

PhD értekezés

Dipoláris relaxáció vizsgálata
időbontott spektroszkópai módszerekkel

Buzády Andrea

Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Biofizikai Intézet

2002

Program megnevezése: Funkcionális fehérjedinamika
vizsgálata biofizikai módszerekkel

Program vezető: Dr. Somogyi Béla, egyetemi tanár

Köszönetnyilvánítás

Köszönetet mondok témavezetőmnek Dr. Somogyi Bélának a szakmai irányításért és a munkám során nyújtott segítségért.

Őszintén köszönöm férjemnek és kollégámnak Dr. Erostyák Jánosnak nélkülözhetetlen segítségét.

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Brunner Jánosnénak a laboratóriumi munkában nyújtott segítségéért és tanácsaiért, valamint a Biofizikai Intézet minden munkatársának segítőkész közreműködésükért.

Tartalomjegyzék

Bevezetés.....	2
1. Irodalmi áttekintés.....	3
1. 1. Lumineszcencia spektroszkópia.....	3
1. 2. Fehérjék belső fluoreszcenciája.....	4
1. 3. Humán szérum albumin szerkezete.....	6
1. 4. Külső fluorforok, acrylodan.....	7
1. 5. Fehérjékhez kapcsolt fluoroforok.....	7
1. 6. Oldószer-hatás.....	8
1. 7. Oldószer-relaxáció dinamikája.....	9
1. 8. Dipoláris relaxáció biológiai rendszerekben.....	14
1. 9. Az acrylodannal jelölt szérum albumin.....	20
2. Célkitűzés.....	22
3. Módszerek, anyagok.....	23
3. 1. Fázisfluorimetria.....	23
3. 2. Pumpa-próba mérőmódszer.....	27
3. 3. Anyagok, minta-előkészítés.....	30
4. Eredmények, diszkusszió.....	31
4. 1. A triptofán körüli környezet relaxációjának vizsgálata HSA-ban fázisfluorimetriás mérésekkel.....	31
4. 2. A cisztein körüli környezet relaxációjának vizsgálata HSA/AC-ban fázisfluorimetriás mérésekkel.....	41
4. 3. Az acrylodan körüli oldószer környezet relaxációjának vizsgálata pumpa-próba mérésekkel.....	48
4. 4. A cisztein körüli környezet relaxációjának vizsgálata HSA/AC-ban pumpa-próba mérésekkel.....	60
5. Az eredmények összefoglalása.....	64
Irodalomjegyzék.....	68
Saját közlemények.....	77

Bevezetés

A fehérjék struktúrájának és dinamikájának vizsgálatakor széles körben alkalmazott módszer a fluoreszcencia spektroszkópia. Vizsgálhatjuk akár a fehérjékben lévő saját fluoreszcenciával bíró aminosavak, akár a molekula kiszemelt részéhez kapcsolt festékmolekula – szonda, fluorofor – világítását. Míg a steady-state mérések segítségével a fluorofor körüli környezet struktúrájáról tudunk információt szerezni, az időbontott mérések révén ezen túlmenően, vizsgálhatjuk azon fotofizikai és fotokémiai folyamatok dinamikáját, amelyek hatással vannak a gerjesztett állapotú fluoroforra. Ezek például: az elektron- és proton-transzfer sztatikus és dinamikus kioltó hatása, gerjesztési energia átadása a fluorofor és más csoportok között, és az általunk tanulmányozott dipoláris relaxáció (DR). A DR vizsgálatával a szonda környezetének dinamikájáról szerezhetünk értékes információkat.

A humán szérum albumin (HSA) a vérkeringésben fontos szerepet játszó transzport fehérje, fehérje-mátrixának dinamikai vizsgálata széleskörű érdeklődésre tart számot.

A fluoreszcencia átmenet élettartama (1–10 ns) alatt a nagy molekulákban, fehérjékben lejátszódó relaxációs folyamatok jól követhetők a fluoreszcencia emisszió időbontott megfigyelésével. A vizsgálatok során a 100 fs–10 ns időskálán vizsgáltuk a HSA fehérje-mátrixában a dipoláris relaxáció jelenségét.

Az időbontásos fluoreszcencia spektroszkópai módszerek közül elsőként a fázisfluorimetriát alkalmaztuk, amelynek segítségével a 0,1–10 ns közötti időtartomány vizsgálható. Szükségesnek látszott az időfelbontást a szubpikoszekundumos időtartományokra is kiterjeszteni, ahol az eredményeket pumpa-próba mérések segítségével kaptuk.

A dolgozatban a lumineszcencia spektroszkópia kapcsolódó irodalmának áttekintését, majd a fogalmak, matematikai eszközök, mérési módszerek, a minta-előkészítés ismertetését követően a munkánk során kapott eredményekről, következtetésekről számolok be.

1. Irodalmi áttekintés

1. 1. Lumineszcencia spektroszkópia

A röntgen krisztallográfiás mérések segítségével megismerhetjük a biológiai rendszerek struktúráját, így azonban csak sztatikus képet kaphatunk a molekulák kapcsolódásairól, a kötésekről, a részegységek egymáshoz képesti elhelyezkedéséről. A lumineszcencia spektroszkópia segítségével ezen túlmenően, mód nyílik a konformációk időbeli fluktuációjának, egymásba alakulásának, a rendszer dinamikájának megfigyelésére is. A biológiai rendszerek mozgásformái nagyon változatosak, az atomok lokális vibrációja, az atomcsoportok és egész domének relatív pozíciójának globális változása is megfigyelhető. Ezeknek a mozgásoknak a sebességét, frekvenciáját jellemző karakterisztikus időállandók nagyon széles időskálán fordulnak elő, a pikoszekundumtól a szekundumig terjednek.

A fény abszorpcióját követően a rendszer emissziója lehet fluoreszcencia és foszforeszcencia. A fluoreszcencia az $S_1 \rightarrow S_0$ átmenethez tartozik, élettartama ns-os nagyságrendű, a foszforeszcencia a tripllett állapotból alapállapotba való átmenetet jelenti és – tiltott átmenet lévén – hosszabb élettartamú [1-4]. Így a fluoreszcencia és foszforeszcencia mérések különböző időskálájú jelenségek vizsgálatát teszik lehetővé. Az előbbieket a ps – 10 ns-ig, az utóbbiak a μ s – s-ig terjedő tartományon alkalmazható módszerek.

A steady-state mérések során mérjük az emisszió színképi eloszlását, az összintenzitást, az emisszió polarizációját, anizotrópiáját.

Az időbontott mérés technikák segítségével lehetőség van a fenti paraméterek időfüggésének vizsgálatára is. Ilyen mérőmódszerek pl. a mintavételezéses mérés, az időkorrelált egyfotonszámlálás, a fázisfluorimetria, a pumpa-próba módszerek, a fluoreszcencia-upkonverzió [3-6].

A környezeti paraméterek (pl.: hőmérséklet, nyomás, viszkozitás, pH, dielektromos állandó) változása természetesen megváltoztatja az emisszió paramétereit (intenzitásváltozás, spektrum eltolódás, polarizáció mértékének változása, stb.), ezeket megfigyelve következtethetünk a biológiai rendszerekben a működési mechanizmus és a struktúra, dinamika közötti kapcsolatra.

1. 2. Fehérjék belső fluoreszcenciája

A fehérjékben előforduló aminosavak közül csak három fluoreszkál a triptofán (Trp), a tirozin (Tyr) és a fenilalanin (Phe) [3]. Abszorpciós spektrumaikban két sáv jelenik meg, a legrövidebb hullámhosszak felé a Phe-nak van abszorpciója, a hosszabbak felé a Trp-nak. Megfelelő hullámhossz megválasztásával (> 295 nm) a Trp szelektíven gerjeszthető. Míg a szabad Trp és a Tyr kvantum hatásfoka megközelítőleg azonos: 0,12, addig a Phe kvantum hatásfoka: ~0,03. Az alacsony mértékű abszorpció és fluoreszcencia kvantumhatásfok miatt a Phe hozzájárulása a fehérjék belső fluoreszcenciájához rendkívül csekély. Vannak azonban olyan molekulák, amelyekben nem fordul elő sem Trp, sem Tyr, Phe viszont igen. Az irodalomban, ha keveset is, de találhatunk a Phe fluoreszcenciáját vizsgáló közleményt. Érzékeny mérő módszerekkel, pl. szinkrotron gerjesztéssel és időkorrelált egyfotonszámlálással, a három belső fluorofor közül csak Phe-t tartalmazó rendszerek is megfigyelhetők [7-10].

A Tyr és a Trp világításának megfigyelésére vonatkozó irodalmat nagy számban találhatunk [11-23]. A Tyr-t és Trp-t tartalmazó fehérjék emissziós spektruma általában nem állítható elő egyszerűen a két aminosav spektrumának lineáris kombinációjából. Az abszorpciós és emissziós spektrumok átfednek, az eredőt több folyamat befolyásolja, pl.: a Tyr és Trp közötti energiatranszfer, a szomszédos oldalláncok kioltó hatása, a mikrokörnyezet paramétereinek változása mind hatással vannak az eredő spektrumra. A Tyr emissziós spektruma kevésbé függ a környezettől, a maximum általában 305 nm-nél van. A Trp fluoreszcenciája azonban érzékeny a környezeti paraméterek változásaira, pl.: az emissziós maximum 330 – 350 nm között változhat a környezet polaritásának megfelelően. Ez azzal kapcsolatos, hogy a Trp gerjesztésekor jelentősen megváltozik a dipólmomentum.

A Trp-nak két lehetséges elektrongerjesztési állapota van: 1L_a és 1L_b , a két átmeneti dipólmomentum közel merőleges egymásra [24]. Az 1L_b állapot dipólmomentuma az oldallánc irányában van, így az ehhez tartozó átmenetkor alig változik a dipólmomentum iránya. Az 1L_a gerjesztésekor azonban nagy az átmeneti dipólmomentum. Az alapállapotbeli 2D az 1L_a gerjesztett állapotban

5,5D-re változik [25]. Ugyanakkor az 1L_a alacsonyabb energiájú állapot, mint az 1L_b . A Trp emisszió nagyrészt az 1L_a állapothoz kapcsolható.

A fehérjék belső fluoreszcenciája – még az egy Trp-t tartalmazóké is – gyakran mutat nem-exponenciális lecsengést [26-36], amit az irodalomban többféle módon interpretálnak. Ez lehet a DR, a gerjesztett állapotú reakciók (pl. proton vagy elektron transzfer), a fehérje konformációs fluktuációja miatt különböző konformációs állapotban lévő Trp csoportok heterogenitásának következménye. A kép még bonyolultabb a több Trp-t és Tyr-t tartalmazó fehérjék esetében, ahol az energiatranszfer és a kioltás is szerepet játszhat a mért fluoreszcencia lecsengés időfüggésében [15-18, 28].

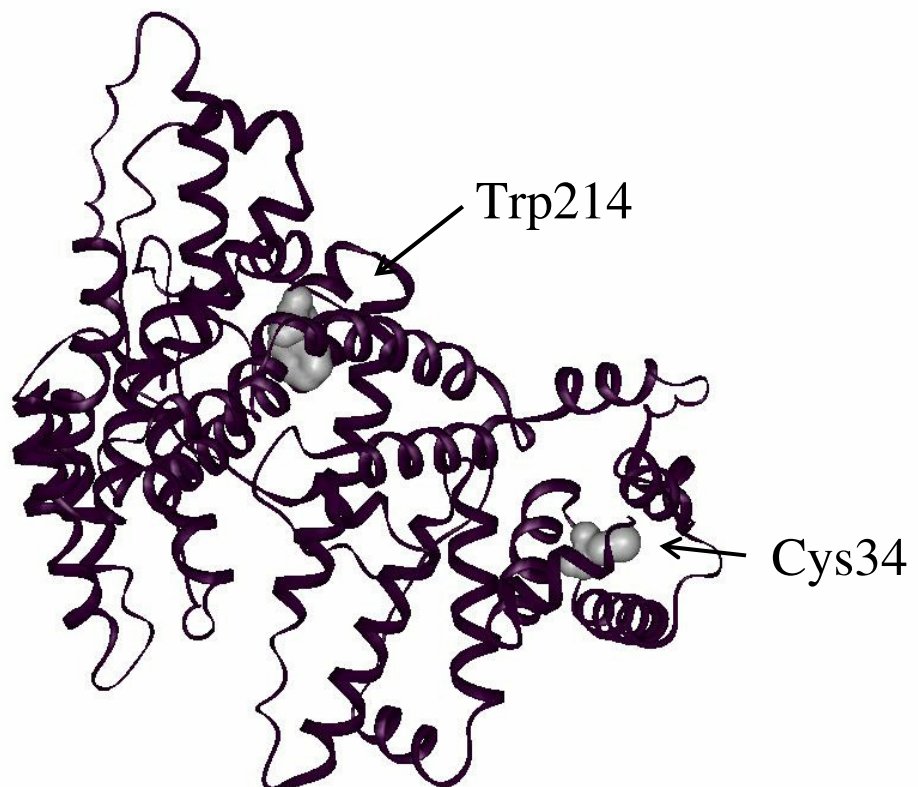
Az eredő nem exponenciális lecsengést mind több diszkrét exponenciális összegével, mind élettartam eloszlással közelíthetjük. [33-38]. Általában két vagy három exponenciális komponens használata már kielégítő illesztést eredményez. A mérés hibáját is figyelembe véve gyakran nem tudunk szignifikáns különbséget tenni a meghatározó folyamatok között. Ugyanazt a lecsengési görbét egyformán jól illeszthetjük különböző élettartam-komponensekkel és amplitúdókkal is [34, 39].

Alapállapotú heterogenitást feltételezve lehetséges a különböző élettartam-komponensek rögzítése az illesztésben (decay-associated spectra), ekkor csak a komponensek amplitúdója változik [18, 19, 40]. Ebben az esetben az adott élettartam komponenseket a különböző állapotú fluoroforok fluoreszcencia élettartamaival azonosítják.

Megfigyelték azt is, hogy a fehérje-mátrix különböző helyein előforduló Trp-ok mobilitása különbözik, a molekula belsejében lévők kevésbé mobilak [23, 41, 42].

