

Segédlet az aminosavak, fehérjék c. anyagrészhez

(2001 január; dr. Csermely Péter, egyetemi tanár)

I. Az “aminosavak, fehérjék” c. anyagrészhez kapcsolódó kötelező tananyag

Ádám V., Faragó A., Machovich R., Mandl J.: Orvosi Biokémia (szerk.: Ádám V.) tankönyv 1.1. fejezete az itt leírt kiegészítésekkel.

II. Ajánlott irodalom

(a vizsgán megköveteltnél részletesebb ismereteket kereső, érdeklődő hallgatók számára; a hivatkozott cikkeket közlő folyóiratokat a Semmelweis Egyetem Általános Orvostudományi Karának kari könyvtárában és az Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Pathobiokémiai Intézet könyvtárában lehet megtalálni)

1. Anfinsen, C.B. (1973) Principles that govern folding of protein chains. Science, 181. kötet, 223-230 old.
2. Chothia, C. (1984) Principles that determine the structure of proteins. Annual Reviews of Biochemistry, 53. kötet, 537-572. old.
3. Csermely P. (2001) Stresszfehérjék, Vince kiadó, Tudomány-Egyetem sorozat, megjelenik: április elején
4. Hartl, F.-U. (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. Nature 381. kötet, 571-580. old.
5. Bukau, B. és Horwich, A.L. (1998) The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. Cell 92. kötet, 351-366. old.

III. Vázlat

- az aminosavak néhány fontosabb tulajdonsága (aminosavak, mint fehérjealkotó molekulák, aminosavak töltésviszonyai, izoelektromos pontja, nem fehérjealkotó aminosavak)
- néhány fontosabb biológiai aktivitással bíró peptid (inzulin, glukagon, oxitocin, vazopresszin, pro-opiomelanokortin peptidcsalád)
- a fehérjék elsődleges szerkezetének meghatározása (Edman lebontás, az elsődleges szerkezetből nyerhető információk: másodlagos, harmadlagos szerkezet jóslása, a fehérjemolekula elhelyezkedése a sejten belül, a fehérje stabilitása, a fehérjefunkció szabályozása, lehetséges enzimaktivitások)
- a fehérjék szerkezete (fehérjedomének; moduláris evolúció)
- a fehérjeszerkezetet kialakító erők (diszulfid hidak, H-híd kötések, sóhidak, van der Waals kötés, hidrofób kölcsönhatások)
- a fehérjeszerkezet kialakulása *in vitro* (a kezdeti gyors lépések, az olvadt gombóc köztes állapot, a záró, sebességhatározó lépések)

- a fehérjeszerkezet kialakulásának termodinamikai viszonyai (entalpiaváltozás, entrópiaváltozás, szabadentalpiaváltozás, aktív helyek a fehérjéken belül)
- különbségek a fehérjeszerkezet kialakulása között *in vitro* és *in vivo*
- molekuláris chaperonok (másnéven dajkafehérjék, vagy hő-sokk fehérjék: protein diszulfid izomeráz, peptidil-prolil-cisz/transz izomeráz, a dajkafehérjék fehérjefelismerésének alapjai, működésük mechanizmusa)

IV. Részletes kifejtés

1. Az aminosavak néhány fontosabb tulajdonsága

Aminosavak, mint fehérjealkotó molekulák. A fehérjealkotó aminosavak közös szerkezeti elemei, az α -amino és α -karboxil csoportok a tankönyvben ismertetett módon egymással peptidkötést képeznek. A peptidkötések a fehérjék szerkezetének alapvázát teremti meg. A fehérjeszerkezet egyediségét azonban az adott fehérjét felépítő aminosavak oldalláncai határozzák meg. Oldalláncaik szerint az aminosavak polárosak (pl. a neutrális pH-n az oldalláncában is töltéssel bíró glutaminsav, vagy lizin, illetve az oldalláncában töltéssel nem rendelkező, de poláros szerin, vagy glutamin), vagy apolárosak (pl. valin, izoleucin) lehetnek. A poláros aminosavak vizes közegben általában a fehérjék külső részén, az apoláros oldalláncúak pedig a fehérjék belsejében helyezkednek el. A cisztein SH csoportjaival diszulfidhidakat tud képezni, és ezzel stabilizálhatja a fehérjék szerkezetét. Hasonlóan a fehérjeszerkezetet merevítő hatása van a prolinnak, amely gyűrűs szerkezete miatt a polipeptidlánc forgási képességét erőteljesen csökkenteni képes. Ezzel ellentétben a legegyszerűbb aminosav, a glicin igen kis oldallánca miatt hajlékonnyá teszi az őt tartalmazó fehérjerészletet. Az aminosavak közül egyedül a hisztidin rendelkezik olyan funkciós csoporttal, amely a fiziológiás pH közelében disszociál (ld. 1. Táblázat). Emiatt a hisztidint igen gyakran találjuk olyan enzimek katalitikus helyén, amelyek protonátmenettel járó reakciókat (pl. hidrolízis) katalizálnak. A különböző fehérjék működését a sejtben a leggyakrabban poszttranszlációs módosítások szabályozzák. A szerin, threonin és tirozin oldalláncok foszforilációja ilyen szabályozófolyamatok alapját képezi. A fehérjealkotó aminosavak (a glicin kivételével, amely optikailag nem aktív) L konfigurációjúak. A két aszimmetriacentrumot is tartalmazó izoleucin és threonin esetén a diasztereomeria jelensége is felléphet. Az aminosavak kiralitásának a szerves kémiában megtanult (és a Bioorganikus Kémia jegyzetben leírt) ismeretek alapján történő részletes ismertetésére a gyakorlatokon kerül sor.

Aminosavak töltésviszonyai. Az α -aminocsoport gyenge bázisként, az α -karboxilcsoport pedig gyenge savként viselkedik. Ha összehasonlítjuk a pK értékeiket (ld. 1. Táblázat) az ecetsavével ($pK = 4,8$), vagy az amino-metánéval ($pK = 10,6$) megállapíthatjuk, hogy az α -aminocsoport nitrogénjének elektronvonzó hatása a szomszédos karboxilcsoport disszociációképességét (savasságát) megnöveli, ezzel szemben a karboxilcsoport oxigénjeinek és pozitív résztöltésű szénatomjának elektronvonzó hatása az aminocsoport elektrongazdagságát (protonvonzó képességét, bázicitását) pedig lecsökkenti a szubsztituálatlan molekulákhoz képest. Az aminosavak titrálási görbéi a pufferekről és a

1. Táblázat: Aminosavak izoelektromos pontja, savas és bázikus csoportjaik pK értékei

Aminosav	pI	pK _α COOH	pK _α NH ₂	pK ₃
glicin (Gly, G)	5,97	2,34	9,60	
alanin (Ala, A)	6,00	2,32	9,69	
valin (Val, V)	5,96	2,32	9,62	
leucin (Leu, L)	6,02	2,36	9,60	
izoleucin (Ile, I)	5,98	2,36	9,68	
szerin (Ser, S)	5,68	2,21	9,15	
treonin (Thr, T)	6,16	2,71	9,62	
cisztein (Cys, C)	5,02	1,71	10,78	8,27 (-SH)
metionin(Met, M)	5,74	2,28	9,21	
fenilalanin (Phe, F)	5,48	1,83	9,13	
tirozin (Tyr, Y)	5,66	2,20	9,11	
triptofán (Trp, W)	5,89	2,38	9,39	
prolin (Pro, P)	6,30	1,99	10,60	
aszparaginsav (Asp, D)	2,77	1,88	9,60	3,65 (β-karboxil)
glutaminsav (Glu, E)	3,22	2,19	9,67	4,25 (γ-karboxil)
lizin (Lys, K)	9,74	2,18	8,95	10,53 (ε-amino)
arginin (Arg, R)	10,76	2,17	9,04	12,48 (guanidin)
hisztidin (His, H)	7,59	1,82	9,17	6,00 (imidazol)

többértékű savak (pl. foszforsav) titrálási görbéiről tanultak alapján történő részletes ismertetésére a gyakorlatokon kerül sor.

