

D/SS. B 1023

JÓZSEF ATTILA TUDOMÁNYEGYETEM BIOFIZIKAI TANSZÉK

Hőmérséklet hatása a fehérjék fluoreszcenciájára

DOKTORI DISSZERTÁCIÓ

Bajusz Tamásné, Kabók Katalin

SZEGED

1974

TARTALOMJEGYZÉK

	Oldal
Bevezetés	
1.§. Korábbi vizsgálatok kritikai áttekintése	1
1.1. Aromás aminosavak fluoreszcencia jellemzői- nek hőmérsékleti függése	4
1.2. Proteinek fluoreszcenciájának hőmérséklet- től való függése	7
2.§. Kísérleti módszerek	24
2.1. Az abszorpciós spektrum meghatározása	24
2.2. Az emissziós spektrum felvétele	24
2.3. A fluoreszcencia relatív hatásfokának meg- határozása	27
2.4. Enzimaktivitásmérés	28
2.5. Egyéb fizikai jellemzők mérése	30
2.6. Vizsgált rendszerek kiválasztása és össze- tetele	30
3.§. Mérési eredmények ismertetése. Diskusszió	33
3.1. Abszorpciós mérések eredményei	33
a. Lizozim oldatok	33
b. Tormagyökérperoxidáz esetében	42
3.2. Az emissziós mérések eredményei	49
a. Lizozim	49
b. Peroxidáz	59
3.3. Relatív intenzitásmérések eredményei	65
3.4. Aktiválási energia meghatározása	66
3.5. Enzimaktivitás mérések eredményei	70
3.6. Egyéb mérési eredmények	72
Összefoglalás	77
Irodalomjegyzék	80



B E V E Z E T É S

Az élő szervezetekben végbemenő valamennyi folyamat speciális, az előre jellemző fehérjekatalizátorok, enzimek hatására folyik le. Így a proteinek közvetlenül szerepet játszanak minden ismert biológiai folyamatban, és ezzel a proteinek struktúrája és funkciója közötti kapcsolat a molekuláris biológia kutatásának egy érdekes és fontos területévé vált. E terület megközelítése számos biofizikai és biokémiai módszerrel lehetséges. A funkció és szerkezet kapcsolata vizsgálatának egyik fontos módszere a fluoreszcenciás vizsgálati mód, amely dinamikus, ugyanakkor érzékeny eszközt szolgáltat a proteinek állapotában, strukturájában, mikrokozonyezetében beálló változások tanulmányozásához, és bizonyos felvilágosítást képes adni a biokémiai folyamatok lefolyásáról is. A fluoreszcenciás módszer előnye /1/ más módszerekkel szemben továbbá az, hogy gyors, kényelmes, kevés anyag felhasználásával az objektum sérülése nélkül alkalmazható.

Vizsgálataink célja az volt, hogy megvizsgáljuk, hogyan változnak a fluoreszcencia jellemzők, és az aktivitás a fehérje oldat hőmérséklete megváltozásával, van-e változás a szabad fluoreszkáló aminosav viselkedéséhez képest, és megkíséreljük kapcsola-

tot találni a fluoreszcencia jellemzők megváltozása és a fehérje szerkezete és funkciója között.

A vizsgált enzimek esetében a hőmérséklettől való függés ismerete és vizsgálata azért jelentős, mert az enzimek biológiai hatását, működését minden olyan fizikai jellemző befolyásolja, amely rájuk, mint fehérje-molekulára hatással vannak. A hőmérséklet emelésével pedig a fehérjék könnyen elveszthetik eredeti, nativ tulajdonságaikat, olyan konformációs változások jöhetnek létre, amelyek után a fehérjék már biológiai aktivitással nem rendelkeznek /2/.

Széles körben tanulmányozták azokat a proteineket, amelyek triptofánt tartalmaznak és fluoreszcenciájuk a bennük lévő indol gyűrűtől ered pl. /3; 4/ . E csoportba tartozó fehérjéket az jellemzi, hogy amíg a fehérjék szerkezete nem változik, a fluoreszcencia intenzitás monoton csökken a hőmérséklet növelésével, de a strukturális átmenet tartományában a hőmérséklettől való függést mutató görbe iránya jellegzetesen megváltozik. E tartományt sok esetben a fluoreszcencia spektrum maximum helyének eltolódása, a spektrum kiszélesedése is jellemzi pl. /5/ .

A tirozint tartalmazó fehérjéknek pl. ribonukleázoknak, inzulinoknak, stb. a tirozin fenol gyűrűjétől

eredő fluoreszcenciája hőmérsékleti függését kevesebben vizsgálták pl. /3; 5/ . Ezeknél a konformációs változás hőmérsékleti tartományában nem tapasztaltak maximum eltolódást, csupán intenzitásváltozást.

Vizsgálati anyagként a fehérjék e két csoportjának egy-egy reprezentánsát, a lizozimet és a tormagyökér peroxidáz enzimet választottuk.

A lizozim fluoreszcencia jellemzőinek hőmérséklettől való függését a konformációs változás bekövetkezéséig már többen vizsgálták pl. /3; 4; 6/ stb. , azonban célszerűnek látszott a hőmérsékleti intervallumot kb. 90°C-ig kiterjeszteni.

A peroxidázt, amelynek fényelnyelését és fluoreszcenciáját a hőmérséklet függvényében ezideig még nem vizsgálták, azért is választottuk vizsgálatunk tárgyául, mert ennek az enzimnek a fluoreszcenciájában mind a tirozin, mind a triptofán fluoreszcenciája megjelenik, sőt alkalmas gerjesztő hullámhossznál elkülönülten az egyiké vagy a másiké /7/. Célunk itt is az volt, hogy együtt vizsgáljuk a fluoreszcencia spektrumot, az abszorpciós spektrumot és az enzimaktivitást, és a jellemzők alapján vonjunk le következtetést a konformációs átalakulás hőmérsékleti intervallumáról, az átmenet reverzibilitásáról és meghatározzuk az átmenet termodinamikai paramétereit.

1. § A KORÁBBI VIZSGÁLATOK KRITIKAI ÁTTEKINTÉSE

A fehérjék belső, önálló fluoreszcenciájának tanulmányozása jelentősebb mértékben az 1950-es évek második felétől kezdődött. A fehérjék önálló fluoreszcenciáját közel egyidőben három, egymástól független kutatócsoport fedezte fel: DUGGAN és UDENFRIEND /8/; SHORE és PARDEE /9/ 1956-ban, VLADIMIROV és KONEV /10/ 1957-ben.

TEALE /11/ és WEBER /12/ vizsgálatai révén vált ismertté, hogy a fehérjék belső fluoreszcenciáját az aromás aminosavak eredményezik. Ezek közül is jelentősebb a fenilalanin (Phe), a tirozin (Tyr) és a triptofán (Try). Korábban csak ezeknek tulajdonították a proteinek belső fluoreszcenciáját. Az azóta végzett vizsgálatokból már ismert, hogy távolabbi UV-tartományban más aminosavak is fluoreszkálnak, de igen kis határfokkal /13/. Az előbbi három aminosav közül a fenilalanin emisszióját nagyon kicsiny határfoka miatt (0,04) nativ fehérjékben még nem sikerült kimutatni. A tirozin és triptofán jelenléte esetén az emissziós spektrum domináns módon a triptofán spektruma /11; 12/. Még humán szérumalbumin esetében is, amely csupán egyetlen triptofánt tar-

talmaz, viszonylag bonyolult analízis szükséges ahhoz, hogy 17 tirozinnak a fluoreszcenciához való hozzájárulása kimutatható legyen. Azóta azonban már ezzel ellentétben pl. KONEV /14/ igaz ugyan, hogy csak gyenge vállként, de 310-320 nm között megtalálta a tirozin fluoreszcenciáját olyan proteinekben, melyek triptofánt is tartalmaznak. A tormagyökér peroxidáznál pedig annak ellenére, hogy a peroxidáz molekulában tirozin és triptofán is jelen van, a tirozin fluoreszcencia intenzitását sokkal nagyobb-nak találták, mint a triptofánét /7/.

A 60-as évektől kezdődően számos szerző vizsgálta a különböző, főképp triptofánt tartalmazó proteinek fluoreszcencia jellemzőit. Azok a széleskörű eltérések, amelyeket a különböző fehérjék között találtak, mind a kvantumhatásfok, mind az abszorpciós és a fluoreszcencia maximumainak hullámhosszában, arra mutatnak, hogy a triptofán csoportok szűkebb környezete jelentős tényező a fluoreszcencia sajátosságok szempontjából. Mind ezek a jellemzők nagy mértékben függenek a különböző kémiai, fizikai paramétereiktől: pH; hőmérséklet, oldószer minősége, koncentráció, stb. Miután a molekulák környezetében beálló változások befolyásolják a molekulák szerkezetét és a fluoreszcencia jellemzőket, ezért ez utóbbiakat fel le-

het használni a protein molekula szerkezetének a tanulmányozására.

Már korábban észrevették, hogy a hő hatására létrejött konformációs változás feltűnő változást idéz elő a fluoreszcenciában, így - mint azt már STEINER és EDELHOCH /4/ is javasolta - a fluoreszcencia jellemzők megfigyelése gyors és érzékeny eszközt szolgáltat a proteinek állapotáról, strukturájáról és a mikrokörnyezetében beálló változásokról. A vizsgálatok végrehajtása gyors és egyszerű, különösen más, kiegészítő módszerekkel kombinálva meglehetősen részletes információt ad a proteinekről /15/.

A fehérjevizsgálatok során problémaként vetődött fel és még jelenleg sem eldöntött kérdés, hogy a belső fluoreszcenciával rendelkező aromás aminosavak megőrzik-e, és milyen mértékben őrzik meg fluoreszcencia sajátásaikat, amikor beépülnek a bonyolult fehérjemolekulába. Az értekezés egyik célja, hogy erre a kérdésre kíséreljen meg választ adni lizozim és peroxidáz esetében. Ebből a célból megnézzük a szabad aminosavak, a fenilalanin, a tirozin és a triptofán fluoreszcencia jellemzőit is a hőmérséklet és a hidrogén ion koncentráció függvényében.

1.1. Aromás aminosavak fluoreszcencia jellemzőinek
hőmérsékleti függése

a./ A triptofán és a tirozin fluoreszcencia jellemzőinek hőmérsékleti függését összefoglalóan GALLY és EDELMAN /3/ közölte. Az általuk végzett kísérletek során a triptofán koncentráció 4 $\mu\text{g/ml}$, a tirozin koncentráció pedig 20 $\mu\text{g/ml}$ volt, amelyek kisebbek azoknál a koncentrációs értékeknél, ahol koncentrációs önkkioltás léphetett volna fel. TUROVEROV és munkatársai vizsgálataikat 10^{-5} - 10^{-3} M/l koncentrációs tartományban végezték /5/, mert tapasztalatuk szerint ebben a tartományban a fluoreszcencia jellemzők hőmérsékleti kioltásának a menete független volt a koncentrációtól.

A /3/-ban leírt tirozin és triptofán oldatok fényabszorpciója a 20-80°C hőmérsékleti intervallumban 1%-nál kisebb mértékben csökkent, anélkül, hogy a spektrumok alakja megváltozott volna. A triptofán esetében hasonló eredményt kapott FOSS is /16/,

aki a triptofán vizesoldatát 70°C-ig melegítve az abszorpciós spektrumban jelentősebb változást nem tapasztalt.

A fluoreszcencia szinkép vizsgálatakor növekvő hőmérséklettel a fluoreszcencia intenzitás csökkenését figyelték meg, bár a hőmérséklet az emissziós spektrumok alakját nem befolyásolta. A triptofán fluoreszcencia spektrumának a maximuma 350 nm-nél, a tiroziné pedig 303 nm-nél van. Ha a 25°C-on mért fluoreszcencia intenzitást 100%-nak tekintették $\lambda_{gerj}=280$ nm, és így ábrázolták a relatív fluoreszcencia intenzitásokat a hőmérséklet függvényében, akkor tirozin esetében egy kb. -0,7 iránytényezőjű egyenest kaptak, míg triptofán esetében az egyenestől enyhén eltérő jóval meredekebb görbét, amely 25-50°C-ig közelíthető egy -2, 50-70°C között pedig egy -1,1 iránytényezőjű egyenessel.

A szerzők által kapott értékek $\pm 2\%$ -on belül reprodukálhatók voltak, és a hőmérséklettel való változások reverzibiliseknek mutatkoztak: hűtéskor visszakapták a melegítéskor kapott görbéket.

Ezekkel az eredményekkel egyező CHEN /6/ megállapítása, aki a triptofán fluoreszcencia

2%-os csökkenését tapasztalta a szobahőmérséklet környékén a hőmérséklet emelésekor. A kvantumhatásfokot a triptofán fluoreszcenciájánál alacsony hőmérsékleteken és a szobahőmérséklet környékén 100-300^oK EISINGER /17/ vizsgálta. Az eredmények fő jellegzetessége a kvantumhatásfok közel konstans volta alacsony hőmérsékleten 100-200^oK tartományban és erősen hőmérsékletfüggő kioltás szobahőmérséklet környékén. A 20-80^oC hőmérsékleti intervallumban a hatásfok 0,21-ről kisebb, mint 0,05 értékre csökkent.

b./ Bár a fenilalanin fluoreszcenciájának a kvantumhatásfoka igen alacsony, ennek a vegyületnek a vizsgálata igen fontos, mert a fenilalanin fluoreszcencia a protein spektrumában való teljes hiányának az oka lehet a gerjesztési energiának a fenilalaninról a tirozinra, majd a triptofánra való átadása. Másrészt felismerték, hogy a fenilalanin fotodisszociációt szenvedhet és ebben az esetben fontos szerepe lehet a proteinekben fellépő fotokémiai, fotofizikai folyamatokban /18/. A fenilalaninra vonatkozóan LEROY és munkatársai /18/ végeztek méréseket 0-70^oC tartományban. A hőmérséklet emelésekor ugyanazt a viselkedést találták, mint GALLY és EDELMAN /13/ tirozin és triptofánra.

Méréseket végeztek a kvantumhatásfok hőmérsékleti függésére is, és azt tapasztalták, hogy a hőmérséklet emelése a kvantumhatásfok gyors csökkenését eredményezte egy közepes 2,7%-os fokenkénti átlagos hőmérsékleti koeficienssel az egész vizsgált tartományban. A 0-70°C-os hőmérsékleti tartományban a hatásfok 0,04 értékről közel 0,008 értékre csökkent. LEROY és munkatársai /18/ fenilalanin esetében a hőmérséklet hatását megvizsgálták a csillapodási időre is 0-70°C hőmérsékleti tartományban. Tapasztalatuk szerint az élettartam jelentősen csökkent a hőmérséklettel. A viszonylagos változás megegyezett a kvantumhatásfokra találtakkal. A csillapodási idő ebben a tartományban 9,6 ns-ről 2 ns-ra csökkent.

1.2. A proteinek fluoreszcenciájának hőmérséklettől való függése

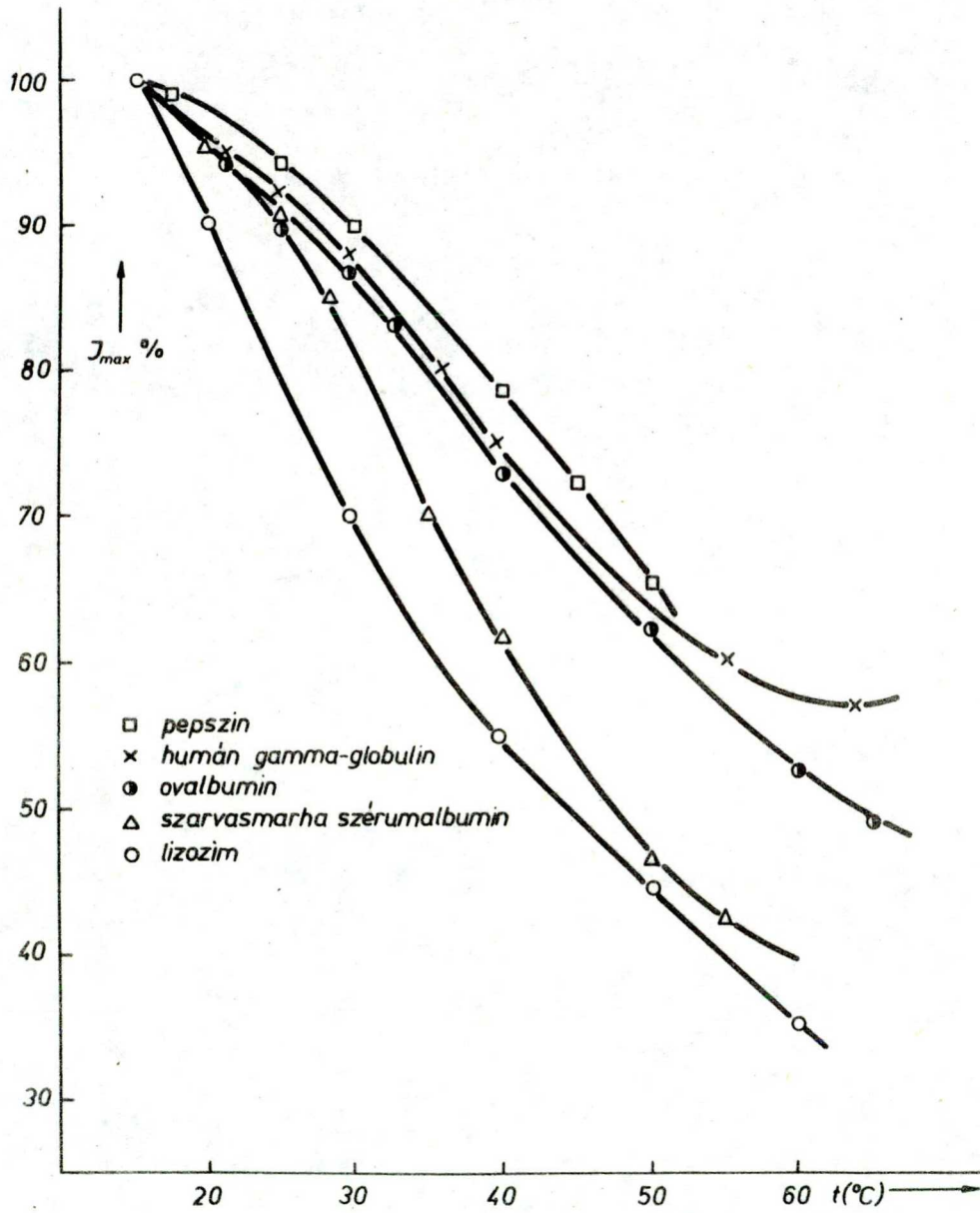
A 60-as évektől kezdődően számos munka foglalkozik a hőmérséklet hatására létrejött denaturációs átmenetek lumineszcenciás módszerrel történő tanulmányozásával, közöttük több összefoglaló jellegű /5; 6; 19; 20-22/.

