termofil enzimforma kialakulásához [94]. Mivel hosszú alifás oldallánccal vagy kiterjedt gyűrűvel rendelkező aromás aminosavak több hidrofób kölcsönhatás kialakítására képesek, ezért ezek általában kedvezően hatnak a fehérjék stabilitására. Például míg a termofil *Thermoactinomyces vulgaris* terminázban 16 aromás aminosav alkot párt, addig a homológ mezofil *Bacillus amyloliquefaciens* szubtilizin csak 6 aromás aminosav párt tartalmaz [95]. Azt sem lehet azonban figyelmen kívül hagyni, hogy ezek az oldalláncok mennyire töltik ki a rendelkezésükre álló üreget. Ha a fehérje térszerkezetében egy nagyobb, több kölcsönhatás kialakítására képes hidrofób aminosav is elfér, a kölcsönhatások számának növekedése miatt nagyobb stabilitást eredményez. Mutációs kísérletek alapján, ahol egy nagyobb aminosavat kisebb alifás aminosavval helyettesítettek, megállapították, hogy egy metil csoport hiánya átlagosan  $5,4 \pm 2,1$  kJ/mól energiával csökkentette a stabilitást [96]. Viszont azoknál a mutációknál, melyeknél egy üreg betöltése történik, gyakran nem következik be a várt stabilizáló hatás, mivel az esetlegesen kialakuló kedvezőtlen Van der Waals kölcsönhatások helyi átrendeződést követelnek meg.

A *hidrogénhid kötések* stabilitáshoz való hozzájárulásának a T1 ribonukleázon végzett vizsgálata alapján az derült ki, hogy azok a hidrofób kölcsönhatásokhoz hasonlóan kötéseként  $5,4$  kJ/mól energiával járulnak hozzá a stabilizációhoz [97].

Az *elektrosztatikus kölcsönhatások* jelentős stabilizáló tényezők a fehérjékben. A T4 lizozim esetén egy ionpár  $12-21$  kJ/mól energiával stabilizálja a fehérjét [98]. A *Pyrococcus furiosus* és a *Clostridium symbiosum* glutamát dehidrogenáz enzim szerkezete leginkább különböző ionpár tartalmukban mutatkozik meg. Míg a hipertermofil enzimben  $0,11$  ionpár jut egy aminosavra, addig a mezofil enzimben csak  $0,06$  [89]. Az ionpárok gyakran hálózatot alkotnak a fehérje felszínén és az alegységek

között. A Pfu glutamát dehidrogenáza 18 ionpárból álló hálózatot alakít ki. Egy ionpár hálózat kiépítése energetikailag sokkal kedvezőbb, mivel egy újabb aminosavnak a hálózathoz való kapcsolódása esetén csupán annak az egy aminosavnak a deszolvatációs energiáját kell legyőzni [99]. Az eltemetett ionpárok stabilizáló szerepe vitatott a felszíni ionpárokkal szemben, mivel jóval nagyobb szolvatációs energiát ( $54 \pm 23$  kJ/mól) kell kompenzálnia a kialakuló ionos kölcsönhatásnak. A különböző tanulmányok alapján mégis valószínű, hogy a sóhidak a fehérje bármely részén képesek a fehérje stabilitásának növelésére [100]. Az egyik általam vizsgált enzim, a Tt IPMDH különleges hőstabilitásában is a töltött oldalláncok közötti ionos kölcsönhatásoknak tulajdonítanak fontos szerepet [101].

A háromdimenziós szerkezettel rendelkező fehérjék esetén a kompakt fehérjeszerkezet kialakulását kísérő dehidratációval járó entrópiánövekedés növelheti a stabilitást. Denaturált állapotban a Gly rendelkezik a legnagyobb konformációs entrópiával az aminosavak közül, míg a Pro csak néhány konformációs állapotot képes felvenni. Tehát a nagy konformációs entrópiával rendelkező aminosavak számának csökkentésével és a *Pro tartalom növelésével* stabilabb fehérjék állíthatóak elő, amennyiben a mutáció hatására kedvezőtlen szerkezetváltozások nem következnek be. Stabilitás növekedésére láthatunk példát a *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* xilóz izomeráza esetén, amennyiben nagyobb konformációs entrópiájú aminosav-maradékok Pro-ra való helyettesítése történik [102]. A Gly helyett termofil fehérjékben pedig gyakran fordul elő az Ala. A *Gly-Ala csere* magyarázható az Ala jó hélix-képző képességével [103], így a másodlagos szerkezeti elemek stabilitásával, míg a Gly ezt a szerkezetet megtöri.

Neet and Timm [104] kimutatták, hogy a negyedleges szerkezet fenntartásában szerepet játszó kölcsönhatások 25-100%-ban játszanak szerepet a fehérje konformációs stabilitásában mezofil, dimer enzimek esetén. Ezek alapján az *oligomerizáció* jelentős stabilizáló mechanizmus lehet a hipertermofil enzimek esetén, habár egyetlen kölcsönhatás típus sem tehető egyedül felelőssé az alegységfelszín stabilizációjáért.

A fehérjék stabilitása a *hélixek* részleges negatív töltéssel rendelkező *C-terminális* vége közelében elhelyezkedő pozitív aminosav-oldalláncokkal, ill. a hélixek részlegesen pozitív töltésű *N-terminálisai* közelében lévő negatív töltésű oldalláncokkal is növelhető. Nicholson és mti. kimutatták, hogy a hélix N terminálisának stabilizálása  $3,3$  kJ/mól energiával is képes egy fehérje stabilitását növelni [105].

További szerkezetstabilizáló hatása lehet a fehérjékben előforduló hurkok, valamint *C-* és *N-terminális végek rögzítésének*. A termofil enzimekre gyakran jellemzőek a *rövidebb hurkok*, ami megfigyelhető a Tt IPMDH esetén is [106].

Összefoglalva tehát, a termofil enzimek nagyobb stabilitásához a szekvenciális és szerkezeti faktorok, mint a hidrofób mag tömörsége, az oligomerizáció, inzerció-deláció, prolin helyettesítés, hidrogénhid és sókötések kialakulása mind-mind hozzájárulnak. Ezen szerkezetstabilizáló tényezők együttesen hozzák létre a stabilabb szerkezetet [100]. Az egyes faktorok viszont különböző mértékben tehető felelőssé a hőstabilitás kialakulásáért, vagyis a stabilizáló stratégiák fehérjénként különbözőek, mint ezt a különböző hőstabilitású D-glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenázok szerkezeti összehasonlításakor is kimutatták [107].

### **2.2.3. A szerkezeti stabilitás energetikai megközelítése**

A fehérjeszerkezet stabilitását meghatározó kémiai kötések természetén kívül fontos megismernünk azokat az energetikai faktorokat is, melyekkel a stabilitás jellemezhető. A szerkezeti információk mellett a termodinamikai (energetikai) megközelítés is alapvetően szükséges ahhoz, hogy a fehérjemolekulák különleges viselkedését az adott környezeti feltételek között megértsük.

Természetesen az előző fejezetben tárgyalt különböző másodlagos kémiai kötések (H-hidak, sókötések, apoláros kölcsönhatások) mindegyike jellemezhető egy sajátos kötési energiával, melyből a natív fehérje szerkezeti stabilitása származtatható. Az egyes kötések jellemző energiaérték ugyan kicsi, de a kötések nagy száma következtében a natív fehérjét stabilizáló energia értékének igen nagyoknak kellene lennie (néhány ezer kJ/mól). A valóságban azonban a natív fehérje stabilitása alig haladja meg a denaturált fehérje stabilitását. Ennek magyarázata szintén a szerkezetben keresendő, mégpedig abban, hogy a denaturált polipeptidláncot az oldószer vízmolekuláival való kölcsönhatások stabilizálják, továbbá, a denaturált fehérjék általában nem teljesen szerkezet nélküliek, előfordulhatnak bennük natívszerű szerkezeti elemek. A denaturált fehérjék oldószernek kitett hidrofób oldalláncai köré rendezett vízmolekulák akár a natív szerkezettel összehasonlítható stabilitást eredményezhetnek. Ebből eredően a denaturációt kísérő szabadentalpia változás ( $\Delta G_{N \rightarrow D}$ ) – az az energia, melyet ahhoz szükséges befektetni, hogy a natív szerkezetű molekula kitekeredett állapotba kerüljön – csupán 20-60 kJ/mól tartományba esik. Ez a viszonylag kis érték lényegében a

stabilizáló és destabilizáló kölcsönhatások között fennálló finom egyensúlyra utal, amely minden bizonnyal a biológiai működés (allosztérikus konformáció változások) szempontjából is lényeges [108].

A teljes termodinamikai jellemzéshez figyelembe kell vennünk a  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$  ismert összefüggést, azaz, hogy a szabadentalpiát hogyan határozza meg a denaturációs entalpia és entrópia. A denaturált polipeptidlánc igen mozgékony, jelentős konformációs szabadsággal rendelkezik. Tehát a denaturációs állapot magas entrópiával jellemezhető, melyet a Boltzmann formulából kaphatunk meg ( $S = k \ln W$ , ahol  $W$  a lehetséges állapotok száma,  $k$  pedig a Boltzmann állandó). Ezzel szemben a natív állapot kevesebb konformációval bír, vagyis entrópiája alacsony. Mindezekből az következik, hogy a polipeptidlánc(ok) feltekeredése jelentős entrópia veszteséggel jár, melyet a natív térszerkezet kialakulása során az entalpia változása ellensúlyoz. Az entalpia a kémiai kötések kialakulásában fejeződik ki. Tehát a fehérje térszerkezet kialakulásakor a klasszikus termodinamika szerint mind az entalpia, mind az entrópia nagy negatív érték, így a natív és denaturált állapot közötti energia különbség minimális lesz:  $\Delta G_{D \rightarrow N} = -\Delta H_{D \rightarrow N} - T(-\Delta S_{D \rightarrow N})$ . Ez az ún. entalpia-entrópia kompenzáció jelensége, amely általános törvényszerűségnek látszik biológiai rendszerekben, mint pl. fehérjék vizes oldataiban, ahol gyenge intermolekuláris kölcsönhatások működnek [109]. A natív szerkezet kialakulását kísérő entalpia és entrópia változások nagy negatív értékeihez viszont nem csak önmagában a polipeptidlánc járul hozzá, hanem jelentős szerepet kapnak az oldószer vízmolekulái is. Natív állapotban a fehérje hidrofób oldalláncai el vannak temetve a molekula belsejében, míg denaturált fehérjében ezek az oldalláncok a felszínen helyezkednek el és hozzáférhetőek a vízmolekulák számára. Ezek a vízmolekulák körbeveszik a hidrofób oldalláncokat és egymás között erős H-híd kötés hálózatot alakítanak ki. A fehérje térszerkezetének kialakulásakor a kötött vízmolekulák felszabadulnak, ezáltal entrópiájuk megnövekszik, mely részben kompenzálja a polipeptidlánc konformációs szabadságának csökkenését.

A fentiek alapján a termodinamikai stabilitás leírható a szabadentalpia változással ( $\Delta G_{N \rightarrow D} = -RT \ln K$ ), mely a denaturációs folyamat egyensúlyi állandójával ( $K$ ) függ össze. Az egyensúlyi állandó a 2.1.3. fejezetben leírt módszerek segítségével kísérletesen meghatározható és ez, valamint a  $\Delta G_{N \rightarrow D}$  számszerűen jellemzi az adott fehérje stabilitását.

A polipeptidlánc(ok) feltekeredését jellemző  $\Delta G_{N \rightarrow D}$  értékét mindaddig leginkább monomer fehérjék esetében tanulmányozták, igen kevés adat található dimer, több polipeptidláncból álló fehérjékre. Ezekben az esetekben a szabadentalpia-változás értékét óvatosan kell kezelni, ugyanis közvetlenül nem hasonlítható össze a monomer és dimer fehérjék esetében, hiszen a dimer fehérjéknél molekulaszám változás lép fel [110]. Az összehasonlításra az adhat lehetőséget, ha a  $\Delta G_{N \rightarrow D}$  értékét mindig ugyanazon oligomer forma koncentrációban kifejezett denaturált fehérje frakció arányára számítjuk ki (3. táblázat). Az eddig rendelkezésünkre álló adatokat tekintve, azon dimer fehérjék esetén, melyeknek térszerkezet kialakulása két- vagy háromállapotú modellel leírható, a  $\Delta G_{N \rightarrow D}$  értéke növekvő tendenciát mutat a fehérje méretével [57].

**3. táblázat A dimer fehérjék két-, ill. háromállapotú mechanizmus szerint végbemenő denaturációját leíró egyenletek** N<sub>2</sub> a natív dimert, D a denaturált monomert, I a monomer intermediert, I<sub>2</sub> pedig a dimer intermediert jelöli. Az egyensúlyi állandó (K) kétállapotú modell esetén felírható a „folding” (k<sub>f</sub>) és „unfolding” (k<sub>d</sub>) sebességi állandójának hányadosaként, háromállapotú modell esetén nincs ilyen egyszerű összefüggés. C a teljes fehérje koncentráció dimer enzime vonatkoztatva.  $\Delta G^0$  a szabadentalpia változás 0 M denaturálószerre extrapolált értéke, m egy arányossági tényező, X a denaturálószer, R a gázállandó, T pedig az abszolút hőmérséklet.

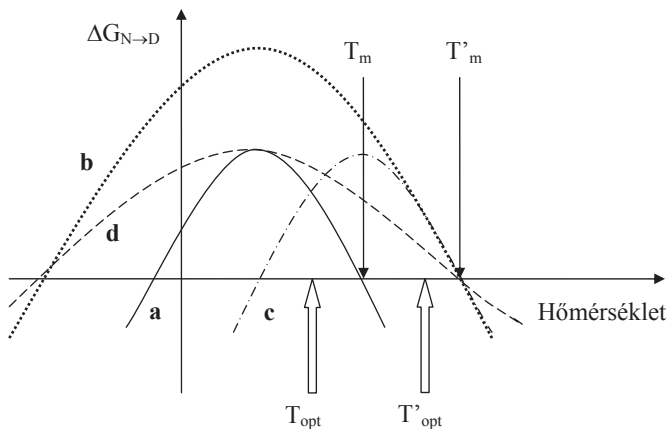
KÉTÁLLAPOTÚ MODELL	HÁROMÁLLAPOTÚ MODELL	
NINCS INTERMEDIER	MONOMER INTERMEDIER	DIMER INTERMEDIER
<b>Mechanizmus</b> $N_2 \rightleftharpoons 2D$	$N_2 \rightleftharpoons 2I \rightleftharpoons 2D$	$N_2 \rightleftharpoons I_2 \rightleftharpoons 2D$
<b>Egyensúlyi állandók</b> $K = [D]^2/[N_2]$ $K = k_f / k_d$	$K_1 = [I]^2/[N_2]$ $K_2 = [D]/[I]$	$K_1 = [I_2]/[N_2]$ $K_2 = [D]^2/[I_2]$
<b>Teljes fehérje koncentráció</b> $[N_2] + [D] / 2 = C$	$[N_2] + [I] / 2 + [D] / 2 = C$	$[N_2] + [I_2] + [D] / 2 = C$
<b>Szabadentalpia változás</b> $\Delta G = \Delta G^0 - m[X] = -RT \ln K$	$\Delta G_1 = -RT \ln K_1$ $\Delta G_2 = -RT \ln K_2$	$\Delta G_1 = -RT \ln K_1$ $\Delta G_2 = -RT \ln K_2$
<b>Moláris koncentrációk aránya</b> $f_N = [N_2]/C$ , $f_D = [D]/2C$	$f_I = [I]/2C$	$f_{I_2} = [I_2]/C$
<b>K és <math>\Delta G^0</math> a teljes folyamatra</b> $K, \Delta G^0$	$K = K_1 K_2^2$ , $\Delta G^0 = \Delta G^0_1 + 2\Delta G^0_2$	$K = K_1 K_2$ , $\Delta G^0 = \Delta G^0_1 + \Delta G^0_2$

Az entrópia és entalpia változására vonatkozó adatokat az oligomer fehérjék térszerkezet kialakulása során, különös figyelemmel a láncok asszociációjára Gloss és Matthews összegezte [111]. A polipeptidláncok összekapcsolódása során egy

kedvezőtlen entrópia csökkenés tapasztalható a szabadsági fokok csökkenése miatt, másrészt az összekapcsolódó felület deszolvatációja kedvező entrópia változást jelent. Az entalpia változása pedig egy kedvezőtlen, víz kötődéséből adódó tagból, valamint egy kedvező vagy kedvezőtlen részből áll össze, mely a monomeren belüli és monomerek között lévő kötések kialakulásával és megszűnésével van összefüggésben. A kísérleti adatok alapján elmondható, hogy dimer átmeneti állapotban az alegységfelszínnek részben már deszolvatálódnak és ezt még csak néhány gyenge kölcsönhatás ellensúlyozza.

A fehérjék stabilitását jellemző  $\Delta G_{N \rightarrow D}$  érték természetesen jellemzi a különböző hőmérsékletekre adaptálódott fehérjék eltérő szerkezeti stabilitását is. Ezek a fehérjék sok esetben homológ szerkezetűek és katalitikus mechanizmusuk is sokszor igen hasonló, mégis eltérő hőstabilitással rendelkezhetnek [112]. Ilyen fehérje pl. az általam tanulmányozott IPMDH enzim is [113].

Termofil, hipertermofil enzimek megnövekedett hőstabilitásának magyarázatára különböző termodinamikai modellek [114, 115] születtek (4. ábra).



**4. ábra** A hőstabilitás kialakulásának termodinamikai modelljei A  $\Delta G_{N \rightarrow D}$  elméleti görbe mezofil (a) és termofil (b-d) enzimek esetén.  $T_m$  és  $T'_m$  a mezofil és termofil fehérjék olvadási hőmérséklete. A parabola maximum értékéhez, azaz a fehérje maximális stabilitásához tartozó hőmérséklet jóval a mezofil és termofil szerkezet optimális növekedési hőmérséklete ( $T_{opt}$  és  $T'_{opt}$ ) alatt figyelhető meg.

A mezofil (a) enzimekéhez képest kiszélesedhet a hőmérséklettartomány, ahol az enzim stabil szerkezettel rendelkezik, azaz termofil enzim esetében minden egyes hőmérséklethez nagyobb  $\Delta G_{N \rightarrow D}$  érték tartozik, mint mezofil homológjánál (b). Az is

előfordulhat, hogy a szabadentalpia görbe alakja nem változik, de magasabb hőmérsékleti tartományba tolódik (c). Ennél a modellnél a  $\Delta G_{N \rightarrow D}$  érték azonos a különböző hőstabilitású enzimeknél, de a maximális stabilitás különböző hőmérsékletnél valósul meg. Tehát, magasabb hőmérsékleten a hőstabil enzim rendelkezik stabilabb szerkezettel, míg alacsonyabb hőmérsékleten a mezofil szervezetből származó fehérje a stabilabb. Lehetséges az is, hogy  $\Delta G_{N \rightarrow D}$  maximális értéke nem változik, sőt a stabilitási maximum is ugyanannál a hőmérsékletnél található az eltérő hőstabilitású enzimek esetén (d), de a hőstabil fehérjére jellemző szabadentalpia változás kevésbé függ a hőmérséklettől, amit a görbe kiszélesedése mutat (4. ábra). A modellek, ill. ezek kombinációjának érvényességét az irodalomban található példák támasztják alá [116, 117].

Kérdésként merül fel, hogy a hőstabilitásbeli különbségek hogyan mutatkoznak meg egy fehérje térszerkezet kialakulásának és felbomlásának sebességében, különösen több polipeptidláncból álló fehérjék esetén, vagy ha a natív szerkezet kialakulása intermedieren keresztül történik.

#### **2.2.4. A szerkezeti stabilitás kinetikai megközelítése**

A stabilitás nemcsak egyensúlyi, hanem kinetikai szempontból is megközelíthető, amely az átmeneti állapot természetéről is felvilágosítást adhat [40]. Már monomer fehérjék esetén is igen változatosnak bizonyult az átmeneti állapot [118, 119]. Dimer fehérjék kétállapotú modell szerinti feltekeredésénél, definíció szerint a két polipeptidlánc már az átmeneti állapotban összekapcsolódik, azaz dimer alakul ki, de a láncok közötti kapcsolat erőssége igen változó [120]. Amennyiben a dimer fehérje natív szerkezete több lépésben alakul ki, az átmeneti állapot monomer vagy dimer szerkezetű is lehet. Mivel az átmeneti állapot soha nincs jelen nagy koncentrációban, jellemzése csak közvetett módszerekkel lehetséges. Ilyen módszerek pl. a Tanford-féle  $\beta$ -érték [121], ill. a Fersht-féle  $\Phi$ -érték [40] analízis. A  $\beta$ -érték lényegében az átmeneti állapot helyét fejezi ki a reakciókoordináta mentén, vagyis az egyensúlyi mérésekből meghatározott m-érték (oldószerrel való függést fejezi ki) és az átmeneti állapot m-értékének arányát. A  $\Phi$ -érték meghatározásához valamely mutáns enzim denaturációjának aktiválási szabadentalpia változását viszonyítják a vad típuséhoz képest, ebből a változásból tudnak következtetést levonni az átmeneti állapot szerkezetére. Ezen adatok alapján, habár dimer enzimekről elég kevés információ áll

rendelkezésünkre, kétállapotú modell esetén elmondható, hogy az átmeneti állapot inkább a natív szerkezethez hasonlít. Megjegyzendő, hogy hasonló eredményeket kaptak monomer kétállapotú fehérjékre is [80]. A néhány vizsgált dimer fehérje között szerepel a GCN4-p1 és az P22 Arc represszor fehérje. Mindkettőre a  $\beta$ -érték igen magasnak adódott, jelezve, hogy a felszíni oldalláncok 60-70%-a már eltemetődött. Ezzel szemben a  $\Phi$ -érték igen közel állt a nullához, vagyis a mutációval vizsgált specifikus oldallánc kölcsönhatások a monomereken belül és azok között még nem alakultak ki az átmeneti állapotban [58]. Ez csak egy látszólagos ellentmondás, itt egy natívszerű átmeneti állapotot kell elképzelni, melyben a fehérje hidrofób magja még laza szerkezetű (ld. korábban a „molten globula” jellemzőit).

A fehérjék termodinamikai stabilitása mellett fontos jellemző a kinetikai stabilitás is, melyet a denaturáció ill. renaturáció aktiválási szabadentalpiája szab meg. Ennek ismerete olyan információt szolgáltathat a stabilitásról, melyet egyensúlyi vizsgálatokkal vagy szekvencia összehasonlítással, de statikus szerkezeti analízissel sem szerezhetünk meg. Reverzibilis, kétállapotú átmenet esetén az egyensúlyi állandó felírható a „folding” és „unfolding” sebességi állandójának hányadosaként ( $K = k_f/k_d$ ). Ennek alapján a stabilitásnövekedés elérhető mind a térszerkezet kialakulás sebességének növelésével, mind a fehérje letekeredés sebességének csökkentésével, vagy akár mindkettővel. Összetettebb folyamatok esetén, ahol már az intermediér állapot is megjelenik az összes sebességi állandó kombinációja határozza meg a stabilitást. Az ilyen jellegű analízis gyakran nehézségekbe ütközik akkor, ha a denaturáció „*in vitro*” vizsgált folyamata nem reverzibilis.

A térszerkezet kialakulás sebesség fehérjeszerkezeti faktortól való függésének vizsgálatára számos tanulmány született. A fehérjék natív topológiájának, szerkezetének összetettségét az ún. kontaktusrend jellemzi (ld. Anyagok és Módszerek 4.2.9. fejezet), melynek értéke annál nagyobb, minél több olyan oldallánc között alakul ki kölcsönhatás, amelyek az elsődleges szerkezetben (szekvenciában) egymástól távol helyezkednek el. Számos esetben fordított irányú összefüggést állapítottak meg a fehérje kontaktusrendje és a renaturáció sebessége között [122-124]. A fehérje térszerkezet kialakulása során háromállapotú mechanizmust követő fehérjék esetén viszont azt találták, hogy lánchosszal van fordított arányban a renaturáció sebessége [88]. Ugyanakkor más vizsgálatok szerint egyenes arányú összefüggés van a kontaktusrend és a hőstabilitás között [125]. Ez utóbbi megállapítás látszólag ésszerű is, hiszen az összetettebb, távolabbi aminosavmaradékok között is kontaktusokkal



rendelkező fehérjeszerkezet feltehetően nagyobb stabilitással is bír. Ha azonban a kontaktusrend és a térszerkezet kialakulás sebessége közötti fordított arányosságot tekintjük, akkor a fentiek értelmében nagyobb stabilitás esetén nagyobb sebességet várnánk. A kísérleti adatok viszont nem mutatnak egyértelmű összefüggést a renaturáció sebessége és a stabilitás között [126, 127]. Dinner és Karplus egy elméleti áttekintő munkában [123] – melyben 33 vizsgált fehérjét hasonlítottak össze – rámutattak, hogy nem egyszerű arányosság, hanem komplex összefüggés áll fent a szerkezeti stabilitás, a renaturáció sebessége és a kontaktusrend között. Nyilvánvalóan ahhoz, hogy ebben kérdésben tisztábban láthassunk még több egyedi fehérje esetén szükséges az összefüggések megállapítása.

### **2.3. Az IPMDH, mint a szerkezeti stabilitás vizsgálatának modellje**

A különböző környezeti hőmérsékletekhez alkalmazkodott szervezetek fehérjeinek (enzimeinek) energetikai és szerkezeti vizsgálatára több kutatócsoport érdeklődésének középpontjában áll, mint modell enzim, a 3-izopropilmalát dehidrogenáz (IPMDH) [113, 128, 129]. Értekezésemben az IPMDH hőstabilitásának energetikai és szerkezeti alapjait vizsgáltam a termofil *Thermus thermophilus* (Tt), a mezofil *Escherichia coli* (Ec) és a sarkvidéki vizekben élő *Vibrio* sp. 15 (Vib) organizmusokból származó enzimekkel.

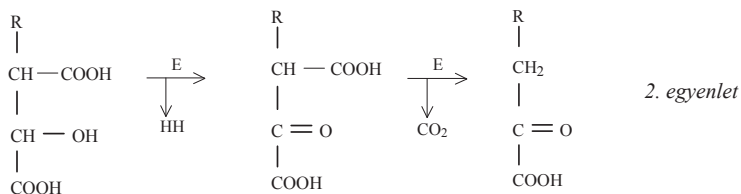
#### **2.3.1. Az IPMDH szerepe az élő szervezetben**

Az IPMDH az aminosav bioszintézis egyik fontos enzime, a leucin szintézisének harmadik lépését katalizálja.  $\text{NAD}^+$  és kétértékű fémionok ( $\text{Mn}^{2+}$  vagy  $\text{Mg}^{2+}$ ) jelenlétében egyidejűleg oxidálja és dekarboxilezi a 3-izopropil maleinsavat (IPM):



Az enzim abban különbözik az egyszerű dehidrogenázoktól, hogy a dehidrogénezésen kívül dekarboxilezést is végez. Ugyanebbe az enzimosztályba tartozik még az izocitrát dehidrogenáz (ICDH) és a tartarát dehidrogenáz is. Ezen enzimek mindegyike valamely (2R, 3S)-2-hidroxi-sav második szénatomját oxidálja, miközben a harmadik szénatomról egy karboxil-csoport távozik. Mindez azért nagyon érdekes, mert attól eltekintve, hogy az IPMDH-nak és az ICDH-nak más a szubsztrát és kofaktor-specifitása, a katalitikus mechanizmusuk megegyezik, éppen úgy, ahogy a „folding topológiájuk”, azaz a másodlagos szerkezeti elemek sorrendje is [130].

Párhuzam vonható azon anyagcsere folyamatok kémiai lépései között is, melyben ezen enzimek részt vesznek (4. táblázat). Lényegében egy C1-es lánchosszabbítási folyamatról van szó, mind a bakteriális leucin bioszintézis során, mind pl. a trikarbonsav ciklus egy részében vagy pedig az egyes gombákban működő  $\alpha$ -adipinsav (AAA) útvonal elején, amely a lizin szintézisét szolgálja. E folyamatokban a kiindulási vegyülethez egy acetyl-csoport kapcsolódik, majd egy izomerizációs lépés során kialakul a 2-hidroxi-dikarbonsav, melyek további átalakulását a már előbb említett enzimek katalizálják, az adott reakciótól függően. Így végül, bár a kiindulási vegyületünk kezdetben két szénatommal gyarapodott, a dekarboxilező lépésnek köszönhetően csupán egy szénatommal hosszabb vegyülethez jutunk a folyamat végére. Általánosságban az alábbi egyenlettel írható le a különböző fémion-függő, dekarboxilezést is végző dehidrogenázok működése:



Az egyenletben szereplő R csoport kémiai természetét a már említett dehidrogenázok esetén az alábbi táblázat foglalja össze:

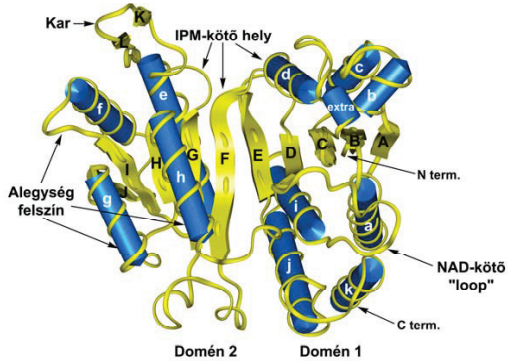
4. táblázat Dekarboxilezést végző dehidrogenázok, szubsztrátjaik és szerepük az élő szervezetben

R	Enzim (E)	Enzim besorolása	Biokémiai folyamat
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{CH} - \text{CH}_3 \\   \end{array}$	IPMDH	EC. 1.1.1.85	Leucin bioszintézis
$\begin{array}{c} \text{COOH} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \end{array}$	ICDH	EC. 1.1.1.42	Szentgyörgyi-Krebs ciklus
$\begin{array}{c} \text{COOH} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{CH}_2 \\   \end{array}$	Homo-ICDH	EC. 1.1.1.87	Lizin bioszintézis (AAA útvonal)
$\begin{array}{c} \text{OH} \\   \end{array}$	Tartarát dehidrogenáz	EC. 1.1.1.93	Glioxalát és dikarboxilát metabolizmus

### 2.3.2. Az IPMDH szerkezeti felépítése

Az IPMDH két azonos alegységből (alegységenként ~37 kD) felépülő enzim, melynek mindkét polipeptidlánca két doménből épül fel. A domének másodlagos szerkezetei alapján az  $\alpha/\beta$  osztályba sorolhatók, tehát a hélixek és a lemezek egymással kölcsönhatásban vannak és váltakozva fordulnak elő a polipeptidlánc mentén (5. ábra).

A



B

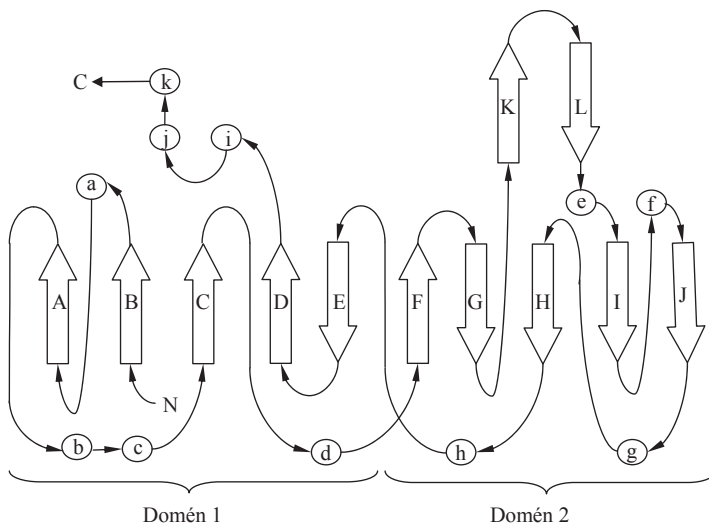
		$\beta\beta$	$\alpha a$	$\beta\lambda$	$\alpha b$	$\alpha c$	$\beta c$		
Tt	1	MKVAVL	FGDGGFPEVT	EAALKVLRAL	DEAEGGLAY	EVFFPGGAAI	DAFGPFPEP	TRKGVFEARA	66
Tf	1	MKKIALF	AGDGGFIEIV	AAARQVLDAV	DQAHLGLRC	TEGLVGGAAI	DASDDIIPA	SIQLAMAADA	67
Ec	1	MSKNYHIAVL	FGDGGFPEVM	TQALKVLDVA	RNRFAIRIT	SHYDVGGAAL	DNHGQLPPA	TVESCEQADA	70
Vib	1	MSNQLLL	FGDGGFPEIM	AEAVKVLNLA	NEKYSLGPEL	SFDDLGGAAI	DRVGVPLADE	TLARAKAADA	68
			** * *			*			
		$\beta c$	extra	$\alpha d$	$\beta f$	$\alpha e$	$\beta g$		
Tt	67	VILGSGGPK	WDGLPRKIS	ETG-LLSLRK	SQDLFANLRP	AKVFPGLERL	SPLKEELIAR	-VDVILVREL	134
Tf	68	VILGAVGPR	WDAYPPAKRP	EQG-LRLRLK	GLDLYANLRP	AGIFFQLLDA	SPLRPELVLD	-VDVILVREL	135
Ec	71	VILGSGGPK	WEHLPPQDP	ERGALLPRK	HFKFSNLRP	AKLYGGLFAF	CPLRADIAR	GFILLCVREL	140
Vib	69	ILLGAVGPK	WDAIDPAIRP	ERG-LLKIRS	QLGLFGNLRP	AILYPQLADA	SSLKREIVAG	-LDVILVREL	136
			** * *	** * *	** * *	** * *	** * *	** * *	
		$\beta k$	$\beta l$	$\alpha e$	$\beta i$	$\alpha f$			
Tt	135	TGGIYFGER	-GMS-E--A	RAMVTERSK	FEVFERVARA	FSAARKRRHK	VVSVKAVNL	EVGEFWRKTV	199
Tf	136	TGDIYFQPR	-GLEVIDGKR	RGENTMYDE	DEIRILARVA	FRAAQGRBK	LCSVDKANVL	ETTRLEWRVIV	204
Ec	141	TGGIYFQPK	-GREGSGQYE	KAFDTEVYHR	FEIRIARIA	FESAKRRHK	VCSIDKANVL	QSSILWRVIV	209
Vib	137	TGGIYFQPR	ESKVLSEGER	MAVDTLYSE	SEIRIARVGV	FDMARVGRK	LCSVDKANVL	ASSQIWRVIV	206
			** * *	** * *	** * *	** * *	** * *	** * *	
		$\alpha f$	$\beta j$	$\alpha g$	$\beta h$	$\alpha h$	$\beta e$	$\beta d$	
Tt	200	ERVVGRYPDV	ALEHGYDAA	AHMLVRS PAR	FDVVVTGNIF	GDILSDIASV	LPGSIGLPLS	ASLG-RGTFV	268
Tf	205	TEVARDYPDV	RLSHMYVDNA	AMQLIRAPAC	FDVLLTGNMF	GDILSDSEASQ	LTGSIQMLPS	ASLGE-GRAM	273
Ec	210	NEIATYEPDV	ELAHMYIDNA	TMQLIKDPSQ	FDVLLCSNLF	GDILSDDECA	ITGSMQMLPS	ASINDEGGL	279
Vib	207	IEVARDYPDV	ELSHMYVDNA	AMQLVFAFKQ	FDVMVTDMLF	GDILSDSEASM	LTGSIQMLPS	ASLDANNKM	276
			** * *	** * *	** * *	** * *	** * *	** * *	
		$\beta d$	$\alpha i$	$\alpha j$					
Tt	269	FEPVHGSAPD	IAGKGIANPT	AALLSAAAML	EHAFGLVELA	RKVEDAVAKA	LLE-TP-PPD	LG--G--SAG	332
Tf	274	YEPIHGSAPD	IAGDKRANPL	ATILSVAMML	RHSLNAEFWA	QRVEDAVQRV	LDLGL-RTAD	IAAGPTPIV	342
Ec	290	YEPAGGSAPD	IAGKIIMPL	AQLLSLAILL	FVSLIDADRA	GLERARINRA	LEGGI-RTG	DLAEGRARV	343
Vib	277	YEPHGSAPD	IAGQGIANPL	ATILSVSMML	RYSFNQTAAA	DAIELAVSNV	LDQGL-RTGD	IYSAGTRKV	345
			** * *	** * *	** * *	** * *	** * *	** * *	
		$\alpha k$							
Tt	333	TEAFATVTLR	HLA	345					
Tf	343	TKAMGAAVN	ALNLD	358					
Ec	348	TDMSGDIAR	VVAEV	363					
Vib	346	TTAMGDVAVE	ALRSL	360					

5. ábra Az IPMDH alegységszerkezete (A) és a térszerkezetek összehasonlítása alapján készített szekvencia összerendezés (B) (A) Szalagdiagram mutatja az IPMDH alegységszerkezetében a másodlagos szerkezeti elemek elrendeződését a Tt enzim példáján Imada és mti. nyomán [131] (B) A Tt, Ec, Vib és Tf (*Thiobacillus ferrooxidans*) IPMDH-k szekvencia összerendezése. A 46 konzervatív oldallánocot csillag jelöli. Az IPM-et és NADH-t közvetlenül kötő oldallánocokat egy további csillag jelzi. A másodlagos szerkezeti elemek szekvenciában való elhelyezkedését kettős nyilak mutatják.