1. 3. A humán szérum albumin szerkezete

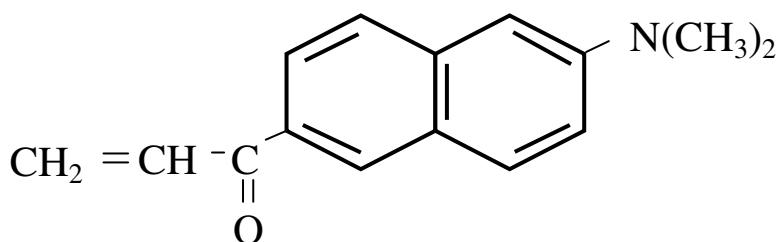
Az általunk vizsgált HSA (human serum albumin) struktúrájának részleteit 2,8Å feloldással X. M. He és D. C. Carter határozták meg [43]. A vérkeringésben fontos szerepet játszó transzport fehérje kb. 60 kD nagyságú, globuláris szerkezetű. Három, strukturálisan homológ doménből áll, melyek mindegyike két kisebb doménre osztható. Két legfontosabb ligand-kötőhelye a IIA és a IIIA doménben van. Aminosavjai között egyetlen triptofán (Trp214) van a molekula belsejében, a IIA-ban, hidrofób zsebben. Anizotrópia mérésekből arra következtettek, hogy szobahőmérsékleten a Trp rotációs szabadsága korlátozott, bár ez a hőmérséklet növekedésével csökken [23]. Az egyetlen szabad SH csoportot tartalmazó cisztein (Cys34) a molekula felszínének közelében az IA doménben, hidrofób zsebben, az oldószer számára mégis hozzáférhetőbb helyen van (1. ábra). A cisztein maga nem világít, de SH csoportjához kovalens módon köthető fluorofor.



1. ábra. A Trp és a Cys helyzete a HSA háromdimenziós szerkezetében.
(Az ábrát a WebLab ViewerLite program segítségével a Protein Data Bank-
ból származó fájl alapján készítettük)

1. 4. Külső fluoroforok, acrylodan

Ha nincs a megfigyelendő domén közelében alkalmas belső fluorofor, akkor fluoreszkáló festéket kapcsolhatunk a fehérjéhez. Számos ilyen festéket szintetizáltak az utóbbi két-három évtizedben. Ezek között megtaláljuk a kovalensen és az egyéb módon, pl.: elektrosztatikus kölcsönhatás révén kapcsolódókat. Vannak köztük, amelyek fluoreszcencia kvantumhatásfoka oldószerben alacsony, de fehérjéhez kötődve igen erősen fluoreszkálnak. A környezet polaritásának változására igen érzékeny szondák jól használhatók a fehérje dinamikai vizsgálatoknál. Előny lehet, ha a szonda szelektíven kapcsolódik a fehérje egy bizonyos típusú csoportjához, pl.: az 6-acryloyl-2-dimethyl-aminonaphtalene (AC, acrylodan) szelektív SH jelölő [44]. Az AC nagy átmeneti dipólmomentummal rendelkezik és így igen érzékeny a környezet polaritásának változására. Molekulasúlya 225D (2. ábra).



2. ábra. Az AC szerkezeti képlete

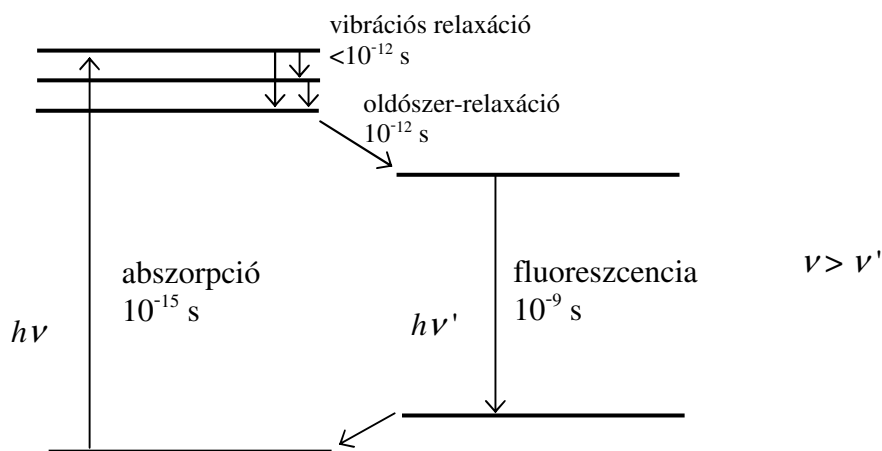
1. 5. Fehérjéhez kapcsolt külső fluoroforok

Torna-peroxidázhoz kapcsolt prodan (6-propionyl-2-dimethyl-aminonaphtalene) [45] és DANCA (6-naphtoyl-4-trans-cyclohexanicoic acid) fluoreszcencia anizotrópiájának megfigyelésével határozták meg a hem kötőhelyének polaritását [46]. Marha szérum albuminhoz kapcsolt dansyl rotációs reorientációs kinetikájának tanulmányozásával meghatározták a rotációs korrelációs időket és alapállapotú heterogenitást találtak [47]. A HSA ligandkötőhelyeinek affinitását, polaritását határozták meg a fehérjéhez kapcsolt flavonol, prodan és AC fluoreszcenciájának vizsgálatával [48, 49]. A

fluoreszcens szonda által okozott konformáció változást és a kötőhely sztatikus polaritását tanulmányozták a HSA és HAP (4-hydroxy-5-azaphenanthrene) proton-transzfer tautomer által alkotott komplexen [50]. Foszfolipid vezikulákba ágyazott DPH (1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene) rendszerben határozták meg a mikroviszkozitást [51]. A membrán különböző fázisú doménjeinek megoszlását vizsgálták prodan és laurdan (6-lauroyl-2-dimethyl-aminonaphtalene) segítségével, kihasználva, hogy a két fluorofor acil-csoportjának hossza eltérő, ezért megoszlásuk a víz és a membrán lipid rétege között különbözik [52]. ATP indukálta konformáció változásokat detektálták a miozin feji részében szintén a prodan fluoreszcenciájának megfigyelésével [53].

1. 6. Oldószer-hatás

A fluoroforok emissziós spektruma az abszorpciós spektrumhoz képest általában a hosszabb hullámhosszak felé esik [2]. Az emissziós és abszorpciós maximum közötti különbséget Stokes-eltolódásnak nevezzük (3. ábra).



3. ábra. Stokes-eltolódás a Jablonszki-diagram alapján.

Ha különböző dielektromos állandójú oldószerben vizsgáljuk a fluorofor spektrumát, azt tapasztaljuk, hogy a maximum érzékeny a környezet polaritására. A nagyobb dielektromos állandójú oldószerben mért emissziós spektrum a hosszabb hullámhosszak felé található, ezt nevezzük oldószer-hatásnak. A fluorofor az abszorpciót követően, gerjesztett állapotban nincs egyensúlyban a környezetével, a rendszer új egyensúlyi helyzet felé relaxál. Ha a relaxáció

időállandója rövidebb, mint a fluoreszcencia élettartama, a fluoreszcencia átmenet a relaxált állapotból jön létre. A különböző dielektromos állandójú oldószerekben a rendszer gerjesztett állapotbeli egyensúlyi helyzete különbözik. A Stokes-eltolódás több folyamat együttes eredménye: (1) vibrációs relaxáció, (2) a gerjesztés miatt az oldott molekulában megváltozik a dipólmomentum, ezt követi az oldószer molekulákhoz tartozó elektronfelhő és a molekulák újrendeződése, (3) a gerjesztett állapotban speciális kölcsönhatások jöhetnek létre az oldott molekula és az oldószer között. Ilyen speciális kölcsönhatások lehetnek a hidrogén kötések és a töltéstranszfer-komplexek kialakulása. Ezeknek a folyamatoknak és a spektrális paraméterekre gyakorolt hatásuknak univerzális – minden fluoroforra és minden oldószerre érvényes – kvantitív leírása természetesen nem lehetséges. A precíz értelmezéshez ismerni kell, hogy miként befolyásolja az oldószer – oldott molekula közötti kölcsönhatás a fluorofor energiaszintjeit alap és gerjesztett állapotban egyaránt. Az irodalomban ismertek elméletek és modellek, amelyek egyszerűsítő feltételezésekkel élve leírják az oldott molekula és az oldószer között foto-gerjesztést követően létrejövő kölcsönhatást.

Lippert modelljében [54] az oldott molekula gömb alakú és a körülötte lévő oldószer, mint egy kontínuum tölti ki a teret. A Lippert-egyenlet szerint az emissziós és abszorpciós maximum közötti különbség az oldószer dielektromos állandójától, törésmutatójától, a fluorofor alap- és gerjesztett állapotbeli dipólmomentumától függ. Bár a modell nem veszi figyelembe a speciális oldószerhatást, számos oldószer esetében jól írja le a kísérletek eredményeit.

1. 7. Oldószer-relaxáció dinamikája

Fenomenológikus leírások teremtenek kapcsolatot a fluoreszcencia élettartama, az oldószer-relaxáció időállandója és a steady-state emissziós spektrum maximuma között.

Bakhsiev és társai 1966-ban egyszerű folytonos modellt állítottak fel [55-57]. A modell szerint a gerjesztést követően a fluorofor emissziója az oldószer-relaxáció következtében folytonosan csökkenő energiájú állapotból jön létre. Az

emissziós spektrum hullámszámban kifejezett maximuma (ν_m) az oldószer-relaxáció időállandójával kifejezve (τ_s) exponenciálisan tolódik az időben:

$$\nu_m(t) = \nu_\infty + (\nu_0 - \nu_\infty) e^{-\frac{t}{\tau_s}}$$

ahol ν_0 és ν_∞ a kezdeti, ill. a relaxált állapothoz tartozó emissziós maximum. A modellben feltesszük, hogy az összfluoreszcencia lecsengés exponenciális (τ) és a spektrum alakja, szélessége időben nem változik. Ebben az esetben a steady-state spektrum maximumára a következő kifejezést kapjuk:

$$\nu_m = \nu_\infty + (\nu_0 - \nu_\infty) \frac{\tau_s}{\tau_s + \tau}$$

A ν_0 és ν_∞ meghatározásához alacsony ill. magas hőmérsékleten mérjük az emissziós spektrumot. Alacsony hőmérsékleten: $\tau_s \gg \tau$, az emisszió a nem relaxált állapotból jön létre és a maximum ν_0 -al lesz egyenlő. Míg magas hőmérsékleten: $\tau_s \ll \tau$ az emisszió a teljesen relaxált állapotból jön létre és a maximum ν_∞ -el lesz egyenlő.

Másik fenomenológikus modell a kétállapotú modell, melyet Demchenko fejlesztett tovább [3, 58]. A modell szerint a relaxáció két diszkrét állapot közötti reakcióval írható le. Két, szimultán megjelenő folyamatot kell figyelembe vennünk:

(1) a $k_f = \frac{1}{\tau_f}$ sebességi állandóval létrejövő fluoreszcencia átmenetet,

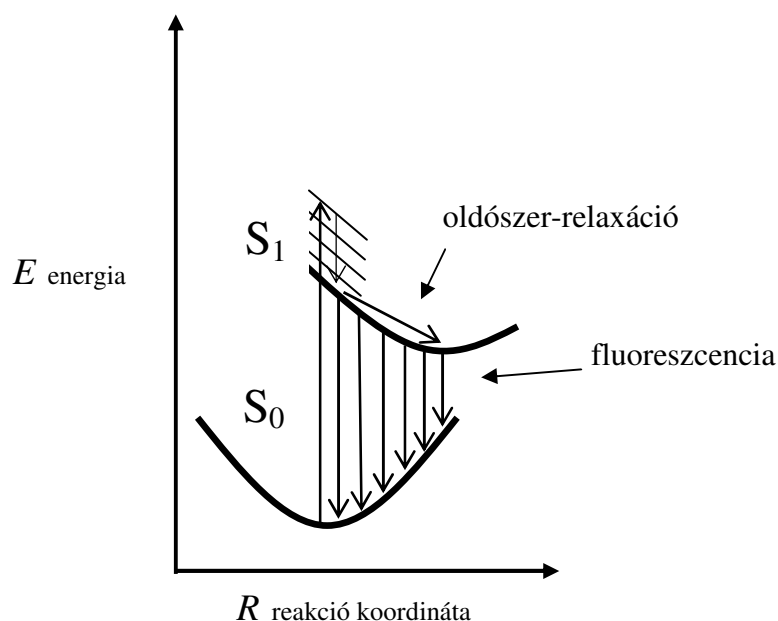
(2) a relaxált állapotba történő $k_r = \frac{1}{\tau_r}$ sebességi állandójú átmenetet.

A relaxálatlan forma spektrumát steady-state módszerekkel vagy időbontott méréssel tudjuk meghatározni. Előbbi esetben a mintát alacsony hőmérsékletre kell lehűteni, másik esetben a gerjesztés után rövid idő múlva vesszük fel a spektrumot. A relaxált forma spektrumát magas hőmérsékleten steady-state méréssel, vagy a gerjesztés után nagy időkésleltetéssel időbontott méréssel tudjuk meghatározni. Közbenső időben a spektrum az előbbi spektrumok lineáris kombinációja, így a modell szerint – ellentétben folytonos modellel – a spektrum

szélessége változik a relaxáció folyamán. A τ_r relaxációs időállandót egyszerűen meghatározhatjuk a fluoreszcencia lecsengés mérésével. Az emissziós spektrum rövid hullámhosszú oldalán mérve a lecsengési görbét két exponenciális komponensre kapunk, legyenek: τ_1 és τ_2 . A hosszabb komponens maga a fluoreszcencia élettartam, azaz $\tau_1 = \tau_f$ másik: $\frac{1}{\tau_2} = \frac{1}{\tau_r} + \frac{1}{\tau_f}$.

Mindkét modell hátránya, hogy csak abban az esetben alkalmazható, ha a fluoreszcencia lecsengése egy-exponenciális.

Az időbontott mérő módszerek fejlődésével lehetővé vált, hogy ne csak a steady-state spektrumok Stokes-eltolódását figyelhessük meg, hanem az eltolódás dinamikáját, időbeli lefolyását is. Ha a relaxáció időállandója összemérhető a fluoreszcencia élettartamával, akkor az abszorpciót követően lesznek molekulák, melyek emissziója a még nem relaxált állapotból jön létre és lesznek, amelyek a már relaxált egyensúlyi állapotból emittálnak. A később kibocsátott fotonok hullámhossza nagyobb lesz, mivel az átmenet alacsonyabb energiájú állapotból történik. Ha megfigyeljük az időbontott emissziós spektrumokat, akkor azt tapasztaljuk, hogy azok a vörös hullámhosszak felé tolódnak. Ezt nevezzük dinamikus Stokes-eltolódásnak (4. ábra).