STEINER és EDELHOCH, valamint GALLY és

EDELMAN /3; 4; 23/ elsőik között mutattak rá a lumineszcenciás módszer alkalmazásának célszerűségére a fehérjékben létrejövő hőmérsékleti átmenetek kutatása szempontjából. Az előbbi szerzők négy, az utóbbiak öt triptofán tartalmu proteint vizsgáltak. A /3/ munkában közöltek alapján a triptofánt tartalmazó proteinek kvantumhatásfoka különböző mértékben ugyan, de csökkent a hőmérséklettel anélkül, hogy a fluoreszcencia spektrumok alakja megváltozott volna. A különböző proteinek pepszin, humán-gamma-globulin, ovalbumin, szarvasmarha szérumalbumin, lizozim fluoreszcencia intenzitásának a monoton csökkenése kb. 60°C-ig tart, ameddig ezek a fehérjék nem mutatnak strukturális átmenetet. A megfigyelések szerint ezeknél a proteineknél a fluoreszcencia spektrumok, de főképp a kvantumhatásfokok is azt igazolták, hogy az aromás aminosavak jelentősen megváltozhatnak, ha beépülnek a fehérje makromolekulába, a protein polipeptid láncába. Bár hőmérsékletnövekedés hatására hasonlóan viselkedtek, fluoreszcencia kvantumhatásfokaikban jelentősen különböztek egymástól a vizsgált fehérjék, sőt kvantumhatásfokuk különbözött a szabad triptofánétól is. Minthogy a triptofán tartalmu pro-

teinek fluoreszcenciájáról már TEALE /11/ ki-
mutatta, hogy az nagymértékben az aminosavmaradék-
nak tulajdonítható, így nem volt meglepő, hogy a
proteinek fluoreszcencia intenzitása a hőmérsék-
let emelésével csökkent hasonlóan a szabad trip-
tofánéhoz. A fluoreszcencia intenzitásokat a hő-
mérséklet függvényében az 1. ábra mutatja. A
15°C-os intenzitást 100%-nak tekintve, legcse-
kélyebb mértékű a változás pepszin esetében, 60°C-
nál is még 60%, míg lizozim esetében - ahol legje-
lentősebb a csökkenés - 60°C-on az intenzitás a
15°C-on mért intenzitásnak csak 30%-a. Hasonló
eredményekre jutott STEINER és EDELHOCH /4; 23/
a pepszin, kimotripszin, gammaglobulin és lizo-
zim esetében is. Minden esetben a fluoreszcencia
intenzitásnak a hőmérséklet emelkedésével való
monoton csökkenését figyelték meg, ha a tanulmá-
nyozott hőmérsékleti tartományban nem lép fel
strukturális változás. A termikusan indukált struk-
turális változások könnyen felismerhetők a gör-
bék menetének egy adott hőmérsékleten való hir-
telen megváltozásából, ez a változás az átmenet-
tet jelzi.

a. A fluoreszcencia intenzitás-hőmérséklet görbe
meredekségének a megváltozása: azt tapasztal-



1. ábra

ták, növekvő hőmérséklet esetén a fluoreszcencia intenzitás monoton csökkenésénél észlelt jelentősebb kioltás, a görbe meredekségének gyors megnövekedése, az intenzitás gyors csökkenése pep-szinogén oldat esetében is strukturális átmenetre utal /11/. A gammaglobulin esetében is megváltozik a görbe meredeksége, a fluoreszcenciaintenzitás gyors növekedése következik be a hődenaturációnak megfelelő hőmérsékleti intervallumban. Ugyancsak a fluoreszcencia intenzitás éles növekedése következik be a ribonukleáz esetében is /5/, amely tirozin fluoreszcenciával rendelkezik. A hőmérséklet további növelése a fluoreszcencia intenzitás ismételt csökkenését eredményezi.

- b. Az irreverzibilitás megjelenése: STEINER és EDELHOCH /4/ azt találta, hogy gammaglobulin esetében pH=7,0-nál a fluoreszcenciaintenzitás lineárisan csökken a hőmérséklettel 60°C-ig és a változás reverzibilis, azonban pH=11,8-nál a görbe eltér az előbbitől, bár lineáris, de csak 35°C-ig reverzibilis. Magasabb hőmérsékleteken az intenzitás kifejezett növekedése lépett fel a konformációs átmenettel egyidőben. Ekkor a visszahűtéssel kapott görbe már nem veszi fel az

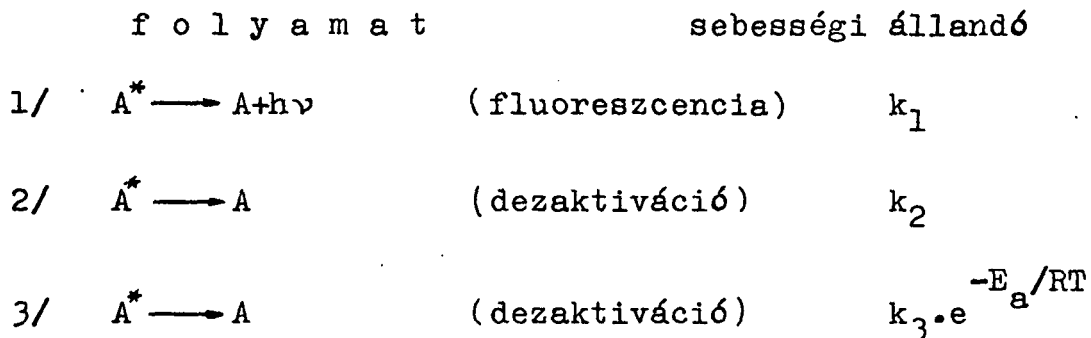
eredeti értékeket, lineáris, és az eredeti görbe felett halad. Ribonukleáz esetén /5/ hűtéskor a fluoreszcenciaintenzitás-hőmérséklet görbe hasonló menetű, mint melegítéskor, azonban a megfordíthatóság nem teljes.

- c. Az időtől függő intenzitásváltozás is konformációs átmenetre utal. PERLMAN /24/ különböző koncentrációju pepszinogén oldatok fluoreszcenciáját, biológiai aktivitását, optikai balrafordítását vizsgálta, mint a hőmérséklet függvényét. Azt kapta, hogy 60°C-ra történő egyszeri felmelegítés után a fluoreszcenciaintenzitás és a biológiai aktivitás is visszahütéskor teljesen helyreállt. A felmelegítést egymás után ötször megismételve visszahűtés után a fluoreszcencia intenzitás 64%-ra csökkent és 70%-ra csökkent a pepszinogén aktivitása is. Ez bizonyos strukturális változásokra utal.

A dezaktivációs folyamat E_a aktiválási energiája és sebességi konstansai

Az aminosavak és fehérjék esetében ugyanugy, mint más szerves anyagok esetében a fluoreszcencia kvantumhatásfoka és élettartama a hőmérséklet növelésével csökken. Általában két fajta sugárzás nél-

küli dezaktivációs folyamatot tételeznek fel, /3; 20/
amelyek a következő séma szerint értelmezhetők:



ahol A^* a molekulát gerjesztett állapotban jelenti,
 $h\nu$ az emittált fény kvantum energia, R a gázállandó, T pe-
dig az abszolút hőmérséklet.

A 2/ alatti dezaktivációs folyamatnak k_2 sebes-
ségi állandója és elhanyagolhatóan kicsiny aktivációs
energiája van. A 3/ alatti folyamatnak E_a aktiválási
energiája is van. Ezt úgy értelmezhetjük, mint az el-
ső szingulett gerjesztett állapot rezgési szintje és
azon energiaállapot közti energia különbséget, ahol a
gerjesztett szingulett és alap, vagy triplett álla-
pot energia felületei metszik egymást.

Ha η_q az abszolút kvantumhatásfok, akkor /3; 20/
szerint felírható

$$\eta_q = \frac{1}{1 + K + k \cdot e^{-E_a/RT}} \quad (1,1)$$

ahol $K = k_2/k_1$ és $k = k_3/k_1$.

A fluoreszcencia hatásfok hőmérsékleti függéséből megállapítható az aktiválási energia és a K , valamint k konstansok értékei.

Feltételezhető, hogy a mért I relatív fluoreszcencia intenzitás arányos az η_q abszolút kvantumhatásfokkal $\eta_q = c \cdot I$, ahol c az arányossági tényező. Ezt figyelembe véve (1,1)-ből

$$\frac{1}{I} = c \left(\frac{k_2}{k_1} + 1 \right) + c \cdot \frac{k_3}{k_1} \cdot e^{-E_a/RT} . \quad (1,2)$$

Ebből következik, hogy

$$\ln \frac{d(-\frac{1}{I})}{d\frac{1}{T}} = \ln \left(\frac{ck_3 E_a}{k_1 R} \right) - \frac{E_a}{RT} \quad (1,3)$$

A $\frac{d(-1/I)}{d(1/T)}$ differenciálhányados értékeit grafikusán határozhatjuk meg úgy, hogy mérjük a görbe negatív iránytangensét az $1/I$ -t az $1/T$ függvényében ábrázolva. Az (1,3) egyenlet szerint az $\ln \frac{d(-1/I)}{d(1/T)}$ ábrázolása az $1/T$ függvényében egy $-E_a/R$ meredekségű egyenes vonalat kell, hogy adjon $\ln(ck_3 E_a/k_1 R)$ tengelymetszettel.

Az aktiválási energia és a sebességi konstansok

ismeretében meghatározhatjuk a F szabad aktiválási energiát, ΔH entalpiát és ΔS -t, az aktiválás entrópiáját.

$$k = \frac{k' \cdot T}{h} \cdot e^{-\frac{\Delta F}{RT}}$$

ahol h a Planck-féle állandó, k' pedig a Boltzmann állandó.

A ΔH $\Delta H = E_a - RT$ egyenletből, a

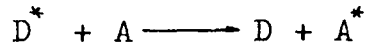
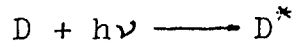
ΔS entrópia érték pedig a

$\Delta F = \Delta H - T\Delta S$ összefüggésből számítható.

Hőmérséklet hatása az elektron gerjesztési energiaátadásra

Az elektron gerjesztési energia átadásának nagy szerepe van a biológiai folyamatokban, így a fehérje rendszerekben létrejövő fluoreszcencia jelenségekben is. Mint ismeretes az energiaátadás lényege abban áll, hogy a rendszer egyik gerjesztetlen molekulája (D , donor) pl. foton abszorpciója útján energiát vesz fel, gerjesztetté válik (D^*), majd energiáját átadja egy másik, eredetileg gerjesztetlen molekulának (A akceptor) és eközben D fluoreszcenciája kioltódik. Ennek

sémája



E kioltás jellemezhető FÖRSTER /25/ egyenletével
Ugyanis a D és A között a gerjesztési energia át-
adásának valószínűsége

$$n_{D^* \rightarrow A} = \frac{1}{\tau_{oD}} \left(\frac{R_o}{R} \right)^6 \quad (1,4)$$

ahol τ_{oD} a donor (D) molekula gerjesztett állapotának
a csillapodási ideje a kioltók (A) távollétében
R a gerjesztett molekula (D*) és az akceptor (A)
molekula közti távolság

R_o az un. kritikus távolság, amely a két mole-
kula között azt a távolságot jelenti, amely-
re az energiaátmenetnek ugyanaz az $1/\tau$ a gya-
korisága, mint amekkora a primér gerjesztett
molekulák kisugárzásának a gyakorisága.

Az R_o az

$$R_o = \sqrt[6]{\frac{9k^2 (\ln 10)^2 \cdot c^2 \cdot \tau_{oD} \cdot I_D}{16\pi^4 n^2 (N')^2 \nu_o^2}} \quad (1,5)$$

összefüggésből határozható meg, ahol

- c a vákuumbeli fénysebesség
 τ_{OD} a donor csillapodási ideje (A távollétében)
 n az oldat törésmutatója
 N' 1 millimol térfogatban lévő molekulák száma
 κ orientációs faktor, amelyre $\overline{\kappa^2} = \frac{2}{3}$
 $\bar{\nu}_0$ a tisztá elektronátmenet hullámszáma
 $I_{\bar{\nu}}$ az átfedési integrál, amelyet a következő egyenlet ad meg

$$I_{\bar{\nu}} = \int_0^{\infty} \epsilon_L(\nu) \cdot \epsilon_D(2\bar{\nu}_{OD} - \bar{\nu}) d\bar{\nu}. \quad (1,6)$$

A $\bar{\nu}_0$ és az $I_{\bar{\nu}}$ meghatározásához szükséges az abszorpciós és emissziós spektrumok ismerete. Ezeknél általában nehézséget jelent, hogy a spektrofotométerek könnyebb leolvashatósága miatt az emissziós és az abszorpciós szinképek a λ függvényében vannak felvéve, ill. ábrázolva.

Az energiavándorlás kritikus távolságait aromás aminosavaknál több szerző is vizsgálta (Karreman, Steele, Szt. Györgyi), akik eredményeit KONEV /26/ foglalta össze a különböző donor-akceptor párok esetén. Ugyancsak KONEV közölte /36/ azokat az adatokat is, amelyeket triptofán molekulák közötti energiavándorlás esetén a kritikus távolságokra kapott különböző

proteineknél. Ezek az értékek az egyes aminosavak közötti energiavándorlás esetén 6,3-16 Å-ig terjednek. Proteinek esetén ez az állandó függ a lumineszkáló aromás aminosav maradékoknak egymásközi távolságától a fehérje molekulán, függ továbbá az egyes fehérje molekulák egymásközötti elhelyezkedésétől is. Mindezek ellenére a proteinben a triptofánra vonatkozó R_0 értékei is 15-25 Å között vannak (KONEV /26/ , STEINBERG /27/), kivéve a hemproteideket, ahol az R_0 érték 50 Å is lehet WEBER, TEALE /28/.

A különböző proteineknél a fluoreszcencia jellemzőkre kapott eredmények

Több szerző foglalkozott a lizozim fluoreszcencia jellemzőinek hőmérséklet okozta változásával. GALLY és EDELMAN /3/ eredményeivel megegyezően JOLY /29/, TUROVEROV és munkatársai /19/, KONEV /14/ és CHEN /6/ is arra a megállapításra jutottak, hogy a lizozim termikus kioltási görbéje 15^o-55^oC-ig pH=2,3 és 6,4 között majdnem lineáris, /4/-ben függetlennek találtak pH=6,0 és 8,5 között. A fluoreszcencia intenzitás hőmérséklettel való változásának lineáris volta összhangban van azzal, hogy ebben a pH tartományban a hőmérsékletemelkedés nem eredményez strukturális változást /30; 31/. Ebben a hőmérsékleti tartomány-

ban a változások reverzibilisnek mutatkoztak. JOLY /29/ szerint a lizozimnak maximális hőstabilitása van pH=5,5-nél. Ezek az eredmények arra mutatnak, hogy a hőmérsékleti hatásokat tulajdonképpen a pH-k figyelembe vételével kell vizsgálni, ugyanis a hőmérséklet okozta konformációs átmenetek helye függ a közeg pH-jától. Savas közegben az átmeneti hőmérsékletek eltolódnak az alacsonyabb értékek felé /3; 4; 20/. A lizozimnál a konformáció gyakorlatilag független a pH-tól. pH=2-pH=8,5 intervallumban.

A lizozim esetében követni lehetett ebben a hőmérsékleti intervallumban kb. 60°C-ig a hőmérséklet hatását a fluoreszcencia intenzitásra. Minden esetben, minden magasabb hőmérsékleten változott a fluoreszcencia intenzitás értéke, azonban anélkül, hogy a görbe alakja és maximumhelye megváltozott volna.

A tripszin esetében a fluoreszcencia intenzitások hőmérsékleti függését több szerző is vizsgálta /21; 22/. Az irodalmi adatokkal egyezésben az optikai forgatás és az UV fluoreszcenciaspektrum kéthullámu regisztrációjának módszerével 49-62°C hőmérsékleti tartományban konformációs átmenetet mutattak ki. A tripszin fluoreszcencia intenzitásának hőmérsékleti függése mellett felvették az egész hőmérsékleti intervallumban a fluoreszcencia spektrumokat, és azt tapasztal-

ták, hogy 49°C-ig a fluoreszcencia spektrum helyzete és formája változatlan ($\lambda_{\max}=333$ nm), további melegítésnél pedig a szinkép a hosszuhullámok felé eltolódik. A spektrum eltolódása 62°C-nál ($\lambda_{\max}=347$ nm) a maximális, 14 nm és ezen a hőmérsékleten a spektrum sávszélessége már lényegesen nagyobb a nativ tripszin oldatéhoz képest.

A humán szérumalbumin esetében is a fluoreszcencia spektrum eltolódását tapasztalták az 50-70°C tartományban /21/, de itt a spektrum a rövidhullámok felé tolódott el kb. 8 nm-rel. Ezt az eltolódást szintén a makromolekulák hőmérsékleti denaturációjával lehet kapcsolatba hozni, ugyanis 50-70°C hőmérsékleti intervallumban a humán szérumalbumin konformációs átalakulást szenved. A spektrum formáját tekintve keveset különbözik a nativ fehérjék fluoreszcencia spektrumától, de a fluoreszcencia spektrumban a tirozin maradványok fluoreszcenciájának a megnövekedése kíséri a hődenaturációt. Ugyancsak jelentős hosszuhullámu eltolódást tapasztaltak kimotripszin esetében is /5/. A fluoreszcencia intenzitás hőmérsékleti függését mutató görbéjének a meredeksége 47°C-nál megváltozott és az emissziós maximum a hosszabb hullámok felé kezdett eltolódni. Az eredetileg 335 nm-es csucs eltolódott egészen 355 nm-ig. Visszahűtéskor a maximum helye

változatlanul 355 nm maradt, a fluoreszcencia intenzitás növekedett ugyan, de nem érte el az eredeti értékeket. Kimotripszin esetében a spektrofotometriás mérésekkel párhuzamosan végzett aktivitásmérések eredménye az volt, hogy az aktivitás maximuma 38°C-nál van, itt azonban nem jelent meg semmiféle változás sem a fluoreszcencia spektrumban, sem az intenzitás csökkenésében. A 38°C feletti aktivitásértékek gyorsan csökkentek és a 47°C felett inaktív vá váló enzimet visszahűtve az eredeti aktivitását teljes mértékben nem nyeri vissza /32/.