Ez a felépítés, vagyis a másodlagos szerkezeti elemek sorrendje és elhelyezkedése („folding topológia”) mindegyik IPMDH-ra általánosan jellemző (6. ábra). Egy alegységen belül 10 db  $\beta$ -lemez egy központi hidrofób magot alkot. Ebből 5 db az egyik és 5 db a másik doménben található. A  $\beta$ -lemezek egy doménen belül parallel helyezkednek el, kivéve a domén határokon elhelyezkedőket. A két domént összehasonlítva pedig a lemezek állása antiparallel. A két domén a szerkezetben a következő módon oszlik meg:

*Domén 1:* 1-99, ill. 252-345 szekvencia részletek (Tt IPMDH) alkotják, azaz az N- és C-terminális végek is itt találhatóak. Az ide tartozó másodlagos szerkezeti elemek pedig: 5 db  $\beta$ -lemez (A, B, C, D, E) és 7 db  $\alpha$ -hélix (a, b, c, d, i, j, k).

*Domén 2:* 100-251 szekvencia szakasz (Tt IPMDH) alkotja, továbbá 7 db  $\beta$ -lemez (F, G, H, I, J, K, L) és 4 db  $\alpha$ -hélix (e, f, g, h) építi fel. A K és L lemez, melyek egymáshoz képest antiparallel elhelyezkedésűek, nem vesznek részt a központi  $\beta$ -réteg kialakításában, hanem egy kart formálva átnyúlnak a másik alegységhez és azzal H-híd kötésekkel alakítanak ki [131].

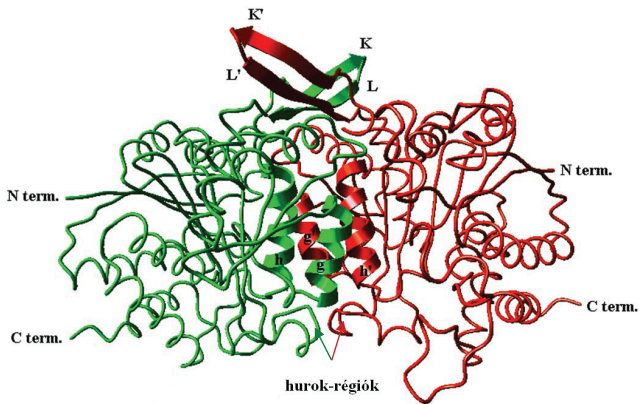


6. ábra Az IPMDH „folding topológiája” Imada és mti. eredeti közleményei [128, 131] alapján.

Az IPMDH dimerben a két alegység azonos felszínei izológ módon kapcsolódnak össze. Az alegységeket összetartó legfontosabb másodlagos kölcsönhatásokat a 7. ábra szemlélteti.

A legfontosabb szerepet az alegységek összetartásában az alábbi kölcsönhatások töltik be:

- A karszerűen kinyúló K és L  $\beta$ -lemezekből álló szerkezeti egység a másik alegységbeli párjával alakít ki H-híd kötések.
- A h- és g-hélixek hidrofób természetű aminosav oldalláncai erős hidrofób kölcsönhatásokat alakítanak ki a másik alegység ugyanezen héliceivel.
- Az alegységfelszínek jelzett hurok-régióiban előforduló aminosav-oldalláncok H-híd kötések kialakításával lépnek kapcsolatba egymással.



**7. ábra** Az alegységek kapcsolódási módja az IPMDH dimerben [128, 131]. A polipeptidlánc térbeli lefutását szalagdiagram jelöli. Az egyik alegységet piros, a másikat zöld színnel tüntettem fel. A másodlagos szerkezeti elemek közül az alegységek kötőfelszínein elhelyezkedő g, h, g', h' hélicek és K, L, K', L'  $\beta$ -redők vannak kiemelve.

A szerkezeti felépítéshez hozzátartozik a szubsztrátok kötődési módja is, azaz, hogy mely oldalláncok vesznek részt az IPM és a  $\text{NAD}^+$  kötésében. Amint az 5. táblázatból is kiténik, a szubsztrátmentes IPMDH-nak számos térszerkezete ismert, de ezek közül csak kettő köti a szubsztrátokat. E szerkezetek mégis számos lényeges információt nyújtanak a szubsztrátok kötőhelyéről, melyek ismeretében következtethetünk az IPMDH működésének lehetséges mechanizmusára is.

5. táblázat Az ismert vad típusú IPMDH kristályszerkezetek összefoglalása

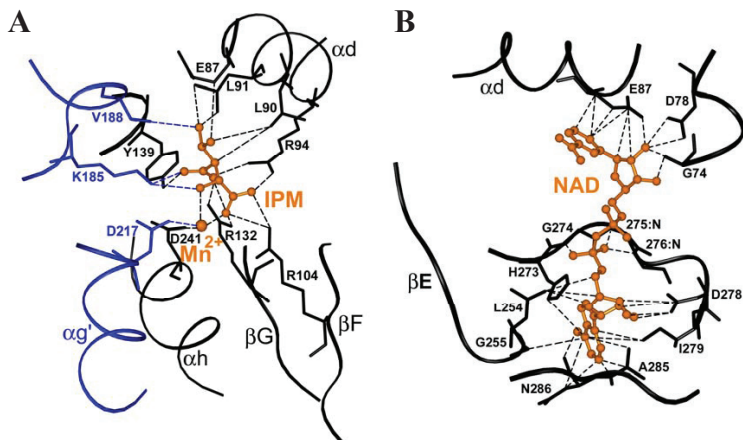
Forrás	Szerkezet	Felbontás	PDB kód	Irodalmi hivatkozás
<i>Thermus thermophilus</i>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	2,20 Å	1IPD	[131]
	NAD <sup>+</sup> komplex	2,50 Å	1HEX	[130]
	Ligandmentes	2,10 Å	1XAA 1XAB	[132]
<i>Escherichia coli</i>	Ligandmentes	2,06 Å	1CM7	[106]
<i>Salmonella typhimurium</i>	Mn <sup>2+</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1,76 Å	1CNZ	[106]
<i>Bacillus coagulans</i>	Ligandmentes	2,85 Å	1V53	Fujita, K. és mti. PDB adatbázisban elhelyezés: (2003)
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	3-IPM komplex	2,00 Å	1A05	[128]
<i>Thermotoga maritima</i>	Cl <sup>-</sup>	1,90 Å	1VLC	Joint Center for Structural Genomics PDB adatbázisban elhelyezés: (2004)
<i>Sulfolobus tokodaii</i>	Mg <sup>2+</sup>	2,80 Å	1WPW	Hirose, R. és mti. PDB adatbázisban elhelyezés: (2004)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Szubsztrátmentes	1,65 Å	1W0D	[133]

### 2.3.3. A szubsztrátok kötődésének fehérjeszerkezeti háttere

Az IPMDH dimernek két azonos aktív centruma van, melynek kialakításában mindkét alegység oldalláncái részt vesznek. Az IPM kötésében résztvevő oldalláncok konzervatívak és mindkét doménből származnak, ahogy azt az 5A ábra szemléltette. A 8A ábra viszont részleteiben mutatja be az IPM kötőhelyét a *Thiobacillus ferrooxidans* (Tf) enzim szerkezetében. A szubsztrát kötésében az egyik alegység mindkét doménjéhez tartozó (fekete) oldalláncokon kívül még a másik alegység 3 db (kék) oldallánc (Domén 2) is részt vesz: az Asp217 az IPM hidroxil-csoportjával, a Lys185 az IPM hidroxil- és karboxil-csoportjával alakítanak ki H-hidas, ill. ionos kölcsönhatásokat, a Val188 pedig hidrofób kölcsönhatásban van az izopropil-csoporttal. Tehát az IPM kötéséhez mindkét alegység oldalláncaira szükség van, melyből feltételezhető, hogy az IPMDH működésének előfeltétele a két alegység

összekapcsolódása, azaz, hogy kizárólag a dimer az aktív forma. Az IPMDH monomer formáját natív körülmények között eddig még nem sikerült előállítani, így ezt a feltételezést nem volt mód közvetlenül ellenőrizni. Yamada és mti. különböző enzimm koncentrációknál és a szubsztrátok jelenlététől függetlenül az IPMDH-nak csak a dimer formáját tudták kimutatni [134]. A fenti feltételezést mégis igazolni látszik a *Bacillus subtilis* IPMDH-val végzett mutációs kísérlet. Az alegységfelszínen létrehozott mutáció következtében a két alegység disszociált és az enzim inaktívvá vált [135].

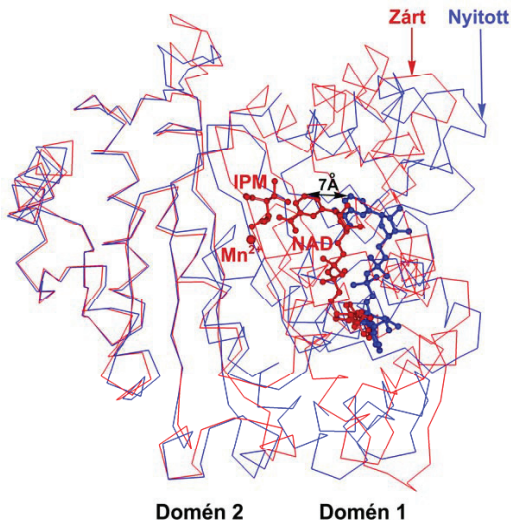
A másik szubsztrát, a  $\text{NAD}^+$  kötésében (8B ábra) csak az egyik alegység vesz részt. Az IPMDH  $\text{NAD}^+$ -kötő doménje (Domén 1) különbözik a már korábban ismert dehidrogenázoknál (pl. laktát- és alkohol-dehidrogenáz) meghatározott úgynevezett „Rossmann-fold”-tól. Ez utóbbi 6 parallel  $\beta$ -lemezből áll, melyeket  $\alpha$ -hélixek kötnek össze. Sem az IPMDH, sem a vele rokonságban lévő ICDH esetén ezt nem találjuk meg.



**8. ábra** Az IPM és  $\text{NAD}^+$  kötődésének szerkezeti részletei (A) Az IPM kötődése a Tf IPMDH szerkezetben [128]. (B) A  $\text{NAD}^+$  kötődése az Tf IPMDH szerkezetben [130, 136]. A kötött IPM és  $\text{NAD}^+$  molekulát narancssárga gömb-pálcika modellel jelöltem, a két különböző alegységből származó oldalláncokat pedig fekete és kék pálcika modell szemlélteti. Az atomi kölcsönhatásokat (H-híd, elektrostatikus és hidrofób kölcsönhatások) szaggatott vonalakkal jelöltem. Az oldalláncok számozása a *Thermus thermophilus* enzimre vonatkozik.

A kristályszerkezetek alapján az IPMDH számos konformációban fordulhat elő az ún. nyitott és zárt állapotok között, melyek a két domén relatív helyzetét jellemzik [133]. Az eddig ismert legnyitottabb szerkezettel a szubsztrátmentes Ec IPMDH (PDB: ICM7), míg a legzártabb szerkezettel az IPM kötő Tf enzim (PDB: 1A05) rendelkezik, ugyanis az IPM hatására a Domén 1 nagyfokú elmozdulása következik be a Domén 2-

hez képest (9. ábra). A  $\text{NAD}^+$  koenzim hatására azonban nem jön létre a domének záródása. Valódi szerkezeti összehasonlításra akkor nyílna lehetőség, ha ugyanazon forrásból, szervezetből lenne elérhető, mind az IPM, mind a  $\text{NAD}^+$  kötő szerkezet. További információkat szolgáltatna az IPMDH működéséről, ha rendelkezésükre állna a mindkét szubsztrátot (analógot) kötő, termer komplex szerkezete is. Feltehetően a szubsztrátmentes IPMDH oldatban mind a nyitott, mind a zárt állapotában előfordul és nagyon kis energia különbség van ezen állapotok között. Valamilyen külső behatás következtében, mint a szubsztrát(ok) kötődése vagy a kristályban kialakuló kölcsönhatások, ez a finom egyensúly eltolódik valamelyik irányba.



**9. ábra** Az IPM kötődésére bekövetkező doménzáródás az IPMDH alegységében. A kék színnel jelölt nyitott szerkezetben (T1 IPMDH) elhelyezkedő  $\text{NAD}^+$  molekula mintegy 7 Å-t mozdul el a domének záródása következtében. A zárt szerkezetben (Tf IPMDH), melyet piros színnel mutatok be, a  $\text{NAD}^+$  molekula valószínű helyzetét a nyitott és zárt szerkezet  $\text{NAD}^+$  kötő domén (Domén 1) központi  $\beta$ -redőinek összemáslásával határoztam meg. A szubsztrátokat gömb-pálcika modellel jelöltem.

Az eddig rendelkezésre álló kristályszerkezetek alapján nagyon valószínűnek látszik, hogy a működő termer komplexben is hasonló relatív doménmozgások következnek be, mint az IPM-et kötő binér komplexben. A doménmozgások eredményeként kerülhet ugyanis a két reagáló szubsztrát (IPM és  $\text{NAD}^+$ ) megfelelő közelségbe egymáshoz (ld. 9. ábra), hogy közöttük a kémiai reakció végbemehessen.



#### 2.3.4. Az IPMDH által katalizált reakció kinetikai mechanizmusa

Az IPMDH igen széles szubsztrát specifitással rendelkezik a (2R,3S)-3-alkilmalátok körében [137]. A 2R-malát vázán a 3S helyzetű izopropil csoport (R-jelű a 2. egyenletben) helyett – mely az IPMDH természetes szubsztrátja – elfogad még egyéb alkilánccokat is, mint a metil, etil, izobutil, izoamil csoport. Továbbá, működik a 2R,3S-tartaráttal is, melyben az alkilánc helyén hidroxil csoport található (4. táblázat). A széles szubsztrát specifitás az alkilcsoportot kötő hidrofób zsebben található E87 (Tt) nagyfokú mozgékonyágával hozható összefüggésbe [128]. Ennek ellenére az IPMDH az ugyanazon enzimesaládba tartozó ICDH szubsztrátjával, az izocitráttal nem működik, ami az alkilcsoport helyén lévő poláros karboxi-metil csoport taszító hatásával magyarázható. A másik szubsztrátot illetően, az IPMDH specifikus a  $\text{NAD}^+$  kofaktorra, katalitikus hatékonysága százszor nagyobb, mint a  $\text{NADP}^+$  molekulára. Ezt a kofaktor specifitást viszont sikerült megfordítani a koenzimkötő zsebben végzett mutagenézissel: 4 aminosav oldallánc, valamint egy  $\beta$ -kanyar  $\alpha$ -hélixre és hurokra való kicserélésével elérték, hogy az IPMDH a  $\text{NADP}^+$  molekulára ezerszer nagyobb katalitikus hatékonyságot mutasson, mindemellett az IPMDH aktivitása a vad típusú enzimhez képest kétszeresére növekedett [138].

Gyorskinetikai módszerekkel még nem tanulmányozták az IPMDH által katalizált reakció mechanizmusát, így nincs információnk külön-külön az egyes elemi lépések kinetikájáról, a folyamat sebességét meghatározó lépésről, csupán „steady state” kinetikai adatok állnak rendelkezésünkre. Az eddig meghatározott kinetikai állandók is sok esetben ellentmondóak (6. táblázat).

Az azonos forrásból származó IPMDH-val, ill. az azonos hőmérsékleten történt mérések adatai is igen különböznek egymástól, így csak nagyságrendileg lehetséges az egyes állandókra következtetni.

Az IPMDH által katalizált reakció mechanizmusa szerint szekvenciális, azaz mindkét szubsztrátnak kötődnie kell az enzimen mielőtt bármelyik termék felszabadulna. Egy korábbi tanulmány szerint a mechanizmust a szubsztrátok „ordered”, vagyis meghatározott sorrendű kötődése jellemzi, méghozzá a kofaktor elsődleges kötődésével [151]. Ezt viszont megkérdőjelezi Dean és mti. munkája [139], akik a kezdeti sebesség tanulmányozása során attól függően kaptak a határozott sorrendű kötődésre jellemző kinetikai képet, hogy azt milyen szubsztrát koncentráció tartományban vizsgálták. A szubsztrátok kötődése valójában random mechanizmus

követ, mivel kísérletes bizonyítékok vannak arra, hogy mindkét szubsztráttal kialakul a megfelelő binér komplex, azaz akármelyik szubsztrát kötődhet elsőként. A fluorimetriás ligandkötődési vizsgálatoknál a Förster Rezonancia Energia Transzfer (FRET) jelenségét (ld. 5.2.1. fejezet) használták fel a szubsztrátok disszociációs állandójának meghatározására, melynek alapján az IPM disszociációs állandója 8,4  $\mu\text{M}$ -nak, míg a NADH molekuláé 65,5  $\mu\text{M}$ -nak adódott [139]. Az IPMDH különböző szubsztrátokkal alkotott komplexeinek kristályszerkezetei is a random mechanizmus mellett szólnak.

6. táblázat Az IPMDH kinetikai állandói

Forrás	IPM $K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	NAD $K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{\text{kat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	T ( $^{\circ}\text{C}$ )	pH	Irodalmi hivatkozás
<i>Thermus thermophilus</i>	0,017	3,2	0,24	21	7,3	[139]
	–	12	0,15	21	7,3	[138]
	32	369	135	50	7,6	[140]
	0,9	9,2	0,7	30	8,0	[141]
	2,6	134	25,5	60		
	–	48	3,3	40	8,0	[142]
	–	220	36	60		
	80	630	–	60	7,6	[134]
	5,1	40	31	60	7,8	[143]
	1,9	–	14	60	7,8	[144]
	1,3	40,9	13,6	60	8,0	[145]
6,1	514	13,4	70	8,0	[146]	
<i>Escherichia coli</i>	105	321	69	40	7,6	[147]
	2,7	117	39,8	30	8,0	[141]
	9,1	864	204	60		
	24	150	6,7	20	7,6	[148]
	97	257	29,5	40		
102	606	71,2	60			
<i>Bacillus subtilis</i>	30,5	333	21,2	40	7,6	[149]
	9,1	246	14,9	40	7,6	[135]
<i>Sulfolobus</i> sp.	1,2	150	3,6	70	8,0	[150]

### 2.3.5 Az IPMDH szerkezeti stabilitása és térszerkezet kialakulási mechanizmusának kérdései

Az IPMDH enzim igen eltérő életkörülmények (pl. szélsőséges hőmérsékletek) között élő baktériumokban is előfordul, így kérdésként merül fel, hogy ezen szervezetekben működő IPMDH enzimeknek van-e valamilyen specifikus szerkezeti adottsága – a fenti fejezetekben ismertetett közös tulajdonságokon kívül – amely biztosítja az adott működési körülmények között a megfelelő stabilitást és egyben lehetővé teszi, hogy optimális aktivitással működjenek.

### *2.3.5.1. Mutagenézis kísérletek a hőstabilitás vizsgálatára*

Számos munkában próbáltak már erre a kérdésre választ adni, pl. oly módon, hogy a fehérjemolekula bizonyos, a szerkezeti stabilitásban feltehetően szerepet játszó oldalláncait kicserélték, hogy ezáltal pl. hőstabilabbá tegyék a mezofil enzimet vagy pedig csökkentsék a termofil enzim stabilitását. Vannak esetek, amikor a mutációs kísérlet valóban igazolta a feltételezéseket, más esetekben viszont ellentmondó adatok születtek.

Németh és mti. az Tt IPMDH alegységfelszínén lévő ionhálózat hőstabilitásban betöltött szerepét bizonyította az E190Q aminosav cseréjével, mely ezt a kölcsönhatás hálózatot megszakította és alacsonyabb stabilitást eredményezett. Ez az ionhálózat a mezofil Ec enzim esetén hiányzik, de a szerkezetileg azonos pozícióban lévő Q200 aminosavmaradék helyére glutaminsav (E) beépítésével lehetőség nyílt ennek kialakítására. A feltételezésnek megfelelően a kialakított mutáció hatására a hőstabilitás megnövekedett [152]. A Tt IPMDH-val végzett más mutációs kísérletek arra is rámutattak, hogy a domének közötti felszínen elhelyezkedő hidrofób oldalláncok méretének (van der Waals térfogatának) növelése stabilitás-növekedést eredményezett, feltehetően a domének között működő hidrofób kölcsönhatások erősítésével [153, 154]. Ugyanakkor a molekula egyéb részein végzett mutációs kísérletekben megfigyelték, hogy a van der Waals térfogat növelése nem mindig okoz stabilitásnövekedést, sőt a stabilitás csökkenésével is járhat [155, 156]. Valószínű, hogy ebben az esetben a túlságosan nagytérfogatú oldallánc elhelyezkedése gátolt a fehérjemolekula adott térszerkezeti elemei között. Hasonló eredményeket kaptak a Tt IPMDH két domén közötti régiójában a 126 pozícióban lévő valin (V) oldalláncot nagyobb térfogatú, szintén hidrofób jellegű aminosavra (pl. I, L, F) való cseréje során is. A fehérje hőstabilitása csökkent, de ugyanakkor meglepő módon alacsonyabb hőmérsékleten megnövekedett a katalitikus aktivitás. Ez feltehetően annak tulajdonítható, hogy a doménhatárokon lévő csukló-régiók mozgékonyasága megnő, ami a működő terner komplexet az enzimreakció bekövetkezésének irányába destabilizálja. Mindez az alacsony hőmérsékletekhez való alkalmazkodás egyik lehetőségét mutatja be [157].

Az elméleti várakozásokat azonban nem minden esetben sikerült alátámasztani. A Tt IPMDH hidrofób magjában létrehozott mutáció (M219A) következtében – mely egy üreget eredményezett a fehérje belsejében – a stabilitás csökkenését várták, de az mégsem volt hatással sem az enzim hőstabilitására, sem az aktivitására [106]. Egy

másik munkában a mezofil Ec IPMDH alegység felszínén elhelyezkedő régió szekvencia-részletét cserélték ki a Tt IPMDH-ban megtalálható megfelelőjével, de mégsem kapták meg a várt stabilitásnövekedést [158]. A látszólag pozitív eredmények is sokszor megkérdőjelezhetőek. A mutációs kísérletek jelentős része a *Bacillus subtilis* IPMDH enzimmel készült [149, 156, 159-161], melynek CD spektroszkópiával követve az olvadási hőmérséklete csupán 50°C-nak adódott [135], mely igen alacsonynak tekinthető a szintén mezofil Ec IPMDH enzim 63°C-os olvadási hőmérsékletéhez képest [106]. Természetesen egy eleve kisebb stabilitású enzim esetén könnyebb olyan mutációt létrehozni, mely megnöveli az enzim hőstabilitását, attól függetlenül, hogy az adott oldalláncnak valóban szerepe lenne a hőstabilitásban. Figyelemre méltó azonban, hogy a Tt IPMDH N- és C-terminális aminosav oldalláncainak kicserélésével a polipeptidlánc két vége között kialakuló kölcsönhatások fontosságára sikerült rámutatni [162, 163].

#### 2.3.5.2. A flexibilitás-aktivitás összefüggés tanulmányozása

Az IPMDH különböző életkörülményekhez való alkalmazkodásának megismerésében a mutációs vizsgálatok mellett, a különböző hőstabilitású enzimek flexibilitásának és katalitikus paramétereinek összehasonlítása is sok információval szolgálhat. A konformációs flexibilitás vizsgálatára alkalmas H-D kicserélődés kinetikai vizsgálatával hasonlították össze Závodszy és mti. a Tt és Ec IPMDH-k viselkedését [113]. Megállapították, hogy azonos hőmérsékleten (25 °C) a hőstabil Tt enzim nagyfokú szerkezeti rigiditással rendelkezik, míg az Ec IPMDH szerkezete sokkal flexibilisebb. Ugyanakkor a saját működési hőmérsékletükön (azaz 48 és 70 °C-n flexibilitásuk hasonló mértékű. Tehát a kísérletsorozat alátámasztotta azt az elképzelést, hogy a szerkezeti flexibilitás az enzimműködés lényeges eleme, továbbá, hogy a különböző hőmérsékleti tartományokra alkalmazkodott szervezetek enzimeinek a működési hőmérsékletükön kell megfelelő szerkezeti flexibilitással rendelkezniük. Egy harmadik, a hidegtűrő Vib IPMDH-ra is kiterjesztett vizsgálatok egyrészt alátámasztották azt az eredményt, hogy az egyes IPMDH-k saját működési hőmérsékletükön hasonló szerkezeti flexibilitást mutatnak. Másrészt azonban, a várakozással ellentétben, a Vib IPMDH szerkezete azonos hőmérsékleten (25 °C) rigiditás szempontjából az Ec és Tt enzim közé esett [164]. Tehát az IPMDH-k esetén csupán a flexibilitásbeli különbségek nem magyarázzák a különböző hőstabilitást. A

hidegtűrő Vib IPMDH tulajdonképpen az igen nagy aktivitása következtében még alacsonyabb hőmérsékleten is képes jól működni, kisebb hőstabilitása pedig a sókötések, az aromás-aromás kölcsönhatások számának csökkenésével, valamint a kevesebb Pro tartalommal és a hosszabb felszíni hurkokkal hozható összefüggésbe [165].

A termofil IPMDH magas hőmérsékletekhez való alkalmazkodási stratégiájára Motono és mti. mutattak rá [129]. A különböző hőmérsékleten felvett egyensúlyi urea-denaturációs görbék alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a Tt IPMDH denaturációs szabadentalpia változása kevésbé függ a hőmérséklettől, mint az Ec enzimé, valamint a maximális szabadentalpia változáshoz tartozó hőmérséklet is 6 °C-kal magasabb a termofil IPMDH-nál. Tehát lényegében a 4. ábrán korábban szemléltetett modellek közül a „d” és „c” görbék kombinációja érvényes rá. Érdeemes azonban megemlíteni, hogy a maximális denaturációs szabadentalpia változás, a várttal ellentétben a termofil enzim esetén kisebb, tehát a nagyobb  $\Delta G_{N \rightarrow D}$  érték nem feltétlenül jár együtt a nagyobb szerkezeti stabilitással.

### 2.3.5.3. A térszerkezet kialakulásának tanulmányozása

Felvetődik a lehetőség, hogy a fehérjék szerkezeti stabilitása összefügghet a térszerkezet kialakulás mechanizmusával, amely IPMDH esetén még nincs felderítve.

A Tt IPMDH hődenaturációja *pásztázó mikrokolorimetriával (DSC)* követve egy lépéses, egyszerű folyamatnak látszik, azonban a Tt és *Bacillus subtilis* IPMDH-ból készített ún. kiméra enzim molekulával végzett hődenaturációs kísérletek [166] érdekes kétlépéses folyamatra utalnak mind *DSC*, mind pedig *CD spektroszkópiás* módszerrel vizsgálva. A kiméra szerkezetben a Tt IPMDH domének közötti régióját cserélték ki a kisebb stabilitású *B. subtilis* enzim szekvenciájával. Tehát feltehető, hogy a két elkülönülő denaturációs lépés a domének közötti kapcsolat meglazulásának tulajdonítható. A DSC mérések során az első hőátmenet után a mintát lehűtve, majd újra felfűtve csak a második átmenet jelent meg újra. A lehűtött minta nem mutatott enzimaktivitást. Ezekből az adatokból stabil, inaktív intermedier jelenlétére következtettek, melynek szerkezete kb. 60%-ban megegyezik a natív fehérje térszerkezetével. Feltételezhető továbbá, hogy ez az intermedier dimer szerkezetű, mivel az első hőátmenet fehérjekoncentráció függetlennek adódott, míg a második már függött az IPMDH koncentrációjától. A kísérleti eredményeket ún. szekvenciális „unfolding”

mechanizmussal magyarázták, ahol a két csúcs az egyes domének egymás utáni denaturációjának felel meg, azaz a domének közötti kooperativitás hiányát jelzi. Tehát először a fehérje alegységek 1. számú doménjei tekerednek le, miáltal az aktív centrum szerkezete megbomlik és az enzim inaktívvá válik. Ekkor a fehérje még dimer szerkezetű, hiszen a 2. számú domének szerkezete, azaz alegységek összetartásában szerepet játszó másodlagos szerkezeti elemek, még épek. Ez felel meg az intermedier állapotnak, majd ezt követi a második hőátmenet során az alegységek szétválása. Az adatok alapján az alábbi modellt állították fel:



ahol  $N_2$  a natív dimer,  $I_2$  a dimer szerkezetű intermedier, míg  $D$  a denaturált monomereket jelenti.

Ezen munkát figyelembe véve kérdésként merül fel, hogy a vad típusú IPMDH szerkezetének felbomlása – mely a *DSC vizsgálata* során csupán egy csúcsot mutatott, így a domének kooperatív letekeredésére enged következtetni – eltérő mechanizmussal következik-e be a különböző hőstabilitású IPMDH-k esetén.

Egy másik kutatócsoport a vad típusú Tt és Ec IPMDH esetén jellemezte a denaturációs átmenet(ek)et különböző urea koncentrációknál végzett egyensúlyi *CD- és fluoreszcencia mérésekkel* [167]. A távoli UV tartományban végzett *CD mérések*, ill. az IPMDH letekeredésekor megváltozó saját *fluoreszcencia követése* során kapott eredmények arra utalnak, hogy a denaturáció mindkét IPMDH esetén kétféle lépésű folyamat, habár a Tt enzim esetén az adatok kevésbé voltak meggyőzőek, az intermedier jelenlétére csupán egy apró „vállacska” utalt. Az utóbbi esetben a mérési adatok akár az egyetlen átmenetet feltételező kétállapotú denaturációs modellel (ld. 3. táblázat) is leírhatóak voltak [129, 167]. Mégis mindkét enzim esetében hasonló háromállapotú modellt tételtek fel, dimer szerkezetű intermedierrel. Adataik azonban csak az Ec enzim esetén szolgáltattak egyértelmű bizonyítékot a megváltozott szerkezetű intermedier jelenlétére.

Mindezek alapján tehát még tisztázásra vár, hogy a különböző hőstabilitású IPMDH enzimek esetében a térszerkezet felbomlása, de még inkább a kialakulása eltérő mechanizmus szerint zajlik-e, vagy az IPMDH-ra általánosan jellemző folyamatról van-e szó. A kérdés vizsgálatára eddig főként csak egyensúlyi denaturációs-renaturációs kísérleteket végeztek, de a folyamat időfüggését még nem követték. További nyitott kérdés az is, hogy az eltérő hőstabilitású fehérjék esetén különbözik-e az egyes alegységek, ill. a domének szerepe a térszerkezet kialakulás folyamán.

### 3. CÉLKITŰZÉS

Munkám során a fehérje térszerkezet kialakulás és felbomlás folyamatát, valamint ezek hőstabilitással való összefüggését kívántam tisztázni az IPMDH, mint modell enzim esetén. Az IPMDH a kérdés vizsgálatára megfelelő objektum volt, hiszen különböző hőmérsékletekhez alkalmazkodott szervezetekből (hőstabil (Tt), mezofil (Ec) és hidegtűrő (Vib)) állt rendelkezésemre. Az IPMDH két alegységből és két doménből felépülő molekulája alkalmas adott ezen szerkezeti egységek térszerkezet kialakulási folyamatban betöltött szerepének tisztázására is. Ahogy az Irodalmi áttekintésben tárgyaltam, születtek már eddig is bizonyos elképzelések az IPMDH térszerkezet felbomlásának mechanizmusáról, de közelről sem tisztázott, hogy a különböző hőstabilitású IPMDH-k esetén azonos vagy különböző séma alapján játszódik-e le a folyamat. Szintén nem eldöntött kérdés, hogy eltérő hőmérsékleti tartományokra adaptálódott enzimfehérjék térszerkezete azonos vagy eltérő mechanizmus szerint alakul-e ki. További általános kérdés, hogy az alegységen belüli domének, a független alegységek, vagy akár a már dimerré asszociált polipeptidláncok-e azok, amelyek a natív térszerkezet kialakulásához szükséges összes információt hordozzák. Habár számos mutációs analízis készült már az IPMDH-val, mégsem találunk egyetlen összefoglaló munkát sem, ahol kísérletet tettek volna az IPMDH molekula egyes részeinek, szerkezeti elemeinek és azok kapcsolatának stabilitásban betöltött szerepének értelmezésére. A különböző hőstabilitású enzimek térszerkezetének alapos és szisztematikus összehasonlítása, szintén elengedhetetlen a stabilitás kérdéskörének megválaszolásához.

Ennek alapján a következő munkatervet követtem:

1. Különböző hőstabilitású IPMDH-k renaturáció és denaturáció mechanizmusának felderítése *egyensúlyi mérések* segítségével, melyekhez CD és fluoreszcencia spektroszkópiát ill. ureagradiens gélelektroforézist alkalmaztam.
2. A térszerkezet kialakulás és felbomlás folyamatának időbeli jellemzése a *kinetikai reakciómechanizmus* felderítésére mindhárom vizsgált IPMDH esetén. Ehhez a CD és fluoreszcencia spektroszkópiás módszerek mellett az enzimaktivitás változás követését, továbbá a tiol-tartalmú fehérjék (pl. Ec vagy Vib IPMDH) esetén a tiolreaktivitás változásának meghatározását is terveztem. Mindemellett a szubsztrátok hatását is célszerűnek látszott megvizsgálni ezen

folyamatokra. Az eredmények magyarázatára számos termofil, mezofil és hidegkedvelő (hidegtűrő) IPMDH szekvencia, ill. a rendelkezésemre álló térszerkezetek összehasonlító analízise is szükségesnek látszott.

