

*Enzimkinetikai vizsgálatok denaturálási
hőmérséklet fölött*

DIPLOMAMUNKA

Simon Zoltán

biológus szak

Témavezető:

Dr. Málnási-Csizmadia András



Eötvös Loránd Tudományegyetem, Biokémiai Tanszék

Budapest, 2005

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	3. oldal
Bevezetés	4. oldal
I. Irodalmi áttekintés	5. oldal
I. 1. Reakciókinetikai vizsgálati módszerek	5. oldal
I. 1. 1. Gyorskeveréses technikák	6. oldal
I. 1. 2. Relaxációs technikák	8. oldal
I. 1. 3. Detektálásra alkalmas jelek	9. oldal
I. 1. 4. Kombinált tranziens kinetikai vizsgálati módszerek	10. oldal
I. 2. A reakciók hőmérsékletfüggése	12. oldal
I. 2. 1. A fluoreszcencia hőmérsékletfüggése	14. oldal
I. 3. A modellrendszerek bemutatása	15. oldal
I. 3. 1. Miozin motordomén	15. oldal
I. 3. 2. Humán tripszin IV	19. oldal
II. Célkitűzések	22. oldal
III. Módszer	23. oldal
III. 1. A konvencionális <i>stopped flow</i> berendezés	23. oldal
III. 2. A <i>stopped flow / temperature jump</i> berendezés felépítése	28. oldal
III. 3. A miozin motordomén előállítása	31. oldal
III. 3. 1. Miozin motordomén termeltetése <i>Dictyostelium</i> rendszerben	31. oldal
III. 3. 3. Elektroforetikus technikák	31. oldal
III. 3. 4. A fehérje tisztítása	33. oldal
III. 4. A spektrofotometriás mérések paraméterei	35. oldal
III. 5. Az <i>SF/TJ</i> mérések paraméterei	36. oldal
IV. A módszer alkalmazhatósága	38. oldal

IV. 1. A készülék összeállítása	38. oldal
IV. 1. 1. A holtidő meghatározása	38. oldal
IV. 1. 2. Az optimális lövési térfogat beállítása	39. oldal
IV. 1. 3. A hőmérséklet kalibrálása	40. oldal
IV. 2. A modellrendszerek vizsgálata	41. oldal
IV. 2. 1. A miozin motordomén <i>open/closed</i> konformációváltásának hőmérsékletfüggése	41. oldal
IV. 2. 2. A humán tripszin IV vizsgálata	41. oldal
V. Diszkusszió	43. oldal
V. 1. A holtidő megállapítása	43. oldal
V. 2. A W501+ konstrukcióval kapott eredmények értelmezése	43. oldal
V. 3. A humán tripszin IV-MUGB reakció eredményeinek értelmezése	44. oldal
V. 4. Az általunk fejlesztett SF/TJ berendezés előnyei	45. oldal
V. 5. Az általunk fejlesztett SF/TJ berendezés hátrányai	46. oldal
V. 6. További tervek	46. oldal
Összefoglalás	48. oldal
Summary	49. oldal
Irodalomjegyzék	50. oldal
Köszönetnyilvánítás	53. oldal

Rövidítések jegyzéke

AMP.PNP: adenzin-5'-(β,γ -imidotrifoszfát)
APS: ammónium-persulfát
BSA: marha szérumalbumin (*bovine serum albumine*)
DMSO: dimetil-szulfoxid
DTT: 1,4-ditiotreitol
EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav
EGTA: etilénlikol-bisz-(2-aminoetiléter)-*N, N, N', N'*-tetraecetsav
GFP: zöld fluoreszcens fehérje (*green fluorescent protein*)
HEPES: N-(2-hidroxietil)-piperazin-1-etánszulfonsav
ME: merkaptó-etanol
MUGB: 4-metil-umbelliferin-guanidin-benzoát
NATA: N-acetil-*L*-triptofánamid
NATyrA: N-acetil-*L*-tirozinamid
NBS: N-bromo-szukcinimid
Ni²⁺-NTA: nikkell-nitrilotriecetsav (*nitrilotriacetic acid*)
PMSF: fenil-metánszulfonil-fluorid
PMT: fotoelektronsokszorozó cső (*photomultiplier tube*)
RPM: percenkénti fordulatszám (*revolutions per minute*)
SDS: nátrium-dodecil-szulfát
SF/TJ: *stopped-flow / temperature jump*
TEMED: *N, N, N, N*-tetrametil-etilén-diamin
TLCK: tozil-*L*-lizil-klórmetil-kezon
TPCK: tozil-*L*-fenil-alanil-klórmetil-kezon
TPM: hőimpulzus-mikroszkópia (*temperature-pulse microscopy*)
Tris: trisz-(hidroxil-metil)-amino-metán

Bevezetés

Az enzimek hatásmechanizmusának vizsgálata, a működésük közben bekövetkező molekuláris szintű változások feltárása és megértése a biokémiai vizsgálatok egyik legfontosabb célja.

A tranziens kinetikai módszerek más reakciókinetikai módszerekhez képest sokkal informatívabb képet adnak az enzimműködésről, mivel lehetőséget nyújtanak az enzimreakciók egyedi lépéseinek tanulmányozására. A biológiai reakciók nagyobb része egyensúlyra vezető folyamat, ezért kiemelt jelentőséggel bírnak a relaxációs tranziens kinetikai technikák, melyek során a reakciók kinetikai paramétereit az egyensúlyi rendszer perturbálása után határozzuk meg. Ezen módszerek egyik jellemző paramétere maga a perturbáció mértéke: minél nagyobb, annál precízebb lehet a vizsgálat. A másik fontos információ az, hogy mennyi idő szükséges ehhez a perturbáláshoz. Egy módszer használhatósága annál nagyobb, minél rövidebb időt igényel a perturbáció. Dolgozatomban áttekintem a tranziens kinetika metodikáját, és bemutatok néhány példát arra vonatkozóan, milyen kísérletek történtek eddig ezen módszereknek az összekapcsolására. Ezután leírok egy új, általunk fejlesztett kombinált tranziens kinetikai vizsgálati módszert, melynek legfőbb előnye, hogy segítségével igen rövid idő alatt nagy hőmérsékleti perturbációt valósíthatunk meg – olyannyira nagyot, hogy a reakció hőmérsékletét akár a denaturálási hőmérséklet fölé is emelhetjük. Ezzel a módszerrel olyan hőmérséklettartományokban vizsgálhatjuk a reakciók kinetikáját, melyen az enzimek már denaturálódnak. A paradoxon csak látszólagos, mert a denaturáció folyamata meglehetősen lassú, és addig, míg ez be nem következik, mindazok a reakciólépések követhetők, melyek ennél gyorsabban játszódnak le.

Az új berendezést két modellrendszeren teszteltük, a miozin motordoménjének és a humán IV-es tripszinnek a felhasználásával. Vizsgálataink rámutatnak, hogy csakugyan lehetséges a fentebb említett mértékű hőmérsékletugrás, és ez sok esetben komoly információval tud szolgálni az enzimek hatásmechanizmusára vonatkozóan.

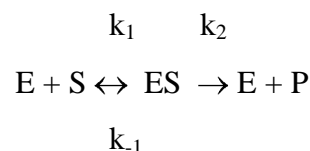
Irodalmi áttekintés

Az irodalmi összefoglaló három pillér köré szerveződik. Elsőként áttekintem a tranziens kinetikában manapság használatos módszereket, a gyorskeverési és a relaxációs technikákat, szemügyre véve azok előnyeit és hátrányait. Röviden összefoglalom az ezen módszerek alkalmazásakor használható jeleket, majd néhány példán keresztül bemutatom, hogy eddig milyen lépések történtek e módszerek kombinálására, és azok milyen eredményekkel jártak. A következő fejezetben a reakciók és a fluoreszcencia hőmérsékletfüggéséről esik szó. Ezután bemutatom az általunk választott modellrendszeret, a miozin II motordoménját és a humán tripszin IV-est, megindokolva, hogy miért éppen ezekre esett a választásunk.

I. Reakciókinetikai vizsgálati módszerek

Az élőlények szervezetében lejátszódó kémiai reakciókat biokatalizátorok, az enzimek segítik. Működési mechanizmusuk tanulmányozásához igen hasznosak a reakciókinetikai vizsgálatok. Alapvetően háromféle reakciókinetikai módszert különböztetünk meg: a *steady-state*, az egyensúlyi és a tranziens kinetikát.

Michaelis és Menten a múlt század elején az enzimreakciókat két egymást követő lépésre bontották:



Az átmeneti állapot koncentrációjának időbeli megváltozása a következő egyenlettel írható le:

$$d [ES] / d t = k_1 [E] [S] - k_{-1} [ES] - k_2 [ES]$$

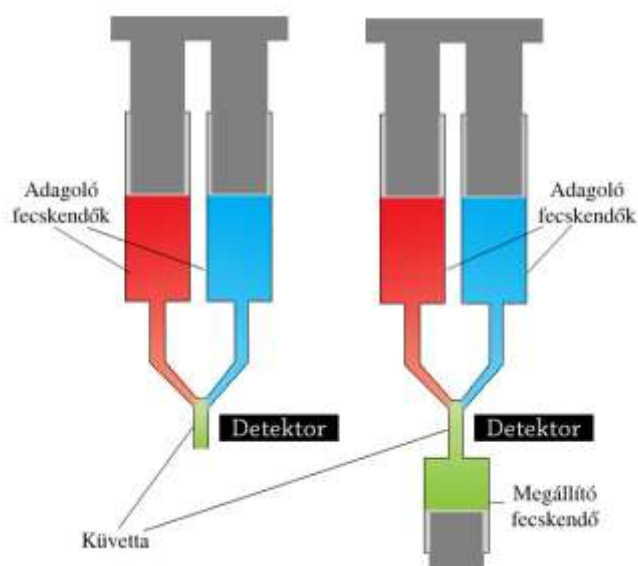
Ennek az egyenletnek az egyszerűsítése történhet az egyensúly feltételezésével, miszerint $k_{-1} \gg k_2$, azonban ez nem mindig teljesül. Briggs és Haldane 1925-ben abból indultak ki, hogy az átmeneti fázis utáni *steady-state* szakaszban az enzim-szubsztrát komplex koncentrációja az időben állandó, azaz $d [ES] / d t = 0$. Ezt a feltételezést felhasználva kifejezhetjük az úgynevezett Michaelis-konstansot, mely a fenti reakcióra

$$K_M = (k_{-1} + k_2) / k_1$$

Emellett megadhatjuk az enzim katalitikus konstansát is, mely arra utal, hogy egyetlen enzim molekula (pontosabban egyetlen aktív hely) hány reakciót tud katalizálni egységnyi idő alatt. Ezen két paraméter viszont nem ad információt a reakció egyes lépéseinek kinetikájáról, sebességi együtthatóik egymáshoz viszonyított nagyságáról. Csak statikus képet ad az enzim működéséről, teljesen figyelmen kívül hagyva annak dinamikáját. Mind a *steady-state*, mind pedig az egyensúlyi közelítésre jellemző tehát, hogy általuk csak közvetett információk nyerhetők az enzim működési mechanizmusáról. A tranziens kinetikai módszerek előnye, hogy a vizsgálni kívánt lépést szelektíven tudjuk követni, így segítségével közvetlen információt kapunk a vizsgált reakcióról.

Gyorskeverési technikák

A tranziens kinetikai mérések során több módszer áll rendelkezésünkre a reaktánsok gyors összekeveréséhez. Általános, hogy a reagensek két fecskendőben vannak (1. ábra, a.),



1. ábra: Gyorskeverési technikák.

a: Általános séma. Az adagoló fecskendőben lévő reaktánsok a küvettaiba kerülnek.

b: A megállított áramlásos (stopped flow) műszer sémája. Az előző esettől eltérően az összeállításban szerepel egy, az áramlás megállításáért felelős fecskendő is.

melyekből egy keverőbe jutnak. Innen a mintakamrába kerülnek, ahol a detektálás történik.

Ezen mérési technikák talán legfontosabb jellemzője a holtidő. Ez az az időtartomány, amely alatt adatgyűjtés még nem lehetséges, de a reakció már zajlik. Zérus holtidejű tranziens kinetikai berendezés nincs, ezért nagyon gondosan kell eljárni a mérési technika megválasztásakor, hiszen ellenkező esetben megtörténhet, hogy egy nagyon gyors reakciót „elveszítünk” a holtidő alatt.

A reaktánsok összekeverése az említett két fecskendő egyidejű,

mechanikus lenyomásával történik. Ha a folyadék áramlási sebessége a mérés során állandó, *continuous flow*-ról beszélünk. Alkalmazásának hátránya, hogy a folyamatos áramlás miatt nagy oldattérfogatra van szükség. Ez gyors reakciók követésénél válik igen feltűnővé, amikor a megfelelő felbontás érdekében nagy sebességű áramlásra van szükség. A módszer nagyon érzékeny az oldat tulajdonságaira, többek között a viszkozitására, ami hőmérsékletfüggő. Ha az áramlás nem egyenletes, turbulencia lép fel, ez pedig megzavarja a mérést. A módszer legfontosabb előnye a kis holtidő, a szubmikroszekundumos detektálás lehetősége.

Az *accelerated flow* esetében időben változó erősséggel nyomjuk a fecskendőket, miközben egy adott ponton történik a detektálás. Az egyre gyorsabb áramlás időben egyre „fiatalabb” jelet eredményez, hiszen a folyadék egyre gyorsabban halad el a detektor előtt. Ennél a módszernél is nagy mennyiségű oldat szükséges, de a technika igazi limitációját az jelenti, hogy a Reynolds-szám csak bizonyos értékek között mozoghat. Ez a mutató, mely az áramlási sebesség, a csőkeresztmetszet, a sűrűség és a viszkozitás függvénye, az áramlásra jellemző, és utal rá, hogy inkább lamináris vagy inkább turbulens áramlásról van-e szó. A mérés szempontjából mindkét szélsőség káros, ezért kell adott csőátmérő használata mellett ügyelni az áramlási sebesség nagyságára. Ezzel viszont a módszer időfelbontása is korlátok közé szorul.

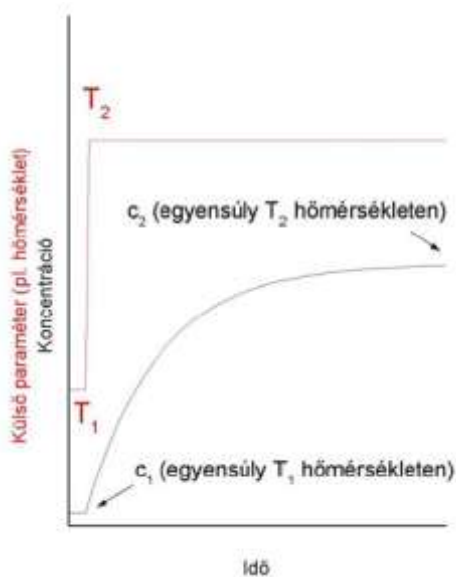
A *stopped flow*, azaz megállított áramlásos vizsgálatoknál csak nagyon rövid ideig tartó lökést alkalmazunk, majd a folyadék áramlását megállítjuk, ezzel kiküszöbölve az áramlásos módszerek hátrányát (1. ábra, b.). Az áramlás megállása után követhető a reakció lefutása, de a reakció az összekeverés pillanatában már megindul. Ez adja a *stopped flow* készülékek holtidejét, ami megközelítőleg minimum 1 ezredmásodperc. Ebből következik, hogy ezzel a technikával csak a körülbelül 1000/s-nál lassabb reakciók vizsgálhatók.

A keverési technikák tárgyalásakor érdemes említést tenni egy további módszerről, a kioltásos áramlás (*quenched flow*) technikáról is. Ebben az esetben a reakciót egy harmadik fecskendőből bejuttatott kioltó ágenssel, *quencherrel* különböző időpontokban pillanatszerűen megállítjuk, és ezeket a mintákat elemezzük, így állapítjuk meg az intermedierek és a termék koncentrációját a különböző időpillanatokban. A módszer hátránya, hogy az egész apparátust inert anyagból kell készíteni, mert a kioltó anyagok általában erős savak. További nehézség, hogy gyakran keletkezik műtermék a kioltás során. Ha a *quench* lassú vagy nem teljes, illetve az így keletkezett termékek instabilak, a mért adatok értékelhetetlenek lesznek. A módszer anyagigénye nagy, ráadásul az értékelést pontról pontra kell végezni, minden mintát külön-külön megvizsgálva. Mindezen hátrányok ellenére azért használatos mégis, mert segítségével milliszekundumos holtidővel mérhetünk, és nincs szükség optikai vagy más követhető

szignálra, pontosan amiatt, mert a reakciótermékeket utólag, analitikai módszerekkel kvantitáljuk. Így a módszer alkalmazásával elkerülhetőek azok az optikai problémák, amelyeket később majd látni fogunk például a megállított áramlásos mérés metodikájának leírásakor.

Relaxációs technikák

A relaxációs kinetikai vizsgálatok két lépésből állnak. Az első lépésben a vizsgálni kívánt, az adott környezeti paraméterek mellett egyensúlyban vagy *steady-state*-ben lévő rendszert rövid idő alatt perturbáljuk, a következő lépésben pedig követjük a relaxációt. Perturbáció lehet a kémiai vagy a fizikai környezet megváltoztatása. Előbbire jó példa a koncentrációváltozás (ide tartozik a pH ugrásszerű megváltoztatása, a *pH jump* is), utóbbira pedig a hőmérséklet, a nyomás, az elektromos térerő stb. módosítása. Így beszélhetünk hőugrásról (*temperature jump*), nyomásugrásról (*pressure jump*) és így tovább.