A proteinek közül viszonylag kevés az, amely a tirozin maradékokból eredő fluoreszcencia spektrummal rendelkezik. Ezek közül főleg a ribonukleázt és az inzulint vizsgálták részletesebben. GALLY és EDELMAN /3/ vizsgálataival egyezően BARENBOIM és munkatársai /22/, TUROVEROV és SELKOV /5/ ribonukleáz vizsgálata során azt figyelte meg, hogy a ribonukleáz tirozin maradékainak fluoreszcencia intenzitása a hőmérséklet emelésével egy ideig csökken (kb. 60°C-ig), majd növekedik egy kis tartományban (60-65°C), ezzel egy olyan strukturális átmenetet tükrözve, amelyet más kutatók más módszerek alkalmazásával is megfigyeltek (pl. Harrington és Schelman 1956-ban az optikai forgatás vizsgálata során). Ez az átmeneti intervallum a pH értékek változásával eltolódott, pl. pH=2,5-nél

29-42°C, és pH=3,15-nél 35-52°C közötti hőfoktartományra. A ribonukleáz fluoreszcenciájának kvantumhatásfoka növekedett abban a hőmérsékleti tartományban, ahol a strukturája megváltozott /19/.

Az ugyancsak tirozin maradványok fluoreszcenciájával rendelkező inzulin fluoreszcencia intenzitása szintén monoton csökken a 20-80°C hőmérsékleti tartományban. Ez a hőmérsékleti függés teljesen reverzibilis és független a közeg pH-jától, vagyis a fluoreszcenciás módszerrel kapott adatok arról tanuskodnak, hogy inzulin esetében nincsenek strukturális változások a 80°C-ig történő melegítésnél /5/. Az eddigi adatokból is nyilvánvaló, hogy bár a vizsgált proteinek mind a triptofán és a tirozin tartalmuk miatt rendelkeznek belső UV fluoreszcenciával, a vizsgált fehérjék mégis széles eltérést mutattak a fluoreszcencia jellemzők tekintetében.

A fentiek alapján összefoglalóan kimondhatjuk, hogy a fluoreszcencia jellemzők hőmérsékleti függésének a vizsgálata lehetővé teszi:

- a/ a makromolekula konform átalakulásának és az átalakulás hőmérsékleti intervallumának a meghatározását
- b/ információ szerzését a konformációs átmenet

megfordíthatóságáról, egyes esetekben annak jellegéről

c/ az átmenet termodinamikai paramétereinek meghatározását.

A fluoreszcenciás módszer lényeges előnye, hogy nagyon kis mennyiségű anyagra van szükség (pl. PERLMAN /24/ 1 %-os pepszinogén oldatot használt az optikai forgatás tanulmányozásához és 0,025%-os oldatot a fluoreszcencia tanulmányozására). Pikogramm mennyiségekből is jelentek már meg közlemények /15/. A módszer további lényeges előnye, hogy a fluoreszcenciás mérések viszonylag könnyen elvégezhetők, még az élő sejtekben történő strukturális újrendeződések tanulmányozását is lehetővé teszik. (Pl. STRANKFELD 1964-ben fel is használta a fluoreszcenciás módszert izomszövet esetén a hőmérséklet hatására beálló változások tanulmányozására /19/.)

2.§. KISÉRLETI MÓDSZEREK

2.1. Az abszorpciós spektrum meghatározása

Az abszorpciós szinkép felvételéhez Optica Milano CF4DR típusu regisztráló spektrofotométert használtunk. (A spektrofotométer feloldóképessége $\delta\lambda < 0,2$ mm sáv-szélességnek felel meg, mérési pontossága $\pm 0,15\%$. Ezen a $\lg I_0/I$ dekadikus extinkciós koefficiens olvasható le különböző hullámhossznál. Ebből az abszorpciós együttható az ismert módon adódik:

$$k(\lambda) = 2,3026 \cdot \frac{1}{l} \cdot \lg \frac{I_0}{I} \quad (2,1)$$

Az abszorpciós spektrum felvételénél a kívánt hőmérséklet beállítását temperálható küvettával oldottuk meg, Höppler-féle ultratermosztát segítségével. A vizsgált $273-373^\circ\text{K}$ hőmérsékleti tartományban a küvettában lévő oldat hőmérséklete $\pm 0,5^\circ\text{C}$ hibahatáron belül megegyezett a termosztátban lévő víz hőmérsékletével.

2.2. Az emissziós spektrum felvétele

Közvetlen méréssel a külső fluoreszcencia spektrum határozható meg, ebből számítással nyerhető a valódi

spektrum. A külső fluoreszcencia spektrum felvételére a JATE Biofizikai Tanszékén összeállított /33/ ultraibolya spektrofluorimétert használtuk. A gerjesztő fényt egy XBO 450 W/4 típusu nagynyomású xenon lámpa szolgáltatta. A gerjesztő fénysugárra merőlegesen kilépő lumineszcencia fényt EMI 9558/QA típusu fotoelektronsokszorozóval mértük. A fotoáramot Kipp and Zonen AL 3 galvanométeren olvastuk le. A valódi fluoreszcenciaspektrum meghatározásánál figyelembe kell venni a reabszorpciót és a némelykor nem elhanyagolható intenzitású szekunder fluoreszcenciát /34/. A spektrofluoriméterrel meghatározott fluoreszcencia intenzitásokból $I_f(\lambda')$ a valódi, reabszorpcióra korrigált spektrumot $f_q(\lambda')$ a következő formulával határozhatjuk meg /25/

$$f_q(\lambda) = c Q(\lambda) \cdot I_f(\lambda) \cdot \psi \quad (2,2)$$

ahol c a konstans, az optikai elrendezéstől és a spektrofluoriméter adataitól függ; a fluoreszcenciafény λ' hullámhosszától nem. $I_f(\lambda')$ a készülék fotoelektronsokszorozója által mért fluoreszcencia intenzitás; $Q(\lambda)$: pedig a spektrofotométer érzékenységi függvényét jelenti; ψ a reabszorpciós korrekció, amelynek értéke merőleges megfigyelés esetén

$$y = \frac{\alpha + \beta}{1 - e^{-(\alpha + \beta) \cdot l}}$$

ahol $\alpha = k(\lambda) \cdot l$ és $\beta = k(\lambda') \cdot l$, amelynél λ a gerjesztő, λ' a fluoreszcenciaspektrum tartományát futja be.

Vizsgálatainknál a szekunder fluoreszcencia spektrális hatása a $k(\lambda)_{\max} \cdot l < 0,5$ feltétel betartása miatt /35/ szerint a mérési hiba határán belül van, így számítás útján nem kell figyelembe venni.

Az oldat kivánt hőmérsékletét temperálható követ-tatartóban ultratermosztáttal cirkuláltatott vízzel biztosítottuk. A hőmérsékletet TG-10 típusu termisz-torral mértük hid kapcsolásban, $0,5^{\circ}\text{C}$ leolvasási pon-tossággal.

A fluoreszcencia spektrumok egy részét a Sze-gedi Biológiai Központ Perkin-Elmer MPF-3 spektro-fluoriméterrel vettük fel.

A fluoreszcencia intenzitások mérésekor a kü-lönböző időben, hőmérsékleten és gerjesztő hullám-hossz mellett felvett fluoreszcencia szinképek össze-hasonlíthatósága céljából a méréseknél összehasonlí-tó standardot alkalmaztunk. A standard diaminoakri-din $5 \times 10^{-5} \text{M}$ koncentrációju szilárd polimetil metak-

rilát oldatából készült 1 cm vastagságu lemez volt, ennek fluoreszcenciája 300 nm-től kezdve a hosszabb hullámok felé a vizsgálatokhoz szükséges tartományban mindenütt fellépett ultraibolya gerjesztésre. Továbbá a fluoreszcencia szinképek felvételekor egy mérési sorozatnál ellenőriztük az oldatokat abból a szempontból, hogy történik-e változás (bomlás) az oldatban fény hatására. Az emissziómérés előtt és utána felvett abszorpciós spektrumok azonossága alapján megállapítottuk, hogy az oldatban ilyen változás nem következett be. Emissziós méréseinket többször megismételtük és a kísérleti eredmények értékelésekor az eredmények középértékeit használtuk fel. A mérések 5% hibahatáron belül reprodukálhatók voltak.

2.3. A fluoreszcencia relatív hatásfokának meghatározása

Méréseink során az η/η_0 relatív hatásfokkal megegyező menetű I/I_0 relatív intenzitásviszonyokat határoztuk meg a /36/-ban adott módon a lumineszcenciaspektrum felvételére használt készülékkel. A küvettatartóba felváltva 1 cm rétegvastagságu oldatokkal telt küvettákat, majd összehasonlító plexit helyeztünk. Ezeket az emissziós spektrum felvételekor használt hullámhosszuságu fénnel gerjesztettük és

a lumineszcenciaspektrum maximumhelyén mértük a fényintenzitásokkal arányos fotoáramokat, majd ezekből az adatokból számítással meghatároztuk az I/I_0 értékeket.

2.4. Enzimaktivitásmérés

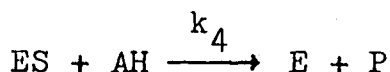
Mindkét anyag esetében az aktivitásváltozással együtt a szubsztrát-enzim kölcsönhatás következtében létrejövő transzmisszió, ill. optikai denzitás változását mértük az Optica Milano CF4DR regisztráló spektrofotométerrel. A lizozim-oldat aktivitását /37/ alapján, a peroxidázét pedig /38; 15/ alapján vizsgáltuk. Szubsztrátként lizozim esetében *Micrococcus Lysodeikticus* 6,24; 7,1 és 8,04 pH-ju foszfátpufferes oldatát használtuk. Az 1 cm-es kuvettába bemértünk 3 ml szubsztrát oldatot és ehhez adtunk 0,3 ml enzim-oldatot. A hozzáadás pillanatától kezdve nő a transzmisszió, amelyet 650 nm-nél figyeltünk meg. A különböző hőmérsékleteken végzett mérések eredményeiből az enzimaktivitásra jellemző mennyiség a következőképp számítható:

$$[a] = \frac{10^5}{\Delta t \cdot c} \quad \left[\frac{\text{liter}}{\text{M} \cdot \text{s}} \right] \quad (2,3)$$

ahol Δt_{40} a 40%-os transzmissziónövekedéshez tartozó

idő, c a tényleges enzimkoncentráció, amely a szubsztráthoz való hozzáadáskor alakul ki.

A peroxidáz oldat esetében az aktivitás a hidrogénperoxid bomlása alapján határozható meg. A bomlási folyamat követésére olyan könnyen oxidálható anyagot alkalmaztunk, amely színes terméket eredményez, így a folyamat fotometriásan is követhető. Alkalmasan választva az egyes komponensek koncentrációit az oxidáció sebességét az utolsó lépés határozza meg:



ahol ES az enzim-szubsztrát komplex; H a hidrogén donor, P az oxidációs termék; k_4 az enzim aktivitásának a mértékeként alkalmas sebességi állandó. Vizsgálatainkban a szubsztrát a hidrogénperoxid, a hidrogén donor a guajakol oldat, a termék pedig a tetraguajakol. Az optikai denzitásváltozást 470 nm-nél figyeltük meg. A megfelelő koncentrációkat és mennyiségeket felhasználva a k_4 konstansot a következő összefüggés szerint számítottuk.

$$k_4 \approx \frac{1}{a_0 e} \cdot \frac{\Delta x}{\Delta t} \quad (2,4)$$

ahol Δx a Δt idő alatt bekövetkezett denzitásnövekedés,

a_0 a donor kezdeti koncentrációja, e pedig a tényleges enzimkoncentráció. Ha a következő mennyiségeket vesszük: enzimoldat 2,9 ml; guajakol 0,05 ml; és a megfigyeléskor a hidrogénperoxid oldatból 1-2 csepp, a denzitásváltozás elég gyorsan bekövetkezik.

2.5. Egyéb mérések

1. sűrűségmérés: A vizsgált oldatok sűrűségét piknométerrel határoztuk meg, a kívánt hőmérsékletet vízfürdővel állítottuk elő.
2. törésmutató mérése: A törésmutatót Zeiss-féle Abbé refraktométerrel mértük, termosztáttal beállított különböző hőmérsékleteken.
3. viszkozitásmérés: Az Ubelode-féle kapillárviszkozimétert használtuk, amelyet vízfürdővel temperáltunk.

2.6. A vizsgált rendszerek kiválasztása és összetétele

A hőmérsékletnek az enzim oldat fluoreszcencia jellemzőire gyakorolt hatását két enzim esetében vizsgáltuk. Az egyik a lizozim, a Nutritional Biochemical Corporation (Cleveland) készítménye, háromszor kristályosított, 6.000-10.000 egység/mg aktivitásu, amelynek szerkezete, szekvenciája jól ismert /pl. 33/, és

fluoreszcenciájára viszonylag sok irodalmi adat is a rendelkezésünkre állt, sőt fluoreszcencia jellemzőinek változását is már vizsgálták bizonyos hőmérsékleti tartományban és pH értékek esetén pl /3; 4; 6; 19; 29; 26/. A másik ugyanezen cég liofilizált, háromszor kristályosított tormagyökér peroxidáz (HRP) készítménye. A gyári készítmény 3170 egység/mg aktivitású. A peroxidáz enzim fluoreszcenciáját ezideig kevésbé vizsgálták /7; 39/. A hőmérsékletnek a peroxidáz fluoreszcencia jellemzőire gyakorolt hatására pedig irodalmi adat nem található.

A lizozim 1×10^{-5} M/l koncentrációju foszfátpufferes (pH=6,24; 7,1; 8,04) és triszpufferes (pH=7,0) oldatait vizsgáltuk. A kristályosított tormagyökérperoxidázból pedig 1×10^{-5} M/l koncentrációju neutrális triszpufferes (pH = 7,0) oldatot készítettünk.

Az aktivitásvizsgálatoknál lizozim esetében szubsztrátként a Worthington Biochemical Corporation (Freehold, New Jersey) Micrococcus Lysodeikticus készítményét, peroxidáz esetében pedig a guajakol gyanta oldatát (Riedel- de Hain AG. Seelze-Hannover) használtuk.

Méréseinket 10-95°C hőmérsékleti intervallumban végeztük úgy, hogy a hőmérsékletet 10°C-tól 5°C-on-

ként emeltük, majd az oldatokat visszahűtöttük és
ugyancsak 5°C -onként mértük.

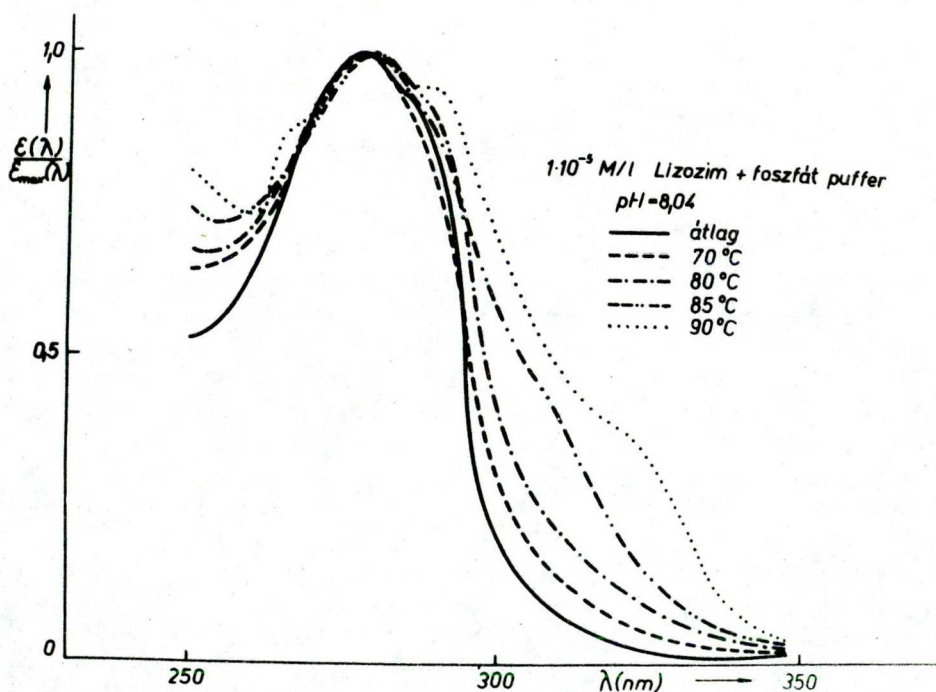
3.§. MÉRÉSI EREDMÉNYEK ISMERTETÉSE. DISZKUSSZIÓ

3.1. Abszorpciós spektrumok

A moláris dekadikus extinkciós koefficienszt egy-egy hőmérsékleten több, egymásután végrehajtott mérés középértéke alapján számítottuk ki, 5 nm-enként és a rétegvastagságot úgy választottuk meg, hogy az optikai denzitás 0,2-0,8 között legyen. A Lambert-Beer törvény méréseink szerint a vizsgált lizozim oldatok esetében igen, a peroxidáz oldatok esetében nem teljesült /39/.