4. ábra. A dinamikus Stokes-eltolódás az alap- és a gerjesztett állapot potenciál görbéje alapján.

Az emissziós spektrumok súlypontjának időfüggését leíró függvény:.

$$\nu(t) = \frac{\int I(\nu, t) \nu d\nu}{\int I(\nu, t) d\nu}$$

ahol $I(\nu, t)$ a fluoreszcencia intenzitás értéke ν hullámszámnál és t időpillanatban. A dinamikus Stokes-eltolódást leíró $S(t)$ függvény [59]:

$$S(t) = \frac{\nu(t) - \nu(\infty)}{\nu(0) - \nu(\infty)}$$

ahol $\nu(0)$ ill. $\nu(\infty)$ az emissziós spektrum súlyponja a kezdeti időpontban, ill. végtelen sok idő elteltével. A dinamikus Stokes-eltolódás a spektrális vagy energetikai relaxációt jellemzi. Felvetődik, hogy megadható-e a precíz korreláció a spektrális relaxációt jellemző időállandó és az oldószer dielektromos relaxációjának sebességét jellemző időállandó között.

Az oldószer-relaxáció dinamikáját vizsgálják elméleti modellekkel [59-66], numerikus szimulációkkal [67-74] és kísérleti módszerekkel [75-88].

A legkorábbi elméletek [54] a fluorofor megváltozott dipólmomentuma által keltett elektromos tér és az oldószer molekulák közötti kölcsönhatást az un. üreg dipol/dielektromos kontinuum modell [89, 90] alapján tárgyalják. A modell szerint a fluorofor egy adott méretű üregben egy dipólus, és az adott dielektromos állandójú oldószer a körülötte lévő teret folytonosan tölti ki. Gyakran éri kritika ezt a modellt, hiszen nem veszi figyelembe, hogy az oldószer molekulákból áll. Számos közlemény mutatja azonban, hogy kitűnő kiinduló pont lehet valós fluorofor – oldószer kölcsönhatás energetikájának leírásához, bár nem veszi figyelembe a speciális oldószer-hatást. Különösen jó egyezést mutat ez a modell a kísérleti eredményekkel poláros oldószerek esetén [91, 92]. Bagchi [59] a modell egyik tovább fejlesztett változatát adta meg, melyben az oldószer sztatikus dielektromos állandóját frekvenciafüggő taggal bővítette. Nem tud különbséget tenni a klasszikus dielektromos kontinuum elmélet a valóban nempoláros oldószerek (pl. ciklohexán) és a nem dipoláros oldószerek (pl. benzol) között. Mivel a benzol dipólmomentuma zérus, az elmélet nem tudja

magyarázni a Stokes-eltolódást. Megoldás lehet a dipólus helyettesítése kvadro-, ill. magasabb rendű pólusokkal [67]. A molekula szimulációs eljárások lehetőséget adnak nemlineáris effektusok – pl.: gerjesztett-állapotbeli töltéstranszfer – figyelembe vételére is [68]. A speciális oldószer kölcsönhatások közül a H-kötések szerepét vizsgálva megállapítható, hogy a H-kötések megléte, vagy gerjesztett állapotban való megjelenése lassítja a relaxációt [72]. Az oldott molekulák rotációs dinamikáját jelentősen befolyásolják az oldott anyag–oldószer közötti elektrosztatikus kölcsönhatások (dipól–dipól, dipól–multipól stb.) [70]. Mivel ezek a kölcsönhatások, (pl.: a H-kötések) állapot-függőek, így az oldott molekulák rotációs dinamikája jelentősen eltérő lehet alapállapotban, ill. gerjesztett állapotban. Az analitikus megoldások nem, de a szimulációk lehetőséget adnak arra is, hogy az oldószert ne egy folytonos rendszerként írjuk le, hanem felosszuk zónákra, un. solvatációs héjakra az oldott molekula körül. A „multishell continuum” modell [73] figyelembe veszi, hogy a kölcsönhatás különbözik az oldott molekulától, azaz a perturbáció helyétől való távolság függvényében.

Maroncelli [91, 92] két közleményben tekintette át az elméleti, szimulációs és kísérleti munkák eredményeit, és vetette össze őket „kritikus szemmel”. Ha az oldószer–oldott anyag kölcsönhatás mind sztatikus, mind dinamikus jellegét le akarjuk írni, akkor a kölcsönhatási energiának egy átlagérték körüli gyors fluktuációját kell leírnunk. Ezen fluktuációk időfüggése: $\delta E(t) = E(t) - \langle E \rangle$ szoros összefüggésben van az oldószerkörnyezetben előforduló dinamikus fékező folyamatokkal. A sokaságra átlagolt fluktuációk időkorrelációs függvénye: $\langle \delta E(0) \cdot \delta E(t) \rangle$ szolgál a folyamatok időfüggésének leírására. Az említett korrelációk időfüggése a solvatáció dinamika néven ismert jelenség. A vizsgálatok során számos kérdés vethető fel, melyek közül a legfontosabbak: melyek azok a molekuláris szintű kölcsönhatások és mozgások, melyek hozzájárulnak a solvatációhoz, vagyis mely jelenségek dominálnak egy-egy konkrét oldott anyag–oldószer páros esetén; milyen nagyságú és milyen időskálájú jelenségek határozzák meg az időbeli változásokat? A solvatáció dinamika vizsgálatára alkalmazott időbontott spektroszkópiai mérések a

gerjesztett állapotbeli újra-eloszlást monitorozzák az emissziós színeképtolódása időfüggésének mérésével. Az időbeli evolúció jellemzésére a normalizált válaszfüggvényt, $S(t)$ -t használjuk.

Hogyan kapcsolódik ez a nem-egyensúlyi állapotfejlődést leíró függvény az oldószer fluktuációk korrelációjához? Feltéve, hogy az elektronátmenet okozta perturbáció nem túl nagy, a lineáris-válasz közelítés szerint:

$$C_{\Delta E}(t) \equiv \frac{\langle \delta E(0) \cdot \delta E(t) \rangle}{\langle (\delta \Delta E)^2 \rangle} \leftrightarrow S_v(t) \equiv \frac{\nu(t) - \nu(\infty)}{\nu(0) - \nu(\infty)}$$

Ennek a „fluktuáció–disszipáció” kapcsolatnak az a fizikai tartalma, hogy ha a perturbáció nem túl nagy, akkor az elektronátmenet által létrehozott nem-egyensúlyi helyzetből történő relaxáció nem különbözik a perturbálatlan rendszerben természetesen előforduló fluktuációk relaxációjától. Az $S(t)$ függvény mérése tehát a szolvatációs dinamika közvetlen mérését jelenti, azzal a megjegyzéssel, hogy persze nem a teljes oldószer–oldott anyag kölcsönhatási energiát mérjük, hanem csak a két elektronállapot ΔE energia különbségét.

Bár a fenti lineáris-válasz közelítés nem minden esetben alkalmazható, a fotogerjesztést követő oldószer-relaxáció dinamikai leírásához a kísérleti munkákban a mai napig az $S(t)$ függvény meghatározása a járható út.

Az optikai spektroszkópia módszerei között az úttörők [75] által is alkalmazott időbontott fluoreszcencia módszeren kívül, az utóbbi időkben a tranziens abszorpciós [86-88] és a fluoreszcencia-upkonverziós módszerek [84] is megjelentek az oldószer dinamikai vizsgálatokban.

1. 8. Dipoláris relaxáció biológiai rendszerekben

Az emissziós spektrum időbeli tolódása a hosszabb hullámhosszak felé nemcsak az oldószerben oldott festék molekulák esetén figyelhető meg, hanem a nagy biológiai molekulák, fehérjék belső fluoreszcenciája vagy hozzájuk kapcsolt külső fluorofor emissziója esetén is. Ennek az eltolódásnak a femtoszekundumoktól a nanoszekundumokig lehet komponense. Ezekben a rendszerekben a relaxáció még bonyolultabb, a kromofor környezete egyrészt az

oldószer molekulákból, másrészt a nagy molekula mátrixának legalábbis a közelben lévő részéből áll. Az oldószerhez tartozó solvatációban számos, különböző intra- és intermolekuláris kölcsönhatás játszik szerepet: távolabbi oldószer molekulák relaxációja, kötött oldószer molekulák relaxációja, az oldószer molekulák femtoszekundumos tehetetlenségi mozgása és az ennél lassabban lejátszódó rotációs diffúziója. A gerjesztés következtében jelentősen változhat a solvatációs héjon belül az oldószer–oldott molekula közötti hidrogén kötések karaktere. Ehhez jön még a fehérje-környezet relaxációja, amit ezentúl, hogy a solvatációtól megkülönböztessük, dipoláris relaxációnak fogunk nevezni. Az irodalomban a dipoláris relaxáción kívül többféle elnevezés is előfordul erre a jelenségre: strukturális –, spektrális –, dielektromos relaxáció. Szobahőmérséklet és nem túl nagy viszkozitások esetén a rövidebb időállandók ($f_s - p_s$) az oldószer molekulák reorientációjához, a hosszabbak ($p_s - n_s$) a fehérje környezethez tartoznak. Oldószer-relaxációhoz tartozó ns-os komponenseket csak alacsony hőmérsékletre lehűtött minták esetén mértek [75, 78-80, 82, 85]. A fehérje molekulához tartozó fluorofor gerjesztett állapotában létrejöhetnek vagy megváltozhatnak a fehérje molekula konformációjának alakításában nagy szerepet játszó hidrogénkötések. Ha nem szelektív módon kapcsolódik a kromofor, akkor a többféle fehérje környezet növeli a fluoreszcencia heterogenitását, ami szintén okozhat spektrumeltolódást. Egyéb gerjesztett állapotú reakciók, pl.: töltéstranszfer-komplexek még bonyolultabbá tehetik a képet. Mindazonáltal a dipoláris relaxáció időfüggése tükrözi a fehérje-környezet mobilitását, polaritását, így ha ez megváltozik, az emisszióban követni tudjuk. A dipoláris relaxáció dinamikájának mérése értékes spektroszkópai módszer a ligandumok bekötődésekor, hőmérséklet, viszkozitás változáskor vagy bármilyen biokémiai folyamat során bekövetkező konformáció-változás megfigyelésekor.

Egyszerű módszert alkalmaz Demchenko több közleményben [93-95] is a relaxációs idő meghatározására a „red-edge” effektus [96] kihasználásával. Abban az esetben, ha a relaxáció lassú ($\tau_r \geq \tau_f$) a gerjesztési hullámhosszat az abszorpciós spektrum hosszú hullámú (red-edge) oldalán növelve az emissziós

spektrum maximuma a hosszabb hullámhosszak felé tolódik. A gerjesztési hullámhossz növelésével egyre alacsonyabb energiájú gerjesztett állapotokat „választunk ki”, az emisszió csak alacsonyabb energiájú állapotból jöhet létre, ahhoz képest mintha az abszorpciós maximumban gerjesztettünk volna. Ha azonban a relaxáció nagyon gyors ($\tau_r \ll \tau_f$) a kromofor-környezet gyors kölcsönhatása miatt a kromofor energiaállapotában gyors újrarendeződés történik, a fluoreszcencia spektrum maximuma függetlenné válik a gerjesztő hullámhossztól. A kromofor mintegy „elfelejti”, hogy milyen energiájú fotonnal gerjesztettük. A már ismertetett Bakhsiev modellt módosítva a relaxációs időre a következőt kapjuk:

$$\frac{V^{mean} - V^{edge}}{V_0^{mean} - V_0^{edge}} = \frac{\tau_r}{\tau_r + \tau_f}$$

A biológiai rendszerekben megfigyelhető relaxációkat [97-120] kezdetben időbontott fluoreszcencia mérésekkel [97-105, 109, 110] vizsgálták. A rövid idejű spektroszkópai mérések rohamos fejlődésével ez többféle módszerrel egészült ki: femtoszekundumos tranziens abszorpciós pumpa-próba módszer [107, 111, 113, 114, 120], foton-echo spektroszkópia [112], fluoreszcencia-upkonverzió [115-119].

A korai munkákban még kevés emissziós hullámhosszon, szűrőkkel kiválasztva mérték a fluoreszcencia lecsengését, aminek hullámhossz függéséből következtek a dipoláris relaxáció jelenlétére. Csirke pepszinogén Trp-jának fluoreszcencia lecsengését mérték különböző emissziós hullámhosszakon [97], a mért görbéket két exponenciális összegével jól tudták illeszteni. A vörös oldalon negatív amplitúdókat kaptak, amit egyértelműen dipoláris relaxációval magyaráztak, mivel a gerjesztő hullámhossz 305 nm volt, a Tyr vagy más Trp csoportoktól származó energiáttranszfer kizártnak mondható. A 20–40% amplitúdójú, 1 ns körüli negatív komponensek ns-os relaxációra utaltak. Fázisfluorimetriás méréssel vizsgálták néhány fehérjében a Trp körüli dipoláris relaxációt [98]. Humán szérum albuminban, melittinben, máj alkohol dehidrogenáz-ban három emissziós hullámhosszon mérték a Trp fluoreszcencia

lecsengését, az eredmények DR jelenlétére utaltak. Ugyanakkor megvizsgálták a propilén-glikolban oldott NATA (N-acetyl-L-tryptophanamide, a Trp modell vegyületének tekinthető) fluoreszcenciáját széles (-9 — $+63^{\circ}\text{C}$) hőmérsékleti tartományban. A hullámhossz függvényében változó élettartamot a nagy viszkozitású oldószer-relaxációjával lehet magyarázni. A NATA vizes oldatában és p-terphenil alkoholos oldatában szobahőmérsékleten nem tapasztaltak hullámhosszfüggést.

A folytonosan változtatható modulációs frekvenciájú fázisfluoriméter kifejlesztése [121] még pontosabb méréseket tett lehetővé. Propilén-glikolban oldott indol spektrális fluoreszcenciáját vizsgálták 2GHz-es modulációs frekvenciájú berendezéssel [99]. Kiszámolták a Bagchi által bevezetett módszer [59] szerint az emissziós spektrumok súlypontjának időfüggvényét, amire exponenciális függvényt tudtak illeszteni. A propilén-glikol dipoláris relaxációjának időállandójára -5°C -on 2,8 ns adódott.

Mesterséges foszfolipid membránba ültetett prodan fluoreszcenciájának vizsgálatával [100] éter-lipid membránban gyorsabb spektrális eltolódást észleltek, mint észter-lipid membránban. Anizotrópia mérésekkel ellenőrizték, hogy a hidrofób régiókban kötődő fluorofor saját mozgása egyforma a kétféle membránban. A spektrális eltolódás különbözőségét egyértelműen a különböző relaxációval magyarázták. Kiszámolták az emissziós spektrumok súlypont-idő függvényét is, ezekre a folytonos modell szerint egy exponenciális függvényt tudtak illeszteni. A prodan körüli környezet relaxációjának időállandójára 2, ill. 3 ns ($\pm 0,1$ ns) adódott.