2. ábra. Adott hőmérsékleten egyensúlyban lévő rendszer hőmérsékletének ugrásszerű megemelése után új egyensúly alakul ki. (Kovács Mihály, 2002, doktori értekezés)

A külső paraméterek gyors megváltozása után a reakcióelegy összetevőinek koncentrációja is megváltozik, és új egyensúly áll be (2. ábra). A koncentrációváltozások lefutásából tudunk következtetni a sebességi állandókra. Az egyensúly beállítását valamilyen jel változásával tudjuk követni. Legjobban azok a reakciók perturbálhatók, melyek egyensúlyi állandója 1 körüli. A módszerek használhatósága annál nagyobb, minél nagyobb perturbáció valósítható meg a segítségükkel (hiszen ezáltal precízebben határozhatók meg a reakció kinetikai paraméterei), és minél kisebb a holtidejük.

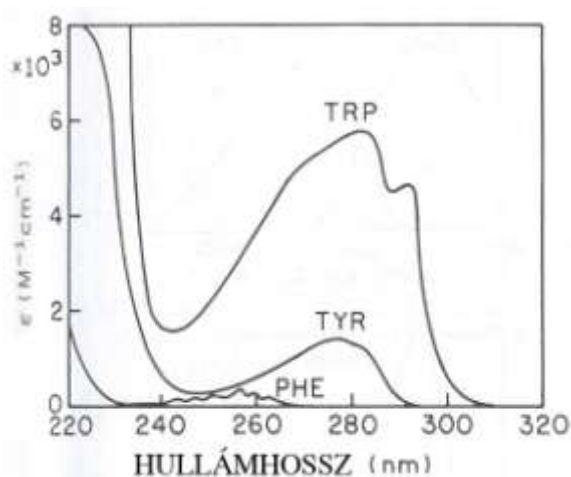
A hőugrásos módszerek holtideje a hőugrás megvalósításának módjától és a hőugrás nagyságától függ, és igen tág határok között mozog: kb. 50 μ s-tól

egészen akár 100 milliszekundumig. Létezik ezeknél jóval kisebb holtidejű lézeres hőugrásos berendezés, ahol a holtidő nanoszekundumos nagyságrendű, de ezzel a technikával csak néhány $^{\circ}$ C-os ugrás valósítható meg. A hőugrás ezenkívül történhet elektromos impulzus hatására, vagy mikrohullám segítségével is. A nyomásugrás holtideje 10-100 μ s, de ezzel a technikával csak a molekulaszám-, illetve térfogatváltozással járó reakciók perturbálhatók.

A relaxációs technikák előnye, hogy alkalmazásukkal lehetőség nyílik az egyes lépések szelektív perturbálására. Ezzel pedig olyan reakciólépések is felderíthetővé válnak, melyek a korábban említett gyorskeveréses technikákkal „láthatatlanok” maradnak.

Detektálásra alkalmas jelek

Számos lehetőség áll rendelkezésünkre a detektáláshoz. Közülük mindenképpen elsőként érdemes megemlíteni a fényel kapcsolatos jeleket. Ilyen többek között a fluoreszcencia, az abszorbanca és a fényszórás. Biológiai rendszerekben igen gyakran detektáljuk fehérjemolekulák fluoreszcenciáját. Ez lehet extrinszik, azaz külső eredetű, valamint intrinszik, magából a fehérjéből származó fluoreszcencia. Az intrinszik fluoreszcencia legjellemzőbb forrásai az aromás oldalláncú aminosavak: a triptofán, a tirozin és a fenilalanin. Ezek fluoreszcenciája a fenti sorrendben egyre gyengébb (3. ábra).



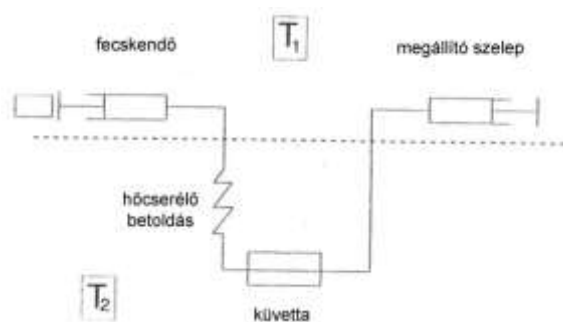
3. ábra: A triptofán, a tirozin és a fenilalanin abszorpciósspektrumai. (Lakowicz, 1999, könyvéből, módosítva)

A triptofán és a tirozin abszorpciósspektruma meglehetősen hasonló, de az előbbinek 295 nm-nél nagyobb hullámhossztartományban van egy jellegzetes válla, amely specifikusan gerjeszthető. A tirozin a triptofánéhoz képest igen alacsony moláris extinkciós koefficiense ellenére azért okozhat problémát a mérések során, mert a fehérjék általában jóval több tirozint tartalmaznak, mint triptofánt. A triptofán nagy előnye a tirozinnal szemben, hogy intrinszik fluoreszcenciája éppen a kisebb háttér miatt nagyobb relatív jelváltozást, s így közvetve sokkal kedvezőbb jel/zaj arányt mutat. Szükség esetén az arány további növeléséhez csak kevés aminosav szubsztitúciója szükséges, így a mutáns fehérje nagyobb eséllyel tartja meg a vad típus tulajdonságait. Amennyiben magának a fehérjének a fluoreszcenciája vizsgálatunkban nem használható, extrinszik fluorofórokat helyezhetünk el rajta. Ez történhet kovalens módosítással, de létrehozhatunk fúziós fehérjéket is, melyek egy fluoreszkáló fehérjét (például a zöld fluoreszcens fehérjét, a GFP-t vagy származékait) tartalmaznak. A fluoreszcencia detektálásának előnye – származzon bármilyen forrásból –, hogy igen érzékeny a környezetre, és könnyen mérhető. A jelamplifikáció jelentős mértékű, mert a gerjesztett fluorofór rövid idő alatt igen sok foton bocsát ki, és ezek nagy

érzékenységgel detektálhatók. A fényszórás a kolloid mérettartományba eső rendszereknél használható jól. Az elektronspin-rezonancia (EPR) követése leginkább akkor hasznos, ha egy molekulába két spinjelet viszünk be egymás közelébe, mert ezek bizonyos távolságon belül perturbálják egymást, méghozzá távolságfüggő módon. Így közvetlenül detektálhatjuk a konformációváltozásokat. A felsoroltakon kívül még számos használható jel áll rendelkezésünkre a modellrendszer függvényében: elektromos vezetőképesség, ultrahangelnyelés stb.

Kombinált tranziens kinetikai mérési módszerek

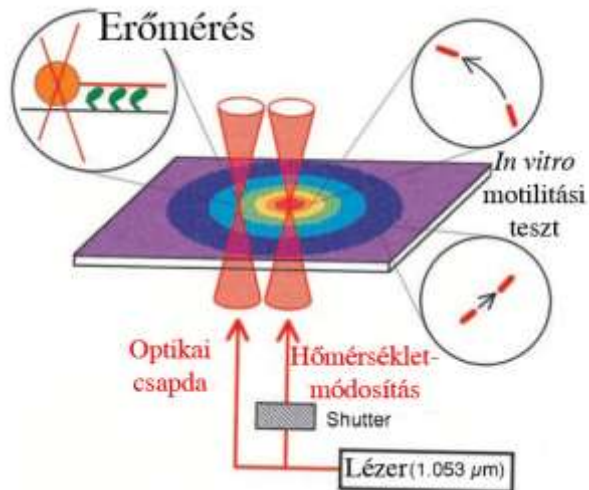
A fentebb említett technikák kombinálására már a kilencvenes években is történt kísérlet (Goldmann és Geeves, 1991). Geeves-ék hozzánk hasonlóan egy közönséges *stopped flow* készüléket módosítottak. Amint a 4. ábrán látható sematikus rajzon jól követhető, a küvetta a kívánt mérési hőmérsékletre temperálták, és a fecskendőből a küvetta vezető csőszakaszba beépítettek egy jó hővezető betoldást.



4. ábra. Egy viszonylag lassú hőugrásos stopped flow készülék sémája. T_2 a mérési hőmérséklet, a szaggatott vonal alatti egységek erre vannak termosztálva. (Goldmann és Geeves, 1991, cikkéből, módosítva)

volt, minél kisebb mintatérfogatban. Az így elérhető hőmérsékletugrás 10-15 °C volt mindkét irányba. A holtidő valamivel kevesebb, mint 150 ms volt, de minimum 87 ms. Belátható, hogy mindkét paraméter, a viszonylag kis perturbáció és az igen nagy holtidő is erősen korlátozza a módszer használhatóságát.

Egész más úton indult el a japán Ishiwata kutatócsoportja. Ők kifejlesztették az általuk hőimpulzus-mikroszkópiának (*temperature-pulse microscopy*, TPM) nevezett eljárást (Kato és mtsai, 1999), melynek segítségével egy mikroszkópi minta hőmérsékletét igen rövid idő, körülbelül 10 ms alatt lehet nagymértékben megnövelni, ráadásul ez a hőugrás reverzibilis.



5. ábra. A hőimpulzus-mikroszkópia (TPM) vázlatja.

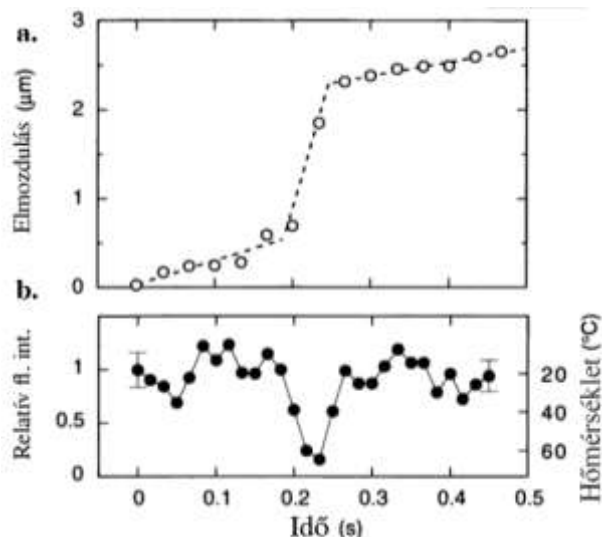
A mintában lévő aggregált fémrészecskék körül az infravörös lézerimpulzus hatására színes koncentrikus körökkel ábrázolt termikus gradiens alakul ki (5. ábra), majd a fény kikapcsolása után a hő pillanatszerűen eloszlik a környezetben. Az ilyen rövid fény-, pontosabban hőimpulzusok nem károsítják

a fehérjét, így ismételt mérésekre is lehetőség van. Mivel a fluoreszcencia hőmérsékletfüggést mutat, a pontos hőmérsékletet az aktinfilamentumokhoz kapcsolt rodamin fluoreszcenciájának intenzitáscsökkenéséből állapították meg, egy általuk felállított empirikus egyenlet alapján. Méréseik során arra a meglepő eredményre jutottak, hogy magas (40-50 °C körüli) hőmérsékleten egy nagyságrenddel nő a csúszási sebesség, és elérheti a 26, sőt, extrém esetekben az 50 μm/s-ot is, mielőtt fellépne a hődenaturáció. A 6. ábrán jól látható egy egyszeri hőimpulzus hatása a csúszási sebességre. Egy későbbi kísérletsorozatban a kinezint is megvizsgálták (Kawaguchi és Ishiwata, 2001). Ekkor már nem fémpartikulumokat használtak, hanem egy roppant vékony alumíniumréteget kondenzáltak egy fedőlemezre, és ezt világították meg az infravörös lézerrel. Meghatározták a kinezin lépési sebességének hőmérsékletfüggését, és elkészítették az Arrhenius-ábrázolást is (7. ábra).

A TPM-módszerrel tehát a holtidő körülbelül 10 ms-nak adódik, és az ugrást a módszerből fakadóan csak felfelé lehet megvalósítani. Az Ishiwatáék által elért legmagasabb hőmérséklet valamivel több, mint 60 °C volt.

Ezek a vizsgálatok igen fontos konzekvenciára világítanak rá: nyilvánvalóvá vált, hogy a denaturálási hőmérséklet fölött is van értelme vizsgálni az enzimek működését, ha ezt a hőmérsékletet elég gyorsan el lehet érni. A hődenaturáció ugyanis egy meglehetősen lassú folyamat, és amíg be nem következik, a fehérje működőképes marad extrém magas

Az eljárás lényege, hogy a mintában fémrészecskék vannak szétosztva (alumínium, arany, ezüst vagy platina), és ezeket a részecskéket infravörös lézerrel világítják meg impulzusszerűen. A fémrészecskék spontán módon szabálytalan alakú aggregátumokat képeztek, de az aggregátumok jelenléte az általuk vizsgált aktomiozin *in vitro* motilitásra megfelelően hosszú ideig nem volt hatással. A lézerfény hatására az aggregátumok körül koncentrikus hőmérsékleti gradiens alakul ki (5. ábra), majd a fény kikapcsolása után a hő pillanatszerűen eloszlik a környezetben. Az ilyen rövid fény-, pontosabban hőimpulzusok nem károsítják



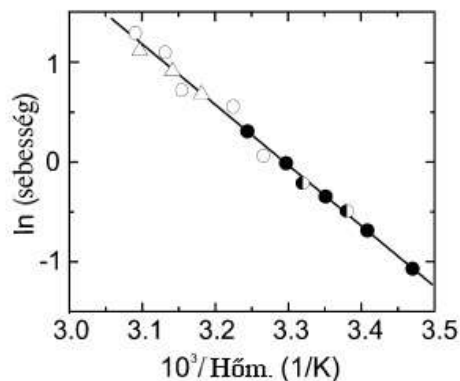
6. ábra. Egyszeri hőimpulzus hatása az aktinfilamentum haladási sebességére.

a. A filamentum középső pontjának elmozdulása az idő függvényében.

b. A relatív fluoreszcenciaintenzitás és az ebből számított hőmérséklet az idő függvényében.

A hőimpulzus 0,19 s-nál látható, az elért maximális hőmérséklet meghaladja a 60 °C-ot. Ezalatt a csúszási sebesség ugrásszerűen megnőtt, 26 µm/s-ra. A lézerefény megszűnte után a hőmérséklet rövid idő alatt visszaállt a kiindulási értékre.

(Kato és mtsai, 1999, cikkéből, módosítva)



7. ábra. A kinezin lépési sebességének Arrhenius-ábrázolása.

A különböző szimbólumok különböző mérési metodikát jeleznek. A magasabb hőmérséklettartományban látható üres karikák és a háromszögek jelzik a TPM-módszerrel megállapított értékeket.

(Kawaguchi és Ishiwata, 2001, cikkéből, módosítva)

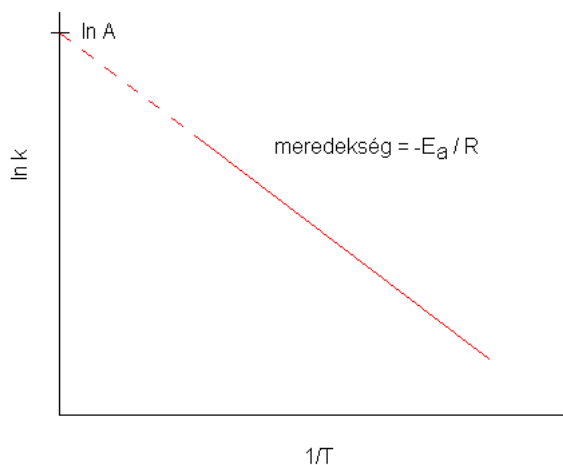
hőmérsékleteken is. Ha pedig igen nagy hőmérsékletugrást valósítunk meg, az egyben igen nagy perturbációt is jelent, ami roppant előnyös a kinetikai vizsgálatok szempontjából.

II. A reakciók hőmérsékletfüggése

Általános tapasztalat, hogy a reakciók sebessége a hőmérséklet növelésével nő. A tapasztalat azt mutatja, hogy a sebességi állandó természetes alapú logaritmusát ábrázolva az abszolút hőmérséklet reciprokanak függvényében, gyakran egyenest kapunk (8. ábra). Ez tulajdonképpen nem más, mint a linearizálása az Arrhenius-egyenletnek:

$$k = A \cdot e^{-E_a/RT}$$

ahol k a sebességi állandó, A a preexponenciális tényező, E_a az aktiválási energia, R az egyetemes gázállandó, T pedig az abszolút hőmérséklet. A preexponenciális tényezőt és az



8. ábra: A sebességi együttható Arrhenius-ábrázolása. Az illesztett egyenes meredeksége $-E_a/R$, tengelymetszete az $1/T=0$ pontban $\ln A$.

aktiválási energiát Arrhenius-paramétereknek nevezik. Az aktiválási energia az a legkisebb energia, amivel egy reaktánsnak rendelkeznie kell ahhoz, hogy terméké alakulhasson. Gázfázisú reakcióknál például az $e^{-E_a/RT}$ kifejezés azoknak az ütközéseknek az arányát adja meg (a Boltzmann-eloszlás szerint), melyek kinetikus energiája eléri vagy meghaladja az aktiválási energia értékét, tehát ezek az ütközések vezetnek termékképződéshez. A preexponenciális tag az ütközések gyakoriságára utal, kettejük szorzata így

éppen a termékképződéshez vezető ütközések számát adja meg. Hasonló, bár bonyolultabb fogalmakat adhatunk meg folyadékfázisú reakciók esetében is.