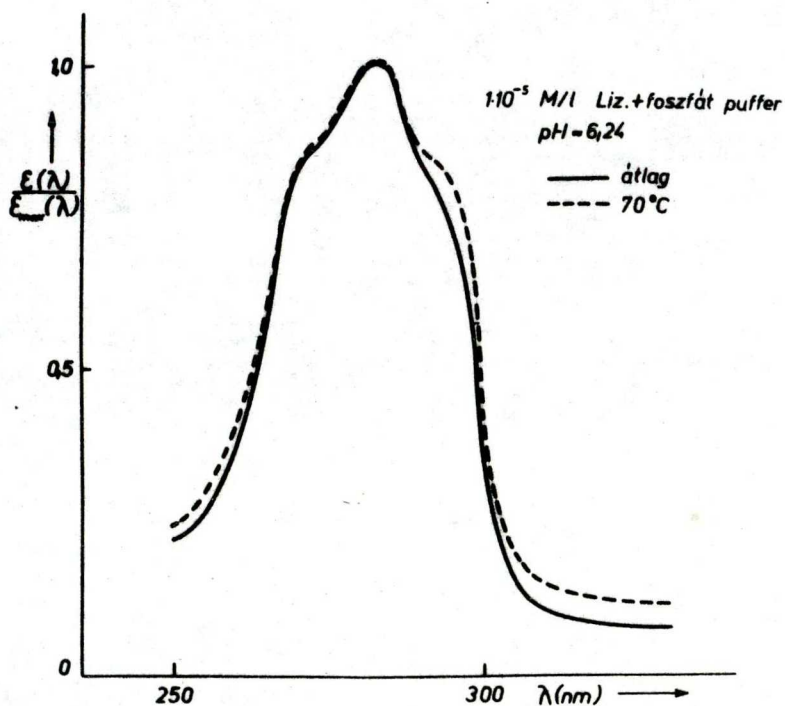
a. Lizozim oldatok esetében kapott eredmények

A 6,24; 7,1 és 8,04 pH-ju foszfátpufferes



2. ábra

1×10^{-5} M/l koncentrációjú lizozim oldatok abszorpciós szinképeit a 2., 3., 4. ábrákon ábrázoltuk. Az 5. ábra pedig a lizozim 1×10^{-5} M/l

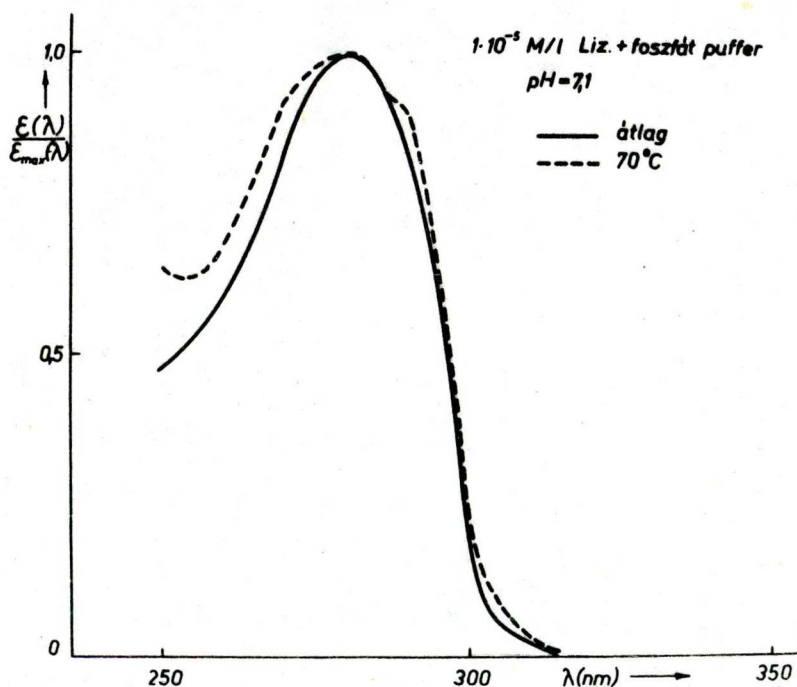


3. ábra

koncentrációjú triszpufferes (pH=7,0) abszorpciós spektrumait mutatja.

A spektrális eloszlás könnyebb összehasonlíthatósága céljából az $\frac{\epsilon(\lambda)}{\epsilon(\lambda)_{\max}}$ relatív ab-

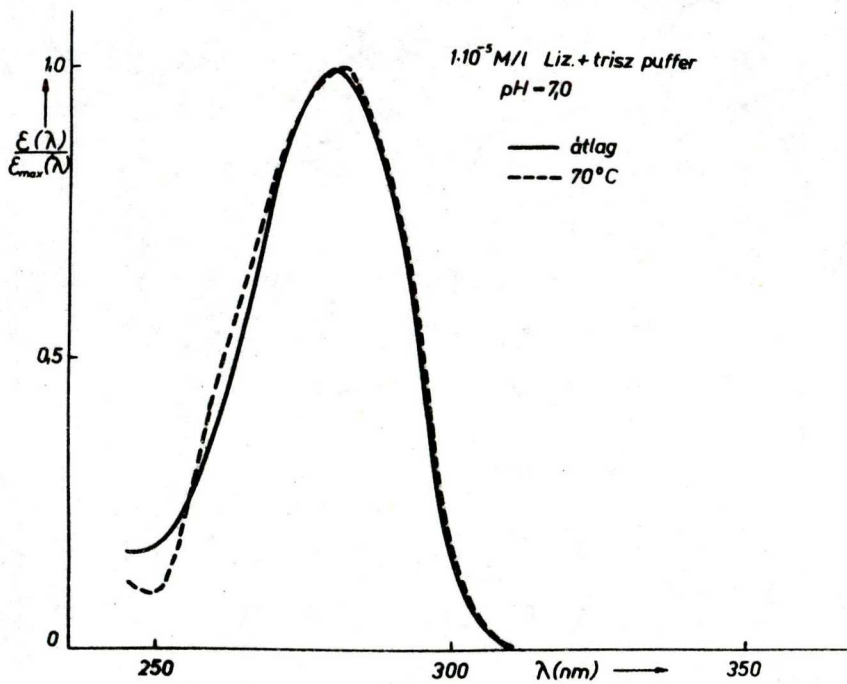
szorpciós spektrumokat adjuk meg. A különböző pH értékeknél, különböző hőmérsékleteken ezek 50°C-ig megegyeztek, így ebben a tartományban az abszorpciós görbéket átlagolni lehetett. Az átlaggörbék szerepelnek az előbbi, 2., 3., 4., 5. áb-



4. ábra

rakon. A mért értékeknek az átlaggörbétől való

legnagyobb eltérése ebben a hőmérsékleti tartományban 3%-nál kisebb volt. A hőmérséklet 50°C feletti további emelése az abszorpciós spektrumok



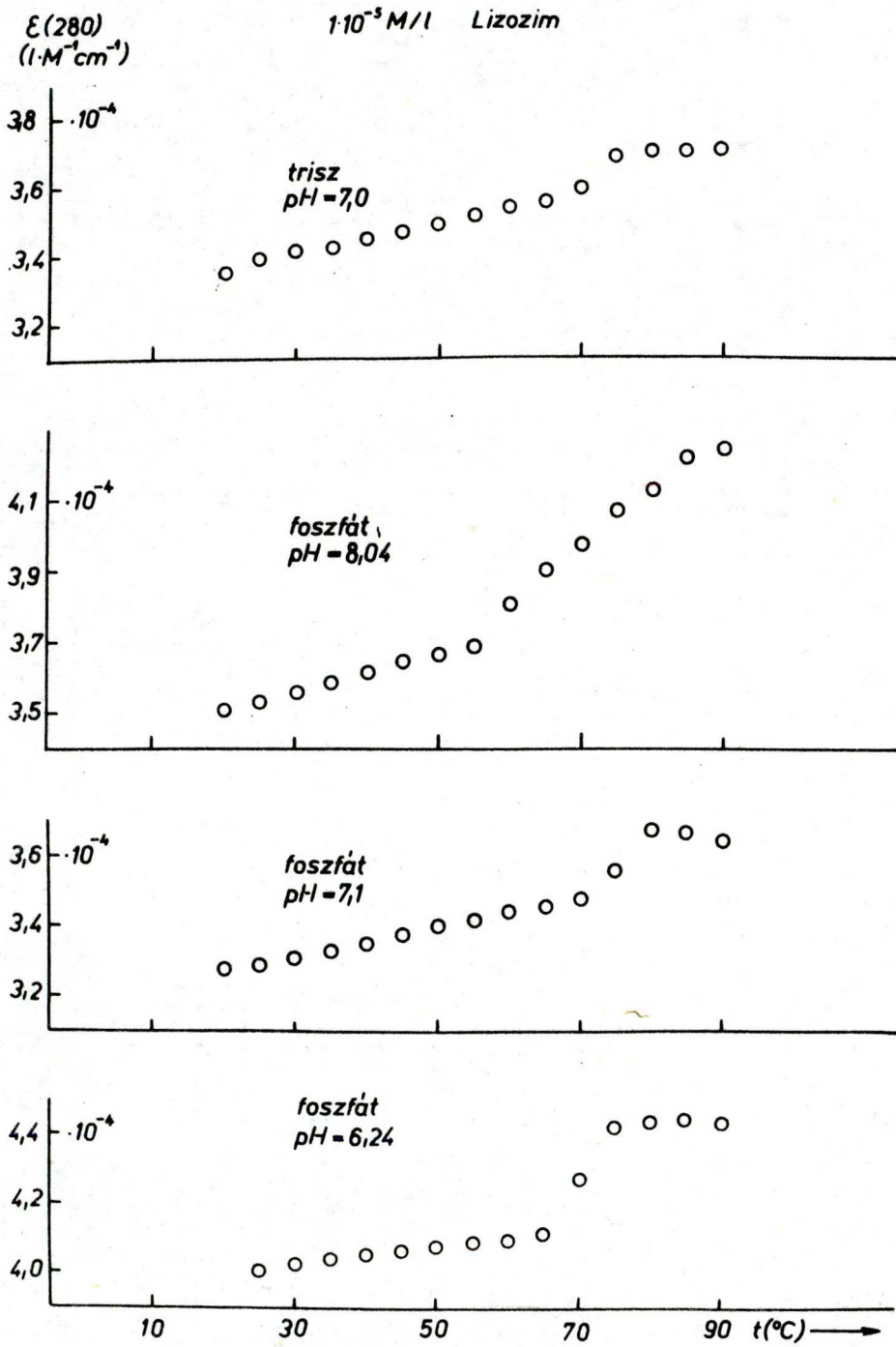
5. ábra

megváltozását eredményezte. Mindegyik oldat esetében ábrázoltuk a 70°C-hoz tartozó relatív szinképet is. Ezen a hőmérsékleten a spektrális

eloszlás már nem felel meg a 50°C -ig történő melegítéskor kapott átlaggörbének, a maximumhely is 2-5 nm eltolódást mutat a hosszabb hullámhosszak felé. A spektrumok a magasabb hőmérsékleten kiszélesednek, a kiszélesedés a 8,04 foszfát pufferes oldat esetén jelentős. Ennél az oldatnál a hőmérséklet emelésével 320 nm körül abszorbeáló komponens is megjelenik.

Miután a lizozim a triptofánt tartalmazó fehérjék csoportjába sorolható, így az aminosavtól származó abszorpciós sáv maximuma 280 nm körül van. Ezért a különböző hőmérsékleteken történt mérésekkor, a 280 nm-nél kapott tényleges $\xi(280)$ értékeket a különböző pH értékek esetén az 1. táblázatban tüntettük fel. Az $\xi(280)$ változását a 6. ábra mutatja. Az $\xi(280)$ értékek a hőmérséklet emelésével kb. 55°C -ig csekély mértékű növekedést mutatnak. A hőmérséklet további emelésével - 60 - 80°C között - mindegyik oldat esetén az előbbieknél nagyobb arányú növekedés következett be. Ez összhangban van azzal, hogy kb. 60°C -ig a lizozim esetében hőmérséklet hatására strukturális változás nem következik be./3/

A különböző pH értékeknél 6,24; 7,1; 8,04 az iránytényezők, amelyek az 1°C hőmérsékletvál-



6. ábra

1. táblázat

1×10^{-5} M/l lizozim foszfát pufferes oldataink abszorpciós koefficiense $l \cdot M^{-1} \cdot cm^{-1}$ egységekben 280 nm-nél, különböző pH értékeknél a hőmérséklet függvényében

t °C	$280 \cdot 10^{-4}$ l/Mcm		
	pH		
	6,24	7,10	8,04
20		3,27	3,50
25	4,00	3,29	3,53
30	4,03	3,30	3,55
35	4,04	3,33	3,58
40	4,05	3,34	3,62
45	4,06	3,37	3,64
50	4,08	3,40	3,67
55	4,09	3,42	3,68
60	4,10	3,44	3,74
65	4,12	3,46	3,86
70	4,28	3,48	3,93
75	4,42	3,56	4,03
80	4,43	3,67	4,13
85	4,47	3,65	4,21
90	4,52	3,64	4,27

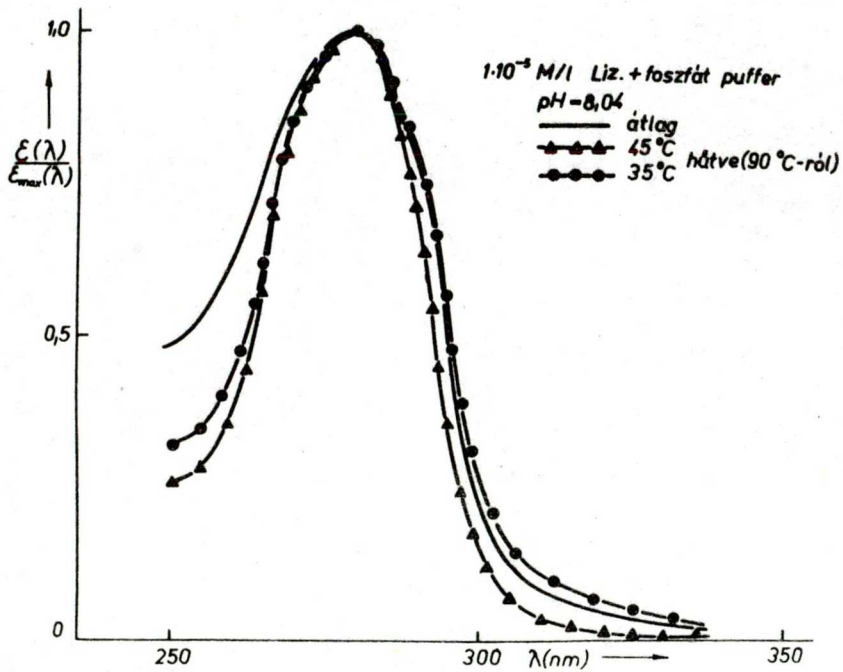
tozás hatására létrejött abszorpcióváltozást jelentik rendre: 0,113; 0,20; 0,26, ill. 55°C felett 1,55; 0,975; 0,883. Triszpufferes lizozim oldat esetén a görbe 55°C-ig 0,21, 55°C felett 0,65 iránytényezőjű egyenessel közelíthető. Az eredményekből kitűnik, hogy a görbék menetében legjelentősebb a változás a pH=6,24 foszfátpufferes oldat esetében, és legcsekélyebb a triszpufferes neutrális oldatnál, bár itt is a kritikus hőmérséklet környékén az iránytényező háromszorosára növekedett, amely az abszorpció ilyen arányu növekedését jelenti.

Tehát a foszfát, ill. triszpufferes oldatok fényabszorpciója a hőmérséklet hatására hasonlóan változik.

Az abszorpciós szinképeket különböző hőmérsékleteken úgy is felvettük, hogy a már 90°C-ra melegített oldatok hűtésekor határoztuk meg azokat. Az így kapott szinképeket a 7., 8. ábrán láthatjuk pH=8,04 foszfát pufferes oldat esetén.

A méréseket a foszfátpufferes oldatok másik két pH értékén és triszpuffer esetében is elvégeztük. Ezeknél a 8,04 pH értékű oldathoz hason-

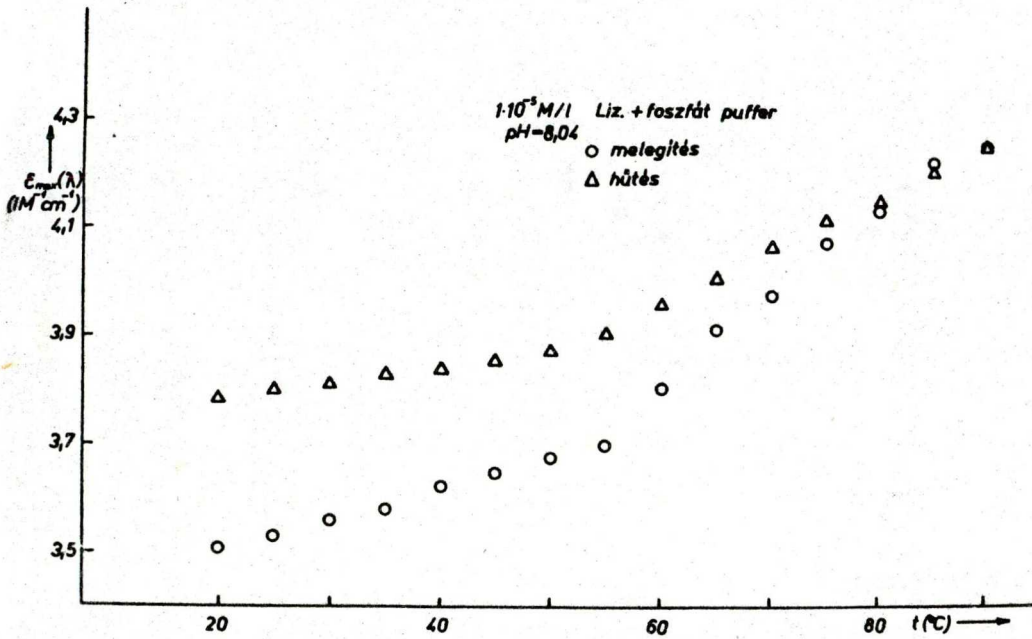
lő viselkedést tapasztaltunk. A tapasztalat szerint hűtéskor az abszorpciós spektrum nem nyeri vissza az ugyanazon a hőfokon melegítéskor mu-



7. ábra

tatott alakját, így az 7. ábrán feltüntetett, hűtéskor mért, 45°C, ill. 35°C-on meghatározott relativ szinkép eltér a melegítéskor kapottól, amely az 50°C-ig történő melegítésnek megfelelő átlaggörbe. Az $\epsilon(280)$ hűtéskor kapott valódi értékeit összevetve a melegítéskor kapott értékekkel, mint az a 8. ábrán is látható, megállapít-

hatjuk, hogy az $\xi(280) = f(T)$ görbe menete a melegítés és a hűtés során hasonló, de ugyanazon a hőmérsékleten magasabb értékeket vesznek fel.