Pikoszekundumos felbontású időkorrelált egyfotonszámlálással mérték a dinamikus Stokes-eltolódást DANCA–apomioglobin komplexen [101]. Az emissziós hullámhossztól függő fluoreszcencia lecsengési görbéket öt exponenciális összegével illesztették, a hosszabb hullámhosszakon mért görbéknél negatív amplitúdókat kaptak. A heterogenitásból eredő spektrum eltolódást a negatív amplitúdók miatt kizárták. A látszólagos élettartam komponenseknek nem tulajdonítottak semmilyen fizikai jelentést. Az átlag emissziós energia csökkenésében az exponenciálislistól nagyfokú eltérést

tapasztaltak, a görbékét jól tudták illeszteni három diszkrét exponenciális (80 ps, 680 ps, 11,6 ns) összegével éppúgy, mint „stretched” exponenciális [122] függvénnyel. Méréseik feloldási határa 20 ps – 20 ns terjedt. Az emissziós energia csökkenését jellemző $S(t)$ függvény illesztéséből kapott időállandókat látszólagosnak gondolják. Mivel az első 20 ps-hoz tartozó emissziós spektrum és az abszorpciós spektrum között már eltolódás tapasztalható, a mérés határ alatti komponenszt tételeznek fel. A kapott $S(t)$ függvény a fehérje-mátrix nagyon széles frekvencia tartományú skálán megvalósuló mozgásformáira utal. Felvetik az $S(t)$ függvény számolásánál előkerülő problémákat, ilyen pl.: a $\nu(\infty)$ értékének meghatározása. A $\nu(t)$ függvény számításakor, a különböző hullámhosszokon megmért fluoreszcencia lecsengési görbékből indulnak ki. A fluoreszcencia intenzitások mérésének pontossága a gerjesztés után hosszú idő múlva az intenzitás lecsökkenése miatt nagyon leromlik, a lecsengési görbék illesztése a „ ∞ ”-ben bizonytalan, így az ebből számolt $\nu(\infty)$ alapvetően hibás lehet.

Fázisfluoriméterrel vizsgálták a staphylococcus nukleáz Trp-jának környezetében a fehérje-mátrix dinamikáját [103]. A molekula háromdimenziós struktúrája röntgen krisztallográfiás vizsgálatokból ismert. A Trp140 a molekula belsejében az oldószer által lényegében hozzáférhetetlen poláros környezetben van. A relaxációs időre a már említett „red-edge” effektus kihasználásával hőmérsékletfüggő steady-state mérésekkel 5 ns-t kaptak. Időbontott mérésekkel ez 1,4 ns-nak adódott. A két eredmény azonban nem hasonlítható össze, hiszen a steady-state mérések széles hőmérséklet tartományon (–50 - 20°C), az időbontott mérések egy hőmérsékleten (–40°C) történtek. Lehetnek olyan dinamikai módusok, melyek alacsony hőmérsékleten „befagynak” és csak a hőmérséklet emelkedésével aktiválódnak, a relaxáció sebessége nem azonos a kétféle mérés során.

Femtosekundumos tranziens abszorpciós mérésekkel a C-phycocianin α -alegysége körüli relaxációt [107] mérték. A gerjesztett állapotú abszorpció mellett indukált emissziós sávot is megfigyeltek. A spektrum időbeli fejlődését követve, az abszorpciós sáv 100–200 fs-os skálán történő kiszélesedésén kívül az indukált emissziós sáv 100 fs-nál rövidebb idejű vörös eltolódását tapasztalták.

Az indukált emissziós sávra kiszámolták a relaxáció korrelációs függvényét ($S(t)$), ennek időállandójára exponenciális illesztésével 139 fs adódott. Ez, figyelembe véve a pumpa nyaláb 170 fs-os időbeli szélességét, valószínűleg 100 fs-nál kisebb értéknek felel meg.

Az egy Trp-t tartalmazó *E.coli*-ből származó citidin monofoszfát kináz-ban mérték a dinamikus Stokes-eltolódást szinkrotron sugárzással gerjesztett fluoreszcencia megfigyelésével [109]. A fehérje külső felszínéhez közel található hidrofób zsebben levő Trp31 körüli fehérje-mátrix dinamikáját vizsgálták. Az időkorrelált egyfotonszámlálással megmért lecsengési görbéket MEM (maximum entropy method) [123] segítségével illesztették. A módszerrel akár 150 exponenciális tag összegeként is le lehet írni a lecsengési görbéket. Az emissziós maximumban mért intenzitás lecsengés nem írható le egy exponenciális függvénnyel, hanem három komponens köré centrált élettartam eloszlással. A gerjesztett állapotú populációk 90 %-át az 1,4 ns-os érték jellemezte, ezenkívül még két kisebb komponens volt 0,3 és 4 ns körül. A NATA – a Trp modell vegyülete – vizes oldatában mért 4 ns-os élettartamhoz képest a megfigyelt élettartam rövidebb. A 3-4 Å távolságban lévő peptid kötések elektron transzfer révén kioltják az indol fluoreszcenciáját

Humán szérum albumint jelöltek a hidrofób régiókba kötődő DCM –mal (4-dicyanomethylene-2-methyl-6-*p*-dimethylaminostyryl-4*H*-pyran) [110]. A lecsengési görbék jelentősen függtek az emissziós hullámhossztól, a vörös oldalon „felcsengést” figyeltek meg. A „globál analízis” segítségével kiértékelt görbékéből számolt relaxációs függvényt két exponenciális összegével illesztették. (25% 600 ps, 75% 10 ns). Elképzelhetőnek tartják, hogy mindkét komponens a víz oldószer-relaxációjához tartozik és azt is, hogy a rövidebb a víz, a hosszabb a fehérje-mátrix relaxációját jellemzi. Az irodalomban Bagchi és társai közöltek olyan elméleti megfontolásokat [124], mely szerint a fehérjéhez kötött és szabad víz molekulákat különböző sebességű relaxációval lehet jellemezni. Más csoportok azonban megkérdőjelezzik a modell kiinduló pontját és a számítások menetében is hibát vélnek felfedezni [125]. Mivel a DCM nem szelektív módon kötődik a HSA-hoz, a kromofor molekulák pontos helye a fehérje molekulán

belül nem ismert, fluoreszcenciájuk heterogén környezetből származik. A többféle frekvenciájú, a fehérje-mátrix különböző részeihez tartozó relaxáció és a víz oldószer-relaxációja egyaránt megjelenik, így a relaxációs időállandók látszólagosak, nem rendelhetők konkrétan egyik mozgásformához sem.

Foton-echo spektroszkópiával vizsgálták az eozin és eozin-lizozim komplex vizes oldatában a relaxációs folyamatokat [111]. A festék vizes oldatában három relaxációs komponenst határozták meg (17 fs, 330 fs, 3 ps), a festék-fehérje komplex vizes oldatában ezzel szemben négyet (18 fs, 310 fs, 7 ps, 135 ps). Az utóbbi 135 ps-os időállandót 1 ns-ra növelt illesztési tartománnyal 535 ps-nak találták. A frekvenciafüggő dielektromos állandóval kiegészített dielektromos kontinuum modell alapján szimulációs számításokat végeztek mindkét rendszerre, így a két rövidebb komponenst az eozin körüli víz molekulák dielektromos relaxációjával magyarázták, a két hosszabb komponenst a fehérje-mátrix belső mozgásaival.

Fluoreszcencia-upkonverziós technikával [117] a Trp vizes oldatában a víz relaxációjára két időállandót kaptak. A 160 fs-os komponens a víz molekulák librációs mozgásához, az 1,1 ps-os komponens a diffúziós mozgáshoz tartozik. A rubredoxinban lévő Trp-ok körül lassabb oldószer-relaxációt tapasztaltak. Azonban egyik relaxációs időállandót sem kapcsolják a fehérje-mátrix mozgásához, mivel a szimulációs számításaik arra utalnak, hogy ezek a 10 ps-nál nagyobb időskálán jelennek meg.

1. 9. Az acrylodannal jelölt szérum albumin

A HSA-hoz ligandként kapcsolódó oleát molekulák okozta konformációs és dinamikai változásokat vizsgálták a HSA-hoz kapcsolt AC fluoreszcenciájának megfigyelésével [126]. A hosszú zsírsav láncú oleát molekulák bekötődésekor az AC fluoreszcencia maximuma a hosszabb hullámhosszak felé tolódott el és a két exponenciálissal illeszthető heterogén lecsengés átlagélettartama lerövidült. Neutrális (acrilamid) és ionos (jodid és tallium) kioltókkal fluoreszcencia kioltási kísérletekkel vizsgálták, hogyan változik a Cys34 oldószer-hozzáférhetősége a zsírsav molekulák jelenlétében. Megállapították, hogy az IA doménben lévő

Cys34 körüli fehérje-mátrixban zsírsav molekulák bekötődésekor olyan konformáció változások következnek be, hogy a cisztein az oldószer számára hozzáférhetőbbé válik. A kioltási kísérletekből meghatározott ionerősség változások alapján mondhatjuk, hogy zsírsav molekulák jelenlétében megnövekszik a szabad SH csoport reaktivitása. Normál esetben a HSA fő ligand-kötőhelyei a IIA és a IIIA doménben vannak. Betegség, pl.: bakteriális fertőzés, cukorbetegség, stressz azonban jelentősen megnöveli a zsírsav szintet a vérben, ami megváltoztatja a kötőhelyek affinitásának eloszlását. Fentiek alapján valószínűsíthető, hogy a Cys34 fontos szerepet játszik a HSA biokémiai funkciójában.

Bright és társai többféle speciális rendszerben vizsgálták a HSA-ban és BSA-ban a Cys34 körüli környezet dinamikai tulajdonságait [127-132]. Vizes oldatban lévő natív és denaturált BSA-ban és kvarcra adszorbeált BSA-ban hasonlították össze a steady-state paramétereket és a relaxációs időállandókat. A denaturált protein emissziós spektruma a hosszabb, az adszorbeált mintáé a rövidebb hullámhosszak felé tolódott el a natív fehérjéhez képest. Az AC környezete az előbbi esetben dipolárisabb, az utóbbi esetben kevésbé dipoláris, mint a natív fehérjében. A relaxációs függvény két exponenciálissal illeszthető mindhárom esetben, az adszorpció a hosszabb komponenst, a kémiai denaturáció mindkét komponenst lényegesen megnöveli. Ugyanezen rendszerekben a fluoreszcens szondához való oldószer hozzáférhetőséget vizsgálták. Tetrametil-ortoszilán-gélbe ágyazott BSA-ban és HSA-ban a gél szárításának függvényében figyelték meg a relaxáció dinamikáját. Reverzális micellákba zárva a hidratáció hatását vizsgálták. SDS-t (sodium dodecyl sulfate) adva a BSA/AC vizes oldatához, megállapították, hogy a detergens jelenléte lényeges változást eredményezett a protein struktúrában. Az AC precessióját jellemző szög megnőtt, mutatva, hogy a struktúra nyitottabbá, a dipoláris relaxáció lassabbá vált az SDS hozzáadásával. A HSA vizes oldatában a Trp fluoreszcenciájának megfigyelésével a II doménben, az HSA/AC-ban az AC fluoreszcenciájának megfigyelésével az I doménben vizsgálták a termális és kémiai denaturáció hatását.

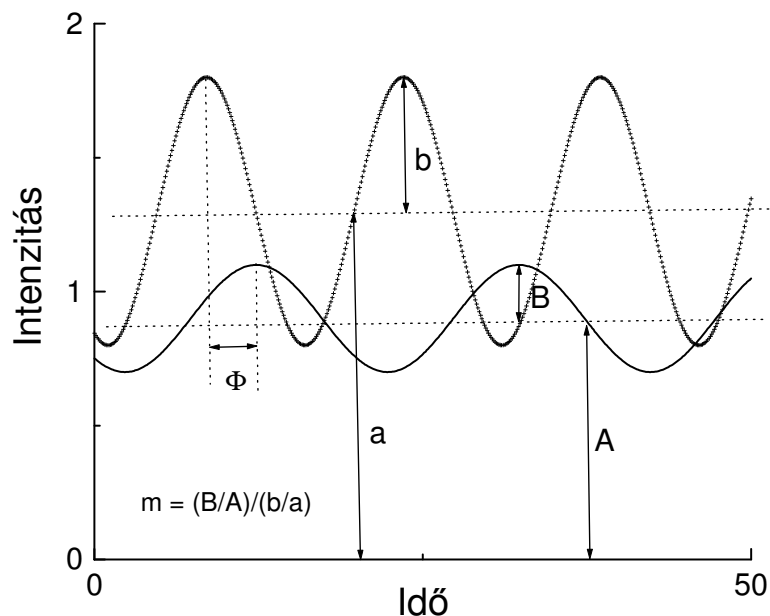
2. Célkitűzés

Célul tűztem ki a Trp és az AC fluoreszcenciájának megfigyelésével a HSA fehérje mátrixa dipoláris relaxációjának nyomon követését és a relaxáció időfüggésének meghatározását. A Trp140 és a Cys34-hez kovalens módon kapcsolt AC a fehérje két, biokémiai folyamatok szempontjából fontos ligandkötőhelyének közelében van. Megvizsgáltam, hogy miként befolyásolja a hőmérséklet és az oldószer változása a fehérje-mátrix dinamikáját a molekula belsejében és a felszín közelében. A fehérje dipoláris relaxációjában megjelenik egy gyors, ps-os mozgást jellemző komponens. Céлом volt ezen gyors mozgás eredetének a meghatározása az oldószerben oldott AC mintákon végzett mérésekkel.

3. Módszerek, anyagok

3. 1. Fázisfluorimetria

A fázisfluoriméterben a mintát egy folytonosan világító fényforrás Pockels-cellával szinuszosan modulált fényével gerjesztjük (5. ábra), amire az ugyanolyan frekvenciával szinuszosan modulált fluoreszcencia jellel válaszol [2, 3].



5. ábra.

A fluoreszcencia jel modulációja és fázisa azonban megváltozik a gerjesztő fényéhez képest. A mérés során több különböző frekvencián – egy szóró közegből jövő jelhez képest – mérjük a fáziskésést (Φ) és a demodulációt (m). Ez a szóró közeg a méréseinknél mindig frissen preparált glikogén volt. A megmért Φ és m adatok hordozzák az információt a fluoreszcencia lecsengés időbeli változásáról.