A fenti egyenlet logaritmizálása a következő összefüggéshez vezet:

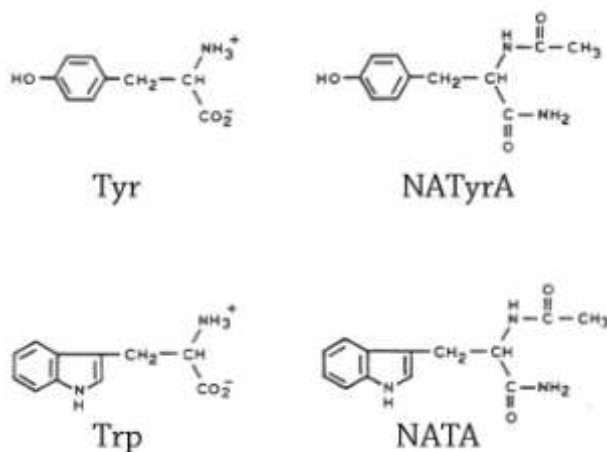
$$\ln k = \ln A - E_a / RT$$

A 8. ábrán látható egyenes meredeksége eszerint $-E_a / R$, tengelymetszete pedig az $1 / T = 0$ pontban $\ln A$. (Ha az eredmények ezen átalakítás után nem egyenest adnak, annak biológiai rendszerekben az a legvalószínűbb oka, hogy a reakció különböző hőmérsékleti tartományokban más úton zajlik le.) Mivel az egyenlet meredeksége az aktiválási energiától függ, elmondhatjuk, hogy minél nagyobb egy reakció aktiválási energiája, annál inkább hőmérsékletfüggő lesz a sebességi állandója.

A Le Chatelier-elv értelmében az egyensúlyi rendszerek hőmérsékletének emelésével az egyensúly az endoterm irányba tolódik el, mert a rendszer hő formájában abszorbeálja az energiát.

A fluoreszcencia hőmérsékletfüggése

Mivel választott modellrendszereinkben az általunk követett jel a fluoreszcencia volt, fontos megemlíteni ennek a hőmérsékletfüggését. Korábbi vizsgálatok (Málnási-Csizmadia és mtsai, 2001) egy neutrális triptofánanalóg, a NATA alkalmazásával megmutatták, hogy a triptofán fluoreszcenciája a hőmérséklet 1 °C-os emelkedésével körülbelül 1 %-ot csökken. Ez a jelenség olyan folyamatokból ered, melyek a gerjesztett fluorofór alapállapotba fotonemisszió



9. ábra: A tirozin és a triptofán, valamint ezek analógjainak szerkezeti képlete.

(Lakowicz, 1999, könyvből, módosítva)

nélkül való visszatérését okozzák, és ezzel csökkentik a gerjesztett állapot életidejét. A fluoreszcencia hőmérsékletfüggésével minden nem konstans hőmérsékleten végzett mérés során számolni kell. Különösen igaz ez a hőugrások relaxációs kísérletekre. Amennyiben egy folyamat hőmérsékletfüggését a fluoreszcencia követésével próbáljuk detektálni, tudnunk kell, hogy a kapott jel vajon a vizsgált reakcióból származik-e, vagy csak magának a fluorofórnak a megváltozott hőmérsékletű közegre adott válasza ez. A kérdés megválaszolható, ha a mérés előtt kontrollkísérletként ugyanabban a hőmérséklettartományban megmérjük az adott aminosav fluoreszcenciájának változását. Ekkor használhatunk közönséges triptofánt vagy tirozint is, de ezek neutrális analógjai, a NATA és a NATyrA (9. ábra) előnyösebbek. Az előbbieknél ugyanis szabad karboxil- és aminocsoportjai vannak, melyek a fluoreszcenciából származó jel csökkenését okozzák, míg az utóbb említett analógok jobban mimikálják a polipeptidláncban elhelyezkedő aminosavmaradékot.

nélkül való visszatérését okozzák, és ezzel csökkentik a gerjesztett állapot életidejét. A fluoreszcencia hőmérsékletfüggésével minden nem konstans hőmérsékleten végzett mérés során számolni kell. Különösen igaz ez a hőugrások relaxációs kísérletekre. Amennyiben egy folyamat hőmérsékletfüggését a fluoreszcencia követésével próbáljuk detektálni, tudnunk kell, hogy a kapott jel vajon a vizsgált reakcióból származik-e, vagy csak magának a fluorofórnak a megváltozott

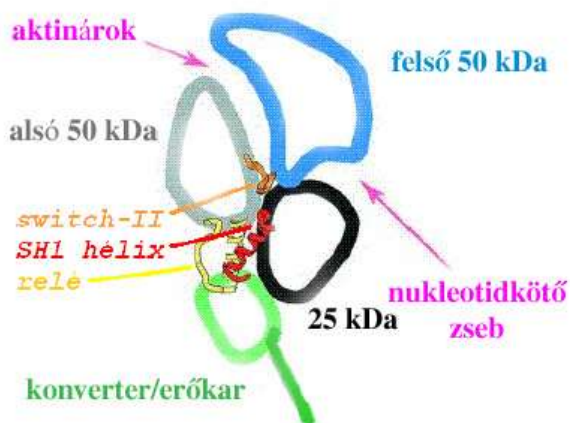
III. A modellrendszerek bemutatása

Miozin motordomén

A motorfehérjék – melyeket újabban szokás energáz enzimeknek is nevezni – legfontosabb jellegzetessége, hogy kemomechanikai energiatermelésre képesek. Jelentőségük óriási: nélkülük működőképes eukarióta sejt nem képzelhető el. A különböző motorfehérjék részt vesznek az intracelluláris organelum-, vezikula- és molekulatranszportban, a sejthalak és sejtpolaritás meghatározásában, az irányított sejtmozgásban, az orsófonalak és kromoszómák mozgásában sejtosztódáskor, a csillók mozgásában, de szerepet játszanak apoptotikus folyamatokban és a hallásreceptióban is. Számos igen súlyos betegség hátterében a motorok és/vagy a hozzájuk kapcsolódó egyéb fehérjék diszfunkciója áll (különböző miopátiák, sükettség, vakság, *lissencephalia* stb.).

A motorfehérjéknek két fő típusuk van: a lineáris motorok és a forgómotorok vagy más néven rotorok. A lineáris motorok egyik csoportját alkotják a citoskeletális vagy „klasszikus” motorok: az aktomiozin rendszer, a tubulin-kinezin és a tubulin-dinein rendszerek. A miozin-, a kinezin- és a dineincsaládok a P-hurok NTP-áz domén szupercsaládba tartoznak néhány közös jellemzőjük alapján. Ilyen például az ATP-kötés és -hidrolízis indukálta konformációváltozás, az ADP- és az ATP-kötött állapot eltérő affinitása a polimersínhez, és a hasonló szerkezet (motordomén és a hozzá kapcsolódó elongált erőkar). Jelenleg megközelítőleg kéttucatnyi miozincsaládot ismerünk, melyek tagjai a legkülönbözőbb élettudományokban vesznek részt. A legelső felfedezett miozinosztály a miozin II volt (konvencionális miozinok). Ezek heterohexamer szerkezetűek, két nehéz láncukhoz két-két könnyű lánc kapcsolódik. A nehéz láncok fejre és rúdra tagolódnak. A fej további két részre osztható: a motordoménre és a regulációs vagy nyaki doménre (erőkar). A regulációs doménhez kapcsolódik a két-két könnyű lánc, az esszenciális és a regulációs könnyű láncok.

A *Dictyostelium discoideum* sejtes nyálkagomba miozinja is a konvencionális miozinok közé tartozik. Kísérleteinkben ennek a miozinnak a motordoménjét használtuk fel. (A teljes miozinra nincs szükség a vizsgálataink során, mert az erőkar kilengésének csuklópontja a motordoménben található, így az egy rövid erőkarral is megfelelő kísérleti objektum.) Ez az úgynevezett motordomén négy szubdoménből áll (10. ábra). Ezek a következők: N-terminális 25 kDa-os szubdomén, felső és alsó 50 kDa-os szubdomének, és a konverter szubdomén. Az 50 kDa-os árok az aktinkötő hely. A felső 25 kDa-os alegység és az N-terminális szubdomén

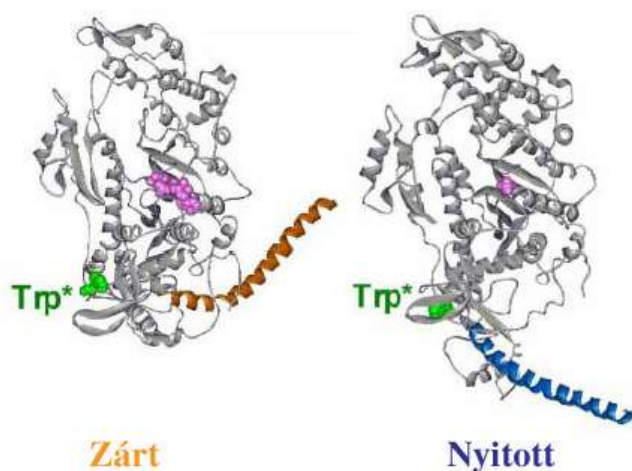


10. ábra: A miozin II motordomén szubdoménszerkezete, a fontosabb kapcsolók és kötőhelyek.

(Kovács Mihály, 2002, doktori értekezés, módosítva)

alakítja ki a nukleotidkötő zsebet. A kapcsolóelemek közül kiemelkedik a *switch II*, mely az aktinkötő hely és a nukleotidkötő zseb γ -foszfátja között teremt kapcsolatot. További fontos kapcsolók és hurkok a *switch I* (az ábrán nem látszik), a reléhélix és a reléhurok (ezek a konverter régió és az alsó 50 kDa-os alegység között helyezkednek el), az SH1 hélix (az N-terminális szubdomén és a konverter között), valamint a P-hurok (a *switch I*-gyel együtt a nukleotid koordinálásában vesz részt, szintén nem látszik az ábrán).

A *switch II*-nek kétféle pozíciója ismeretes. Az egyik pozíció, melyet kristályosítással ATP, ADP, illetve ATP-analógok (AMP.PNP, ADP.BeF_x) jelenlétében lehet megfigyelni, az *open* (nyitott) állás. Ezzel szemben ADP.P_i-analógok (ADP.AlF₄, ADP.Vi) jelenlétében a *switch II* 0,5 nm-rel közelebb helyezkedik el a γ -foszfáthoz, mint az előző esetben, és hidrogénhidat létesít vele. Ezt a szerkezetet a *switch II* pozíciója alapján *closed* (zárt) konformációnak nevezik. Ismerünk egy harmadik, a fentiekől némileg eltérő globális konformációs állapotot



11. ábra: A *Dictyostelium* miozin motordoménjének szerkezete open és closed állapotban. Az 501-es pozíciójú triptofán zölddel van jelölve, a közötti ligandum lila, az erőkar pedig narancssárga (zárt), illetve kék (nyitott) színű.

(Kovács Mihály, 2002, doktori értekezés)

is: ez az *apo* állapot, mely nukleotid távollétében jellemző.

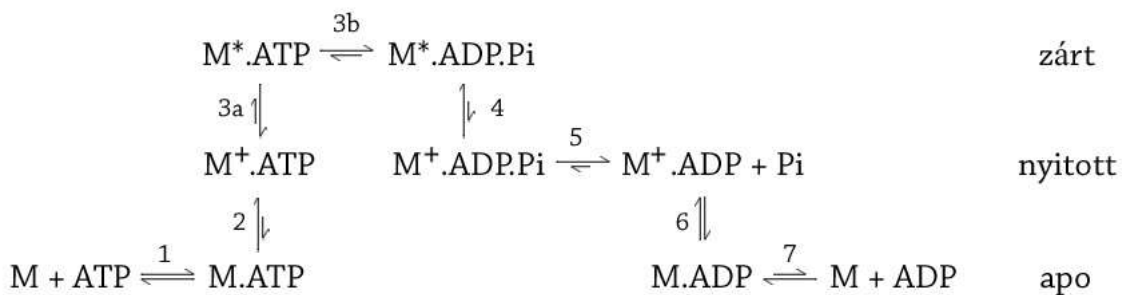
A *Dictyostelium* motordomén viszonylag kevés triptofánt tartalmaz. ATP-kötésre intrinszik

fluoreszcenciaemelkedés tapasztalható, ami arra utal, hogy a triptofánok valamelyike érzékeny az ATP-kötés hatására bekövetkező, fentebb említett

konformációváltozásra.

Helyspecifikus módosítással előállították a motordomén egytriptofános mutánsait, és

megállapították, hogy a bekövetkező fluoreszcenciaemelkedésért a reléhurokban elhelyezkedő 501-es triptofán a felelős (11. ábra) (Málnási-Csizmadia és mtsai, 2000). A W501+ motordoménmutáns, melynek triptofánjai az 501-es kivételével fenil-alaninra vannak cserélve, jelentős (preparátumtól is függő, akár 80-100%-os) *steady-state* fluoreszcenciaemelkedést mutat ATP hozzáadására, és enyhe (körülbelül 20%-os) csökkenést ADP jelenlétében. Ezen egytriptofános mutáns nagy előnye, hogy az intrinszik jel egyértelműen köthető a reléhurok triptofánjához, és a szignál egyértelműen jelzi az *open-closed* konformációs átmenetet (Málnási-Csizmadia és mtsai, 2000, Geeves és Holmes, 1999, Batra és Manstein, 1999). Ekkor először egy fluoreszcenciacsökkenést kapunk (*apo-open* átmenet), amit egy nagyobb emelkedés követ (*open-closed* átmenet). Ennek ismeretében az ATP-áz ciklus sémája a következőképpen adható meg (* jelöli a magasabb fluoreszcenciájú állapotot, + az alacsonyabbat):

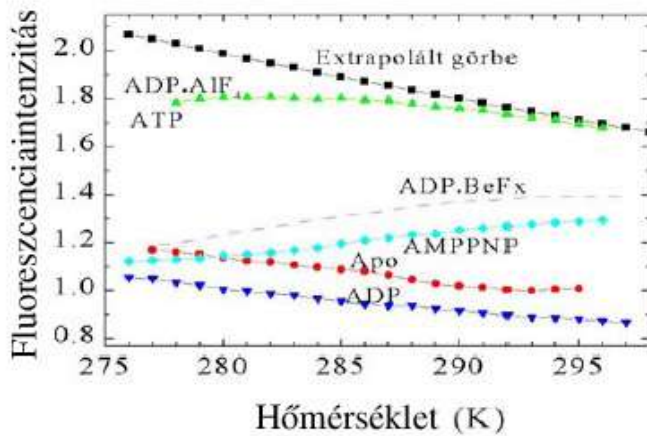


12. ábra: A Dictyostelium miozin II ATP-áz ciklusának sémája.

A sémát eredetileg Bagshaw és Trentham dolgozták ki vázizom miozinra körülbelül harminc évvel ezelőtt (Bagshaw és mtsai, 1974, Bagshaw és Trentham, 1974, illetve Johnson és Taylor, 1978). Ezt kis módosítással lehet alkalmazni Dictyostelium miozinra is (Wakelin és mtsai, 2002). Az ábrán jól látható, hogy melyik állapotra milyen globális konformáció jellemző. Részletesebb magyarázat a szövegben.

Nukleotid távollétében a miozin az aktinnal erősen kötött komplexet alkot. ATP-kötés hatására a *switch I* zárt állapotba kerül, az aktinkötő árok kinyílik, és a miozin disszociál az aktinról, majd a *switch II open-closed* átmenete után lehetővé válik az ATP hidrolízise. Ez csak zárt állapotban következhet be, az állapot kialakulása előfeltétele a hidrolízislépésnek, amint azt helyspecifikus mutációs kísérletekkel igazolni is lehetett (Sasaki és mtsai, 1998). Az erőkar felhúzott állapotba kerül, és a miozin ismét visszaköt az aktinhoz. Az aktinárok bezárul, a *switch I* nyit, majd a *switch II* nyitása után az inorganikus foszfát távozik az erőgenerálás, a munkaütem (*power stroke*) során. A foszfát nem távozhat ugyanott, ahol érkezett, hiszen az ADP még az útjában van. (Ebből következik, hogy a miozin úgynevezett

„backdoor” enzim, hiszen a termék nem azon az úton távozik, ahogy a szubsztrát érkezett. Ez az út még nem ismert.) Végül az ADP is távozik a nukleotidkötő zsebből, a miozin pedig ismét rigor komplexet alkot az aktinnal.



13. ábra: A W501+ konstrukció steady-state fluoreszcenciájának hőmérsékletfüggése.

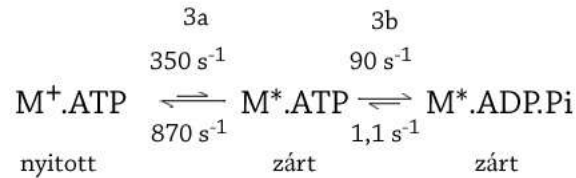
A hőmérséklet növelésével apo állapotban, illetve ADP vagy ADP.AIF₄ jelenlétében a fluoreszcencia csökken, míg ATP-analógok (AMP.PNP és ADP.BeF_x) jelenlétében intenzitásnövekedés tapasztalható. Az extrapolált egyenes a NATA fluoreszcenciájának hőmérsékletfüggését mutatja a vizsgált hőmérsékleti tartományban.