8. ábra

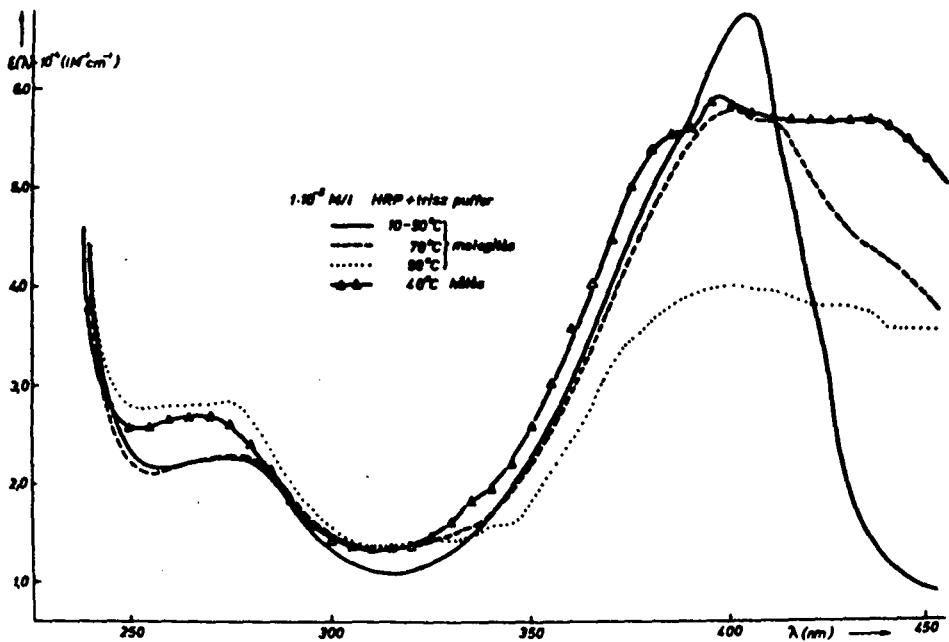
az $\xi(\lambda)$ értékek hűtéskor, mint melegítéskor.

b. A tormagyökér peroxidáz oldat abszorpciós mérési eredményei

A peroxidáz fényelnyelési szinképe hőmérséklet hatására létrejött változásának a vizsgálatakor figyelembe vettük /39/-ben a szobahőmérsékleten végzett méréseket. Ezek szerint a 270-280

nm és 405 nm-es sávok mellett egy viszonylag éles 190 nm-nél fellépő sáv is létezik. Ebben a sávban azonban a triszpufferes oldat abszorpciója a puffer erős abszorpciója miatt még nitrogén atmoszférában sem volt mérhető, így a hőmérsékleti hatás vizsgálatakor a peroxidáz jellemző három fő sáv abszorpció maximumai környezetében létrejött (200; 280; 405 nm) változásokra voltunk figyelemmel. Az 1×10^{-5} M/l koncentrációju HRP triszpufferes (pH-7,0) oldat különböző hőmérsékleten felvett abszorpció spektrumait a 9. ábrán ábrázoltuk 50°C-ig a spektrum alakjában, maximumok helyében és az elnyelés mértékében gyakorlatilag változás nem mutatkozott, így ebben a hőfoktartományban a spektrumoknak az átlagát képeztük, és ezt mutatjuk be a 9. ábrán. Tovább melegítve az oldatot 70°C-on és 90°C-on is felvettük az abszorpció szinképet. A hőmérsékletet 50°C fölé emelve az aminosavaktól származó 280 nm-es abszorpció maximum növekedést mutat, megegyezésben a lizozim oldatnál tapasztaltakkal, a hem csoport abszorpciója 405 nm-nél pedig erős csökkenést mutat a spektrum jellegének jelentős megváltozása mellett. A távolabbi UV sáv viselkedése hasonló az aminosavakéhoz.

Az $\xi(\lambda)$ maximum értékeit a 2. táblázatban közöljük. A valódi $\xi(\lambda)$ értékeket a hőmérséklet függ-



9. ábra

vényében a 10. ábrán mutatjuk be. A mérést 200, 280, ill. 405 nm-nél végeztük.

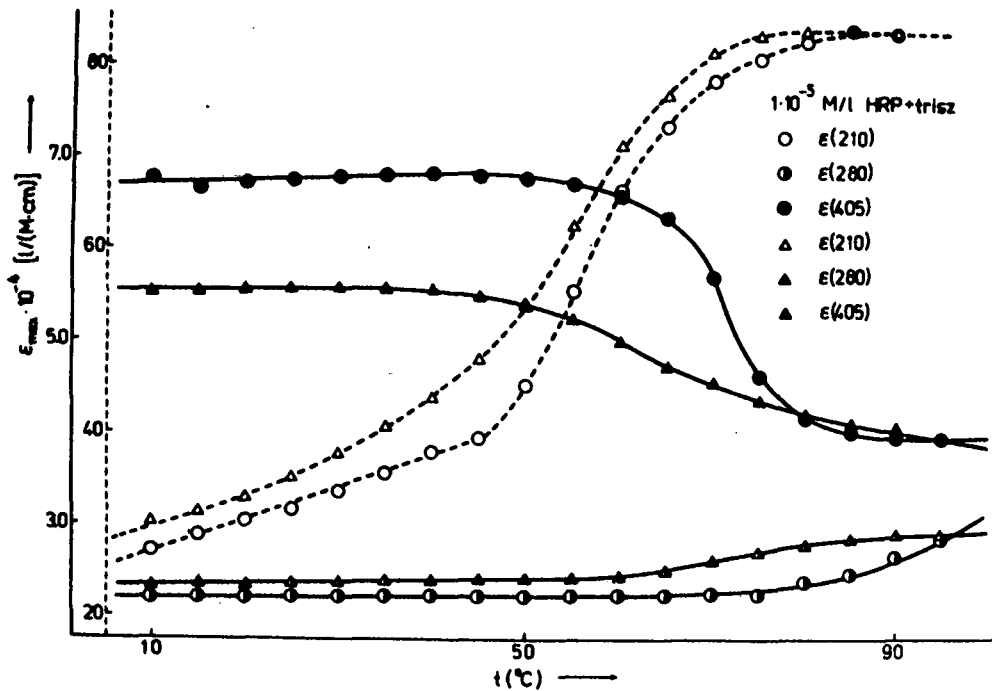
A görbéről megállapítható, hogy a három jellemző sávban a peroxidáz abszorpciós szinképei-nek a maximumai 10-50°C hőmérsékleti tartományban jelentősen nem változtak. A hőmérséklet további növelésével a 200 és 280 nm-nél mért extinkciós koefficiensek lényegében hasonlóan változnak.

2. táblázat

1×10^{-5} M/l HRP triszpufferes oldatának pH=7,0
abszorpciós koefficiensei $1 \cdot M^{-1} \text{cm}^{-1}$ egységekben
különböző megfigyelési hullámhosszaknál a hőmér-
séklet függvényében

$\frac{\epsilon(\lambda)_m}{t^{\circ}\text{C}}$	$\lambda_{\text{megf}}=210\text{nm}$	$\lambda_{\text{megf}}=280\text{nm}$	$\lambda_{\text{megf}}=405\text{nm}$
10	27,2	2,20	6,77
15	28,7	2,20	6,64
20	30,3	2,21	6,69
25	31,6	2,21	6,73
30	33,4	2,21	6,76
35	35,5	2,21	6,77
40	37,8	2,21	6,79
45	39,3	2,22	6,77
50	45,0	2,22	6,74
55	55,1	2,23	6,68
60	65,9	2,23	6,55
65	72,9	2,24	6,31
70	78,0	2,25	5,67
75	80,4	2,27	4,60
80	82,3	2,38	4,15
85	83,7	2,47	4,00
90	83,5	2,64	3,96
95		2,84	3,98

A 10-40°C tartományban nem vagy csak kismértékben növekszik az abszorpció, 40°C felett pedig határozottabban növekszik. A β -naftanol /40/ esetében Passerini és Ross szintén növekedést tapasztalt az abszorpciós szinképben a hőmérséklet emelésével az UV tartományban. A hem csucsánál (405 nm-nél) mért extinkció hasonlóan a festékekénél általában tapasztalt



10. ábra

talt viselkedéshez /41; 42/ a hőmérséklet emelésével csökken. Mindhárom görbe alapján úgy tűnik, hogy a konformációs átmenet kb. 40°C-nál már meg-

kezdődik és 60-75°C tartományban rohamossá válik.

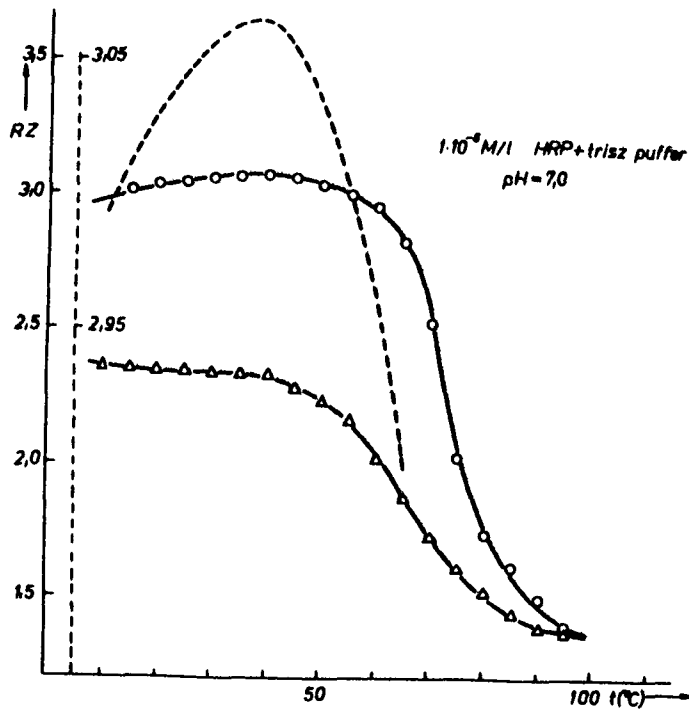
A méréseket úgy is elvégeztük, hogy az oldatokat 90°C-ról visszahűtöttük. Az aminosavakhoz rendelhető abszorpciós maximumok a melegítéskor felvett értékeknél nagyobbakat vettek fel, amelyek 60°C-ig csökkennek és 60°C alatt gyakorlatilag változatlanok. A hem csoport abszorpciója hűtés-kor kb. 45°C-ig növekszik, utána csak csekély mértékben változik a hőmérséklet további csökkentésével, azonban a melegítéskor kapott értékeknél 80°C alatt mindig kisebbek. Ha a hűtést 45°C-ról végezzük, akkor ez a spektrum egybeesik a melegítéskor ebben a tartományban kapottal. Ebből arra lehet következtetni, hogy az enzim 45°C-ig nem szenved konformációs változást, míg ennél magasabb hőmérsékleten az enzim konformációs változást szenved és ez a változás nem reverzibilis.

A peroxidáz abszorpciós szinképe alapján, ahogyan THEORELL /43/ az enzimet jellemző tisztasági fokot (RZ=Reinheit Zahl) megadta, a szinképben talált hem és protein sáv maximumainak hányadosával jellemezhető

$$RZ = \frac{\xi(402)}{\xi(280)} .$$

Mint hogy a Beer-Lambert törvény a peroxidáz oldat

esetén egyik tartományban sem érvényes, a tisztasági fok értéke mellett szükséges megadni azt a koncentrációt is, amely mellett az RZ-t meghatároztuk /7/. Vizsgálataink szerint az RZ értéke a hőmérséklettől is függ. A 2. táblázatban feltüntetett, általunk mért $\xi(405)$ és $\xi(280)$ értékekből a melegítésre, valamint a hűtésre nyert abszorpciós koefficiensek hányadosát ábrázoltuk a 11. ábrán.



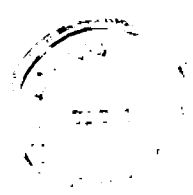
11. ábra

Az ábráról látható, hogy melegítéskor az RZ az

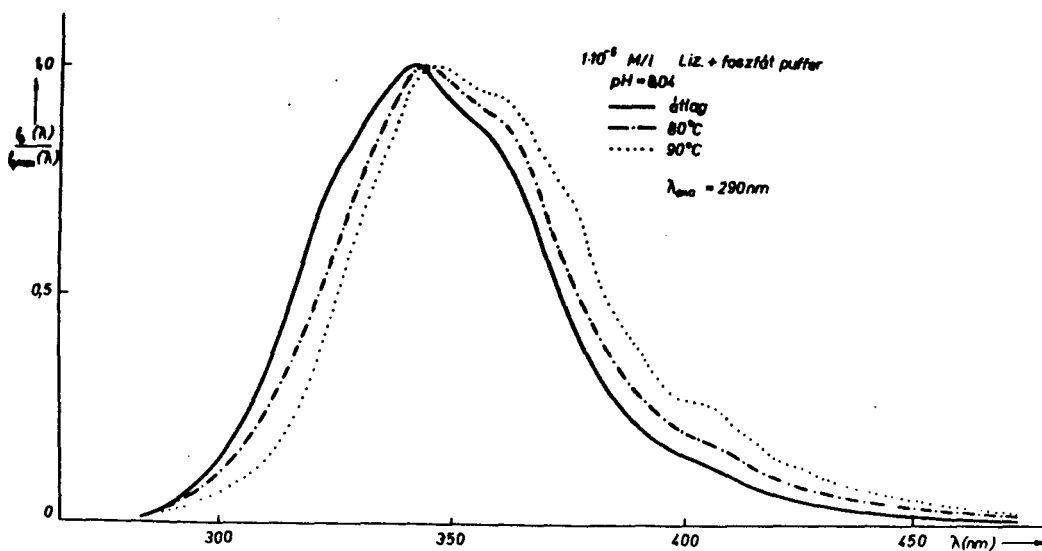
enzim hőoptimumáig ($38,5^{\circ}\text{C}$ -ig) kismértékben, de emelkedik, majd ezt követően a konformációs változás tartományában rohamosan csökken. Visszahűtve, a görbe menete az optimumig hasonló menetet mutat, mint a melegítésre kapott görbe. A hőmérsékleti optimum után azonban enyhén emelkedik, vagy konstans. Ez azzal magyarázható, hogy a denaturálódást követően, mivel a folyamat részben reverzibilis, az enzím részben visszanyeri eredeti biológiai (amit a 22. aktivitási görbe mutat) és optikai tulajdonságát. A rendszer valószínűleg egyensúlyi állapotba jut, azaz a hem és protein maximumok aránya lényegében nem változik.

3.2. Az emissziós mérések eredményei

- a. A 6,24; 7,1 és 8,04 pH-ju foszfátpufferes lizozim oldatok fluoreszcencia szinképeit a 12., 13., 14. ábrák mutatják. Hasonlóan, mint az abszorpciós szinképeknél, itt is azt tapasztaltuk, hogy szobahőmérséklettől kb. 50°C -ig melegítve az oldatokat, a spektrális eloszlás nem változott jelentősen, így az átlagokat képeztük és ezeket ábráztuk. A spektrális eloszlásban eltérés mutatkozott, ha



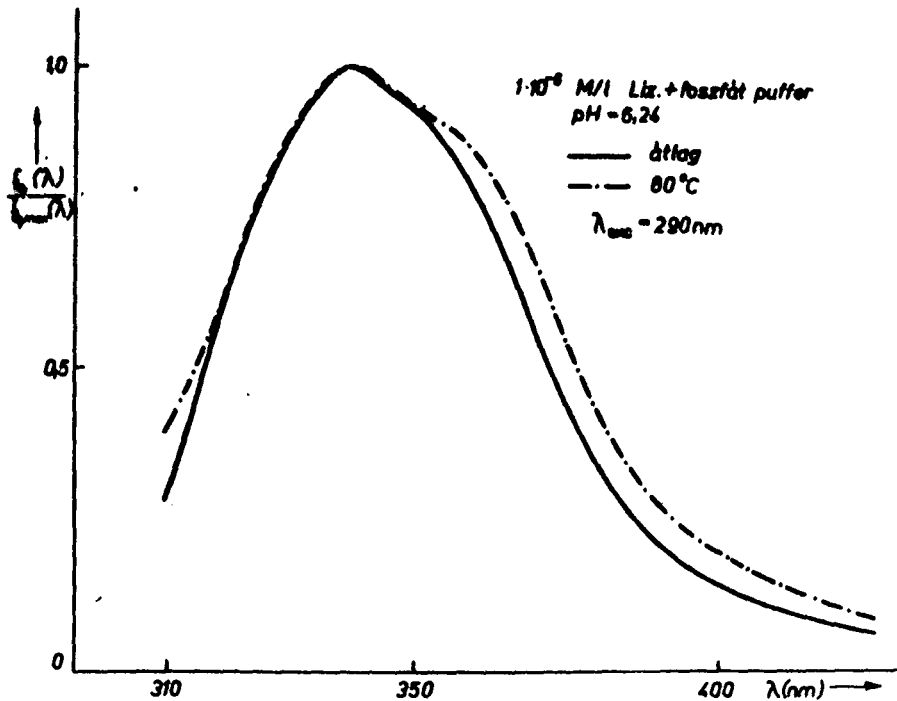
az oldatokat magasabb hőmérsékletre melegítettük. Mint a 13. ábrán is látható, a 60°C-



12. ábra

on mért értékek még elég jól megközelítik az átlagértékeket. Magasabb hőmérsékleten a különbség már jelentősebb, sőt tapasztalható, csekély mértékű maximum eltolódás is - az abszorpciós spektrumokhoz hasonlóan - a hosszabb hullámok felé. A spektrum hosszuhullámu eltolódása BARENBOIM és munkatársai /22/ által a

tripszinre talált eredményekhez hasonlóan egyrészt arról tanuskodik, hogy a triptofán



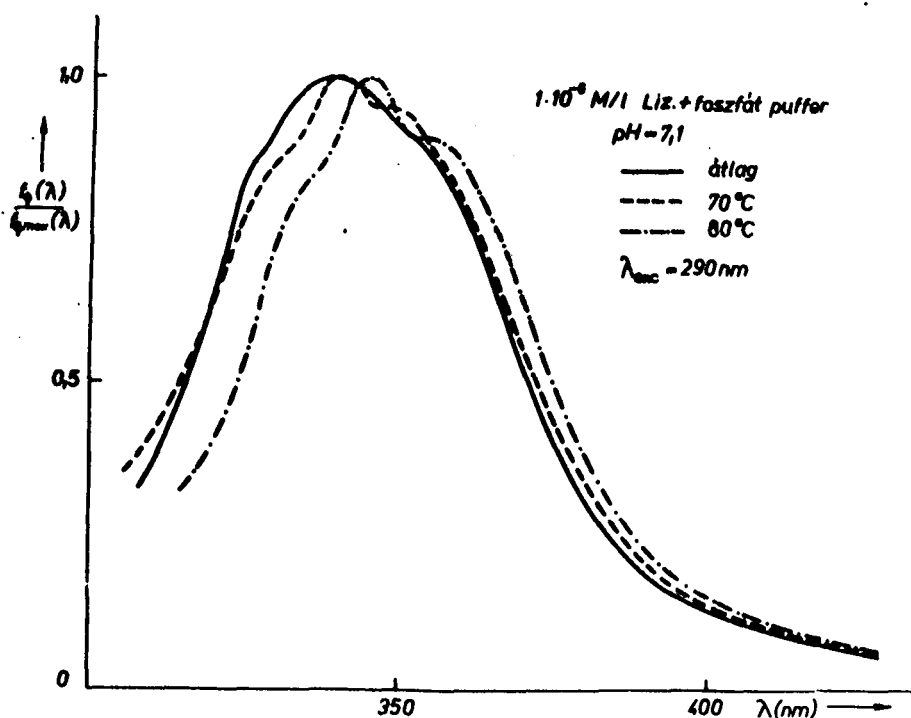
13. ábra

maradványok, melyek a nativ makromolekulánál hidrofob környezetben vannak, átmenet következtében az oldószer számára hozzáférhetővé válnak, amely tehát a globulár makromolekulák szétszakadásáról tanuskodik.