3. A térszerkezet kialakulás során megjelenő *intermedier jellemzése*, felépítésének, oligomerizációs állapotának, szubsztrátkötő képességének stb. tanulmányozása különböző biofizikai módszerekkel.
4. További célként tűztem ki az *alegységek szerepének* tanulmányozását fluoreszcencia anizotrópia, ill. az egyes folyamatok fehérje koncentrációfüggésének vizsgálatával, annak megállapítására, hogy mindkét alegységre szükség van-e a helyes térszerkezet kialakulásához, azok elősegítik-e egymás feltekeredését, vagy pedig önálló „folding” egységet alkotnak.
5. Az egyes IPMDH *domének* térszerkezet kialakulást folyamatának nyomon követésére a Tt IPMDH-nak olyan helyspecifikus mutánsait terveztem létrehozni, melyekben a fluoreszcenciáért felelős Trp oldalláncok előre tervezett módon helyezkednek el csak az egyik vagy csak a másik doménben. A Tt IPMDH alegységenkénti 3 db Trp oldallánca közül a W77 az 1. doménben, a W152 és a W195 a 2. doménben található. Az utóbbiak közül a W152 éppen a 2. domén kinyúló karjában található (ld. 5. ábra), melyen keresztül a két alegység egymással kapcsolódik. Ezen oldalláncok egyenkénti kicserélése más, hasonlóan aromás, de a Trp-hoz képest elhanyagolható fluoreszcencia intenzitással rendelkező aminosavoldallánca (pl. fenilalaninra) várhatólag lehetőséget ad az egyes IPMDH domének ill. a kar denaturációs-renaturációs folyamatának külön-külön való vizsgálatára. A következő mutánsokkal való kísérleteket terveztem:
  - W152F – a két domén együttesen vizsgálható a „kar” hozzájárulása nélkül
  - W152,77F – a 2. domén feltekeredése tanulmányozható
  - W152,195F – az 1. domén viselkedése figyelhető meg.

Ezen mutánsokkal a már korábban említett biofizikai módszerekkel terveztem tanulmányozni az egyes domének szerepét a fehérje térszerkezet kialakulás folyamatában.

6. A fenti kísérleti eredményekre támaszkodva a rendelkezésemre álló Tt, Ec és Vib IPMDH kristályszerkezetek alegység- és doménfelszínén lévő kölcsönhatások feltérképezésével és szisztematikus összehasonlításával kívántam *szerkezeti magyarázatot* adni a különböző hőstabilitású IPMDH-k viselkedésére a térszerkezet kialakulása során.



## **4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

### **4.1 Anyagok**

Az IPMDH enzim [EC 1.1.1.85.] Tt és Vib változatának Leu B génjét tartalmazó pUTL118 és pGWII plazmidokat Závodszy P. és munkacsoportja (MTA SZBK Enzimológia Intézet) bocsátotta rendelkezésemre. A pET21c vektorba klónozott, His-tag-gel rendelkező Tt és Ec IPMDH plazmidot szintén ezen laboratóriumból kaptuk.

A fehérjetermelés és tisztítás során felhasznált anyagok közül az LB tápoldatok készítéséhez szükséges élesztő kivonat, a bacto trypton, a NaCl Reanal termék, az IPMDH fehérje előállításához szükséges ampicillin és a kloramfenikol Sigma; az IPTG Fermentas gyártmány volt. A kromatográfiához szükséges anyagokat a GE Healthcare-től vásároltuk.

Az enzimaktivitás mérésekhez felhasznált treo-DL-3-izopropil-malát a Wako Chemicals-tól származik, a NAD<sup>+</sup> és NADH a Boehringer Mannheim, a MnCl<sub>2</sub> és MgCl<sub>2</sub> pedig a Sigma gyártmánya. A térszerkezet kialakulás vizsgálatához az Ellman reagenst (DTNB) a Servától, az ANS-t a Sigmától vásároltuk, a DTT Fluka gyártmány. Az irányított mutációk kivitelezéséhez használt QuikChange kit Stratagene termék. A PCR reakcióhoz a primereket az Invitrogen-től rendeltem. Minden egyéb felhasznált vegyszer a Mercktől, Reanaltól és Sigmától származik és az előbbiekkal együtt analitikai tisztaságú volt.

### **4.2 Módszerek**

#### **4.2.1. DNS szintű munkák a mutáns Tt IPMDH enzimek előállítására**

Az irányított mutagenézis során a mutáns enzimeket QuikChange helyspecifikus mutagenézis kit segítségével állítottam elő az alábbi primerek felhasználásával (7. táblázat). A PCR segítségével felszaporított mutációt tartalmazó plazmidot Epicurian Coli XL1-Blue szuperkompetens sejtekbe; fehérjetermelés céljából pedig BL21(DE3) LysS kompetens sejtekbe transzformáltam. A mutációkat DNS szekvenálással ellenőriztettem (BIOMI Kft., Gödöllő).

7. táblázat Az irányított mutagenézishez használt „forward”, ill. „reverz” primerek DNS szekvenciája Minden mutáció esetén a felső sorban az alkalmazott „forward”, alatta pedig a „reverz” primer bázissorrendje látható.

Mutáció típusa	Primerek: „forward” (5'→ 3') és „reverz” (5'→ 3')
W77F	GTGGGGGGGGCCCAAG <u>TT</u> CGACGGCCTTCCCCGC GCGGGGAAGCCGTC <u>GAA</u> CTTTGGGCCCCCCCAC
W152F	CGAGGCCGAGGCCT <u>TT</u> CAACACGGAGCGCTAC GTAGCGCTCCGTGTT <u>GAA</u> GGCCTCGGCCTCG
W195F	CGAGGTGGGAGAGTTCT <u>TT</u> CCGCAAGACCGTGGAGGAGG CCTCTCCACGGTCTTGCG <u>GAA</u> GAACTCTCCCACCTCG

#### 4.2.2. A különböző vad típusú és mutáns IPMDH-k homogén formában történi előállítás

##### 4.2.2.1. Transzformálás

A transzformálás folyamán a His-tag-gel nem rendelkező Tt és Vib IPMDH LeuB génjét tartalmazó pUTL118 és pGWII rekombináns plazmidot Ec OM17 kompetens sejtekbe juttattam. A Tt és Ec IPMDH His-tag-gel (az N-terminálison AS-, míg a C-terminálison –AAALEHHHHHHH szekvencia részlet kapcsolódott még a fehérjéhez) rendelkező formáját is kifejeztem a könnyebb tisztítás érdekében. Ebben az esetben a transzformálás, ill. a fehérjeszintézis Ec BL21(DE3) LysS sejtek segítségével történt.

##### Kompetens sejtek készítése

A vektorba épített DNS-t transzformációval juttattam be a baktériumba. Ennek az elve az, hogy a baktérium membránját átmenetileg átjárhatóvá tesszük, pl. kétértékű kationok hozzáadásával. Ily módon kompetens sejtekhez jutunk.

A kompetens sejtek készítését a következő módon végeztem:

- 200 µl sejtet 20 ml tápoldatba oltva, a logaritmusos fázisig ( $A_{600nm} \approx 0,6$ ) növesztettem a baktériumokat.
- A sejteket jégben való lehűtés után 3000 rpm-en 5 percig centrifugáltam.
- A felülúszót leöntve a sejteket felszuszpendáltam a szintén jégben hűtött 10 ml 100 mM MgCl<sub>2</sub>-ban, majd hidegen inkubáltam 45 percig.
- A sejteket 3000 rpm-mel 5 percig történi centrifugálással összegyűjtve 1 ml 100 mM CaCl<sub>2</sub> oldatban szuszpendáltam, majd fagyaszta tároltam.

### *Transzformálás plazmiddal*

A transzformáció során az IPMDH génjét tartalmazó plazmidot kompetens Ec sejtekhez adtam. Miután a sejtek felvették a plazmidot, tápoldatban hagytam őket növekedni. Ezután antibiotikum tartalmú agaron szélesztettem a sejteket és egy éjszakán át inkubáltam, hogy csak azok az Ec sejtek hozzanak létre telepeket, melyek tartalmazzák az antibiotikum rezisztencia gént.

A transzformálást a következő módon végeztem:

- 200 µl kompetens sejthez kb. 0,01-0,1 mg cirkuláris DNS-t adtam, majd inkubáltam 4°C-on 1 órán át.
- Ezután 2 perces hőshokkot alkalmaztam (42°C), ezt 2 perces jégben hűtés követte.
- A sejtekhez 1 ml táptalajoldatot adtam és 37°C-on kb. 1 órán át inkubáltam.
- A sejtszuspenzió kb. 250 µl-es adagjait az OM17-es sejtek esetén ampicillint tartalmazó, míg a BL21 sejteknél ezenfelül még kloramfenikolt is tartalmazó lemezre kentem ki.
- A sejteket 37°C-on egy éjszakán át növesztettem.

### *4.2.2.2. A fehérje termeltetése*

A rendelkezésemre álló LeuB (IPMDH) gént tartalmazó plazmid DNS-sel transzformált Ec sejtek segítségével nagy mennyiségben lehetett termeltetni a különböző IPMDH-kat, mely a következő módon történt:

- Háromszor 20 ml tápoldatban 100 µg/ml ampicillin (OM17-es sejtek), ill. még további 30 µg/ml kloramfenikol (BL21 sejtek) jelenlétében növesztettem a plazmid DNS-sel transzformált Ec sejteket a növekedés logaritmusikus fázisáig.
- 5 l steril tápoldathoz 5 ml 100 mg/ml töménységű ampicillin törzsoldatot, ill. a BL21 sejtek esetén még 5 ml 30 mg/ml kloramfenikol oldatot is adtam, majd az 50 ml plazmidot tartalmazó Ec sejtszuspenzió hozzáadása következett. Az oldatot 8 részre osztottam és ezekkel dolgoztam tovább.
- A sejteket 37°C-on  $A_{600nm} \approx 0,6$ -ig növesztettem, ezt követően 0,4 mM IPTG-vel indukáltam, majd az OM17 sejteket egy éjszakán át, míg a BL21 sejteket 4 órán át növesztettem.

- Ezután a sejtszuspenziót 5000 rpm-en 4°C-on 25 percig centrifugáltam és a sejteket -80°C-on tároltam.

#### 4.2.2.3. A fehérje tisztítása

##### *A sejtek feltárása*

- A sejteket felsuszpendáltam, -80°C-on 60 percig állni hagytam, majd szobahőmérsékleten felolvasztottam és ezred térfogatnyi 100 mg/ml-es lizozim jelenlétében 1 órán át állni hagytam. A BL21-es sejteknél nincs szükség külön lizozim hozzáadására, csupán a szonikálás után 1 h-t állni hagytam az oldatot.
- A sejtszuspenziót 4°C-on ultrahanggal feltártam (szonikálás). Ez 5-ször 1 perc volt a Tt IPMDH esetén, míg az Ec és Vib enzim esetén 10 másodpercenként szonikáltam 10 percen keresztül a szonikálás időtartalmával megegyező szüneteket tartva.
- A feltárt sejteket 15000 rpm-mel 15 percig centrifugáltam 4°C-on. A sejttörmelék a centrifugacső alján gyűlt össze, míg a fehérjét oldott állapotban kaptam meg.

##### *Hődenaturáció*

A Tt IPMDH esetén lehetőség van a hődenaturáció alkalmazására is a tisztítás során, ugyanis a Tt IPMDH hőstabil és ezt kihasználva el lehet választani az Ec baktérium saját fehérjétől. A hődenaturációt a következő módon végeztem: a sejtek feltárásából származó fehérjeoldatot 72°C-on termosztátban 30 percig inkubáltam, majd a kicsapódott fehérjéktől centrifugálással (18000 rpm, 15 perc, 4 °C) szabadultam meg.

##### *Ammónium szulfátos frakcionálás*

Ezen tisztítási lépést csak a His-tag-et nem tartalmazó IPMDH esetén alkalmaztam, mely során a fehérjét telítjük (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-tal (120g/l), majd egy órát állni hagyjuk, így a szennyező fehérjék újabb részétől lehet megszabadulni. (Az IPMDH csak ennél töményebb (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-oldatban csapódik ki.)

##### *Kromatográfias tisztítás*

A fehérje tisztítása a His-tag-gel nem rendelkező IPMDH esetében az alább leírt három kromatográfias lépésben zajlott, melyekhez minden esetben 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> puffert (pH=7,6) alkalmaztam az adott esetben szükséges adalékanyagokkal.

A His-tag-et tartalmazó IPMDH változatok (ide tartoznak a Tt IPMDH mutánsai is) tisztítása Ni<sup>+</sup> affinitás kromatográfiával történt.

### *Butil-Sepharose kromatográfia*

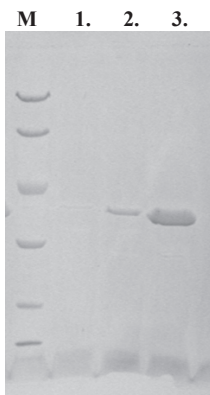
A Butil-Sepharose kromatográfia alapja az, hogy a különböző fehérjék felületi hidrofobicitásuk alapján különböző mértékben kötődnek a gyantához és ezért más-más ionerősségnél eluálódnak. Az oszlopot  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  tartalmú (120 g/l) pufferrel hoztam egyensúlyba, majd felvittem az ugyanilyen oldatban lévő fehérjemintát és mostam háromszoros oszloptérfogat pufferrel. Az oszlopon kötődött fehérjét lineáris gradiens alkalmazásával eluáltam: 100-100 ml 0 és 20%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  tartalmú puffer megfelelő arányú keverésével. A kromatogram legtisztább aktív frakcióit egyesítettem, majd a fehérjét 20 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pufferrel (pH=7,6) dializáltam az  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  eltávolítása céljából.

### *DEAE-Sepharose kromatográfia*

A DEAE-Sepharose anioncserélő kromatográfia alapja az, hogy a fehérjék eltérő töltésükből eredően különböző erősséggel kötődnek a kationos jellegű funkcionális csoportot hordozó gyantához és így különböző ionerősségnél eluálódnak. Az oszlopot pufferrel egyensúlyba hoztam, majd felvittem az előző lépésben dializált fehérjemintát és mostam háromszoros oszloptérfogat pufferrel. Az oszlopon kötődött fehérjét lineáris gradiens segítségével eluáltam: 100-100 ml 0 és 2 M KCl-ot tartalmazó puffer megfelelő arányú keverésével. A kromatogram legtisztább aktív frakcióit egyesítettem, majd a fehérjeoldatot Amicon membránszűrő segítségével töményítettem kb. 2 ml térfogatra. Ez az oldat azonban, SDS gélelektroforézis alapján, még tartalmazott az IPMDH mellett szennyező fehérjéket is.

### *Sephacryl S-200 géliszűrés*

A géliszűrés elve az, hogy az oszloptöltet apró, gyöngyszerű, pórusos anyagból áll, ahol a pórusok átmérője a fehérjék méretének nagyságrendjébe esik. A kisebb fehérjék – a nagyobb méretűekkel szemben – be tudnak lépni a gyantaszemcsek pórusaiba, ezáltal hosszabb utat tesznek meg az oszlopon, azaz nagyobb térfogatnál fognak eluálódni. A Sephacryl S-200-as oszlopot pufferrel egyensúlyba hoztam, felvittem a fehérjemintát, majd tovább mostam a pufferrel és frakciókat szedtem. Az összegyűjtött frakciókban már 95-98% tisztaságú IPMDH volt jelen SDS gélelektroforézis alapján (10. ábra). Mivel a denaturációs és renaturációs kísérletekhez tömény fehérjére volt szükségem, ezért a fehérjeoldatot Amicon membránszűrőn töményítettem kb. 0,1 mM koncentráció eléréséig.



**10. ábra** Az IPMDH frakciók tisztaságának ellenőrzése SDS gélelektroforézis segítségével a Sephacryl S-200 géliszűrési kromatográfia után M a fehérje molekula markert, míg a számok a géliszűrési egyes frakcióit jelöli.

#### *Ni<sup>+</sup> affinitás kromatográfia*

A His-tag-gel rendelkező IPMDH forma tisztításához csak egyetlen kromatográfiai lépésre volt szükség. A Ni<sup>+</sup> affinitás kromatográfia során az oszloptöltet anyagához a His-tag-et alkotó hisztidinek szelektíven kötődnek, így az egyéb szennyező fehérjék könnyen eltávolíthatók az IPMDH mellől. Az oszlopot 20 mM imidazolt, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> és 300 mM NaCl-ot tartalmazó oldattal (pH=8,0) hoztam egyensúlyba. A minta felvitele után az oszlopot ugyanezen puffer 3-szoros oszloptérfogatnyi mennyiségével mostam, majd 120 mM imidazolt tartalmazó pufferrel eluáltam az IPMDH-t. A kapott fehérjét 20 mM-os KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pufferben (pH=7,6) dializáltam. Az összes kísérlethez ezt a standard puffert alkalmaztam. Az Ec enzim esetében a dialízis puffer 1 mM DTT-t is tartalmazott. A Tt IPMDH mutánsok esetén (mivel ezek a His-tag-et tartalmazó fehérjével készültek) csak ezt a tisztítási módot alkalmaztam. Az előállított fehérje 95-98% tisztaságú volt. A megtisztított enzimek oldatait -80°C-on tároltam.

#### **4.2.3. Az IPMDH és a NAD<sup>+</sup> koncentrációjának meghatározása**

Az IPMDH koncentrációjának meghatározás során az  $\epsilon_{280}$  értéket, azaz a fehérje moláris abszorpciós koefficiensét 280 nm-en, Pace és mti. szerint [168] M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> egységekben számítottam ki a dimer szerkezetű fehérjére: a vad típusú Tt IPMDH esetén 47900, az Ec és Vib IPMDH esetén 54780, az egyszeres W152F Tt mutáns enzim esetén 36900, a W77,152F és W195,152F mutánsok esetén pedig 25900

értékeket kaptam. A dimer Tt IPMDH molekula tömege 73300, az Ec IPMDH 78780, a Vib IPMDH enzimé pedig 76960 Da. A His-tag jelenlétének következtében a molekulatömeg 1430 Da-nal növekszik meg.

A  $\text{NAD}^+$  oldat koncentrációjának meghatározását 260 nm-nél (adenin gyűrű elnyelése) végeztem az  $\epsilon_{\text{NAD}^+, 260 \text{ nm}} = 18000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  moláris extinkciós koefficiens ismeretében. Így a Lambert-Beer törvény alapján a koncentráció már számolható.

#### 4.2.4. Az IPMDH enzimaktivitásának meghatározása

Az aktivitás meghatározás azon alapul, hogy az IPMDH által katalizált reakcióban NADH keletkezik (lásd 1. egyenlet). A felszabaduló NADH mennyiségének időbeli változását a NADH fényelnyelésének maximumánál, 340 nm-nél követtem termosztáttal ellátott (20°C) Jasco V-550 típusú spektrofotométerrel. Az enzim aktivitását az 1 perc alatti fényabszorpció változásából számítottam ( $\epsilon_{\text{NADH}, 340 \text{ nm}} = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Az enzimek moláris specifikus aktivitásai a 8. táblázatban láthatóak.

A méréseket a standard foszfát pufferben végeztem, mely 300 mM KCl oldatot és 10 mM DTT is tartalmazott. A standard reakcióelegy a szubsztrátokat telítési koncentrációban tartalmazta: 0,25 mM IPM, 1,3 mM  $\text{NAD}^+$  és 0,35 mM  $\text{MnCl}_2$  vagy 3 mM  $\text{MgCl}_2$ . Az enzim koncentráció a Tt IPMDH esetén 0,16  $\mu\text{M}$ , az Ec és Vib enzim esetén pedig 0,08  $\mu\text{M}$  volt.

8. táblázat A különböző forrásból származó IPMDH-k specifikus aktivitás értékei

IPMDH forrás	Specifikus aktivitás ( $\text{perc}^{-1}$ )	
	$\text{Mn}^{2+}$ jelenlétében	$\text{Mg}^{2+}$ jelenlétében
<b>Tt</b>	450 $\pm$ 50	380 $\pm$ 50
<b>Ec</b>	1400 $\pm$ 150	1180 $\pm$ 150
<b>Vib</b>	1600 $\pm$ 150	1350 $\pm$ 150

A W152F és W77,152F mutáns Tt IPMDH enzimek specifikus aktivitása a vad típusú enzimével azonos, míg a W152,195F mutáns csak IPM-mel történő 1 órás inkubálás után mutatott aktivitást, melynek értéke  $\text{Mg}^{2+}$  kofaktor esetén 195  $\text{perc}^{-1}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  esetében pedig 230  $\text{perc}^{-1}$ .

## 4.2.5. Az enzimszerkezet stabilitásának meghatározása

### 4.2.5.1. Differenciális pásztázó mikrokolorimetria (DSC)

A differenciális pásztázó mikrokolorimetria lehetőséget ad a fehérje szerkezet hő hatására bekövetkező natív → denaturált átalakulást jellemző „olvadási” hőmérsékletet ( $T_m$ ) meghatározására, ami jellemzi a fehérje szerkezeti stabilitását. Minél magasabb hőmérsékleten következik be az átalakulás, a fehérje szerkezete annál nagyobb stabilitással rendelkezik. A mérés során a készülék a minta- és referencia-cella hőmérsékletét 0,1 °C pontossággal azonos hőmérsékleten tartja, miközben a hőmérsékletet egy meghatározott program szerint (például 1 °C/perc) emeli. Ehhez hőenergiát kellett befektetni, melynek mennyisége jól mérhető.

A DSC kísérletekben a vad típusú és mutáns Tt IPMDH olvadási hőmérsékleteit hasonlítottam össze annak megállapítására, hogy a mutáció okozott-e szerkezet változást. A méréseket MicroCal VP-DSC típusú mikrokoloriméteren (MicroCal) végeztem, melynek cellatérfogata 0,51 ml. A felfűtési sebességet 1 °C/perc-nek választottam. A fehérjekoncentráció (300 mM KCl tartalmú standard pufferverben) minden kísérletben 6,8  $\mu$ M (0,5 mg/ml) volt. A DSC mérések analiziséhez a Microcal Inc. DSC 5.0 Origin szoftvert használtam.

### 4.2.5.2. CD spektroszkópia

CD spektroszkópia segítségével ellenőriztem, hogy a Tt IPMDH mutánsok megfelelő másodlagos, ill. harmadlagos szerkezettel rendelkeznek-e. A méréseket JASCO 720 spekropolariméteren végeztem távoli (200-250 nm) ill. a közeli (270-340 nm) UV tartományban 20 °C-on (Neslab RTE 111 termosztát). A távoli UV esetén, mely a másodlagos szerkezeti elemekről nyújt felvilágosítást, az IPMDH koncentráció 1 mg/ml (13,6  $\mu$ M), a cellahossz pedig 0,1 mm volt, míg a közeli UV tartományban, mely a harmadlagos szerkezetet jellemzi, az IPMDH koncentráció 3,8 mg/ml (50  $\mu$ M), a cellahossz pedig 1 cm volt.

### 4.2.5.3. Natív gélelektroforézis

A mutáció következtében az enzim szerkezetében bekövetkező változások kimutatására alkalmas módszer a natív gélelektroforézis is. Az SDS gélelektroforézissel szemben, mely a molekulákat csak tömegük alapján választja el, a natív gélelektroforézisnél a molekulák töltései és alakja is fontos szerepet játszik az



elválasztás során. Tehát, ha a mutáció megváltoztatja az enzim szerkezetét és ezzel együtt a molekula alakját is, az kimutatható lehet a natív gélelektroforézis segítségével.

A natív gélelektroforézist Orstein és Davis munkája alapján végeztem [169]. Az elválasztó gél 10%-os, míg a tömörítő gél 5%-os volt akrilamidra nézve. A géltre 2-3 µg IPMDH enzimet vittem fel, majd az elválasztást pH=8,8 értéknél, jégben, 180 V-on, 1 órán át végeztem.

## 4.2.6. Az IPMDH egyensúlyi denaturációja és renaturációja

### 4.2.6.1. CD és fluoreszcencia spektroszkópia

A standard foszfát pufferben, mely még 300 mM KCl-ot és 10 mM DTT-t is tartalmazott, 1.0 mg/ml (13,6 µM) IPMDH oldatot 12-60 óráig szobahőmérsékleten inkubáltam különböző koncentrációjú, 0-8,5 M urea jelenlétében. A távoli UV CD spektrumok felvétele után a mintákat 6,5 µg/ml koncentrációra hígítva a fluorimetriás spektrumokat is megmértem kettős monokromátorral ellátott és Peltier termosztáttal felszerelt SPEX Fluoromax-3 spektrofluorimétert használva. Az elegyek pontos urea koncentrációját refraktométerrel határoztam meg.

A mérési eredmények értékelése során a kapott adatok 0 és 1 értékek közé történő normalizálását, ill. az átmenet előtt és után lévő szakaszok meredekségének korrigálását az alábbi egyenlet segítségével végeztem el [170]:

$$I_c = \frac{(I_{\min} + s_{\min} \cdot c_U) - I}{(I_{\min} + s_{\min} \cdot c_U) - (I_{\max} + s_{\max} \cdot c_U)} \quad 4. \text{ egyenlet}$$

ahol  $I_c$  a korrigált intenzitás,  $I_{\min}$  és  $I_{\max}$  a mért legkisebb és legnagyobb intenzitás,  $I$  a különböző urea koncentrációknál mért intenzitás,  $c_U$  az urea koncentrációja,  $s_{\min}$ ,  $s_{\max}$  pedig az átmenet előtt és után lévő szakaszok meredekségét jelöli. Az adatokat az 5. egyenletet használva illesztettem (SigmaPlot 6.0 segítségével), mely kétállapotú mechanizmus, ill. a háromállapotú mechanizmus (ld. 2.1.4. fejezet) egyes részlépései esetén alkalmazható, termodinamikai megfontolások alapján [170].

$$I_c = \frac{I_N + I_D \left( e^{\frac{m \cdot c_U - m \cdot c_{U50}}{RT}} \right)}{1 + e^{\frac{m \cdot c_U - m \cdot c_{U50}}{RT}}} \quad 5. \text{ egyenlet}$$

ahol  $I_c$  a korrigált intenzitás érték különböző urea koncentrációknál ( $c_U$ ),  $c_{U50}$  az egyensúlyi átmenethez tartozó urea koncentráció,  $I_N$  and  $I_D$  a natív és denaturált szintez

tartozó korrigált intenzitás értékek,  $m$  egy arányossági tényező, mely a denaturált fehérje oldószernek való nagyobb kitétségét tükrözi,  $R$  a gázállandó,  $T$  pedig az abszolút hőmérséklet. Az illesztés alapján a  $c_{U50}$  és az  $m$  érték meghatározható.

A szabad entalpia 0 M ureára extrapolált értékének ( $\Delta G^0$ ) meghatározásához először az egyes részfolyamatok egyensúlyi állandóinak meghatározása szükséges, melyet az alábbi egyenlet segítségével tettem meg [171]:

$$K = \frac{4}{I_N - 2 \cdot I_D} \frac{c \cdot (I_N - I_c)^2}{I_c - 2 \cdot I_D} \quad 6. \text{ egyenlet}$$

ahol  $K$  az egyes részfolyamatok egyensúlyi állandója,  $I_c$  a korrigált intenzitás érték különböző urea koncentrációknál,  $I_N$  and  $I_D$  a natív és denaturált szinthez tartozó korrigált intenzitás értékek,  $c$  pedig a teljes fehérje koncentrációja.

Az egyensúlyi állandó ismeretében a szabad entalpia az alábbiak alapján számolható:

$$\Delta G_{N \rightarrow D} = -RT \cdot \ln K \quad 7. \text{ egyenlet}$$

Ennek segítségével pedig a  $\Delta G^0$  érték már könnyen meghatározható az  $m$  ismeretében:

$$\Delta G^0 = \Delta G_{N \rightarrow D} + m \cdot c_U \quad 8. \text{ egyenlet}$$

ahol  $\Delta G_{N \rightarrow D}$  a már korábban említett szabadentalpia változás a denaturáció során,  $m$  egy arányossági tényező, mely a denaturált fehérje oldószernek való nagyobb kitétségét tükrözi,  $c_U$  pedig az urea koncentrációja.

#### 4.2.6.2. Ureagradiens gélelektroforézis

Az ureagradiens gél (0-8 M) elkészítéséhez Creighton munkája szolgált alapul [172]. Ennek során a gél készítésével egyidőben egy fokozatosan növekvő urea koncentrációt hozunk létre. A denaturációs átmenet akkor figyelhető meg, ha az urea gradiensének iránya merőleges az elektroforézis futásának irányára. A denaturáció, ill. a renaturáció tanulmányozásához standard pufferben lévő 100  $\mu$ l 300  $\mu$ g/ml IPMDH enzimet használtunk fel. Az elektroforézis puffer 10 mM Tris-HCl (pH 8,3) oldatot és 10 % glycerol tartalmazott. Az elektroforetikus elválasztás 25°C-on 200 V-on és 3 órán át (Ec és Vib IPMDH-k esetén) vagy 50 V-on 13 órán át történt (Tt IPMDH esetén). A gélek festéséhez Coomassie Brilliant Blue festéket, ill. ezüst festést alkalmaztunk.

#### 4.2.7. Az IPMDH denaturációjának és renaturációjának kinetikája

A renaturáció követéséhez a Tt, Ec és Vib IPMDH enzimeket először 600 µg/ml (8,15 µM) koncentrációban denaturáltam 24 órán, 1 órán, ill. 10 percen keresztül 8,5 M ureát tartalmazó standard foszfát pufferben, mely 300 mM KCl-ot és 10 mM DTT-t is tartalmazott. A KCl nem befolyásolta a denaturáció ill. renaturáció folyamatát. A renaturáció folyamatát a denaturált fehérje – ureát nem tartalmazó pufferbe való 10-100-szoros hígításával indítottam el. A fluorimetriás detektálás esetén a gyors hígítást a küvettába helyezett mágneses keverő (holtidő 1 másodperc) biztosította. Bizonyos esetekben a gyors szakasz követése stopped flow készülék (Unisoku Inc., Japan) segítségével történt. A renaturációs elegy fehérje koncentrációja 6 és 120 µg/ml (0,08-1,63 µM) között változott a mérések során.

Az IPMDH-k denaturációs folyamatának időfüggését a natív enzim 8,5 M ureát tartalmazó pufferbe történő hígítását követően vizsgáltam. Mind a renaturáció, mind a denaturáció kinetikáját 20 °C-on az alábbiakban ismertetett módszerekkel követtem. A kísérleteket a szubsztrátok jelen- és távollétében is elvégeztem. Az enzimaktivitás mérésnél megadott szubsztrát koncentráció értékeket alkalmaztam a kísérletek során is. A NADH-t a NAD<sup>+</sup>-al megegyező koncentrációban használtam. Az IPMDH-k renaturációjának mértéke 50-70 % között változott az alkalmazott követési módszertől függetlenül.

##### 4.2.7.1. Enzimaktivitás változásának követése

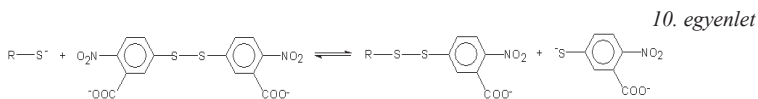
Az aktivitás elvesztését, oly módon követtem a denaturáció folyamata során, hogy a denaturációs elegyből különböző időpillanatokban mintát vettem, melyek az aktivitás elegyekben 60-110-szeresére hígultak. Az egyes időpontokban az enzim aktivitását az aktivitási görbe kezdeti meredekségének (5-10 másodperc) meghatározásával kaptam meg, így a fellépő reaktiválás még nem befolyásolta a denaturáció folyamatát. A renaturáció során fellépő reaktiválás követésénél a renaturációs elegyből adott pillanatokban történő mintavétel után a fentiekhez hasonlóan történt az aktivitás meghatározása. A denaturáció folyamán kapott aktivitás értékek időgörbéjének illesztése exponenciális egyenlettel volt leírható, míg a renaturáció, vagyis az aktivitás visszatérése két lépéses, elsőrendű szekvenciális mechanizmussal volt jellemezhető (9. egyenlet).

$$v = A \cdot \frac{k_2 \cdot (1 - e^{-k_1 \cdot t}) - k_1 \cdot (1 - e^{-k_2 \cdot t})}{k_2 - k_1} \quad 9. \text{ egyenlet}$$

ahol  $v$  a mért aktivitás,  $A$  az a maximális aktivitás, amit az enzim a renaturáció során elér,  $k_1$  és  $k_2$  pedig a sebességi állandók.

#### 4.2.7.2. Tiol-csoport hozzáférhetőség változásának követése

A tiol-csoportok hozzáférhetőségének vizsgálatához a kísérletekben reagensként DTNB-t használtam (10. egyenlet). A reakció folyamán az abszorbanciában bekövetkező növekedést mértem spektrofotometriásan 412 nm-es hullámhossznál, mely a keletkező tiolát-anionnak tulajdonítható ( $\epsilon_{412}=14150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [173]).



A Tt IPMDH nem rendelkezik tiol-csoporttal, míg az Ec és Vib IPMDH enzimek 12, ill. 4 mól/mól enzim tiol-csoportot tartalmaznak. A denaturált enzimekkel végzett kísérletek során, az enzim SH-csoportjaihoz viszonyítva legalább 10-szeres moláris feleslegben alkalmazva a DTNB-t (1,3 mM) az IPMDH tiol-csoportjai 5-10 másodperc alatt elreagálnak. A tiol-csoport tartalom ezek alapján 8-10, ill. 3-3,5 mól/mól értéknek adódott az Ec és Vib IPMDH esetén. Natív körülmények között az Ec enzim csak 2 mól/mól reagáló tiol-csoportot tartalmaz, míg a natív Vib IPMDH-ban nincs szabadon hozzáférhető reaktív csoport. Az eltemetett tiol-csoportok mindkét enzim esetén csak órák alatt reagálnak el. A denaturáció folyamatának követéséhez különböző időpillanatokban mintát vettem a denaturációs elegyből és vizsgáltam a hozzáférhető, reaktív tiol-csoportok számának növekedését. Ezt a denaturáció viszonylag lassú folyamatához képest a nagy koncentrációjú DTNB-vel való gyors reakció tette lehetővé.

#### 4.2.7.3. CD spektroszkópia vizsgálatok

A denaturáció és renaturáció folyamatát 225 nm-en 1 cm fényúthosszú kűvettában követtem, kézi keverést alkalmazva, 10 µg/ml (136 nM) fehérje koncentrációnál.

#### 4.2.7.4. Fluoreszcencia spektroszkópia vizsgálatok

##### Fehérje fluoreszcencia

A Tt, Ec és Vib vad típusú IPMDH-k denaturációjának és renaturációjának összehasonlítása esetén a gerjesztés 275 nm-en, míg a vad típusú Tt IPMDH és Trp mutánsai esetén 295 nm-en történt. Az emissziót 335 nm-en detektáltam. A gerjesztési rés szélessége 2 nm, míg az emissziós rés szélessége a fehérje koncentrációtól függően 2 vagy 4 nm volt. A mérések során 10 mm fényúthosszú kuvettát használtam.

A renaturáció fluorimetriás követése során kapott adatok kétlépéses, szekvenciális mechanizmussal voltak leírhatóak (11. egyenlet).

$$\text{Intenzitás} = A_1 \cdot (1 - e^{-k_1 \cdot t}) + A_2 \cdot \frac{k_2 \cdot (1 - e^{-k_1 \cdot t}) - k_1 \cdot (1 - e^{-k_2 \cdot t})}{k_2 - k_1} \quad 11. \text{ egyenlet}$$

ahol  $k_1$  és  $k_2$  a sebességi állandók,  $A_1$  és  $A_2$  pedig az időgörbék gyors és lassú szakaszában bekövetkező intenzitásváltozások.

##### ANS fluoreszcencia

A mérés alapja az, hogy az ANS – mivel nem specifikus módon kötődik a molekulák hidrofób felszínéhez, és ezt fluoreszcencia jel változása kíséri – alkalmas a denaturáció, ill. renaturáció követésére [174]. Az ANS koncentrációját vizes oldatban határoztam meg  $\epsilon_{350} = 4954 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  abszorpciós koefficiens segítségével [175]. A renaturáció folyamatát a fentiekhez hasonlóan indítottam el. A renaturációs elegyben az ANS 200-szoros moláris feleslegben volt az IPMDH enzimhez képest. A gerjesztést 350 nm-en végeztem, míg a kinetikát 480 nm emissziós hullámhossznál követtem. Mind a gerjesztési, mint az emissziós rés 4 nm volt.