A fázisfluorimetria matematikai alapjai

Hogyan lehet a frekvenciatérben mért adatokból a fluoreszcencia időbeli lecsengésének jellemzésére szolgáló adatokhoz jutni?

Legyen a λ emissziós hullámhosszon – az impulzus gerjesztésre létrejövő – fluoreszcencia időbeli lecsengését jellemző függvény $I(\lambda, t)$ [2, 3]. A szinuszos $[f(t) = a + b \sin \omega t]$ gerjesztő fényre adott fluoreszcencia jel az $I(\lambda, t)$ és $f(t)$ konvolúciója: $F(t) = I(t) \otimes f(t)$. A fázisfluoriméterben előforduló nem túl nagy fényintenzitásoknál: $F(t) = A + B \sin(\omega t - \Phi)$ alakú.

Számoljuk ki az $I(\lambda, t)$ szinusz- és koszinusz-transzformáltját:

$$N(\lambda, \omega) = \frac{\int_0^{\infty} I(\lambda, t) \sin \omega t dt}{\int_0^{\infty} I(\lambda, t) dt} \quad \text{és} \quad D(\lambda, \omega) = \frac{\int_0^{\infty} I(\lambda, t) \cos \omega t dt}{\int_0^{\infty} I(\lambda, t) dt}.$$

Legyen $I(\lambda, t) = \sum_i \alpha_i(\lambda) e^{-\frac{t}{\tau_i(\lambda)}}$, akkor:

$$N(\lambda, \omega) = \frac{\sum_{i=1}^n \frac{\alpha_i(\lambda) \omega \tau_i^2(\lambda)}{1 + \omega^2 \tau_i^2(\lambda)}}{\sum_{i=1}^n \alpha_i(\lambda) \tau_i(\lambda)}, \quad D(\lambda, \omega) = \frac{\sum_{i=1}^n \frac{\alpha_i(\lambda) \tau_i(\lambda)}{1 + \omega^2 \tau_i^2(\lambda)}}{\sum_{i=1}^n \alpha_i(\lambda) \tau_i(\lambda)}.$$

Megmutatható, hogy:

$$\operatorname{tg} \Phi(\lambda, \omega) = \frac{N(\lambda, \omega)}{D(\lambda, \omega)} \quad \text{és} \quad m(\lambda, \omega) = [D^2(\lambda, \omega) + N^2(\lambda, \omega)]^{\frac{1}{2}}.$$

α_i és τ_i paraméterek változtatásával megkeressük a fentiek szerint számolt Φ_{cal} , m_{cal} és a mért Φ_m , m_m adatok közötti legjobb egyezést. Azaz kiszámoljuk az

egyres illesztések jóságát: $\chi^2 = \sum_{\omega} \left[\frac{\Phi_{cal} - \Phi}{\delta \Phi} \right]^2 + \sum_{\omega} \left[\frac{m_{cal} - m}{\delta m} \right]^2$ szerint. Az

$I(\lambda, t)$ függvényt a legkisebb eltérés négyzetet eredményező α_i és τ_i paraméterekkel írhatjuk le.

A dipoláris relaxáció leírásához szükséges matematikai eszközök

A dinamikus Stokes-eltolódást leíró $S(t)$ függvényt az emissziós spektrumok súlypontjának időfüggését leíró $\nu(t)$ függvényből a következők szerint

$$\text{számoljuk: } S(t) = \frac{\nu(t) - \nu(\infty)}{\nu(0) - \nu(\infty)}, \text{ ahol } \nu(t) = \frac{\int I(\nu, t) \nu d\nu}{\int I(\nu, t) d\nu} \text{ és } I(\nu, t) \text{ a fluoreszcencia}$$

intenzitás értéke ν hullámszámnál és t időpillanatban.

Mivel a fluoreszcencia lecsengési görbéket a hullámhossz függvényében mérjük, a súlypont függvényt a következő összefüggés szerint számítottuk:

$$\nu(t) = \frac{\int I(\lambda, t) \lambda^3 d\lambda}{\int I(\lambda, t) \lambda^2 d\lambda}, \text{ ahol } I(\lambda, t) \text{ a fluoreszcencia intenzitás értéke } \lambda$$

hullámhosszon és t időpillanatban.

A dipoláris relaxáció időfüggését közvetlenül a $\nu(t)$ függvény – és nem az $S(t)$ – illesztésével számoltuk, mert így nem szükséges feltételezni az egyébként ismeretlen $\nu(\infty)$ értékét:

$$\nu(t) = \nu(\infty) + [\nu(0) - \nu(\infty)]S(t) = \nu(\infty) + [\nu(0) - \nu(\infty)] \sum_i a_i e^{-t/\tau_{DRi}} = \nu(\infty) + \sum_i b_i e^{-t/\tau_{DRi}}.$$

Belátható, hogy az $S(t)$ és a $\bar{\nu}(t)$ illesztéséből ugyanazok az időparaméterek származnak, az amplitúdókra pedig érvényes a következő összefüggés: $\frac{a_i}{a_j} = \frac{b_i}{b_j}$.

A $\nu(t)$ függvény számolásához ismernünk kell a fluoreszcencia emisszió idő-emissziós mátrixát (TEM). Hogyan kaphatjuk meg a fázisfluorimetria módszerével ezt a mátrixot, azaz $I(\lambda, t)$ értékeit?

1. Mérnünk kell a fázis és demodulációs adatokat több különböző emissziós hullámhosszon.
2. A fázis és demodulációs adatokból elő kell állítani a lecsengési görbék alakját illesztéssel (általában nem több mint három exponenciális összegeként):

$$f(\lambda, t) = \frac{\sum_i a_i(\lambda) e^{-\frac{t}{\tau_i}}}{\sum_i a_i(\lambda)} .$$

A fluoreszcencia intenzitása λ hullámhosszon és t időpillanatban a kezdeti értékből és a lecsengési görbe alakjából: $I(\lambda, t) = I(\lambda, 0)f(\lambda, t)$, ahol $I(\lambda, 0)$ a fluoreszcencia intenzitás értéke a nulla időpillanatban.

Az integrált fluoreszcencia spektrum, ami a steady-state spektrum mérésével határozható meg: $I_{\text{IFS}}(\lambda) = \int_0^{\infty} I(\lambda, t) dt = \int_0^{\infty} I(\lambda, 0)f(\lambda, t) dt$.

Tehát az intenzitás kezdeti értékét a következők szerint számolhatjuk a mért adatokból: $I(\lambda, 0) = \frac{I_{\text{IFS}}(\lambda)}{\int_0^{\infty} f(\lambda, t) dt}$

3. A TEM elemek így a következők szerint tudjuk meghatározni a fázisfluorimetriás mérésekből: $I(\lambda, t) = \frac{I_{\text{IFS}}(\lambda)f(\lambda, t)}{\int_0^{\infty} f(\lambda, t) dt}$

A különböző emissziós hullámhosszakon megvalósuló fluoreszcencia átmenetek jellemzésére alkalmas a fluoreszcencia átlagélettartama, ami definíció szerint a következő:

$$\bar{\tau}(\lambda) = \frac{\int I(\lambda, t) t dt}{\int I(\lambda, t) dt}$$

Diszkrét élettartamkomponensek esetén a következők szerint számolható:

$$\bar{\tau}(\lambda) = \frac{\sum_i a_i \tau_i^2}{\sum_i a_i \tau_i}$$

Az emissziós spektrumok spektrális szélességét a következők szerint kapjuk:

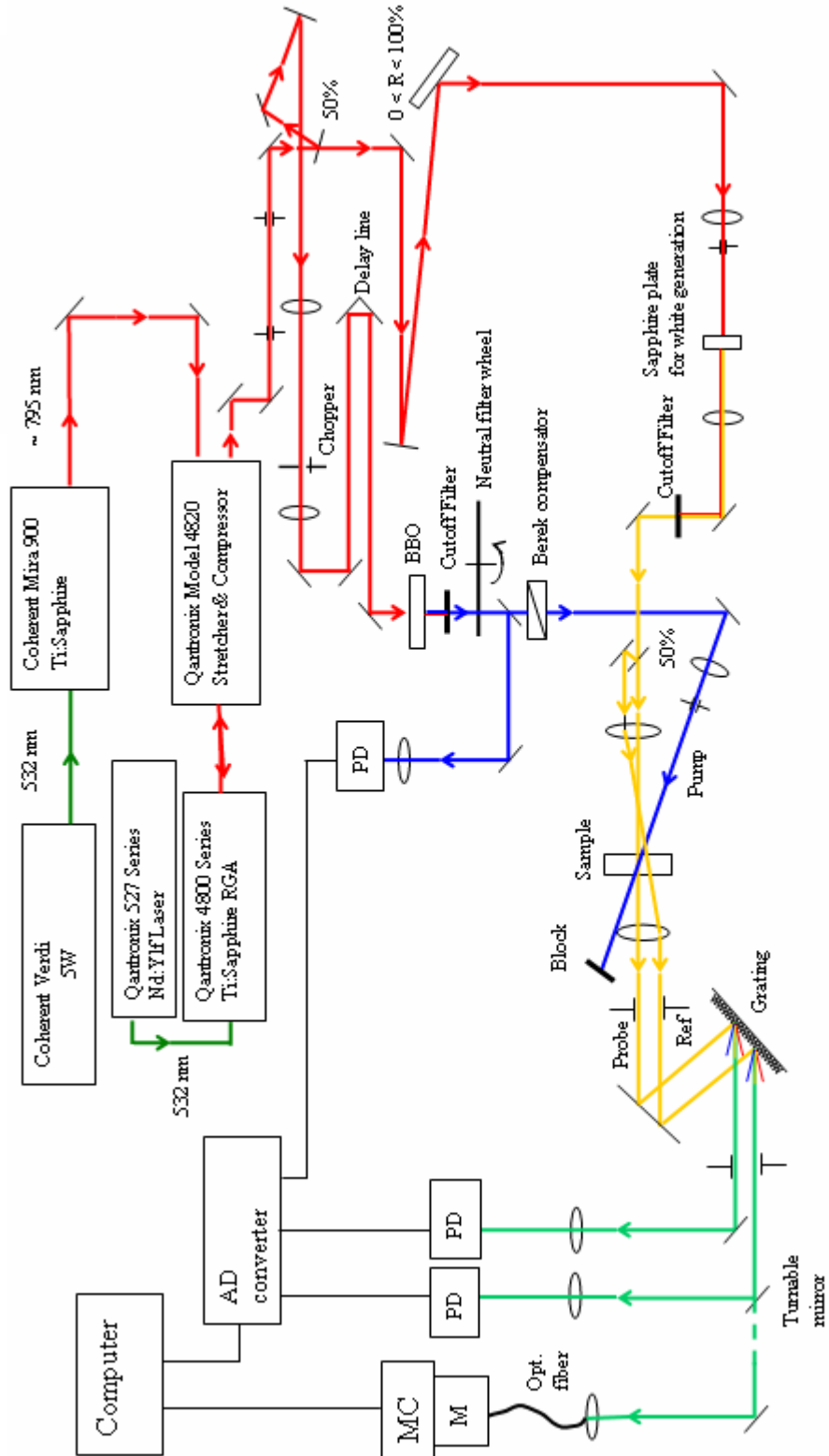
$$\Delta \nu(t) = \left(\frac{\int I(\nu, t) [\nu - \bar{\nu}(t)]^2 d\nu}{\int I(\nu, t) d\nu} \right)^{1/2}$$

3. 2. Pumpa-próba mérőrendszer

A pompa-próba méréseknél a mintát a pompa impulzussal gerjesztjük. Ezután a mintán átmenő, a pumpához képest időben késleltetett próba impulzus változását mérjük (tranziens jel), abban az esetben, ha van pompa jel és abban az esetben, amikor nincs [5, 6]. Az általunk használt mérőrendszer elrendezése a 6. ábrán látható. A femtoszekundumos magimpulzusokat egy Ti:Zafír lézer oszcillátor (Coherent Mira 900) állította elő, melyet egy dióda lézer által pumpált frekvencia-kétszerezett NdYAG lézer (Coherent Verdi 5 W) pumpált. A magimpulzusokat egy 1 kHz-es ismétlési frekvenciájú regeneratív erősítő rendszer erősítette. Az erősítő rendszer részei: forrásként 1 kHz-es frekvencia-kétszerezett Nd:YLF lézer (Quantronix 527), erősítőként egy Ti:Zafír lézer (Quantronix 4800) és egy stretcher-kompresszor (Quantronix 4820). A lézerrendszer által előállított impulzusok központi hullámhossza 795 nm, az időbeli szélessége 180–220 fs, energiája 550 μ J volt. Az impulzus időbeli alakját etanolban Kerr-effektus segítségével mértük, szélességét Lorentz-görbe alakú impulzust feltételezve számítottuk.

Az alapimpulzus egy részét frekvencia-kétszerezés után pumpanyalábként használtuk. A mintára jutó gerjesztő fényimpulzus tipikus energiája 1,5 μ J/impulzus volt. Az alap-impulzus másik részét egy 2 mm vastag zafír lapra fókuszálva, fehér fényt állítunk elő. Ennek a fehér fénynek a spektrális tartománya a teljes látható tartományt lefedte. A fehér fényt kettéosztottuk, egyik része a pumpával átfedésben haladt át a mintán és próba nyalábként szolgált, másik része ettől különböző helyen haladt át a mintán és referencia nyaláb volt.

A pumpanyaláb polarizációja mágikus szögbe (a próba nyalábhöz viszonyítva: $54,7^\circ$) volt beállítva. A detektorrendszerrel $\Delta\lambda = 6$ nm-es spektrális szélességben mértük a próba nyaláb intenzitását a referenciához képest pompa jelenlétében ill. nélküle.



6. ábra. Pumpa-próba mérőrendszer

A tranziens jelet a következő összefüggés segítségével számoltuk:

$$\lg \frac{I_{prob}^{noexc}}{I_{ref}} - \lg \frac{I_{prob}^{exc}}{I_{ref}} = OD. \text{ Pozitív OD értékek esetén tehát: } I_{prob}^{noexc} > I_{prob}^{exc}, \text{ ez az}$$

abszorpció nagyobb súlyára utal. Negatív OD értékek esetén: $I_{prob}^{noexc} < I_{prob}^{exc}$, ez indukált emissziót jelent.