Másrészt oká lehet az is /41/, hogy ha a makromolekula rezgési energiája jelentősen meg-

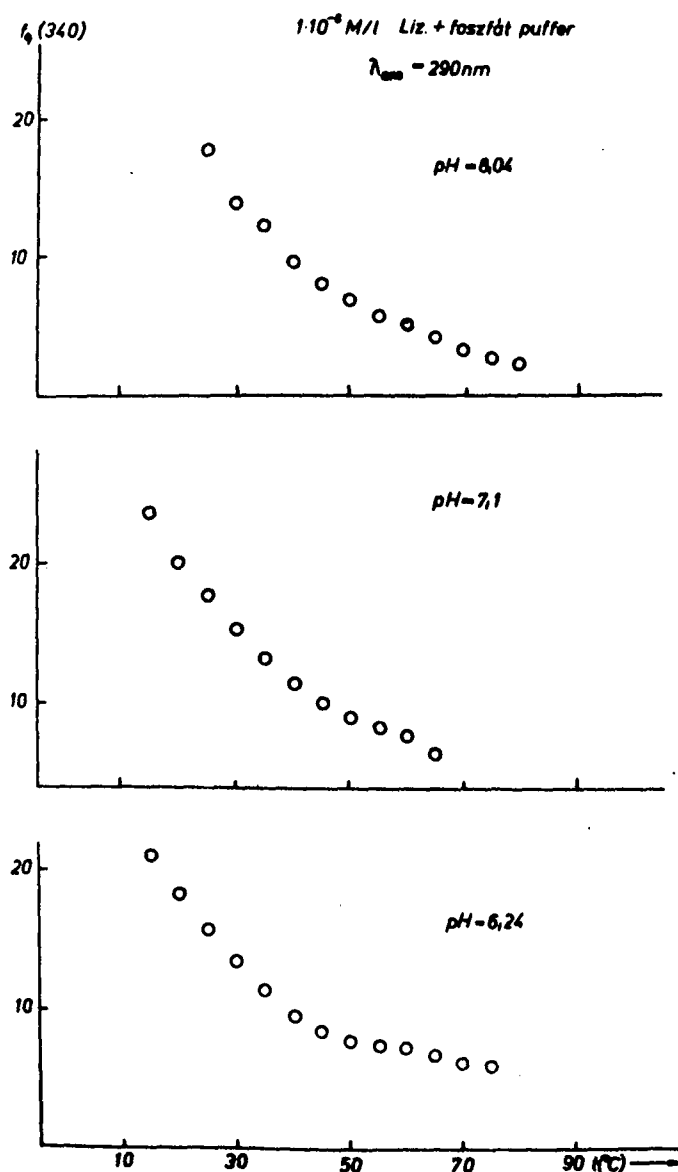
nő és az intramolekuláris kötések a hőmérséklet emelkedése következtében meggyengülnek és a gerjesztés pillanatában létrejöhet a molekula denaturációja vagy a molekula más, nagyobb potenciális energiának megfelelő módosulatba mehet át. A spektrum enyhe kiszélesedése pedig kapcsolatban lehet a tirozin maradványok hatásának megnövekedésével a fluoreszcencia spektrumban /22/.

A lizozim triszpufferes oldata esetén a foszfátpufferes oldatoknál kapott eredményekhez hasonlókat kaptunk.



14. ábra

A fluoreszcencia spektrumok maximumainak a 2.§-ban leírt korrekcióval nyert értékeit különböző oldatoknál a 3. táblázat mutatja. A 15. ábrán pedig felrajzoltuk a $f_q(340)$ értékeket, mint a hőmérséklet függvényét különböző pH-nál. A gerjesztés hullámhossza $\lambda_{gerj}=290$ nm, a megfigyelési pedig $\lambda_{megf}=340$ nm volt. Az in-



15. ábra

3. táblázat

$1 \times 10^{-5} \text{ M/l}$ lizozim foszfátpufferes oldatának fluoreszcencia intenzitásai önkényes egységekben különböző pH értéknél a hőmérséklet függvényében

($\lambda_{\text{gerj}} = 290 \text{ nm}$)

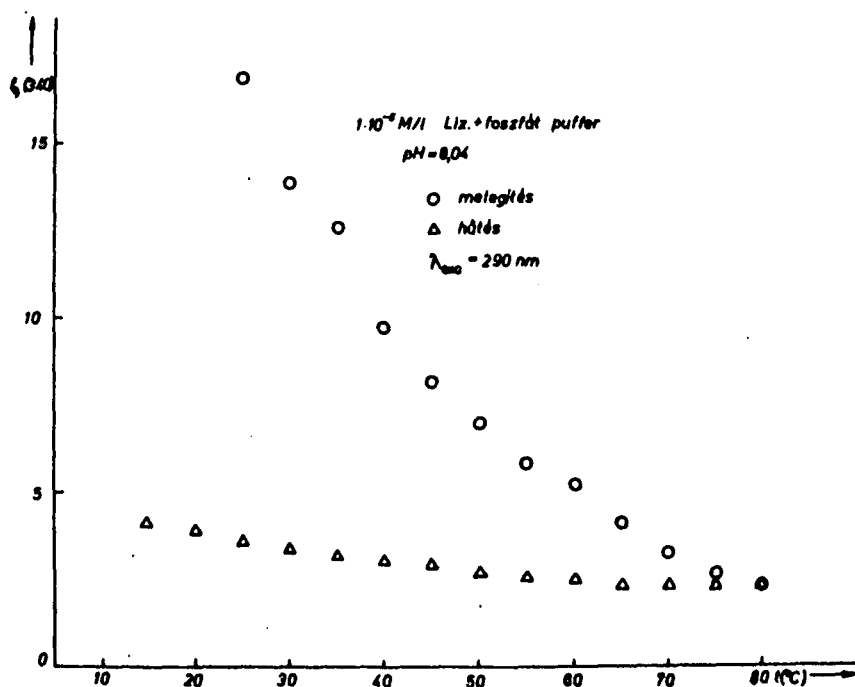
($\lambda_{\text{megf}} = 340 \text{ nm}$)

t °C	pH		
	6,24	7,1	8,04
15	21,3	23,7	
20	18,3	20,1	
25	15,8	17,8	16,7
30	13,6	15,3	13,8
35	11,6	13,2	12,2
40	9,92	11,4	9,76
45	8,63	10,0	8,02
50	7,90	8,94	6,87
55	7,62	8,40	5,73
60	7,26	7,62	5,06
65	6,80	6,43	4,04
70	6,37		3,18
75			2,60
80			2,23

tenzitásértékek a hőmérséklet növekedésével jelentősen csökkentek. Ez a csökkenés monoton volt kb. 40°C -ig. Az egyenesek iránytényezői, amelyek az 1°C hőmérsékletváltozás hatására 6,24; 7,1 és 8,04 létrejött intenzitásváltozást jelentik, pH értékeknél rendre -1,1; -1,13; -0,9. Kb. 40°C -nál a görbe iránya és meredeksége megváltozott, az 1°C -ra eső intenzitás változás lecsökkent, az iránytényezők most -0,16; -0,40; -0,40. Mint látható, legjelentősebb a változás a $\text{pH}=6,24$ -nél és legcsekélyebb a 8,04 pH-ju oldat esetében.

A fluoreszcencia intenzitásokat mértük úgy is, hogy a $80-90^{\circ}\text{C}$ -ra felmelegített oldatokat lehűtöttük és hűtés közben vettük fel a spektrumokat. A spektrumok alakja hasonló volt a melegítéskor kapottakéhoz. A felvett maximumértékeket pedig a 16. ábrán mutatjuk be. Melegítéskor a fluoreszcencia intenzitás jelentősen csökken, míg visszahütéskor csak csekély mértékben növekszik. Visszahütéskor az intenzitás jóval kisebb, mint ugyanazon a hőmérsékleten melegítéskor volt. A 16. ábra a $\text{pH}=8,04$

foszfátpufferes lizozimoldatra kapott eredményeket mutatja és ehhez hasonló eredményeket kaptunk a többi oldat esetében is. A visszahűtés és a melegítés közötti különbség a hő



16. ábra

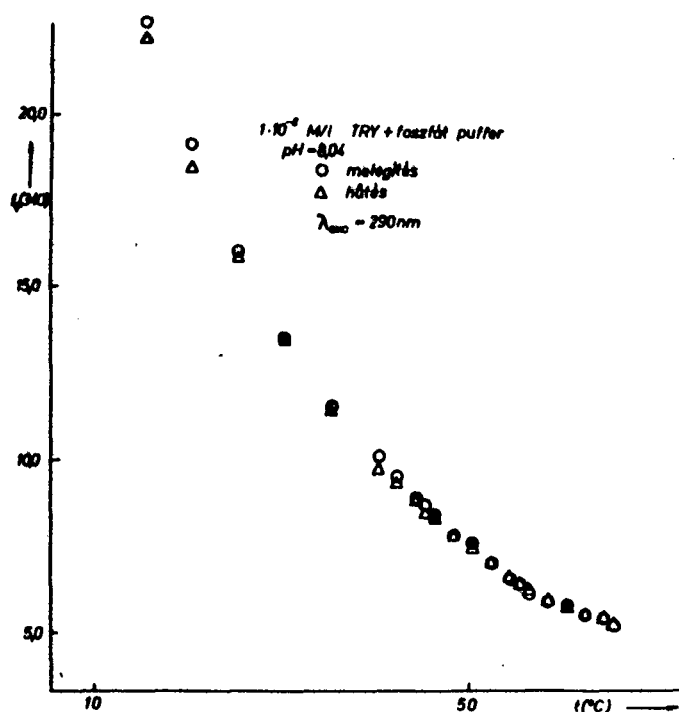
okozta irreverzibilis változásról tanuskodik.

A fluoreszcencia spektrumokat felvettük abban az esetben is, amikor 50°C-ra melegített oldatot hűtöttünk le. A hűtve, illetve a melegítéskor adott hőmérsékleten felvett spektrumok alakjában különbség nem volt. A fluoreszcencia 340 nm-nél mért intenzitása megegyezett

a melegítéskor kapott értékekkel. Tehát 50°C-ig a melegítés hatására az enzimen a fluoreszcencia szempontjából maradandó változás nem következett be. A változás reverzibilis, eltérően a magasabb hőmérsékletre történő melegítéstől. Az 50°C-ról történő visszahűtés eredményei arról tanuskodnak, hogy ebben a hőmérsékleti intervallumban tisztán hőmérsékleti kioltással van dolgunk.

Abból a célból, hogy megvizsgáljuk változik-e a triptofán fluoreszcenciája a hőmérséklet növekedésével akkor, ha azt a fehérjébe épülten vizsgáljuk, meghatároztuk az 1×10^{-5} M/l koncentrációju foszfát pufferes triptofán oldat fluoreszcencia szinképeit is. A szabad triptofán és a fehérjébe épült triptofán a hőmérséklet növekedésével hasonlóan viselkedik. Ez a 16. és 17. ábrán figyelemmel kísérhető. A maximumok 50°C-ig közel azonos intenzitásuk a triptofán és a lizozim oldat esetében is. 50°C felett azonban csekély eltérés mutatkozott. A lizozim oldat fluoreszcencia intenzitása valamivel kisebb, mint a triptofáné. Az ábrákon az is látható, hogy a triptofán fluoreszcencia intenzitása a vizsgált hő-

mérsékleti tartományban végig monoton csökkenő, lizozim esetében pedig 50°C körül törés van. Jelentősebb a különbség a visszahűtésekor kapott értékek esetén. A szabad triptofán oldat hűtéskor kapott fluoreszcencia maximum intenzitásai - eltérően a lizozimétól - meg-



17. ábra

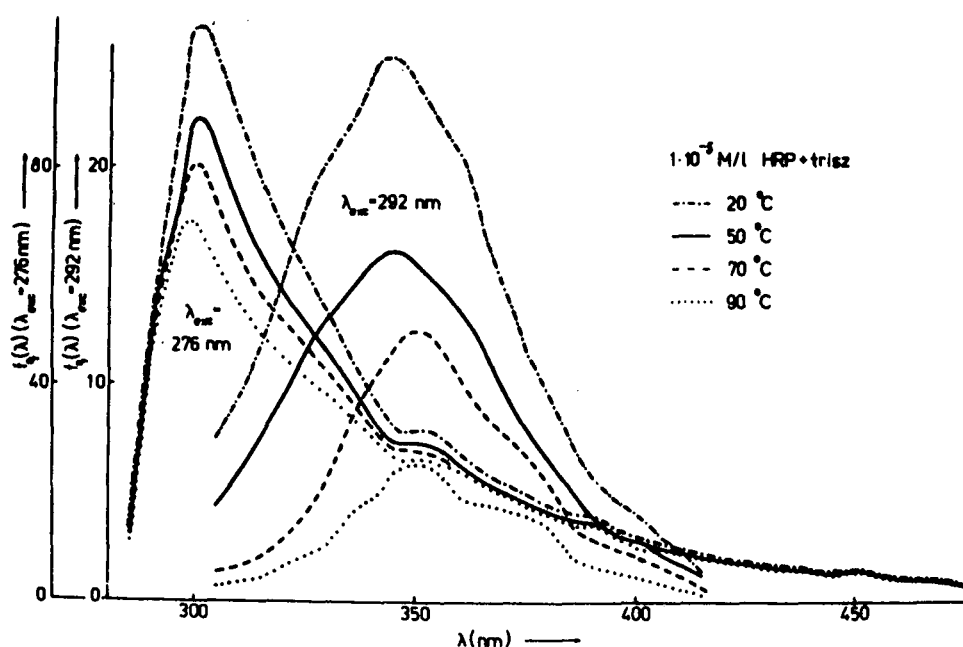
egyeztek a melegítéskor felvett értékekkel. A triptofán oldatok különböző hőmérsékleten felvett spektrumai nem mutattak eltérést sem melegítéskor, sem a hűtés során a szobahőmérsék-

leten kapott spektrumhoz képest, tehát a hőmérséklet okozta változás szabad aminosavak esetén reverzibilis.

- b. Az 1×10^{-5} M/l peroxidáz triszpufferes oldatára vonatkozólag megállapították /7/, hogy bár a peroxidáz molekulában tirozin és triptofán is van, ha mindkét aminosav gerjesztődik, a tirozin fluoreszcencia intenzitása meglepően sokkal nagyobb, mint a triptofáné. A fluoreszcencia szinképekben a 305 nm-es és a 340 nm-es sávok rendelhetők a tirozin, ill. a triptofán fluoreszcenciájához. Ha a fluoreszcencia szinképeket $\lambda_{\text{gerj}}=276$ nm-nél gerjesztjük, a 305 nm-es maximummal rendelkező tirozin fluoreszcenciát kapjuk, míg $\lambda_{\text{gerj}}=290$ nm-nél a triptofánét. Ezt a két esetet tanulmányoztuk a hőmérséklet függvényében.

A spektrumok változását a 18. ábra szemlélteti. A 276 nm-es gerjesztéssel felvett fluoreszcencia spektrumokban az intenzitás-értékek csökkentek a hőmérséklet emelésével, a szinképek alakjának jelentős megváltozása nélkül. A 290 nm-es gerjesztés esetén a magasabb hőmérsékleteken (60°C felett) felvett spektru-

mok alakja változott az alacsonyabb hőmérsékleteken mért spektrumokéhoz képest. A triptofán szinképe hosszabb hullámok felé tolódik és a spektrum kiszélesedik, összhangban más eredményekkel /22/.