A mérési adatok a következő szekvenciális egyenlettel voltak illeszthetőek:

$$\text{Intenzitás} = A_0 - A_1 \cdot (1 - e^{-k_1 \cdot t}) - A_2 \cdot \frac{k_2 \cdot (1 - e^{-k_1 \cdot t}) - k_1 \cdot (1 - e^{-k_2 \cdot t})}{k_2 - k_1} \quad 12. \text{ egyenlet}$$

ahol  $A_0$  a kezdeti detektálható intenzitás a renaturáció folyamán, míg a többi jelölés megfelel a már korábban leírtaknak.

##### Fluoreszcencia Rezonancia Energia Transzfer (FRET)

Az IPMDH esetén Dean és Dvorak [139] megfigyelték a FRET jelenségét, mely során az IPMDH-ban lévő Trp(ok) és a kötött NADH molekula között fluoreszcencia energia transzfer jön létre. Mivel a FRET a natív enzim jellemzője, ezért kialakulásának kinetikájával követhető az IPMDH renaturációja. A renaturációs elegyben az IPMDH

12  $\mu\text{g/ml}$  (0,16  $\mu\text{M}$ ), a NADH 12,5  $\mu\text{M}$ , a  $\text{MgCl}_2$  3 mM, míg az IPM 0,6 mM koncentrációban volt jelen. A Trp-okat specifikusan 295 nm-en gerjesztve, a NADH 410 nm-nél lévő emissziós maximumánál követtem a FRET kialakulását.

Mivel a FRET IPM jelenlétében alakul csak ki, segítségével az IPM kötőhelyének kialakulásáról is információt kaphatunk a renaturáció során. Mindehhez különböző IPM koncentrációknál követtem a renaturációt a fenti módszerrel, majd a különböző adott időpillanatokhoz tartozó intenzitás értékeket ábrázoltam az IPM koncentráció függvényében. Az egyes görbéket a 13. egyenlettel illesztve, megkaptam az IPM egyes időpontokhoz tartozó disszociációs állandóit.

$$I = \frac{I_{\max} \cdot C_{\text{IPM}}}{K_d + C_{\text{IPM}}} \quad 13. \text{ egyenlet}$$

ahol  $I$  a mért intenzitás,  $C_{\text{IPM}}$  az IPM koncentrációja,  $K_d$  a disszociációs állandó,  $I_{\max}$  pedig a maximálisan elért intenzitás. A görbeseregéből meghatározott  $K_d$  értékek a szubsztrát kötődésének változását jellemzik a renaturáció során.

### Fluoreszcencia anizotrópia

Gerjesztő fény hatására a molekulák polarizálódnak, melynek mértékét számos tényező befolyásolja, így pl. a dipólust hordozó molekula mérete, alakja, a gerjesztett állapot élettideje, a viszkozitás és hőmérséklet. E tényezők és a polarizáció összefüggését írja le a Perrin egyenlet (14. egyenlet).

$$\frac{1}{p} \pm \frac{1}{3} = \left( \frac{1}{p_0} \pm \frac{1}{3} \right) \left( 1 + \frac{RT\tau}{\eta V_0} \right) \quad 14. \text{ egyenlet}$$

ahol,  $p$  a polarizáció,  $p_0$  a belső polarizáció,  $\tau$  a gerjesztett állapot élettideje,  $\eta$  a viszkozitás,  $V_0$  a molekula térfogata,  $R$  az egyetemes gázállandó,  $T$  pedig a hőmérséklet. Mivel a polarizáció értékét a vizsgált molekula térfogata, azaz mérete is érzékenyen befolyásolja, a polarizáció változásának követése a renaturáció során információt adhat arról, hogy a dimerizáció milyen időskálán következik be. A mérések során síkban polarizált 275 nm hullámhosszúságú fényrel gerjesztettem a molekula fluoreszcens oldalláncait, majd az emittált fény függőleges és vízszintes összetevőinek intenzitását ( $I_{\text{VH}}$  és  $I_{\text{VH}}$ ) detektáltam, melyből a polarizáció, ill. anizotrópia értékek már számolhatóak voltak.

$$p = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + GI_{VH}} \quad r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2 \cdot GI_{VH}} \quad 15. \text{ egyenlet}$$

ahol  $p$  a polarizáció,  $r$  az anizotrópia,  $G = I_{HV} / I_{HH}$ , pedig az adott műszerre jellemző faktor. Az első index a gerjesztési, a második pedig az emissziós polarizátor helyzetét jelöli.

#### 4.2.8. Molekuláris grafikai analízis

A hőstabilitás tanulmányozásához használt IPMDH szekvenciák a Swissprot adatbázisból származnak. A keresés eredményeképpen 272 szekvencia állt rendelkezésemre, 233 származott baktériumból, míg 39 eukariótából és archeából. A 272 szekvenciát a CLUSTALW program segítségével rendeztem össze. 95 %-os azonosságot tekintve 46 oldallánc adódott konzervatívnak. A hőstabilitás lehetséges okát keresve a szekvenciákat 3 csoportba rendeztük. Így nyolc adódott termofilnak (néhány hipertermofil, mérsékelt termofil ill. redundánsan előforduló termofil szekvenciát nem tekintve), 243 mezofilnak és 7 hidegkedvelőnek. Az egyetlen hidegtűrő szekvenciát, a Vib IPMDH-t is ebbe a kategóriába soroltuk be. Azért, hogy az egyes csoportokban összehasonlítható számú szekvenciával dolgozhassunk a mezofil csoportból csak a már térszerkezettel rendelkező IPMDH-kat, ill. néhány olyan szekvenciát tartottunk meg, mellyel korábban már mutációs vizsgálatokat végeztek. Az így kapott 8 mezofil szerkezet jól reprezentálja a teljes csoportot. A három különböző hőstabilitású csoport tanulmányozásával kiválasztottunk 27 nem konzervatív oldalláncot, melyek csoporton belül jellegükben hasonlóak, de eltérnek az egyes csoportok között. A hasonlóság alapján a  $pK$ -t, polaritást, hidrofóbicitást, méretet és alakot (alifás vagy aromás) tekintettük. Ezen kívül megvizsgáltunk még néhány egyéb nem konzervatív oldalláncot is, melyeknek mutációs kísérletek alapján szerepe lehet a hőstabilitás kialakításában. A konzervatív és nem konzervatív oldalláncok kölcsönhatásainak feltérképezéséhez a Tt (1XAA, 1HEX), Ec (1CM7) kristályszerkezetét és a Vibrio IPMDH homológia modelljét használtuk, melyhez az INSIGHTII (Byosim/MSI, San Diego, CA) program nyújtott segítséget. A H-hid kötések 3,5 Å, a hidrofób kölcsönhatásokat 4,5 Å, az ionos kölcsönhatásokat pedig 4,0 Å-ig vettük figyelembe.

#### 4.2.9. Kontaktusrend meghatározása

A kontaktusrend a natív topológia összetettségét jellemzi a szekvenciában távol lévő oldalláncok között kialakult kölcsönhatások segítségével. A kilenc ismert térszerkezetű IPMDH-ra (ld. 14. táblázat) a relatív és az abszolút kontaktusrend kiszámítása az alábbi képletek alapján történt [176]:

$$\text{Relatív CO: } \frac{1}{L \cdot N} \sum^N \Delta L_{ij} \quad 16. \text{ egyenlet}$$

$$\text{Abszolút CO: } \frac{1}{N} \sum^N \Delta L_{ij} \quad 17. \text{ egyenlet}$$

ahol  $N$  a kölcsönhatások száma ( $6 \text{ \AA}$  távolságon belül),  $L$  a fehérje aminosavainak száma,  $\Delta L_{ij}$  pedig a két kölcsönható aminosavat elválasztó aminosavak száma.



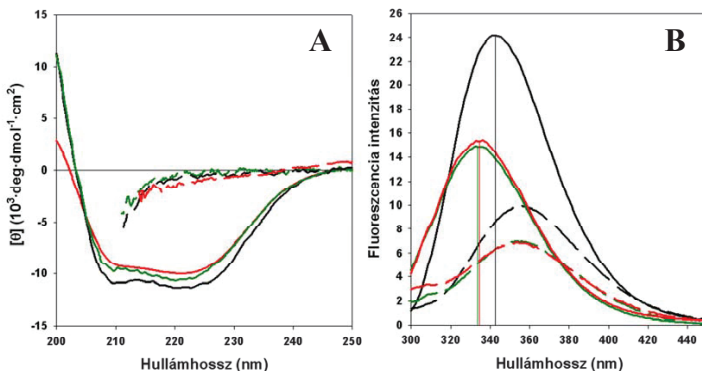
## 5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTELMEZÉSÜK

### 5.1. A térszerkezet kialakulás és felbomlás kapcsolata a hőstabilitással

#### 5.1.1. Egyensúlyi vizsgálatok

Az IPMDH-val korábban végzett kísérletek alapján nem volt egyértelmű, hogy a különböző hőstabilitású IPMDH-k térszerkezete azonos vagy eltérő mechanizmus szerint alakul-e ki. A Tt IPMDH térszerkezetének kialakulása, ill. felbomlása egyensúlyi mérések alapján inkább kétállapotú modellt követett, de háromállapotú mechanizmussal is leírható volt. Az Ec IPMDH kísérleti adatai csak háromállapotú mechanizmussal voltak leírhatóak. Kérdésként merült fel, hogy a térszerkezet kialakulás mechanizmusa és a hőstabilitás között van-e valamilyen összefüggés, vagy az összes IPMDH térszerkezete azonos módon alakul ki. A kérdés eldöntésére a termofil és mezofil IPMDH mellett megvizsgáltam a hidegtűrő Vib IPMDH viselkedését is az egyensúlyi denaturációs-renaturációs folyamatokban.

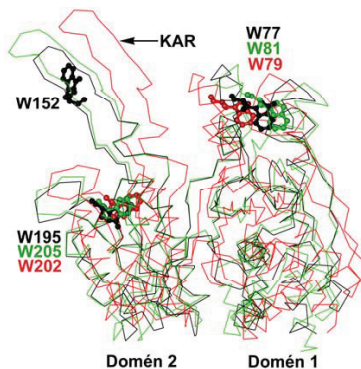
A három különböző hőstabilitású IPMDH-t különböző koncentrációjú urea jelenlétében denaturáltam és CD-, ill. fehérje fluoreszcencia spektroszkópia segítségével, valamint ureagradiens gélelektroforézissel követtem a folyamatokat. Az előbbieket az tette lehetővé, hogy a natív és denaturált IPMDH spektrális tulajdonságai jelentős mértékben különböznek egymástól (11A és 11B ábrák).



**11. ábra** Az IPMDH spektrális tulajdonságai A Tt (fekete), Ec (zöld) és Vib (piros) IPMDH enzimek natív (folyamos vonal) és 8,5 M urea jelenlétében denaturált (szaggatott vonal) állapotainak távoli UV CD- (A) és fehérje fluoreszcencia spektroszkópiával (B) regisztrált spektrumai. A CD spektroszkópiai méréseknél mg/ml (16  $\mu$ M), a fluoreszcencia spektroszkópia esetén 12  $\mu$ g/ml (0,16  $\mu$ M) volt az enzim koncentrációja. A natív enzimek fluoreszcencia intenzitás maximumát függőleges vonallal szemléltettem.

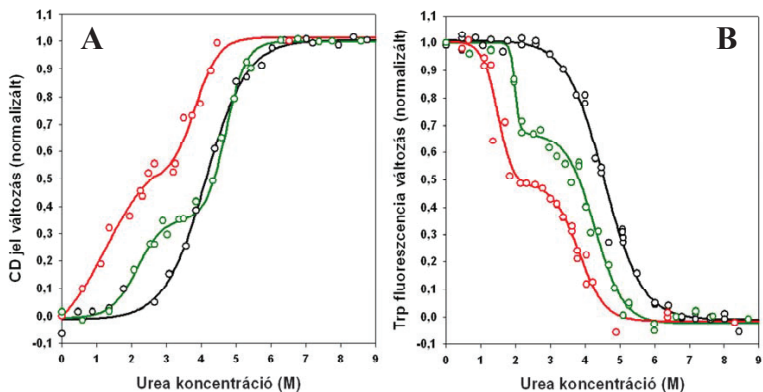
A három különböző IPMDH spektrumait különböző színekkel jelöltem és a továbbiakban is ezt a színkódot fogom alkalmazni. A három enzim natív CD spektruma igen hasonló, mely az IPMDH erősen konzervált másodlagos szerkezeti elemeiből, ill. azoknak a háromdimenziós szerkezetben való elrendeződéséből adódik. A 8,5 M ureában inkubált IPMDH enzimek spektruma a teljesen denaturált fehérjékre jellemző.

A natív IPMDH-k fehérje fluoreszcencia spektruma (11B ábra) – a CD spektroszkópiával ellentétben – különbözik egymástól. Mindezt eltérő Trp tartalmuk magyarázza. Míg az *Ec* és *Vib* IPMDH alegységenként csak két Trp oldalláncot tartalmaz, addig *Tt* enzim kar régiójában az előbbiekhöz képest egy további Trp is található (12. ábra). Így a *Tt* enzim nagyobb fluoreszcencia intenzitással rendelkezik, valamint a maximális intenzitáshoz tartozó hullámhossz ( $\lambda_{\max}$ ) is a magasabb értékek felé tolódik el (335 nm-ről 342 nm-re), mely a Trp oldalláncok eltérő környezetével magyarázható. A denaturáció folyamatát nagy mértékű intenzitás csökkenés, valamint a  $\lambda_{\max}$  magasabb hullámhosszak felé való eltolódása kíséri.



**12. ábra** A Trp oldalláncok elhelyezkedése a *Tt*, *Ec* és *Vib* IPMDH-ban. A három különböző hőstabilitású enzim egy-egy alegységét a korábban már bevezetett színekkel mutatom be. A Trp oldalláncokat gömb-pálcica modellel jelöltem.

Az egyensúlyi mérések során különböző urea koncentrációk jelenlétében, megvárva a denaturációs egyensúlyi állapot beálltát, regisztráltam a CD- és fluoreszcencia spektrumokat. A kísérleti adatok értékelését a Módszerek 4-8. sz. egyenletei alapján végeztem. A kapott eredményeket a 13. ábrán, ill. az egyes folyamatokat jellemző paramétereket a 9. táblázatban mutatom be. A *Tt* IPMDH esetén egyértelműen egyszerű kétállapotú átmenet volt megfigyelhető, míg az *Ec* és *Vib* enzimeknél intermedier állapot jelenlétére következtethetünk a közti urea koncentrációknál (13. ábra).



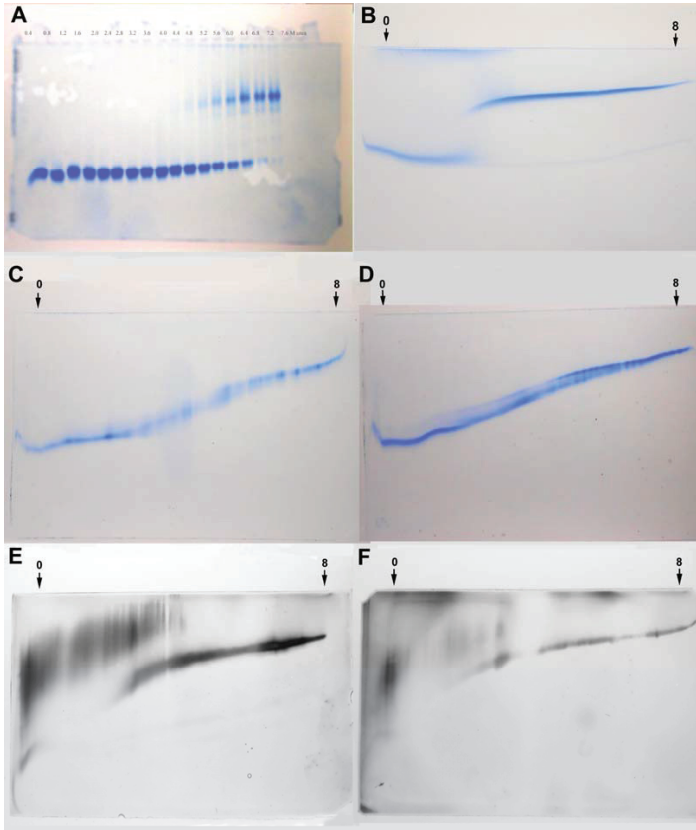
13. ábra Tt, Ec és Vib IPMDH egyensúlyi denaturációja CD spektroszkópiával (A) és Trp fluoreszcenciával (B) követve A fehérje koncentráció 1 mg/ml volt a CD-, valamint 6,5 µg/ml volt a fluoreszcencia spektroszkópia esetén. A Tt (fekete), Ec (zöld) és Vib (piros) mintákat különböző urea koncentrációk mellett inkubáltam 60, 36, ill. 12 órán át. A CD spektrum változását 220 nm-en követtem. A Trp fluoreszcencia esetén a gerjesztő fény hullámhossza 275 nm volt, az emissziót 330 és 360 nm között regisztráltam.

Az egyensúlyi átmenethez tartozó urea koncentrációk ( $c_{U50}$ ) mindkét módszer esetén jól tükrözik a stabilitásbeli különbségeket, bár a mérési bizonytalanságból adódóan kisebb eltérések megfigyelhetők. A 0 M urea koncentrációra extrapolált szabadentalpia változás értéke  $\Delta G^0$  mind a mezofil Ec, mind a hidegtűrő Vib enzim esetén (itt a részfolyamatok összege számít) jóval magasabb a termofil enziménél. Tehát az adatok a Vib enzimekre is kiterjesztik a 2.3.5.2. fejezetben és a 4. ábrával kapcsolatban már tárgyalt mechanizmust. Egyrészt, a Tt IPMDH szerkezete nem a denaturációs szabadentalpia változás növelésével stabilizálódik, hanem ez a függvény kevésbé érzékeny a hőmérséklet változására [129]. Másrészt, bár a hidegtűrő Vib és mezofil Ec

9. táblázat A Tt, Ec és Vib IPMDH-k egyensúlyi denaturációját jellemző paraméterek  $c_{U50}$  az egyensúlyi átmenethez tartozó urea koncentráció,  $m$  egy arányossági tényező, mely a denaturált fehérje oldószerek való nagyobb kitétségét tükrözi,  $\Delta G^0$  a denaturációs szabadentalpia 0 M ureára extrapolált értéke

IPMDH	Módszer	$c_{U50}$ (M)		$m$ (kJ)		$\Delta G^0$ (kJ)		$\Sigma \Delta G^0$ (kJ)
		1.	2.	1.	2.	1.	2.	1. + 2.
Tt	CD	4,13		3,9		47,2		47,2
	Fluoreszcencia	4,55		5,5		63,4		63,4
Ec	CD	2,18	4,65	10,3	7,6	54,6	66,1	120,7
	Fluoreszcencia	1,99	4,28	17,8	4,1	47,6	29,6	77,2
Vib	CD	1,32	3,86	4,5	5,9	37,0	52,8	89,8
	Fluoreszcencia	1,50	3,81	23,4	2,6	71,1	21,7	92,8

enzim  $\Delta G^0$  értékei nagyon hasonlóak, az Ec IPMDH a Vib enzimhez képest nagyobb szerkezeti stabilitását – a 4. ábrán bemutatottaknak megfelelően – feltehetően szintén azon hőmérséklet tartomány kiszélesedésével éri el, ahol az enzim még stabil szerkezettel rendelkezik. Érdekes, hogy az Ec és Vib enzimek működésének optimális hőmérsékleti tartománya azonos, bár hőstabilitásuk eltérő. Ez feltehetően azzal függ össze, hogy a hidegtűrő enzim aktivitása minden hőmérsékleten meghaladja a mezofil Ec IPMDH aktivitását [164].



**14. ábra** Tt (A, B), Ec (C, D) és Vib (E, F) IPMDH ureagradiens gélelektroforézise. Az A, C, E és F ábra a denaturációt, míg a B és D ábra a renaturációt mutatja be. A géltre 30  $\mu\text{g}$  IPMDH-t vittünk fel, kivéve az (F) ábrát, ahol 3  $\mu\text{g}$  volt az enzimmennyiség. Az E és F ábra esetében a fehérje kimutatására ezüsfestést használtuk. A Tt enzimet (A) gélen való denaturációja előtt 36 órány keresztül különböző urea koncentrációknál inkubáltuk. Az Ec és Vib enzimmél (C, E és F) a denaturáció az elektroforézis alatt megtörtént. Az urea koncentrációja a gélben balról jobbra haladva 0 és 8 M között lineárisan változott.

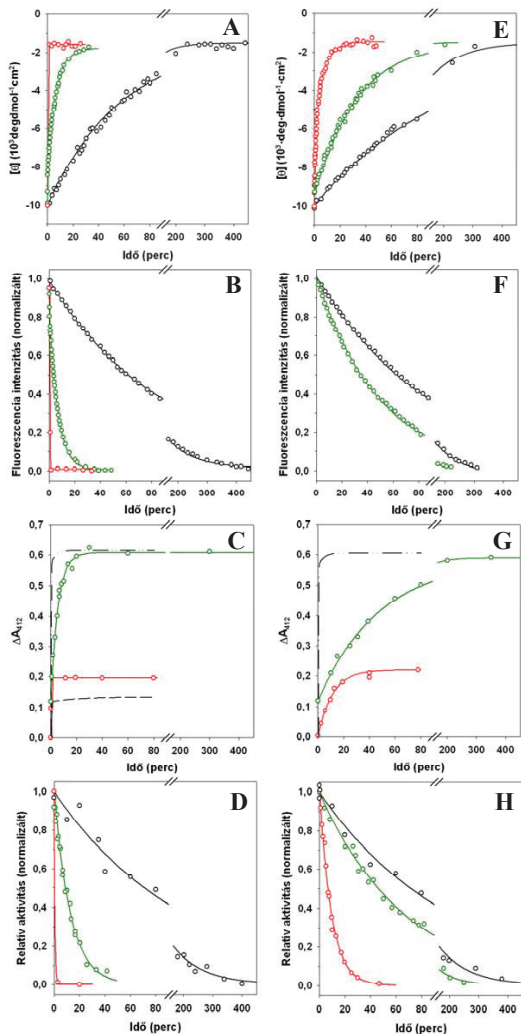
A spektroszkópiai módszerek mellett az egyensúlyi folyamatok megértéséhez hasznos és kellő érzékenységű eszköz a gélelektroforézis is, mely segíthet az egyes fehérje konformációs, ill. oligomerizációs állapotok elkülönítésében és az átmeneti állapotok analizisében, annak ellenére, hogy a fehérje konformáció és elektroforetikus mobilitás közötti összefüggés igen bonyolult. A mobilitás tulajdonképpen a natív szerkezetre jellemző kompaktsággal arányos, így annak elvesztésével fokozatosan csökken. A Tt IPMDH esetén az ureagradiens gélelektroforézis megerősítette a spektroszkópiás módszerekkel kapott eredményeket, azaz egyetlen éles átmenet látható a nagy mozgékonyssággal rendelkező, feltekeredett, kompakt szerkezetű dimer és a kitekeredett denaturált monomer állapot között, mind a denaturáció (14A ábra), mind a renaturáció (14B ábra) esetén. Tehát ez a módszer is a denaturációs intermedier hiányát mutatta a termofil Tt IPMDH enzimnél. Az Ec (14C és D) és Vib (14E és F) enzimeknél az átmenet széles urea koncentráció tartományban következik be, összhangban az átmeneti urea koncentrációknál megjelenő intermedier állapot jelenlétével. Annak ellenére, hogy magas fehérje koncentrációnál az érzékenyebb Vib enzim aggregálódik (14E ábra), egyértelműen elmondható, hogy a fehérje denaturációja (kompaktságának elvesztése) és a monomerekre való disszociációja egymással párhuzamosan zajlik, akárcsak a renaturáció folyamán az asszociáció és dimerizáció folyamata.

Bár a termofil Tt IPMDH denaturációja az egyensúlyi mérések szerint, az Ec és Vib enzimekhez hasonlítva látszólag egyszerűbb mechanizmussal zajlik, az analizis teljességéhez, ill. a mechanizmus hőstabilitással való összefüggésének megismeréséhez a denaturáció és renaturáció folyamatainak időben való követése és kinetikai analizise is szükséges.

## **5.1.2. Kinetikai vizsgálatok**

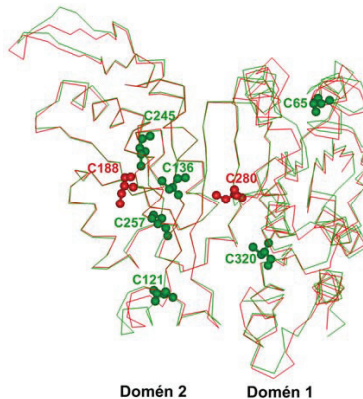
### *5.1.2.1. Különböző hőstabilitású IPMDH enzimek denaturációs kinetikája*

A natív IPMDH enzimeket 8,5 M ureát tartalmazó pufferbe keverve a fehérjeláncok kitekeredése azonnal elindul, mely folyamatot különböző módszerekkel követtem. A 11. ábrán bemutatott spektrális változások alapján a távoli UV CD spektroszkópia (15A és E ábra) segítségével a másodlagos szerkezeti elemek eltűnését figyelhettem meg, míg a fehérjében lévő fluoreszcens oldalláncoknak, mint pl. a Trp vagy Tyr köszönhetően a fehérje harmadlagos szerkezetének változásai is követhetővé váltak (15B és F ábra).



15. ábra A különböző hőstabilitású IPMDH enzimek denaturációs kinetikájának összehasonlítása A Tt (fekete), Ec (zöld) és Vib (piros) IPMDH enzimek denaturációs kinetikáját a szubsztrát (0,25 mM IPM, 0,35 mM MnCl<sub>2</sub>) távol- (A–D) és jelenlétében (E–H) is követtem CD- (A és E), fluoreszcencia spektroszkópia (B és F), tiol-csoport hozzáférhetőség (C és G) és az enzim aktivitás mérés (D és H) segítségével. A fehérje koncentrációk 0,1 mg/ml (1,6  $\mu$ M) (A és E), 0,01 mg/ml (0,16  $\mu$ M) (B és F), 0,44 mg/ml (5,9  $\mu$ M) (C és G) és 0,7 mg/ml (11  $\mu$ M) (D és H) voltak. A kísérleti adatok egy exponenciális egyenlettel illeszthetők, az így kapott sebességi állandókat a 10. táblázatban foglaltam össze. A C és G ábrákon a pont-vonal a denaturált Ec IPMDH reakcióját mutatja be a DTNB-vel, míg a natív Ec enzim gyorsan elreagáló tiol-csoportjainak módosítását a szaggatott vonal jelöli.

Látható, hogy a CD spektrum eltűnése, ill. a fluoreszcencia intenzitás csökkenése viszonylag lassú folyamat, főként a Tt, de az Ec enzim esetén is. A folyamat lényegében a másodlagos szerkezeti elemek eltűnését, ill. a fluoreszcens oldalláncok környezetének változását tükrözi a fehérje kitekeredése során. A fehérje szerkezetének felbomlását a denaturáció során felszínre kerülő ciszteinil oldalláncok DTNB-vel való reakcióképességének vizsgálatával is tanulmányoztam az Ec és Vib enzim esetén. Ezen oldalláncok nagy része a natív állapotú fehérjemolekulák belsejében eltemetve helyezkednek el (16. ábra). A 15 C ábrán szaggatott vonal jelzi a natív állapotú Ec enzim molekula felszínén elhelyezkedő (2 mól/mól alegységenként) tiol-csoportok DTNB-vel való gyors reakcióját, mely kb. 1 percen belül befejeződik. A denaturáció során a többi eltemetett tiol-csoport is felszínre kerül és a denaturáció sebességéhez képest igen gyorsan, gyakorlatilag azonnal elreagál az alkalmazott DTNB koncentráció mellett. Így a módosítás sebességét a fehérjemolekula kitekeredésének sebessége szabja meg, ez követhető az időgörbékben (15 C és G ábra). A Tt IPMDH molekulája egyáltalán nem tartalmaz Cys aminosavakat, tehát itt ez a módszer nem alkalmazható a denaturáció követésére.



**16. ábra** A ciszteinil oldalláncok elhelyezkedése az Ec és Vib IPMDH enzimekben. Mind az Ec (zöld), mind a Vib (piros) enzim egy alegységét tüntettem fel gömb-pálcika modellel kiemelve a ciszteinil oldalláncok helyzetét. Az Ec IPMDH-ban mólónként 6, a Vib enzimben mólónként 2 ciszteinil oldallánc található.

További lehetőség a denaturáció vizsgálatára az aktivitás elvesztésének követése (15D és H ábra), hiszen a kitekeredett fehérje már nem képes funkcióját ellátni. Természetesen az aktivitásmérés denaturáló körülmények között (8,5 M urea) nem lehetséges, de mivel a denaturáció is időt igénylő folyamat (ld. alább) a 8,5 M urea

tartalmú denaturációs elegyből vett mintát az aktivitás-mérő reakció elegybe keverve (és ezáltal az urea koncentrációját kellően csökkentve) a mért kezdeti sebességek kellő realitással tükrözik a denaturáció adott időpontjában az enzim aktivitását.

A denaturáció követésére alkalmazott mindegyik módszerrel azt kaptam, hogy a fehérje letekeredése egyszerű, elsőrendű folyamat. A kísérleti adatok illesztéséből származó sebességi állandók szintén nem függenek a vizsgálat módszerétől (10. táblázat). Mindez azt jelenti, hogy a fehérje molekula különböző régiói, ill. a másod- és harmadlagos szerkezeti elemek egymással párhuzamosan bomlanak fel a denaturáció során.

**10. táblázat A különböző hőstabilitású IPMDH-k denaturációjának sebességi állandói (perc-1) A sebességi állandókat a 15. ábrán feltüntetett mérési adatok egy exponenciálissal történő illesztésével kaptam.**

Enzim	Mn*IPM	Távoli-UV CD	Fehérje fluoreszcencia	Aktivitás	Tiol- reaktivitás <sup>a</sup>
<b>Tt</b>	–	0,015 ± 0,003	0,013 ± 0,002	0,010 ± 0,003	–
	+	0,013 ± 0,002	0,012 ± 0,002	0,009 ± 0,002	–
<b>Ec</b>	–	0,14 ± 0,05	0,14 ± 0,06	0,077 ± 0,026	0,140 ± 0,06
	+	0,023 ± 0,004	0,021 ± 0,003	0,015 ± 0,003	0,017 ± 0,003
<b>Vib</b>	–	> 10	> 10	> 10	> 10
	+	0,12 ± 0,04	nincs adat	0,100 ± 0,03	0,087 ± 0,033

<sup>a</sup> A Tt IPMDH nem rendelkezik tiol-csoporttal.

A különböző hőstabilitású IPMDH enzimek denaturációjának sebességét összehasonlítva azt is megállapítottam, hogy a hőstabilitás növekedésével a denaturáció sebessége csökken. Minél stabilabb az IPMDH molekula, annál több idő szükséges a fehérje szerkezetének felbontásához. A denaturáció féléletideje 1 óra, néhány perc és néhány másodperc volt a termofil, mezofil ill. hidegkedvelő IPMDH-ra nézve.

Az IPMDH denaturáció folyamatát szubsztrátok jelenlétében is tanulmányoztam. Ennek során követtem a működő terner komplex (IPMDH\*NAD\*MnIPM), a nem működő terner komplex (IPMDH\*NADH\* MnIPM) és az egyes szubsztrátokkal külön-külön alkotott binér komplexek denaturációs kinetikáját is. A terner komplexek és a Mn\*IPM binér komplex esetében a denaturáció sebessége jelentősen csökkent, míg a NAD és NADH molekulának önmagában semmilyen hatása nem volt a sebességre. Tehát a Mn\*IPM önmagában felelős az IPMDH lassabb denaturációjáért, vagyis védi a fehérjét a letekeredés ellen. Mindezt feltehetően az enzim szerkezetének stabilizációjával éri el, melyet az 5.1.3.1. fejezetben részletesen tárgyalok. Rendkívül



érdekes hogy ez a védelem eltérő mértékű a három különböző hőstabilitású enzim esetén (11. táblázat).

11. táblázat A szubsztrátok védő hatásának mértéke a különböző hőstabilitású IPMDH-k esetén

Szubsztrát távol- (-) és jelen- (+) léte	Átlagos sebességi állandó (perc <sup>-1</sup> )		
	Tt	Ec	Vib
- Mn*IPM	0,013	0,120	> 10
+ Mn*IPM	0,011	0,019	0,100
$\frac{- \text{Mn} * \text{IPM}}{+ \text{Mn} * \text{IPM}}$	<b>1,2</b>	<b>6,3</b>	<b>&gt; 100</b>

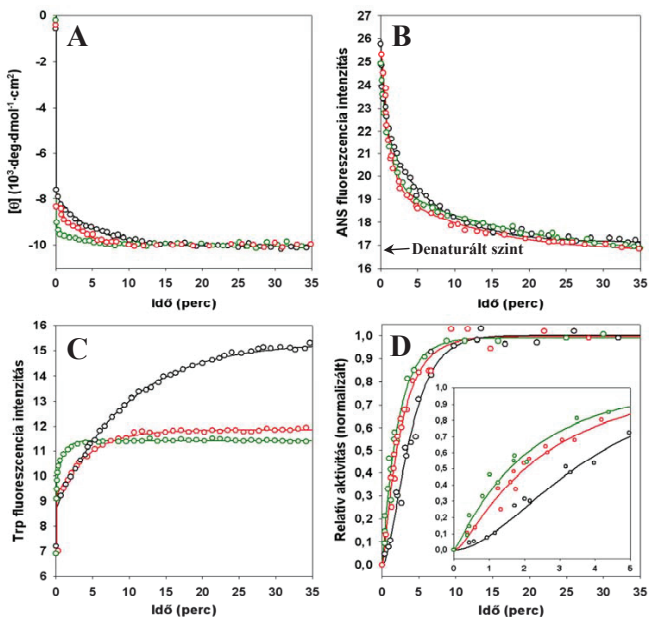
A legstabilabb Tt IPMDH esetén a Mn\*IPM szubsztrát védő hatása a denaturációval szemben minimális, a mezofil enzim esetében nagyobb hatást tapasztalunk, míg a hidegkedvelő, legkevésbé stabil Vib enzim denaturációja jelentősen lelassul. Tehát az eleve nagy stabilitással és rigiditással rendelkező Tt IPMDH esetén (melyet független H-D kicserélődési mérések bizonyítottak [113]) a szubsztrát jelenléte már nem vezet jelentős további stabilizációhoz a denaturáció folyamán, míg a nagyobb flexibilitású Ec és Vib enzim [164] esetében erre lehetőség van.

#### 5.1.2.2. Különböző hőstabilitású IPMDH enzimek renaturációs kinetikája

A denaturáció kinetikájának követéséhez alkalmazott módszerek alkalmasak a renaturáció tanulmányozására is. Távoli UV CD spektroszkópiával követve a renaturáció folyamatát (16A ábra) már a műszer mérési holtidején (kb. fél perc) belül a reakció 90%-a lejátszódik, mely arra utal, hogy a másodlagos szerkezeti elemek már igen korán kialakulnak. A maradék kb. 10 %-a a natív szerkezetnek már sokkal lassabban alakul ki. A folyamat összetett jellegéből intermedier képződésére következtethetünk.