A tranziens jel mérésénél az első 6 ps időtartományon a legkisebb 40 fs-os időközt használtuk, a következő 11 ps-ot 200 fs-onként, később 1 ps-os lépésben mértünk. Az idő-tranziens jel mátrixot 20 nm-enként mért lecsengési görbékből állítottuk össze. A hosszú időtartományon mért tranziens spektrumot egy fix időkéleltetésnél a hullámhossz változtatásával mértük. Az időskála nullpontját a Kerr-effektus segítségével mért gerjesztő impulzusok maximumához rendeltük. Mivel ez hullámhosszfüggő, ezt különböző próba hullámhosszakon végzett mérésekkel vettük figyelembe.

A fluoreszcencia spektrumok időbeli megfigyelésével – fázisfluorimetria – közvetlenül tudtuk az emissziós spektrumok súlypontjának időfüggését követni és ezt használtuk az oldószer relaxáció dinamikájának leírásához. A pumpa-próba méréseknél az indukált emisszió időbeli fejlődése jellemzi közvetetten a fluoreszcencia és így az oldószer relaxáció dinamikáját. DMF esetében az idő-tranziens jel mátrixból a 480 nm és a 620 nm közé eső spektrumokból számoltuk a $\nu(t)$ függvényt. Etanol esetén a 480–600 nm közötti, HSA/AC esetén 450–540 nm közötti tartományból számoltunk.

3. 3. Anyagok, minta-előkészítés

A HSA és a NATA a Sigma, az AC a Molecular Probes terméke, minden további tisztítás nélkül használtuk őket.

A vizes minták esetében a liofilizált HSA-t és a NATA-t 0.05 M-os Na-foszfát pufferben oldottuk (pH = 7,0), a glicerines minták esetében 30–50% (ww) glicerin/puffer volt az oldószer. A HSA koncentrációja 5 mg/ml ($7,24 \cdot 10^{-5}$ M), a NATA moláris koncentrációja szintén $7,24 \cdot 10^{-5}$ M volt.

Az AC-al jelölt HSA-t Wang módszere [127] szerint készítettük el. A HSA pufferes oldatához (10 ml) állandó keverés közben adtuk hozzá 1:1 moláris arányban az előzőleg 50 μ l DMF-ben (dimetyl-formamid) feloldott AC-t. Ezt az oldatot 6 órán keresztül szobahőmérsékleten kevertettük, majd dializáló zsákba töltve négy napig hűtőszekrényben dializáltuk az oldószerrel szemben, a külső puffert 12h-ként cseréltük. Végül a HSA/AC oldatban még meglévő szabad AC-t Sephadex G25 oszloppal választottuk szét.

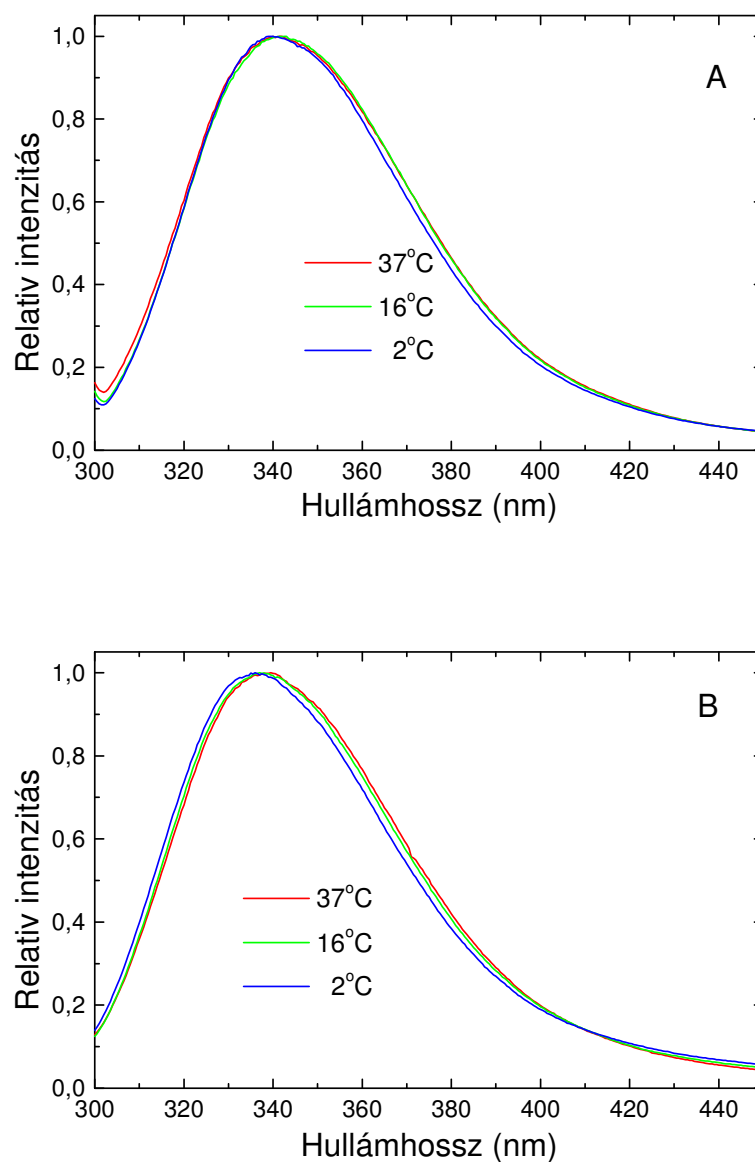
Az etanolban és DMF-ben oldott AC minták esetén spektroszkópiai tisztaságú oldószereket használtunk, az AC koncentrációja 10^{-5} M volt.

4. Eredmények, diszkusszió

4. 1. A triptofán körüli környezet relaxációjának vizsgálata HSA-ban fázisfluorimetriás mérésekkel

Steady-state mérések

Megmértük a HSA emissziós spektrumát több különböző hőmérsékleten, pufferes és glicerines oldószerben (7. ábra). A glicerin koncentrációja 50% (w/w) volt.

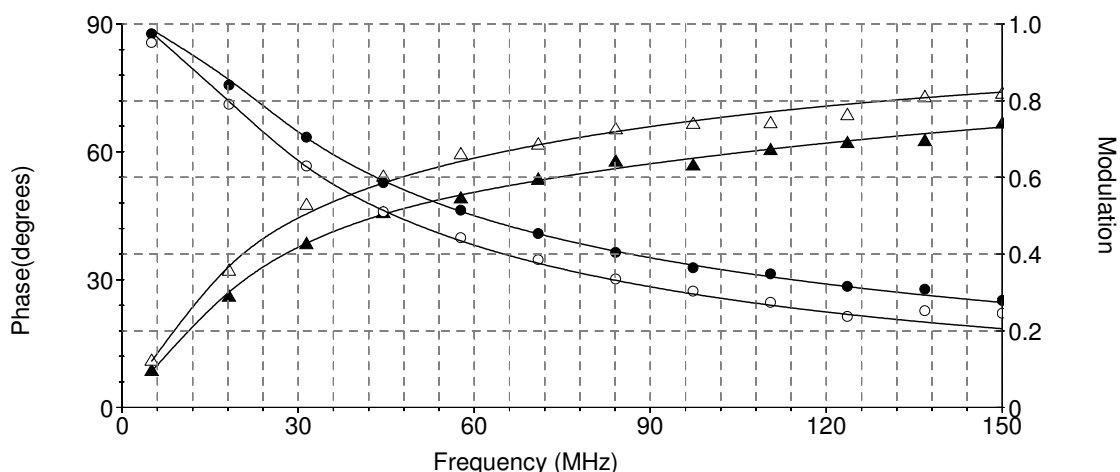


7. ábra. Normált emissziós spektrumok.
(A): HSA pufferben, (B): HSA glicerin/pufferben.

A spektrumokat 2, 6, 9, 12, 16, 23, 30, 37°C hőmérsékleten mértük, a gerjesztő hullámhossz 295 nm volt. Az ábrán az áttekinthetőség kedvéért nem tüntettük fel az összes mérés eredményét. A hőmérséklet csökkenésével a spektrumok maximuma a rövidebb hullámhosszak felé tolódik el. A mintát 37°C-ról 2°C-ra hűtve az eltolódás mértéke glicerines minta esetén nagyobb, 4 nm körüli, pufferes minta esetén 2 nm. Továbbá az azonos hőmérsékleten mért pufferes és glicerines mintát összehasonlítva, a glicerines mintán mért spektrum – hőmérséklettől függően – 3-5 nm-el a kék hullámhosszak felé található. Ezek a jelenségek az időbontott mérésekkel összhangban a dipoláris relaxáció jelenlétére utalnak. Alacsonyabb hőmérsékleten, ill. glicerín jelenlétében a fluoreszcencia emisszió nagyobb energiájú állapotból jön létre, ezért a steady-state spektrum a kékebb hullámhosszak felé tolódik el, a magasabb hőmérsékletű illetve pufferes mérésekhez képest.

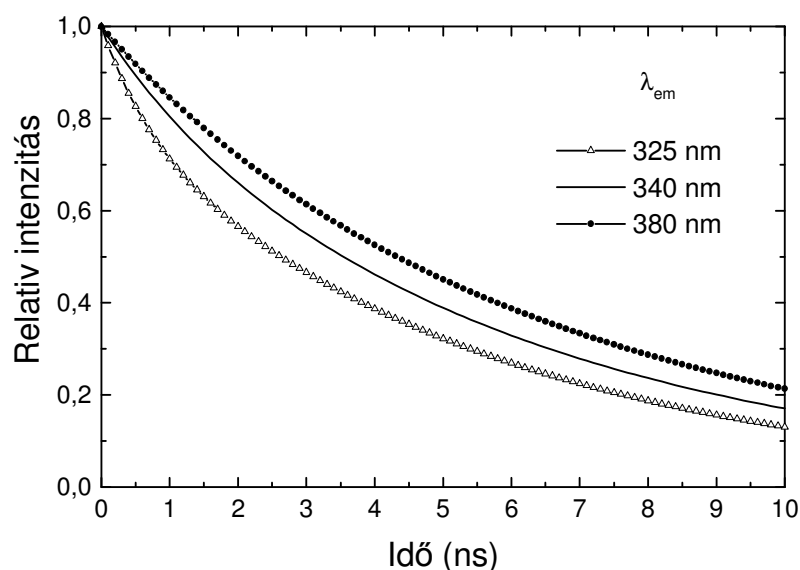
Időbontott mérések

A dipoláris relaxációt jellemző $\nu(t)$ függvények meghatározásához mértük a HSA Trp-jának fluoreszcencia lecsengését több (325, 330, 340, 350, 360, 370, 380 nm) emissziós hullámhosszon (8. ábra).



8. ábra. Tipikus fázis és modulációs adatok az emissziós spektrum kék és vörös oldalán mérve. (telt jelek: 325 nm, nyitott jelek: 380 nm, háromszögek: fázis adatok, körök: modulációs adatok) HSA puffereben, $T = 0^\circ\text{C}$, $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$.

A fázis és modulációs adatokból két exponenciális összegével közelítettük lecsengési görbéket, amikre a 9. ábrán látunk három példát.



9. ábra. Tipikus fluoreszcencia lecsengési görbék. HSA glicerin/pufferben.
 $T = 6^{\circ}\text{C}$, $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$.

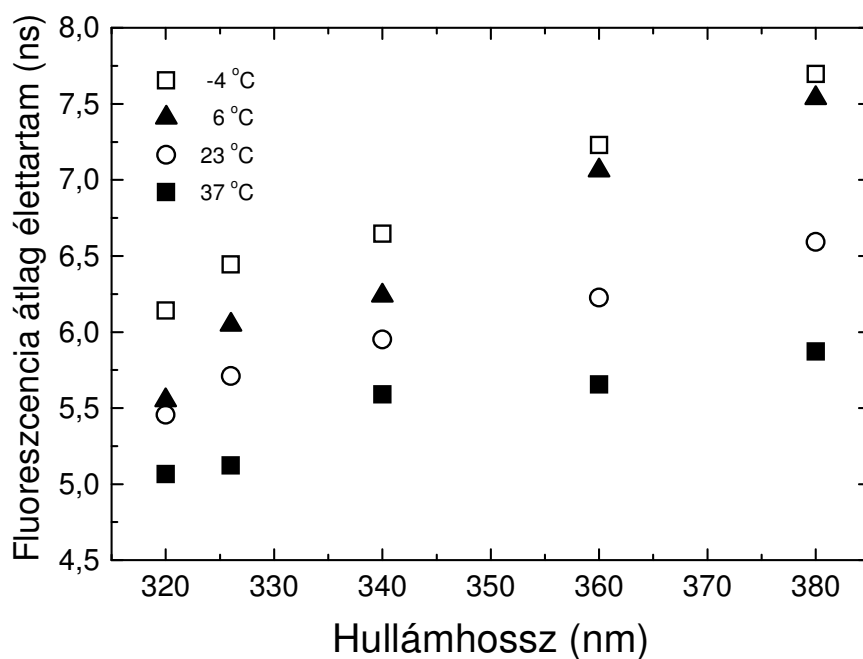
Az emissziós hullámhossz növekedésével a fluoreszcencia lecsengés lassabbá válik, mivel az emissziós spektrum az idő függvényében a hosszabb hullámhosszak felé tolódik. A jelenség a fluoreszcencia élettartamával összemérhető időállandójú dipoláris relaxációra utal.

Érdemes megjegyezni, hogy az első 10 ns időtartam alatt néhány tizedszázalékon belül megegyező eredményt kaphatunk, ha két Gauss eloszlásfüggvény összegével vagy akár „stretched” exponenciálissal illesztjük a mérési eredményeket. Ezért választottuk a legegyszerűbb illesztést, a két diszkrét exponenciális összegét (I. táblázat).

A különböző emissziós hullámhosszakon mért lecsengési görbékből és élettartam komponensekből kiszámoltuk az adott hullámhosszhoz tartozó átlagos fluoreszcencia élettartamot (10. ábra). Az emissziós spektrum időfüggő vörös-eltolódása miatt az átlagélettartam az emissziós színek kék oldalán rövidebb, a vörös oldalán hosszabb. Továbbá, a hőmérséklet csökkentésével – mivel csökken a nem sugárzásos átmenetek száma – az átlagélettartam növekszik.

