

# Felgombolyodási kinetikák, mechanizmusok

1. Alapkísérletek
2. Többállapotú viselkedés
3. Hidrogénkicserélődéses módszerek
4. Példák a felgombolyodás részletes jellemzésére

## Alapkísérletek

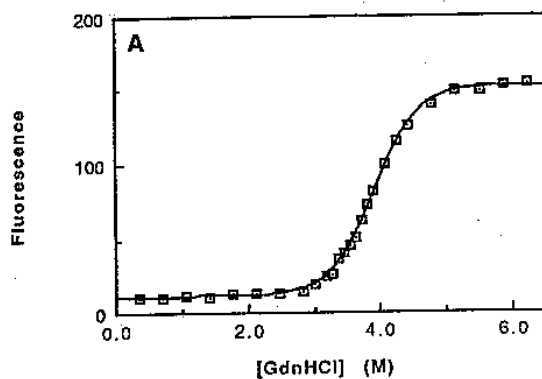
- **Egyensúlyi felgombolyodásvizsgálatok**
  - ◆ Egyensúly létrehozása denaturálószer jelenlétében
  - ◆ Egyensúlyi hődenaturáció
- **Kinetikus felgombolyodásvizsgálatok**
  - ◆ Fel- vagy legombolyodás indítása denaturálószer jelenlétében (gyors keverés)
  - ◆ A folyamat nyomonkövetése ált. optikai úton
- **Vannak-e köztes állapotok (köztitermékek)?**
  - ◆ **Egyensúlyi köztitermékek:** annyira stabilak, hogy egyensúlyi állapotban észlelhetők
  - ◆ **Kinetikus köztitermékek:** metastabilak, csak kinetikus mérés során észlelhetők
  - ◆ Ha nincs észlelhető arányban felhalmozódó köztitermék, akkor **kétállapotú viselkedésről** beszélünk.

## Egyensúlyi kísérlet

Denaturálószerrel ( $D$ , urea vagy guanidin-hidroklorid, GdnHCl) végezve:

- Fehérjemintákat különböző koncentrációjú ( $D$ ) denaturálószer-oldatokban állni hagyunk
- A  $D$  koncentráció 0-tól töményig terjed (8M urea v. 6M GdnHCl)
- megvárjuk a fel- és legombolyodás egyensúlyának beálltát (órák)
- megmérünk egy optikai jellemzőt, mely érzékeny a konformációra (cirkuláris dikroizmus, fluoreszcencia)

Kétállapotú viselkedés esetén:



**szigmoid görbe** (S alakú).

Bármely  $D$ -nél a legombolyodás egyensúlyi állandója:

$$K_U(D) = [U]/[F] = (I_F - I(D))/(I(D) - I_U)$$

ahol  $I(D)$ , ill.  $I_F$  és  $I_U$  a mért optikai jellemző  $D$  denaturálószer-koncentráció mellett, ill. natív (folded, 0 denaturálószer-koncentráció) és denaturált (unfolded, maximális denaturálószer-koncentráció) állapotban.

$K_U$ -ból a legombolyodás szabadentalpiája:

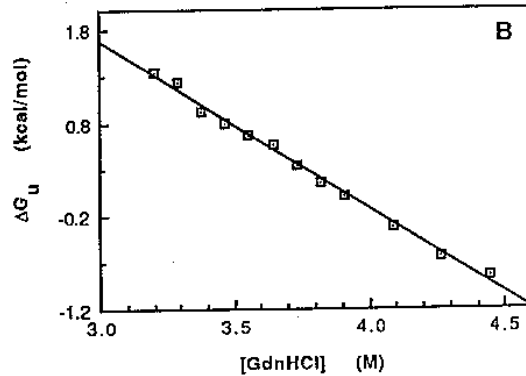
$$\Delta G_U(D) = -RT \ln K_U(D)$$

Kétállapotú rendszernél ez lineáris:

$$\Delta G_U(D) = \Delta G_{U,víz} - m_U D$$

ahol  $\Delta G_{U,víz}$  a vízben ( $D=0$ ) érvényes legombolyodási szabadentalpia,

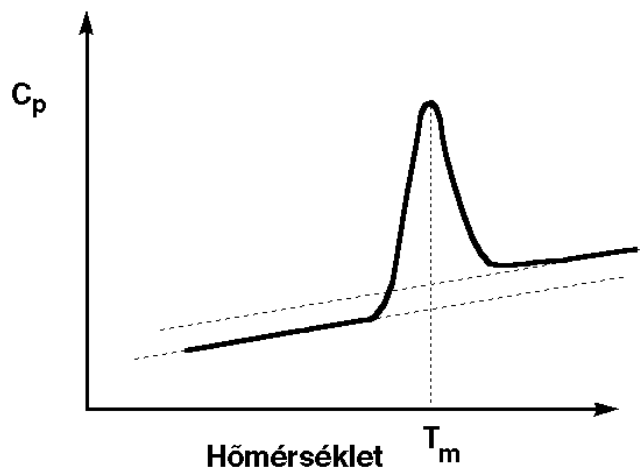
$m_U$  meredekség: konstans, arányos a legombolyodáskor hozzáférhetővé váló felszín nagyságával.



Az egyenest a  $D=0$  denaturálószer-koncentrációra extrapolálva megkapjuk a  $\Delta G_{U,víz}$  értéket, ami a fehérje stabilitásának mértéke vízben.

### Hődenaturáció útján

- A fehérjeoldatot lassan melegítjük, időt hagyva az egyensúly mindenkor beállítására
- Optikai jellemzőt vagy hőelnyelést mérünk
- Optikai jellemzőnél: kiértékelés hasonló, mint a denaturálószer-nél; Van't Hoff-plotok
- Hőelnyelés mérésénél (kalorimetria): minden termodinamikai mennyiség számítható.
  - ◆ Tipikus hőkapacitásgörbe:



- ◆ **kalorimetrikus entalpia:** görbe alatti területből
- ◆ **Van't Hoff-entalpia:** a görbéből, kétállapotú átmenetet feltételezve

### Az egyensúlyi legombolyodás kétállapotúságának feltételei

1. A denaturálószeres mérési adatoknak illeszkedniük kell a kétállapotú átmenetre jellemző görbére (szigmoid, ill.  $\Delta G$ -ben egyenes).
2. Az átmenetnek függetlennek kell lennie az állapot nyomonkövetésére használt, mért jellemzőtől (fluoreszcencia, elnyelés, CD, NMR, stb.)
3. A Van't Hoff-entalpiának meg kell egyeznie a kalorimetrikus entalpiával