A fluoreszcens festék ANS-t kiterjedten alkalmazzák denaturációs intermedier állapotok kimutatására [174, 177]. Az IPMDH esetén sem a natív, sem a denaturált fehérje nem alakít ki kölcsönhatásokat az ANS-sel, így fluoreszcenciás jelet sem szolgáltatnak. Ezzel szemben az ANS kötődik az IPMDH intermedieréhez és ezáltal az jellegzetes fluoreszcenciás jelet ad (17B ábra, időskála kezdete). Így válik lehetővé a térszerkezet kialakulás folyamatának követése ANS fluoreszcencia segítségével. A renaturációs kinetika elején hirtelen, nagy intenzitás növekedés figyelhető meg a denaturált állapothoz képest (ez feleltethető meg a gyorsan kialakuló intermediernek), melyet lassú csökkenés követ a natív állapot eléréséig (17B ábra). A natív állapot a

denaturálthoz hasonlóan nem köti az ANS molekulát. A hirtelen intenzitás növekedés a renaturációs folyamat elején egy „molten globula” szerű intermedier kialakulását sejteti, melynek laza globuláris szerkezetében a másodlagos szerkezeti elemek nagy része már kialakult (ld. távoli CD spektroszkópiai mérések), de még nem rendelkezik harmadlagos szerkezettel. A renaturáció időgörbéjét nem lehetett egyetlen exponenciális egyenlettel leírni, a kísérleti pontok illesztéséhez elsősorú, szekvenciális mechanizmus feltételezése volt szükséges. Ez a renaturáció folyamatának összetettségét jelzi, azaz a fehérje intermedier(ek)en keresztül éri el natív szerkezetét. Az illesztések során kapott sebességi állandókat a 12. táblázat tartalmazza. Az eredmények a három különböző hőstabilitású IPMDH-ra igen hasonlóak, azaz az ANS fluoreszcencia csökkenése azonos időskálán zajlik, néhány perces felezési idővel.



**17. ábra** A különböző hőstabilitású IPMDH enzimek renaturációs kinetikájának összehasonlítása A Tt (fekete), Ec (zöld) és Vib (piros) IPMDH enzimek renaturációs kinetikáját CD spektroszkópiával 225 nm-en (A), ANS fluoreszcenciával 480 nm-en (B), Trp fluoreszcenciával 335 nm-en (C) és enzim aktivitás mérés (D) segítségével követtem. A fehérje koncentrációk 10 µg/ml (0,14 µM) (A), 6 µg/ml (0,08 µM) (B és D) és 12 µg/ml (0,16 µM) (C) voltak. A kísérleti adatok elsősorú, szekvenciális egyenlettel illeszthetőek, az így kapott sebességi állandókat a 12. táblázatban foglaltam össze. A D ábra kinagyított részén a reaktiválás kezdeti szakasza látható.

A renaturáció folyamatának összetettségét támasztja alá a Trp fluoreszcencia változása is (17C ábra). A gyors intenzitás növekedést, amely abszolút értékben a 3 enzimmél azonos, további sokkal lassabb növekedés követi. A folyamat bifázikus jellege szintén intermedier kialakulására utal. A lassú növekedés a Tt enzim esetében jóval kifejezettebb, mint a Ec vagy Vib IPMDH-nál, melyet a Tt IPMDH molekulában a másik két enzimhez képest jelenlévő további Trp oldallánc magyaráz, mely az alegység kar régiójában helyezkedik el (ld. 12. ábra). Ezt bizonyítja az 5.2.3.2. fejezetben bemutatásra kerülő W152F mutáns renaturációs kinetikája is (25B ábra). Tehát, az IPMDH renaturáció lassú szakaszának változása tükrözheti a két kar, így a két alegység között kialakuló natív kölcsönhatások létrejöttét, mely feltehetően bimolekuláris lépés. Ezen feltételezés ellenőrzésére különböző fehérje koncentrációknál (0,04-1,60  $\mu\text{M}$ ) követtem a fehérje fluoreszcencia változását a lassú szakasz folyamán mindhárom IPMDH esetén, de nem tapasztaltam az időgörbék fehérje koncentrációtól való függését. Tehát a lassú szakasz folyamán a két polipeptidlánc asszociációja nem sebesség meghatározó lépés. Ez azonban még nem feltétlenül zárja ki a dimerizáció bekövetkezését e szakasz alatt. Lehetséges, hogy egy még lassabb intramolekuláris izomerizációs lépés határozza meg mind a dimerizáció, mind a renaturáció sebességi állandóját.

A reaktiválás követése a renaturáció folyamán további bizonyítékot szolgáltatott az intermedier képződésére. Mindhárom IPMDH esetén egy érdekes jelenség volt megfigyelhető: a kinetikák késleltetéssel vagyis „lag fázissal” indultak. Ez a Tt IPMDH esetén volt a legkifejezettebb (17D ábra). Ebből arra következtethetünk, hogy az aktivitással rendelkező enzimszerkezet kialakulása szintén összetett folyamat, melynek során a reakciót még katalizálni nem képes, inaktív intermedier keletkezik. Különböző fehérje koncentrációknál vizsgálva a reaktiválást itt sem találtam fehérje koncentrációtól való függést. Tehát itt sem volt kimutatható a dimerizáció, vagyis a bimolekuláris lépés sebesség meghatározó jellege az enzim aktivitásának visszanyerése során. A mérési eredményeket szekvenciális, elsődrendű egyenlettel illesztettem és az így meghatározott sebességi állandók a 12. táblázatban láthatóak.

**12. táblázat A különböző hőstabilitású IPMDH-k renaturációjának sebességi állandói (perc-1) A sebességi állandókat ( $k_1$ ,  $k_2$ ) a 16. ábrán feltüntetett mérési adatok elsőrendű, szekvenciális egyenlet illesztésével kaptam meg. A reaktiválás mérése során kapott adatok illesztésénél feltételeztük, hogy az intermedier nem rendelkezik enzimaktivitással. A gyors szakaszra kapott sebességi állandók óvatosan kezelendők a nagy kísérleti hiba miatt.**

Enzim	ANS fluoreszcencia		Fehérje fluoreszcencia		Aktivitás		Távoli UV CD	
	$k_1$	$k_2$	$k_1$	$k_2$	$k_1$	$k_2$	$k_1$	$k_2$
<b>Tt</b>	0,67 ± 0,13	0,12 ± 0,01	> 20	0,11 ± 0,02	0,96 ± 0,20	0,26 ± 0,05	> 20	0,20 ± 0,03
<b>Ec</b>	0,76 ± 0,10	0,064 ± 0,006	> 20	0,80 ± 0,20	> 20	0,46 ± 0,07	> 20	0,33 ± 0,07
<b>Vib</b>	0,77 ± 0,10	0,064 ± 0,003	> 20	0,23 ± 0,03	7,2 ± 1,2	0,37 ± 0,05	> 20	0,34 ± 0,06

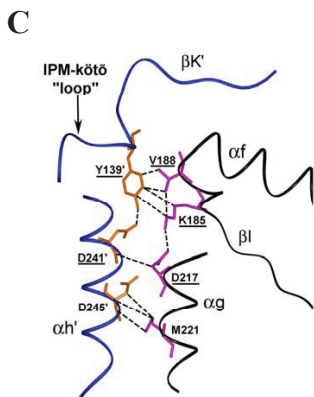
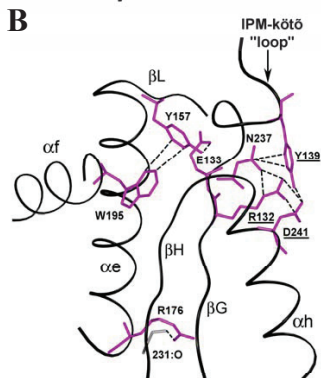
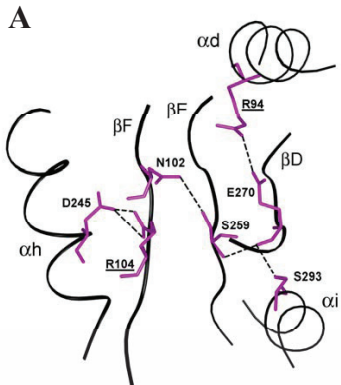
A térszerkezet kialakulás folyamatát, szemben a denaturációval nem befolyásolta a szubsztrátok jelenléte. A három különböző hőstabilitású IPMDH renaturációs kinetikájának sebességét összehasonlítva megállapítható, hogy az enzimszerkezet kialakulása hasonló időskálán zajlik (2-3 perces felezési idővel), szemben a denaturáció folyamatával, mely igen különböző a Tt, Ec és Vib IPMDH-k esetén.

### 5.1.3. A denaturáció és renaturáció kinetikai adatainak értelmezése a térszerkezeti adatok alapján

#### 5.1.3.1. A szubsztrátok stabilizáló hatása a denaturáció folyamán

Az IPMDH molekula denaturációja során kimutatható volt a Mn\*IPM komplex védőhatása a fehérjelánc letekeredésével szemben. A Mn\*IPM komplex ezt feltehetően az enzimszerkezet stabilizálásával éri el, melyet a Tf IPMDH szerkezetében tanulmányoztam. A fehérjében lévő 46 konzervatív oldallánc közül (definíciójukat ld. Módszerek 4.2.8. fejezet) 11 vesz részt a Mn\*IPM szubsztrát kötésében. Amint az 5. és 8. ábrákon bemutattam, ezen oldallancok öt különböző szerkezeti elemben helyezkednek el, így a d, g és h  $\alpha$ -hélixekben, valamint az F és G  $\beta$ -redőkben. Tehát, amint az IPM kötődési módját bemutató ábra is sugallja, ésszerűnek látszik feltételezni, hogy a Mn\*IPM pusztán kötődése által stabilizálni képes ezen szerkezeti elemek relatív térbeli helyzetét az IPMDH molekulában.

Ezen felül az IPMDH szerkezetének stabilizálásban – másodlagos szerkezeti elemek összetartása által – számos más konzervatív oldallánc is részt vesz, melyek közvetve vagy közvetlenül kapcsolatban állnak szubsztrát kötő aminosavakkal. E



konzervatív aminosavakat, ill. az összetartott másodlagos szerkezeti elemeket a 13. táblázatban tüntettem fel. A 18. ábrán néhány érdekes stabilizáló kölcsönhatás látható a Tt IPMDH kristályszerkezetében. A 46 konzervatív aminosav-maradékból a másodlagos szerkezeti elemek összetartásában 25 aminosav vesz részt. A fennmaradó 21 aminosav közül vannak, melyeknek egyéb konformációs szerepe van, ill. olyanok is találhatóak közöttük, melyek részt vesznek a koenzim kötésében, de a másodlagos szerkezeti elemek között nem alakítanak ki stabilizáló kölcsönhatásokat. Néhány konzervatív oldallánc szerepére azonban még nem találtunk magyarázatot.

Meg kell még említeni, hogy az IPM önmagában, a fémion jelenléte nélkül is képes lassítani a denaturáció folyamatát, de ennek mértéke jóval kisebb, mint annak jelenlétében. Mindez azzal magyarázható, hogy a fémion a h és a g'  $\alpha$ -hélix-ekkel is kölcsönhatásokat alakít ki (8A ábra).

**18. ábra A konzervatív oldalláncok harmadlagos szerkezet kialakításában betöltött szerepe** A konzervatív oldalláncok kölcsönhatásai egy alegységen belül (A, B), ill. a két alegység között (C) a Tt IPMDH szerkezetében vannak bemutatva. Az egyes alegységeket fekete (A-C), ill. kék (C) szalag diagram jelképezi. A konzervatív oldalláncokat a két domén között régióban (A), a 2. doménben (B) és a két alegység felszínén lila (A-C) és narancssárga (C) palcika modell jelöli. A konzervatív oldalláncokkal kölcsönható egyetlen nem konzervatív oldallánc peptidmaradékát szürkével jelöltem. Az atomi kölcsönhatásokat szaggatott vonal jelzi. A Mn<sup>2+</sup>IPM kötésében résztvevő oldalláncok aláhúzással vannak kiemelve.

**13. táblázat A konzervatív oldalláncok szerepe az IPMDH harmad- és negyedleges szerkezetének kialakításában és a szubsztrát kötésében** A 46 konzervatív oldalláncból 25 esetében volt kimutatható a harmadlagos szerkezet fenntartásában betöltött szerep. Azon aminosav oldalláncok, melyek a Mn\*IPM kötésében (11 db) vesznek részt félkövérrel, melyek pedig a NAD kötésében (2db) dőlt betűtípussal vannak szedve. Az aposztróf a másik alegységbeli oldalláncokat jelöli.

Szerkezeti egység	Konzervatív oldalláncok			Kapcsolatban lévő másodlagos szerkezeti elemek (a zárójelben lévő számok a Tt IPMDH-ra vonatkoznak, de ugyanezen kapcsolatok az Ec és Vib enzimekre is jellemzőek)	
	Tt	Ec	Vib		
Domén 1	D	9	13	11	<b><math>\beta</math>B(D9)<math>\leftrightarrow</math><math>\beta</math>C(G73)<math>\leftrightarrow</math>NAD-kötő hurok(S275)</b>
	G	12	16	14	
	E	14	18	16	<b>NAD-kötő hurok(281:N,283:N)<math>\leftrightarrow</math><math>\alpha</math>A(E14)</b>
	<i>G</i>	<i>73</i>	<i>77</i>	<i>75</i>	
	<i>S</i>	<i>275</i>	<i>286</i>	<i>283</i>	
Interdomén régió	<b>R</b>	<b>94</b>	<b>99</b>	<b>96</b>	<b><math>\beta</math>E(S259)<math>\leftrightarrow</math>(N102)<math>\beta</math>F(R104)<math>\leftrightarrow</math><math>\alpha</math>H(D245)</b>
	N	102	107	104	
	<b>R</b>	<b>104</b>	<b>109</b>	<b>106</b>	<b><math>\alpha</math>I(S293)<math>\leftrightarrow</math><math>\beta</math>D(E270)<math>\leftrightarrow</math><math>\alpha</math>D(R94)</b>
	D	245	255	252	
	S	259	269	266	
	E	270	281	278	
S	293	304	301		
Domén 2	<b>R</b>	<b>132</b>	<b>138</b>	<b>134</b>	<b><math>\alpha</math>H(D241)<math>\leftrightarrow</math>(R132)<math>\beta</math>G(E133)<math>\leftrightarrow</math> <math>\leftrightarrow</math><math>\beta</math>L(Y157)<math>\leftrightarrow</math><math>\alpha</math>F(W195)</b>
	E	133	139	135	
	<b>Y</b>	<b>139</b>	<b>145</b>	<b>141</b>	<b><math>\alpha</math>H(D241)<math>\leftrightarrow</math>IPM-kötő hurok(Y139)<math>\leftrightarrow</math><math>\alpha</math>H(N237)</b>
	Y	157	167	164	
	R	176	186	183	<b><math>\alpha</math>E(R176)<math>\leftrightarrow</math><math>\beta</math>H(231:O)</b>
	<b>K</b>	<b>185</b>	<b>195</b>	<b>192</b>	
	W	195	205	202	<b><math>\alpha</math>H(F239)<math>\leftrightarrow</math><math>\beta</math>I(K185)</b>
	N	237	247	244	
	F	239	249	246	<b><math>\alpha</math>H'(D241')<math>\leftrightarrow</math><math>\alpha</math>G(D217)<math>\leftrightarrow</math><math>\beta</math>I(K185)<math>\leftrightarrow</math><math>\alpha</math>F(V188)</b>
	<b>D</b>	<b>241</b>	<b>251</b>	<b>248</b>	
D	245	255	252		
Alegység-felszín	<b>K</b>	<b>185</b>	<b>195</b>	<b>192</b>	<b><math>\alpha</math>H'(D241')<math>\leftrightarrow</math>IPM-kötő hurok(Y139')<math>\leftrightarrow</math><math>\beta</math>I(K185)</b>
	<b>V</b>	<b>188</b>	<b>198</b>	<b>195</b>	
	<b>D</b>	<b>217</b>	<b>227</b>	<b>224</b>	<b>IPM-kötő hurok(Y139')<math>\leftrightarrow</math><math>\alpha</math>F(V188)</b>
	M	221	231	228	
	<b>Y</b>	<b>139'</b>	<b>145'</b>	<b>141'</b>	<b><math>\alpha</math>H'(D245')<math>\leftrightarrow</math><math>\alpha</math>G(M221)</b>
	<b>D</b>	<b>241'</b>	<b>251'</b>	<b>248'</b>	
	D	245'	255'	252'	

5.1.3.2. Különböző natív szerkezetű IPMDH enzimek „topológiájának” meghatározása és összefüggése a hőstabilitással

Az Irodalmi áttekintés 2.2.4. pontja alapján még nem tisztázott, hogy milyen összefüggés áll fent a fehérjeszerkezet összetett jellegét leíró kontaktusrend, a lánchossz és a renaturáció sebessége között. Kérdésként merült fel, hogy a nagyobb hőstabilitás együtt jár-e a távoli aminosavak közötti kölcsönhatások számának megnövekedésével,

vagyis a kontaktusrend növekedésével párhuzamosan változik-e a hőstabilitás, valamint a kontaktusrend és a renaturáció sebessége között megfigyelhető-e valamilyen összefüggés.

**14. táblázat Különböző IPMDH-k relatív és abszolút kontaktusrendjeinek meghatározása**

Hő-stabilitás <sup>a</sup>	Szervezet	PDB	Teljes molekula			
			Lánc-hossz	Relatív kontaktusrend	Abszolút kontaktusrend	
HT	Sulfolobus tokodaii	1wpwA 1wpwB	1-336	0,08455 0,08457	28,41 28,41	
	Thermotoga maritima	1vlcA	1-354	0,07592	26,87	
T	Thermus thermophilus	1xaa 1hex	1-345	0,07533 0,07525	25,99 25,96	
M	Escherichia coli	1cm7A 1cm7B	1-363	0,07806 0,07921	28,33 28,75	
		1cnzA 1cnzB	1-363	0,07821 0,07791	28,39 28,28	
	Thiobacillus ferrooxidans	1a05A 1a05B	1-358	0,07484 0,07485	26,72 26,72	
		Bacillus coagulans	2ayqA 2ayqB	1-356	0,07411 0,07568	26,38 27,01
	Mycobacterium tuberculosis		1w0dA 1w0dB 1w0dC 1w0dD	1-336	0,08610 0,08354 0,08646 0,08492	28,93 28,07 29,05 28,53
		P	1vibA 1vibB	1-360	0,07564 0,07561	27,23 27,21

<sup>a</sup> HT, T, M, P a hipertermofil, termofil, mezofil és pszihrotrof szervezeteket jelöli.

Ezen kérdések eldöntésére a kilenc ismert térszerkezetű IPMDH esetén kiszámítottuk mind a relatív, mind az abszolút kontaktusrendeket, melynek eredményei a 14. táblázatban láthatóak. A kiszámított kontaktusrendek gyakorlatilag megegyeznek a különböző hőstabilitású IPMDH enzimekre, tehát ezen adatok alapján nem figyelhető meg összefüggés a hőstabilitás és a kontaktusrend között. Az általunk vizsgált Tt IPMDH láncá valamivel rövidebb (345 aminosav), mint a termofil (358 as), mezofil (360 as), ill. hidegkedvelő (361 as) 8 tagú csoportok átlagos lánc hosszai, mely alapján várható lett volna, hogy gyorsabban alakuljon ki a szerkezete [88, 125], de a kísérleti eredmények ezt nem támasztották alá. Eredményeink azonban nem mondanak ellent,

bár nem is támasztják alá azt a feltételezést, miszerint a kontaktusrend és térszerkezet kialakulási sebesség összefüggenek, hiszen azonos kontaktusrend esetén, azonos térszerkezet kialakulás sebességet tapasztaltunk. A saját, valamint az irodalmi adatokat tekintve elmondható, hogy a kontaktusrend, a stabilitás és a térszerkezet kialakulás sebessége közötti összefüggés nem egyértelmű és több esetben fehérjétől függően változik. Általános következtetés levonásához további több doménból, ill. alegységből álló, különböző hőstabilitású fehérje vizsgálata lenne szükséges.

### *5.1.3.3. Az eltérő hőstabilitásért felelős szerkezeti különbségek*

A három különböző hőstabilitású IPMDH denaturációja különböző időskálán történik, azaz minél nagyobb stabilitású az enzim, annál több idő szükséges a fehérje láncának letekeréséhez. A jelenség magyarázatára a Tt, Ec és Vib IPMDH nem konzervatív oldalláncai közötti kapcsolatokat hasonlítottam össze, melyek eltérése a hőstabilitásbeli különbségeket okozhatja. A kiválasztott 27 nem konzervatív aminosavból 16 esetben volt tisztán kimutatható a kapcsolat az atomi kölcsönhatások és a hőstabilitás között. Ezeket az aminosavakat tüntettem fel a 15. táblázatban. A nem konzervatív oldallánkok stabilitásban betöltött szerepét számos, már az irodalmi áttekintésben tárgyalt (2.3.5. fejezet) mutációs kísérlet is alátámasztja (ld. 15. táblázat).

A szerkezeti összehasonlítás során az IPMDH molekula három nagy régiója volt elkülöníthető, melyek a különböző hőstabilitásért felelőssé tehetőek. Az első régió a Domén 1, mely összetartja az  $\alpha_a$ ,  $\alpha_i$ ,  $\alpha_j$  és  $\alpha_k$  szerkezeti elemeket (19A ábra) éppúgy, mint az  $\alpha_a$  és  $\beta_A$  másodlagos szerkezeti elemeket is (19C ábra). Ezen régió – ahol a konzervatív oldallánkok stabilizáló hatása kevésbé jelentős – tartalmazza a polipeptidlánc N- és C-terminális részét is, melynek stabilizációban betöltött szerepét mutációs analízisek is alátámasztják [162, 163]. A szekvenciában távol elhelyezkedő aminosavak közötti stabilizáló kölcsönhatások mellett, a közeli aminosavak közötti kölcsönhatásoknak is jelentős szerepe van a szerkezet stabilitásának fenntartásában, mint pl. az  $\alpha_c$  előtti hurok stabilizálása esetén (19D ábra). A Domén 2 régióban csak néhány nem konzervatív oldallánc stabilizáló szerepét sikerült kimutatni (19E ábra).



**15. táblázat A nem konzervatív oldalláncok szerepe az IPMDH-k ettérő szerkezeti stabilitásában** A termofil, mezofil és pszihrofil IPMDH csoportok összehasonlításával kiválasztott 27 nem konzervatív oldallánc (ld. Anyagok és Módszerek fejezet) közül csak azon 16 aminosav van feltüntetve, melyek a grafikai analízis alapján is összefüggésben vannak a hőstabilitással. Közülük öt oldalláncnak (53, 58, 82, 126 és 190 a Tt számozása alapján) mutációs analízissel is megerősítették a stabilizáló szerepét. További 9 olyan oldalláncot tüntettem fel, melyek mutációs kísérletek alapján stabilizálják a szerkezetet, de nem figyelhető meg összefüggés a hőstabilitás és az oldallánc kémiai természeté között. A nem konzervatív oldalláncnak megfelelő aminosavak természeté a 8-8 tagú termofil, mezofil és pszihrofil csoportokban zárójelben vannak feltüntetve.

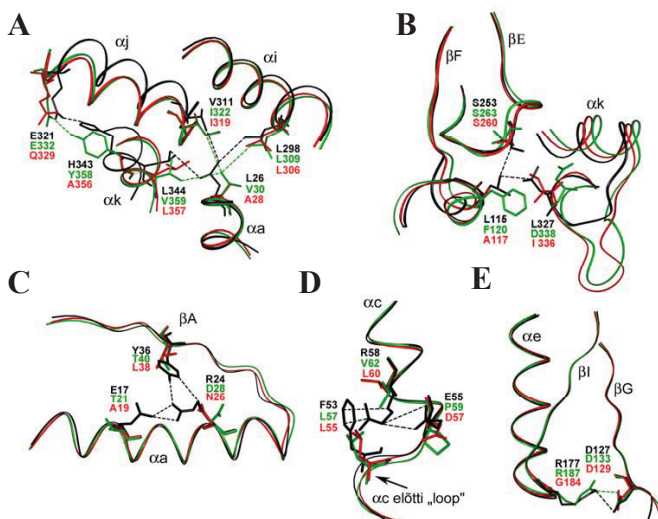
Szerk. egység	A különböző hőstabilitású IPMDH csoportok alapján kiválasztott nem konzervatív oldalláncok						Az oldallánc természetének változása a csökkenő hőstabilitás irányába	Hiv.	A különböző hőstabilitás szerkezeti alapjai és az abban résztvevő szerkezeti elemek (Tt, Ec és Vib szerkezetének összehasonlításából)
	Termofilok		Mezofilok		Pszihrofilok				
	Tt	Ec	Vib <sup>a</sup>						
Domén 1	E17	(1A, 1S, 1Q, 2E, 3R)	T21	(3A, 1T, 1D, 2E)	A19	(3A, 1V, 1L, 2T, 1E)	Töltött→Hidrofób	[101]	Stabilizáció az <b>αa</b> -n belül és az <b>αa</b> és <b>βA</b> elemek között a Tt szerkezetben (19C ábra)
	R24	(1Q, 2D, 2R, 3K)	D28	(1T, 3D, 4K)	N26	(1V, 5N, 2D)	Töltött→Poláros		
	Y36	(1I, 3F, 2Y, 2W)	T40	(2T, 1C, 5F)	L38	(3L, 1M, 1F, 1T, 2R)	Oldallánc térfogatának csökkenése		
	L26	(1A, 4V, 2L, 1I)	V30	(1A, 6V, 1I)	A28	(1A, 6V, 1L)	Lánchossz csökkenése	[162, 163]	Stabilizáció a Tt és Ec szerkezetben az <b>αa</b> és az <b>αi</b> , <b>αj</b> , valamint az <b>αk</b> kapcsolatán keresztül (19A ábra)
	V311	(4V, 4I)	I322	(4V, 4I)	I319	(8I)	Lánchossz növekedése	---	
	E321	(4Q, 4E)	E332	(1A, 2S, 1Q, 1D, 3E)	Q329	(2A, 1N, 2Q, 2D, 1R)	Az ionos kölcsönhatás valószínűségének csökkenése	[101]	Stabilizáció ionos (Tt), ill. H-híd kötésekkel (Ec) az <b>αj</b> és <b>αk</b> között (19A ábra)
	H343	(1A, 1L, 2H, 1E, 3K)	Y358	(2A, 1I, 1F, 2Y, 1K, 1R)	A356	(3A, 1Y, 1Q, 1R, 2K)	Oldallánc térfogatának csökkenése	[146]	Stabilizáció a Tt szerkezetben az <b>αc</b> és az azt megelőző hurok között (19B ábra)
	F53	(4L, 3F, 1Y)	L57	(8L)	L55	(8L)	Bázikusság csökkenése		
	R58	(4L, 4R)	V62	(3V, 4L, 1I)	L60	(1V, 5L, 2M)	Töltött→Hidrofób	[140]	Stabilizáció felszíni töltések által (csak a 2T2M6T kimerá enzimben)
	R82	(1G, 2P, 1W, 4R)	P86	(1G, 1A, 1S, 4P, 1del)	P84	(5P, 3R)	Polaritás növekedése	---	A polaritás növekedése a hidrofób magban csökkenti a stabilitást az <b>αa</b> és <b>αi</b> között
A290	(4A, 1M, 1T, 2Q)	Q301	(1A, 3T, 4Q)	T298	(4T, 3Q, 1E)				

Domén 2	P110	(7P, 1D)	Q115	(1A, 2P, 1S, 1E, 2Q, 1N)	P112	(5P, 1S, 1E, 1K)	b	[140, 149, 159, 161]	A <b>βF</b> végén lévő Pro-Gly motívum növeli a rigiditást és ezért a Tt enzim stabilitását is
	G111	(2G, 2S, 1P, 3Q)	G116	(2G, 1V, 1S, 1T, 2E, 1Q)	Q113	(1G, 2A, 1S, 4Q)			
	E113	(3V, 1L, 2K, 2E)	E118	(3L, 1S, 2E, 2K)	A115	(1A, 3V, 2S, 1T, 1E)			
	L115	(6A, 2L)	F120	(5A, 1D, 2F)	A117	(6A, 1L, 1F)	b	[140]	A <b>βF</b> és <b>βG</b> , az <b>αH</b> és <b>βE</b> , valamint <b>αK</b> és <b>αJ</b> közötti hurkok csak a Tt szerkezetben vannak egymással kapcsolatban
	R177	(1Q, 6R, 1K)	R187	(2N, 5R, 1K)	G184	(1G, 2A, 3S, 1N, 1E)	Bázikusság csökkenése	—	A <b>βG</b> és az <b>αE-βI</b> közötti hurkok kapcsolata a Tt enzimnél erős, az Ec-nél gyenge és hiányzik a Vib-nál (19E ábra)
Interdomén régió	V126	(5V, 1L, 2I)	F132	(4V, 1L, 2F, 1T)	L128	(4L, 4F)	Oldallánc térfogatának növekedése	[157]	Az oldalláncok megnövekedett térfogata zsírfólságot okoz az Ec, Vib szerkezetben
	A172	(3A, 3L, 1I, 1T)	S182	(3A, 1L, 2M, 2S)	M179	(4A, 2L, 1M, 1S)	b	[153, 154]	A megnövekedett van der Waals térfogat növelheti a stabilitást a hidrofób kölcsönhatások erősítésével az <b>αE</b> és <b>αI</b> között
	H300	(1L, 3H, 4Y)	Y311	(1L, 1T, 5Y, 1H)	Y308	(1F, 7Y)		[160]	
A legység felszín	M146	(4I, 2M, 1R, 1K)	R152	(1L, 1T, 1D, 5R)	K149	(7R, 1K)	Bázikusság növekedése	—	A töltött aminosavak megjelenése az alegységfelszínen (beleértve az <b>αF</b> , <b>βK</b> és <b>βL</b> elemeket) az Ec és Vib esetén gyengítik a hidrofób kölcsönhatásokat
	N153	(6N, 2D)	D163	(1N, 7D)	D160	(2N, 6D)	Savasság növekedése	—	
	E190	(1S, 7E)	Q200	(1A, 1T, 2Q, 1D, 3E)	A197	(3A, 1T, 1Q, 3E)	Savasság csökkenése	[152]	Sőkötés az <b>αF</b> and <b>βK'</b> között a Tt esetén, hiányzik az Ec és Vib enzimnél (Vib-nál más sóhid létezik, de a <b>βK</b> és <b>βL</b> között)
	F194	(6L, 2F)	L204	(6L, 1M, 1F)	L201	(7L, 1F)	b	[158]	Az <b>αF</b> kölcsönhatása a <b>βK'</b> és <b>βL'</b> elemekkel a Tt enzimnél, de hiányzik az Ec és Vib esetén
	L246	(2L, 1I, 5E)	E256	(8E)	E253	(1I, 7E)	b	[149, 155]	A megnövekedett van der Waals térfogat zsírfólságot okoz az Ec és Vib esetén a hidrofób 4 hélix köteg kapcsolatában
	V249	(2V, 5M, 1Q)	M259	(2V, 1I, 4M, 1Q)	M256	(8M)	b	[155, 156]	

<sup>a</sup>Vib IPMDH hűségű enzim.

<sup>b</sup>Nem figyelhető meg összefüggés az oldalláncok típusa és a hőstabilitás között, de a mutációs kísérletek mégis az oldallánc hőstabilitásában betöltött szerepét bizonyították.

Az IPMDH stabilizációjában fontos szerepet betöltő másik szerkezeti egység a két domén között elhelyezkedő régió. Itt található meg a Tt L115, mely három flexibilis hurkot tart össze ( $\beta$ F- $\beta$ G,  $\alpha$ H- $\beta$ E és  $\alpha$ J- $\alpha$ K másodlagos szerkezeti elem párokat kötik össze a szerkezet nélküli hurkok) a két domén között (19B ábra). A hidrofób oldalláncok stabilizáló szerepét e pozícióban Numata és mti. is kimutatták [140]. A  $\beta$ F- $\beta$ G redők közötti hurok stabilitásában, valamint a denaturációban betöltött szerepét hőmérséklet ugrásos, ún. „T-jump” krisztallográfiai módszerrel is alátámasztották [161]. E kísérletek szerint az IPMDH denaturációja ebben a régióban kezdődik el. A három IPMDH ezen régióban talált kölcsönhatásainak különbsége (19B ábra) összhangban van a stabilitásbeli különbségekkel.



**19. ábra** A különböző hőstabilitásért felelős szerkezeti különbségek A másodlagos szerkezeti elemeket fekete (Tt), zöld (Ec) és piros (Vib) szalagdiagram jelöli. A három szerkezet összemásolása  $\beta$ -redők  $\alpha$  atomjai szerint történt (kivéve a karban elhelyezkedő  $\beta$ K- és  $\beta$ L-redőt). A nem konzervatív oldalláncokat pálcika modell jelöli. A szaggatott vonalak az atomi kölcsönhatásokat jelképezik. Az A, C és D ábra a Domén 1, a B ábra a két domén közötti régió, az E pedig a Domén 2 kölcsönhatásait mutatja.

Az IPMDH molekula stabilizációban fontos harmadik régiója az alegységfelszinen helyezkedik el. Korábbi tanulmányok szerint [152, 156] a Tt enzimből a kar régió (beleértve a  $\beta$ K és  $\beta$ L redőket is), valamint annak kölcsönhatásai az  $\alpha$ F szerkezeti elemmel, továbbá a 4 hélix köteg ( $\alpha$ G,  $\alpha$ G',  $\alpha$ H,  $\alpha$ H') kapcsolatai sokkal kedvezőbbek a mezofil Ec IPMDH-hoz képest. Szerkezeti analízisem alapján e korábbi megfigyelések,

vagyis a stabilitás és szerkezet közötti összefüggés kiterjeszhető az IPMDH hidegkedvelő formáira is (ld. 15. táblázat ide vonatkozó részeit).

A denaturáció és renaturáció kinetikai eredményeit figyelembe véve feltételezhető, hogy a különböző hőstabilitású IPMDH-k natív szerkezetében fellelhető különbségek a renaturációs folyamatok aktivált átmeneti állapotában még nem alakultak ki, így azok energiaszintje is igen hasonló. Ha figyelembe vesszük azt is, hogy a denaturált állapotok energiaszintje azonos, a renaturációs folyamat sebességét meghatározó aktiválási szabadentalpia hasonló lesz a különböző hőstabilitású enzimeknél. Az ellentétes folyamatban, a denaturációnál azonban az előbbtől feltehetően különböző átmeneti állapot elérése különböző aktiválási szabadentalpia befektetést igényel, figyelembe véve azt is, hogy a kiindulási natív állapot energiaszintjei is különbözőek (ld. 5.1.1. fejezet). Ez eredményezi az eltérő denaturációs sebességi állandókat a különböző hőstabilitású fehérjék esetén.

