

Proteinlerin Isı İle Denatürasyonu Esnasında Meydana Çıkan Anyonik Gruplar

The Anionic Groups of Proteins Becoming Accessible During Heat-denaturation

Nevzat ÖNER ve İlgihan ÖNCEL *

Natif halde bulunan bazı proteinlerin uzun peptid zincirlerinin yumak tarzında katlanarak sferoproteinleri teşkil ettikleri bilinmektedir. Çeşitli aminoasitlerden meydana gelen ve bir polipeptid zincirinden ibaret olan protein molekülünde (-SH), (HO-fenil-), serbest (-COOH), serbest (-NH₂) v.b. gibi birtakım gruplar mevcuttur. Natif halde katlanmış bulunan protein moleküllerinde bu gruplardan bazıları molekülün yüzeyindedir, bazıları ise katlanma dolayısıyla molekülün içinde saklı bulunurlar. Natif hallerinde bu durumda olan protein molekülüleri ısıtıldıkları zaman, molekül içi ve moleküller arası köprü ve bağlar açılır, proteinler bazı özelliklerini kaybederek yeni bir takım özellikler kazanırlar ve bu arada molekül içinde saklı bulunan gruplar meydana çıkar. Proteinlerin ısı denatürasyonu diye adlandırılan bu olay umumiyetle irreverzibldir. Natif proteinlere herhangi bir reaksiyon tatbik edildiği zaman bilhassa molekülün yüzeyine rastlayan gruplar reaksiyona girdikleri halde, ısı ile denatüre edilmiş proteinlerde hem yüzeydeki gruplar ve hem de molekülün açılması dolayısıyla yüzeye çıkan gruplar da reaksiyona girmektedirler.

Nitekim, bu düşünceleri izah eder mahiyette birçok çalışmalar vardır. Heffter⁽¹⁾, denatüre yumurta albumininin nitrosoprussiatla koyu pembe renk verdiğini, buna mukabil aynı proteinin natif şeklinin aynı madde ile renksiz kaldığını tesbit etmiş ve bu suretle denatürasyon esnasında (-SH) gruplarının meydana çıktığını göstermiştir. Daha sonra birçok araştırmacılar da⁽²⁻⁶⁾ bu bulguları doğrulamışlardır. Herriot⁽⁷⁾, denatüre ovalbuminin Folin'in fenol reaktifi ile,

* Biokimya Kürsüsü, Eczacılık Fakültesi, Üniversite - İstanbul.

Mirsky ve Anson⁽⁸⁾ ise denatüre proteinlerin fosfomolibdatla natiflerine nazaran daha koyu mavi renk verdiklerini tesbit etmişler ve bu suretle denatürasyon esnasında molekülün içinde bulunan (HO-fenil-) gruplarının meydana çıktığını göstermişlerdir. Haurowitz ve Tekman⁽⁹⁾, bir taraftan natif ve denatüre yumurta ve serum albuminlerini ayrı ayrı Folin'in fenol reaktifi ile muamele ederek denatüre proteinlerin daha koyu mavi renk verdiklerini göstermek suretile bu araştırmacıların bulgularını teyid etmişler, diğer taraftan aynı proteinlerin denatüre şekillerinin diazobenzen sülfonat ile natiflerine nazaran daha koyu renk verdiklerini tesbit ederek denatüre proteinlerde diazo reaksiyonu veren grupların meydana çıktığını göstermişlerdir. Yine Haurowitz ve arkadaşları⁽¹⁰⁾, ısıtılmış yumurta albumininin natifine nazaran daha fazla kongo kırmızısı bağladığını ve denatürasyon esnasında molekül içinde bulunan ve kongo kırmızısını bağlayan katyonik grupların meydana çıktığını göstermişlerdir.

Bu çalışmada, serum albumin ve ovalbuminin ısı ile denatürasyonunda anyonik grupların meydana çıktığını, proteinin ısı ile koagülasyonuna engel olan⁽¹¹⁾, asitlendirilmiş kongo kırmızısı ile göstermek istedik.

MATERYEL ve METOD

Deneylerimizde sığır serum albumini, kristalize ovalbumin ve kongo kırmızısı kullanıldı.

Sığır serum albumini, serumun amonium sülfatla fraksiyonlu çöktürülmesi ile elde edildi. Amonium sülfat dializ ile uzaklaştırıldı. Elde edilen serum albumin çözeltilisinin konsantrasyonu refraktometrik ve pH sı elektrometrik olarak ölçüldü. Serum albuminin konsantrasyonu % 1.8 ve pH sı 5.8 bulundu.