## Kinetikus kísérlet

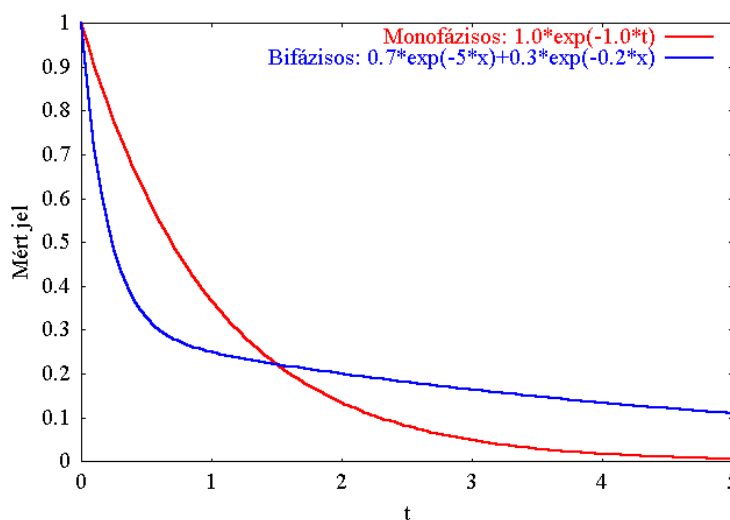
### A sebességi állandók mérése

- A teljes jellemzéshez különféle denaturálószer–koncentrációk mellett mérjük a fel- vagy legombolyodás sebességét:
  - ◆ Alacsony denaturálószer–koncentrációknál felgombolyodási kísérleteket végzünk: teljesen denaturált állapotból hirtelen kihigítjuk a denaturálószer-t úgy, hogy alacsony legyen a koncentrációja
  - ◆ Magas denaturálószer–koncentrációknál legombolyodási kísérleteket végzünk: teljesen natív állapotból denaturálószer hirtelen hozzákeverésével indítjuk a folyamatot
- A keverés után valamilyen optikai jel (pl. fluoreszcencia, cirkuláris dikroizmus, abszorpció) időfüggését mérjük.
- A mért jel időfüggésére exponenciális lecsengések összegét illesztjük:

$$I(t) = I_0 + A_1 \exp(-k_1 t) + A_2 \exp(-k_2 t) + \dots$$

(itt  $t$  az időt jelenti!)

- $A_i$ : amplitúdók,  $k_i$ : sebességi állandók (vagy  $\tau_i = 1/k_i$  időállandók)
- Ha egy exponenciális elég, akkor *monofázisos* az időfüggés, ha kettő kell, akkor *bifázisos*, stb.

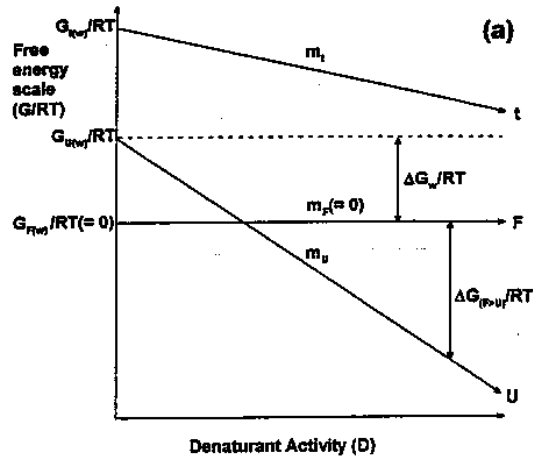


### A kinetika elméleti leírása és a mérés értékelése kétállapotú rendszernél

- Kétállapotú viselkedésnél a natív és a denaturált állapotot egymástól egyetlen energiagát választja el, ez az átmeneti állapot.
- Ha van egy átmeneti állapot (jele:  $t$ , transition state), feltehetjük, hogy annak szabadentalpiája is lineárisan függ a denaturálószer–koncentrációtól:

$$G_t(D) = G_{t,víz} - m_t D$$

és  $m_t$ -vel jelöljük a függés meredekségét.



(mindent a felgombolyodott állapothoz viszonyítva ( $G_F$ -et tekintjük 0-nak bármely  $D$ -nél) a delták elhagyhatók; az ábrán még  $RT$ -vel is osztották a szabadentalpiákat, ezt most hagyjuk figyelmen kívül).

- A fel- és legombolyodás sebességi állandói az aktiválási energiáktól függenek:
  - ◆ A legombolyodás aktiválási energiája:  $G_t$ , így

$$k_{le} = k' \exp(-G_t/RT)$$

- ◆ A felgombolyodás aktiválási energiája:  $G_t - G_U$ , így

$$k_{fel} = k' \exp(-(G_t - G_U)/RT)$$

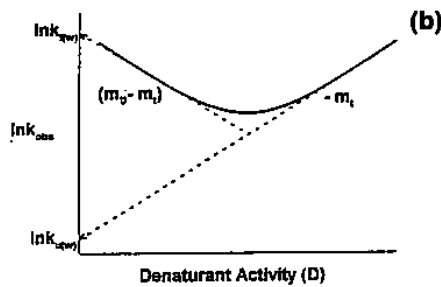
- Kinetikai mérésnél az egyensúlyból való kibillenés (a denaturálószer-koncentráció hirtelen megváltozása) utáni relaxáció (új egyensúlyi állapot felvételének folyamata) sebességét mérjük. Ennek megfigyelhető sebességi állandója (ezt kapjuk meg az optikai jel időfüggéséből a fentebb leírt illesztésből):

$$k_{megfigy} = k_{fel} + k_{le}$$

- A  $D$ -től való függést bevive és az egyenlet logaritmusát véve kapjuk:

$$\ln k_{megfigy} = \ln (k_{fel,víz} \exp((m_U - m_t)D) + k_{le,víz} \exp(-m_t D))$$

- Ezt mérési adatok alapján ábrázolva kapjuk az ún. **chevron plot**ot:



Jellegzetes, V alakú plot (chevron: fordított V alakú katonai rangjelzés). A V alak abból adódik, hogy alacsony denaturálószer-koncentrációnál a felgombolyodás, magasnál a legombolyodás sebessége nagy, közepesnél mindkettő kicsi.