(Kovács Mihály, 2002, doktori értekezés)

előbbi esetekben a fluoreszcencia intenzitásának növekedését idézi elő, az utóbbiak esetében pedig csökkenéssel jár együtt (Málnási-Csizmadia és mtsai, 2001). Ennek legvalószínűbb oka az, hogy ezen analógok jelenlétében a nyitott és zárt konformáció egyensúlya alakul ki, és ez az egyensúly hőmérsékletfüggő. A magasabb hőmérséklet a zárt konformáció felé tolja el az egyensúlyt (13. ábra). Hőugrásos relaxációs kísérletekkel tehát pontosabb képet kaphatunk a konformációváltás kinetikai paramétereiről. Azonban míg az említett ATP-analógok jelenlétében a nyitott-zárt egyensúly tényleges egyensúlyi állandóját kaphatjuk meg (K_{3a} a 12. ábrán), addig ATP jelenlétében annak hidrolízise eltolja az egyensúlyt, így egy látszólagos egyensúlyi állandót ($K_{obs} = K_{3a} + [1 + K_{3b}]$) számíthatunk. Hőugrásos kísérletekre már került sor pár évvel ezelőtt, de a technika korlátai miatt ATP jelenlétében nem, csak nukleotidanalógokkal és ADP-vel (Málnási-Csizmadia és mtsai, 2001). ADP, ADP.AIF₄ (és nukleotidmentes) állapotban a hőugrás hatására nem történt fluoreszcenciaváltozással járó átmenet, ami várható volt, hiszen ezekben az esetekben nincs nyitott-zárt átalakulás. AMP.PNP és ADP.BeF_x jelenlétében azonban a hőugrással egy 1000 s⁻¹ körüli megfigyelt

Az *open-closed* konformációs átmenet és a hidrolízislépés egymástól való elválasztása akkor lehetséges perturbációs módszerekkel, ha az előbbi egyensúlyi állandója 1-hez közeli ($0,1 < K < 10$), és szelektíven perturbálható. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy ezek a feltételek teljesülnek a konformációs átmenetre. AMP.PNP és ADP.BeF_x nukleotidanalógok jelenlétében ugyanis a W501+ *steady-state* fluoreszcenciájának hőmérsékletfüggése eltér az ADP, illetve ADP.AIF₄ jelenlétében mért értékektől, és a tendencia is megfordul: a hőmérséklet emelése az

sebességi állandójú reakciólépést lehetett kimutatni. Ezekből, valamint többek között nyomásgrásos mérésekből a következő sémát lehetett felírni 20 °C-on a konformációs átmenetre és a hidrolízislépésre:

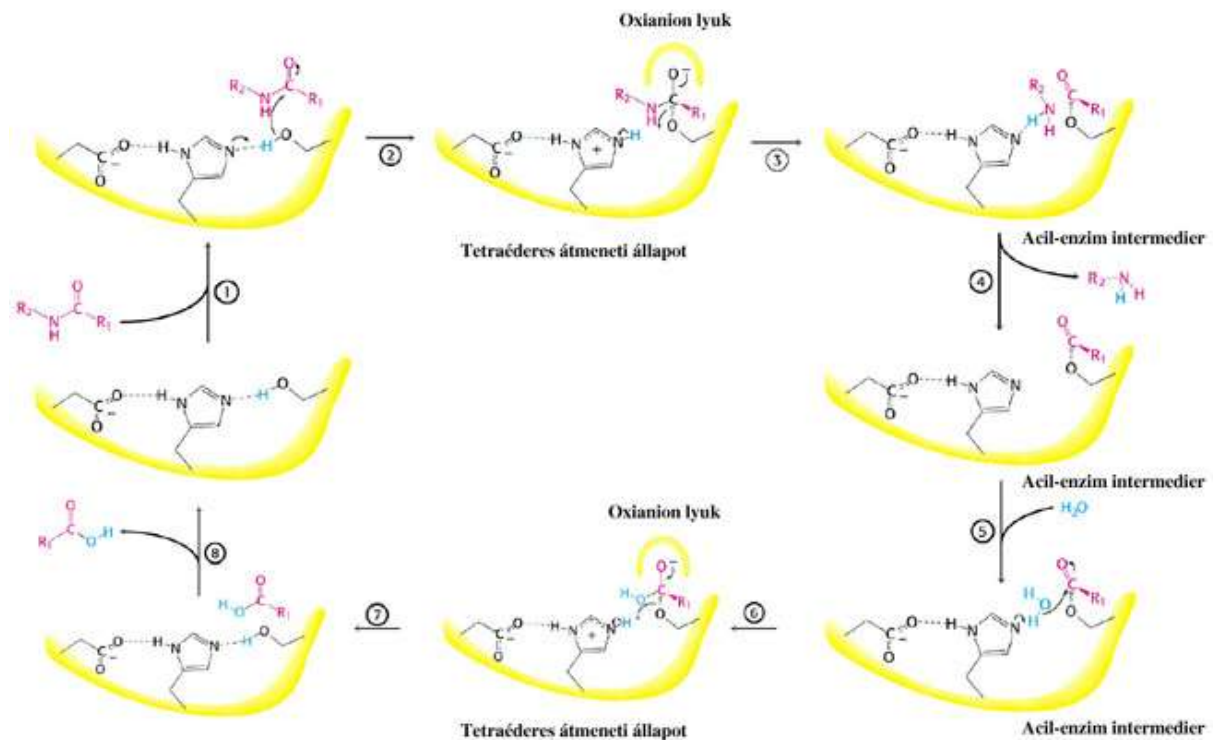


14. ábra: A Dictyostelium miozin II ATP-áz ciklusa két lépésének sémája 20 °C-on.

Szándékunk az volt, hogy a konformációs átmenet hőmérsékletfüggését minél szélesebb hőmérséklettartományban megvizsgáljuk ATP jelenlétében.

Humán tripszin IV

A tripszinek a szerin-proteáz család tagjai, amelyek amid- és észterkötések hidrolízisét katalizálják. Fontos szerepet játszanak a szabályozásban, fehérjék aktiválásában és



15. ábra. A szerin-proteázok általános működési mechanizmusa. Magyarázat a szövegben.

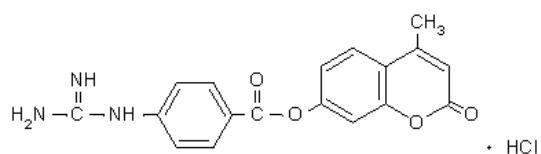
(Stryer, 2002, könyvből, módosítva)

inaktiválásában, továbbá részt vesznek különböző szignáltranszdukciós folyamatokban. Két β -hordó doménből állnak, melyek feltehetően génduplikációval keletkeztek. Aktív centrumukat, katalitikus triádjukat egy szerin, egy hisztidin és egy aszparaginsav adja (Ser195, His57, Asp102). A hidrolízis acil-transzfer mechanizmussal történik (15. ábra). A Michaelis-komplex kialakulása után az elhasítandó kötésben levő karbonil szénatomot a szerin hidroxilcsoportja támadja. Ez a folyamat egy kovalens tetraédes átmeneti állapot kialakulásához vezet, mely ezután távozó csoportra és az acil-enzimre bomlik. Az acilálódás során a szerin hidroxics csoportjának protonja a hisztidin imidazolgyűrűjének közvetítésével a távozó csoport amincsoportjára kerül. A továbbiakban az acil-enzim hidrolizál a dezacilációs útvonalon. Ekkor egy vízmolekula tölti be a nukleofil támadó szerepét. A szerin proteázok aktív helye egy oxianion zsebet is tartalmaz, melynek kialakításában különös jelentősége van a Gly193 és Ser195 peptidkötésének iminocsoportjának. Az oxianion zseb kialakításában résztvevő csoportok segítenek a tetraédes átmeneti állapot stabilizálásában (Kraut, 1977). A szerin-proteázok szubsztrátspecificitását a P, P' oldalláncok és az S, S' kötőzsebek döntik el. Az előbbieket a szubsztrátnak a hasítandó kötéstől C-, illetve N-terminális felőli aminosav-oldalláncait jelöli. A P pozíciójú oldallánc beleillik az S kötőzsebbe a tripszinen, a P' helye pedig az S' kötőzsebbe. Ezeket a zsebeket a 189-195, 214-220 és 225-228 pozíciójú aminosavak alakítják ki. A különböző tripszinek szubsztrátspecificitásbeli eltéréseit a kötőzsebekben található aminosav-oldalláncok határozzák meg. Ezek méretüknél vagy töltésüknél fogva gátolhatják a szubsztrát bizonyos aminosav-oldalláncainak a kötőzsebbe kerülését.

Az 1970-es években humán hasnyálmirigyvádékból izolálták a kationos és az anionos tripszineket (Guy és mtsai, 1978), majd később a mezotripszint (Rinderknecht és mtsai, 1984). Ez utóbbi nevét a két korábbi tripszinforma izoelektromos pontja közé eső izoelektromos értékéről kapta. A mezotripszinről kiderült, hogy igen erős inhibitor-rezisztenciát mutat. A cDNS-szekvenciák alapján az izolált enzimeket humán I, humán II, humán IV és mezotripszin (Nyaruhucha és mtsai, 1997) néven azonosították. A mezotripszinogén aktív formájának (mezotripszin) és a humán tripszinogén IV aktív formájának, mely az agyban expresszálódik (humán tripszin IV), teljesen megegyezik az aminosav szekvenciája. A humán tripszinogén IV polimorfiaát mutat: felfedeztek egy B-formát is, mely abban különbözik a korábban azonosított A-formától, hogy az N-terminálisról hiányzik egyetlen glutamát. A humán tripszin IV agyban betöltött szerepe egyelőre ismeretlen, de feltételezhető, hogy komoly funkciókat lát el. A β -amiloid Alzheimer-prekurzor fehérje (APP) tartalmaz egy Kunitz-típusú tripszin inhibitor domént és metabolizmusában is egy tripszin vehet részt (Scheidig és mtsai, 1997). Az irodalomban és az

adatbázisokban található tripszin szekvenciák vizsgálata alapján megállapítást nyert, hogy csak a humán IV tripszinben van a 193-as aminosavhelyen arginin. Bebizonyosodott az is, hogy ez az arginin felelős a humán tripszin IV (és a mezotripszin) kivételes inhibitorrezisztenciájáért (Katona és mtsai, 2002).

A tripszinek aktívhely-titrálását általában kromogén szubsztrátokkal végzik, melyek hasítás után színes terméket adnak. Gyakran használt szubsztrát például a 4-metil-umbelliferin-guanidin-benzoát (MUGB, 16. ábra), melyet a tripszin IV-gyel végzett *stopped flow/temperature jump* vizsgálataink során használtunk. Célunk az volt, hogy gyorskinetikai



16. ábra: A 4-metil-umbelliferin-guanidin-benzoát (MUGB) szerkezeti képlete.

módszerekkel tanulmányozzuk a humán tripszin IV szubsztrátkötésének hőmérsékletfüggését, és ezekből következtessünk termodinamikai paraméterekre, mivel eddig ilyen vizsgálatokra nem került sor.

Célkitűzések

Fő célunk az volt, hogy a gyorskeverési és hőugrásos relaxációs technikák kombinálásával egy új, széleskörűen használható, komplex tranziens kinetikai mérőműszert állítsunk össze, majd ennek használhatóságát több modellrendszer alkalmazásával ellenőrizzük.

Elvárásaink az általunk tervezett *stopped flow / temperature jump* (SF/TJ) készüléssel szemben a következők voltak:

1. Minél kisebb holtidő.
2. Minél nagyobb elérhető hőmérsékletugrás.

A SF/TJ berendezés tesztelésére két modellrendszert választottunk: a *Dictyostelium discoideum* nyálkagomba konvencionális miozinjának motordoménjét és a humán tripszin IV-et. Az előbbi egy tranziens kinetikai módszerekkel jól tanulmányozott rendszer, melynek két jól meghatározott reakciólépését kívántuk perturbálni. A célunk az volt, hogy specifikusan ezekről gyűjtsünk információkat. A tripszin ezzel szemben egy olyan rendszer, melyről eddig nem rendelkezünk sok tranziens kinetikai adattal. Itt a célunk a minél teljesebb összkép kialakítása volt a reakciómechanizmust illetően. Szándékaink tehát a két modellrendszerben épp ellentétesek voltak: az egyiknél egy specialista, a másiknál pedig egy generalista kérdést tettünk fel. Ez a két modellrendszer reményeink szerint így jól szimulálja azoknak a vizsgálatoknak a szélsőségeit, melyek elvégzésére a készülék várhatóan alkalmas lesz.

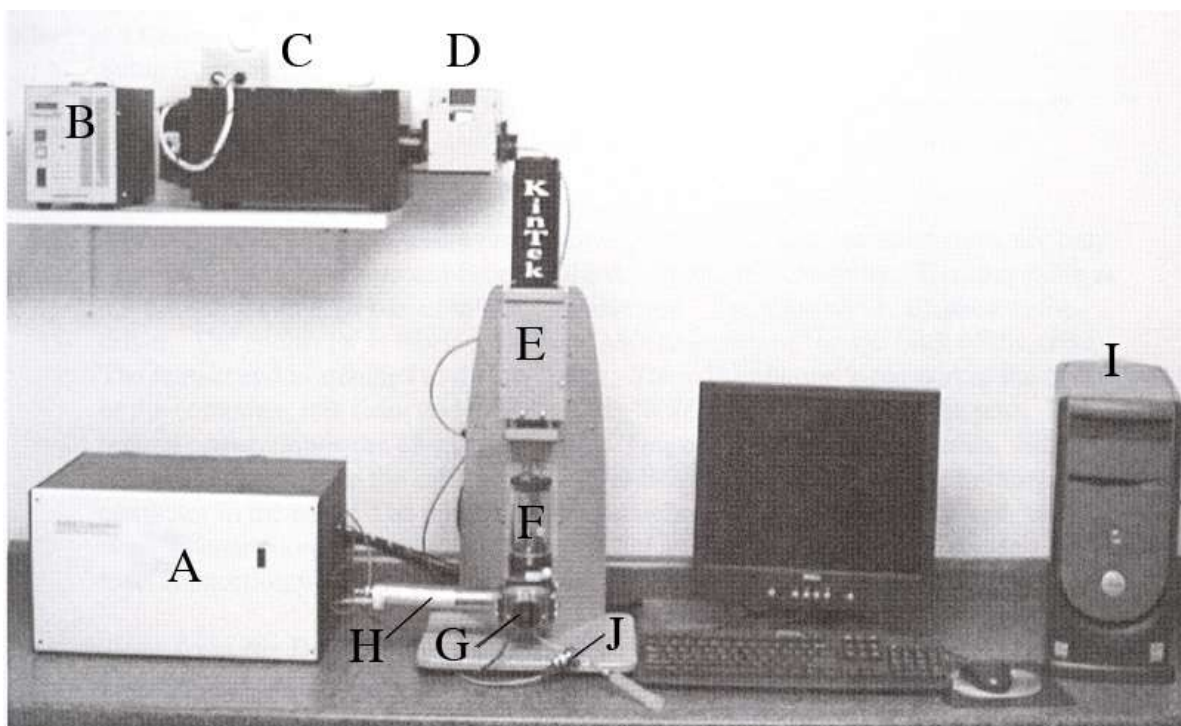
Célkitűzéseink tehát a következő pontokban foglalhatóak össze:

1. A *stopped flow / temperature jump* készülék összeállítása és kalibrálása.
2. A módszer validálása.
 - 2/A. A miozin *open-closed* átmenete hőmérsékletfüggésének vizsgálata, a sebességi állandók és néhány termodinamikai paraméter minél precízebb meghatározása.
 - 2/B. A humán tripszin IV MUGB kromogén szubsztráttal való reakciója hőmérsékletfüggésének vizsgálata.

Módszer

A konvencionális *stopped flow* berendezés

A klasszikus *stopped flow* berendezések, mint a Biokémiai Tanszéken található KinTek gyártmányú, SF-2004 típusjelű berendezés is, a 17. ábrán látható elemekből épülnek fel.

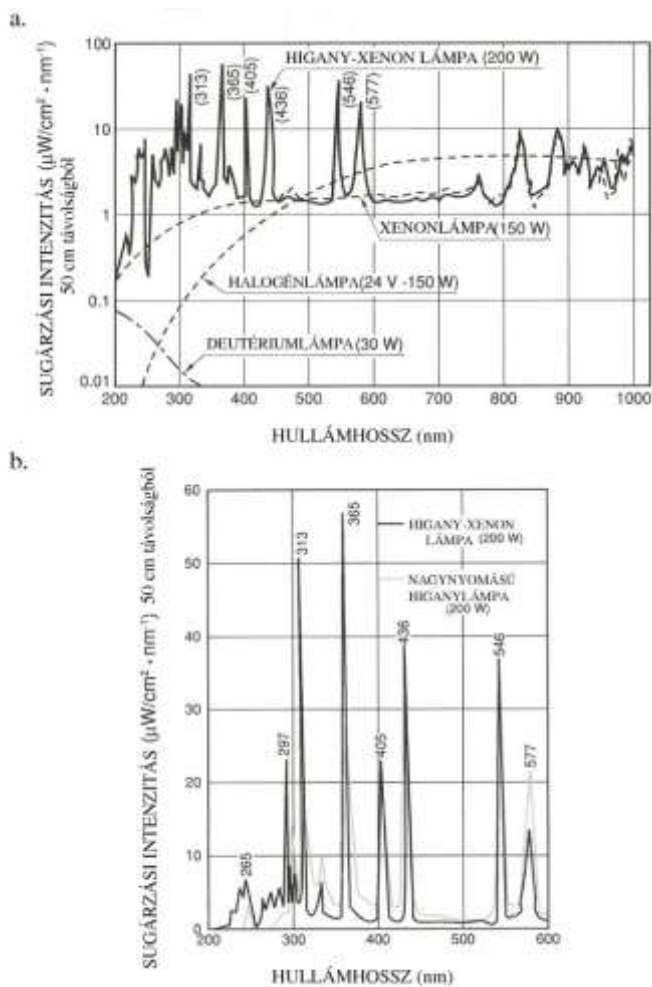


17. ábra: A stopped flow berendezés részei.