Az aminosavak, peptidek, fehérjék *izoelektromos pontja* az a pH, amelyen az adott molekula töltéseinek összege nulla. Az izoelektromos pontot annak a két pK értéknek a számtani közepe adja meg, amely az adott aminosav +0,5, illetve -0,5 töltéssel jellemezhető formájához tartozik. Az aminosavak adott pH-án jellemző töltésének meghatározásához érdemes az egyik pH extrémumból (erősen savas, vagy lúgos közeg) kiindulva az aminosav töltésváltozásait nyomon követnünk. Vegyük példaként a glutaminsavat. 1-es pH-án mind az α-, mind pedig a gamma-karboxilcsoportja protonáltan, azaz semleges formában fordul elő. Az α-aminocsoport is protonált, amely a molekula egészének egy pozitív töltést kölcsönöz. pH 2,2-nél (az α-karboxilcsoport pK értékével megegyező pH-án, ld. 1. Táblázat) az α-karboxilcsoport felerészben már elvesztette a protonját, így a molekula össztöltése +0,5. A gamma-karboxilcsoport pK értékével megegyező pH-án, pH 4,2-nél az α-karboxilcsoport már teljesen a gamma-karboxilcsoport viszont még csak felerészben disszociált, amely (az α-aminocsoport pozitív töltésével együtt) az egész molekulának -0,5 töltést kölcsönöz. Így a glutaminsav izoelektromos pontja e két pK érték számtani közepe, azaz 3,2 lesz. 3,2-es pH-n tehát a glutaminsav össztöltése nulla, hiszen a gamma-karboxilcsoport még számottevően nem disszociált, az α-karboxilcsoport viszont már igen, és ez utóbbi negatív töltése kiegyenlíti az α-aminocsoport pozitív töltését. (Pontosabb megközelítésben a gamma karboxilcsoportnak az izoelektromos ponton bekövetkező kb. 10 %-os disszociációját, az ezen a pH-n még kb. 10 %-nyi asszociálva maradt α-karboxilcsoport egyenlíti ki.) Az aminosavak titrálási görbéinek

felvételére és az amino, illetve a karboxilcsoportok kémiai reakcióinak a szerves kémiai ismeretek alapján történő áttekintésére a gyakorlatokon kerül sor.

Nem fehérjealkotó aminosavak. A tankönyv 1-1. ábrája a fehérjealkotó 20 aminosav képletét és osztályozását foglalja össze. E mellett számos olyan, biológiailag fontos aminosavat ismerünk, amelyek nem fordulnak elő fehérjékben. Ilyen például a koenzim A részét képező β -alanin ($\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$), az ingerületátvitelben fontos szerepet betöltő gamma-amino-vajsav (GABA, ld. a tankönyv 214. oldala), vagy az urea ciklusban szerepet játszó ornitin és citrullin (képletüket ld. a tankönyv 205. oldalán). A fehérjealkotó aminosavak dekarboxileződésével biológiailag igen hatékony *biogén aminok* jönnek létre, mint pl. a hisztidinből keletkező hisztamin (ld. a tankönyv 215. oldala). A tirozinból több szintetikus lépéssel számos katekolamin így a dopamin, a noradrenalin és az adrenalin szintetizálódik (ld. a tankönyv 427. oldala). Triptofánból pedig szerotonin keletkezik a tankönyv 212. oldalán ismerttetettek szerint.

A *biológiailag fontos peptidek* közül az inzulin, az oxitocin, a vazopresszin, és a pro-opiomelanokortin peptidcsalád vázlatos szerkezetét mutatom be az 1. ábrán. A bemutatott képletek alapján néhány általánosítást is tehetünk. A biológiailag hatékony peptidek, peptidhormonok szintézise igen gyakran egy prekursor számos egymástkövető proteolitikus hasításával megy végbe (lásd pl. pro-opiomelanokortinok, inzulin és az 1. ábrán nem bemutatott glukagon). A peptidhormonokban igen gyakran találunk diszulfid-hidakat. Ennek az az oka, hogy a kisméretű peptidek önmagukban csak ritkán képesek stabil szerkezetet kialakítani. A szerkezetük stabilizálását az inzulin, az oxitocin és a vazopresszin esetében a diszulfid hidak biztosítják. Más biológiailag aktív peptidek (pl. az antibiotikum hatású bacitracin, gramicidin és valinomycin) ciklizálódással, vagy (pl. az immunszuppresszív ciklosporin esetén) néhány peptidkötésük nitrogénjének metilezésével növelik meg szerkezeti stabilitásukat.

2. A fehérjék elsődleges szerkezetének meghatározása

A fehérjék elsődleges szerkezetének (aminosav sorrendjének, aminosav szekvenciájának) meghatározására alapvetően két módszer, két megközelítés ismeretes. E módszerek közül az első már évtizedek óta ismert, részletesebb tárgyalására tehát nem újdonsága miatt, hanem a tankönyv kiegészítéseként kerül sor. A *direkt* fehérjeszekvenálás során a tiszta (más fehérjeszennyeződésektől elválasztott, izolált) fehérjét alkalmasan választott proteáz vagy kémiai reakció segítségével darabokra hasítjuk és az így kapott peptidek aminosav sorrendjét aminosav-szekvenátorral meghatározzuk. A szekvenátor működése az *Edman-lebontás*on alapul (ld. 2. ábra). Az Edman-lebontás lépéseit nem megtanulandó tananyagként, hanem kiegészítő ismeretként közlöm.

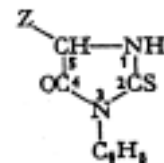
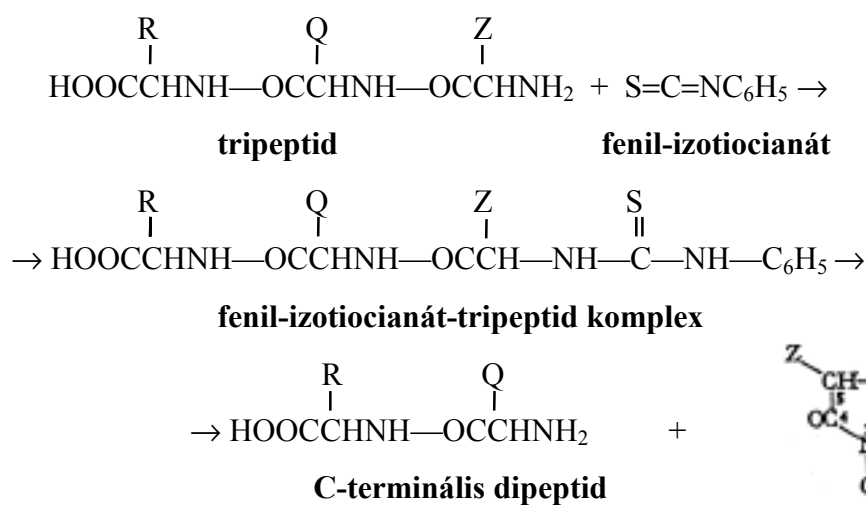
Az inzulin kialakulása

humán oxitocin

humán vazopresszin (Arg⁸-vasopresszin, AVP)

A pro-opiomelanokortin (POMC) prekursorból keletkező peptidek

1. ábra: Az inzulin, az oxitocin, a vazopresszin, és a pro-opiomelanokortin peptidcsalád vázlatos szerkezete



fenil-tiohidantoin származék

2. ábra: Az Edman-lebontás lépései

Az Edman-lebontás során a kiválasztott (és pl. magasnyomású folyadékkromatográfia, HPLC segítségével izolált) peptid N-terminális szabad aminosav-csoportjával fenil-izotiocianát lép reakcióba és az N-terminális aminosav fluoreszcens gyűrűs termék (ú.n. fenil-tiohidantoin származék) képződése közben a peptidről leszakad. Újabb HPLC analízis segítségével a képződött N-terminális aminosav-származék azonosítható. Ezzel párhuzamosan az eredeti peptid N-terminális melletti aminosaván egy szabad α -amino csoport képződik, amely újabb molekula fenil-izotiocianáttal reagálva a második aminosav leszakadását segíti elő. A reakció korlátlan ismételtetőségének (és így korlátlan számú aminosav sorrendje felderítésének) az szab gátat, hogy az Edman lebontás nem 100 %-os hatásfokkal megy végbe. Így a második aminosav leszakadásával párhuzamosan az első aminosav maradéka is levál. Könnyen belátható, hogy a sokadik aminosav reakciója esetén az éppen távozó aminosavak keverékéből nehéz megállapítani, hogy melyik is lehet az, amelyik legutóbb távozott.

Az Edman lebontás (és az e reakciót automatizáló aminosav-szekvenátor) csak 10-20 (különleges esetben 60-80) aminosavból álló peptid szekvenciájának meghatározására alkalmas. Emiatt van szükség arra, hogy a fehérjéket akkora darabokra (peptidekre) hasogassuk, amelyek szekvenciáját az Edman lebontással már végig meg tudjuk határozni. A direkt fehérjeszekvenálás azonban nem ér véget azzal, hogy a fehérjéből kapott összes peptid aminosav sorrendjét meghatározzuk, hiszen nem tudjuk, hogy milyen sorrendben voltak az egyes peptidek az eredeti fehérjén belül. A kirakósjátékhoz (puzzle-hoz) hasonló fejtörő megoldása úgy lehetséges, ha az eredeti fehérjét egy más módszerrel is felhasogatjuk, és a kapott peptidek aminosav sorrendjét ismét meghatározzuk. Ezen új, átfedő peptidek tartalmazni fogják az eredeti hasítási helyeket és így szekvenciájukból az eredeti peptidek egymás utáni sorrendje meghatározható.