Kristalize ovalbumin Kekwick ve Cannan⁽¹²⁾ metodu ile elde edildi. Ovalbumin çözeltilisinin protein konsantrasyonu kjeldahlometrik ve pH sı elektrometrik olarak tâyin edildi; konsantrasyonu % 6.5 ve pH sı 4.8 bulundu.

Kongo kırmızısı (E. Merck AG. Darmstadt)'nin % 1 lik olarak hazırlanan ve pH sı 8.9 olan ana çözeltilisinden sulandırılmak ve seyreltik sülfürik asit ile asitlendirilmek suretile pH 4 - 5 arasında, 0.1

pH aralıklı, % 0.02 lik kongo kırmızısı çözeltileri hazırlandı. Bunun için, 1 ml % 1 lik kongo kırmızısı çözeltisine 45 ml saf su ilâve edildikten sonra 0.01 N sülfirik asit ve saf su ile istenen pH ya ayarlanarak hacmi su ile 50 ml ye iblâğ edildi. Bu % 0.02 lik, asitlendirilmiş kongo kırmızısı çözeltileri her deneyde yeni hazırlanarak derhal kullanıldı.

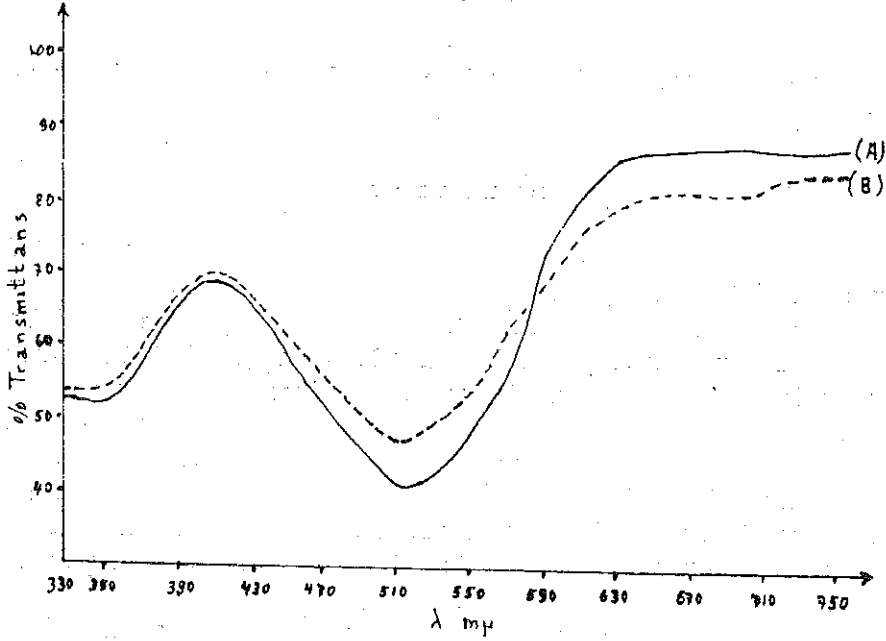
Spektrofotometrik ölçmeler DB model Beckman spektrofotometresi ile yapıldı.

B U L G U L A R

15 ml lik şifli kapaklı tübe; on defa sulandırılmış (% 0.18 lik ve pH sı 6.0 olan) sığır serum albumin çözeltisinden 2 ml (3.6 mg protein) kondu. Bunun üzerine 10 ml % 0.02 lik ve pH sı asitle 4.5 e ayarlanmış, menekşe rengindeki, kongo kırmızısı çözeltisinden (2 mg kongo kırmızısı) ilâve edildi, karıştırıldı. Şarap kırmızısı rengini alan karışımın pH sı ölçüldü, 5.9 bulundu. Tüp muhteviyatı iki eşit kısma bölündü. Bunlardan biri kaynar su banyosunda 15 dakika ısıtıldı, rengi gelincik kırmızısına dönen ve berrak kalan çözelti, musluk suyu ile soğutulduktan sonra pH sı ölçüldü, 6.3 bulundu. Isıtılmış ve ısıtılmamış numuneler saf su ile yirmibeş defa sulandırıldıktan sonra transmittansları, saf suya karşı, spektrofotometrede ölçüldü. Şarap kırmızısı renginde olan ısıtılmamış deney ile gelincik kırmızısı rengini alan ısıtılmış deney arasında gözle görülen renk farkı (ısıtılmışta kırmızı rengin fazlalaşması) spektrofotometrik olarak da tesbit edildi. Aşağıdaki grafikde asitlendirilmiş (pH = 4.5) kongo kırmızısı muvacehesinde ısıtılmış (A) ve ısıtılmamış (B) sığır serum albuminin 330 - 750 m μ dalga boyları arasındaki transmittans eğrileri görülmektedir.