- Jobb oldali ág: legombolyodási ág (legombolyítással mérhető), meredeksége  $-m_t$ , tengelymetszete  $\ln k_{le,víz}$
- Bal oldali ág: felgombolyodási ág (felgombolyítással mérhető), meredeksége  $m_U - m_t$ , tengelymetszete  $\ln k_{fel,víz}$
- A mérésből meghatározható  $m_t$  és  $m_U$ . (Az  $m_U$  egyensúlyi mérésből is, ld. fentebb.)
  - ◆  $m_t$  arányos az átmeneti állapotban hozzáférhetővé váló felszínnel
  - ◆  $(m_U - m_t)/m_U$  az átmeneti állapot pozícióját jellemzi (hol van a reakciókoordinátán)

- $D$  denaturálószer–koncentráció: valójában az *aktivitással* kell(ene) számolni, ez nemlineáris függvénye a koncentrációnak, néha alkalmazzák

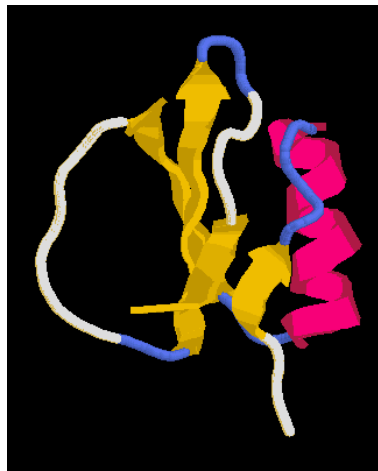
## A kinetika kétállapotúságának feltételei

1. A fel- és legombolyodásnak is monofázisosnak kell lennie
2.  $\ln k_{\text{megfígy}}$ -nek a fenti egyenlet szerint kell függnie a denaturálószer–koncentrációtól: a chevron plot mindkét ágának egyenesnek kell lennie.
3. A kinetikus kísérletekből számolt paraméterek értékeinek (egyensúlyi állandó  $K_U = k_{\text{fel}}/k_{\text{le}}$ ,  $m_U = [\text{felgombolyodási ág meredeksége}] + [\text{legombolyodási ág meredeksége}]$ ) meg kell egyeznie az egyensúlyi kísérletekből nyert értékekkel.

## Példák kétállapotú viselkedést mutató fehérjékre

### Példa: Kimotripszin inhibitor 2

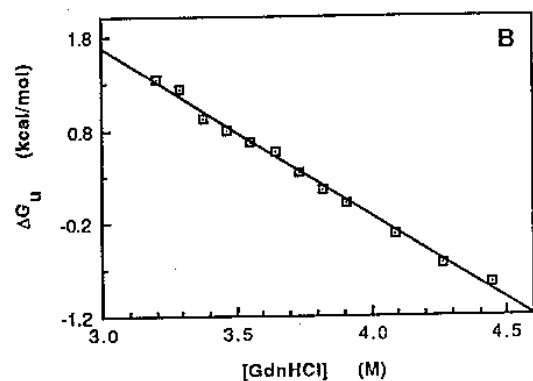
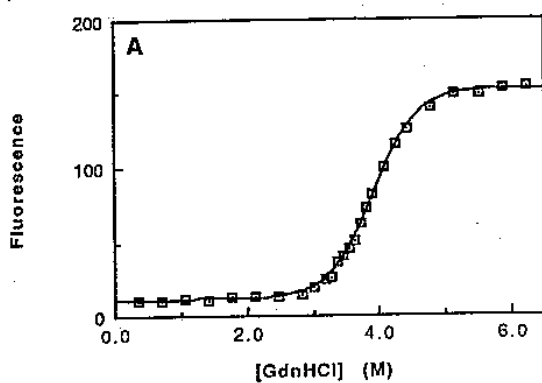
#### Szerkezete



64 aminosav, egy négyszálú béta–lemez és egy hélix

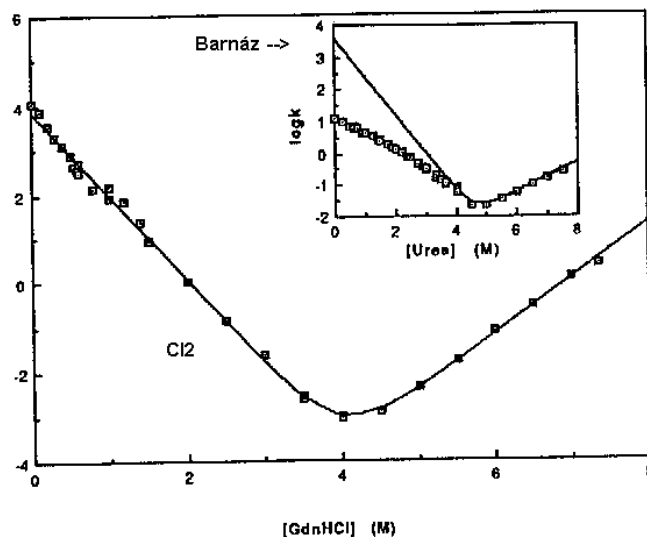
#### Egyensúlyi kísérlet

GdnHCl denaturáció fluoreszcenciával követve:



Az egyensúlyi kísérletben pontosan illeszkedik a kétállapotú modellre.

#### Kinetikai kísérlet:



A kinetikai kísérletben is pontosan illeszkedik a kétállapotú modellre. Inzert: ugyanez barnázon kimérve (a felgombolyodási ág nemlineáris  $\rightarrow$  nem kétállapotú viselkedés).

Egyetlen kooperatív egység. Egyéb kísérletek kimutatták: a másodlagos és a harmadlagos szerkezet egyidejűleg alakul ki, a hierarchikus modell itt nem teljesül! A kimotripszin inhibitor 2 minden tekintetben tökéletesen kétállapotú viselkedést mutat.

### Egyéb, kétállapotú viselkedést mutató fehérjék

- Számos kis, egydoménes fehérje, pl.
  - ◆ Alfa-helikális fehérjék: monomerekus lambda represszor, citokrom c (speciális körülmények között)
  - ◆ Béta-fehérjék: tendamiszát, CspB hidegsokk-fehérje, SH3 domének
  - ◆ Béta-szendvicsek: twitchin, tenascin, stb.
  - ◆ Alfa/béta fehérjék: Kimotripszin inhibitor 2, Arc represszor, ubiquitin (pontmutáns), villin, stb.
- Nagy változatosságot mutatnak  $k_{fel}$ -ben is és az átmeneti állapot pozíciójában is
- Legfeljebb kb. 100 aminosavrészből állnak (a legnagyobb 107).
- Némely esetben a kétállapotú viselkedés könnyen megszüntethető (mutáció, körülmények változtatása)
- A felgombolyodás kinetikai paramétereit elsősorban a fehérje topológiája határozza meg (hasonló topológia  $\rightarrow$  hasonló paraméterek)
- Másodlagos szerkezet: alfa-helikális fehérjék gyorsabban gombolyodnak-e fel, mint a béta-szerkezetűek? Van korreláció, de sok a kivétel.
- Lokális/nemlokális kontaktusok száma összefügg-e a felgombolyodási sebességgel? Van némi korreláció. (Több nemlokális kontaktus  $\rightarrow$  lassúbb gombolyodás)

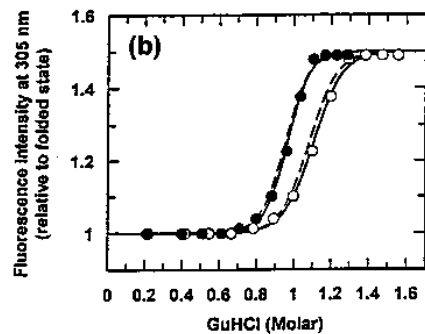
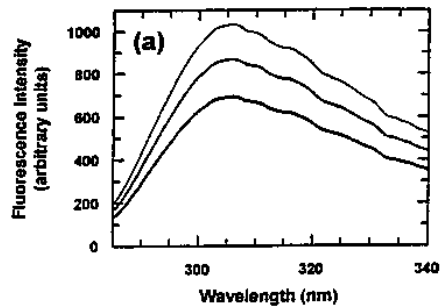
## Többállapotú viselkedés