A fentiekből látható, hogy a direkt fehérjeszekvenálás elég hosszadalmas. Még nagyobb hátránya, hogy nagyobb mennyiségű (ez mg-ot jelent!) tiszta fehérjét igényel. Mivel a szervezetben, sejtjeinkben nagyobb mennyiségben előforduló fehérjék aminosav sorrendje már ismert, mára azon fehérjék szerkezetének felderítése maradt, amelyekből csak igen hosszadalmas (akár évekig tartó) munkával, rendkívül sok kiindulási anyag felhasználásával lehetne csak mg-nyi mennyiséget tisztítani. Így a direkt szekvenálást többnyire csak igen rövid, 10 kDa-nál kisebb fehérjék aminosav sorrendjének megállapítására alkalmazzák. Az utóbbi néhány évben a tömegspektrometriás eljárások fejlődése a szekvenáláshoz szükséges anyagmennyiséget jelentősen lecsökkentette, így az aminosav-analízisen alapuló szekvenciameghatározás ismét fellendülőben van.

A direkt szekvenálás nehézségei miatt a nyolcvanas évektől a fehérjék szerkezetét az őket *kódoló DNS szerkezetének analízisével* (a fehérjét kódoló génszakasz nukleotidsorrendjének felderítésével) vizsgáljuk. A folyamat lépéseinek részletes tárgyalására a félév második felében kerül sor, (ld. tankönyv 3.5. fejezete) most csak egy rövid vázlatot írok le, amely jelzés jellegű. A kiindulási anyag itt is az izolált fehérje, de ehhez az eljáráshoz elég csupán néhány mikrogramm belőle. A fehérjét az előző módszerhez hasonlóan feldaraboljuk, és a kapott peptideket Edman-lebontással szekvencia-analízisnek vetjük alá. A fehérje peptid darabjának ismeretében a kísérletes munka sok esetben véget is ér, hiszen pl. ha a fehérjék tartalmazó baktérium genomja ismert, elég a fehérjét kódoló nukleinsav-szakaszt a genomból visszakeresni. Ha helyzetünk nem ilyen kényelmes, a fehérje néhány peptidje

aminosav sorrendje alapján szintetikusán előállítjuk a peptidet kódoló nukleotidszakaszt, majd a tankönyv 3.5. fejezetében ismertetett molekuláris biológiai módszerekkel megkeressük és felszaporítjuk az adott gént, és végül meghatározzuk a gén nukleotidsorrendjét. A nukleotidsorrendből a kódszótár alapján az aminosav sorrend visszakövetkeztethető.

3. Mit lehet megtudni a fehérjék aminosav sorrendjéből?

3.1.

Mindent. Mint később látni fogjuk, a fehérjék aminosavsorrendje szinte teljesen meghatározza szerkezetüket és tulajdonságaikat. Ismereteink, módszereink gazdagodásával (pl. a humán genom meghatározásával) hamarosan elérünk egy olyan szintre, ahol egy új fehérje “jellemrajza” a korábban felderített fehérjék szerkezetével való hasonlóságai alapján pusztán az aminosav sorrendje ismeretében szinte teljes mértékben megjósolható lesz.

3.2.

A. másodlagos szerkezet Egyszerű algoritmusokkal viszonylag nagy pontossággal megjósolható, hogy hol várható α -hélix, illetve β -redős lemez szerkezet megjelenése a fehérjén belül.

B. harmadlagos szerkezet Az utóbbi években megszülettek azok az első módszerek, amelyek a fehérjék aminosav sorrendjéből harmadlagos, azaz teljes térbeli szerkezetükre képesek következtetni. A harmadlagos szerkezet jóslásának az elméleti biokémikusok esztétikai élvezetén túl azért van nagy jelentősége, mert a harmadlagos szerkezet röntgendiffrakcióval történő kísérletes meghatározásához a fehérjét kristályosítani kell. A megfelelő nagyságú kristály növesztése sokszor évek munkája lehet. A harmadlagos szerkezet oldatformában történő meghatározásának módszere, a magmágneses rezonancia spektroszkópia (NMR) pedig csak jelenleg kezd képessé válni a 20-30 kDa-nál nagyobb fehérjék szerkezetének meghatározására. A harmadlagos szerkezetre az aminosav sorrendből az aminosav oldalláncok kölcsönhatása során fellépő különböző erők becslésével és a fehérjelánc energiájának minimalizálásával következtethetünk. Más módszerek a fehérjeszerkezet kialakulása során fellépő entrópiaváltozásokat (ld. később) is figyelembe veszik. A legújabb eljárások segítségül hívják az alakfelismerésre alkalmasabb, ún. “logikai” számítógépeket is. E módszerek jelenleg csak akkor vezetnek sikerre, ha ismert valamilyen homológ fehérje pontos szerkezete. Mivel azonban a fehérjék meglepően kevésfajta (jelenlegi ismereteink szerint néhány tucat) alapváz szerint tekerednek, ez az első ránézésre igen szigorú kitétel egyre több fehérje 3-dimenziós szerkezetének becslését teszi lehetővé.

C. fehérjemolekula elhelyezkedése a sejten belül (a) A membránalkotó lipideknek a membránok közepén elhelyezkedő szénhidrogén láncai nem képesek hidrogén-híd kötések kialakítására. *Fehérjemolekulák membránba épüléséhez* szükség van egy olyan hidrofób szakaszra az aminosav szekvenciájukon belül, amely eleget tesz annak a kritériumnak, hogy nincs szüksége a környezetével alkotott hidrogén-híd kötésekre. Ilyen szakaszok (20 aminosavnál többet tartalmazó hidrofób α -hélixek, illetve α -helikális, β -redős lemez részletek kombinációi) kialakulása az aminosav sorrend ismeretében megjósolható. **(b)** Az eukariota sejtek különböző membránokkal határolt kompartmentumokból (sejtmag, mitochondrium, lizoszóma, endoplazmás retikulum, peroxiszóma, stb.) épülnek fel. E szubcelluláris

organellumok belsejébe a frissen szintetizált fehérjemolekulák különböző, a tankönyv 3.4. fejezetében összefoglalt transzportrendszerek segítségével jutnak be. E transzportrendszerek a transzportálandó fehérje rövid aminosav-szakaszait, ú.n. *transzport szignáljait* ismerik fel. Így a fehérje aminosav sorrendje által kódolt transzport szignálok felvilágosítást adhatnak a fehérje elhelyezkedésére a sejten belül.

D. a fehérjemolekula stabilitása Szervezetünk fehérjéit életük során különböző káros behatások (pl. oxidáció, cukor-addíció, részleges denaturáció, stb.) érik. Emiatt szükségessé válik a funkciójukat kevésbé, vagy nem betöltő fehérjemolekulák lebontása, amit a sejt lizoszomális, vagy extralizoszomális fehérjelebontó rendszerei végeznek el. A részleges, vagy teljes proteolízis jónéhány esetben (pl. a sejtciklust szabályozó ciklinek lebontása) fontos szabályozó szerepet is betölt. A fehérjemolekulák féléletideje a percek és a napok között változik. Bizonyos aminosavak (pl. prolin-glutaminsav-aszparaginsav-szerin-threonin tartalmú, az aminosavak egybetűs kódjával az angol pestis szóval megegyező PEST-nek rövidített) szigetei igen labilissá teszik az őket hordozó fehérjéket. Ennek valószínűleg az az oka, hogy különböző proteázok ezeket a szekvenciákat ismerik fel. Ezek és más szerkezeti jellemzők alapján az aminosav sorrendből a fehérje várható élettartamára is következtethetünk.

E. szabályozás A fehérjék szintézisük után számos ú.n. poszttranszlációs módosuláson (pl. foszforiláció, glikoziláció, lipid-addíció, metiláció, szulfát-addíció, stb.) mennek keresztül. Az ezeket a folyamatokat katalizáló enzimek csak bizonyos, meghatározott fehérjerészleteket ismernek fel. Így a fehérjék aminosav sorrendjéből későbbi módosulásaikra is következtethetünk. A poszttranszlációs módosítások a fehérjefunkciók szabályozásának egyik legfontosabb eszközei.