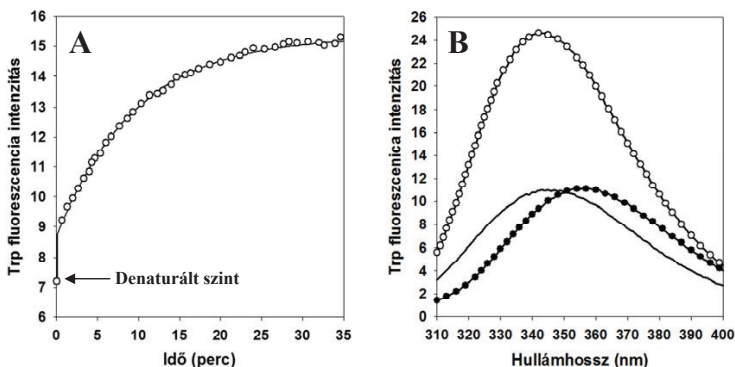
Kinetikai és szerkezeti vizsgálataink alapján a következő kép alakult ki az IPMDH-k térszerkezet kialakulási folyamatairól: A hasonló renaturációs sebességek alapján feltételezhető, hogy a három különböző hőstabilitású IPMDH renaturációs aktiválási átmeneti állapota szerkezetileg még igen hasonló. A fehérje térszerkezet kialakulása során a korai intermedier állapotok szintén igen hasonlóak lehetnek. Az eltérő hőstabilitásért felelős szerkezeti különbségek még nem jelentkeznek az átmeneti, vagy korai intermedier állapotokban. Az átmeneti állapotban a molekulának csupán a fő szerkezeti jellemzői alakultak ki, melyet a polipeptidlánc entrópiájának nagymértékű csökkenése kísér. Ez a sebesség meghatározó lépése a renaturáció folyamatának. A fentiekben tárgyalt, stabilitást meghatározó jellegzetes szerkezeti különbségek csak a renaturáció egy későbbi (nem sebesség meghatározó) szakaszában alakulnak ki, ahol az aminosav oldallánccok kialakítják specifikus kölcsönhatásaikat. Ezt az elképzelést támasztja alá számos termofil és mezofil fehérjével végzett tanulmány is [178].

## **5.2. Az IPMDH, mint modell dimer enzim térszerkezet kialakulási mechanizmusa**

### **5.2.1. A renaturáció során kialakuló intermedier kinetikai jellemzése**

A bevezetőben tárgyaltak szerint az IPMDH nemcsak a hőstabilitás eredetének vizsgálata szempontjából érdekes fehérje, hanem összetett dimer szerkezete a térszerkezet-kialakulás általános kérdései vizsgálatára is alkalmassá teszi. A három

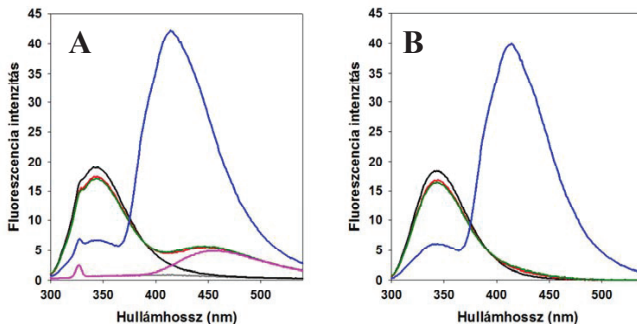
vizsgált IPMDH renaturációja igen hasonló mechanizmussal zajlik, pl. intermedier képződését számos fenti kísérlet támasztja alá. Az intermedier természetének tisztázására a bifázikus renaturációs időgörbe (20A ábra) gyors szakaszának végén, vagyis az intermedier állapotban rögzítettem a Trp fluoreszcencia spektrumot (20B ábra). A maximális fluoreszcencia emisszióhoz tartozó hullámhossz érték, a denaturált enzim spektrumához viszonyítva, jelentősen eltolódik az alacsonyabb hullámhosszak irányába és egybeesik a natív enzim  $\lambda_{\max}$  értékével, bár intenzitása még messze elmarad a natív spektrum maximális fluoreszcencia intenzitásától. E megfigyelésekből arra következtethetünk, hogy az intermedier állapotban a fehérjében lévő Trp-ok már deszolvatált állapotban vannak ugyan, de a natív fehérjére jellemző környezetük még nem teljesen alakult ki.



**20. ábra** Az IPMDH renaturációjának kinetikája (A) és a kialakuló intermedier fluoreszcenciás spektruma (B) (A) A T1 IPMDH renaturációs kinetikáját Trp fluoreszcencia emisszió kialakulásával követtem 335 nm-en, a gerjesztés 275 nm-en történt. A fehérje koncentrációja 12  $\mu\text{g/ml}$  (0,16  $\mu\text{M}$ ) volt. (B) Az intermedier spektrumát (folytonos vonal) a térszerkezet kialakulás 30. másodpercében rögzítettem. Az ábrán feltüntettem még a natív (○) és denaturált (●) fehérje spektrumát is.

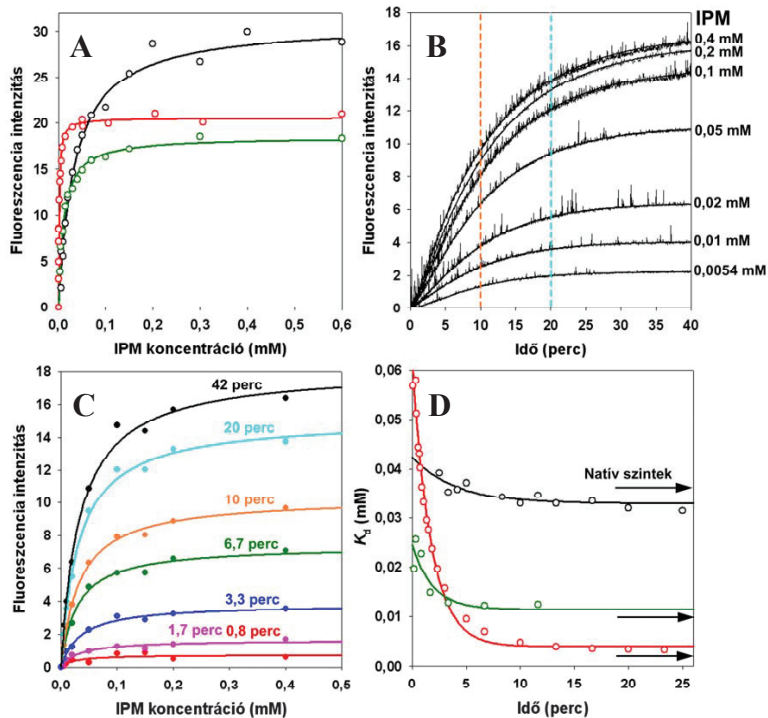
Az 5.1.2.2. fejezetben tárgyalt ANS segítségével végzett mérések alapján ez az intermedier egy fellazult „molten globula” szerű szerkezettel rendelkezik, melynek egyik jellegzetes tulajdonsága, hogy a másodlagos szerkezeti elemek jelentős része már kialakult. Ezt támasztják alá a távoli CD spektroszkópiával követett renaturációs kinetikák is (17A ábra). Az aktivitás mérések (17D ábra) összetett, késleltetéssel („lag fázis”) induló kinetikái olyan intermedier jelenlétére utalnak, mely még nem rendelkezik enzimaktivitással. Összefoglalva tehát elmondható, hogy az IPMDH renaturációja legalább egy intermedier állapoton keresztül történik, mely natívszerű,

„molten globula”-hoz hasonló szerkezettel rendelkezik, de még enzimaktivitást nem mutat.



**21. ábra** A natív IPMDH-t jellemző FRET jelenség (A) Fluoriméter segítségével rögzített eredeti mérési eredmények. (B) Az eredeti mérési eredményekből már levonásra került a puffer, ill. a NADH jele. A foszfát puffer jelét szűrkevel, a NADH molekuláét rózsaszínnel jelöltem. A 0,16  $\mu$ M (12  $\mu$ g/ml) natív IPMDH-hoz (fekete) először 12  $\mu$ M koncentrációban NADH-t (piros), 3 mM  $MgCl_2$ -ot (zöld), majd pedig 0,6 mM IPM-et (kék) adtam. A Trp oldalláncok gerjesztése 295 nm-en történt.

Kérdésként merül fel, hogy a natívszerű intermedier bár inaktív, rendelkezik-e már a szerkezeti elemek azon specifikus elrendeződésével, ami a szubsztrát kötését lehetővé teszi. A kérdés vizsgálatára lehetőséget adott az IPMDH-nak egy jellegzetes spektrális tulajdonsága a Förster Rezonancia Energia Transzfer (FRET), ami alkalmas az IPM szubsztráttal való kölcsönhatás kimutatására. A FRET jelensége során egy gerjesztett donor molekula – jelen esetben a fehérje Trp aminosav oldalláncai – által emittált fény képes egy másik, ún. akceptor molekula – jelen esetben az enzimen kötött NADH – gerjesztésére. Mindez spektrálisan a fehérje 340 nm környékén megjelenő emissziós csúcának intenzitás csökkenésében és a NADH molekula 410 nm-en lévő emissziós jelének növekedésében mutatkozik meg (21. ábra). A FRET jelenség kialakulásához az IPMDH által kötött NADH mellett az IPM szubsztrát jelenléte is szükséges [139]. Feltehetően az IPM által okozott fehérje konformációváltozás biztosítja a kötött NADH nikotinamid és a Trp gyűrűk megfelelő orientációját, ami a FRET kialakulását eredményezi. Az ismert IPMDH kristályszerkezetek alapján a konformáció változás mibenlétéről kialakított elképzelésünket az 5.2.3.2. fejezetben mutatom be. Az enzimműködéshez szükséges fémion jelenléte nélkül is megfigyelhető az energia transzfer létrejötte, bár jóval kisebb mértékben (nincs bemutatva). A FRET a natív enzimre jellemző tulajdonság (21. ábra), mely jelenséget sem a denaturált enzim, sem a Trp oldat nem mutatja.



22. ábra A különböző hőstabilitású natív IPMDH enzimek (Tt, Ec és Vib) IPM-kötő képessége (A) és az IPM-kötő képesség kialakulása a Tt IPMDH renaturáció során (B) az IPM kötődését mindkét esetben a FRET kialakulását detektálva követtem különböző IPM koncentrációkat alkalmazva. A renaturáció során a szaggatott vonalak az azonos időponthoz (azaz az azonos mértékű renaturációhoz) tartozó intenzitás értékeket jelölik (B). Az egyes időpillanatokhoz tartozó intenzitások ábrázolása és illesztése 13. egyenlet szerint megadja a Tt IPMDH renaturációjának adott időpillanatra jellemző kötődési görbéket (C). Az IPM kötő képesség változását a Tt (fekete), Ec (zöld) és Vib (piros) enzimek renaturációja során a (D) ábra szemlélteti. A nyilak a natív enzimek  $K_d$  értékeit jelölik.

Mivel az energia transzfer az IPM kötődés indikátora, így alkalmas spektrális jelet szolgáltat az IPM kötődési erősségének meghatározására a natív enzim esetén (22A ábra). A  $K_d$  értékek  $34,1 \pm 2,3$  (Tt),  $10,9 \pm 0,7$  (Ec) és  $1,3 \pm 0,1$   $\mu\text{M}$  (Vib) adódtak a három enzimre nézve. Korábban Dean és Dvorak  $10,6$   $\mu\text{M}$  értéket kapott a Tt IPMDH esetén [139]. A FRET jel segítségével azonban nem csak a natív enzim IPM kötő képessége jellemezhető, hanem az IPM kötődés kialakulása is nyomon követhető a három vizsgált IPMDH renaturációjának lassú szakasza folyamán, ha különböző IPM koncentrációk jelenlétében követjük a FRET kialakulását a folyamat alatt (22B ábra).

A renaturációs kinetikák azonos időpontjaihoz tartozó intenzitás értékek (22B ábra) az IPM koncentráció függvényében ábrázolva szubsztrát kötődési görbéket adnak a renaturáció különböző előrehaladási fokainál (22C ábra). Ezek illesztéséből számított  $K_d$  értékeket tüntettem fel a 22D ábrán. Látható, hogy az IPM  $K_d$  értéke csökken a fehérje térszerkezet kialakulása során, azaz a szubsztrát kötés egyre erősödik a renaturáció lassú szakasza folyamán. Figyelemre méltó azonban, hogy már a 0 időpontra (azaz valójában a gyors szakasz végére) extrapolált érték is viszonylag szoros szubsztrát kötésre utal. Ebből az következik, hogy az előbbieken jellemzett natívszerű intermedier IPM kötőhelye is már elég jól kialakult.

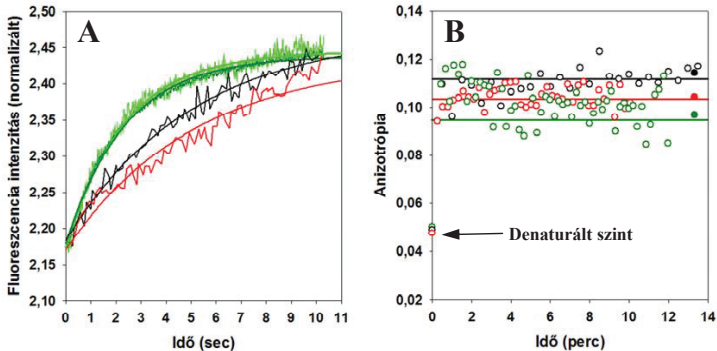
### 5.2.2. Az alegységek szerepe a térszerkezet kialakulás folyamatában

A térszerkezet kialakulása során megjelenő intermedier természetével kapcsolatban további kérdésként merül fel, hogy az monomer vagy dimer állapotú-e, vagyis a két polipeptidlánc összekapcsolódása a renaturáció mely szakaszában következik be. Ennek felderítése számos információt nyújthat az alegységek szerepéről a térszerkezet kialakulása folyamán.

A renaturációt Trp fluoreszcencia segítségével különböző enzim koncentrációknál követve a térszerkezet kialakulás lassú szakasza folyamán nem volt kimutatható egy kinetikailag másodrendű lépés, amelyet a dimerizáció folyamatának lehetett volna megfeleltetni (5.1.2.2. fejezet). Ezért feltételezhető volt, hogy a két polipeptidlánc asszociációja igen korán, már a gyors szakasz alatt megtörténik. Amennyiben a dimerizáció a gyors szakasz alatt bekövetkezik, akkor várhatólag a renaturációs kinetika gyors szakasza kinetikailag másodrendű lépés lesz. Ennek vizsgálatára adtak lehetőséget a gyorskinetikai mérések. A renaturáció gyors szakaszát különböző enzim koncentrációknál megállított áramlással követve a három különböző hőstabilitású IPMDH esetén, a várakozásokkal szemben egyik esetben sem tapasztaltam a renaturációs időgörbék fehérje koncentráció függését, melyet az *Ec* IPMDH példáján mutatok be (23A ábra). Hasonló eredmények születtek a *Tt* és *Vib* IPMDH esetén is. Tehát a másodrendű lépés, vagyis a polipeptidláncok asszociációja nem volt kimutatható a renaturációnak sem a gyors, sem a lassú szakasza alatt annak ellenére, hogy a két polipeptidláncnak a térszerkezet kialakulása során össze kell kapcsolódnia az aktív enzimszerkezet kialakításához. A látszólagos ellentmondás azzal magyarázható, hogy a dimerizáció folyamata bár bekövetkezik, de nem sebességmeghatározó lépés a térszerkezet kialakulása során. Megfigyelhető még az is, hogy a *Tt*, *Ec* és *Vib* IPMDH



enzimek renaturációjának gyors szakasza igen hasonló egymáshoz, az exponenciális illesztés során kapott sebességi állandók pedig  $16,5 \pm 3,7$  (Tt),  $25,2 \pm 5,1$  (Ec) és  $11,7 \pm 2,8$  (Vib)  $\text{perc}^{-1}$  értékeknek adódtak. Az elsőrendű sebességi állandók nagy valószínűséggel gyors konformációs átrendeződést jelentenek.



23. ábra A különböző hőstabilitású IPMDH enzimek renaturációjának követése (A) megállított áramlásos módszerrel és anizotrópia (B) segítségével (A) Mindhárom IPMDH enzimmél a gyorskinetikai mérések két különböző enzim koncentrációnál történtek, de ez csak az Ec enzim esetén van bemutatva:  $2,45 \mu\text{M}$  (sötétzöld),  $0,27 \mu\text{M}$  (világoszöld). A kísérleti adatokat exponenciális egyenlettel illesztettem. (B) Az anizotrópia változásának követése a renaturáció folyamán  $163 \text{ nM}$ -os enzim koncentrációnál történt. A teli szimbólumok a natív enzimek anizotrópia értékeit jelölik. Mindkét kísérletben a gerjesztési hullámhossz  $275 \text{ nm}$  volt.

A fluoreszcencia anizotrópia változásának tanulmányozása a renaturáció során további lehetőséget nyújt a két polipeptidlánc összekapcsolódásának vizsgálatára, mivel az anizotrópia értéke függ a molekulák térfogatától, mely a dimerizáció során növekszik. A renaturáció gyors szakasza után, a lassú szakasz folyamán az anizotrópia értékekben már nem tapasztaltam változást, mely értékek pontosan megfeleltek a natív, dimer enzimek anizotrópia értékeinek (23B ábra). Mindez azt támasztja alá, hogy a lassú szakasz folyamán az IPMDH molekula már asszociált, dimer formában van jelen, azaz a polipeptidláncok asszociációja valamikor az intermedier kialakulás gyors folyamata alatt következik be. Azonban az asszociáció nem sebesség meghatározó, feltehetően valamely lassabb elsőrendű konformációs lépés (pl. a fent jellemzett, valamivel kevésbé gyors folyamat) előzi meg és ez limitálja a gyors szakasz sebességét. Meg kell még említeni, hogy a Trp oldalláncok féléletideje (mely szintén befolyásolja az anizotrópiát) a dimerizáció során megváltozhat, de annak valószínűsége igen kicsi, hogy a molekula térfogata és a féléletidő egymás hatását éppen ellensúlyozza. Az előző eredményekkel összhangban szintén dimer intermedier jelenlétére utal az a fentiekben

tárgyalt eredmény, hogy az intermedier már képes kezdetleges kölcsönhatások kialakítására az IPM szubsztráttal (5.2.1. fejezet). Tehát a két polipeptidlánc asszociációja már a térszerkezet kialakulás kezdetén megtörténik és feltehetően ez az előfeltétele a további renaturációs lépések végbemenetelének. Mindez a különböző hőstabilitású IPMDH-k esetén hasonlóan történik.

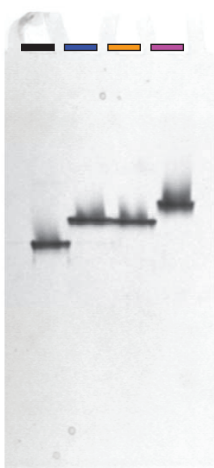
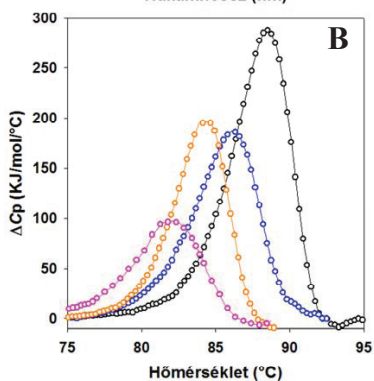
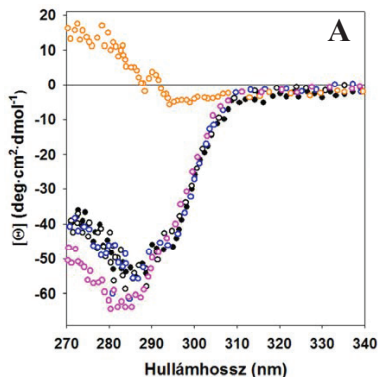
### 5.2.3. A domének szerepe a térszerkezet kialakulás folyamatában

Amint az irodalmi áttekintésben tárgyaltam, az alegységekhez hasonlóan, a domének térszerkezet kialakulásában betöltött szerepe jelenleg még nem tisztázott. Kérdésként merül fel, hogy a domének valójában önálló „folding” egységet alkotnak-e, mint azt a moduláris modell vagy egyes domén definíciók feltételezik, vagy szerkezetük egymást elősegítve alakul ki.

#### 5.2.3.1 A *Thermus thermophilus* IPMDH Trp mutánsok jellemzése

A domének szerepének vizsgálatához a Tt IPMDH enzim látszott alkalmas objektumnak, mivel Trp oldalláncai sajátosan helyezkednek el, doménenként 1-1 található. Az alegységenkénti 3 darab Trp oldalláncból a W152 az ún. kar régióban helyezkedik el, mely a két alegység összetartásában játszik szerepet, míg a W77 és W195 az első, ill. a második doménben található (12. ábra). Ahhoz, hogy az egyes domének renaturációját külön-külön tanulmányozhassam, az egy egyes Trp-okat helyspecifikus mutagenezissel az elenyésző fluoreszcenciával rendelkező, de szintén gyűrűs Phe-re cseréltem. Létrehoztam egyrészt a W152F mutáns, amelynek a kar régiójából hiányzott a Trp, másrészt elkészítettem kétféle kétszeres mutáns, a W77,152F-t és W152,195-t, amelyeknek csak egyik, vagy csak másik doménjében található Trp.

Az egyes domének térszerkezet kialakulásának tanulmányozása előtt ellenőriztem a mutációk hatását a natív IPMDH szerkezetére. A másodlagos szerkezetet távoli UV CD spektroszkópiával vizsgálva nem találtam eltérést a vad típusú és mutáns enzimek között. A harmadlagos szerkezetet jellemző közeli UV CD spektrumok alapján csak a W152F karban lévő mutáció nem változtatta meg a vad típusra jellemző görbét (24A ábra). A W77,152F és W152,195F mutáns IPMDH enzimek spektrumai jelentősen eltértek egymástól nemcsak az intenzitásukban, hanem előjelükben is, mely a W77 és W195 oldalláncok natív környezetének különbözőségére utal. A kettős mutáns IPMDH-k spektrumainak összege viszont a vad típusú enzim görbéjét eredményezi. A



C

spektrumok additivitása arra enged következtetni, hogy mindkét kettős mutáns IPMDH enzimben a Trp-ok környezete natívszerű konformációban van jelen. A mikrokalorimetriás kísérletek (24B ábra) során a vad típusra jellemző kooperatív átmenet többé-kevésbé megmarad a W152F és W77,152F mutáns enzimeknél, míg a W152,195F mutáns esetén ez az átmenet kissé kiszélesedik és az átmeneti olvadási hőmérséklet is lecsökken. Szintén ezen IPMDH mutáns kevésbé kompakt szerkezetére utal, hogy képes az ANS kötésére szemben a vad típusú enzimmel. A natív gélelektroforézis (24C ábra) is alkalmas módszernek bizonyult olyan kisebb szerkezeti változások kimutatására, mely a DSC során tapasztalható volt. A W152F és W77,152F mutáns enzimek natív, helyes térszerkezetét bizonyítják a vad típusú IPMDH-hoz hasonló enzimaktivitás értékei is. Azonban a W152,195F mutáns enzimet az aktivitási elegybe hígítva az nem

**24. ábra A mutációk hatása a Tt IPMDH harmadlagos szerkezetére (A), a hőstabilitására (B) és a hidrodinamikai térfogatára (C)** (A) Az enzim harmadlagos szerkezetének meglétét a közeli CD spektrumok mutatják a vad típusú (fekete), a W152F (kék), a W77,152F (narancs) és a W152,195F (rózsaszín) mutáns IPMDH esetén 50  $\mu$ M enzim koncentrációnál. A W77,152F és W152,195F mutánsok spektrumainak összegét fekete teli karika jelöli. (B) Az egyes IPMDH formák hőkalorimetriás átmeneti görbéit az előző ábrával azonos színek jelölik. Az olvadási hőmérsékletek  $88,5 \pm 0,2$  (vad típus),  $86,1 \pm 0,1$  (W152F),  $84,4 \pm 0,3$  (W77,152F) és  $82,1 \pm 0,2$  °C értékeknek adódtak. (C) A natív gélelektroforézis hasonló enzimformákkal történt.

mutatott enzimaktivitást. Viszont az IPM szubsztráttal telítési szubsztrát koncentrációnál együtt történő 1 órás inkubáció után a natív enzimre jellemző aktivitás jelentős része visszatért. Tehát mindazok ellenére, hogy a Trp oldalláncok mutációja befolyásolja a fehérje hőstabilitását és hidrodinamikai térfogatát, az IPMDH mutánsok a fő strukturális elemeket natív konformációban hordozzák.

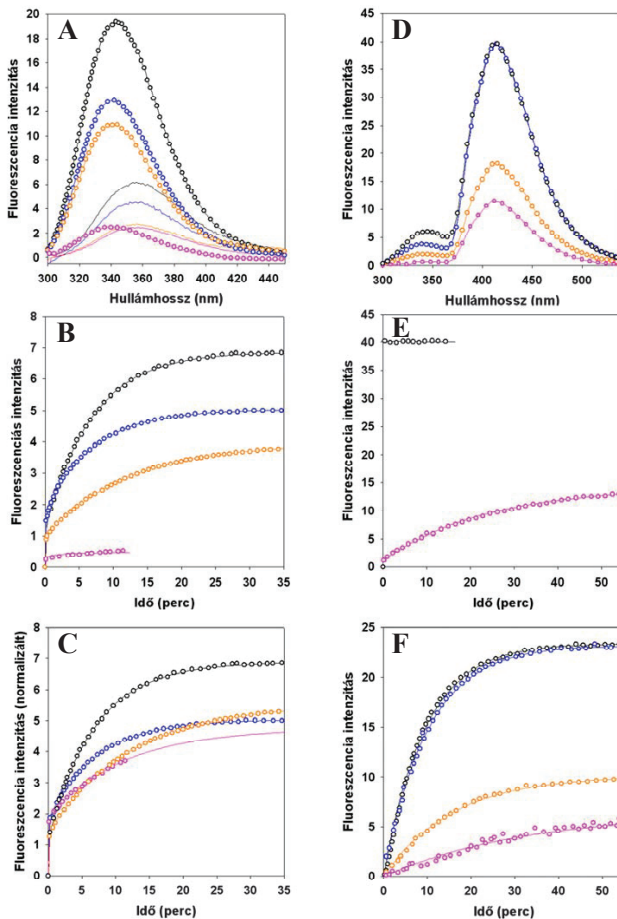
### 5.2.3.2. *A Trp mutánsok renaturációs folyamatainak kinetikai összehasonlítása*

A domének szerepének tanulmányozására, a fentiekben tárgyaltak értelmében kiváló lehetőséget adnak a fluoreszcencia spektroszkópiás vizsgálatok. A 25A ábrán láthatóak a vad típusú és mutáns IPMDH-k Trp fluoreszcencia spektrumai, a fehérjék mind natív, mind denaturált állapotában. A denaturált fehérjék spektrumai a vártaknak megfelelően alacsonyabb intenzitással rendelkeznek a megfelelő natív enzimekhez képest és intenzitásuk arányos a Trp tartalmukkal. Másrésztől a natív állapotú mutáns enzimek spektrumai alapján következtethetünk az egyes Trp oldalláncok fluoreszcenciás hozzájárulására az intakt IPMDH enzimben. A legalacsonyabb fluoreszcenciás jelet a Trp77 mutatja, melynek a natív enzim fluoreszcencia spektrumához való hozzájárulása összemérhető a szerkezet nélküli enzim alacsony fluoreszcencia intenzitásával. A Trp195 oldallánc hozzájárulása már magasabb, valamint a vártaknak megfelelően a Trp77 és Trp195 oldalláncokat is tartalmazó mutáns natív IPMDH fluoreszcencia intenzitása tovább növekszik.

A vad típusú és mutáns IPMDH-k renaturációs kinetikáját 335 nm-en követtem (25B ábra). A mutáns enzimek kinetikai viselkedése – akár a gyors szakasz jelenlétét, akár a lassú szakasz sebességi állandóit tekintve – igen hasonló mind egymáshoz, mind pedig a vad típusú IPMDH-hoz viszonyítva. A sebességi állandók rendre  $0,11 \pm 0,02$  (vad típus),  $0,12 \pm 0,02$  (W152F),  $0,078 \pm 0,010$  (W77,152F) és  $0,24 \pm 0,10$  (W152,195F)  $\text{perc}^{-1}$  értékeknek adódtak. A hasonlóság még szembetűnőbb a kinetikai görbék normalizálása után (25C ábra).

A kettős mutáns IPMDH enzimeknél a Trp oldallánc vagy az egyik, vagy a másik doménben helyezkedik el, ezért ezek renaturációjának vizsgálatával az egyes domének térszerkezet kialakulási folyamata követhető. Mivel lényeges különbség nem volt tapasztalható az egyszeres és a kettős mutánsok renaturációs kinetikái, ill. azok

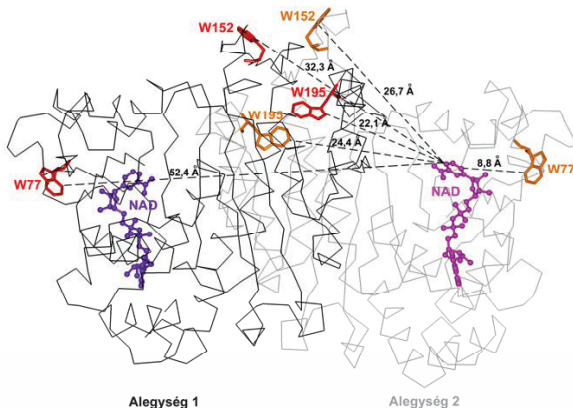
sebességi állandói között, bizonyítottá vált, hogy az IPMDH molekula két doménjének szerkezete egymással szorosan együttműködve, kooperatív módon alakul ki.



**25. ábra** A vad típusú és mutáns Tt IPMDH renaturációs kinetikáinak összehasonlítása (A) Natív (○) és denaturált (—) Trp fluoreszcencia spektrumok a vad típusú (fekete), W152F (kék), W77,152 (narancs) és W152,195F (rózsaszín) mutáns IPMDH esetén. Az alábbiakban ugyanezen színeket alkalmaztam a megfelelő IPMDH-k jelölésére. (B) A vad típusú és mutáns IPMDH enzimek renaturációs kinetikája Trp fluoreszcencia segítségével követve. A kísérleti adatok illesztése a 11. egyenlet alapján történt. (C) A W77,152F és W152,195F IPMDH-val kapott időgörbék normalizálása a W152F mutánséhoz natív spektrumuk intenzitás arányai alapján. (D) Natív állapotú IPMDH-k FRET spektruma. (E) A FRET jelenség kialakulásának időfüggése a vad típusú és W152,195F enzim esetében az IPM hozzáadása után. (F) A FRET kialakulása a renaturáció folyamán. A kísérletek 0,16  $\mu\text{M}$  (12  $\mu\text{g/ml}$ ) enzim koncentrációnál és 295 nm-es gerjesztési hullámhossznál voltak kivitelezve. A FRET mérések során 12  $\mu\text{M}$  NADH, 3 mM  $\text{MgCl}_2$  és 0,6 mM IPM volt alkalmazva.

A W152F IPMDH mutáns – ahol a kar régióban lévő Trp-t cseréltem Phe-ra – renaturációs kinetikáját tanulmányozva érdekes jelenségre figyelhetünk fel, mégpedig hogy a vad típusú IPMDH-hoz képest megfigyelt fluoreszcencia intenzitás csökkenés (25A ábra) csak a kinetika lassú szakaszában jelentkezik (25B ábra). Ezen mutáns renaturációs kinetikája igen hasonló a vad típusú Vib enziméhez (17C ábra), melyben a Tt enzim kar régiójában lévő nem konzervatív Trp oldalláncot a kevésbé fluoreszcens Tyr aminosav helyettesíti. Mindebből arra következtethetünk, hogy a kar régió helyes térszerkezetének létrejötte, vagyis a natív kölcsönhatások kialakulása a renaturáció lassú szakaszában történik meg. Ezen kölcsönhatások természetesen tovább erősítik a gyors szakasz alatt már kialakuló dimer szerkezetet.

A továbbiakban azt vizsgáltam a mutáns IPMDH-k segítségével, hogy az egyes doménekből található Trp oldalláncoknak mi lehet a szerepe a FRET kialakulásában azaz, hogy a FRET renaturáció folyamán történő kialakulását vizsgálva nyerhető-e további független információ az egyes domének térszerkezet kialakulásáról. Ezért felvettem a vad típusú és mutáns Tt IPMDH-k natív FRET spektrumait (25D ábra). Ebből nyilvánvalóvá vált, hogy a Trp 152 oldalláncnak nincs szerepe a FRET kialakulásában, hiszen azon mutáns natív spektruma, melyből csak ez a Trp oldallánc hiányzott, teljesen megegyezik a natív enzimével. Azonban mind a Trp77, mint a Trp195 aminosav oldalláncok egyértelműen szerepet játszanak a FRET kialakulásában.



**26. ábra** A NAD és Trp molekulák elhelyezkedése a Tt IPMDH (PDB kód: 1HEX) nyitott szerkezetében. A NAD molekulákat gömb-pálcika, míg a Trp oldalláncokat pálcika modell jelöli az IPMDH szűrővel és feketével bemutatott két alegységében. A NAD és Trp molekulák gyűrűi között lévő távolságokat is feltüntettem.

Jól ismert, hogy a Trp és NADH molekula jó donor-akceptor párt képeznek. Ilyen esetekben kb. 50 % FRET hatékonyság várható, amennyiben a kölcsönható donor-akceptor molekulák 25 Å távolságon belül helyezkednek el és megfelelő orientációban is vannak egymáshoz képest. Ezt figyelembe véve a Tt IPMDH NAD-dal alkotott binér komplexe kristályszerkezetében a NAD nikotinamid gyűrűje és egyes Trp oldalláncok indol csoportjai optimális távolságban vannak a FRET kialakításához (26. ábra), és feltehetően ugyanez érvényes a kötött NADH esetére is, mégsem tapasztalható a FRET jelensége IPM jelenléte nélkül. Tehát a gyűrűk orientációja is fontos a kritikus távolság mellett. Kérdésként merül fel, hogy az IPM kötődésére milyen konformáció változás lép fel az IPMDH molekulájában, hogyan változik meg az egyes oldalláncok, köztük a Trp-ok helyzete/orientációja a doménzáródás során. Az IPMDH enzimben található Trp molekulák nem vesznek rész közvetlenül az IPM kötésében (8A ábra). Annak ellenőrzésére, hogy mely kölcsönhatások változnak meg az IPM kötés hatására a Tt IPMDH molekulájában és ezek milyen hatással vannak a Trp-ok elhelyezkedésére, az egyetlen IPM-et kötő kristályszerkezet, a Tf IPMDH szerkezetének felhasználására is szükség volt. A megfelelő szerkezetek összehasonlítása alapján elmondható, hogy a FRET kialakulásában résztvevő Trp77 és Trp195 oldalláncok közül a Trp 195 indol gyűrűjének a NAD nikotinamid gyűrűtől való távolsága változik meg az IPM kötésére, még hozzá a legnagyobb változás a másik alegységbeli oldallánc esetén volt tapasztalható (16. táblázat).

**16. táblázat A Trp oldalláncok távolsága a kötött NAD-tól a nyitott és IPM-et kötő zárt Tt IPMDH szerkezetében** A távolság jellemzésére a NAD nikotinamid gyűrűjének egy C atomja és a kérdéses Trp oldallánc indol gyűrűjének ehhez legközelebb eső C atomja közötti távolságot mértem meg egyrészt a NAD-ot kötő nyitott kristályszerkezetben, másrészt a Tf IPMDH zárt szerkezetében alapján modelleztem Tt IPMDH szerkezetében. Modellezéskor a Tt és Tf IPMDH-k szerkezetét másoltam össze az első, ill. a második domén központi  $\beta$ -redői szerint, így állapítottam meg a kötött NAD lehetséges elhelyezkedését a Tt IPMDH molekula zárt szerkezetében (v.ö. 27A ábra). Narancssárga szín jelöli azon Trp oldalláncokat, melyeknek az IPM hatására bekövetkező elmozdulása fontos szerepet játszhat a FRET kialakulásában.