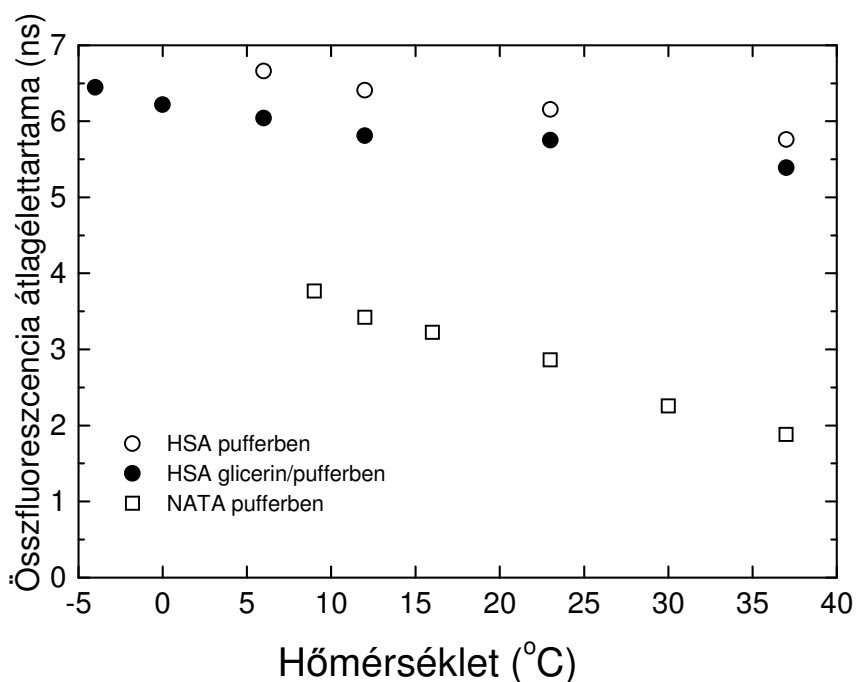
λ_{em} (nm)	a_1	a_2	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)
325	0.80	0.20	5.52	0.69
330	0.86	0.14	5.75	1.06
340	0.87	0.13	6.13	1.46
350	0.91	0.09	6.32	1.36
360	0.93	0.07	6.45	1.30
370	0.93	0.07	6.49	1.26
380	0.94	0.06	6.79	2.10

I. táblázat. Tipikus, látszólagos fluoreszcencia élettartam komponensek. HSA glicerin/pufferben, $T = 6^\circ\text{C}$, $\lambda_{ex} = 295$ nm.



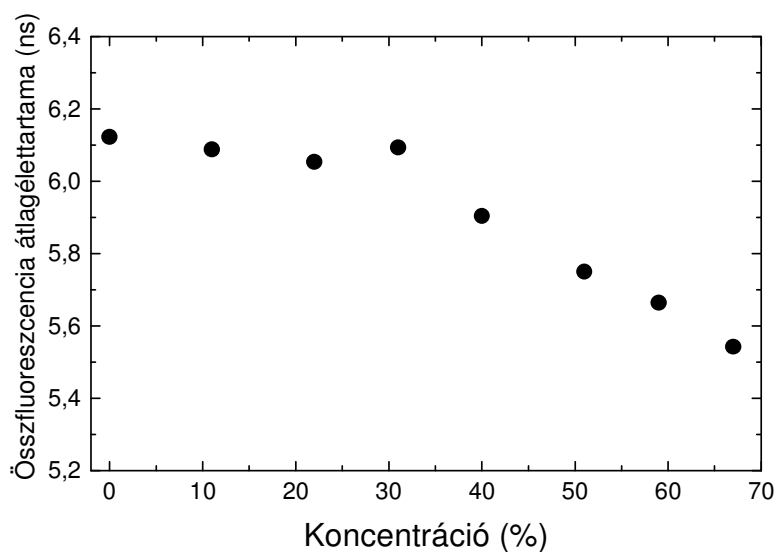
10. ábra. A fluoreszcencia átlagos élettartamának függése az emissziós hullámhossztól több különböző hőmérsékleten. HSA glicerin/pufferben, $\lambda_{ex} = 295$ nm.

Megmértük az összfluoreszcencia lecsengését több különböző hőmérsékleten, pufferes és glicerines fehérje oldaton és NATA-t tartalmazó mintán is. Kiszámoltuk az átlagélettartamokat (11. ábra). Glicerin jelenlétében az átlagélettartam rövidebb. A NATA-ra vonatkozó eredményekről még lesz később szó.



11. ábra. Az összfluoreszcencia lecsengés átlagélettartama a hőmérséklet függvényében HSA és NATA esetében. $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$.

A több különböző glicerín koncentrációjú oldat esetén, szobahőmérsékleten mért összfluoreszcencia lecsengéséből kiszámoltuk az átlagélettartamot (12. ábra).

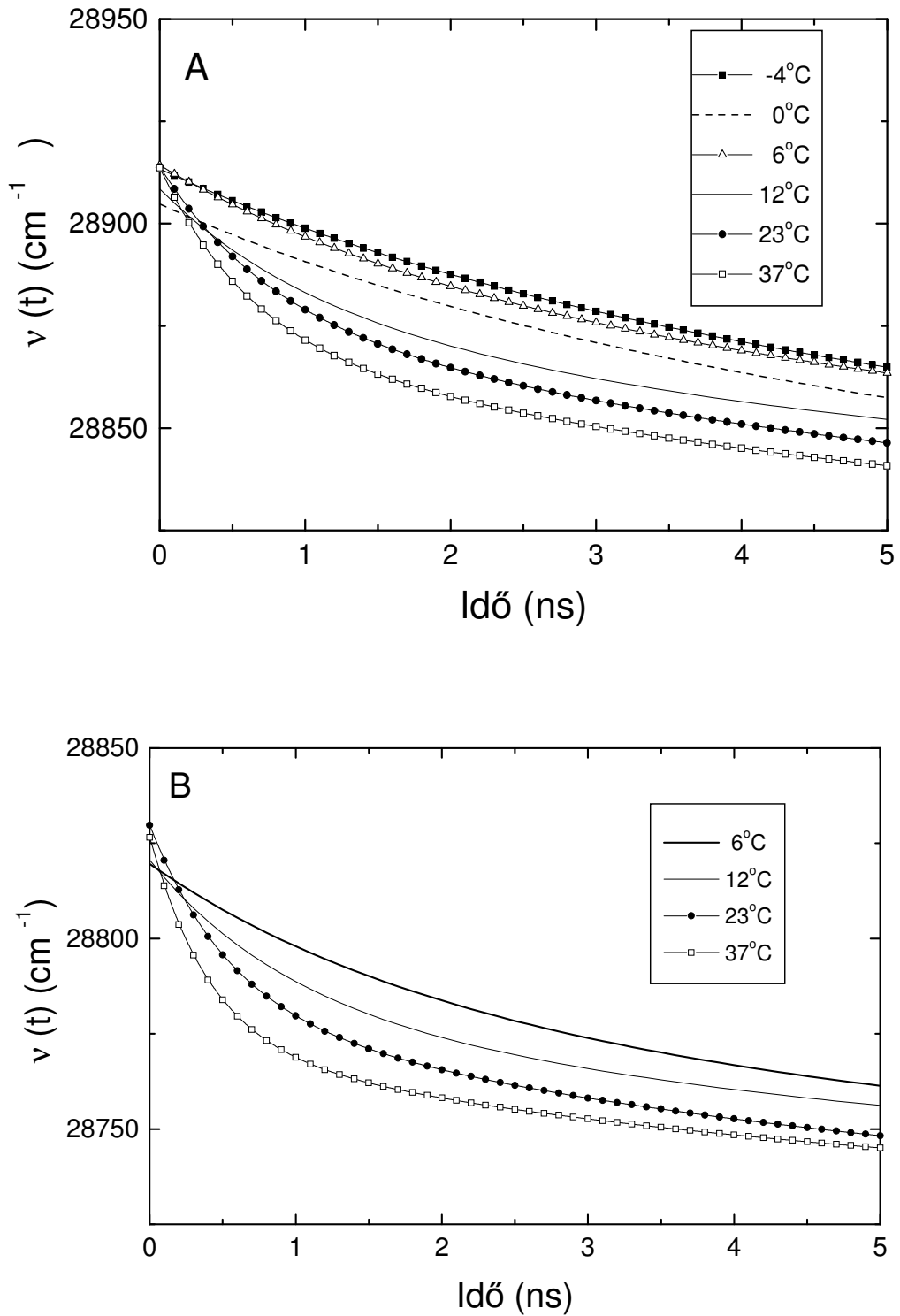


12. ábra. A HSA összfluoreszcenciájának átlagélettartama a glicerín koncentrációjának függvényében. $T = 0^\circ\text{C}$, $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$.

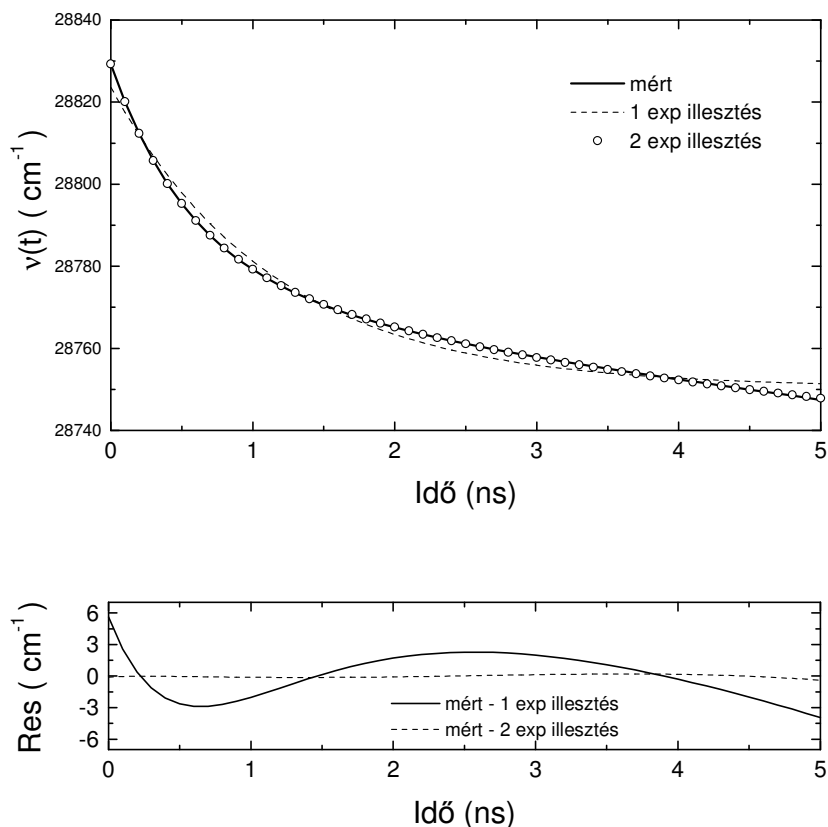
A 0–30% koncentrációjú glicerin oldatok esetében nem látunk változást az átlagélettartamban, ezt meghaladó koncentrációknál azonban az élettartam monoton módon csökken. Ez azt jelenti, hogy az általunk alkalmazott 50% glicerin koncentráció esetén a Trp körüli közvetlen környezet konformációja már lényegesen megváltozott a glicerinmentes környezethez képest. Megnőtt a szomszédos csoportok, az oldószer molekulák kioltó hatása, megnőtt a nem sugárzásos átmenetek száma, tehát a fluoreszcencia átlagélettartama lecsökkent.

A különböző emissziós hullámhosszakon megmért fluoreszcencia lecsengési görbékből elkészítettük az idő–emissziós mátrixokat, ezekből pedig kiszámoltuk az emissziós spektrumok súlypontfüggvényét, a $\nu(t)$ függvényeket (13. ábra). Ezek már csak a dipoláris relaxáció idő függését jellemzik.

Meg kell jegyezni, hogy a $\nu(t)$ -k csak az első 5–10 ns időtartományon írják le a dipoláris relaxáció idő függését korrekten. Ezen az időtartományon a kezdeti értékhez képest egytizedére csökken a fluoreszcencia intenzitása, így a fluoreszcencia lecsengés illesztésekor a hosszú élettartam-komponens kis mértékű különbsége is műtermékhez vezet a $\nu(t)$ függvény menetében. A $\nu(t)$ függvényeket két exponenciális összegével lehetett jól illeszteni (14. ábra) (II. táblázat).



13. ábra. A Trp körüli környezet dipoláris relaxációját jellemző $\nu(t)$ függvények különböző hőmérsékleten. (A): HSA glicerin/pufferben, (B): HSA pufferben.



14. ábra. Egy példa a $\nu(t)$ függvény illesztésére. Lecsengési görbe és rezidum. HSA pufferben, $T = 23^\circ\text{C}$, $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$.

hőmérséklet ($^\circ\text{C}$)		y_0 (cm^{-1})	a_1	a_2	t_1 (ns)	t_2 (ns)
37	puffer	28730	41.7	54.8	4.91	0.41
	glicerin	28820	52.3	41.4	5.43	0.61
23	puffer	28727	54.5	48.2	5.31	0.54
	glicerin	28822	56.6	35.3	5.94	0.74
12	puffer	28734	49.3	37.3	6.21	0.93
	glicerin	28827	52.4	29.1	6.73	1.03
6	puffer	28735	55.2	29.4	6.33	1.61
	glicerin	28832	63.9	18.4	6.85	1.53
0	glicerin	28817	78.4	9.4	7.41	1.71
-4	glicerin	28821	79.2	13.2	8.17	1.90

II. táblázat. A dipoláris relaxáció időállandói. HSA pufferben és glicerin/pufferben különböző hőmérsékleteken, $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$.

$$\nu(t) = y_0 + a_1 \cdot \exp(-t/t_1) + a_2 \cdot \exp(-t/t_2)$$

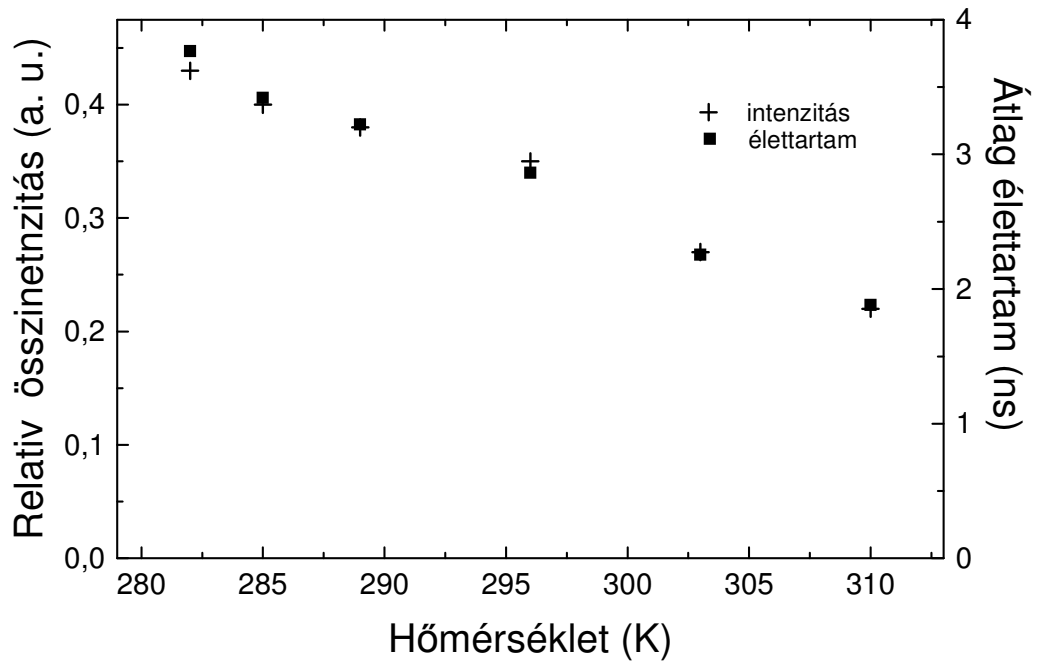
Az adatokból jól látszik, hogy a hőmérséklet csökkenésével mind a rövidebb, mind a hosszabb komponens értéke nő, továbbá a hosszabb komponens súlya növekszik a rövidebb komponenshez képest. Glicerin jelenlétében minden egyes hőmérsékleten lassabb a relaxáció. A Trp körüli környezet fotogerjesztést követő relaxációja a fenti két időállandóval jellemezhető ezen az időtartományon, ezek a fehérje-mátrix különböző frekvenciájú mozgásaival kapcsolatosak [133]. Természetesen ennél rövidebb idejű – ps-os vagy akár subps-os – relaxáció sem zárható ki [69].