A. Motorvezérlő számítógép, B. A lámpa tápegysége, C. Lámpa, D. Monokromátor, E. Motor, F. Fecskendőház, G. Küvettaház, H. Fotoelektronsokszorozó, I. Adatgyűjtő számítógép, J. Megállító szelep, K. Vízhűtés a fényforrás és a fecskendőház számára (az ábrán nem látszik)

(KinTek SF-2004 felhasználói kézikönyv, módosítva)

A lámpával szemben támasztott legfontosabb követelmény, hogy erős fényű legyen, hiszen fluoreszcencia detektálásakor a gerjesztő fény mindössze 1 százaléka emittálódik. Emellett lényeges az is, hogy a lámpa fényintenzitása időben ne változzon, hiszen ez a fluktuáció műtermék keletkezéséhez vezethet. A *stopped flow* készülékekben a 18. ábrán látható lámpatípusok használatosak.



18. ábra: A stopped flow berendezésekben használható lámpatípusok.

a: Higany-xenon-, higany-, halogén- és deutériumlámpák emissziós spektruma.

b: Higany-xenon lámpa és nagynyomású higanygőzlámpa emissziós spektrumának összehasonlítása.

(Hamamatsu, műszaki leírás)

(monokromatikus) alkotóira. Fő alkotóelemei a belépő rés, a kilépő rés, a fókuszáló lencsék vagy tükrök és a diszperziós elem. Ez utóbbi különbözőképpen téríti el a polikromatikus sugárzás monokromatikus összetevőit, úgy, hogy a kilépő résen a kívánt hullámhosszú ($\lambda \pm \Delta \lambda$) fény jut át. A diszperziós elem típusa szerint megkülönböztetünk rácsos és prizmás monokromátort. Az utóbbi típus további két csoportra osztható az optikai rács kialakításának módja szerint. A sík interferencia-monokromátorok mechanikai ráccsal rendelkeznek, melyet véséssel (karcolással) alakítanak ki. A konkáv interferencia-monokromátorok elterjedtebbek, ezeknél holografikus módszerrel hozzák létre az optikai rácsot, és a fényt egy mozgó konkáv

A xenonlámpa spektruma 300 és 800 nm között meglehetősen „sima”, folyamatos spektrumú, csúcsok nélkül. A higany-xenon lámpa főleg alacsonyabb hullámhosszokon intenzívebb fényű, mint az előző, és a spektrumán éles csúcsok jelentkeznek. Míg ennek a lámpának az időbeli fluktuációja néhány százalékos is lehet, a vízhűtést igénylő úgynevezett „superquiet” lámpák esetében ez gyakorlatilag nulla. E nagynyomású higanygőzlámpák további előnye a többivel szemben, hogy már-már vonalas spektrummal rendelkeznek, a csúcsok félszélessége rendkívül kicsi. A lámpák átlagos élettartama körülbelül 1000 óra.

A tanszéki készülék lámpája egy 150 W-os superquiet higany-xenon lámpa (Hamamatsu).

A monokromátor feladata a sugárforrásból származó összetett elektromágneses sugárzás felbontása megközelítőleg azonos hullámhosszú

tükör irányítja a kilépő részhez. Ez viszont hibákat eredményezhet: bizonyos résszélességnél megjelenhet az optikai rács tükörképe (ebben az esetben meg kell változtatni a résszélességét).

A monokromátorok jellemezhetők többek között a diszperzióval, a hatékonysággal és a *stray light levellel* (becsillanó fény szintje). A diszperzió azt adja meg, hogy 1 mm-es résszélesség hány nm-es hullámhossztartományt jelent. A hatékonyság pedig a belépő és a kilépő fény intenzitásának különbsége. (A prizmás monokromátorok hatékonysága rosszabb, mint az optikai ráccsal rendelkezőké.) A *stray light*, azaz a becsillanó gerjesztő fény több szempontból is komoly problémát jelent. Ha ez a fény eljut a küvettába, aspecifikussá válhat a gerjesztés. Ha vörösebb, azaz nagyobb hullámhosszú fény jut át, mint az általunk kívánt, akkor ez beleeshet a fluoreszcenciaemisszió tartományába, és hamis jelet adhat. Másrészt a gerjesztési fényintenzitás 1000-szer erősebb, mint a fluoreszcenciásan emittált fény, így a műtermék elnyomhatja a valódi jelet. Ennek kiküszöbölésére számos módszer létezik, pl. a *dual grading*, melynek hátránya, hogy alkalmazásával a felére csökken a fényintenzitás. A becsillanás főleg a prizmás monokromátoroknál lehet jelentős.

A monokromátorok tárgyalásakor említést kell tenni a másod-, harmad- és magasabbrendű transzmisszióról. A monokromátor ugyanis nemcsak az általunk kívánt hullámhosszú gerjesztő fényt engedi át, hanem azt a fényt is, melynek hullámhossza a gerjesztési hullámhossz egész számú többszöröse (másodrendű transzmisszió). Ennek a kiszűréséről a megfelelő filterek kiválasztásával kell gondoskodni.

A résszélesség, azaz a *slit* beállításakor, mint oly sok más esetben is, optimalizációra van szükség. Minél kisebb a résszélesség, annál specifikusabb lehet a gerjesztés, de annál kisebb lesz a fényintenzitás is. Ha ellenben nagy a *slit*, és túl sok fény jut a küvettába, *photobleaching* léphet fel: az emissziós spektrum eltorzul, és ismételt mérésre kisebb jelet fogunk kapni. Ráadásul túl nagy slit esetén is felléphet a becsillanás jelensége.

Az általunk használt SF-2004-hez rácsos monokromátor tartozik (Spectra-Physics Grating Monochromator Model 77250).

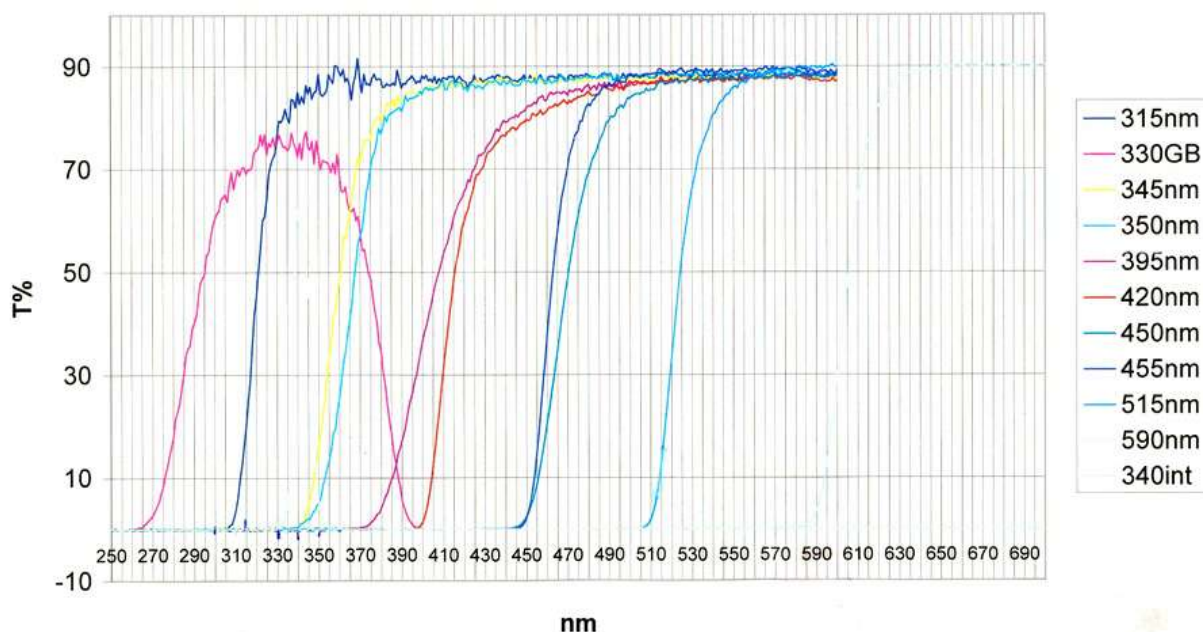
A megállított áramlásos készülékek *motorja* lehet szervomotor, légnyomásvezérelt motor vagy úgynevezett *step*-motor. Az SF-2004 szervomotorral rendelkezik.

Az általunk használt készülék *fecskendőházában* három fecskendő található. A klasszikus megállított áramlásos méréseknél kettőre van szükség, a harmadik fecskendő csak a *double mixing*-kísérleteknél használatos. Ebben az esetben a két reaktáns gyors keverése után egy adott pillanatban egy harmadik reaktánst is bejuttathatunk a küvettába. A fecskendőházban

beépített termométer van. A ház hőmérsékletét vizes termosztáttal (Colora Messtechnik GmbH., Model WK 14-1 DS) tartjuk állandó szinten.

A két reaktáns küvettába juttatásával kapcsolatos paraméterek a következők: a küvettán átfolyó anyag mennyisége, az összelövés sebessége és a reaktánsok keverési aránya. Általános, hogy a küvettatér fogat háromszorosát löjük be a küvettába. Ezzel eltávolítjuk a korábbi reakció nyomait is. A lövési sebesség a turbulencia miatt jelentős. Ha nagy sebességgel történik az összelövés, az áramlás megállása után turbulencia jelentkezik, mely zavarja a mérést. A keverési arányt azzal tudjuk megváltoztatni, hogy a fecskendőházban kicseréljük a fecskendőket. Az alapbeállítás 1:1 arányú, de általában lehetőség van 1:5 stb. arányú keverésre is.

A vastag falú *küvettaházban* található a küvetta, melynek mérete változó. 20-25 μl -es és 5 μl -esek egyaránt használatosak. A nagyobb küvetták előnye, hogy ezekkel nagyobb jelt tudunk detektálni, de több anyagra van szükség. Kisebb küvetta használatkor viszont a holtidő csökken. A mérés szempontjából nagy jelentősége van a küvetta geometriájának. A hagyományos elrendezés nagy turbiditású oldatok esetén okozhat gondot, mert a belső szűrőhatás (*inner filter effect*) miatt gyengébb jelet fogunk detektálni. Ekkor ugyanis, ha az oldat transzmittanciája kicsi, a küvetta fényforrástól távolabbi részén kisebb lesz a fényintenzitás, mint a fényforráshoz közeli oldalon.



19. ábra: Néhány optikai filter transzmissziós spektruma. A 330GB jelű szűrő azonos a szövegben szereplő UG11-gyel. (Filterek leírása)

A detektálás lehetőségeinek tárgyalása előtt érdemes megemlíteni az *optikai filtereket*, melyek segítségével a mérés szempontjából haszontalan, zavaró hullámhosszú fényt kiküszöbölhetjük. Az általunk használt szűrők transzmissziós spektruma a 19. ábrán látható.

A *band-pass* filterek, mint például az UG11, egy hullámhosszablakot engednek át, ezek a legolcsóbbak. A *cut-off* szűrők jellegzetessége, hogy transzmittanciájuk egy szűk hullámhossztartományon belül nagyon megnövekszik. Ez az intervallum a *cut-off* filtereknél néhány 10 nanométert jelent, de a *short wavelength pass filterek* esetében egy nagyságrenddel kisebb, mindössze néhány nanométer. Mindkét imént említett filtertípus rendelkezik azzal a hátránnyal, hogy a másod- és magasabbrendű transzmissziót nem szűrik ki. Az interferenciafilterek egy igen szűk (5-10 nm-es) hullámhossztartományt engednek csak át. Hátrányuk, hogy drágák, és használatuk nagy fényvesztéssel jár.

Nagyon gyakran filterkombinációkat használunk az optimális eredmény elérése érdekében. Például triptofán fluoreszcenciájának detektálásakor nagyon előnyös a 315 nm-es *cut-off* és az UG11 típusú *band-pass* filterek együttes használata. A triptofán specifikusan gerjeszthető 297 nm-en, amit a PMT előtti *cut-off* filter levág, így csak az emittált fény jut a detektorba. A többi fluorofór esetleges gerjesztésével keletkező magasabb hullámhosszú fényt és a másodrendű transzmissziót az UG11 filter vágja le, hiszen ennek a transzmittanciája 420 nm után szinte nulla. A másik lehetőség, hogy a 340 nm-es interferenciaszűrőt használjuk.

A fény detektálása történhet diódadetektorral vagy *fotoelektronsokszorozóval* (*photomultiplier tube*, PMT). Abszorbancia- és transzmittanciamérésekhez mindkettő használható, de fluoreszcenciamérésekhez nagyobb érzékenysége miatt csak az utóbbi. A PMT működési elve az, hogy egy fényérzékeny katódból az emittált fotonok becsapódásának hatására elektronok lépnek ki. Ezek egy szabályozható potenciálkülönbség hatására az anód felé haladva felgyorsulnak, és közben a dinódákba ütközve további elektronokat szabadítanak fel. Így az elemi részecskék száma több nagyságrendnyit növekszik, mire az anódhoz érnek. A PMT-eket jellemezhetjük a reagálási idővel és az átfutási idővel. Az előbbi nanoszekundumos nagyságrendű, és azt adja meg, mennyi idő telik el a foton becsapódása és az első elektron kilépése között. Az átfutási idő (*transit time*) az elektronoknak az elektronsokszorozó cső teljes hosszán történő végigfutásához szükséges idő, ami elérheti a 20 nanoszekundumot is. A PMT-kre jellemző a színhatás (*color effect*), azaz a fotokatód reagálási ideje nem független a becsapódott foton hullámhosszától. Minden mérés előtt meg kell határozni a PMT sötétáramát, ugyanis a katódból spontán is kilépnek az elektronok, ami szintén jelet eredményez. A fentebb említett potenciálkülönbséget (*High Voltage*), ami tulajdonképpen a detektor érzékenységét adja meg, a *stopped flow* készülék szoftverével lehet beállítani.

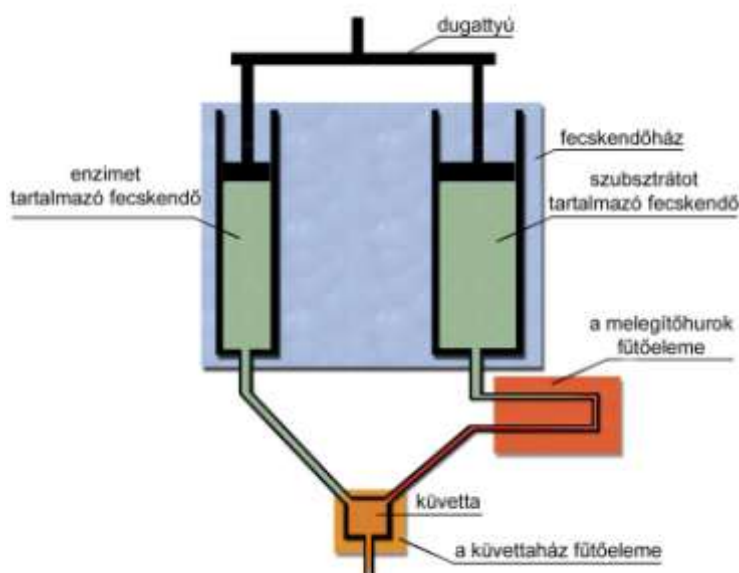
A tanszéki *stopped flow* készülékre három detektort szerelhetünk fel, a detektálás tehát egyszerre három csatornán történhet, például a két oldalsón két PMT-vel mérhetünk fluoreszcenciát, a gerjesztő fényel szemben pedig egy fotodiódával detektálhatunk fényszórást vagy abszorbanciát.

Az adatgyűjtés alapesetben a szervómotor leállásakor indul, de *pretrigger push* üzemmódban már a folyadék mozgásának megállása előtt is megkezdődhet a detektálás. Az adatok rögzítése történhet normál vagy logaritmusos időskálán, továbbá egy vagy két időtartomány megadásával. Az általunk használt készülékkel egy mérés során összesen 1000 adatpontot rögzíthetünk. Ezt két időtartomány alkalmazása esetén megoszthatjuk. Ez például akkor hasznos, ha olyan kétlépéses reakciót vizsgálunk, amelynél a sebességi állandók legalább egy nagyságrenddel eltérnek egymástól.