Triptofán	NAD-tól mért távolság (Å)	
	IPM távolléte (nyitott szerk.)	IPM jelenléte (zárt szerk.)
<b>W152</b>	26,7	21,6
<b>W77</b>	<b>8,8</b>	<b>8,8</b>
<b>W195</b>	<b>24,4</b>	<b>21,3</b>
<b>W152'</b>	32,3	27,9
<b>W77'</b>	52,4	41,0
<b>W195'</b>	<b>22,1</b>	<b>15,4</b>





oldallánchoz, mely az  $\alpha$  hélixben található és amely a Trp195 oldalláncot is hordozza. Tehát az IPM kötődése az egyik alegységhez befolyásolni tudja a másik alegységbeli Trp195 helyzetét is, amint arra már a 16. táblázat adatai is utaltak. Ennek alapján azt várhatjuk, hogy a Trp195 FRET jelének kialakulása információval szolgálhat mind az alegység-alegység, mind a domén-domén kölcsönhatások kialakulásáról a renaturáció folyamán.

Mivel a FRET vad típusú enzim esetén igen gyorsan – 1 sec-on belül kialakul – az IPM és a NADH hozzáadása után (25E ábra), lehetővé vált a renaturáció lassú szakaszának (ugyanis gyors szakasz itt meg sem figyelhető) külön történő követése FRET-tel. A vad típusú Tt IPMDH renaturációs kinetikájának FRET segítségével való követése (25F ábra) hasonló sebességi állandójú időgörbét eredményezett, mint az amikor a Trp fluoreszcencia intenzitás kialakulását vizsgáltam a renaturáció során (25B ábra). Mindez azt tükrözi, hogy az IPM kötőhely geometriájának kialakulása a harmadlagos szerkezet létrejöttével egy időben történik. A FRET kialakulás kinetikai adatai még azt is megmutatták, hogy az IPM kötődése és az azt kísérő konformáció változás (doménzáródás) a lassú renaturációs lépéshez képest sokkal gyorsabb folyamatok, ahogyan az várható is az enzim katalitikus hatékonyságának ( $k_{\text{kat}} \approx 0,2 \text{ s}^{-1}$ ) ismeretében. A Trp mutánsok kinetikáját követve is hasonló eredményekre jutottam (25F ábra). A renaturáció folyamatára a vad típusú és a különböző mutáns enzimekre az alábbi sebességi állandókat kaptam:  $0,11 \pm 0,02$  (vad típus),  $0,10 \pm 0,02$  (W152F),  $0,066 \pm 0,010$  (W77,152F) és  $0,033 \pm 0,004$  (W152,195F)  $\text{perc}^{-1}$ . Ezen sebességi állandók ugyanazon nagyságrendbe esnek, mely az egyes domének kooperatív, egymás feltekeredését elősegítő térszerkezet kialakulás mechanizmusát támasztja alá.

Meg kell azonban jegyezni, hogy a W152,195F mutáns esetén – mely kevésbé kompakt szerkezettel rendelkezik a vad típusú IPMDH-hoz képest (24C ábra) – a natív enzim FRET jelensége nem pillanatszerűen alakul ki az IPM hozzáadása után. A folyamatot  $0,067 \pm 0,008 \text{ perc}^{-1}$  sebességi állandó jellemzi, mely összehasonlítható a renaturáció követése során meghatározottakkal. A natív mutáns enzimet IPM-el előinkubálva, viszont a FRET kialakulásának időfüggése eltűnik. Mint fentebb említettem szintén az IPM-el való előinkubálás képes volt ezen mutánst inaktívból aktív konformációba hozni. A 25E ábrán bemutatott időgörbe valószínűleg ez az IPM jelenlétében bekövetkező konformációs átalakulást tükrözi. Külön érdekesség (bár lehet

véletlen egybeesés is), hogy a folyamat sebességi állandója gyakorlatilag megegyezik a renaturáció lassú szakaszának sebességi állandójával.

Összefoglalva tehát, a Trp mutások mindkét fluoreszcens megközelítéssel történő vizsgálata egyértelműen arra mutat, hogy az IPMDH molekulában az egyes domének térszerkezet kialakulása egymástól nem független folyamat, hanem egymásra támaszkodva, kooperatív módon megy végbe. A két domén térszerkezete tehát az alegységen belül egyidejűleg, szimmetrikus módon alakul ki. Az 5.2.2. fejezetben leírtak értelmében az alegységen belüli szimmetria kiterjeszhető az alegységek szimmetrikus, szintén egymásra épülő térszerkezet kialakulására is a dimeren belül. Az alábbiakban azt fogom megvizsgálni, hogy mi lehet a szerkezeti háttere az alegységek és domének nagyfokú együttműködésének és hogy ez érvényes-e a különböző hőstabilitású IPMDH enzimeknél is.

#### **5.2.4. Szerkezeti magyarázat az alegységek és domének együttműködésére a térszerkezet kialakulása során**

Az alegységek, ill. a domének a térszerkezet kialakulás során mutatott szoros együttműködésének megértéséhez elengedhetetlen volt az alegység- és doménfelszín kölcsönhatásainak alapos, szisztematikus feltérképezése, valamint összehasonlítása a különböző hőstabilitású IPMDH enzimek esetén. Az alegységfelszíneket alkotó másodlagos szerkezeti elemek a térszerkezeti adatokból ismertek, amint azt az Irodalmi rész 7. ábráján bemutattam. A doménfelszínt feltételezhetően alkotó elemek ( $\beta$ F, ill.  $\beta$ E) szintén grafikus analízis alapján azonosíthatóak (5. ábra). Az alegységek és domének közötti kölcsönhatások feltérképezése előtt megvizsgáltam a  $\beta$ F, ill.  $\beta$ E, mint doménfelszíni elemek realitását. Ehhez számba vettem ezen elemeknek a doménon belüli, ill. a másik doménnel kialakított kontaktusait a Tt IPMDH enzim esetében. A doménon belüli kontaktusok nagyobb száma (30 db) a domének közöttihez (14 db) képest bizonyítja, hogy a  $\beta$ F és  $\beta$ E valóban a domének felszínén helyezkednek el.

Az alegység- és doménfelszínének összehasonlító analízise során kapott eredményeket a 17. és 18. táblázatban foglaltam össze.

**17. táblázat A három különböző hőstabilitású IPMDH alegységfelszínén lévő kölcsönhatásai** Az atomi kölcsönhatások meghatározása (ld. Anyagok és módszerek fejezet) az ismert kristályszerkezetek alapján történt. Az aminosavak számozása megfelel az ismert szekenciák számozásának. A szerkezetek összerendezés alapján egymásnak megfeleltethető aminosav oldalláncok között kialakuló kölcsönhatások azonos sorban találhatóak. A konzervatív oldalláncokat félkövér betűtípus jelzi.

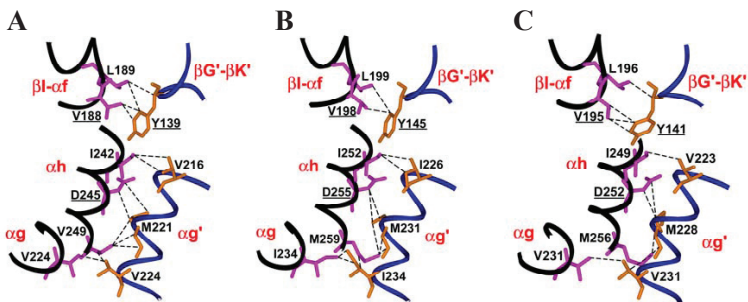
Tt	Ec	Vib	Másodlagos szerkezeti elemek	Kölcsönhatás típusa
P117-R225	P122-I234	S119-V231	βF-βG „loop”, αg'	hidrofób
L118-V224	L123-I234	L120-V231		
K119-K119	R124-R124	K121-K121	βF-βG, βF'-βG' „loop”-ok	
<b>Y139-V188</b>	<b>Y145-V198</b>	<b>Y141-V195</b>	βG-βK, βI'-αf''	
<b>Y139-L189</b>	<b>Y145-L199</b>	<b>Y141-L196</b>	„loop”-ok	
A149-S158	E159-H168	R156-S165	βK-βL „loop”, βL'	H-híd kötés
<b>R144-V188</b>	<b>K150-V198</b>	<b>R146-V195</b>	βK, βI'-αf'' „loop”	
R144-E190	-	-		ionos
-	K150-Q200	-		
G145-E190	G151-Q200	Q147-A197		βK, αf''
M146-E190	-	-		
M146-E193	-	-		
M146-F194	-	-		
-	Q157-R169	-		
-	Q157-F170	-	βK-βL „loop”, αe'	ionos
	E159-R169	R156-E166		
A149-K159	E159-R169	R156-E166		βL, βL'
A151- <b>Y157</b>	A161- <b>Y167</b>	A158- <b>Y164</b>		
N153-E155	D163-E165	D160-L162		
E150-S158	K160-H168	M157-S165	hidrofób	
W152-R156	F162-V166	Y159-P163		
E150-F194	K160-L204	M157-L201		
A151-E190	A161-Q200	A158-A197		
A151-F194	A161-L204	A158-L201		
N153-L189	D163-L199	D160-L196	βL, βI-αf'' „loop”	hidrofób, H-híd kötés
N153-E190	D163-Q200	D160-A197	βL, αf''	
N153-V191	D163-S201	D160-S198	αg, αh'	H-híd kötés
V216-I242	I226-I252	V223-I249		hidrofób
A220-I242	T230- I252	A227- I249		
M221- <b>D245</b>	M231- <b>D255</b>	M228- <b>D252</b>		
M221-V249	M231-M259	M228-M256		
R225-V249	K235-M259	R232-M256		
V224-V224	I234-I234	V231-V231		
I238- <b>F239</b>	L248- <b>F249</b>	L245- <b>F246</b>		
			αh, αh'	

**18. táblázat A három különböző hőstabilitású IPMDH doménfelszínén lévő kölcsönhatásai** Az atomi kölcsönhatások meghatározása (ld. Anyagok és módszerek fejezet) az ismert kristályszerkezetek alapján történt. Az aminosavak számozása megfelel az ismert szekvenciák számozásának. A szekvencia összerendezés alapján egymásnak megfeleltethető aminosav oldalláncok között kialakuló kölcsönhatások azonos sorban találhatóak. A konzervatív oldalláncokat félkövér betűtípus jelzi.

Tt	Ec	Vib	Másodlagos szerkezeti elemek	Kölcsönhatás típusa
A101-L262	S106-L272	G103-L269	βF és βE	H-híd kötés
N102-A260	N107-A270	N104-A267		
L103-A260	L108-A270	L105-A267		
A101-S261	S106-S271	G103-S268		hidrofób
<b>N102-A260</b>	<b>N107-A270</b>	<b>N104-A267</b>		
N102-A261	N107-S271	N104-S268		
L103-A260	L108-A270	L105-A267		
L103-L262	L108-L272	L105-L269		
<b>R104-S259</b>	<b>R109-S269</b>	<b>R106-S266</b>		
<b>P105-P258</b>	<b>P110-P268</b>	-		
-	-	<b>R106-L264</b>		
-	-	<b>P107-L264</b>		
-	A111-L267	A108-L264		
L103-M296	-	L105-M304	βF és αi	
<b>P105-M296</b>	<b>P110-L307</b>	<b>P107-M304</b>		
L103-H300	L108-Y311	L105-Y308		
<b>R104-V272</b>	<b>R109-A283</b>	<b>R106-C280</b>	βF és βD	

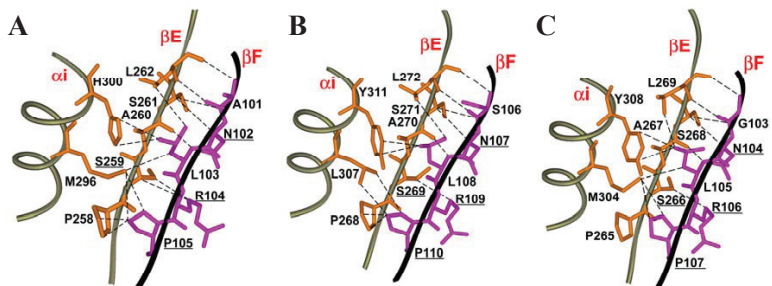
Az adatok alapján levonható az az általános következtetés, hogy mind az alegységek, mind a domének összetartásában a hidrofób kölcsönhatások töltik be a legjelentősebb szerepet. Megfigyelhető az is, hogy a hidrofób kölcsönhatások nagy száma – hőstabilitástól függetlenül – mindhárom vizsgált IPMDH általános jellemzője, tehát feltételezhető, hogy az összes IPMDH enzimben ezen kölcsönhatások játszanak fő szerepet az alegységek és domének összetartásában. Mindez jól magyarázza az előző fejezetekben kifejtett, nagyon hasonló térszerkezet kialakulási mechanizmust a három eltérő hőstabilitású IPMDH esetében.

A 28. és 29. ábra szemléletesen mutatja be az alegység-, ill. doménfelszín egy részének kölcsönhatásait a Tt, Ec és Vib enzim esetén. Érdekes még megemlíteni mindamellett, hogy a két alegység és a két domén összetartásában a hidrofób jelleg az a tulajdonság, ami jelentőséggel bír a kölcsönhatások kialakítása során, ez a tulajdonság nem igényli a kölcsönható oldalláncok teljes konzervativitását. Sok esetben elegendő a hidrofób természet fennmaradása az adott pozícióban: pl. a Tt IPMDH-ban a 249-s helyen lévő Val-t az összes ismert IPMDH szekvencia 57 %-ában a szintén hidrofób természetű Met helyettesíti, a fennmaradó részben pedig a Val mellett főként Ala, Leu, ill. Ile szerepel, melyek mindegyike alkalmas hidrofób kontaktusok kialakítására.



28. ábra Alegység kontaktusok összehasonlítása a különböző hőstabilitású IPMDH enzimek esetén A Tt (A), Ec (B) és Vib (C) enzimek megfelelő alegység részleteit fekete, ill. kék szalagdiagram jelöli. Az alegység kontaktus kialakításában résztvevő oldalláncokat rózsaszín és narancssárga pálcika modell, míg a kölcsönhatásokat szaggatott vonal jelképezi. A 95%-ban konzervatív oldalláncokat aláhúzással jelöltem.

Mint fent tárgyaltam, a domének kölcsönhatásainak vizsgálata rámutatott arra is, hogy az egyes doméneket határoló  $\beta E$  és  $\beta F$  redők között kevesebb kölcsönhatás alakul ki, mint a doméneken belül, mégis az alegységek doménjei oly mértékben tartoznak össze, hogy elősegítik egymás térszerkezetének kialakulását. Mindez összhangban van azzal, hogy az IPMDH alegység doménjeinek központi  $\beta$ -redői oly módon helyezkednek el, hogy együttesen egy közös hidrofób magot alkotnak (5. ábra).



29. ábra A doménfelszínen lévő kölcsönhatások összehasonlítása különböző hőstabilitású IPMDH enzimek esetén A Tt (A), Ec (B) és Vib (C) enzimek 1. domén részletét szürke, míg a 2. domén részletét fekete szalagdiagram jelöli. Az oldalláncokat narancssárga és rózsaszín pálcika modell, míg a kölcsönhatásokat szaggatott vonal jelképezi. A 95%-ban konzervatív oldalláncokat aláhúzással jelöltem.

Tehát az alegységek és domének felszínén kialakuló kiterjedt hidrofób kölcsönhatás hálózat lehet felelős az alegységek és domének kooperatív térszerkezet kialakulási folyamatáért. Mivel a másodlagos szerkezeti elemek az egész molekulában sokkal gyorsabban kialakulnak, mint a harmadlagos natív szerkezeti elemek, ez elősegíti a domén-domén és az alegység kontaktusok létrejöttét már a térszerkezet kialakulás korai szakaszában, továbbá feltételezi az egymást elősegítő térszerkezet kialakulást is.

## 6. ÖSSZEFOGLALÁS

Doktori munkám során a két alegységből és alegységenként két szerkezeti doménből felépülő 3-izopropilmalát dehidrogenáz (IPMDH) molekuláját (ill. annak különböző hőstabilitású formáit) választottam modell fehérjeként két különböző, de egymással szorosan összefüggő kérdéskör tanulmányozására:

1. Milyen szerepe van az alegységeknek és a doméneknek a fehérjétszerkezet kialakulási folyamat mechanizmusában?
2. Van-e összefüggés a térszerkezet kialakulás mechanizmusa és a fehérjék hőstabilitása között?

Főbb megállapításaim a következők:

1. Az egyensúlyi denaturációs vizsgálatok alapján – melyekhez CD és fluoreszcencia spektroszkópiát, ill. ureagradiens gélelektroforézist alkalmaztam – megállapítottam, hogy a Tt (termofil), Ec (mezofil) és Vib (hidegtűrő) IPMDH-k közötti stabilitás különbségek nem tulajdoníthatóak egyszerűen a denaturációs szabadentalpia változás ( $\Delta G^0$ ) értékeinek. Míg az Ec és Vib IPMDH térszerkezet kialakulási mechanizmusa egyértelműen összetett, három állapotú folyamat, addig a Tt enzim esetében ezen kísérletek nem támasztották alá a folyamat komplexitását. A Tt IPMDH térszerkezet kialakulási folyamatának komplex jellegére viszont a további kinetikai vizsgálataimból mégis fény derült.

2. A három különböző hőstabilitású IPMDH térszerkezet kialakulási és felbomlási folyamatának időbeli jellemzéséhez a CD- és fluoreszcencia spektroszkópiás módszerek mellett, az enzimaktivitás és a tioltartalmú Ec és Vib enzim esetén a tiolreaktivitás változásának követését is felhasználtam. Megállapítottam, hogy a denaturáció mindhárom IPMDH esetében egyszerű, elsőrendű folyamat, a sebességi állandók viszont jelentősen eltérnek egymástól. A termofil enzim denaturációja a leglassabb, míg legkönnyebben a hidegtűrő Vib enzim veszíti el szerkezetét. A denaturációval ellentétben a térszerkezet kialakulása (renaturációja) mindhárom IPMDH esetében összetett folyamat: egy igen gyors és egy sokkal lassabb elsőrendű szakaszból áll. Az egyes szakaszok sebessége a három enzim esetén nem különbözik lényegesen egymástól.

A denaturáció és renaturáció időgörbéjét szubsztrátok jelenlétében is vizsgáltam. A denaturáció sebessége jelentősen lecsökkent a Mn\*IPM-et kötő binér komplexben, továbbá a működő (NAD\*Mn\*IPM) és a nem működő (NADH\*Mn\*IPM) terner komplexek esetében. A NAD, ill. NADH molekuláknak önmagában semmilyen hatása nem volt a denaturáció folyamatára. Megállapítottam tehát, hogy a Mn\*IPM felelős a lassabb denaturációért, vagyis védi a fehérjemolekulát a letekeredés ellen. Kimutattam azt is, hogy ez a védő hatás eltérő a három különböző hőstabilitású enzim esetén. A legnagyobb rigiditással és hőstabilitással rendelkező Tt enzimmél a szubsztrát jelenléte nem vezet jelentős további stabilizációhoz, míg a nagyobb flexibilitású Ec és Vib enzim esetén erre lehetőség van. A renaturáció folyamatát – a denaturációtól eltérően – a szubsztrátok jelenléte nem befolyásolta.

3. A denaturáció és renaturáció kinetikai eredményeit térszerkezeti adatok alapján értelmeztem. Az eltérő denaturációs sebességekért a nem konzervatív oldalláncok közötti specifikus kölcsönhatások tehetőek felelőssé, melyek a fehérjék stabilitásbeli különbségeit is okozzák. A 27 kiválasztott nem konzervatív aminosavból 16 esetén volt tisztán kimutatható a kapcsolat az atomi kölcsönhatások és a hőstabilitás között. Az IPMDH molekula három nagy régiója (1. domén, a két domén közötti régió és az alegységfelszín) különíthető el, melyeknek szerepe van az eltérő hőstabilitásban.

A Mn\*IPM stabilizáló szerepével kapcsolatban megállapítottam, hogy a szubsztrát kötődése rögzíti a vele kölcsönható oldalláncokat magában foglaló másodlagos szerkezeti elemek relatív térbeli helyzetét. Ezenkívül a szerkezet stabilizálásában számos más, a szubsztráttal csak közvetve kapcsolatban álló konzervatív oldallánc is részt vesz.

4. Az IPMDH esetén a térszerkezet kialakulás sebessége és a hőstabilitás között nem volt kimutatható összefüggés, bár más fehérjéknél található erre példa az irodalomban. Tehát a stabilitási különbségeket meghatározó specifikus (nem konzervatív) kölcsönhatások a térszerkezet kialakulási folyamat későbbi szakaszában, azaz csak a sebességmeghatározó lépés(ek)et követően alakulnak ki az IPMDH esetén. Azt, hogy ez a mechanizmus mennyire általánosítható, több más, eltérő stabilitású rokon fehérjével végzett renaturációs kísérlettel lehetne eldönteni. A denaturáció sebességének az IPMDH esetén megfigyelt csökkenése a hőstabilitás növekedésével viszont általánosabb stabilizáló mechanizmusnak látszik, melyet a hipertermofil fehérjék körében is megfigyeltek.

5. Jellemeztem a renaturáció során kialakuló intermedier természetét is. Ez az intermedier a Trp fluoreszcenciás mérések alapján már a natív enzimre jellemző  $\lambda_{\max}$  értékkel rendelkezik, de fluoreszcencia emissziója még jóval alacsonyabb a natív enziménél. Tehát a Trp oldalláncok részleges deszolvatációja már megtörténik a polipeptidlánc feltekeredésének ezen kezdeti szakaszában. Ezt támasztották alá az ANS fluoreszcenciás mérések is, melyek szerint az intermedier egy „molten globula”-szerű állapotot vesz fel. További, fluoreszcencia anizotrópia mérések segítségével megállapítottam, hogy az intermedier állapotban már feltehetően a két polipeptidlánc asszociációja is bekövetkezik, amely a végső dimer szerkezet kezdeményének tekinthető. FRET mérések segítségével azt is kimutattam, hogy az intermedier már kifejezetten képes a szubsztrát kötésére, habár még ezen kölcsönhatások biztosan nem natívszerűek, hiszen az intermedier enzimaktivitással nem rendelkezik.

6. A fentiek alapján az alegységek térszerkezet kialakulási szerepével kapcsolatban elmondható, hogy az IPMDH két polipeptidlánc asszociációjának már igen korán, a folyamat kezdeti fázisában be kell következnie ahhoz, hogy térszerkezetüket egymást segítve, kooperatív módon alakíthassák ki.

7. Az alegységek szerepe mellett tanulmányoztam a domének szerepét is a renaturáció folyamatában. A Tt IPMDH egy alegysége 3 Trp oldalláncot tartalmaz: egyet az 1. doménben, egyet a 2. doménben és egyet az úgynevezett kar régióban. A Trp-ok helyspecifikus mutagenézisével elértem, hogy az egyes Trp oldalláncok környezetében, elkülönítve követhessem a natív szerkezet kialakulását és ezáltal külön-külön jellemezhessem az egyes szerkezeti domének térszerkezet kialakulási folyamatait az intakt enzimmolekulán belül. Mind a Trp fluoreszcenciás, mind a FRET mérések egybehangzóan megmutatták, hogy a domének térszerkezet kialakulása az alegységen belül teljesen szimmetrikusan zajlik. Tehát a két domén egymással szoros kölcsönhatásban van a térszerkezet kialakulás teljes folyamata alatt és kölcsönösen segítik egymás natív konformációjának létrejöttét.

8. Az alegységek és domének térszerkezet kialakulásának szoros összefüggését az alegység-, ill. doménfelszínen lévő kölcsönhatások szisztematikus összehasonlításával támasztottam alá. Ezen kölcsönhatások mindhárom IPMDH-ban igen hasonlóak és főként hidrofób jellegűek, függetlenül azok hőstabilitásától.



## 7. KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

### 1. Az értekezés témaköréhez kapcsolódó referált tudományos folyóiratban megjelent közlemények:

**Gráczer, É.**, Varga, A., Melnik, B., Semisotnov, G., Závodszky, P. & Vas, M.  
Symmetrical Refolding of Protein Domains and Subunits: Example of the Dimeric  
Two-Domain 3-Isopropylmalate Dehydrogenase  
*Biochemistry* (2009) **48** 1123-1134

**Gráczer, É.**, Varga, A., Hajdú, I., Melnik, B., Szilágyi, A., Semisotnov, G., Závodszky,  
P. & Vas, M.  
Rates of Unfolding, rather than Refolding, Determine Thermal Stabilities of  
Thermophilic, Mesophilic and Psychrotrophic 3-Isopropylmalate Dehydrogenases  
*Biochemistry* (2007) **46** 11536-11549

### 2. Egyéb referált tudományos folyóiratban megjelent közlemények:

Varga, A., Flachner, B., Konarev, P., **Gráczer, É.**, Szabó, J., Svergun, D., Závodszky,  
P., Vas, M.  
Substrate-induced double sided H-bond network as a means of domain closure in 3-  
phosphoglycerate kinase  
*FEBS Lett.* (2006) **580** 2698-2706

Varga, A., Flachner, B., **Gráczer, É.**, Osváth, S., Szilágyi, AN., Vas, M.  
Correlation between conformational stability of the ternary enzyme-substrate complex  
and domain closure of 3-phosphoglycerate kinase  
*FEBS Journal* (2005) **272** 1867-1885

### 3. Konferencia kiadványok, konferencia összefoglalók:

(az előadás, ill. a poszter előadója a szerzők sorában az első helyen szerepel)

**Gráczer, É.**, Varga, A., Melnik, B., Semisotnov, G., Závodszy, P. & Vas, M.  
Poszter címe: Az alegységek és a domének kooperativitása az izopropilmalát dehidrogenáz (IPMDH) térszerkezet kialakulása során  
A Magyar Biofizikai Egyesület XXIII. Kongresszusa, Pécs 2009  
Konferencia kiadvány, 73. oldal

Vas, M., Varga A., Szabó, J., **Gráczer, É.**, Flachner B., Závodszy, P., Konarev, P. & Svergun, D.

Előadás címe: Insight into the mechanism of domain movements and its role in functioning of 3-phosphoglycerate kinase

„Biocatalysis-2007. Structure, functions, application” Nemzetközi konferencia  
Moszkva, Szentpétervár, Oroszország 2007

*Vestnik Moscow University Bulletin*, Ser. No. 2. (2008) 48 142-147

**Gráczer, É.**, Varga, A., Hajdú, I., Melnik, B., Semisotnov, G., Závodszy, P. & Vas, M.

Poszter címe: Correlation between thermal stabilities of IPMDHs and their unfolding rates

VI. Európai Biofizikai Kongresszus, London 2007

*Eur. J. Biophys.* **36**, p. S159, P-413

**Gráczer, É.**, Varga, A., Hajdú, I., Melnik, B., Szilágyi, A., Semisotnov, G., Závodszy, P. & Vas, M.

Előadás címe: Rates of unfolding, rather than refolding determine thermal stabilities of thermophilic, mesophilic and psychrotrophic isopropylmalate dehydrogenases (IPMDH)

Straub napok, Szeged 2007

**Gráczer, É.**, Varga, A., Hajdú, I., Semisotnov, G., Závodszy, P. & Vas, M.

Poszter címe: Az izopropilmalát dehidrogenázok (IPMDH) hőstabilitásbeli különbségeit denaturációjuk sebessége határozza meg

A Magyar Biokémiai Egyesület Vándorgyűlése, Pécs 2006

*Biokémia* szeptemberi szám, 70. oldal P-29

Varga, A., **Gráczer, É.**, Hajdú, I., Závodszy, P. & Vas, M.

Poszter címe: Association of subunits is a prerequisite for formation of the native structure of the dimeric isopropylmalate-dehydrogenase (IPMDH)

V. Európai Biofizikai Kongresszus, Montpellier 2005

*Eur. J. Biophys.* **34**, p.796, P-839

## 8. IRODALMI HIVATKOZÁSOK

1. Anfinsen, C. B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains *Science* 181, 223-30.
2. Galzitskaia, O. V. (2002) [Sensitivity of the folding pathway to the details of amino acid sequence] *Mol Biol (Mosk)* 36, 386-90.
3. Huang, J. T., and Cheng, J. P. (2008) Differentiation between two-state and multi-state folding proteins based on sequence *Proteins* 72, 44-9.
4. Wetlaufer, D. B. (1973) Nucleation, rapid folding, and globular intrachain regions in proteins *Proc Natl Acad Sci U S A* 70, 697-701.
5. Wetlaufer, D. B. (1990) Nucleation in protein folding--confusion of structure and process *Trends Biochem Sci* 15, 414-5.
6. Itzhaki, L. S., Otzen, D. E., and Fersht, A. R. (1995) The structure of the transition state for folding of chymotrypsin inhibitor 2 analysed by protein engineering methods: evidence for a nucleation-condensation mechanism for protein folding *J Mol Biol* 254, 260-88.
7. Fersht, A. R. (1995) Optimization of rates of protein folding: the nucleation-condensation mechanism and its implications *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 10869-73.
8. Nolting, B., and Agard, D. A. (2008) How general is the nucleation-condensation mechanism? *Proteins* 73, 754-64.
9. Kim, P. S., and Baldwin, R. L. (1990) Intermediates in the folding reactions of small proteins *Annu Rev Biochem* 59, 631-60.
10. Ptitsyn, O. B. (1973) [Stages in the mechanism of self-organization of protein molecules] *Dokl Akad Nauk SSSR* 210, 1213-5.
11. Lin, C. C., and Chang, J. Y. (2007) Pathway of oxidative folding of bovine alpha-interferon: predominance of native disulfide-bonded folding intermediates *Biochemistry* 46, 3925-32.
12. Ptitsyn, O. B., and Semisotnov, G. V. (1991) The mechanism of protein folding in *Conformations and forces in protein folding* (Nall, B. T., and Dill, K. A., Eds.) pp 155-157, AAAS, Washington D. C.
13. Dolgikh, D. A., Gilmanshin, R. I., Brazhnikov, E. V., Bychkova, V. E., Semisotnov, G. V., Venyaminov, S., and Ptitsyn, O. B. (1981) Alpha-Lactalbumin: compact state with fluctuating tertiary structure? *FEBS Lett* 136, 311-5.
14. Ptitsyn, O. B., Pain, R. H., Semisotnov, G. V., Zerovnik, E., and Razgulyaev, O. I. (1990) Evidence for a molten globule state as a general intermediate in protein folding *FEBS Lett* 262, 20-4.
15. Choithia, C. (1984) Principles that determine the structure of proteins *Annu Rev Biochem* 53, 537-72.
16. Tsong, T. Y., Hu, C. K., and Wu, M. C. (2008) Hydrophobic condensation and modular assembly model of protein folding *Biosystems* 93, 78-89.
17. Karplus, M., and Weaver, D. L. (1976) Protein-folding dynamics *Nature* 260, 404-6.
18. Ramos, C. H., Weisbuch, S., and Jamin, M. (2007) Diffusive motions control the folding and unfolding kinetics of the apomyoglobin pH 4 molten globule intermediate *Biochemistry* 46, 4379-89.
19. Dill, K. A., Bromberg, S., Yue, K., Fiebig, K. M., Yee, D. P., Thomas, P. D., and Chan, H. S. (1995) Principles of protein folding--a perspective from simple exact models *Protein Sci* 4, 561-602.

20. Harrison, S. C., and Durbin, R. (1985) Is there a single pathway for the folding of a polypeptide chain? *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 4028-30.
21. Banerjee, R., Sen, M., Bhattacharya, D., and Saha, P. (2003) The jigsaw puzzle model: search for conformational specificity in protein interiors *J Mol Biol* 333, 211-26.
22. Dill, K. A., and Chan, H. S. (1997) From Levinthal to pathways to funnels *Nat Struct Biol* 4, 10-9.
23. Lindberg, M. O., and Oliveberg, M. (2007) Malleability of protein folding pathways: a simple reason for complex behaviour *Curr Opin Struct Biol* 17, 21-9.
24. Oliveira, L. C., Schug, A., and Onuchic, J. N. (2008) Geometrical features of the protein folding mechanism are a robust property of the energy landscape: a detailed investigation of several reduced models *J Phys Chem B* 112, 6131-6.
25. Hill, D. J., Mio, M. J., Prince, R. B., Hughes, T. S., and Moore, J. S. (2001) A field guide to foldamers *Chem Rev* 101, 3893-4012.
26. Brockwell, D. J., Smith, D. A., and Radford, S. E. (2000) Protein folding mechanisms: new methods and emerging ideas *Curr Opin Struct Biol* 10, 16-25.
27. Eaton, W. A., Munoz, V., Hagen, S. J., Jas, G. S., Lapidus, L. J., Henry, E. R., and Hofrichter, J. (2000) Fast kinetics and mechanisms in protein folding *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29, 327-59.
28. Roder, H., and Shastry, M. R. (1999) Methods for exploring early events in protein folding *Curr Opin Struct Biol* 9, 620-6.
29. Orevi, T., Ben Ishay, E., Pirchi, M., Jacob, M. H., Amir, D., and Haas, E. (2009) Early closure of a long loop in the refolding of adenylate kinase: a possible key role of non-local interactions in the initial folding steps *J Mol Biol* 385, 1230-42.
30. Goldbeck, R. A., Kim-Shapiro, D. B., and Kligler, D. S. (1997) Fast natural and magnetic circular dichroism spectroscopy *Annu Rev Phys Chem* 48, 453-79.
31. Ge, M., Mao, Y. J., and Pan, X. M. (2009) Refolding of the hyperthermophilic protein Ssh10b involves a kinetic dimeric intermediate *Extremophiles* 13, 131-7.
32. Neudecker, P., Zarrine-Afsar, A., Davidson, A. R., and Kay, L. E. (2007) Phi-value analysis of a three-state protein folding pathway by NMR relaxation dispersion spectroscopy *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 15717-22.
33. Hsu, I. J., Shiu, Y. J., Jeng, U. S., Chen, T. H., Huang, Y. S., Lai, Y. H., Tsai, L. N., Jang, L. Y., Lee, J. F., Lin, L. J., Lin, S. H., and Wang, Y. (2007) A solution study on the local and global structure changes of cytochrome c: an unfolding process induced by urea *J Phys Chem A* 111, 9286-90.
34. Fabian, H., and Naumann, D. (2004) Methods to study protein folding by stopped-flow FT-IR *Methods* 34, 28-40.
35. Korzhnev, D. M., and Kay, L. E. (2008) Probing invisible, low-populated States of protein molecules by relaxation dispersion NMR spectroscopy: an application to protein folding *Acc Chem Res* 41, 442-51.
36. Miranker, A., Robinson, C. V., Radford, S. E., and Dobson, C. M. (1996) Investigation of protein folding by mass spectrometry *Faseb J* 10, 93-101.
37. Englander, S. W. (2000) Protein folding intermediates and pathways studied by hydrogen exchange *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29, 213-38.
38. Baek, J. H., Yang, W. S., Lee, C., and Yu, M. H. (2009) Functional unfolding of alpha1-antitrypsin probed by hydrogen-deuterium exchange coupled with mass spectrometry *Mol Cell Proteomics* 8, 1072-81.
39. Borgia, A., Williams, P. M., and Clarke, J. (2008) Single-molecule studies of protein folding *Annu Rev Biochem* 77, 101-25.