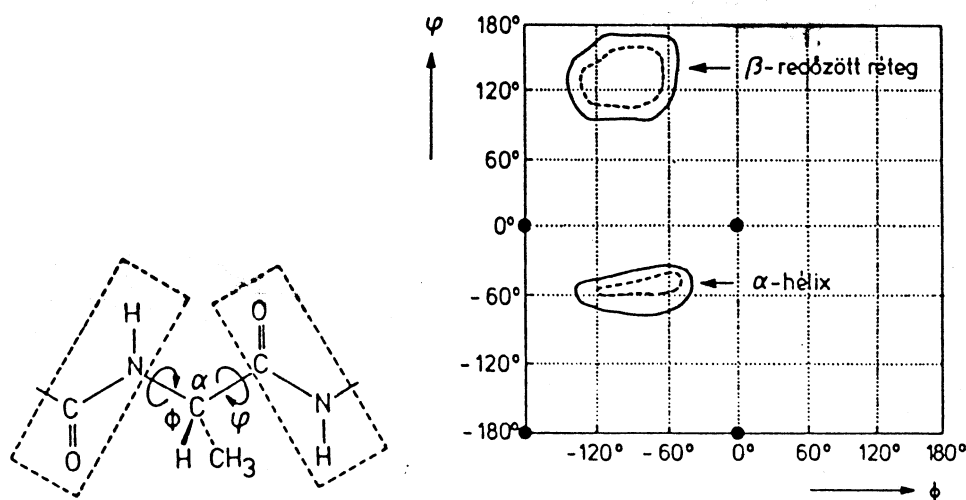
F. a fehérje funkciója Az aminosav sorrendből nyerhető információk közül a legfontosabbat, a fehérje funkciójának, aktivitásának megőrlését hagytam a végére. A későbbiekben részletesebben is kifejtem, hogy a fehérjék bizonyos szakaszai (doménjei) meglehetősen változatlansággal öröztek meg az evolúció során. Ebből fakadóan számos fehérjeszerkezeti elemhez meghatározott fehérjefunkciók (más fehérje, DNS, RNS, ion, kofaktor kötése, enzimaktivitás) rendelhetők.

A fehérjék aminosav sorrendjéből nyerhető információsereg nem csak azért fontos, mert a fehérje szekvenciaanalízisével egész "jellemrajzát" a kezünkbe adja, hanem a különböző genetikai manipulációkkal megteremti a lehetőségét bizonyos fehérjetulajdonságok tervezett és célzott megváltoztatásának. A Human Genom Project-tel (HUGO), azaz a teljes emberi genom szekvenciájának felderítésével egyre több olyan fehérje aminosav sorrendjét ismerjük meg, amelyet még soha senki nem különített el, nem analizált. A fenti módszerekkel nyerhető információk hozzásegítenek ahhoz, hogy ezen funkciótlan fehérjék tényleges fiziológiai szerepét hamarabb megtalálhassuk.

4. A fehérjék szerkezete

A peptidkötés a karbonilcsoport π -elektronjainak és a nitrogén nem-kötő elektronpárjának delokalizálódása miatt planáris, merev szerkezetű. A fehérjék peptidláncában forgás csak az α szénatom melletti két σ (szigma) kötés mentén lehetséges (ld. tankönyv 1-5. ábrája). A két σ kötés helyzetét jellemző szögpar azonban a peptidkötést alkotó

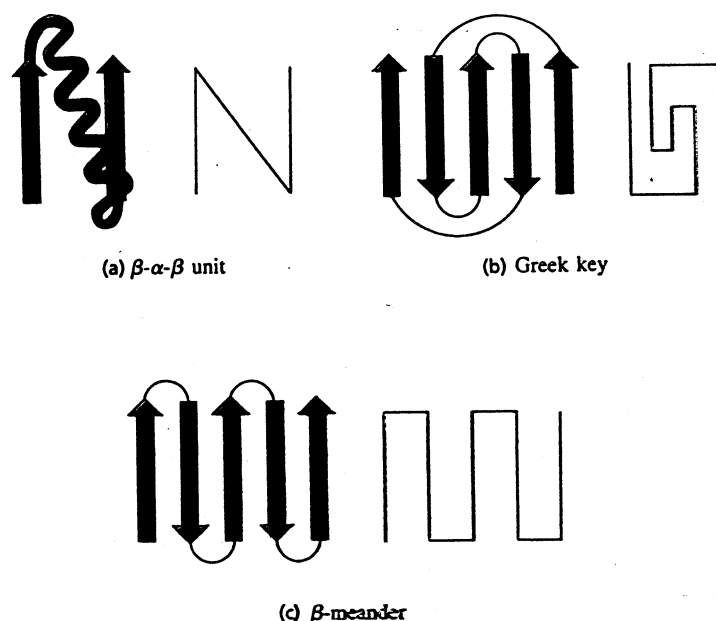
csoportok és az aminosav oldalláncok térigénye miatt nem vehet fel tetszőleges értékeket. Ha a fehérjékben ténylegesen előforduló szögpárok értékeit ábrázoljuk, az ún. *Ramachandran-diagram*hoz jutunk (ld. 3. ábra). A Ramachandran-diagramot megfigyelve azt tapasztaljuk, hogy a lehetséges szögpárok zöme viszonylag kis szigetekre koncentrálódik. Egy-egy ilyen sziget egy meghatározott másodlagos fehérjeszerkezeti elemnek (α -hélix, β -redőzött lemez, β -hajtú, illetve más típusú hélixek) felel meg. Az egyedi szögpárok általában rendezetlen (random coil) struktúrákat jelölnek.



3. ábra: A peptidkötés forgási szögei és a Ramachandran-diagram

A tankönyvben ismertetett legfontosabb szerkezeti elemek, az α -hélix, a β -redős lemez és a β -hajtú közül elsőként az α -hélix néhány további tulajdonságát szeretném ismertetni. Az α -hélix jobbmenetessége a fehérjealkotó aminosavak L konfigurációjából következik, ugyanis balmenetes α -helikális struktúrában az L-aminosavak oldalláncai a közelükben lévő peptidkötések karbonilcsoportjaival “kocognának”. A fehérjék másodlagos szerkezeti elemei, pl. a mindig jobbmenetes α -helikális struktúra az őket alkotó aminosavak kiralitásától függetlenül is optikailag aktívak. A poláros fény síkjának elforgatásához ezek a tükröképi párjukkal fedésbe nem hozható (optikailag aktív) másodlagos szerkezeti elemek az egyedi aminosavaknál sokkal nagyobb mértékben járulnak hozzá, emiatt lehet a forgatóképesség hullámhosszfüggését a másodlagos szerkezet meghatározására használni. Az α hélixek dipólusok, N-terminális régiójuk kb. +0,5, C-terminálisuk pedig -0,5 töltéssel rendelkezik.

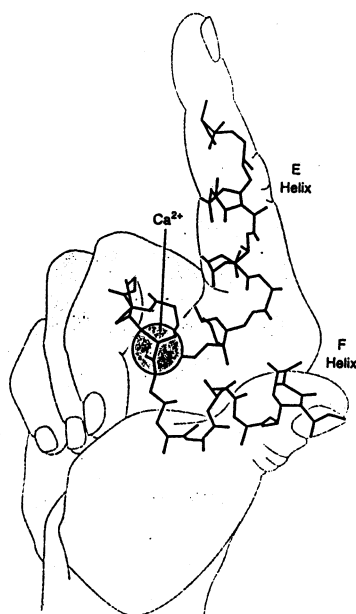
A másodlagos szerkezeti elemek közül még a β -hajtú (vagy β -görbület) néhány sajátosságára szeretném felhívni a figyelmet. Négy aminosav a tankönyv 1-9. ábrán ismertetett módon ún. β -hajtú (β -görbület, β -turn) struktúrát képezhet. A β -hajtút az első és a negyedik aminosav közötti hidrogén-híd kötés tartja össze. A β -hajtúban a polipeptidlánc megfordul, emiatt ilyen szerkezeti elemek igen gyakran a fehérjemolekula külső részén fordulnak elő. A fehérjefelszínen megjelenő β -hajtú részletek részt vesznek a fehérjemolekulák egymáshoz kötésében. Sejtjeinkben igen sok jelátviteli folyamat fehérjekomplexek kialakulásával és elbomlásával megy végbe. E molekuláris történésekben számos esetben a felszíni β -hajtúk kitüntetett szerepet játszanak.