330 - 580 m μ arasında, ısıtılmış deneyin transmittans değerleri ısıtılmamış deneyin transmittans değerlerinden daha küçük, 580 - 750 m μ arasında ise daha büyüktür. Her iki deneyde de en küçük transmittans en büyük absorpsiyon 510 m μ de ve en büyük transmittans farkı 5 - 7 kadar olup 490 - 560 m μ ile 600 - 700 m μ arasındadır. Deneylerimizde, 490 - 560 m μ arasında en fazla absorpsiyon yapan kırmızı renk olduğundan ısıtılmış deneyin transmittansı bu aralıkta daha azdır. 600 - 700 m μ arasında ise en çok absorpsiyon yapan mavi renktir. Isıtılmış deneyde mavi molekül sayısı ısıtılma-

mişa nazaran daha az olduğundan, bu aralıkta, ısıtılmış deneyin absorpsiyonu ısıtılmamışinkinden daha az yani transmittansı daha yüksektir.



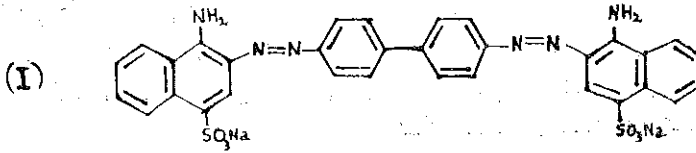
Grafik. — Asitlendirilmiş (pH=4,5) kongo kırmızısı muvacehesinde ısıtılmış (A) ve ısıtılmamış (B) sığır albuminin absorpsiyon spektrumları.

Yukarıdaki deneyler sığır serum albumini ile, 0.1 aralıkla, 4-5 arasındaki bütün pH larda tekrarlanmış hemen hemen aynı transmittans farkları bulunmuştur. Sulandırılmış, kristalize ovalbumin çözeltisi (% 0.18 ve pH sı 5.0) ile aynı şartlarda yapılan deneylerde bu transmisyon farkı daha az olup 3-4 kadardır.

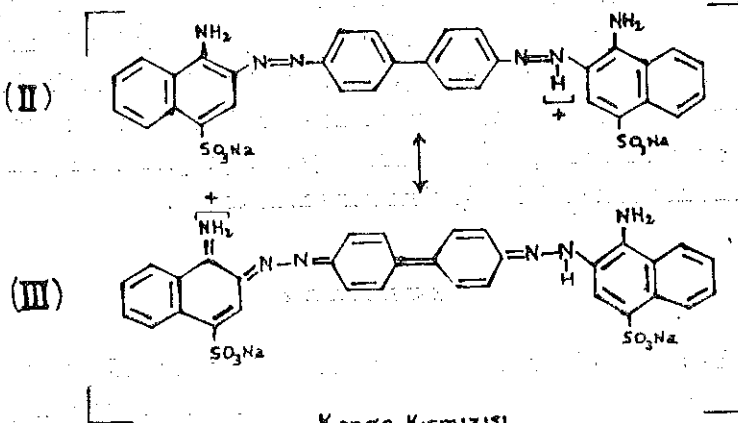
Sığır serum albumini ve pH sı 4.0 olan (ovalbumin ile pH sı 4.2 olan) kongo kırmızısı ile yapılan deneylerde bulanıklık müşahede edildiğinden bu ve bunun altındaki pH larda çalışmak mümkün olmamıştır. pH 5 in üstündeki kongo kırmızısı çözeltileri muvacehesinde ısıtılmış ve ısıtılmamış protein deneylerinin renkleri arasında gözle bariz fark görülmediği için bunların spektrofotometrik ölçmeleri yapılmamıştır.

TARTIŞMA

Sudaki çözeltisi kırmızı renkli olan kongo kırmızısı kısmen asitlendirildiği zaman, moleküllerinin bir kısmı H^+ bağlayarak mavi renkli şekle döner. Bundan dolayı, çözelti mavi ile kırmızı rengin karışımı olan menekşe renginde görünür. Aşağıdaki formüllerde kongo kırmızısı molekülü (I) ve bunun asitlendirilerek H^+ almış şeklinin iki sınır formülü (II), (III) görülmektedir.