Példa: lizozim és a foszfoglicerát kináz (PGK) izolált N-terminális doménje

### PGK N-domén (175 aminosav)

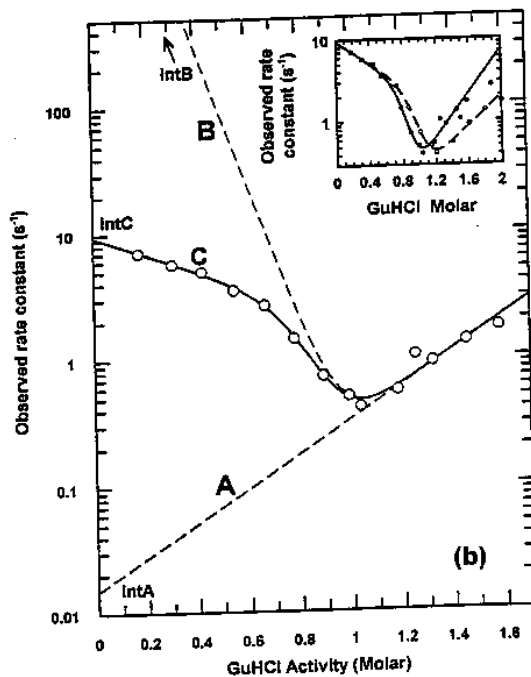
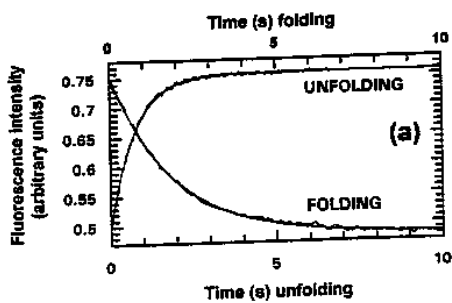
#### Egyensúlyi kísérlet:

GdnHCl denaturáció



Szigmoid görbe, az egyensúly kétállapotú

Kinetikai kísérlet:



Fent: a fel- és legombolyodás relaxációs görbéi: monofázisosak

Lent: a chevron plot felgombolyodási ága nemlineáris  $\rightarrow$  kétállapotú modellnek nem felel meg.

Az adatok illeszthetők háromállapotú modellre:  $U = I = F$

---

## Lizozim (129 aminosav)

### Szerkezet

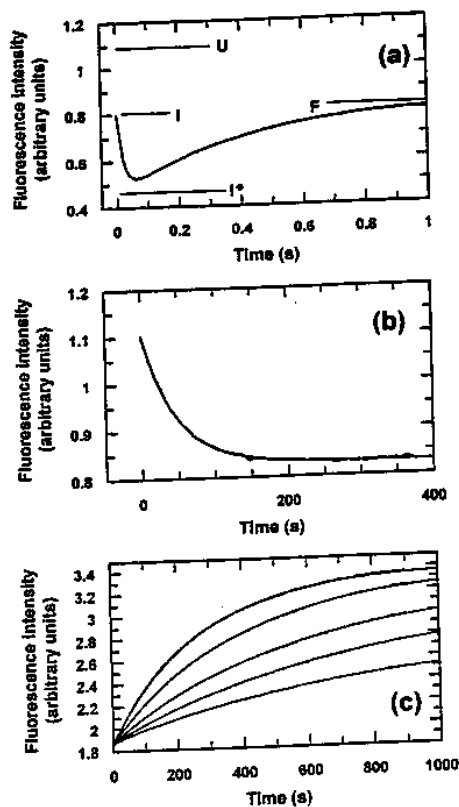


Tyútktojás–lizozim: egy alfa és egy béta domén

### Egyensúlyi kísérlet:

szigmoid görbe, kétállapotú egyensúly

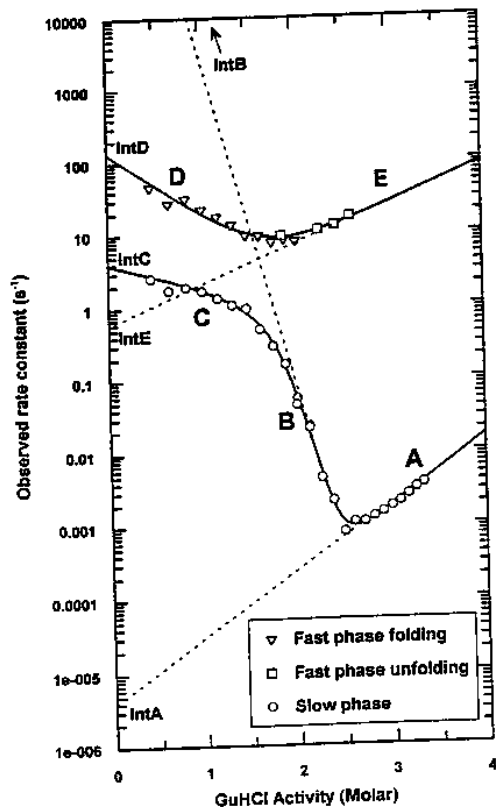
### Kinetikai kísérlet



- (a): 5,4-ről 0,49 M GdnHCl-re hígítás. Háromfázisú kinetika: (1) Ugrásszerű csökkenés (holdidőben), (2) gyors csökkenés, (3) lassabb emelkedés
- (b): 5,4-ről 2,8 M GdnHCl-re hígítás. Egyfázisú kinetika, lassú.
- (c): Denaturációs átmenetek: sima egyfázisú görbék

**Chevron plot:** ha több fázis van, mindegyik fázis sebességi állandója alapján készíthetünk chevron plotot:



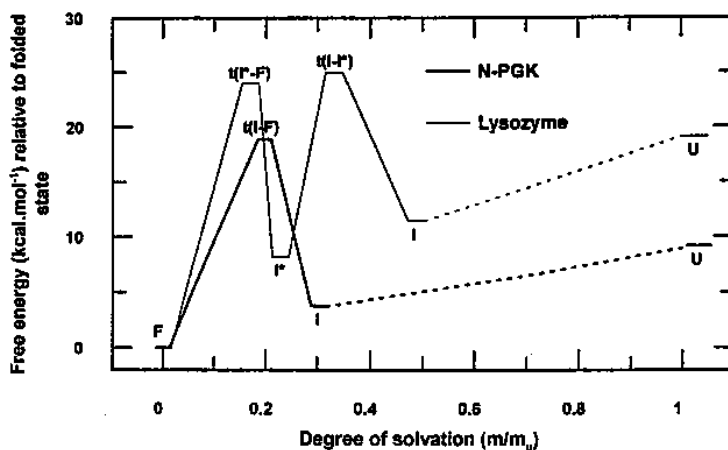


- Felső görbe a gyors, alsó a lassú fázisok sebességi állandói alapján
- Felgombolyodási ág nemlineáris → nem teljesül a kétállapotú kinetika
- Az adatok négyállapotú modellre illeszthetők:  $U = I = I^* = F$

A lizozim felgombolyodása tehát különösen komplex: négyállapotú felgombolyodás!