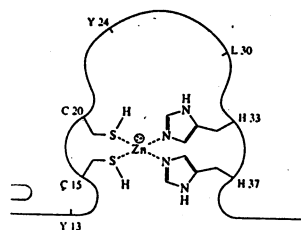
4. ábra: Supersecondary structures

Másodlagos szerkezeti elemek (α -hélixek, β -redős lemezek, β -hajtúk) sok esetben meghatározott kombinációkban fordulnak elő. Ezeket a kombinációkat (ld. 4. ábra) ú.n. “*supersecondary structure*”-nek, azaz a másodlagos és a harmadlagos szerkezet közötti (“harmadfeledleges”) szerkezeti elemeknek nevezzük. Megkülönböztetésük azért is indokolt, mert ezen szerkezeti elemek nagy konzervativitással öröklődnek a fehérjék molekuláris evolúciója során. A konzervatív öröklődés egyik egyik legfontosabb oka, hogy az α -hélixek és a β -redős lemezek az egyetlen olyan fehérjeformációk, amelyek hézagmentesen képesek egymáshoz illeszkedni. A tömör, hézagmentes felépítés a globuláris fehérjék hidrofób magjának igen fontos szerkezeti sajátossága. Ugyanakkor azon struktúrák száma, amelyek ennyire szorosan tudnak egymáshoz illeszkedni, meglepően csekély, így nem csoda, hogy a sikeres összeállítások (amelyek megegyeznek a leggyakoribb supersecondary structure-ökkel) megőrződtek az evolúció során.

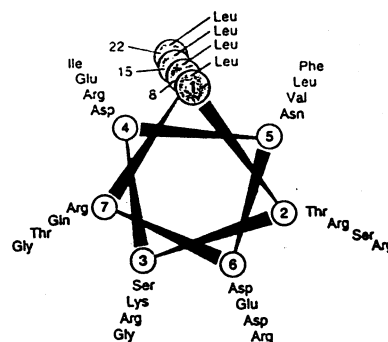
A harmadfeledleges szerkezetek számos esetben meghatározott funkciókat is hordoznak. Ezen funkciókra jó példák a két α -hélixből alkotott kalcium-kötő “EF-kéz”, a négy cisztein és hisztidin oldallánccal komplexet képző cink ionnal stabilizált “cink-ujj”, amely a fehérjék DNS-hez, illetve (ú.n. LIM-doménként) foszfortirozinokhoz való kötésében vesz részt. A két hidrofób felszínnel rendelkező α -hélix által alkotott “leucin-zipzár” szintén DNS-kötő fehérjeelem (ld. 5. ábra). E fehérjék szerkezetének és funkciójának összefüggéseit a biokémia tárgy további fejezeteiben fogjuk ismertetni, jelenleg csak példaként szerepelnek a segédletben.



EF-kéz



cink-ujj



leucin zipzár

EF-kéz

cink-ujj

leucin zipzár

5. ábra: EF-kéz, cink-ujj és leucin-zipzár (Az EF-kéz E és F α -hélicei közötti zseb aszparaginsav és glutaminsav oldalláncái komplexet képeznek a kötő kalciumionnal; a cink-ujj ciszteinjeinek SH-csoportjai és hisztidin imidazoljainak nitrogénjei szolgálnak a cinkionok ligandumaiként; a leucin-zipzár “ragadós”, egy egyenes mentén elhelyezkedő hidrofób leucinait az ábrán szürke körök jelölik)

Egy vagy több “supersecondary structure” fehérjedomént alkot. A *fehérjedomén* az evolúció során olyan, viszonylagosan konzervatívan megőrzött fehérjeelem, amelyhez meghatározott funkció rendelhető. Így pl. beszélhetünk nukleotidkötő-, kináz-, illetve foszfatáz-doménekről. Egy fehérjemolekulában több domén is előfordulhat. A különböző domének igen gyakran csak egy vékony, struktúratlan fehérjeszakasszal kötődnek egymáshoz, amely biztosítja egymástól többé-kevésbé független konformációváltásukat és azt is eredményezi, hogy az egyes fehérjedomének limitált proteolízissel egymástól elkülöníthetők. (A proteáz jobban hozzáfér a szabadonhagyott összekötő fehérjeszakaszokhoz, mint a domének belsejében lévő globuláris struktúrákhoz.)

A domének viszonylagos konzervativitása és egymástól való elég nagy függetlensége a *moduláris evolúció* elméletével magyarázható. Ezen elmélet azon megfigyeléseket foglalja össze, amelyek kimutatták, hogy egymástól igen különböző funkciójú fehérjékben igen gyakran hasonló (és hasonló részfunkciókat betöltő) domének fordulnak elő. A sejt “nem pazarol”. Ha már egyszer “rájött” arra, hogy milyen fehérjedomén a legalkalmasabb arra, hogy pl. a fehérjét az aktinszálakhoz hozzákösse, akkor ugyanezt a domént alkalmazza akkor, ha egy a sejtmetabolizmusban és akkor is, ha egy a jelátvitelben használatos enzimet kell az aktinhoz hozzákötnie. A fehérjedoméneket kódoló génszakaszok gyakran együtt cserélődnek, vándorolnak a különböző gének között az evolúció során. A fehérjedomének megőrzését az is

indokolja, hogy viszonylag kevés olyan fehérjetekeredési alapstruktúra ismeretes, amely nem változik meg (nem megy tönkre), ha az őt alkotó aminosavakból jónéhány random mutációval kicserélődik. Emiatt ezek az “evolúcióképes” fehérjeformák a földi élet megőrzésre érdemes nagy kincseivé léptek elő.

5. A fehérjék szerkezetét kialakító és stabilizáló erők

A fehérjék létrejöttének elengedhetetlen feltétele a peptidkötések kialakulása. Ha a fehérjéket azonban csak a peptidkötések tartanák össze, akkor egy fehérjének számtalan konformációja egyaránt stabilis volna. A fehérjék natív konformációját számos más kötés, erő stabilizálja. Ezek közül a legnagyobb energiával a *diszulfid-híd* kötés bír, amely két cisztein aminosav oldallánc SH csoportja enyhe oxidációjával létrejövő kovalens kötés.

Az egyedi kötések közül a *hidrogén-híd kötés* erőssége átmenetet képez a kovalens és a másodlagos kötések kötéserőssége között. Az α -héliceket és a β -redős lemezeket stabilizáló, peptidkötésekből származó hidrogénhídkötések mellett az aminosav oldalláncok (pl. szerin, threonin –OH csoportok, aszparaginsav, glutaminsav karboxilcsoportjai, hisztidin imidazolgyűrű nitrogénjei, lizin amino csoportja, stb.) is képesek hidrogén-híd kötések kialakítására, amelyek mind fontos szerepet töltenek be a fehérjék harmadlagos és negyedleges szerkezetének kialakításában.

Megjegyzés: a továbbiakban az anyaghoz nem szorosan kapcsolódóan a hidrogénkötésről nyert ismereteink összefoglalása következik. Az ismeretek részletesebb kifejtésére a témakörrel kapcsolatban a vizsgákon nyert szomorú tapasztalataim készítették.

A hidrogén-híd kötés egy kvázi-kovalens kötés, amelyben a központi proton “átugorhat” a donor hídfőatom szigma kötéséből az akceptor hídfőatom magányos elektronpárjához és átmenetileg az utóbbival létesíthet datív jellegű szigma kötést. A proton ilyen furcsa viselkedésére (“ugrálására”) az ad lehetőséget, hogy kis mérete révén a protonnak is van (bár az elektronnál jóval kisebb mértékben) hullámtermészete. Így a hidrogén-híd kötést létesítő proton a két elektronpár tartózkodási maximuma közötti “senki-földjén” (energiagáton) saját kvantummechanikai helybizonytalanságából adódó ún. “alagúteffektussal” jut át. A hidrogén-híd kötés létrejöttéhez természetesen szükséges, hogy a donor hídfőatom szigma-kötése a protont “elengedje”. Ehhez az kell, hogy a szigma kötés közel legyen a donor hídfőatomhoz, azaz, a donor hídfőatomnak nagy elektronegativitásúnak kell lennie. (Ahhoz, hogy a proton az “átugrás” után vissza is tudjon “ugorni” természetesen az akceptor hídfőatomnak is hasonlóan nagy elektronegativitással kell bírnia.) A peptidkötések NH csoportjának hidrogénje és karbonilcsoportjának oxigénje (megfelelő, lineáris elrendeződésük esetén) ideális partnerek hidrogén-híd kötések kialakítására. A hidrogénhídkötés két hídfőatomjának távolsága egyben a kötés energiáját is megszabja. Minél közelebb van egymáshoz a két hídfőatom, annál nagyobb a képzett kötés energiája.

