

Spektroskopik Teknikler ile Protein Isıl Kararlılık ve Denatürasyon İncelemeleri

AMAÇ:

1. Proteinlerin yapı ve fonksiyonlarının tartışılması
2. Yüksek sıcaklıkların protein yapısal bütünlüğü üzerindeki etkilerinin gözlenmesi
3. UV/visible spektroskopisi ile proteinlerin katlanma açılma motiflerinin incelenmesi

GİRİŞ:

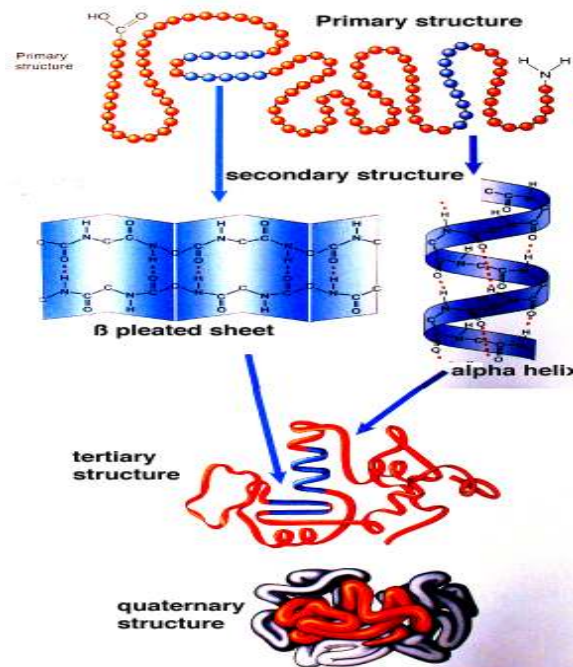
Amino asitler proteinlerin yapı taşlarını oluşturur. Bir amino asitin karboksil grubu ile diğer bir amino asitin amino grubunun peptid adı verilen kovalent bağlar ile bağlanması sonucu protein denilen polimerler meydana gelir. Proteinlerin 4 farklı yapısı vardır. Birincil yapı (primer yapı), proteinlerdeki aminoasit dizini ve polinükleotitteki baz dizini gibi polimerlerin yapısında bulunan farklı monomerlerin dizilimini içermektedir.

Biyolojik polimerler farklı amino asit yan zincirlerinin etkileşimi, nükleik asit ve bazların etkileşimi ile farklı moleküllerin suyla etkileşimi nedeniyle çok nadir olarak tamamen açık ve lineer zincirler halinde bulunurlar. Lineer zincirler halinde bulunmak yerine katlanarak, karmaşık üç boyutlu yapılar oluştururlar. Genel olarak, bir zincir boyunca belirli bir pozisyonda bulunan monomerler lineer dizilim boyunca kendilerine yakın olan ya da belirli bir uzaklıkta bulunan diğer ünitelerle çeşitli etkileşimlerde bulunurlar. Bu etkileşimler (temel olarak Hidrojen bağları) bir araya gelerek ikincil yapı (sekonder yapı) denilen yerel yapıları meydana getirir. Proteinlerde bu yapının en yaygın örnekleri alfa sarmalı (alpha helix), beta yaprağı (beta sheet) ve dönüşlerdir (turns). Protein ikincil yapıları lineer dizilim ile bir ölçüde ilişkili olmakla birlikte, proteinlerin uzaydaki oryantasyonu ile ilgili çok az düzeyde bilgi vermektedir. Üçüncül yapı (tersiyer yapı), makromolekülleri oluşturan atomların 3 boyutlu uzayda meydana getirdikleri tüm etkileşimler sonucu ortaya çıkan yapıya verilen addır. Birçok biyolojik polimer, birbirleri ile etkileşimleri sonucunda membran ve filamentler gibi karmaşık yapılar meydana getirirler, bu yapılara ise dördüncül yapı (kuaterner yapı) adı verilir.

Zincirdeki tüm bağlarda serbest dönüşe sahip olan ve yan gruplarda herhangi bir etkileşim içermeyen lineer polimerlere düzensiz sargı (random coil) adı verilir. Düzensiz sargılar Brown deviniminin yıkıcı etkileri nedeniyle herhangi bir özgün üç boyutlu yapıya

sahip değildir. Başka bir deyişle düzensiz sargı, her bir monomerin kendisine komşu olan monomere göre mümkün olan herhangi bir açıyı yapabilme durumunu kapsar. Hiçbir protein tamamen esnek bir yapıya sahip olamaz. Fakat bir protein eğer büyük ölçüde esnek bir yapıya sahipse ve çekici ve itici herhangi bir kuvvet içermiyorsa, o molekülün düzensiz sargıya bir eğilimi var demektir. Yalnız bu durum biyolojik makromoleküller arasında oldukça seyrek bir biçimde görülür, çünkü biyolojik moleküllerin monomerleri arasında belirgin bir biçimde etkileşim kurma eğilimi vardır.