## Szabadentalpia–profilok

A mérések alapján meghatározható az átmeneti állapotok és a köztes állapotok szabadentalpiája és reakciókoordinátán vett pozíciója (reakciókoordináta: a natív állapotban eltemetett felszínek hozzáférhetősége az adott állapotban, ez az  $m_U$  és  $m_I$  értékekből származtatható). A PGK-ra és a lizozimra a fenti mérések alapján a következő **szabadentalpia–profilok** adódnak:



## Egyéb, többállapotú viselkedést mutató fehérjék

- A 100 aminosavnál hosszabb fehérjék általában, pl. barnáz, lizozim, GroEL chaperonin apikális doménje, ribonukláz H, izolált PGK-domének, citokróm c (bizonyos körülmények között)

- Nem különböznek lényegesen a kétállapotúan gombolyodó fehérjéktől sem a sebességi állandókban, sem az átmeneti állapot pozíciójában, sem a térszerkezet komplexitásában
- Általában nagyobb a stabilitásuk, mint a kétállapotúaknak
- Néha stabilizálással kétállapotú fehérjét háromállapotúvá, destabilizációval háromállapotút kétállapotúvá lehet alakítani
- A felgombolyodást kinetikus csapdák, hibásan gombolyodott közttermékek komplikálják

## Hidrogénkicserélődéses módszerek

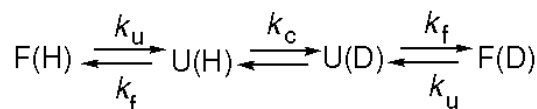
### Hidrogenizotóp–kicserélődés

- Fehérjét nehézvízbe helyezve a labilis protonok deutronra (deutérium magja) cserélődnek.
- A kicserélődés sebességi állandója (teljes hozzáférés esetén):

$$k_c = k_H[H^+] + k_{OH}[OH^-]$$

sav- és báziskatalizált, minimuma pH=3-nál (pH=3-nál a leglassúbb, ettől eltérve gyorsul)

- Denaturált fehérjénél oldalláncok szekvenciafüggő módon befolyásolják a kicserélődést.
- Felgombolyodott fehérje belsejében lévő protonnak előbb felszínre kell kerülnie.



(U a denaturált, F a natív állapot, H a hidrogén, D a deutérium)

- Ha a felgombolyodott állapot energetikailag erősen kedvező, akkor  $k_f \gg k_u$ , így a megfigyelhető kicserélődési sebesség:

$$k_{ex} = k_u k_c / (k_f + k_c)$$

Két határeset:

- ♦ **EX<sub>2</sub>** mechanizmus:  $k_f \gg k_c$  esetén: szerkezeti fluktuáció gyors a kicserélődéshez képest (kicserélődés–limitált mechanizmus). Ekkor

$$k_{ex} = K_{op} k_c$$

ahol  $K_{op}$  a protont rejtő hely felnyílásának egyensúlyi állandója. Reciproka:  $P = k_c / k_{ex}$  a *védettségi tényező*. A kicserélődés sebességét az éppen kinyílt állapotban lévő proton relatív koncentrációja határozza meg. Sok kinyílás kell egy kicserélődéshez.

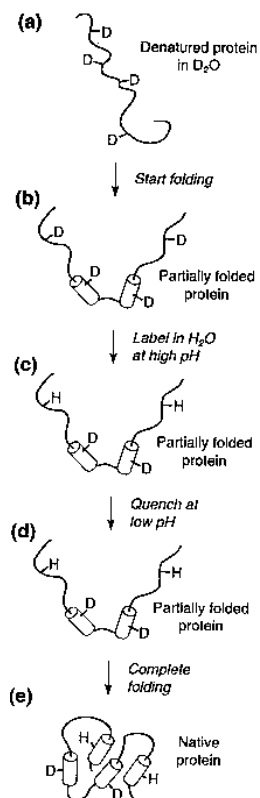
- ♦ **EX<sub>1</sub>** mechanizmus:  $k_f \ll k_c$  esetén: szerkezeti fluktuáció lassú a kicserélődéshez képest (felnyílás–limitált mechanizmus). Ekkor

$$k_{ex} = k_u$$

a kicserélődés sebességét a kinyílási sebesség határozza meg: minden kinyíláskor csere van.

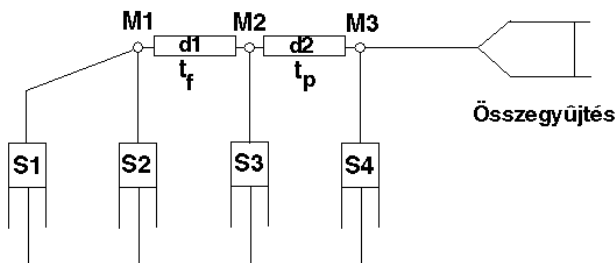
- EX<sub>2</sub> a leggyakoribb eset. EX<sub>1</sub> akkor valósul meg, ha a fehérje destabilizált (lassan gombolyodik fel) vagy ha erősen bázikus a pH (gyors a kicserélődés).
- A két mechanizmus elkülönítése: pH–függés alapján.
  - ♦ EX<sub>2</sub>–nél a  $k_c$  erős pH–függése jelenik meg
  - ♦ EX<sub>1</sub>–nél csak  $k_u$  esetleges pH–függése