A sejtjeinkben, szervezetünkben előforduló semleges pH-n a savas aminosav oldalláncok (pl. aszparaginsav, glutaminsav) negatív, a bázisosak (pl. arginin, lizin) pozitív töltéssel rendelkeznek. A pozitív és negatív töltések “párosodásából”, az ún. só-hidak, *só-kötések* képződéséből jelentős energianyereség származik. Ha nem egy teljes töltés alakul ki a fehérjemolekulán belül, hanem a különböző elektronegativitású atomok miatt elektroneltolódás megy végbe és ennek következtében résztöltések keletkeznek, ezen ellentétes résztöltések párosodása is energianyereséggel jár. A résztöltések kialakulása révén

keletkező dipólusok közti Coulomb vonzóerőket másodlagos kötőerőknek, vagy van der Waals erőknek hívjuk.

A fehérjék szerkezetének kialakításában szerepet játszó erők közül az ú.n. *hidrofób kölcsönhatásokról* nem tettem még említést. Globuláris fehérjék vizes oldatában (és a vizes oldatokból kristályosított fehérjekristályokban) a hidrofób aminosav oldalláncok a fehérje belsejében találhatóak, a hidrofil oldalláncok pedig a fehérje felszínén helyezkednek el. Korábban úgy gondolták, hogy ezt az általánosan jellemző elrendeződést a hidrofób oldalláncok van der Waals féle vonzása stabilizálja. A hetvenes évek elején javarészt Tanford munkássága alapján jöttek rá arra, hogy a hidrofób kölcsönhatások mértéke jóval meghaladja azt a szintet, ami pusztán a van der Waals kötőerők hatásával magyarázható lenne. Kiderült, hogy a globuláris fehérjék harmadlagos szerkezetének stabilitását egy, a fehérjétől független tényező, a víz szerkezete biztosítja. A víz sok szempontból szinte "kvázikristályos" anyagként viselkedik a benne található nagyszámú hidrogén-híd kötés stabilizáló hatása miatt. Könnyen belátható, hogy ezen hidrogén-híd kötések megbomlása igen nagy energiavesztéssel jár. Hidrofób anyagok képtelenek a vízmolekulákkal hidrogén-híd kötések kialakítását létesíteni, így a víz/hidrofób határfelületen a víz hidrogén-hidas szerkezete megtörik. Emiatt a jelentős energiavesztéssel járó szerkezettorzulás miatt a víz igyekszik a hidrofób anyagokat a lehető legkisebb térfogatra összeszorítani (gondoljunk pl. a vízben úszó olajcseppekre), hogy ezáltal minimalizálja az érintkező felületet. Így már könnyen érthető, hogy nem a fehérjemolekula hidrofób magjának önvonzása, hanem a fehérjét körülvevő víz hidrogénhidas szerkezetének lehető legteljesebb megőrzése az a hajtóerő, amely a fehérjék "bent hidrofób, kívül hidrofil" harmadlagos szerkezetét stabilizálja. A fentiekből egyszersmint az is következik, hogy a fehérjék alakjára az őket körülvevő közeg viszonylag kis változásai is igen nagy hatással lehetnek.

A fehérjék szerkezetének kialakításában és megőrzésében a legnagyobb szerepet az utoljára említett hidrofób és van der Waals erők játsszák. A fehérjemolekulákon belüli hidrogén-híd kötések hatása számottevő (egy aminosavra átlagosan 0,75 H-híd kötés esik), míg az egyenként nagy energiát képviselő só-kötések és diszulfid hidak összességükben (csekély számuk miatt) csak kevésbé járulnak hozzá a fehérjeszerkezet kialakulásához.

6. A fehérjék szerkezetének kialakulása *in vitro*

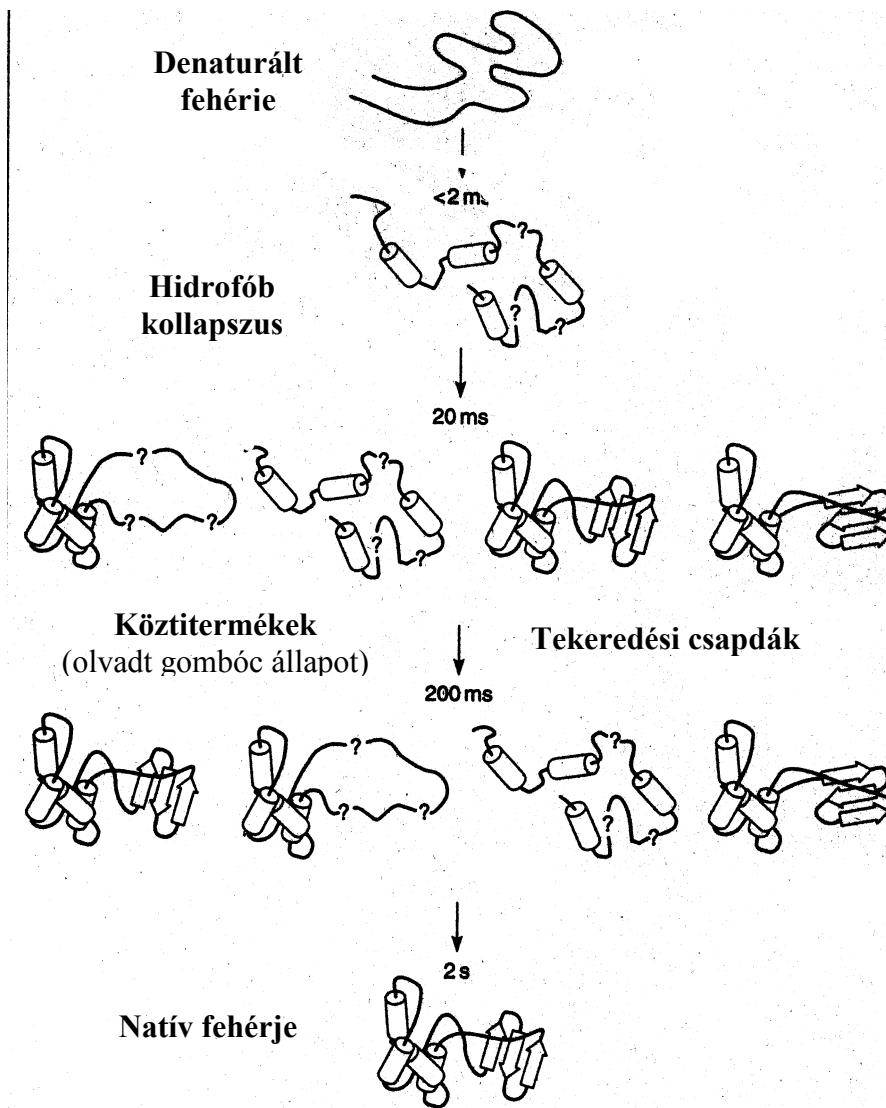
In vitro körülmények között a fehérjék szerkezetének kialakulása viszonylag egyszerűen vizsgálható. A fehérjét először valamilyen reverzibilis behatással denaturáljuk, majd a denaturálószeret eltávolítva különböző mérési eljárásokkal a fehérje szerkezetének kialakulását folyamatosan nyomon követjük. A fehérjék harmadlagos szerkezetének kialakulása nem egymásraépülő lépések egyenes láncolataként írható le, hanem olyan folyamat, amelyben számtalan zsákutca van és a natív, alacsony energiájú szerkezetét kereső fehérjemolekulának sok, különböző konformációjú változata egyidejűleg megtalálható (6. ábra). A szerkezet kialakulása gyors lépésekkel indul, a folyamat lassú, sebességhatározó lépései a natívhoz közeli állapot kifejlődésére jellemzőek.

A fehérjeszerkezet kialakulásának első --gyors-- lépései során azok az egymás melletti aminosav oldalláncok rendeződnek össze, amelyek α -helikális, illetve β -hajtús szerkezetek

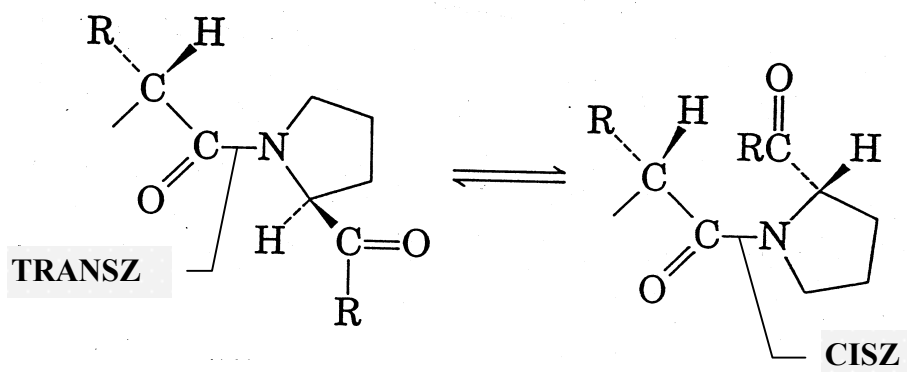
kialakítására képesek. Ennek az az oka, hogy **(a)** az egymás melletti aminosav oldalláncok könnyen megtalálják egymást (az aminosav oldalláncok lokális koncentrációja 10^8 és 10^{11} mol/liter közé esik!), **(b)** a közel fekvő aminosavak közötti hidrogén-híd kötések kialakulásának valószínűsége magas, és **(c)** a stabilizálódó fehérjeszerkezet csak viszonylag kis fehérjerészletre terjed ki, így a kialakulásával együtt járó entrópiacsökkenés viszonylag kicsi (a termodinamikai vonatkozások részleteit ld. később). A β -redős lemezek kialakulása azért követi az α -hélix és a β -hajtű megjelenését, mert bennük egymástól távollévő aminosavak között létesülnek hidrogén-híd kötések, ami mindhárom fenti szempont alapján sokkal nehezebben következik be.