Biyolojik makromoleküller genel olarak düzensiz sargı halinde bulunmazlar. Bunun yerine uzayda karmaşık bir oryantasyonda (üçüncül yapı halinde) bulunurlar. Proteinlerin üçüncül yapıda bulunuyor olmalarının sebebi ise bu katlanmanın protein aktivitesini kazanma konusunda elzem olmasıdır. Üçüncül yapı, hidrojen bağı, hidrofobik etkileşimler, van der Waals kuvvetleri, iyonik bağlar ve yük itimleri gibi omurga ve yan zincir atomlarının etkileşmesi ile sağlanır. Yan zincir etkileşimleri, genel anlamda protein omurgasının dahil olmadığı etkileşimler için kullanılmaktadır. Oluşan etkileşim eğer genel olarak küresel ya da eliptik bir biçimde ise protein globüler, eğer açık, uzatılmış ve çubuk gibi ise protein lifli protein olarak sınıflandırılır. Çoğu kez etkileşimler moleküllerin hacmini düzensiz sargıda görüldüğünden daha aza indirgerler. Bu durumda molekül yapısı kompakt hali alır.



Figür 1. Protein yapıları ve birbirleri arasındaki dönüşümleri

Proteinlerin Doğal ve Denatüre Halleri

Proteinlerin doğal hali;

1. makromoleküllerin doğada bulunan hallerinin yapısı,
2. makromoleküllerin enzimatik aktivitelerini koruyarak izole edilmiş yapısı,
3. makromoleküllerin herhangi bir biyolojik aktivite sergilemeden yalnızca ikincil yapıya sahip oldukları durumu olarak ifade edilebilir.

Denatüre ise bir makromolekülün enzimatik aktivitesini kaybettiği, ya da daha az ikincil yapıya sahip olduğu, makromolekülün doğal olmayan halleri için kullanılan bir terimdir.

Kaynakça: Physical Biochemistry, David Freifelder, Freeman and Company, N.y. 1982.

Prosedür:

Sığır Serum Albümin (Bovine serum albumin – BSA) Tamponunun Hazırlanması

- 1) 5 mg BSA küçük bir kaptan tartılır.
- 2) 1000µl fosfat çözeltisi (pH=7.4) eklenip karıştırılır.
- 3) Kap BSA stok tamponu olarak işaretlenir.
- 4) Örneğin absorbansı UV spektrometre ile ölçülür. Ölçülen absorbans çok yüksek olacağından bu solüsyon seyreltilecektir.
- 5) Stok çözeltiden 200 µl BSA alınır.
- 6) Üzerine 800 µl fosfat çözeltisi eklenir. (200 µl BSA + 800 µl fosfat çözeltisi). Bu şekilde BSA seyreltilmiş olacaktır.

Deneyin geri kalan aşamalarında UV spektrometrede seyreltilmiş olan BSA çözeltisi kullanılacaktır.

Proteinlerin Katlanma ve Açılmalarının Gözlemlenmesi

- 1) Spektrofotometre açılır.
- 2) Spektrofotometrenin başlangıç (initialization) durumuna gelmesi beklenir.
- 3) Bu süreç içinde örnek tutucunun açılmaması gerekir.
- 4) 1 ml fosfat çözeltisi iki kuartz küvete konularak küvetler örnek tutuculara yerleştirilir.
- 5) "Baseline correction" yapılır.
- 6) Örnek tutucudaki küvet çıkartılır ve içindeki fosfat çözeltisi boşaltılır.
- 7) Küvet tamamen kuruduktan sonra 1 ml seyreltilmiş BSA stok çözeltisi üzerine eklenir. 'Return' düğmesine basılarak menü kısmından 'spectrum' seçilir.
- 8) **SPECTRUM** kısmından **MODE** açılır.

- 9) Dalgaboyu limitleri 240nm-800nm olarak belirlenir.
- 10) BSA'nın verdiği en yüksek absorbandsın dalgaboyunu bulmak için 'Scan' tıklanır.
- 11) Bu şekilde o spektrumun tepe noktası olan λ değeri (λ_m) elde edilir.
- 12) **RETURN** tıklanır ve **MODE** seçilir.
- 13) 'Photometric' kısım olan fotometrik ayarların yapıldığı bölüm seçilir.
- 14) λ_m değeri nm cinsinden yazılır.
- 15) **ENTER** düğmesine basılır.
- 16) Farklı sıcaklıklardaki absorbands değerleri nm cinsinden kaydedilir. Her bir sıcaklık aralığında, örneğin istenilen sıcaklıkta dengelenebilmesi için absorbands değerini kaydetmeden önce 5 dk beklemek gerekmektedir.
- 17) Örneğin en yüksek sıcaklıktaki absorbands değerlerinin okuması bittikten sonra spektrometreyi tekrar başlangıç sıcaklığı olan 5°C'ye kadar soğutulur.
- 18) Sođutma işleminde sonra başlangıç sıcaklığı olan bu değerdeki absorbands değerini tekrar okunur.

SONUÇLAR:

Tablo 1. Sıcaklığın proteinler üzerindeki etkisi

Stok Tampon içerisindeki BSA	
T (°C)nm'deki Absorbans
5	
10	
15	
20	
25	
30	
35	
40	
45	
55	
60	
5	