18. ábra

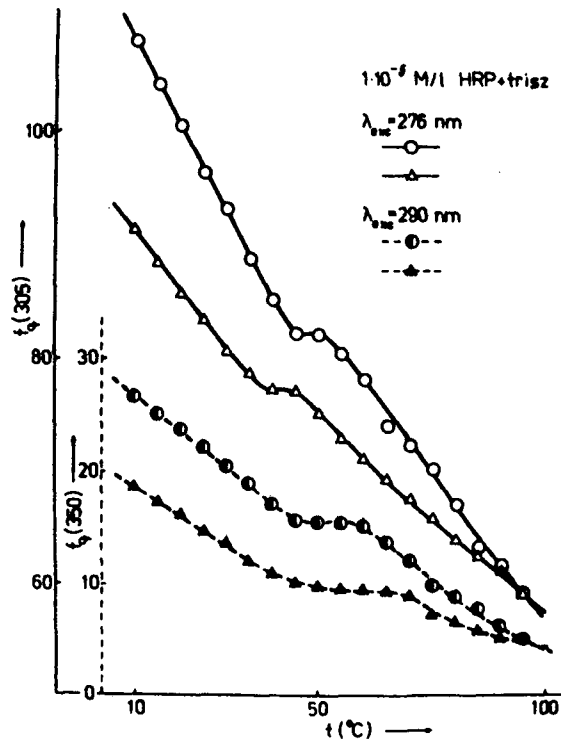
A különböző gerjesztéssel felvett spektrumok maximumaihoz tartozó intenzitásokat a 4. táblázatban közöltük, a görbék menetét pedig a 19. ábra mutatja. A $\lambda_{\text{megf}}=305 \text{ nm}$ -nél a maximumok nagysága kb. 45°C-ig és 55°C felett

4. táblázat

1×10^{-5} M/l HRP neutrális triszpufferes oldatának pH=7,0 fluoreszcencia intenzitásai önkényes egységekben a hőmérséklet függvényében

$f_q(\lambda)$ $t(^{\circ}\text{C})$	$\lambda_{\text{gerj}}=290 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{megf}}=350 \text{ nm}$	$\lambda_{\text{gerj}}=276 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{megf}}=305 \text{ nm}$
10	26,5	107,0
15	24,9	104,0
20	23,6	100,0
25	22,0	96,2
30	20,4	93,0
35	18,9	88,7
40	17,2	85,0
45	15,6	81,9
50	15,5	81,9
55	15,4	80,4
60	15,1	78,1
65	13,6	74,2
70	12,7	72,4
75	9,82	70,3
80	8,85	67,2
85	7,72	63,5
90	6,28	
95	5,15	

jelentősen csökken a 45-55°C tartományban pedig közel változatlan. Ugyancsak a fluoreszcencia intenzitások csökkenését tapasztaltuk a $\lambda_{\text{gerj}}=290$ nm és $\lambda_{\text{megf}}=350$ nm esetén



19. ábra

is, bár itt a 45°C-tól 60°C-ig terjedő hőmérséklet tartományban tekinthetők az intenzitások gyakorlatilag változatlanoknak.

A triptofán oldat fluoreszcenciájának hőmérsékleti kioltása négy-öttszörös intenzitás-csökkenéshez vezet, ha a hőmérsékletet 20°C-

ról 90°C-ra emeljük. A peroxidázba épült egyetlen triptofán /44/ fluoreszcenciájának hőmérsékleti kioltása hasonló körülmények között négyszeres intenzitás csökkenést mutat, ha a peroxidázt olyan hullámhossznál (290 nm) gerjesztjük, hogy benne csak a triptofán világít. Vagyis a szabad és a fehérjéhez kötött triptofán fluoreszcenciájának hőmérsékleti kioltása lényegileg hasonló mértékű.

Ha a tirozint és a triptofánt a peroxidázban $\lambda_g=276$ nm-rel együttesen gerjesztjük a hőmérsékleti kioltás lényegesen kisebb mértékű, mint a $\lambda_g=290$ nm-nél. A tirozin csucs intenzitása 90°C-on 0,66-ára, a triptofané 0,83-ára csökken a 20°C-on mért értékhez képest. Tehát a hőmérséklet emelésével a tirozin és triptofán fluoreszcencia intenzitása nem azonos mértékben csökken, hanem a tiroziné nagyobb mértékben. A mérési eredményeket az 5. táblázat tartalmazza. 20°C-on mért fluoreszcencia spektrumban a 305 nm-nél lévő tirozin sáv és a 350 nm-nél lévő triptofán sáv intenzitásának hányadosa 3,3; míg ugyanezen hányados 90°C hőmérsékleten 2,7. Mindez azt jelenti, hogy melegítés hatására a tirozinról a gerjesztési energia nagyobb hányada megy át a triptofánra,

5. táblázat

1×10^{-5} M/l HRP neutrális triszpufferes oldatának pH=7,0 fluoreszcencia intenzitásai önkényes egységekben a hőmérséklet függvényében

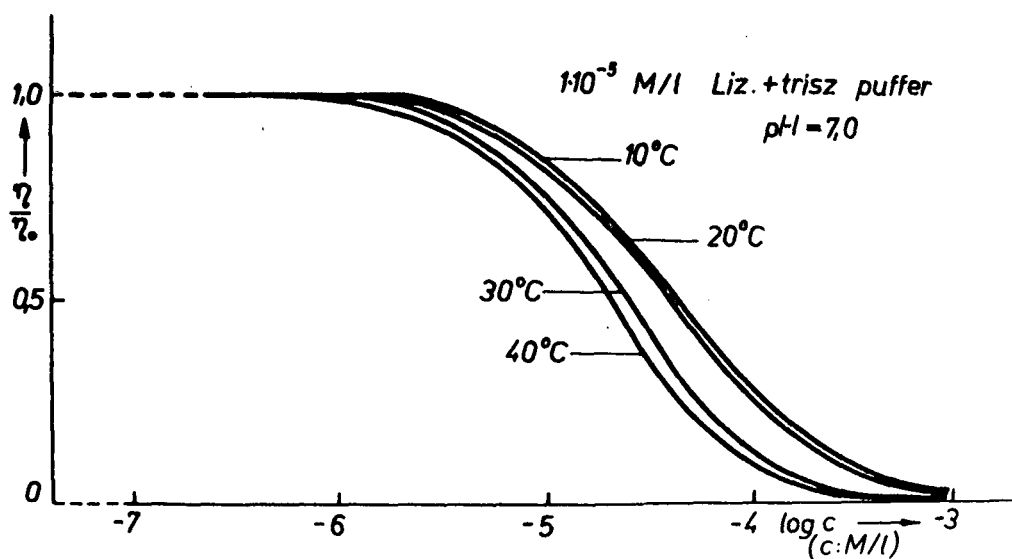
t °C	HRP+trisz $\lambda_g = 276 \text{ nm}$		HRP+trisz $\lambda_g = 290 \text{ nm}$	TRY+trisz $\lambda_g = 290 \text{ nm}$	HRP $\left(\frac{\text{TYR}}{\text{TRY}}\right)$ $\lambda_g = 276 \text{ nm}$
	TYR	TRY	TRY		
20	106	31,7	24,9	22,1	3,34
50	88,8	29,2	16,4	8,6	3,04
70	80,3	28,8	12,4	5,47	2,79
90	67,9	26,2	6,29	4,73	2,66
$\frac{I(20^\circ\text{C})}{I(90^\circ\text{C})}$	1,52	1,21	3,96	4,67	

jeléül annak is, hogy a triptofán maradék "hozzáférhetőbbé" válik. Ezen vizsgálatok eredményei összhangban vannak korábbi vizsgálatok /23/ eredményeivel, amelyek szerint a triptofánnak a fehérje molekula belsejében kell lennie. Ha a méréseket az oldat hűtésekor is elvégeztük, akkor a 19. ábrán közölt értékeket kaptuk. A hűtéskor kapott intenzitásértékek a melegítéskor kapott jellegnek megfelelően változtak, de hasonlóan, mint a lizozim esetében, itt is alacsonyabbak a hűtéskor kapott értékek, mint a melegítéskor kapottak. Ez azt mutatja, hogy a 40°C feletti hőmérsékleti intervallumban a létrejött változás részben reverzibilis.

3.3. A relativ intenzitásmérések eredményei

A relativ intenzitásértékeket a triszpufferes lizozim oldat esetében határoztuk meg különböző koncentrációk mellett különböző hőmérsékleteken abban a hőmérsékleti tartományban, ahol konformációs változás még nem jött létre (55°C-ig). A görbék a 20. ábrán láthatók. Az ábrán lévő eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy a koncentrációs kioltást jelentős mértékben befolyásolja a hőmérsék-

let. Leglassabb 10°C-on és a magasabb hőmérsékleteken a hőmérséklet emelésével gyorsabbá válik.



20. ábra

3.4. Aktiválási energia meghatározása

Az 1.§-ban leírt, a /3/ és /20/ irodalomban ismerttetett összefüggések alapján meghatároztuk a lizozim 1×10^{-5} M/l koncentrációjú foszfátpufferes (pH=8,04) oldatánál az E_a aktiválási energia és a hőmérsékleti kioltási folyamat sebességi konstansainak az értékeit.

Az η_q 25°C-on mért valódi értékét a /45/ irodalomból használtuk fel ($\eta_q=0,0707$), amelyek ismeretében c konstans értékét meghatároztuk. A fluoreszcencia intenzitások méréséből a c konstans ismeretében az $\eta_q=c \cdot I$ összefüggés alapján a 10-90°C hőmérsékleti intervallumban kiszámítottuk a kvantumhatásfokokat.

A számításokat /20/ alapján elvégezve a lizozim E_a aktiválási energiáját 8,6 kcal/M értéknek kaptuk. Ez összhangban van a /3/ irodalomban közölt triptofán (8,1 kcal/M) aktiválási energia értékkel. A sebességi konstansok értékei pedig

$$k = 1,92 \cdot 10^7 \quad \text{és} \quad K = 3,56 .$$

Ezek szintén jó egyezésben vannak a /3/ irodalom eredményeivel: k értéke triptofánnál $2,2 \cdot 10^6$, a K konstans pedig 1,3.

A hőmérséklet függvényében végzett fluoreszcenciás- és aktivitási mérési eredmények lehetőséget nyújtanak arra, hogy peroxidáz esetében is meghatározzuk a folyamatok termodinamikai paramétereit.

Peroxidáz esetében az aktiválási energia E_a értékét és a sebességi konstansok (k) és (K) értékeit

külön határoztuk meg a 10-45°C és a 60-90°C hőmérsékleti intervallumban. A kapott értékeket a 6. táblázat mutatja. Számításainknál felhasználtuk azt, hogy az q arányos a mért intenzitással /3/, illetve WEBER és TEALE /28/ eredményét, hogy a peroxidáz triptofán fluoreszcenciájának kvantumhatásfoka szobahőmérsékleten 0,002.

Az enzimaktivitási görbe adataiból RAISON szerint /4/ az aktivitás hőmérsékleti változásához tartozó aktivációs energiát is kiszámítottuk. Ennek az értéke konformációs változás előtt 9,15 kcal/mol, a konformációs változás után pedig 20,6 kcal/mol. Ha a 6. táblázat adatait összehasonlítjuk a /20/ /5/-ben szabad tirozinra és triptofánra kapott adatokkal, azt látjuk, hogy mind a triptofán, mind a tirozin fluoreszcencia hőmérsékleti kioltását jellemző aktiválási energia kisebb, mint a szabad aminosavaké. Tirozin esetében az eltérés (kb. 3,2 kcal/mol) különösen nagy, ami azzal magyarázható, hogy a 10-45°C hőmérsékleti tartományban a tirozin fluoreszcencia a hőmérséklet emelésével könnyebben oltódik ki, illetve átadódik a triptofánnak, ahol az eltérés kb. 0,3 kcal/mol. Így a peroxidáz esetén a fluoreszcencia kioltás két tényezőtől tevődik össze, egy tisztán hőmérsékleti kioltásból és egy a tirozinról a triptofánra való

6. táblázat

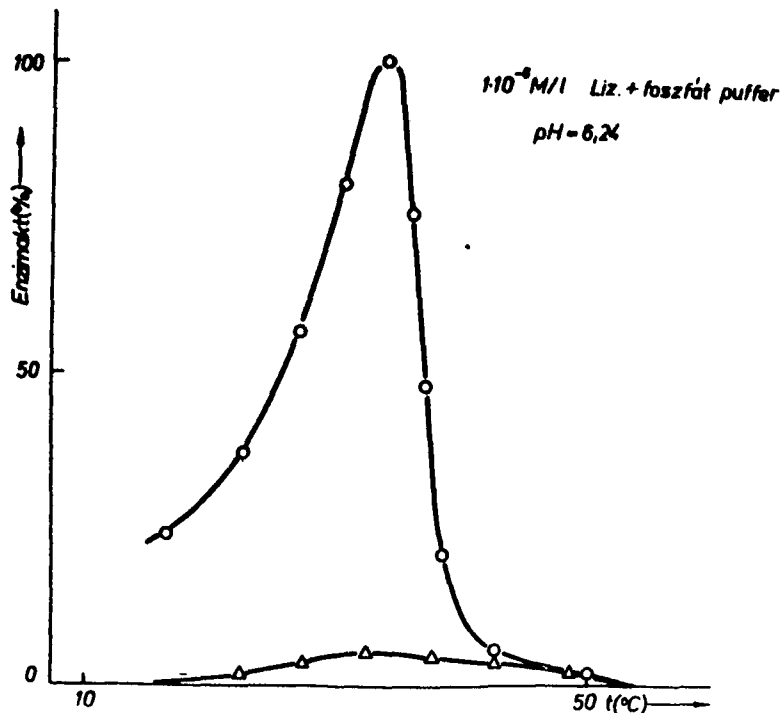
A peroxidáz 1×10^{-5} M/l koncentrációju neutrális triszpufferes oldatának fluoreszcencia hőmérsékleti kioltására vonatkozó termodinamikai és kinetikai adatok

	Tirozin fluoreszcencia			Tryptofán fluoreszcencia		
	HRP-ben		szabad aminósav 25°C	HRP-ben		szabad aminósav 25°C
	10-45°C	60-90°C		10-45°C	60-90°C	
q T=298°K	0,0087		0,21	0,002		0,22
E_a kcal/M	3,2	5,1	6,2-7,1	7,8	14,0	8,1-8,5
$k = k_3/k_1$	10,4	92,8	10,2-13,0	$8,2 \cdot 10^4$	$3,1 \cdot 10^8$	15,2-14,6
$K = k_2/k_1$	114,0	113,0	0,9-3,0	498,0	499,0	1,5-2,3

energiaátadásból. Ezt az elképzelést alátámasztja az a tény is, hogy a peroxidáz esetén a konformációs változás befejeződése után az aktiválási energia 5,1 kcal/mol már jól megközelíti a szabad tirozin aktiválási energiát.

3.5. Enzimaktivitás mérések eredményei

a. Lizozim esetén, a $\text{pH}=8,04$ 1×10^{-5} M/l koncentrációju foszfátpufferes enzimoldat aktivitásának %-ban kifejezett értékeit a hőmérséklet függvényében a 21. ábra mutatja. Az aktivi-

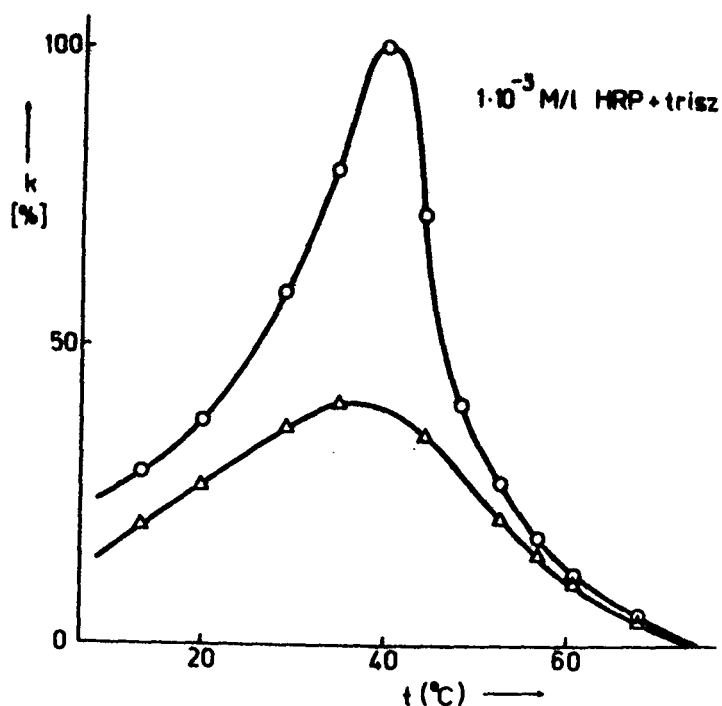


21. ábra

tás kb. 35°C -nál éri el a maximumát, $10\text{-}35^{\circ}\text{C}$ -ig jelentős növekedést, 35°C felett pedig nagymértékű csökkenést mutat a hőmérséklet emelésekor. Az enzim 60°C környékén már teljesen inaktív válik. Az oldat visszahűtésekor mért értékek csekély mértékben ugyan, de szintén növekednek 35°C -ig, majd csökkennek, de a hűtés után kapott maximális aktivitás értéke a melegítéskor kapott maximum értéknek csak kb. 5%-a.

- b. Peroxidáz oldat esetében is az abszorpció és fluoreszcencia mérésekkel párhuzamosan az enzimoldat aktivitását hűtve és melegítve és különböző hőmérsékleteken is megmértük. Az enzim 38°C -on volt a legaktívabb, itt az aktivitást 100%-nak véve, a többi hőmérsékleten ennek megfelelő %-ban ábrázoltuk az aktivitásértékeket. A hőmérséklet emelésekor 38°C -ig az aktivitás növekedett, 38°C felett pedig csökkent és 75°C -nál az enzimműködés megszűnt. Ez látható a 22. ábrán. Ha az enzimet 90°C -ra melegítettük és utána hűtöttük, azt tapasztaltuk, hogy a lizozimtól eltérően

itt hűtéskor még jelentős biológiai aktivitással rendelkezik az enzim. 38°C -on például a melegítéskor kapott aktivitás mintegy 40%-át mértük a hűtött enzimoldat esetében (22. ábra). Ez is a hőmérséklet okozta változás részben reverzibilis voltát igazolja.