## Pulse-labelling (impulzusjelöléses) hidrogénkicserélődés



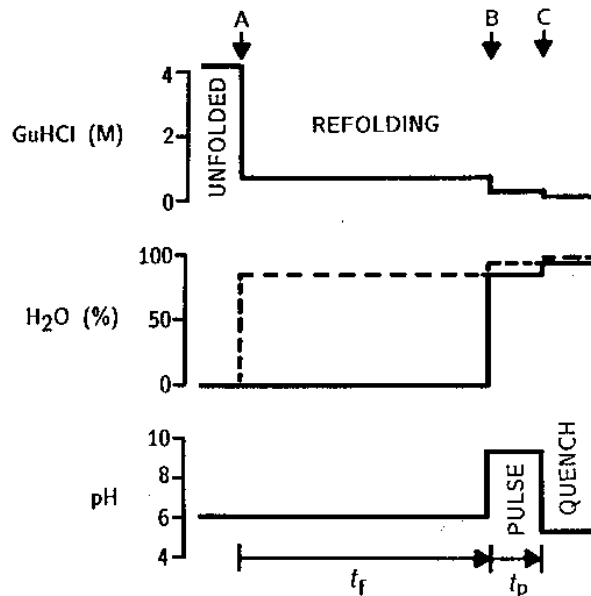
- teljesen deuterált, denaturált fehérje (előzőleg nehézvízes denaturálószerben áztattuk sokáig)
- elindítjuk a felgombolyodást, majd adott  $t_f$  idő múlva
- magas pH-n egy adott időtartamú,  $H_2O$ -val készített pufferlökettel (impulzus) **megjelöljük a hozzáférhető protonhelyeket** (ezeken a helyeken a deuterionok protonokra cserélődnek). Ezzel lényegében *pillanatfelvételt* készítünk a fehérje adott állapotáról.
- alacsony pH-jú pufferrel megállítjuk a kicserélődést, hogy a védettebb deuterionok megmaradhassanak (a H-kötésben lévők). (Ha hagynánk a magas pH-jú puffert, egy idő után mindegyik deuterion protonra cserélődne.)
- hagyjuk befejeződni a felgombolyodást
- a jelölt mintát NMR-rel vagy tömegspektroszkópiával vizsgáljuk: NMR-rel a kicserélődött protonok helye azonosítható, tömegspektroszkópiával a számuk és heterogén minta esetén az eloszlásuk is
- A kísérletet  $t_f$  változtatásával sokszor megismételjük, így pillanatfelvételeket készítve a felgombolyodás folyamatáról, különböző időpontokban.

Kísérleti elrendezés:



- S1: denaturált fehérje nehézvízben  
 S2: visszagombolyító puffer  
 S3: impulzuspuffer (magas pH,  $H_2O$ )  
 S4: leállító puffer (alacsony pH)  
 M1, M2, M3: keverések  
 $t_f$ : visszagombolyodási idő (a jelölés előtt)  
 $t_p$ : impulzusidő

Koncentrációváltozások az idő függvényében:



**Mért mennyiség:**

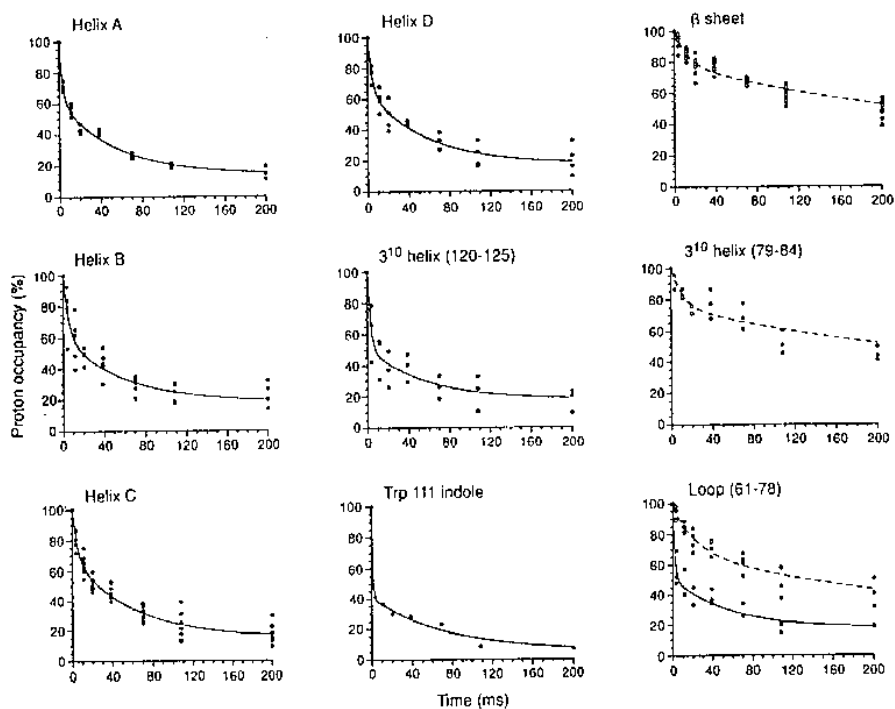
- a fehérje egyes régióiban lévő protonok **jelölhetősége** a felgombolyodásra hagyott idő függvényében. (Minél hosszabb ideig hagyjuk menni a felgombolyodást a jelölés előtt, annál kevesebb molekulában lesznek még hozzáférhetőek a jelölhető protonok, tehát a jelölhetőség csökken!)
- az egyes protonok **védettségi tényezője** (ez növekszik a felgombolyodási idő előrehaladtával)

**Példák a felgombolyodás részletes jellemzésére**

**Lizozim felgombolyodásának vizsgálata**

**Impulzusjelöléses hidrogénkicserélődés, NMR-rel követve**

Különböző régiók jelölhetőségének csökkenése az idő függvényében:



- A görbék nem esnek mind egybe → vannak intermedierek
- Bifázisos görbék
  - ◆ Gyors fázis: 7 ms körüli időállandó. Amplitúdója a hélixeknél 40%, a béta-doménnél csak 24%
  - ◆ Lassú fázis: a hélixeknél <100 ms időállandó, a béta-doménnél >100 ms
  - ◆ az alfa-domén minden görbéje kb. ugyanolyan, mindkét fázis → a domén magja kialakulhat, miközben a béta még nem stabilizálódott

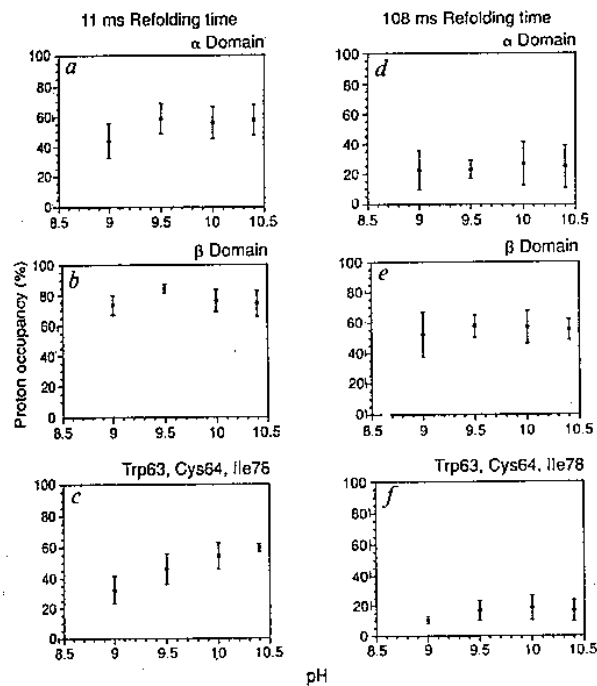
• **Szekvenciális események vagy párhuzamos utak?**

A bifázisos görbék két lehetséges magyarázata:

1. A gyors fázisban az adott proton az összes molekulában részleges védettséget szerez, egy gyengén stabil köztitermékben. Ez a lassú fázisban alakul át stabilabb szerkezetté. (Egy közös út.)
2. Az adott amidcsoport a molekulák egy részében teljes védettséget szerez, a többiben semmit. Az utóbbi frakció a lassú fázisban szerzi meg a védettséget. (Két párhuzamos út.)