A stopped flow / temperature jump berendezés felépítése

Goldmann és Geeves módszerének hátránya az volt, hogy a mintát közvetlenül a mérési hőmérsékletre melegítette vagy hűtötte, még hozzá igen lassan. Ez drasztikusan megnövelte a holtidőt, és nem tett lehetővé nagy hőmérsékletugrást, mert ebben az esetben a fehérje denaturálódhatott volna, mire eléri a küvettát. Ha a *stopped flow* apparátust szeretnénk kiindulási alapnak használni, akkor valamilyen más módszerre van szükség a mérési hőmérséklet gyors eléréséhez. A TPM-eljárás, legyen bármennyire is jó egyedi molekulás mikroszkópos vizsgálatoknál, ebben az esetben értelemszerűen nem használható, hiszen a lézertfényel történő melegítés nem oldható meg, és az oldat fényszórását sem célszerű növelni. Ha a holtidő növekedését el akarjuk kerülni, mindenképpen olyan megoldásra van szükség, mely nem igényel plusz időt a kívánt hőmérséklet eléréséhez, és a lehető legerősebben támaszkodik magára a *stopped flow* gyorskeverési technikára. Az sajnos nem járható út, hogy az amúgy is termosztált fecskendőház hőmérsékletét növeljük, hiszen magas hőmérsékleten könnyen denaturálna a fehérje, mivel viszonylag hosszú ideig tartózkodik a fecskendőben. Ezekből a megállapításokból következik, hogy az elméletileg legtökéletesebb megoldás az, ha magával a keveréssel egyidejűleg történik meg a hőmérsékletugrás. Ez csakis úgy lehetséges, ha az egyik fecskendőben lévő oldat hőmérsékletét a mérési hőmérséklet fölé emeljük, miután elhagyta a fecskendőházat, a másikat pedig nem változtatjuk. Így a két, eltérő hőmérsékletű oldat az összekeveredéskor fogja elérni a mérési hőmérsékletet. Ha feltételezzük, hogy a két folyadék hőkapacitása nagyjából azonos, a keveredéskor kialakuló

végso hőmérséklet a magasabb és az alacsonyabb hőmérsékletnek az oldattérfogatokkal súlyozott átlaga lesz. 1:1 arányú keverést feltételezve bizonyos esetekben a mérési hőmérséklet csaknem duplájára kellene melegíteni az egyik fecskendőből jövő oldatot, ezért célszerű megváltoztatni a keverési arányt: a majdani fűtendő oldatot tartalmazó fecskendőt nagyobbra (esetünkben 1 ml-es helyett 5 ml-esre) kell cserélni. Ezzel a módosítással 1:5 keverési arány érhető el a melegebb oldat javára. Ennek köszönhetően nem szükséges drasztikusan a mérési érték fölé emelni egyik oldat hőmérsékletét sem. A hőérzékeny reaktánst (általában a fehérjét) abba a fecskendőbe kell tölteni, amelynek a hőmérsékletét nem emeltük meg, hiszen ez csak a keveredéskor fogja elérni a magas hőmérsékletet, közvetlenül a detektálás előtt. A nagyobb fecskendő miatt az egyik reaktánsból valamivel nagyobb mennyiségre van szükség, mint a hagyományos, 1:1 arányú elrendezésnél. Emellett számolni kell a nagyobb hígulással is, ezért a SF/TJ berendezés nagyobb fehérjekoncentrációt is igényel.



20. ábra: A stopped flow/temperature jump berendezés felépítésének vázlatos rajza.

Az ábrán jól látható a két újonnan beépített fűtőelem. A folyadék színe jelzi annak hőmérsékletét (narancssárga jelöli a mérési hőmérsékletet).

ez nem teljesülne, a fluorofór alacsonyabb vagy magasabb hőmérsékletű környezetbe kerülésekor bekövetkező fluoreszcenciaváltozást detektálnánk, nem pedig az általunk vizsgálni kívánt folyamatot. Ezért van szükség egy második fűtőelemre is, mely magát a küvettaházat melegíti.

A fűtőelemet tehát nem közvetlenül a küvetta elé kell helyezni, hanem az egyik fecskendő kivezetése és a keveredés helye közé. Ezáltal elérhető, hogy a holtidő gyakorlatilag változatlan maradjon a SF/TJ elrendezésben a stopped flow-hoz képest. Viszont a fluoreszcencia hőmérsékletfüggése miatt esszenciális, hogy a fecskendőkből jövő, eltérő hőmérsékletű oldatok keveredésekor kialakuló végso hőmérséklet megegyezzen a küvettaház hőmérsékletével. Ha

A 20. és 21. ábrán (fotó) jól látható minden, fent említett módosítás. A fűtőelemeket a Supertech Kft. készítette el a kívánságainknak megfelelően.



21. ábra: A stopped flow/temperature jump berendezés állványának fényképe.

Mindkét fűtőelem megfigyelhető a képen (bár a felsőt félig eltakarja a fecskendőház). A küvettaház hőszigetelő rétegét és a termométer szenzorát eltávolítottuk.

a környezetével. Ennek csökkentése érdekében vastag, hőszigetelő hungarocell lapokkal fedtük be a küvettaház szabad oldalait. Hasonló hőszigetelést készítettünk a hurkot melegítő fűtőelem számára is.

A küvettaházba beépítettünk egy termométert (Digital Multimeter TR-1667-A), melynek szenzorát a dióda számára kialakított nyíláson vezettük be a küvetta közelébe, így közvetlenül tudtuk mérni a küvetta hőmérsékletét. (Ez persze együtt jár azzal, hogy fényszórásos vizsgálatokat ebben az elrendezésben nem lehet végezni.) Természetesen gondoskodtunk róla, hogy külső forrásból származó fény ne kerülhessen be a küvettaházba. A termométer beépítése rávilágított arra a tényre, hogy a küvettaházban igen jelentős hőmérsékleti gradiens alakul ki: a ház aljára felszerelt fűtőelem nem képes arra a hőmérsékletre felfűteni a házat, amilyenre magát a fűtőelemet beállítottuk. A küvettaház hűlése jelentős, hiszen jó hővezető, és meglehetősen nagy felületen érintkezik

Modellrendszerek

Miozin II motordomén túltermeltetése *Dictyostelium* expressziós rendszerben

Az egytriptofános motordoménmutánst *Dictyostelium discoideum* eukarióta rendszerben expresszáltuk. Prokarióta rendszerben a miozinfrafragmentumok expressziója nem lehetséges a foldinghoz esszenciális dajkafehérjék hiánya miatt. A W501+ mutáns elkészítéséhez a pDXA/M761 plazmid volt a kiindulási konstrukció. Ez a motordomén első 761 aminosavát tartalmazza, módosított N- és C-terminálisokkal (utóbbin található az oktamer His-jelölés) (Málnási és mtsai, 2000). A W501+ konstrukcióba bevitt pontmutációk: W36F, W432F, W584F. A konstrukció elkészítése 2000-ben fejeződött be, ebben én nem vettem részt. Az expressziós rendszer beállítása megtörtént, a fehérje termeltetése azóta problémamentes.

A *Dictyostelium* expressziós rendszernek számos előnye mellett akadnak hátrányai is, melyek közül a legfontosabb a proteolitikus enzimek nagy koncentrációja a sejtekben. Ezek számos műtermék képződéséhez vezethetnek, melyek valószínűségét csak fokozzák a szokványos proteinanalitikai körülmények (SDS-kezelővel történő forralás stb.), mivel ezek megnövekedett proteázaktivitást eredményeznek. Ezért igen fontos, hogy a *Dictyostelium*-sejtek lízise a szokásosnál enyhébb körülmények között történjen, anélkül, hogy a lizoszómák megsérülneek. A túltermelt miozinfrafragmentumok további védelmét szolgálja, hogy alacsony celluláris ATP-koncentráció mellett komplexet képeznek az aktinnal, mely a nyálkagomba egyik leggyakoribb sejtfehérjéje. Az aktomiozin komplex jelenléte a miozin tisztítását is megkönnyíti (Manstein és Hunt, 1995).

Elektroforetikus technikák

SDS-poliakrilamid gélelektroforézis

5%-os koncentráció gél (2,5 ml):

- 422 µl 30% akrilamid (29% akrilamid + 1 % bisz-akrilamid),
- 312 µl 1M Tris-HCl (pH 6,8)
- 25 µl 10% SDS
- 8 µl cc. TEMED
- 25 µl 10% APS

- 1,75 ml desztillált víz

9 %-os futtató gél (5 ml):

- 1,5 ml 30% akrilamid (29% akrilamid + 1 % bisz-akrilamid),

- 1,85 ml Tris-HCl (pH 8,8)

- 50 µl 10% SDS

- 10 µl cc. TEMED

- 50 µl 10% APS

- 1,55 ml desztillált víz

Tankpuffer (1000 ml, 10x):

- 30,3 g Tris

- 144,0 g glicin

- 10 g SDS

SDS-kezelő (50 ml, 2x):

- 6,25 ml 1M Tris pH 7,4

- 5 ml glicerin

- 1 g SDS

- 2,5 ml ME

- 0,5 ml brómfenolkék

desztillált vízzel kiegészítve 50 ml-re.

Futtatás: 80-100 V, 20-30 mA

Festék (1000 ml):

- 2,5 g Coomassie R250

- 500 ml etanol

- 90 ml ecetsav

desztillált vízzel kiegészítve 1 l-re.

Festéktelenítő oldat (1000 ml):

- 500 ml etanol

- 90 ml ecetsav

desztillált vízzel kiegészítve 1 l-re.

A fehérje tisztítása

Pufferek, oldatok

10x PBS

- 1,4 M NaCl
- 27 mM KCl
- 101 mM Na₂HPO₄
- 18 mM KH₂PO₄

desztillált vízzel kiegészítve 1 l-re, pH 7,3.

Lysis Buffer

- 50 mM TrisHCl
 - 2 mM EDTA
 - 0,2 mM EGTA
 - 1-3 mM DTT
 - 5 mM benzamidin
 - 2000x PI (proteázinhibitor) mix
- pH 8,0.

PI mix

- 15 mg Pepstatin
 - 2 mg Leupeptin
 - 66 mg TPCK
 - 25 mg TLCK
 - 66 mg PMSF
- 1 ml DMSO-ban oldva.

Extraction Buffer

- 50 mM HEPES
- 30 mM Kac

- 10 mM MgAc
- 7 mM ME
- 5 mM benzamidin
- 40 µg/ml PMSF
pH 7,3.

Low Salt Buffer

- 50 mM HEPES
- 30 mM Kac
- 3 mM benzamidin
ph 7,3.

High Salt Buffer

- 50 mM HEPES
- 300 mM KAc
- 3 mM benzamidin
pH 7,3.

Assay Buffer

- 40 mM NaCl
- 10 mM HEPES
- 1 mM MgCl₂
pH 7,5.

A miozinfragmentumok tisztítása

A transzformált sejteket 7 percig 2700 rpm-mel centrifugáljuk. Hideg PBS-sel mossuk a pelletet, majd ismételt centrifugálás következik. A sejteket ezután lízispufferben vesszük fel. A sejtek nedves tömegének minden grammjához 4 ml lízispuffert adunk. A sejtekhez felszuszpendálásuk után grammonként további 2 ml lízispuffert adunk, mely 1% Triton-X100-at, 15 µg/ml RNáz-A-t és 100 egység alkalikus foszfátot tartalmaz. Ügyelni kell a Triton teljes feloldódására. A szuszpenziót vizes jégen szonikáljuk 10 percig, miután a szonikáló tűt jégen tartottuk pár percig. Szonikálás után ellenőrizni kell, maradtak-e intakt sejtek. Ha igen, további szonikálásra van szükség. Ezután ultracentrifuga-csővekbe töltjük a

lizátumot, és 3000 rpm-mel 45 percig fugáljuk. A felülúszót leöntjük, és a pelletet 60-100 ml extrakciós pufferrel mossuk át, majd további 45 percig fugáljuk 45000 rpm-mel. A felülúszót leöntjük. A miozin aktomiozin komplex formájában a pelletben marad, melyet 20 mM ATP-t és további 10 mM MgCl₂-ot tartalmazó extrakciós pufferben veszünk fel (a puffer pH-jának továbbra is 7,3-nak kell lennie). A pellet minden grammjához 1,6 ml puffert adunk, majd 60000 rpm-mel fugáljuk 1 órán át. Az ATP hatására a miozin disszociál az aktintól, és a felülúszóba kerül.

A felülúszót Ni²⁺-NTA oszlopra visszük, miután az oszlopot átmostuk 1 oszloptérfogatnyi *Low Salt Bufferrel*. Ebbe, és a továbbiakban minden további pufferbe is teszünk kevés benzamidint és merkapto-etanol. Az átfolyás sebessége körülbelül 1 ml/perc. Miután a felülúszó átfolyt az oszlopon, és kikötött rá a hisztidin-címkével jelölt miozin, az oszlopot 1 térfogatnyi *Low Salt Bufferrel*, majd 30-40 ml *High Salt Bufferrel*, végül ismét *Low Salt Bufferrel* mossuk (az utóbbi ekkor tartalmaz 10 % imidazol is). Ez leszedi az aspecifikusan megkötött fehérjéket. Az átfolyás sebessége 2 ml/perc. Addig szedünk frakciókat Bradford-reagensbe, míg az megőrzött barna színével jelzi, hogy nincs már kimutatható mennyiségű hulladékfehérje az oszlopon. Ezután 90% imidazol és 10 % *Low Salt Puffer* keverékével, 0,5 ml/perces folyási sebességgel lemoszuk az oszlopról a miozin motordomént.

A fehérjét egy éjszakán, de legalább hat órán keresztül dializáljuk *Assay Bufferrel*. A dialízist esetenként megismételjük, ezzel tovább csökkentve az imidazol koncentrációját.

Humán tripszinogén termeltetése *E. coli* expressziós rendszerben

A tripszinogén expressziója az SM138 jelzésű *E. coli* törzsben történt. A fehérjét mérésre kész állapotban kaptuk.

A spektrofotometriás mérések paraméterei

Fehérjekoncentráció meghatározása Bradford szerint

Kalibrálósor elkészítése: 1-1 ml Bradford-reagenshez rendre 5, 8, 11, 14, 17, 20 µl 0,785 mg/ml-es koncentrációjú BSA (*bovine serum albumine*)-oldatot adunk.

A detektálás 595 nm-en történik, az ismeretlen koncentrációjú fehérjeoldattal három párhuzamos mérést végzünk. A méréshez Shimadzu típusú spektrofotométert használtunk.

A SF/TJ mérések paramétere

Megjegyzés: a fűtőhurokkal a „C” jelzésű fecskendő van összeköttetésben.

A holtidő meghatározása

Gerjesztési hullámhossz: 280 nm

Slit: 5 nm / 5 nm

Használt filter: 340 nm-es interferenciaszűrő

Fecskendőház hőmérséklete: 20 °C

Puffer: Assay buffer pH 7,2

Áramlási sebesség: 18 ml/sec

Lövési térfogat: 120 µl

„A” fecskendő: 50, 25 mM NBS

„B” fecskendő: (üres)

„C” fecskendő: 20 µM NATA

Hőmérsékleti kalibrálás

Gerjesztési hullámhossz: 297 nm

Slit: 2 nm / 2 nm

Használt filter: 340 nm-es interferenciaszűrő

Fecskendőház hőmérséklete: 20 °C

Puffer: Assay buffer pH 7,2

Áramlási sebesség: 18 ml/sec

Lövési térfogat: 120 µl

„A” fecskendő: 20 µM NATA

„B” fecskendő: (üres)

„C” fecskendő: Assay buffer

Mérések a W501+ miozin motordoménmutáns

Gerjesztési hullámhossz: 297 nm

Slit: 2 nm / 2 nm

Használt filter: 340 nm-es interferenciaszűrő

Fecskendőház hőmérséklete: 20 °C

Puffer: Assay buffer pH 7,2

Áramlási sebesség: 18 ml/sec

Lövési térfogat: 120 µl

„A” fecskendő: 12 µM W501+

„B” fecskendő: (üres)

„C” fecskendő: 1,2 mM ATP

Mérések a humán tripszin IV-gyel

Gerjesztési hullámhossz: 365 nm

Slit: 0,5 nm / 0,5 nm

Használt filter: 420 nm-es cut-off filter

Detektálás: 445 nm

Fecskendőház hőmérséklete: 20 °C

Puffer: 100 mM-os foszfátpuffer pH 8,0

Áramlási sebesség: 8 ml/sec

Lövési térfogat: 120 µl

„A” fecskendő: 5 µM humán tripszin IV

„B” fecskendő: (üres)

„C” fecskendő: 35 µM MUGB

A módszer alkalmazhatósága

Első célkitűzésünk a SF/TJ készülék összeállítása volt. Ennek érdekében szét kellett szerelni a küvettaházat és a fecskendőházat. Az utóbbiból eltávolítottuk az egyik 1 ml-es fecskendőt, és beszereltünk helyette egy 5 ml-eset. Ezenkívül be kellett építenünk egy 54 μ l térfogatú csőszakaszt, mely összeköttetésben van ezzel a fecskendővel. Ennek a szakasznak a hőmérsékletét tudja szabályozni a melegítőhurok. A küvettaház aljára szintén felszereltük a fűtőelemet, és elhelyeztük a termométer szenzorát is. Ezután a küvettaházat hőszigetelő lapokkal borítottuk be.