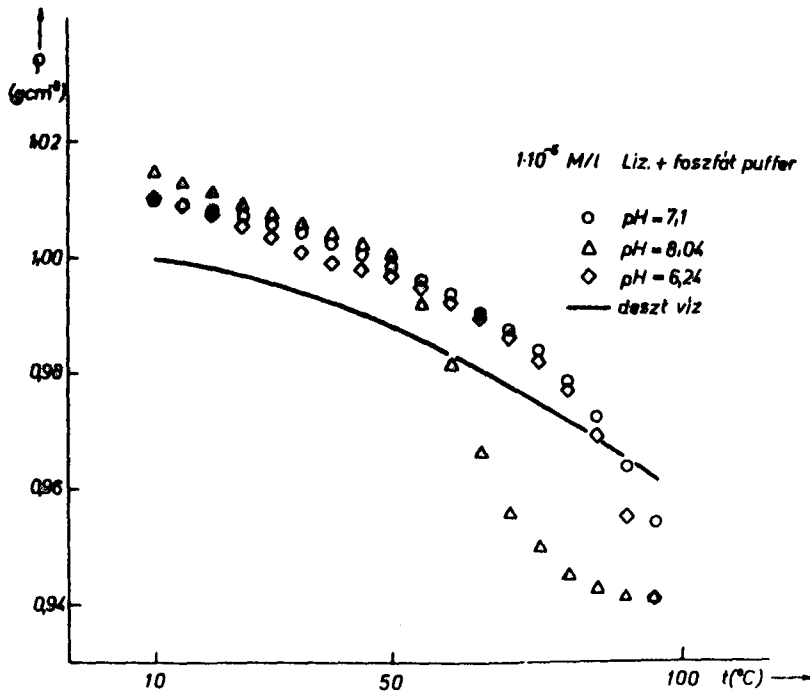


22. ábra

3.6. Egyéb mérési eredmények

- a. A valódi abszorpciós együtthatók, ill. extinkciós koeficiensek meghatározásánál szükséges volt a sűrűség és törésmutató hőmérsék-

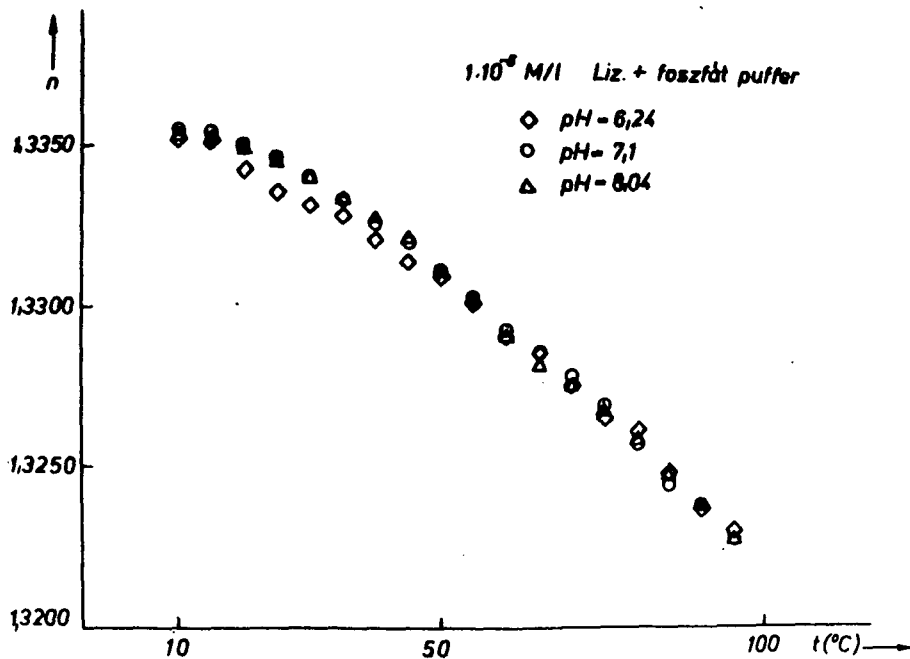
let okozta változását figyelembevevő korrekciók elvégzése /47/. E célból a sűrűséget és a törésmutatót is megmértük, különböző hőmérsékleteken. A lizozim különböző foszfátpufferes oldatai esetén kapott sűrűségeket a 23., a törésmutatókat pedig a 24. ábra mutatja. (Összehasonlításként a desztillált viz



23. ábra

sűrűségét is ábrázoltuk a hőmérséklet függvényében.) A törésmutatók értékében, mint azt a 24. ábra is mutatja, csekély mértékű elté-

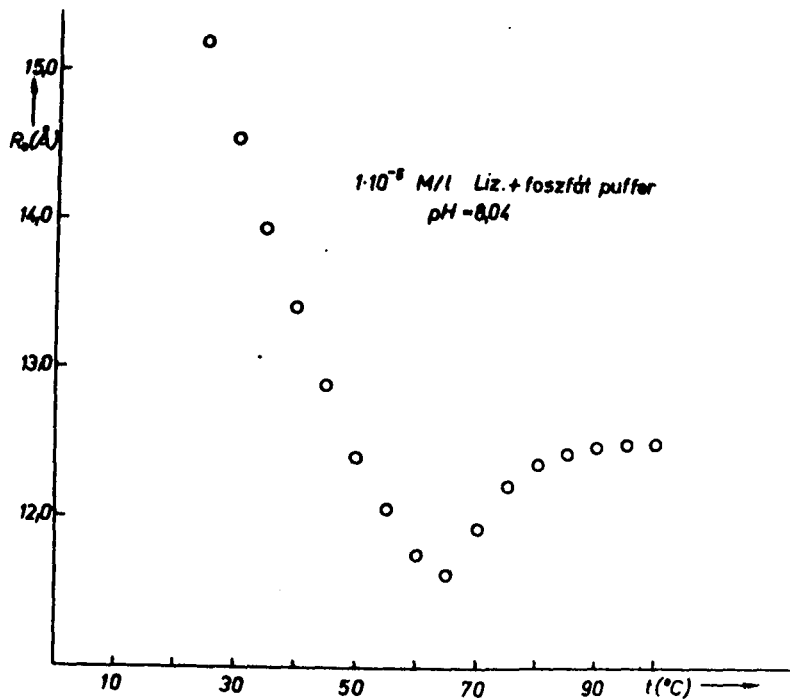
rést tapasztalunk különböző pH értékek esetén. A viszkozitásértékek megegyeztek a desztillált víz viszkozitásértékeivel, és ez a megegyezés magasabb hőmérsékleteken is megvolt, tehát a viszkozitás értékeiben és hőmérsékleti függésében nem tapasztaltunk eltérést akár fehérjeoldatot, akár desztillált vizet vizsgáltunk. Méréseink triszpufferes oldatok esetén (lizozim, illetve peroxidáz) is hasonló eredményekre vezettek.



24. ábra

b. Az R_0 számításakor kapott eredmények.

Az 1.§-ban leírtak alapján meghatároztuk az 1×10^{-5} M/l koncentrációjú 8,04 pH-ju foszfátpufferes lizozim oldat esetében az R_0 értékeket, a kapott eredményeket a 25. ábra mutatja. Az R_0 értékei kb. 55-60°C-ig lineárisan csökkennek a hőmérséklet növekedésével. A 60-75°C-os hőmérsékleti tartományban, a fluoreszcenciás mérésekkel is az enzimaktivitás mérésekkel összhangban, a görbe menete megváltozik, majd a 75°C feletti hőmérsékleteken (a denaturált enzimoldat esetében) az R_0 a hőmérséklettől gyakorlatilag független.



25. ábra

A lineáris szakaszon R_0 értékei: 15,2 Å-től 11,6 Å-ig változnak, majd a 60-75°C hőmérsékleti intervallumban emelkedő hőmérséklettel 11,6 Å-ről 12,4 Å-re növekednek. Az állandó értéke kb. 12,4-12,5 Å.

Ezek az eredmények jó egyezésben vannak KONEV /36/ eredményeivel.

Ö S S Z E F O G L A L Á S

A dolgozatban a lizozim és a tormagyökér peroxidáz 1×10^{-5} M/l koncentrációju oldatainak fényelnyelését és fluoreszcenciáját, valamint aktivitását vizsgáltuk különböző pH értékek esetén a hőmérséklet függvényében.

Lizozim esetében méréseinket az irodalmi adatokon tulmenően 60°C fölé is kiterjesztettük és azt tapasztaltuk, hogy az abszorpció, illetve fluoreszcencia intenzitások hőmérséklet okozta monoton változása 60°C környékén megszakad. A fluoreszcencia spektrum kissé eltolódik és kissé kiszélesedik. Ez olyan konformációs átmenetre utal, amely a makromolekula "kiterülését" jelenti. A visszahűtéskor kapott eredmények különböztek a melegítéskor kapott értékektől, amely a hőokozta változás irreverzibilis voltára utal. Ezt támasztják alá az aktivitásmérés eredményei is. A melegítéskor a lizozim enzim aktivitása kb. 35°C -nál éri el a maximumot és 60°C -nál válik inaktívá. A visszahűtött enzim akti-

vitása azonban 35°C -nál csak mintegy 5%-a a melegítéskor mért értéknek.

A fluoreszcencia jellemzők hőmérséklet hatására létrejött változásának az ismerete lehetővé teszi a folyamat termodinamikai paramétereinek a meghatározását. Az E_a aktiválási energia értéke lizozimnál $8,6 \text{ kcal/mol}$ értéknek adódott.

Tormagyökér peroxidáz esetén az oldat abszorpciós és fluoreszcencia szinképei $10-45^{\circ}\text{C}$ -ig terjedő hőmérsékleti tartományban függetlenek, $50-90^{\circ}\text{C}$ -ig terjedő tartományban függők a hőmérséklettől. A fluoreszcencia intenzitása a hőmérséklet emelésével mindvégig csökken. Az abszorpciós együttható a látható tartományban 45°C felett csökken, az ultraibolyában növekszik. A triptofántól származó fluoreszcencia hőmérsékleti kioltását a hőmérséklet emelésével a tirozinról a triptofánra növekvő energiaátadás kíséri. A fluoreszcencia kioltás aktiválási energiája $7,8 \text{ kcal/mol}$ a $10-45^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleti intervallumban, ill. $14,0 \text{ kcal/mol}$ a triptofán fluoreszcenciára nézve, ill. $3,2 \text{ kcal/mol}$ és $5,4 \text{ kcal/mol}$ a tirozin maradék fluoreszcenciájára.

Az enzim aktivitásának hőmérsékleti optimuma 38°C -nál van, az aktivitás 75°C -nál szűnik meg. A hő okozta aktivitásváltozás részben reverzibilis, visszahűtéskor az aktivitás 40%-ig helyreáll. Részleges reverzibilitásra utalnak a szinképi változások is. Az aktivitási görbéhez hasonló menetű és azonos hőoptimumu az enzim tisztaságát jellemző faktor hőmérsékleti függése is. Ez azt is jelenti, hogy az enzim a hőoptimum hőmérsékletén a "legtisztább". Ez lehetővé teszi, hogy közvetlenül az abszorpciós görbékkel határozzuk meg a hőoptimumot. Az aktivitás hőmérsékleti változásának aktiválási energiája $9,15 \text{ kcal/mol}$, illetve $20,6 \text{ kcal/mol}$ a $10-40^{\circ}\text{C}$, ill. $45-75^{\circ}\text{C}$ hőmérséklet tartományban.

A fluoreszcencia jellemzők megfigyelése mindkét enzim esetében lehetőséget nyújt arra, hogy elég pontosan meghatározzuk azt a hőmérsékleti intervallumot, ahol a konformációs változás hő hatására bekövetkezik, és a görbék jellegének a megváltozásából következtessünk a végbemenő átalakulásra.

IRODALOMJEGYZÉK

- /1/ Styer, L.: Science 162, 526, (1968)
- /2/ Straub, F.B.: Biokémia, Medicina Könyvkiadó, Budapest, 1961
- /3/ Gally, J.A., Edelman G.H.: Biochim. Biophys. Acta 60, 499, (1962)
- /4/ Steiner, R.F., Edelhoch H.: Biochim. Biophys. Acta 66, 341,(1963)
- /5/ Turoverov, K.K., Selcskov B.V.: Biofizika 5, 800, (1970)
- /6/ Chen, R.F.: "Fluorescence : Theory, Instrumentation and Practice" M. Dekker, Inc. New-York, 1967
- /7/ Várkonyi, Z., Szalay L.: Acta Biochim. et Biophys. Acad. Sci. Hung. megjelenés alatt
- /8/ Duggand, D, S. Udenfriend: J. Biol. Chem. 223, 313 (1956)
- /9/ Shore, V.G., A.B. Pardee: Arch. Biochem. Biophys. 60, 100, (1956)
- /10/ Vladimirov, J.A., Konev S.V.: Biofizika 2, 3,(1957)
- /11/ Teale, F.: Biochem. J. 76, 381, (1960)
- /12/ Weber, G.: Biochem. J. 75, 235, (1960)
- /13/ Dévényi, T., Elődi, P., Keleti T., Szabolcsi G.:
Strukturelle Grundlagen der biologischen
Funktion der Proteine
Akadémiai Kiadó, Budapest, 1969

- /14/ Konev S.V.: Dokl. Akad. Nauk SSSR 116, 594, (1957)
- /15/ Methods in food analysis
Edited by M.A. Joslyn Academic Press,
New York-London, 1970
- /16/ Foss, J.G.: Biochim. Biophys. Acta 47, 569 (1961)
- /17/ Eisinger, J.A.: Molekular Luminescence An.
International Conference
Ed. E. Lim. New York-Amsterdam, 1969
- /18/ Leroy, E., Larmi, H., Laustriat, G.: Photochemistry
and Photobiology 13, 441, (1971)
- /19/ Barenboim, G.M., Domanskii A.N., Turoverov K.K.:
"Luminescence of biopolymers and cells",
Plenum Press, New York-London , 1969
- /20/ Csernickij, E.A.: "Lumineszcencija i sztrukturnaja
labilnoszty belkov v rasztvore i kletke"
Nauka i tehnika, Minszk 1972
- /21/ Turoverov, K.K., Selcskov B.V.: Biofizika 6, 965, (1970)
- /22/ Tarenbojm G.M., Szokolenko V.A., Turoverov K.K.:
Citologija 10, 636, (1968)
- /23/ Steiner, R.F., Edelhoeh H.: Nautre 193, 375 (1962)
- /24/ Perlmann, G.E.: Biopolymers Symposia No. 1 pp383 (1964)
- /25/ Förster, Th.: Fluoreszenz Organischer Verbindungen
Vandenhoeck und Ruprecht, Göttingen, 1951

- /26/ Konev, S.V.: Fluorescence and Phosphorescence of Proteins and Nucleic Acids, Plenum Press, New York, 1967
- /27/ Steinberg, I.: Ann. Rev. of Biochemistry 40, 84 (1971)
- /28/ Weber, G., Teale F.: Disc. Faraday Soc. 27, 134, (1959)
- /29/ Joly, M.: "Fiziceseszkaja himija denaturácii belkov" Mir, Moszkva, 1968
- /30/ Donovan, J., Laskowski M., Jr and H.A. Scheraga: J.Am. Chem. Soc. 82, 2154, (1960)
- /31/ Tanford, C., Wagner M.: J. Am. Chem. Soc. 76, 3331, (1954)
- /32/ Surovtzev, V.I., Koslov L.V., Antonov V.K.: Dokl. Akad. Nauk. SSSR. 195, 1463 (1970)
- /33/ Várkonyi Z., Kovács K.: Acta Biochim. Et Biophys. Acad. Sci. Hung. 7, (1972)
- /34/ Strikler, S.J., Berg, R.A.: J. Chem. Phys. 37, 814 (1962)
- /35/ Budó, Á., Ketskeméty I.: J. Chem. Phys. 25, 595 (1956)
Acta Phys. Hung. 7, 207 (1957)
- /36/ Hevesi J.: Kandidátusi értekezés, Szeged, 1965
- /37/ Schugar, D.: Biochim. Biophys. Acta 8, 302, (1952)
- /38/ Chance, B.: Arch. of Biochemistry 21, 416, (1949)
- /39/ Szalay L., Várkonyi Z.: Acta Phys. et Chem. Szeged 1974 megjelenés alatt

- /40/ Passerini, R., Ross J.G.: Chem. Phys. 22, 1012, (1954)
- /41/ Ljovsin, V.L.: Folyékony és szilárd anyagok fotolumineszcenciája. Akadémiai Kiadó, Bp. 1956.
- /42/ Hevesi, J., Kozma L.: Acta Phys. Acad. Sci. Hung. 20, 352, (1966)
- /43/ Theorell, H., Maehly A.: Acta Chem. Scand. 4, 422 (1950)
- /44/ Welinder, L.B., Smillie, L.B., Schonbaum G.R.: Canad. J. Biochim. 50, 44, (1972)
- /45/ Kronman, M.J., Holmes L.G.: Photochemistry and Photobiology 14, 113, (1971)
- /46/ Raison, I.K.: Bioenergetics 4, 285, (1973)
- /47/ Kortüm, G.: Kalorimetrie. Photometrie und Spektrometrie; Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1955.

Ez a disszertáció a József Attila Tudományegyetem Biofizikai Tanszékén készült. Köszönetemet fejezem ki dr Szalay László egyetemi tanárnak, a fizikai tudományok doktorának, aki lehetővé tette a vizsgálatok lefolytatását, valamint az eredmények kiértékelésekor hasznos tanácsaival segítette munkámat.

Köszönettel tartozom dr Hevesi János docensnek, a fizikai tudományok kandidátusának a dolgozat elkészítése során kifejtett érdeklődéséért.

A szerző köszönetét fejezi ki dr Várkonyi Zoltán adjunktusnak, a téma vezetőjének azért a sokoldalú és értékes segítségért, amelyet a vizsgálatok során felmerült kísérleti és elméleti problémák megoldásához nyújtott.

Köszönet illeti dr Garay András, a SZBK Biofizikai Intézetének az igazgatóját, aki a mérések egy részének elvégzését a Biológiai Központban lehetővé tette.

Köszönettel tartozom a technikai, illetve adminisztrációs munkatársaknak az értekezés formai kivitelezése alkalmával végzett gondos és lelkiismeretes munkájukért, különösen Horváthné, Peszleg Zsuzsanna laboránsnak a méréseknél kifejtett hasznos közreműködéséért, valamint a számítások pontos elvégzéséért.



F. k. : Dr. Hevesi János rektorhelyettes

Készült a JATE sokszorosító üzemében Szeged.

Engedélyszám: 113/74.

Méret: A/4.

Példányszám: 20

F. v. : Lengyel Gábor