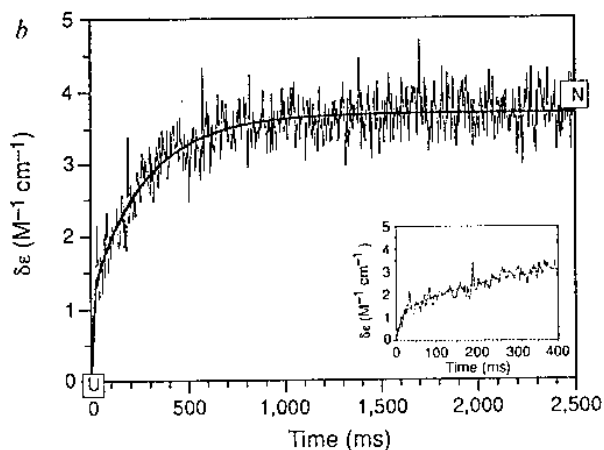
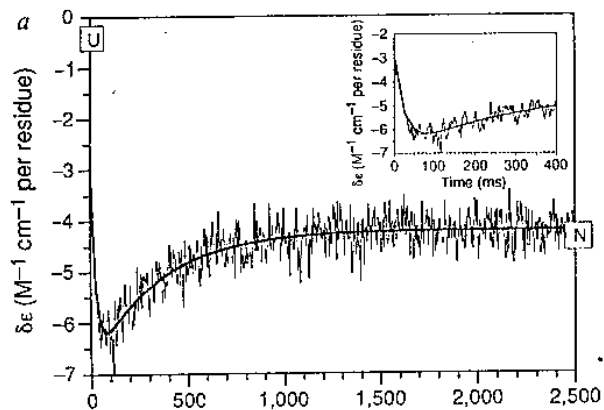
Hogyan különíthető el?

- ◆ 1. esetben EX<sub>2</sub>, 2. esetben EX<sub>1</sub> mechanizmus működik, így a két eset a pH-függés alapján elkülöníthető.  
Eredmény:



- ◆ Többnyire nincs kivehető pH-függés → **több párhuzamos út van**

**Cirkuláris dikroizmus, stopped-flow méréssel**

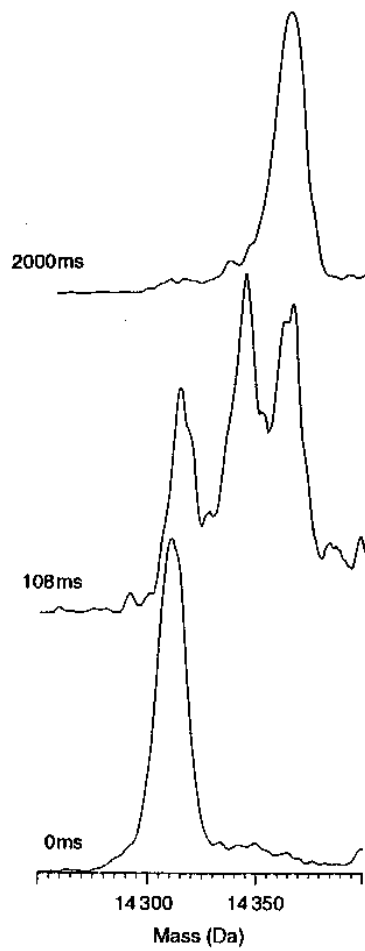


- Felső: távoli UV-tartomány (másodlagos szerk.). Három fázis:
  1. Megugrás a holtidőn belül (2 ms). Hélixtartalomra utal.
  2. További változás kb. 80 ms-ig. A natív értéken túllő (vsz. diszulfid kromofórok miatt). Időállóan nem esik egybe a hidrogénkicserélődésnél mértékkel.
  3. A natív szint elérése 300 ms időállóan (béta-domén lassú fázisának felel meg)
- Alsó: közeli UV-tartomány (harmadlagos szerk.). Két fázis:
  1. Gyors (amplitúdó 32%), időállóan 10 ms
  2. Lassú (amplitúdó 68%), időállóan 285 ms

A béta-domén hidrogénkicserélődéséhez hasonló fázisok.

### Impulzusjelöléses hidrogénkicserélődés tömegspektroszkópiával mérve

(electrospray ionization mass spectrometry)

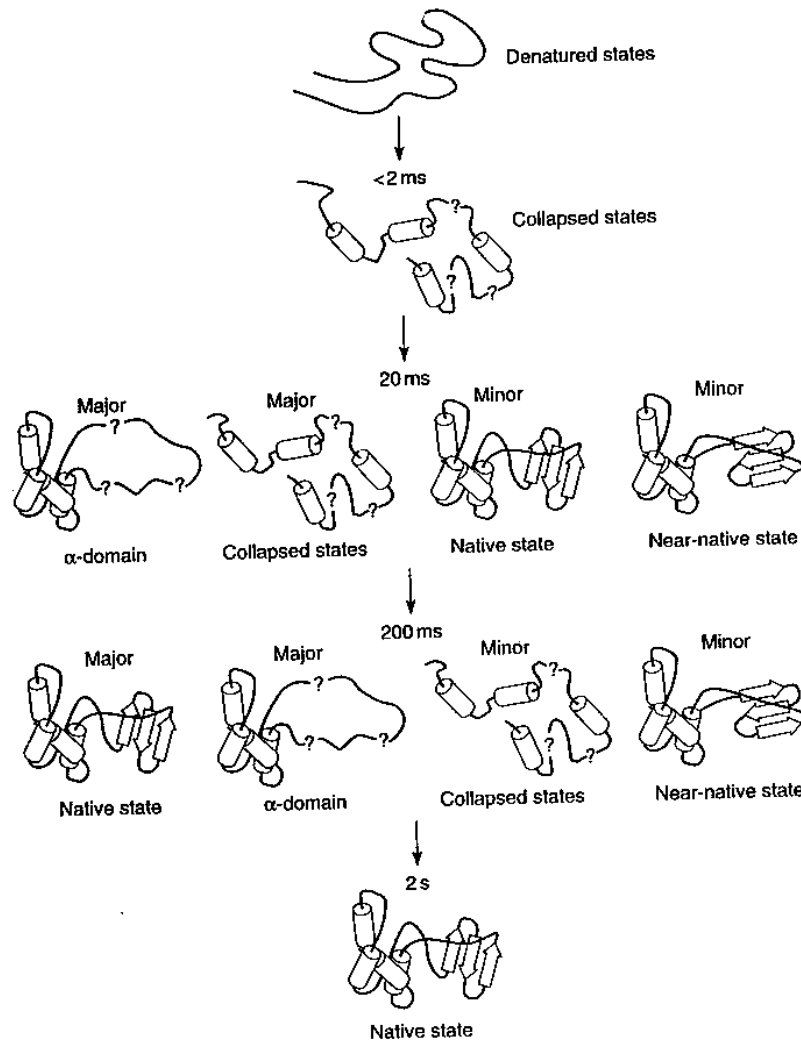


Jól látható a köztes állapotok heterogenitása. Egy köztitermék különösen nagy mennyiségben található, ebben az alfa-domén már létrejött, a béta nem.