A mérések megkezdése előtt a következő vizsgálatokat kell elvégezni a készülékkel:

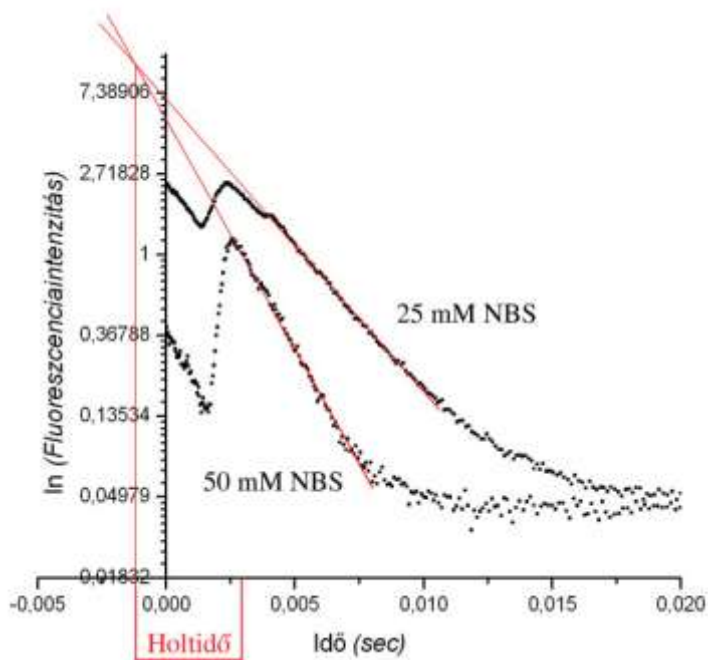
1. A holtidő meghatározása. Ellenőrizni kell, helyes-e az az elképzelésünk, hogy a holtidő nem változik ebben az összeállításban a hagyományos elrendezéshez képest.
2. Az optimális lövési térfogat beállítása. A melegítőhurok beépítésével megváltozott a *stopped flow* készülék csőrendszerének hossza, ami hatással van a lövési térfogatra.
3. Hőmérsékleti kalibráció. Meg kell állapítanunk, hogy milyen hőmérséklettartományt képes átfogni a fűtőrendszer, és egymáshoz kell igazítani a melegítőelemek hőmérsékletét, hogy kiküszöböljük a fluoreszcencia hőmérsékletfüggéséből származó műtermékek megjelenését.

Nagyon fontos, hogy minden, a mérések során használt oldatot felmelegített és légtelenített pufferrel készítsünk el. Ellenkező esetben a hőugrás megvalósításakor buborékok képződhetnek a folyadékban, mely műtermék képződéséhez vezet. Az oxigén eltávolítása ezenkívül a *bleaching* veszélyét is csökkenti, így a mérési eredmények reprodukálhatósága javul..

A holtidő meghatározása

A holtidő meghatározása pszeudo-elsőrendű körülmények között történik. A NATA és a hozzá nagy feleslegben adott (minimum 10-szeres koncentrációkülönbség) NBS reakciója kiválóan használható a holdidő megállapítására (Peterman, 1979). A reakció előrehaladtával a NATA fluoreszcenciája exponenciálisan csökken. Logaritmikus beosztású időskálán ez a fluoreszcenciacsökkenés egy egyenest ad, mely jól mutatja, hogy ebben az esetben

megvalósul a pszeudo-elsőrendűség feltétele. Az NBS koncentrációjának növelésével az egyenes meredeksége nő. A különböző koncentrációjú NBS-oldatokkal felvett egyenesek egy pontban metszik egymást a megfigyelés kezdete előtt. Az ettől a ponttól a megfigyelés kezdetéig eltelt idő adja meg a készülék holtidejét.



22. ábra: A holtidő meghatározása.

A lineáris szakaszokhoz illesztett extrapolált egyenesek metszéspontja megadja a reakció kezdőpontját, így megállapítható a műszer holtideje.

idő függvényében, a 22. ábrán látható képet kaptuk. A reakció lefutását a görbék lineáris szakaszai jelzik. Ezeket extrapolálva a megfigyelés kezdete előtti szakaszra, metszéspontjukban megkaptuk a reakció indulásának pillanatát. A lineáris szakasz kezdete és a fenti módon megállapított kezdőpont közötti idő adja meg a készülék holtidejét. Esetünkben ez körülbelül 3,8 milliszekundum lett. A „pozitív” időtartományban a 0-2,5 ezredmásodpercek között látható jel műtermék, amelynek okát egyelőre nem ismerjük.

Az optimális lövési térfogat beállítása

A konvencionális *stopped flow* készülék átépítésével megváltozott a fecskendőket a küvettházzal összekötő csőszakaszok hossza. A melegítő hurok 54 μ l-rel növeli meg a csőrendszer térfogatát, melyet a lövési térfogat növelésével kell kompenzálnunk. Rosszul

Esetünkben a NATA 20 μ M-os oldatát lőttük össze különböző koncentrációjú (25, illetve 50 mM) NBS-oldatokkal. Mivel az NBS szubsztrát hőérzékeny, a melegítő hurokkal ellátott fecskendőbe nem tölthető be. Éppen ezért oda a NATA került. Ügyelni kell arra, hogy a hígításoknál használt pufferoldat ne tartalmazzon merkaptó-etanol, mert az reagál a szubsztáttal.

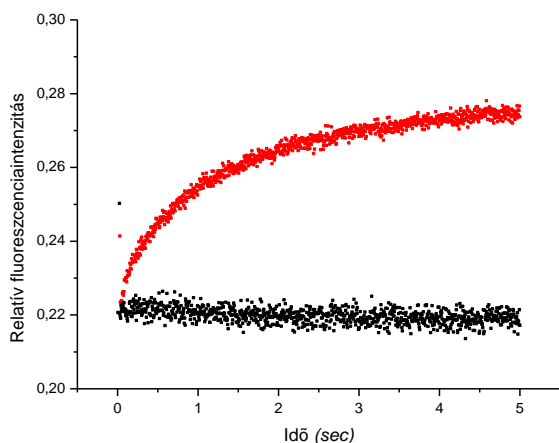
Az adatokat logaritmikus időbeosztású mintavételezéssel vettük fel. A kapott fluoreszcenciaértékek természetes alapú logaritmusát ábrázolva az

megválasztott lövési térfogat alkalmazásakor előfordulhat, hogy a szubsztrát nem jut el a küvettházig, illetve nem mosódik ki az előzőleg összelőtt oldat.

A megszokott 30 μ l-es lövési térfogat helyett esetünkben körülbelül 120 μ l-rel kell dolgozni, ennél kisebb térfogat alkalmazásakor ugyanis az előző lövésből származó jelet látjuk, ami a rendszer elégtelen átmosására utal.

Hőmérsékleti kalibrálás

Mint korábban említettem, a SF/TJ készülékkel történő mérések során csak akkor követhetjük a reakció előrehaladását a fluoreszcenciaintenzitás változásával, ha a küvetta kerülő oldatok keveredésekor kialakuló folyadék hőmérséklet megegyezik magának a küvetta hőmérsékletével. Ezért szükséges egymáshoz igazítani a két fűtőelem hőmérsékletét. Ha ugyanis a küvetta hőmérséklete alacsonyabb, mint a bele kerülő oldaté, akkor a folyadék lehül, és ez a fluoreszcenciaintenzitás emelkedését eredményezi. Ha a küvetta magasabb hőmérsékletű, akkor benne az oldat felmelegszik, és a fluoreszcenciás jel csökkenni fog. Ha pedig a két hőmérséklet azonos, nem lesz látható változás a fluoreszcenciaintenzitásban (23. ábra).



23. ábra: A NATA fluoreszcenciájának változása hidegebb és az oldattal azonos hőmérsékletű küvetta kerülve.

A vörös görbe mutatja az oldat lehülésével járó fluoreszcencianövekedést. A fekete görbét az oldat vele azonos hőmérsékletre temperált küvetta kerüléskor rögzítettük, ekkor nincs intenzitásváltozás. A két mérés közötti alapvonal-eltolódást kiküszöböltük.

A kalibrálás módja a következő volt: 20 μ M-os NATA-oldatot kevertünk össze Assay bufferrel, mely utóbbit a fűtőhurokkal felszerelt fecskendőbe töltöttük. Első lépésben a hurok hőmérsékletét beállítottuk az általunk kívánt értékre. A küvetta hurok fűtőelemét pedig úgy állítottuk be, hogy a küvetta hőmérséklete (melyet a termométer jelzett) megegyezzen az általunk kívánttal. Ehhez nagyjából 15 °C-kal magasabb hőmérsékletűre kellett állítani a küvetta hurok fűtő elemét. Ekkor néhány lövéssel ellenőriztük, történik-e hőmérsékletváltozás a küvetta hurok fűtőelemének hőmérsékletét ezután

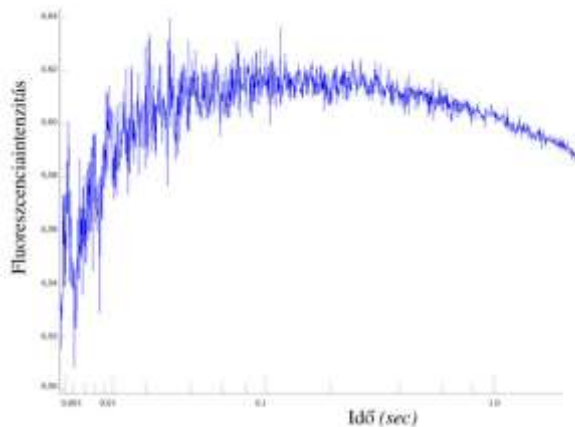
úgy állítottuk be (1 °C-onkénti változtatással), hogy a fluoreszcenciás jel ne változzon. Ez a finomhangolás ahhoz az empirikus tapasztalathoz vezetett, hogy a fűtőelemnek körülbelül egy fokkal kell magasabb hőmérsékletűnek lennie, mint a küvettának.

A következő lépésben ellenőriztük, hogy a fűtőelemekkel mekkora hőmérsékletet lehet elérni.

A küvettaházban mérhető maximális érték megközelítőleg 65 °C volt.

A modellrendszerek vizsgálata

W501+ miozin motordoménmutáns



24. ábra: A W501+ konstrukció fluoreszcencia-változása 50 °C-on, ATP hozzáadására.

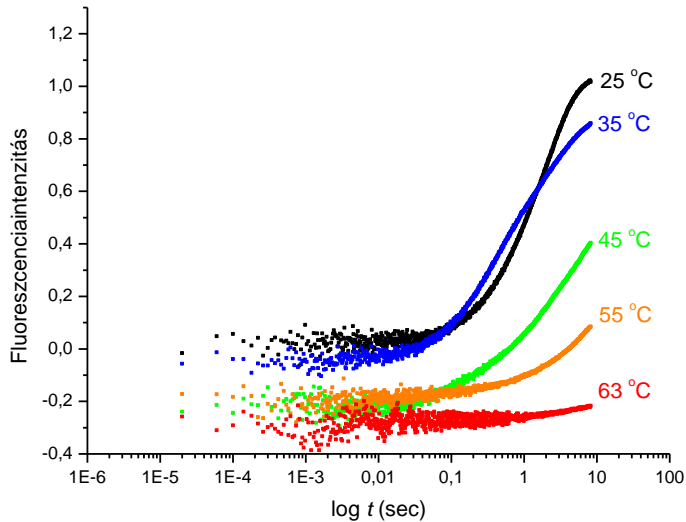
Jól látszik a fluoreszcenciaintenzitás emelkedése, mely a nyitott-zárt átmenettel van összefüggésben. Az 1 másodpercnél látható intenzitáscsökkenés oka a fehérje denaturációja.

nagyrésze a holtidő tartományába esik, és az emelkedésnek így csak az utolsó szakasza detektálható. A görbe következő szakaszára nagy meglepetésünkre kettős exponenciális illeszthető, két sebességi állandót kaphatunk (k_1 és k_2). A k_1 a nyitott-zárt átmenet látszólagos sebességi állandója.

Humán tripszin IV

A tripszinnel 25 és 63 °C között történtek mérések, megközelítőleg 10 fokonként. A vizsgálathoz használt szubsztrát, a MUGB nagy hátránya, hogy spontán hidrolizál, ezért

minden hőmérsékleten össze kell lőni a pufferrel is, hogy az így kapott adatokat levonhassuk a tripszinnel való reakció fluoreszcenciaértékeiből. Jelentős a *bleaching* veszélye is, ezért a lehető legkisebb résszélességet kell beállítani a monokromátoron.



25. ábra: A tripszin-MUGB reakció hőugrásos tranziensei 25 és 63 °C között.

A hőugrásos görbékre (25. ábra) kettős exponenciális illeszthető: egy gyors és egy lassú fázis különíthető el. Nagyon meglepő eredmény, hogy méréseink szerint 55 °C-on az első fázis döbbenetesen felgyorsul (a látszólagos sebességi állandó több nagyságrendnyit változik), mielőtt bekövetkezne a hődenaturáció. Ez a gyors fázis szinte elvész a holtidőben.

Diszkusszió

A holtidő megállapítása

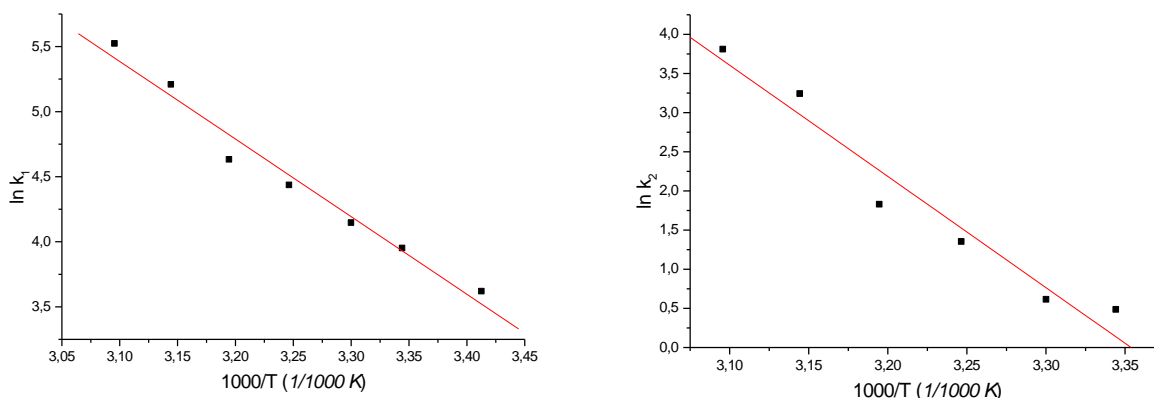
A SF/TJ összeállítás holtideje megközelítőleg 3,8 ms-nak bizonyult. A tanszéki KinTek SF-2004 készülék holtideje az átszerelés előtt is valamivel több, mint 3 ms volt. Ezzel bebizonyosodott, hogy az átépítés nem befolyásolta számottevően a műszer holtidejét.

A W501+ konstrukcióval kapott eredmények értelmezése

Az 24. ábrán látható görbe, melyet 50 °C-on regisztráltunk, tökéletesen igazolja előzetes várakozásainkat. Egyrészt maga a tény, hogy látunk fluoreszcenciaemelkedést, azt mutatja, hogy a fehérje csakugyan működőképes ilyen magas hőmérsékleten is. 1998-ban kalorimetriás módon meghatározták a miozin motordomén denaturálási hőmérsékletét, ami 45 °C-nak adódott (Levitsky és mtsai, 1998). Ez alátámasztotta korábbi ismereteinket, miszerint csakugyan lehetséges a denaturációs hőmérséklet fölötti hőmérséklettartományban mérni kinetikai paramétereket. Másrészt ezt az emelkedést a denaturációból származó intenzitáscsökkenés követi. Eszerint a denaturációnál gyorsabb reakciólépések módszerünk segítségével követhetők magas hőmérsékleten is.

A *burst* kimérését nem tudtuk elvégezni, bár ez is kivitelezhető a későbbiekben: a W501+ konstrukciót az ATP-vel történő reagáltatás után össze kell löni pufferrel is (természetesen a fecskendő alapos átmosása után). Ezzel jó közelítéssel megkaphatjuk azt a fluoreszcenciaszintet, amely a *burst* fázis kezdete volt. Terveink között szerepel ennek a mérésnek az elvégzése.

A motordomén vizsgálatával kapott eredményeink kétségkívül legérdekesebb része a kétfázisú emelkedés volt. A korábbi vizsgálatok egyértelműen igazolták, hogy csak egyetlen hőmérsékletérzékeny egyensúly perturbációjával kell számolni, és ez a nyitott-zárt konformációs átmenet. Ennek ellenére mégis sikerült kimérnünk egy második emelkedési fázist is. Ezt egyelőre nem tudjuk megmagyarázni, az irodalomban nincs utalás olyan fázisra, mely ennek megfeleltethető lenne (ez a fázis 20 °C-on szinte észrevehetetlen). Feltételezéseink szerint egy eddig ismeretlen instabil állapotról lehet szó, de nem zárható ki annak a lehetősége sem, hogy egy új, korábban rejtve maradt reakciólépést sikerült kimutatni.



26. ábra: a W501+ konstrukció ATP-vel adott tranzienseiből számolt látszólagos sebességi állandók Arrhenius-ábrázolása.

A bal oldali ábrán az első fázis hőmérsékletfüggése látható, mely a nyitott-zárt konformációs átmenetnek feleltethető meg. A jobb oldali grafikon az általunk detektált, eddig nem azonosított fázis hőmérsékletfüggését mutatja.

Meghatároztuk mindkét fázis sebességi állandóit 20 és 50 °C között, és elkészítettük ezek Arrhenius-ábrázolásait (26. ábra, a és b). A mérési adatok jól illeszkednek egy egyenesre. Meghatároztuk az egyes fázisok preexponenciális faktorát és látszólagos egyensúlyi szabadentalpiáját (ΔH_0) (I. táblázat).