40. Fersht, A. R. (1999) Kinetics of Protein Folding in *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*, Freeman & Co., New York.
41. Lorch, M., Mason, J. M., Clarke, A. R., and Parker, M. J. (1999) Effects of core mutations on the folding of a beta-sheet protein: implications for backbone organization in the I-state *Biochemistry* *38*, 1377-85.
42. Cavagnero, S., Dyson, H. J., and Wright, P. E. (1999) Effect of H helix destabilizing mutations on the kinetic and equilibrium folding of apomyoglobin *J Mol Biol* *285*, 269-82.
43. Kuwajima, K., Yamaya, H., and Sugai, S. (1996) The burst-phase intermediate in the refolding of beta-lactoglobulin studied by stopped-flow circular dichroism and absorption spectroscopy *J Mol Biol* *264*, 806-22.
44. Qi, P. X., Sosnick, T. R., and Englander, S. W. (1998) The burst phase in ribonuclease A folding and solvent dependence of the unfolded state *Nat Struct Biol* *5*, 882-4.
45. Ferguson, N., Capaldi, A. P., James, R., Kleanthous, C., and Radford, S. E. (1999) Rapid folding with and without populated intermediates in the homologous four-helix proteins Im7 and Im9 *J Mol Biol* *286*, 1597-608.
46. Eaton, W. A., Munoz, V., Thompson, P. A., Henry, E. R., and Hofrichter, J. (1998) Kinetics and Dynamics of Loops,  $\alpha$ -Helices,  $\beta$ -Hairpins, and Fast-Folding Proteins *Accounts of Chemical Research* *31*, 745-753.
47. Bieri, O., Wirz, J., Hellrung, B., Schutkowski, M., Drewello, M., and Kiefhaber, T. (1999) The speed limit for protein folding measured by triplet-triplet energy transfer *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 9597-601.
48. Shastry, M. C., and Roder, H. (1998) Evidence for barrier-limited protein folding kinetics on the microsecond time scale *Nat Struct Biol* *5*, 385-92.
49. Park, S. H., Shastry, M. C., and Roder, H. (1999) Folding dynamics of the B1 domain of protein G explored by ultrarapid mixing *Nat Struct Biol* *6*, 943-7.
50. Pollack, L., Tate, M. W., Darnton, N. C., Knight, J. B., Gruner, S. M., Eaton, W. A., and Austin, R. H. (1999) Compactness of the denatured state of a fast-folding protein measured by submillisecond small-angle x-ray scattering *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 10115-7.
51. Plaxco, K. W., Millett, I. S., Segel, D. J., Doniach, S., and Baker, D. (1999) Chain collapse can occur concomitantly with the rate-limiting step in protein folding *Nat Struct Biol* *6*, 554-6.
52. Nagi, A. D., Anderson, K. S., and Regan, L. (1999) Using loop length variants to dissect the folding pathway of a four-helix-bundle protein *J Mol Biol* *286*, 257-65.
53. Kim, D. E., Yi, Q., Gladwin, S. T., Goldberg, J. M., and Baker, D. (1998) The single helix in protein L is largely disrupted at the rate-limiting step in folding *J Mol Biol* *284*, 807-15.
54. Zhou, Y., and Karplus, M. (1999) Interpreting the folding kinetics of helical proteins *Nature* *401*, 400-3.
55. Morozova-Roche, L. A., Jones, J. A., Noppe, W., and Dobson, C. M. (1999) Independent nucleation and heterogeneous assembly of structure during folding of equine lysozyme *J Mol Biol* *289*, 1055-73.
56. Goodsell, D. S., and Olson, A. J. (2000) Structural symmetry and protein function *Annu Rev Biophys Biomol Struct* *29*, 105-53.

57. Rumfeldt, J. A., Galvagnion, C., Vassall, K. A., and Meiering, E. M. (2008) Conformational stability and folding mechanisms of dimeric proteins *Prog Biophys Mol Biol* 98, 61-84.
58. Ibarra-Molero, B., Makhatadze, G. I., and Matthews, C. R. (2001) Mapping the energy surface for the folding reaction of the coiled-coil peptide GCN4-p1 *Biochemistry* 40, 719-31.
59. Bachhawat, K., Kapoor, M., Dam, T. K., and Surolia, A. (2001) The reversible two-state unfolding of a monocot mannose-binding lectin from garlic bulbs reveals the dominant role of the dimeric interface in its stabilization *Biochemistry* 40, 2991-3000.
60. Milla, M. E., and Sauer, R. T. (1994) P22 Arc repressor: folding kinetics of a single-domain, dimeric protein *Biochemistry* 33, 1125-33.
61. Ragone, R. (2000) How the protein concentration affects unfolding curves of oligomers *Biopolymers* 53, 221-5.
62. Gianni, S., Ivarsson, Y., Jemth, P., Brunori, M., and Travaglini-Allocatelli, C. (2007) Identification and characterization of protein folding intermediates *Biophys Chem* 128, 105-13.
63. Feige, M. J., Hagn, F., Esser, J., Kessler, H., and Buchner, J. (2007) Influence of the internal disulfide bridge on the folding pathway of the CL antibody domain *J Mol Biol* 365, 1232-44.
64. Koteiche, H. A., Kumar, M. S., and McHaourab, H. S. (2007) Analysis of betaB1-crystallin unfolding equilibrium by spin and fluorescence labeling: evidence of a dimeric intermediate *FEBS Lett* 581, 1933-8.
65. Baldwin, T. O., Ziegler, M. M., Chaffotte, A. F., and Goldberg, M. E. (1993) Contribution of folding steps involving the individual subunits of bacterial luciferase to the assembly of the active heterodimeric enzyme *J Biol Chem* 268, 10766-72.
66. Deu, E., Dhoot, J., and Kirsch, J. F. (2009) The partially folded homodimeric intermediate of *Escherichia coli* aspartate aminotransferase contains a "molten interface" structure *Biochemistry* 48, 433-41.
67. Gloss, L. M., Simler, B. R., and Matthews, C. R. (2001) Rough energy landscapes in protein folding: dimeric *E. coli* Trp repressor folds through three parallel channels *J Mol Biol* 312, 1121-34.
68. Najera, H., Dagdug, L., and Fernandez-Velasco, D. A. (2007) Thermodynamic and kinetic characterization of the association of triosephosphate isomerase: the role of diffusion *Biochim Biophys Acta* 1774, 985-94.
69. Qin, G., Jianwei, Z., Taotao, L., and Xicheng, W. (2007) Intermediates in the refolding of urea-denatured dimeric arginine kinase from *Stichopus japonicus* *Int J Biol Macromol* 41, 521-8.
70. Garel, J. R., Martel, A., Muller, K., Ikai, A., Morishima, N., and Sutoh, K. (1984) Role of subunit interactions in the self-assembly of oligomeric proteins *Adv Biophys* 18, 91-113.
71. Liang, H., Sandberg, W. S., and Terwilliger, T. C. (1993) Genetic fusion of subunits of a dimeric protein substantially enhances its stability and rate of folding *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 7010-4.
72. Shao, X., and Matthews, C. R. (1998) Single-tryptophan mutants of monomeric tryptophan repressor: optical spectroscopy reveals nonnative structure in a model for an early folding intermediate *Biochemistry* 37, 7850-8.
73. Mallam, A. L., and Jackson, S. E. (2005) Folding studies on a knotted protein *J Mol Biol* 346, 1409-21.

74. Chien, J. (1948) Kinetic Analysis of Irreversible Consecutive Reactions *Journal of the American Chemical Society* 70, 2256-2261.
75. Mallam, A. L., and Jackson, S. E. (2006) Probing nature's knots: the folding pathway of a knotted homodimeric protein *J Mol Biol* 359, 1420-36.
76. Han, J. H., Batey, S., Nickson, A. A., Teichmann, S. A., and Clarke, J. (2007) The folding and evolution of multidomain proteins *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 319-30.
77. Levy, Y., Cho, S. S., Onuchic, J. N., and Wolynes, P. G. (2005) A survey of flexible protein binding mechanisms and their transition states using native topology based energy landscapes *J Mol Biol* 346, 1121-45.
78. Szilágyi, A. N., and Vas, M. (1998) Sequential domain refolding of pig muscle 3-phosphoglycerate kinase: kinetic analysis of reactivation *Fold Des* 3, 565-75.
79. Batey, S., Randles, L. G., Steward, A., and Clarke, J. (2005) Cooperative folding in a multi-domain protein *J Mol Biol* 349, 1045-59.
80. Jackson, S. E. (1998) How do small single-domain proteins fold? *Fold Des* 3, R81-91.
81. Matthews, C. R. (1993) Pathways of protein folding *Annu Rev Biochem* 62, 653-83.
82. Mason, J. M., Hagemann, U. B., and Arndt, K. M. (2007) Improved stability of the Jun-Fos Activator Protein-1 coiled coil motif: A stopped-flow circular dichroism kinetic analysis *J Biol Chem* 282, 23015-24.
83. Wendt, H., Berger, C., Baici, A., Thomas, R. M., and Bosshard, H. R. (1995) Kinetics of folding of leucine zipper domains *Biochemistry* 34, 4097-107.
84. Wagner, C., and Kiefhaber, T. (1999) Intermediates can accelerate protein folding *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6716-21.
85. Chiti, F., Taddei, N., Baroni, F., Capanni, C., Stefani, M., Ramponi, G., and Dobson, C. M. (2002) Kinetic partitioning of protein folding and aggregation *Nat Struct Biol* 9, 137-43.
86. Topping, T. B., and Gloss, L. M. (2004) Stability and folding mechanism of mesophilic, thermophilic and hyperthermophilic archaeal histones: the importance of folding intermediates *J Mol Biol* 342, 247-60.
87. Clark, A. C., Sinclair, J. F., and Baldwin, T. O. (1993) Folding of bacterial luciferase involves a non-native heterodimeric intermediate in equilibrium with the native enzyme and the unfolded subunits *J Biol Chem* 268, 10773-9.
88. Galzitskaya, O. V., Garbuzynskiy, S. O., Ivankov, D. N., and Finkelstein, A. V. (2003) Chain length is the main determinant of the folding rate for proteins with three-state folding kinetics *Proteins* 51, 162-6.
89. Vieille, C., and Zeikus, G. J. (2001) Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability *Microbiol Mol Biol Rev* 65, 1-43.
90. Yokota, K., Satou, K., and Ohki, S. (2006) Comparative analysis of protein thermostability: Differences in amino acid content and substitution at the surfaces and in the core regions of thermophilic and mesophilic proteins *Science and Technology of Advanced Materials* 7, 255-262.
91. Chaves, J. M., Srivastava, K., Gupta, R., and Srivastava, O. P. (2008) Structural and functional roles of deamidation and/or truncation of N- or C-termini in human alpha A-crystallin *Biochemistry* 47, 10069-83.
92. Hess, D., Kruger, K., Knappik, A., Palm, P., and Hensel, R. (1995) Dimeric 3-phosphoglycerate kinases from hyperthermophilic Archaea. Cloning, sequencing and expression of the 3-phosphoglycerate kinase gene of *Pyrococcus woesei* in *Escherichia coli* and characterization of the protein. Structural and functional

- comparison with the 3-phosphoglycerate kinase of *Methanothermus fervidus* *Eur J Biochem* 233, 227-37.
93. Sadeghi, M., Naderi-Manesh, H., Zarrabi, M., and Ranjbar, B. (2006) Effective factors in thermostability of thermophilic proteins *Biophys Chem* 119, 256-70.
  94. Paiardini, A., Gianese, G., Bossa, F., and Pascarella, S. (2003) Structural plasticity of the thermophilic serine hydroxymethyltransferases *Proteins* 50, 122-34.
  95. Teplyakov, A. V., Kuranova, I. P., Harutyunyan, E. H., Vainshtein, B. K., Frommel, C., Hohne, W. E., and Wilson, K. S. (1990) Crystal structure of thermitase at 1.4 Å resolution *J Mol Biol* 214, 261-79.
  96. Pace, C. N. (1992) Contribution of the hydrophobic effect to globular protein stability *J Mol Biol* 226, 29-35.
  97. Shirley, B. A., Stanssens, P., Hahn, U., and Pace, C. N. (1992) Contribution of hydrogen bonding to the conformational stability of ribonuclease T1 *Biochemistry* 31, 725-32.
  98. Anderson, D. E., Becktel, W. J., and Dahlquist, F. W. (1990) pH-induced denaturation of proteins: a single salt bridge contributes 3-5 kcal/mol to the free energy of folding of T4 lysozyme *Biochemistry* 29, 2403-8.
  99. Yip, K. S., Stillman, T. J., Britton, K. L., Artymiuk, P. J., Baker, P. J., Sedelnikova, S. E., Engel, P. C., Pasquo, A., Chiaraluce, R., Consalvi, V., and et al. (1995) The structure of *Pyrococcus furiosus* glutamate dehydrogenase reveals a key role for ion-pair networks in maintaining enzyme stability at extreme temperatures *Structure* 3, 1147-58.
  100. Kumar, S., Tsai, C. J., and Nussinov, R. (2000) Factors enhancing protein thermostability *Protein Eng* 13, 179-91.
  101. Rhode, D. J., and Martin, B. L. (1999) Localized structural effects of electrostatic interactions in a thermostable enzyme *Biochem Biophys Res Commun* 258, 179-83.
  102. Sriprapundh, D., Vieille, C., and Zeikus, J. G. (2000) Molecular determinants of xylose isomerase thermal stability and activity: analysis of thermozymes by site-directed mutagenesis *Protein Eng* 13, 259-65.
  103. Argos, P., Rossman, M. G., Grau, U. M., Zuber, H., Frank, G., and Tratschin, J. D. (1979) Thermal stability and protein structure *Biochemistry* 18, 5698-703.
  104. Neet, K. E., and Timm, D. E. (1994) Conformational stability of dimeric proteins: quantitative studies by equilibrium denaturation *Protein Sci* 3, 2167-74.
  105. Nicholson, H., Becktel, W. J., and Matthews, B. W. (1988) Enhanced protein thermostability from designed mutations that interact with alpha-helix dipoles *Nature* 336, 651-6.
  106. Wallon, G., Kryger, G., Lovett, S. T., Oshima, T., Ringe, D., and Petsko, G. A. (1997) Crystal structures of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* 3-isopropylmalate dehydrogenase and comparison with their thermophilic counterpart from *Thermus thermophilus* *J Mol Biol* 266, 1016-31.
  107. Szilágyi, A., and Zavodszky, P. (1995) Structural basis for the extreme thermostability of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Thermotoga maritima*: analysis based on homology modelling *Protein Eng* 8, 779-89.
  108. Pace, C. N. (1990) Conformational stability of globular proteins *Trends Biochem Sci* 15, 14-7.
  109. Dunitz, J. D. (1995) Win some, lose some: enthalpy-entropy compensation in weak intermolecular interactions *Chem Biol* 2, 709-12.



110. Park, C., and Marqusee, S. (2004) Analysis of the stability of multimeric proteins by effective DeltaG and effective m-values *Protein Sci* 13, 2553-8.
111. Gloss, L. M., and Matthews, C. R. (1998) The barriers in the bimolecular and unimolecular folding reactions of the dimeric core domain of Escherichia coli Trp repressor are dominated by enthalpic contributions *Biochemistry* 37, 16000-10.
112. Minarik, P., Tomaskova, N., Kollarova, M., and Antalík, M. (2002) Malate dehydrogenases--structure and function *Gen Physiol Biophys* 21, 257-65.
113. Závodszy, P., Kardos, J., Svingor, and Petsko, G. A. (1998) Adjustment of conformational flexibility is a key event in the thermal adaptation of proteins *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7406-11.
114. Jaenicke, R., and Bohm, G. (1998) The stability of proteins in extreme environments *Curr Opin Struct Biol* 8, 738-48.
115. Luke, K. A., Higgins, C. L., and Wittung-Stafshede, P. (2007) Thermodynamic stability and folding of proteins from hyperthermophilic organisms *Febs J* 274, 4023-33.
116. Kumar, S., Tsai, C. J., and Nussinov, R. (2001) Thermodynamic differences among homologous thermophilic and mesophilic proteins *Biochemistry* 40, 14152-65.
117. Razvi, A., and Scholtz, J. M. (2006) Lessons in stability from thermophilic proteins *Protein Sci* 15, 1569-78.
118. Daggett, V., and Fersht, A. R. (2003) Is there a unifying mechanism for protein folding? *Trends Biochem Sci* 28, 18-25.
119. Lindorff-Larsen, K., Rogen, P., Paci, E., Vendruscolo, M., and Dobson, C. M. (2005) Protein folding and the organization of the protein topology universe *Trends Biochem Sci* 30, 13-9.
120. Alsallaq, R., and Zhou, H. X. (2007) Energy landscape and transition state of protein-protein association *Biophys J* 92, 1486-502.
121. Tanford, C. (1970) Protein denaturation. C. Theoretical models for the mechanism of denaturation *Adv Protein Chem* 24, 1-95.
122. Plaxco, K. W., Larson, S., Ruczinski, I., Riddle, D. S., Thayer, E. C., Buchwitz, B., Davidson, A. R., and Baker, D. (2000) Evolutionary conservation in protein folding kinetics *J Mol Biol* 298, 303-12.
123. Dinner, A. R., and Karplus, M. (2001) The roles of stability and contact order in determining protein folding rates *Nat Struct Biol* 8, 21-2.
124. Makarov, D. E., Keller, C. A., Plaxco, K. W., and Metiu, H. (2002) How the folding rate constant of simple, single-domain proteins depends on the number of native contacts *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3535-9.
125. Robinson-Rechavi, M., and Godzik, A. (2005) Structural genomics of thermotoga maritima proteins shows that contact order is a major determinant of protein thermostability *Structure* 13, 857-60.
126. Perl, D., Welker, C., Schindler, T., Schroder, K., Marahiel, M. A., Jaenicke, R., and Schmid, F. X. (1998) Conservation of rapid two-state folding in mesophilic, thermophilic and hyperthermophilic cold shock proteins *Nat Struct Biol* 5, 229-35.
127. McGee, W. A., and Nall, B. T. (1998) Refolding rate of stability-enhanced cytochrome c is independent of thermodynamic driving force *Protein Sci* 7, 1071-82.
128. Imada, K., Inagaki, K., Matsunami, H., Kawaguchi, H., Tanaka, H., Tanaka, N., and Namba, K. (1998) Structure of 3-isopropylmalate dehydrogenase in

- complex with 3-isopropylmalate at 2.0 Å resolution: the role of Glu88 in the unique substrate-recognition mechanism *Structure* 6, 971-82.
129. Motono, C., Oshima, T., and Yamagishi, A. (2001) High thermal stability of 3-isopropylmalate dehydrogenase from *Thermus thermophilus* resulting from low  $\Delta\Delta C(p)$  of unfolding *Protein Eng* 14, 961-6.
  130. Hurlley, J. H., and Dean, A. M. (1994) Structure of 3-isopropylmalate dehydrogenase in complex with NAD<sup>+</sup>: ligand-induced loop closing and mechanism for cofactor specificity *Structure* 2, 1007-16.
  131. Imada, K., Sato, M., Tanaka, N., Katsube, Y., Matsuura, Y., and Oshima, T. (1991) Three-dimensional structure of a highly thermostable enzyme, 3-isopropylmalate dehydrogenase of *Thermus thermophilus* at 2.2 Å resolution *J Mol Biol* 222, 725-38.
  132. Nagata, C., Moriyama, H., Tanaka, N., Nakasako, M., Yamamoto, M., Ueki, T., and Oshima, T. (1996) Cryocrystallography of 3-Isopropylmalate dehydrogenase from *Thermus thermophilus* and its chimeric enzyme *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 52, 623-30.
  133. Singh, R. K., Kefala, G., Janowski, R., Mueller-Dieckmann, C., von Kries, J. P., and Weiss, M. S. (2005) The high-resolution Structure of LeuB (Rv2995c) from *Mycobacterium tuberculosis* *J Mol Biol* 346, 1-11.
  134. Yamada, T., Akutsu, N., Miyazaki, K., Kakinuma, K., Yoshida, M., and Oshima, T. (1990) Purification, catalytic properties, and thermal stability of three-Ds-3-isopropylmalate dehydrogenase coded by leuB gene from an extreme thermophile, *Thermus thermophilus* strain HB8 *J Biochem* 108, 449-56.
  135. Ohkuri, T., and Yamagishi, A. (2007) The effects of mutations at position 253 on the thermostability of the *Bacillus subtilis* 3-isopropylmalate dehydrogenase subunit interface *J Biochem* 141, 791-7.
  136. Kadono, S., Sakurai, M., Moriyama, H., Sato, M., Hayashi, Y., Oshima, T., and Tanaka, N. (1995) Ligand-induced changes in the conformation of 3-isopropylmalate dehydrogenase from *Thermus thermophilus* *J Biochem* 118, 745-52.
  137. Miyazaki, K., Kakinuma, K., Terasawa, H., and Oshima, T. (1993) Kinetic analysis on the substrate specificity of 3-isopropylmalate dehydrogenase *FEBS Lett* 332, 35-6.
  138. Chen, R., Greer, A., and Dean, A. M. (1996) Redesigning secondary structure to invert coenzyme specificity in isopropylmalate dehydrogenase *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12171-6.
  139. Dean, A. M., and Dvorak, L. (1995) The role of glutamate 87 in the kinetic mechanism of *Thermus thermophilus* isopropylmalate dehydrogenase *Protein Sci* 4, 2156-67.
  140. Numata, K., Hayashi-Iwasaki, Y., Kawaguchi, J., Sakurai, M., Moriyama, H., Tanaka, N., and Oshima, T. (2001) Thermostabilization of a chimeric enzyme by residue substitutions: four amino acid residues in loop regions are responsible for the thermostability of *Thermus thermophilus* isopropylmalate dehydrogenase *Biochim Biophys Acta* 1545, 174-83.
  141. Yasugi, M., Amino, M., Suzuki, T., Oshima, T., and Yamagishi, A. (2001) Cold adaptation of the thermophilic enzyme 3-isopropylmalate dehydrogenase *J Biochem (Tokyo)* 129, 477-84.
  142. Yasugi, M., Suzuki, T., Yamagishi, A., and Oshima, T. (2001) Analysis of the effect of accumulation of amino acid replacements on activity of 3-

- isopropylmalate dehydrogenase from *Thermus thermophilus* *Protein Eng* 14, 601-7.
143. Yaoi, T., Miyazaki, K., and Oshima, T. (1997) Substrate recognition of isocitrate dehydrogenase and 3-isopropylmalate dehydrogenase from *Thermus thermophilus* HB8 *J Biochem* 121, 77-81.
  144. Fujita, M., Tamegai, H., Eguchi, T., and Kakinuma, K. (2001) Novel substrate specificity of designer 3-isopropylmalate dehydrogenase derived from *Thermus thermophilus* HB8 *Biosci Biotechnol Biochem* 65, 2695-700.
  145. Miyazaki, K., and Oshima, T. (1993) Tyr-139 in *Thermus thermophilus* 3-isopropylmalate dehydrogenase is involved in catalytic function *FEBS Lett* 332, 37-8.
  146. Watanabe, K., and Yamagishi, A. (2006) The effects of multiple ancestral residues on the *Thermus thermophilus* 3-isopropylmalate dehydrogenase *FEBS Lett* 580, 3867-71.
  147. Wallon, G., Yamamoto, K., Kirino, H., Yamagishi, A., Lovett, S. T., Petsko, G. A., and Oshima, T. (1997) Purification, catalytic properties and thermostability of 3-isopropylmalate dehydrogenase from *Escherichia coli* *Biochim Biophys Acta* 1337, 105-12.
  148. Hajdu, I., Szilágyi, A., Kardos, J., and Zavodszky, P. (2009) A link between hinge-bending domain motions and the temperature dependence of catalysis in 3-isopropylmalate dehydrogenase *Biophys J* 96, 5003-12.
  149. Akanuma, S., Yamagishi, A., Tanaka, N., and Oshima, T. (1999) Further improvement of the thermal stability of a partially stabilized *Bacillus subtilis* 3-isopropylmalate dehydrogenase variant by random and site-directed mutagenesis *Eur J Biochem* 260, 499-504.
  150. Suzuki, T., Inoki, Y., Yamagishi, A., Iwasaki, T., Wakagi, T., and Oshima, T. (1997) Molecular and phylogenetic characterization of isopropylmalate dehydrogenase of a thermoacidophilic archaeon, *Sulfolobus* sp. strain 7 *J Bacteriol* 179, 1174-9.
  151. Han, S., and Pirrung, M. (1994) Squarate inhibitors of 3-isopropylmalate dehydrogenase *J Org Chem* 59, 2423-2429.
  152. Németh, A., Svingor, Á., Pócsik, M., Dobó, J., Magyar, C., Szilágyi, A., Gál, P., and Závodszky, P. (2000) Mirror image mutations reveal the significance of an intersubunit ion cluster in the stability of 3-isopropylmalate dehydrogenase *FEBS Lett* 468, 48-52.
  153. Kotsuka, T., Akanuma, S., Tomuro, M., Yamagishi, A., and Oshima, T. (1996) Further stabilization of 3-isopropylmalate dehydrogenase of an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*, by a suppressor mutation method *J Bacteriol* 178, 723-7.
  154. Akanuma, S., Qu, C., Yamagishi, A., Tanaka, N., and Oshima, T. (1997) Effect of polar side chains at position 172 on thermal stability of 3-isopropylmalate dehydrogenase from *Thermus thermophilus* *FEBS Lett* 410, 141-4.
  155. Kirino, H., Aoki, M., Aoshima, M., Hayashi, Y., Ohba, M., Yamagishi, A., Wakagi, T., and Oshima, T. (1994) Hydrophobic interaction at the subunit interface contributes to the thermostability of 3-isopropylmalate dehydrogenase from an extreme thermophile, *Thermus thermophilus* *Eur J Biochem* 220, 275-81.
  156. Ohkuri, T., and Yamagishi, A. (2003) Increased thermal stability against irreversible inactivation of 3-isopropylmalate dehydrogenase induced by

- decreased van der Waals volume at the subunit interface *Protein Eng* 16, 615-21.
157. Suzuki, T., Yasugi, M., Arisaka, F., Oshima, T., and Yamagishi, A. (2002) Cold-adaptation mechanism of mutant enzymes of 3-isopropylmalate dehydrogenase from *Thermus thermophilus* *Protein Eng* 15, 471-6.
  158. Aoshima, M., and Oshima, T. (1997) Stabilization of *Escherichia coli* isopropylmalate dehydrogenase by single amino acid substitution *Protein Eng* 10, 249-54.
  159. Onodera, K., Sakurai, M., Moriyama, H., Tanaka, N., Numata, K., Oshima, T., Sato, M., and Katsube, Y. (1994) Three-dimensional structures of chimeric enzymes between *Bacillus subtilis* and *Thermus thermophilus* 3-isopropylmalate dehydrogenases *Protein Eng* 7, 453-9.
  160. Akanuma, S., Yamagishi, A., Tanaka, N., and Oshima, T. (1998) Serial increase in the thermal stability of 3-isopropylmalate dehydrogenase from *Bacillus subtilis* by experimental evolution *Protein Sci* 7, 698-705.
  161. Hori, T., Moriyama, H., Kawaguchi, J., Hayashi-Iwasaki, Y., Oshima, T., and Tanaka, N. (2000) The initial step of the thermal unfolding of 3-isopropylmalate dehydrogenase detected by the temperature-jump Laue method *Protein Eng* 13, 527-33.
  162. Akanuma, S., Yamagishi, A., Tanaka, N., and Oshima, T. (1996) Spontaneous tandem sequence duplications reverse the thermal stability of carboxyl-terminal modified 3-isopropylmalate dehydrogenase *J Bacteriol* 178, 6300-4.
  163. Nurachman, Z., Akanuma, S., Sato, T., Oshima, T., and Tanaka, N. (2000) Crystal structures of 3-isopropylmalate dehydrogenases with mutations at the C-terminus: crystallographic analyses of structure-stability relationships *Protein Eng* 13, 253-8.
  164. Svingor, A., Kardos, J., Hajdú, I., Németh, A., and Závodszy, P. (2001) A better enzyme to cope with cold. Comparative flexibility studies on psychrotrophic, mesophilic, and thermophilic IPMDHs *J Biol Chem* 276, 28121-5.
  165. Wallon, G., Lovett, S. T., Magyar, C., Svingor, A., Szilagyi, A., Závodszy, P., Ringe, D., and Petsko, G. A. (1997) Sequence and homology model of 3-isopropylmalate dehydrogenase from the psychrotrophic bacterium *Vibrio* sp. I5 suggest reasons for thermal instability *Protein Eng* 10, 665-72.
  166. Hayashi-Iwasaki, Y., Numata, K., Yamagishi, A., Yutani, K., Sakurai, M., Tanaka, N., and Oshima, T. (1996) A stable intermediate in the thermal unfolding process of a chimeric 3-isopropylmalate dehydrogenase between a thermophilic and a mesophilic enzymes *Protein Sci* 5, 511-6.
  167. Motono, C., Yamagishi, A., and Oshima, T. (1999) Urea-induced unfolding and conformational stability of 3-isopropylmalate dehydrogenase from the Thermophile *thermus thermophilus* and its mesophilic counterpart from *Escherichia coli* *Biochemistry* 38, 1332-7.
  168. Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., and Gray, T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein *Protein Sci* 4, 2411-23.
  169. Ornstein, L. (1964) Disc Electrophoresis. I. Background and Theory *Ann N Y Acad Sci* 121, 321-49.
  170. Wang, C., Lascu, I., and Giartosio, A. (1998) Bovine serum fetuin is unfolded through a molten globule state *Biochemistry* 37, 8457-64.

171. He, Y., Qin, S., and Pan, X. M. (2008) A novel procedure for identification of the folding/unfolding patterns of dimeric proteins *J Theor Biol* 250, 461-7.
172. Creighton, T. E. (1986) Detection of folding intermediates using urea-gradient electrophoresis *Methods Enzymol* 131, 156-72.
173. Riddles, P. W., Blakeley, R. L., and Zerner, B. (1979) Ellman's reagent: 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)--a reexamination *Anal Biochem* 94, 75-81.
174. Semisotnov, G. V., Rodionova, N. A., Razgulyaev, O. I., Uversky, V. N., Gripas, A. F., and Gilmanshin, R. I. (1991) Study of the "molten globule" intermediate state in protein folding by a hydrophobic fluorescent probe *Biopolymers* 31, 119-28.
175. Weber, G., and Young, L. B. (1964) Fragmentation of Bovine Serum Albumin by Pepsin. I. The Origin of the Acid Expansion of the Albumin Molecule *J Biol Chem* 239, 1415-23.
176. Ivankov, D. N., Garbuzynskiy, S. O., Alm, E., Plaxco, K. W., Baker, D., and Finkelstein, A. V. (2003) Contact order revisited: influence of protein size on the folding rate *Protein Sci* 12, 2057-62.
177. Ahmad, S., and Rao, N. M. (2009) Thermally denatured state determines refolding in lipase: mutational analysis *Protein Sci* 18, 1183-96.
178. Glyakina, A. V., Garbuzynskiy, S. O., Lobanov, M. Y., and Galzitskaya, O. V. (2007) Different packing of external residues can explain differences in the thermostability of proteins from thermophilic and mesophilic organisms *Bioinformatics* 23, 2231-8.

## RÖVID ÖSSZEFOGLALÁS

A fehérjék natív térszerkezet kialakulásának mechanizmusa még ma is megoldatlan biofizikai kérdés. Különösen a bonyolultabb, multidomén-, ill. oligomer fehérjék szerkezeti önszerveződésének szabályai (pl. a domének, ill. alegységek szerepe) várnak tisztázásra. Ide tartozó kérdés még, hogy a térszerkezet kialakulási mechanizmus milyen összefüggésben van a fehérjék stabilitásával. E kérdések vizsgálatára modellként a két alegységből és alegységenként két doménből felépülő 3-izopropilmalát dehidrogenáz (IPMDH) *Thermus thermophilus* (Tt), *Escherichia coli* (Ec) és *Vibrio* sp. I5 (Vib) szervezetekből származó különböző hőstabilitású formáit választottam.

A térszerkezet felbomlás (denaturáció) és kialakulás (renaturáció) időbeli folyamatát CD-, ill. fluoreszcencia spektroszkópia segítségével és enzimaktivitás méréssel követve megállapítottam, hogy míg a denaturáció sebessége a termofil (Tt), mezofil (Ec) és a hidegtűrő (Vib) sorrendben nő, addig renaturációjuk közel azonos sebességgel megy végbe. A denaturáció látszólag mindig egyetlen elsődrendű folyamat, a renaturáció viszont bifázikus (szekvenciális), de szintén elsődrendű mechanizmust követ. A gyors fázis alatt egy natív-, „molten globula”-szerű kompakt intermedier alakul ki, amely már képes az IPM szubsztrát kötésére, de még nem mutat enzimaktivitást.

A denaturáció és renaturáció kinetikai eredményeit térszerkezeti adatok alapján értelmeztem. Az eltérő denaturációs sebességekért, s egyben a hőstabilitásért, a nem konzervatív aminosav oldalláncok közötti specifikus kölcsönhatások felelősek. A hasonló renaturációs sebességeket az magyarázza, hogy e stabilitási különbségeket meghatározó specifikus kölcsönhatások a térszerkezet kialakulási folyamatnak egy későbbi szakaszában, csak a sebességmeghatározó lépés(ek)et követően alakulnak ki.

Az alegységek térszerkezet kialakulási folyamatban betöltött szerepét illetően fluoreszcencia anizotrópia mérésekkel megállapítottam, hogy az IPMDH két polipeptidláncának asszociációja már a folyamat kezdeti fázisában megtörténik. A domének térszerkezet-kialakulása párhuzamosan, hasonló időgörbe szerint zajlik a Trp oldalláncok irányított cseréjével létrehozott mutánsokkal végzett kinetikai vizsgálataim szerint. Tehát mind az alegységek, mind a domének szorosan együttműködve, kooperatív módon alakítják ki az IPMDH molekula natív térszerkezetét. Ezt a mechanizmust az alegység-, ill. doménfelszínen lévő kölcsönhatások szerkezeti analízisével támasztottam alá. E kölcsönhatások mindhárom IPMDH-ban igen hasonlóak és főként hidrofób jellegűek, függetlenül azok hőstabilitásától.

## SHORT SUMMARY

The description of self-organisation pathways of native protein structure is one of the most difficult biophysical problem. Especially, the folding of more complex proteins – including the role of the domains and subunits – still has to be clarified. A related question is the possibility of relationship between protein stability and the folding mechanism. My Ph. D. work was aimed to deal with both problems by carrying out denaturation-renaturation experiments on the homodimeric two-domain 3-isopropylmalate dehydrogenases (IPMDH) with different heat stabilities (*Thermus thermophilus* (Tt), *Escherichia coli* (Ec) and *Vibrio* sp. 15 (Vib)).

The time courses of both denaturation and renaturation were followed by detecting enzyme activity, CD- and fluorescence spectroscopy. While the rate of the denaturation increases in the order of thermophilic (Tt), mesophilic (Ec) and psychrotrophic (Vib) IPMDHs, the rates of renaturation are closely similar for the three enzymes. The denaturation is always an apparently single first order process, however the renaturation follows a biphasic (sequential) first order kinetic mechanism. During a burst phase a native-, molten globule-like, compact intermediate is formed, that is already able to bind the substrate IPM, but does not possess any detectable enzyme activity.

The kinetic results of denaturation and renaturation are interpreted by molecular graphical analysis of the structural data. The specific interactions among the non-conserved side-chains are suggested to be responsible for both the different denaturation rates and the heat stabilities. The similar renaturation rates are compatible with formation of these specific interactions during the later phase of renaturation, i.e. only after the rate limiting step(s).

The role of the subunits in the formation of native IPMDH was investigated by recording the time courses of fluorescence anisotropy changes during refolding. The results indicated association of the two polypeptide chains in the very early phase of refolding. Renaturation experiments with site-directed Trp mutants have revealed simultaneous formation of the native structure of each domain with closely similar rates. Thus, the structures of both subunits and domains of IPMDH are reconstructed in a highly cooperative manner. Structural analysis of the atomic interactions on the subunit-subunit and domain-domain interfaces entirely consistent with this mechanism. These interactions are mainly hydrophobic in their nature and very similar in cases of the three different IPMDHs, i.e. independent of their heat stabilities.