Kongo Kırmızısı
= = (Kırmızı)



Kongo Kırmızısı
(Mavi)

H^+ bağlamış kongo kırmızısı molekülünün mavi rengi bu iki sınır formülü arasındaki rezonanstaki ileri gelmektedir⁽¹⁰⁾.

Asitlendirilmiş kongo kırmızısı çözeltisi, isoelektrik noktasının üstünde bulunan, protein ile temasa gelince rengi menekşeden şarap kırmızısına döner ve pH yükselir. Buna sebep protein moleküllerinin

deki anyonik grupların ortamdaki H^+ larını bağlamaları ile mavi moleküllerden bir kısmının bazik karakterli kırmızı şekle çevrilmesidir. Protein ve kongo kırmızısı karışımı ısıtıldığı zaman karışımın kırmızı renginin şiddetlenmesi, proteinin ısı ile denatürasyonu esnasında meydana çıkan anyonik gruplarının da ortamdaki H^+ almaları neticesinde kırmızı kongo kırmızısı moleküllerinin artması ile izah edilebilir. Nitekim, ısıtılmış deneyde kırmızı rengin fazlaştığı gözle görüldüğü gibi spektrofotometrik olarak da tesbit edilmektedir. Bu artış bilhassa 490 - 560 $m\mu$ ler arasında barizdir. Kırmızı moleküllerin artması ile mavi moleküllerin azaldığı, ısıtılmış numunede 600 - 700 $m\mu$ arasında transmittansın ısıtılmamış numuneye nazaran daha yüksek yani mavi rengin absorpsiyonunun daha düşük olmasından da anlaşılmaktadır.

Ö Z E T

Sığır serum albumini ve ovalbumin asitlendirilmiş kongo kırmızısı muvacehesinde ısıtıldığı zaman karışımın kırmızı rengi, ısıtılmamış deneye nazaran, gözle görülür şekilde şiddetlenmektedir. Kırmızı renk şiddetinin arttığı spektrofotometrik olarak da tesbit edilmiş ve bunun, proteinlerin ısı ile denatürasyonu esnasında katlanmış molekülün iç tarafındaki anyonik grupların meydana çıkmasının neticesi olabileceği ileri sürülmüştür.

S U M M A R Y

The accessible anionic groups of heat denatured bovine serum albumin and ovalbumin was studied, spectrophotometrically, in the presence of acidified congo red.

The denatured proteins showed more intensive red colour than their native states. The increase of the colour intensity was attributed to the anionic groups of unfolded protein chains, which become accessible during heat-denaturation. The mechanism of this phenomenon was discussed.

L İ T E R A T Ü R

1. Heffter, A. : *Chem. Ztg.* **11**, 322 (1907). - Ref. *Advanc. Prot. Chem.* **2**, 363 (1945).
2. Arnold, V. : *Z. Physiol. Chem.* **70**, 300 (1911). - Ref. *Advanc. Prot. Chem.* **2**, 363 (1945).
3. Mirsky, A. E., Anson, M. L. : *J. Gen. Physiol.* **18**, 307 (1935). - Ref. *Advanc. Prot. Chem.* **2**, 364 (1945).
4. Kuhn, R., Desnuelle, P. : *Z. Physiol. Chem.* **251**, 14 (1938).
5. Greenstein, J. P. : *J. Biol. Chem.* **125**, 501 (1938).
6. Anson, M. L. : *J. Gen. Physiol.* **24**, 399 (1941).
7. Herriott, R. M. : *Ibid.* **19**, 283 (1935). - Ref. *Advanc. Prot. Chem.* **2**, 364 (1941).
8. Mirsky, A. E., Anson, M. L. : *J. Gen. Physiol.* **19**, 451 (1936). - Ref. *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 2265 (1952).
9. Haurowitz, F., Tekman, S. : *Biochim. Biophys. Acta* **1**, 484 (1947).
10. Haurowitz, F., Dimoia, F., Tekman, S. : *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 2265 (1952).
11. Tékman, s., Öner, N. : *Nature (London)*. **204**, 287 (1964).
12. Kekwick, R. A., Cannan, R. K. : *Biochem. J.* **30**, 227 (1936).

(Redaksiyona verildiği tarih : 8 Ağustos 1967)