Paraméter	1. fázis	2. fázis
Preexponenciális tényező (A)	$2,326 \cdot 10^{10} \text{ s}^{-1}$	$8,07 \cdot 10^{20} \text{ s}^{-1}$
Látszólagos egyensúlyi szabadentalpia (ΔH_0)	49,58 kJ/mol	119 kJ/mol

I. táblázat. A W501+ konstrukció hőugrásos megállított áramlásos vizsgálatával kapott termodinamikai paraméterek.

A humán tripszin IV-MUGB reakció eredményeinek értelmezése

A mérés kétségtelenül egyik legérdekesebb eredménye az volt, hogy 55 °C-nál a gyors fázis meglepően felgyorsult, ami 63 °C-on is jellemző maradt. Sajnos a műszer holtidejében szinte teljesen elvész egy ilyen gyors reakció, ezért ennek valódiságáról egyelőre nem vagyunk teljesen meggyőződve. Az eredmény értelmezése további kutatásokat igényel. Ha valós jelenségről van szó, nagyon izgalmas lenne a jelenség okának felderítése.

Emiatt a nagy, nehezen értelmezhető változás miatt eltekintek az 55 °C feletti tartományban mért adatok elemzésétől, és a 25-45 °C közötti tartományra koncentrálok. Az, hogy kettős exponenciálisan lehet illeszteni a hőugrásos görbékre, arra utal, hogy a tripszin IV MUGB szubsztráttal való reakciójában két hőmérsékletérzékeny lépést különíthetünk el. Adott hőmérsékleten a látott két fázis amplitúdójának aránya a gyors lépés egyensúlyi állandóját adja meg (K). A kapott látszólagos sebességi állandók valójában az adott lépés előre- és visszafelé irányuló reakciói sebességi állandóinak összege. Ezen adatok ismeretében ez a két érték kiszámítható, ezeket a II. táblázat tartalmazza.

T (°C)	k_+ (s ⁻¹)	k_- (s ⁻¹)
25,00	0,28	1,49
35,00	1,629	1,713
45,00	2,033	5,695

II. táblázat: A tripszin-MUGB reakció gyors lépésének számított sebességi állandói.

Mivel a számított paraméterekből felírható Arrhenius-ábrázolás törést mutat, a szubsztrátkötés feltehetőleg kétlépéses folyamat.

Ezek a mérési eredmények csak előzetes eredményeknek tekinthetők. Az adatok máris több, tisztázásra váró kérdést vetnek fel, ami arra utal, hogy ezzel a módszerrel csakugyan új távlatok nyílhatnak meg a gyorskinetikai vizsgálatokban.

Az általunk fejlesztett SF/TJ berendezés előnyei

1. A hőugrás ideje megegyezik a reaktánsok keverési idejével, így a mérőműszer holtideje nem növekszik számottevően. Ilyen egyedülálló előnnyel eddig egyetlen kombinált tranziens kinetikai műszer sem rendelkezett. Módszerünk legnagyobb jelentőségű újítása ez.
2. A konvencionális *stopped flow* berendezésekhez képest sokkal nagyobb effektív mérési hőmérséklettartomány érhető el. Ebből fakadóan nagyobb perturbáció valósítható meg, mely a reakciólépések pontosabb szeparálását és a reakció energetikájának precízebb meghatározását teszi lehetővé. Lehetségessé válhat új, korábban rejtve maradt reakciólépések, köztiállapotok felderítése.
3. Az elektromos impulzussal történő hőugrásos eljárásokkal szemben nagy előny, hogy alkalmazása nem igényel nagy ionerőt, amire egyébként a jó áram- és hővezetés miatt lenne szükség.

4. A mérések megismétlése roppant egyszerűen történhet (szemben néhány korábbi relaxációs technikával), ezáltal sokkal kedvezőbb jel-zaj arányt produkálhatunk.
5. Összeállításunk megtartja a megállított áramlásos technikák egyik igen fontos előnyét, a viszonylag (más módszerekhez képesti) kis anyagigényt.
5. A hőugrás alacsonyabb hőmérséklettartományok felé is megvalósítható (*cold jump*), amennyiben fűtésre és hűtésre egyaránt alkalmas elemeket applikálunk a készülékre.

Az általunk fejlesztett SF/TJ berendezés hátrányai

1. A módszer legfontosabb hátránya, hogy erősen hőérzékeny szubsztrátok nem használhatók a berendezésben. Ez a hátrány viszonylag alacsony hőmérsékleten végzett kis hőugrások esetén kiküszöbölhető azzal, hogy a másik reaktánst helyezzük a melegítőhurokkal ellátott fecskendőbe, ahogy azt a holtidő meghatározásánál tettük. (Hőérzékeny anyagokkal végzett tranziens kinetikai vizsgálatokra van a hőugrásnál optimálisabb megoldás is.)
2. Noha a módszer anyagigénye kicsi, mint arra az imént rámutattam, a módosítások miatt mégis valamivel nagyobb anyagmennyiséget igényel, mint a hagyományos elrendezésű *stopped flow* készülékek.
3. Dióda nem csatlakoztatható az általunk használt műszerre, ha a termométer be van építve. Ha mégis szeretnénk csatlakoztatni, akkor a termométert el kell távolítanunk. Ez abban az esetben nem veszélyezteti a mérés megbízhatóságát, ha rendelkezünk megfelelő hőmérsékletpárokkal, melyekből leolvasható, hogy a felső és az alsó fűtőelemeknek milyen hőmérsékletűeknek kell lenniük ahhoz, hogy a küvettába kerülő folyadék hőmérséklete megegyezzen a küvetta hőmérsékletével.

További tervek

A későbbi vizsgálatokhoz gondoskodni kell a küvettaház megfelelő hőszigeteléséről, mivel jelenleg 65 °C fölötti hőmérséklet elérése a nagy hőveszteség miatt nem lehetséges. (Ehhez is tartósan 90 °C-on kell tartani a fűtőelem hőmérsékletét.) Felmerülhet, hogy a fotoelektronszorzó hosszú távon nem bírja ezt a magas hőmérsékletet.

Az általunk fejlesztett SF/TJ kombinált technika rendkívül széleskörűen használható módszer. Kisebb hátrányaival szemben előnyei annyira általános jelentőségűek, hogy a kinetikai alap kutatásban szinte bármilyen konkrét enzim vizsgálatokor alkalmazható a technika, ha

hőmérsékletváltozással szelektíven perturbálható, nagyjából 1000 s^{-1} -nál lassabb reakciólépést ismerünk az enzimreakció során.

Van néhány terület, amelynek a vizsgálatát a közeljövőben tervezzük. Ezek közül a legjelentősebb a fehérjék termikus unfoldingjának tanulmányozása. A fehérjék térszerkezetének stabilitása, a natív szerkezet kialakulása és a denaturáció igen izgalmas kutatási területet jelent. Az inkább α -hélixekből álló fehérjék foldingjáról viszonylag pontos képünk van. A random láncban először megjelennek a szekunder szerkezeti magok. Ezután a majdani hidrofób magot alkotó aminosavak bekerülnek a kialakulóban lévő szerkezet középső részébe (hidrofób kollapszus), ahogy kizáródnak a proteint körülvevő általában poláris közegből. Ez a folyamat viszonylag gyorsan játszódik le. Ezután a korrekt másodlagos szerkezet valamivel lassabban alakul ki. A fehérje entrópiája és szabadenergiája a folding során egyre csökken, ahogy egyre mélyebbre jut az úgynevezett „folding-tölcsérben”. A főleg β -szerkezetből álló fehérjék foldingjáról azonban sokkal kevesebbet tudunk. Ebben az esetben ugyanis a szerkezeti kooperativitás miatt nem vehető biztosra, hogy a másodlagos szerkezet hamarabb jelenik meg, mint a harmadlagos.

A foldinggal kapcsolatos kérdések tisztázásának nagyon komoly orvosi jelentősége van, hiszen számos igen súlyos humán betegség (pl. cisztás fibrózis, enfizéma) kiváltó oka a hibás, illetve lassú feltekeredés.

A közeljövőben szándékunkban áll megvizsgálni a GFP termikus unfoldingját. E fehérje mechanikus unfoldingját egyedi molekulás mérésekkel már alaposan tanulmányozták (Dietz és Rief, 2004). Kísérleteinkben szeretnénk összevetni a két eltérő letekerési hatás kinetikáját. Ehhez *E. coli* rendszerben expresszáltattunk GST-GFT fúziós fehérjét, melyet glutation oszlopon tisztítottunk meg, majd a GST-t trombinnal lehasítottuk róla, így a fehérje készen áll a mérésekre.

Összefoglalás

A tranziens kinetikai vizsgálatok nagy segítséget nyújtanak az enzimek működési mechanizmusának megértéséhez. Ezen módszerek előnye, hogy a vizsgálni kívánt lépést szelektíven tudjuk követni.

A gyorskinetikai vizsgálati módszerek két nagy csoportját alkotják a gyorskeverési és a relaxációs technikák. Célunk az volt, hogy e két metodika egyesítésével egy új, széleskörűen alkalmazható, komplex mérőműszert állítsunk össze.

Kifejlesztettünk egy új megállított áramlásos/hőugrásos eljárást, mellyel az enzimek denaturálási hőmérséklete fölött is lehet tranziens kinetikai méréseket végezni. Ez a módszer lehetővé teszi, hogy a hőugrást milliszekundumos időtartam alatt valósítsuk meg, a reaktánsok összekeverésével egyidejűleg. Ezáltal a készülék holtideje nem növekszik számottevően, ami a jelenleg ismert kombinált tranziens kinetikai eljárások között egyedülálló. A hődenaturáció másodperces időtartományban válik jelentőssé, így, ha a hőmérsékletet az enzim denaturálási hőmérséklete fölé emeljük, mindazok a reakciók követhetőek maradnak, melyek a hődenaturációnál gyorsabbak.

Az új eljárást két modellrendszer felhasználásával teszteltük: a *Dictyostelium* sejtes nyálkagomba miozin II ATP-áz reakciója egyik lépésének és a tripszin IV-nek a vizsgálatával. Előzetes eredményeink rámutattak, hogy a miozin nyitott-zárt átmenete után felfedezhető egy új, eddig nem azonosított, hőmérsékletérzékeny instabil állapot.

Summary

Transient kinetic studies are useful tools to understand enzyme functions. The advantage of these manners is the specific following of the desired reaction step.

Rapid mixing and relaxation techniques are the two main groups of fast kinetic methods. Our goal was to combine these two approaches and assemble a new, universal complex measuring instrument.

We have developed a novel stopped flow / temperature jump method to measure enzyme transient kinetics at high temperature even above denaturation temperature of enzymes. This method enables us to increase the temperature in a millisecond time scale parallel with mixing of the reactants so dead time does not increase significantly which is unique among currently used combined transient kinetic techniques. Heat denaturation normally occurs in a second time scale. If the temperature is increased above the enzyme denaturation temperature, essentially all of the events can be followed that are faster than heat denaturation reaction.

We have tested the new method on cellular slime mold *Dictyostelium* myosin ATPase reaction and human trypsin IV vs. MUGB substrate reaction. Our preliminary data show that there is a temperature-sensitive unstable state – not identified so far – in the myosin ATPase cycle following the *open-closed* conformational transition.

Irodalomjegyzék

Bagshaw, C. R., and Trentham, D. R. (1974) The characterization of myosin-product complexes and of product-release steps during the magnesium ion-dependent adenosine triphosphatase reaction. *Biochem J* 141, 331

Bagshaw, C. R., Eccleston, J. F., Eckstein, F., Goody, R. S., Gutfreund, H., and Trentham, D. R. (1974) The magnesium ion-dependent adenosine triphosphatase of myosin. Two-step processes of adenosine triphosphate association and adenosine diphosphate dissociation. *Biochem J* 141, 351

Batra, R., Manstein, D. J., (1999) Functional characterisation of Dictyostelium myosin II with conserved tryptophanyl residue 501 mutated to tyrosine. *Biol Chem* 380(7-8):1017-23

Dietz, H., Rief, M. (2004) Exploring the energy landscape of GFP by single-molecule mechanical experiments. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 101(46):16192-97

Geeves, M. A., Holmes, K. C. (1999) Structural mechanism of muscle contraction. *Ann Rev Biochem* 68:687-728

Goldmann, W. H., and Geeves, M. A. (1991) A „slow” temperature jump apparatus built from a stopped-flow machine. *Anal Biochem* 192(1):55-8

Guy, O., Lombardo, D., Barelt, C. B., Amic, J., and Figarella, C. (1978) Two human trypsinogens. Purification, molecular properties, and N-terminal sequences. *Biochemistry* 17, 1669-1675

Instruction Manual: Stopped-Flow Model SF-2004, KinTek Corporation, 2004.

Johnson, K. A., Taylor, E. W. (1978) Intermediate states of subfragment S1 and actosubfragment 1 ATPase: Reevaluation of the mechanism *Biochemistry* 17, 3432-42

Kato, H., Nishizaka, T., Iga, T., Kinoshita, K. Jr., Ishiwata, S. (1999) Imaging of thermal activation of actomyosin motors. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 96(17):9602-6

Katona, G., Berglund, G. I., Hajdu, J., Gráf, L., Szilágyi, L. (2002) Crystal structure reveals basis for the inhibitor resistance of human brain trypsin. *J. Mol. Biol.* 315:1209-18

Kawaguchi K., Ishiwata, S. (2001) Thermal activation of single kinesin molecules with temperature pulse microscopy. *Cell Motil Cytoskeleton* 49:41-47

Kraut, J. (1977) Serine proteases: structure and mechanism of catalysis. *Ann Rev Biochem*, 46, 331-358.

Lakowicz, J. R. (1999) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Kluwer Academic Publishers, Norvell, MA

Levitsky, D. I., Ponomarev, M. A., Geeves, M. A., Shnyrov, V. L., Manstein, D. J. (1998) Differential scanning calorimetric study of the thermal unfolding of the motor domain fragments of *Dictyostelium discoideum* myosin II. *Eur J Biochem* 251(1-2):275-80.

Málnási-Csizmadia, A., Pearson, D. S., Kovács, M., Woolley, R. J., Geeves, M. A., Bagshaw, C. R. (2001) Kinetic resolution of a conformational transition and the ATP hydrolysis step using relaxation methods with a *Dictyostelium* myosin II mutant containing a single tryptophan residue. *Biochemistry* 40(42): 12727-37

Málnási-Csizmadia, A., Woolley, R. J., Bagshaw, C. R. (2000) Resolution of conformational states of *Dictyostelium* myosin II motor domain using tryptophan (W501) mutants: Implications for the open-closed transition identified by crystallography. *Biochemistry* 39(51):16135-46

Manstein, D. K., Hunt, D. M. (1995) Overexpression of myosin motor domains in Dictyostelium: screening of transformants and purification of the affinity tagged protein. *J Muscle Res Cell Motil* 16(3):325-32

Nyaruchucha, C. N. M., Kito, M., and Fukuoka, S. (1997) Identification and expression of the cDNA-encoding human mesotrypsin(ogen), an isoform of trypsin with inhibitor resistance. *J Biol Chem* 272, 16, 10573-78.

Peterman, B. F. (1979) Measurement of the dead time of a fluorescence stopped-flow instrument. *Anal Biochem* 93, 442-44

Rinderknecht, H., Renner, I. G., Abramson, S. B., Carmack, C. (1984) Mesotrypsin: A new inhibitor-resistant protease from a zymogen in human pancreatic tissue and fluid. *Gastroenterology* 86(4):681-92

Sasaki, N., Shimada, T., and Sutoh, K.: Mutational analysis of the switch II loop of Dictyostelium myosin II. *J Biol Chem* 273, 20334 (1998)

Scheidig, A. J., Hynes, T. R., Pelletier, L. A., Wells, J. A. and Kossiakoff, A. A. (1997) Crystal structures of bovine chymotrypsin and trypsin complexed to the inhibitor domain of Alzheimer's amyloid beta-protein precursor (APPI) and basic pancreatic trypsin inhibitor (BPTI): engineering of inhibitors with altered specificities. *Prot. Science* 6, 1806-1824.

Stryer et al: Biochemistry. Fifth Edition, 2002. W. H. Freeman ISBN 0716746840

Wakelin, S., Conibear, P. B., Woolley, R. J., Floyd, D. N., Bagshaw, C. R., Kovács, M., Málnási-Csizmadia, A. (2002) Engineering Dictyostelium discoideum myosin II for the introduction of site-specific fluorescence probes. *J Muscle Res Cell Motil* 23:673-83

Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani szüleimnek, Simon Bálintnak és Pápai Editnek. Nem hiszem, hogy valaha meg fogom tudni hálálni nekik azt a végtelenül sok segítséget, amit kaptam tőlük.

Nagyon hálás vagyok témavezetőmnek, Dr. Málnási-Csizmadia Andrásnak segítségéért, támogatásáért, szemléletmódjáért, és azért, hogy velem dolgozhattam.

Ugyanígy köszönettel tartozom Prof. Gráf László tanár úrnak, hogy itt dolgozhattam a Biokémiai Tanszéken.

Szeretném megköszönni Dr. Hegyi György tanár úrnak az új készülék összeállítása során felmerült problémák megoldásában nyújtott rengeteg segítségét.

Köszönöm Tóth Júliának és Gombos Lindának, hogy rendelkezésemre bocsátották mérési adataikat, és megosztották velem tudásukat.

Hálás vagyok Gyimesi Máténak és Jelinek Balázsnak a segítségükért, biztatásukért.

Mindazokon kívül, akiket itt név szerint felsoroltam, még igen sokan segítettek a tanszéken belül és kívül kisebb-nagyobb gondjaim megoldásában. Mindannyiuknak igen hálás vagyok.