### Egyéb mérések

triptofánok fluoreszcenciája, fluoreszcencia quenching, ANS-kötés, inhibítorkötés, stb.

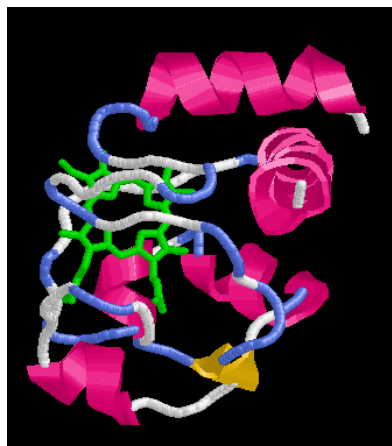
**Az összkép:**



1. Legkorábbi állapot (<2 ms): részlegesen összeesett, fluktuáló, jelentős másodlagos szerkezet, nincsenek stabil harmadlagos kölcsönhatások.
2. Az alfa-doménben stabil szerkezet alakul ki, a béta-domén még instabil és fluktuáló. Kis mennyiségben feltűnik egy másik köztitermék is, amiben mindkét domén megvan, de még nem álltak össze natívvá
3. 200 ms: túlnyomórészt majdnem kész alfa-domént tartalmazó köztitermékek. Lassú folyamatban (350 ms időáll.) kialakul a béta-domén és mindkét domén magjának finomszerkezete.

A molekulák 25–30%–a gyorsan gombolyodik (ezeknél 5–10 ms időállandóval mindkét domén létrejön), 70–75%–a lassan (ezeknél a béta domén csak lassan alakul ki).

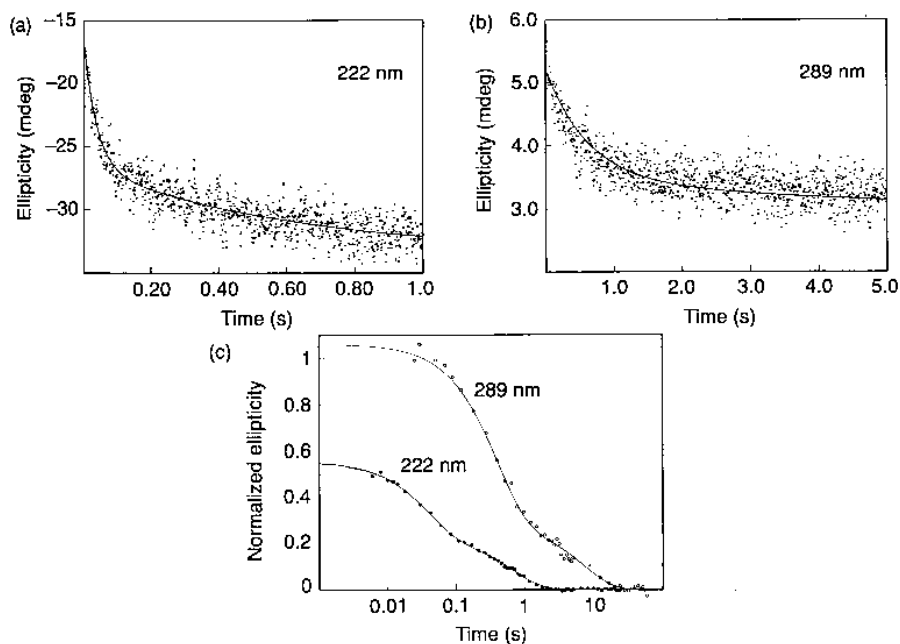
## Citokróm c felgombolyodásának vizsgálata





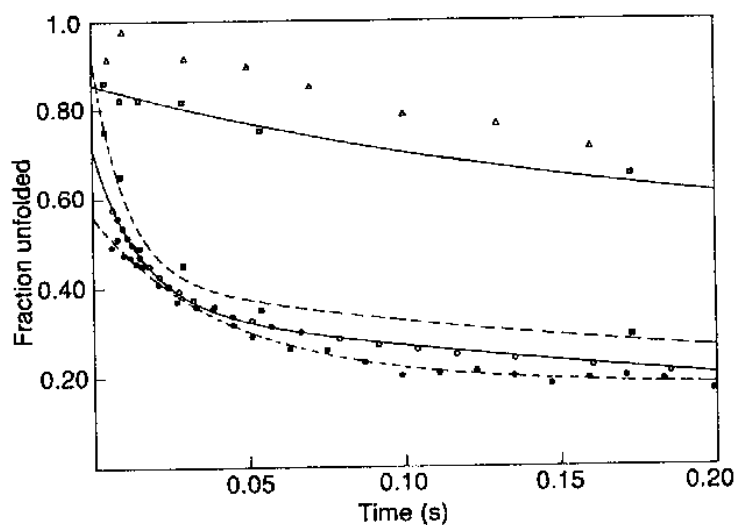
Szerkezete: helikális, hem csoporttal

### Cirkuláris dikroizmus stopped-flowval



- Távoli UV: holtidőn (4 ms) belül a változás 45%-a megtörténik, majd kétfázisú görbe
- Közeli UV: nincs gyors változás, mintegy 100 ms-ig alig változik, utána lassú lecsengés

### Különbéle mérések



- Gyors időállandóval fejlődik:
  - ◆ Távoli UV CD (másodlagos szerkezet)
  - ◆ N- és C-terminális hélixek amidprotonjainak védettsége — a mért értékek hasonlósága arra utal, hogy ezek korán asszociálódnak
  - ◆ Trp 59 fluoreszcenciájának kioltása a hem csoport által (gyors kollapszusra utal)
- Lassú időállandóval fejlődik:
  - ◆ Közeli ultraibolya tartományban a cirkuláris dikroizmus (harmadlagos szerkezet)
  - ◆ Lánc közepén lévő hélixek amidprotonjainak védettsége

**Burst-fázis:** holtidőn belül a legtöbb fehérjénél megugrás a távoli UV CD-ben. Újabb eredmény: ez lehet az oldatcserétől is, nem feltétlenül tükröz szerkezeti változást.