Az α -hélixek és a β -hajtűk kialakulásával párhuzamosan az előzőekben részletezett hidrofób effektus miatt a fehérje hidrofób magja “összeugrik”, egy vagy több hidrofób csomó képződik. Ezen hidrofób kollapszus (összeugrás) során a fehérjének egy olyan magja alakul ki, amely a további rendeződési folyamatokat nagymértékben meggyorsítja. A fehérjeszerkezet kialakulásának ezen autokatalitikus (öngyorsító) sajátossága nélkül a világegyetem egész eddigi életkora sem lett volna elegendő egyetlen darab fehérjemolekula teljes szerkezetének kialakulásához (*Levinthal-paradoxon*).

A harmadlagos szerkezet kialakulásának ezen kezdeti lépései rendkívül gyorsan, a másodperc tört része alatt lezajlanak. A kezdeti lépések után egy stabil, köztes intermedier, az ú.n. “olvadt gombóc” (molten globule) keletkezik. Az olvadt gombóc másodlagos szerkezeti elemei (így bizonyos β -redős lemezek is) többé-kevésbé kialakultak, a harmadlagos szerkezete azonban erőteljesen fluktuál. Az olvadt gombóc formában lévő fehérjemolekula a hidrofób kollapszus miatt elég kompakt, a denaturált fehérje összes térfogatának mintegy 10-20 %-át teszi ki, és térfogata csak 10-20 %-kal nagyobb a natív fehérje térfogatánál. A harmadlagos szerkezet kialakulatlansága miatt az olvadt gombóc még tartalmaz felszíni hidrofób részleteket, ezért aggregációra hajlamos. Az olvadt gombóc szerkezetben még előfordulnak a fehérje belsejében lévő vízmolekulák, amelyek a natív szerkezet kialakulása során “kipréselődnek” a hidrofób környezetből.



6. ábra: a fehérjeszerkezet kialakulásának lépései *in vitro*



7. ábra: a prolin melletti cisz/transz peptidkötés

A fehérjeszerkezet kialakulásának záró-, sebességhatározó lépései során kerül sor az egyedi, nagyenergiájú kötések, így a diszulfid-hidak és a só-kötések kialakulására. Ebben a fázisban kerül sor a prolin melletti peptidkötések (az egyetlen olyan peptidkötés, amely az

általánosan jellemző transz helyzet mellett cisz állapotban is előfordulhat – ld. 7. ábra –) cisz/transz izomerizációjára is.

E zárólépések azért maradnak a folyamat végére, mert legtöbbször a fehérjeláncban egymástól távoli csoportok kölcsönhatását feltételezik. Az ilyen kölcsönhatások létrejöttük esetén is túl nagy entrópiaveszteséget jelentenének abban az esetben, ha a fehérjeszerkezet többi eleme az adott –SH csoportokat, illetve ionokat nem hozná amúgy is egymáshoz közel.

A zárólépések azért sebességmeghatározóak, azért lassúak, mert ritkán fordul elő, hogy az egymással közvetlen kölcsönhatásba lépő csoportokat a fehérje többi része teljesen optimális helyzetbe hozná a közöttük létesülő kötés kialakulásához. Így a kötés létesítéséhez a résztvevő csoportoknak egy konformációs energiagátat kell leküzdeniük (a folyamat aktiválási energiája nagy), ami nem ritkán a fehérje más részein “nagyenergiájú”, a lokális energiaminimumnál magasabb energiaállapotban lévő szerkezeti elemeket stabilizál. E nagyenergiájú helyek fennmaradásának jelentőségére a folyamat termodinamikai jellemzése során fogok visszatérni.

A konformációs energiagát abban a gyakori esetben is jelentkezik, amikor a tekeredő fehérje belső, hidrofób magjának kell alaposan átrendeződnie ahhoz, hogy az “olvadt gombóc” állapotnál tömörebb, natív szerkezethez eljusson. A hidrofób kollapszus során ugyanis a fehérjét a víz általában túl szorosan préseli össze és emiatt a belsejében nem marad elég tér arra, hogy a rosszul összetekeredett hidrofób polipeptidlánc a natív szerkezetet felvehesse.

7. A fehérjeszerkezet kialakulásának termodinamikai viszonyai

Ahogy a fehérje szerkezete kialakul, a fehérje egyre rendezettebb állapotba kerül, azaz entrópiája csökken. A folyamat entalpiaváltozása szintén negatív, hiszen a rendeződés során különböző kötések kialakulása zajlik, amely energianyereséggel jár (a folyamat exoterm). A

$$\Delta G = \Delta H - T \times \Delta S$$

egyenlet értelmében az entrópiacsökkenés az entalpiacsökkenés ellen dolgozik, és ez a hatás különösen magas hőmérsékletek esetén érvényesül. *Ez a fehérjék hődenaturációjának termodinamikai oka.* Az entrópia és az entalpia hatása meglehetősen kiegyenlített, így a folyamat szabadentalpiaváltozása elég mérsékelt, -20 és -70 kJ/mol közé esik. Ha a fehérjeszerkezet kialakulását nagyobb szabadentalpiacsökkenés kísérné (a fehérje a natív konformáció kialakulásával mélyebb energiagödörbe zuhanna bele) a kialakult szerkezet igen stabil lenne. Ez erőteljesen csökkentené annak a valószínűségét, hogy a natív fehérje konformációváltozásokon menjen keresztül, ami gátat szabna a legtöbb enzimfunkciónak és jelátviteli folyamatnak. A natív fehérjekonformáció kialakulásával együttjáró szabadentalpiacsökkenés háromszor-ötször nagyobb értéke esetén a földi élet nem (vagy nem fehérjékre alapozottan) jött volna létre.

Mint az előző fejezetben már említettem, a fehérjék natív szerkezetében a szerkezeti részletek döntő többségének energiaminimuma lokálisan nagyenergiájú részleteket, ún. aktív helyeket hoz létre. Ezeken az aktív helyeken olyan konformációs feszültség lép fel, amely a fehérjemolekula további átalakulása révén már nem tud stabilizálódni. A fehérje ilyen aktív

helyei csak akkor képesek arra, hogy tovább stabilizálódjanak, ha valamilyen más molekulát megkötnék. Termodinamikai szempontból a fehérjék aktív helyeinek léte adja meg az enzimműködésnek a magyarázatát, hiszen ha a fehérjemolekula minden részlete az elérhető legstabilabb konformációban lenne, nem tudna olyan konformációs átmeneteket létrehozni, amelyek átsegítik a szubsztrátot a katalizálandó reakció energiagátján.

A fentieknek megfelelően a fehérjék kialakulása nem minden esetben áll kizárólag termodinamikai kontroll alatt. A fehérjék nem minden részlete éri el a lehetséges energiaminimumot, emiatt szerkezetük kialakulása úgynevezett kinetikai kontroll alatt áll, amely azt jelenti, hogy az energiaminimum eléréséhez szükséges konformációváltozásoknak olyan nagy az aktiválási energiája, amely e konformációváltozások sebességét igen lecsökkenti.

8. Különbségek az *in vitro* és *in vivo* fehérjeszerkezet kialakulás között

A ribonukleáz enzim reverzibilis denaturációja (*Anfinsen-kísérlet*) azért volt a fehérjebiokémiai kutatások Nobel díjjal jutalmazott jelentős mérföldköve, mert bizonyította, hogy a fehérjére jellemző összes információ a fehérje primer szerkezetével (az aminosav szekvenciával) meghatározott és hogy a fehérjeszerkezet kialakulása spontán folyamat.

Az Anfinsen-kísérlethez hasonló *in vitro* fehérje-renaturáció azonban számos vonatkozásában eltér a fehérjék *in vivo* körülmények közötti “betekeredésétől” (folding-jától). Az *in vitro* folyamat sok esetben órák alatt megy végbe, míg az *in vivo* betekeredés legfeljebb percekig vesz igénybe. *In vitro* a fehérjekoncentrációt nem lehet 0,1-1 mg/ml fölé emelni, mert ellenkező esetben a kezdeti, kitekeredetthez közeli állapotok és az olvadt gombóc intermedier hidrofób felszínei miatt a tekeredő fehérjék intenzív aggregációja következik be. *In vivo* a fehérjekoncentráció ennél legalább százszor magasabb, aggregáció mégsem tapasztalható. *In vitro* az egész fehérje egyszerre tekeredik, *in vivo* a riboszómából “kibújó” nascens fehérjének először az N-terminális nyerheti el végleges állapotát, amit csak később követhet a fehérje szintézisének végén megszülető C-terminális betekeredése.

Megállapítható tehát, hogy *in vivo* körülmények között kell hogy legyenek olyan mechanizmusok, amelyek védik a nascens fehérjét az aggregáció és a “túl korai” (csak az N-terminálisra kiterjedő) betekeredés ellen, visszafordítják a tekeredő fehérjéket a tekeredés zsákutcáiból és meggyorsítják a fehérjeszerkezet kialakulásának záró, sebességhatározó lépéseit: a prolin melletti peptidkötések izomerizációját, a diszulfidhidak kialakulását és a hidrofób mag lassú rendeződését. E feladatokat a sejten belül az ún. dajkafehérjék (angolszász irodalomban: molekuláris chaperonok) látják el.

9. A dajkafehérjék

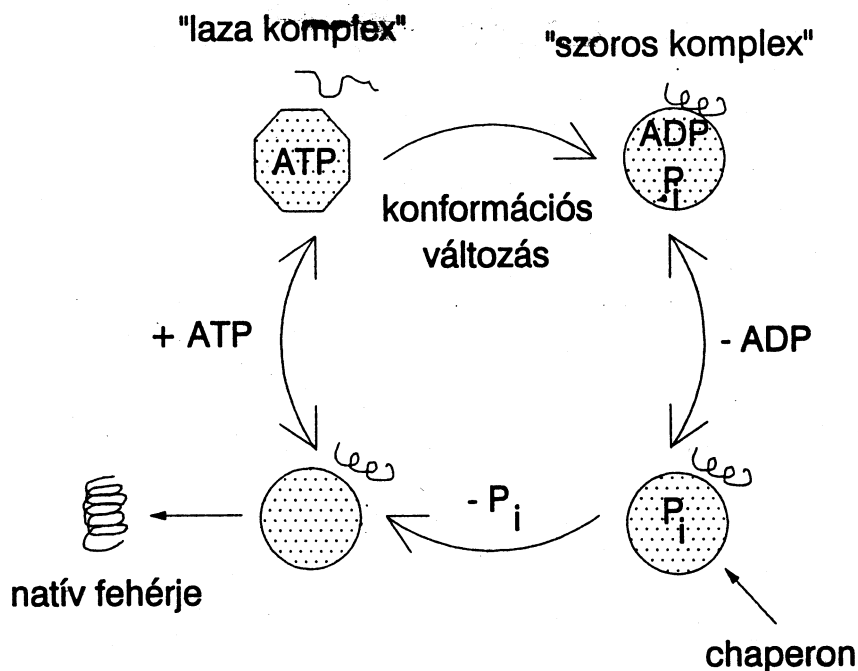
Egy közhasznú definíció szerint a dajkafehérjék olyan fehérjék, amelyek más fehérjék instabil konformerjeihez kötve, azt stabilizálva, megszabják az adott fehérje sorsát a sejten belül. A megjelölésükre az angolszász irodalomban használatos chaperon szó francia eredetű, gardedámot jelent, hiszen ezek a fehérjék úgy kísérik, irányítják a többi fehérjét, mint ahogy a gardedámok irányították, óvták a süldő leánykákat a hajdanvolt bálokon.

A dajkafehérjék közül számos fehérje szintézise változatos környezeti stresszek (pl. hő-sokk, glukóz megvonás) hatására számottevően megemelkedik. Ezek a hő-sokk fehérjék (Hsp-k) és glukóz-regulált fehérjék (Grp-k) a stressz hatására károsodott fehérjék "helyreterelésében" közreműködve egy ősi, sejten belüli védekezési mechanizmus elemeit alkotják.

A fentiek értelmében a naszcens fehérjék aggregáció elleni védelmét és N-terminális részletük "idő előtti" betekeredésének megakadályozását a riboszómával asszociált molekuláris chaperonok, leginkább a 70 kDa-os hő sokk fehérjék (Hsp70) látják el. A riboszóma mellett "várakozó" Hsp70 molekulák mintegy "ráülnek" a naszcens fehérje először szintetizálódó N-terminális részletének hidrofób szakaszaira és megvédik, további tekeredésre képes (folding-competent) állapotban tartják e fehérjelelemeket. A különböző dajkafehérjék a natív konformációjukat még el nem nyert, illetve a stresszhatásra részlegesen denaturált fehérjéket leginkább hidrofób felszíneik alapján ismerik fel.

A fehérjék konformációja kialakulásának záró lépései közül a diszulfidhidak keletkezését a *protein-diszulfid-izomeráz* enzim segíti. Az enzim (amelyet Anfinsen csoportjával párhuzamosan két magyar tudós, Venetianer Pál és Straub F. Brúnó fedezett fel, akik a protein-diszulfid-izomerázt tekeráz-nak nevezték el) a cisztein oldalláncok –SH csoportjainak reverzibilis oxido/redukcióját katalizálja, és közben segíti a diszulfid hidakkal stabilizálódó fehérje korrekt konformációjának kialakulását is. A protein-diszulfid-izomeráz leginkább az endoplazmatikus retikulum lumenében fordul elő, amely sokkal oxidáltabb, mint a citoplazma, és így kedvez a diszulfid hidak kialakulásának. Az endoplazmatikus retikulum oxidációs állapota átmenetet képez a citoplazma és az extracelluláris környezet redoxpotenciálja között és így protein-diszulfid-izomerázzal együtt fokozatosan felkészíti a szekrécióra, illetve a plazmamembrán külső oldalára kerülő fehérjéket a sejten kívüli tér sokkal oxidatívabb környezetére. A prolin mellett peptidkötések cisz/transz izomerizációját (ld. 7. ábra) a *peptidil-prolil-cisz/transz-izomeráz* (PPI, rotamáz) segíti.

A dajkafehérjék az előzőekben ismertetett funkcióikat számos enzimaktivitás segítségével tudják betölteni. Ezek közül a legjelentősebb az adenzin trifoszfát kötése és hidrolízise (ATP-áz aktivitás). ATP kötésére a dajkafehérjék konformációváltozáson mennek keresztül, majd a dajkafehérje konformációja az ATP hidrolízisével az eredeti állapotába visszalakul. Az így lezajló "ATP-ciklus" során a dajkafehérje váltakozva magas és alacsony affinitású komplexet képez a betekeredő fehérjével, amely fellazítja a tekerendő fehérje belsejét és így hozzájárul a tekerendő fehérje konformációjának kialakulásához (8. ábra).



8. ábra: A dajkafehérjék ATP ciklusa

A fehérjék helyes konformációjának kialakításán túl a dajkafehérjék segítenek oligomerjeik kialakulásában, a sejten belüli membránokon keresztül megvalósuló fehérjetranszportban, illetve bizonyos fehérjék (pl. fehérje kinázok) inaktív/aktív formájának egymásba való átalakításában is. Dajkafehérjék (hő-sokk fehérjék) indukciójával (pl. lázas állapotban) a betegségek által megtámadott szövetek, szervek gyorsabb regenerációja érhető el. A dajkafehérjéket a modern klinikai gyakorlat egyre szélesebb körben használja fel mint az agyvérzés, a szívinfarktus megelőzésére, illetve következményeinek enyhítésére használatos eszközöket, mint a szervátültetéseknél az átültetendő szerv épségét megőrző mechanizmusokat, vagy mint az immunrendszer felerősítésére szolgáló anyagokat virális fertőzés, illetve rákos megbetegedés esetén.

Köszönetnyilvánítás:

A segédlet tervezetének átnézéséért, hasznos tanácsaikért köszönettel tartozom Dr. Faragó Annának, Dr. Hrabák Andrásnak, Dr. Mandl Józsefnek, Dr. Mészáros Györgynek, Dr. Mile Imrének és Dr. Schnaider Tamásnak.