Felmerülhet, hogy az előbbieken bemutatott relaxáció paraméterek nem a fehérje-mátrixhoz köthetők, hanem az oldószer molekulákhoz. Ennek tisztázása érdekében vizsgáltuk a NATA – mint a Trp modellvegyülete – pufferes oldatában a relaxációt. Három különböző emissziós hullámhosszon és két hőmérsékleten mértük a fluoreszcencia lecsengési görbéket (III. táblázat). A lecsengési görbéket egy exponenciálissal jól lehetett illeszteni. Lényegében minimális különbség (< 4%) van a kék és vörös oldalon mért fluoreszcencia élettartamok között. Megállapíthatjuk, hogy ezen az időtartományon, az alkalmazott hőmérsékleteken módszerünkkel nem mutatható ki dielektromos relaxáció az oldószerben levő NATA körül. Ezzel ellentétben a HSA-ban lévő Trp-nál szignifikáns időfüggő Stokes-eltolódást tapasztalhattunk, ami most már egyértelműen a fehérje-mátrix hatásának tulajdonítható.

λ_{em} (nm)	τ (ns) $T = 6 \text{ }^\circ\text{C}$	τ (ns) $T = 23 \text{ }^\circ\text{C}$
325	3.89	2.75
340	3.92	2.76
380	4.02	2.84

III. táblázat. Pufferben oldott NATA fluoreszcencia élettartama különböző emissziós hullámhosszakon. $\lambda_{ex} = 295 \text{ nm}$.

Megmértük az összfluoreszcencia lecsengését és intenzitását több hőmérsékleten. Kiszámoltuk az átlag élettartamot (15. ábra) és azt találtuk, hogy az átlagélettartam és az intenzitás hőmérsékletfüggése erősen korrelál egymással.

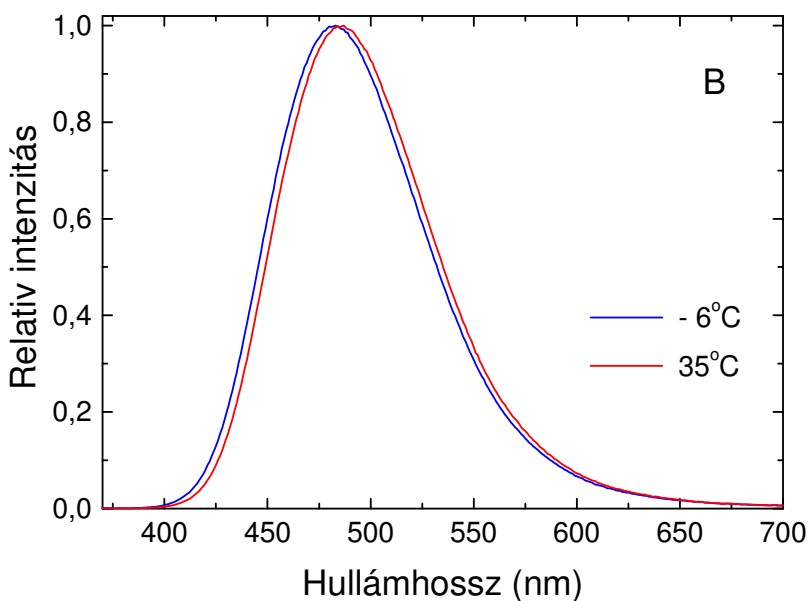
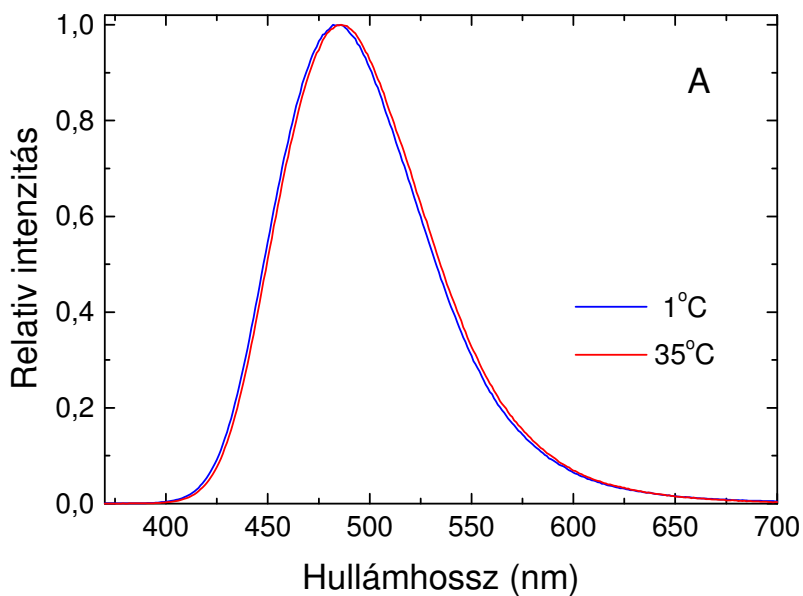


15. ábra. A fluoreszcencia intenzitás és az összfluoreszcencia átlagélettartamának hőmérséklet függése. NATA pufferben. $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$.

4. 2. A cisztein körüli környezet relaxációjának vizsgálata HSA-ban fázisfluorimetriás mérésekkel.

Steady-state mérések

Megmértük a HSA/AC emissziós spektrumát több különböző hőmérsékleten, pufferes és glicerines oldószerben (16. ábra).



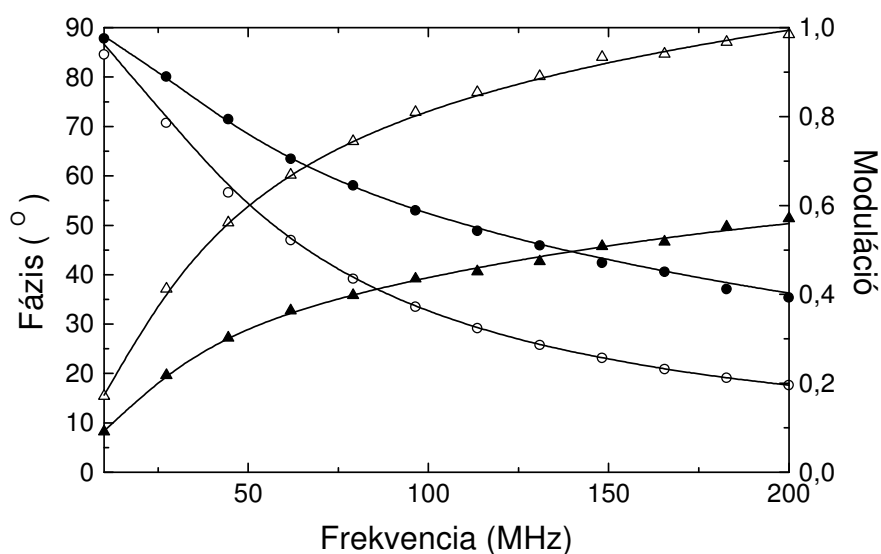
16. ábra. Normált emissziós spektrumok. $\lambda_{\text{ex}} = 380 \text{ nm}$
(A): HSA/AC puffereben, (B): HSA/AC glicerin/puffereben.

A glicerín koncentrációja 30% (w/w) volt. A spektrumokat glicerines minta esetén $-6, 0, 22, 35^{\circ}\text{C}$, pufferes minta esetén $1, 22, 35^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleten mértük, a gerjesztő hullámhossz 380 nm volt. A 16. ábrán az áttekinthetőség kedvéért nem tüntettük fel az összes mérés eredményét.

Az alacsonyabb hőmérsékleten mért spektrumok a kékebb hullámhosszak felé tolódnak, de sem az eltolódás mértéke, sem a spektrum alakjának hőmérsékletfüggése nem olyan mértékű, mint a Trp esetében volt.

Időbontott mérések

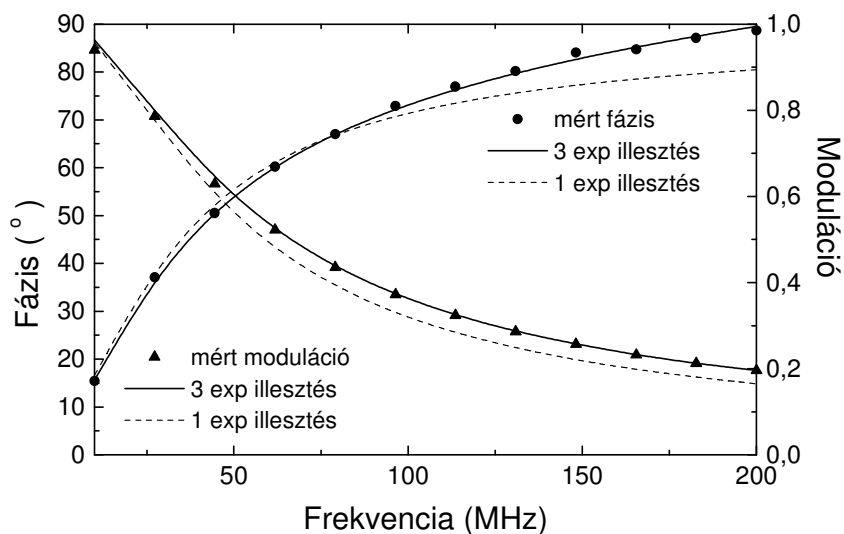
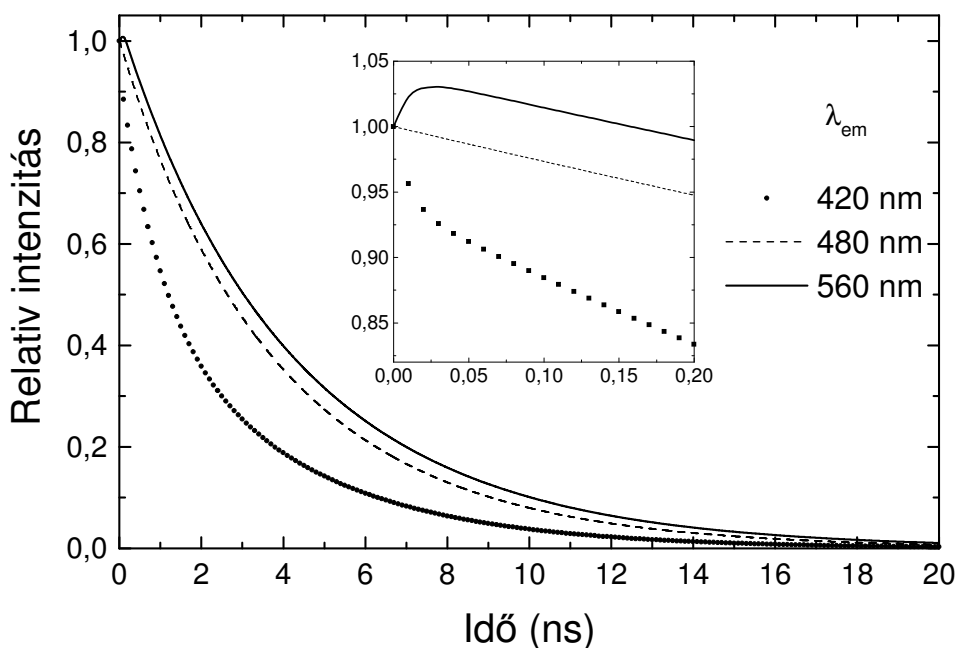
A $v(t)$ függvények meghatározásához a HSA/AC esetében az AC fluoreszcenciájának lecsengését mértük több ($420\text{--}560\text{ nm}$, 10 nm -es lépésben) emissziós hullámhosszon (17. ábra).



17. ábra. Tipikus fázis és modulációs adatok az emissziós spektrum kék és vörös oldalán mérve. (telt jelek: 420 nm , nyitott jelek: 560 nm , háromszögek: fázis adatok, körök: modulációs adatok) HSA/AC puffereben.

$$T = 22^{\circ}\text{C}, \lambda_{\text{ex}} = 380\text{ nm}.$$

A fázis és modulációs görbéket két ill. három exponenciális összegével tudtuk illeszteni (18. ábra) A fluoreszcencia lecsengési görbék közül az 19. ábrán látunk hármat.

18. ábra. Mért és illesztett fázis és modulációs adatok. $\lambda_{em} = 560$ nm.19. ábra. Fluoreszcencia lecsengési görbék az emissziós spektrum kék és vörös oldalán ill. a maximumban. HSA/AC pufferben, $T = 22^\circ\text{C}$, $\lambda_{ex} = 380$ nm.

A leggyorsabb a lecsengés a kék oldalon, a vörös oldalon kezdeti felcsengést is tapasztalunk. Tipikus látszólagos fluoreszcencia lecsengési komponenseket összegeztünk a IV. táblázatban.

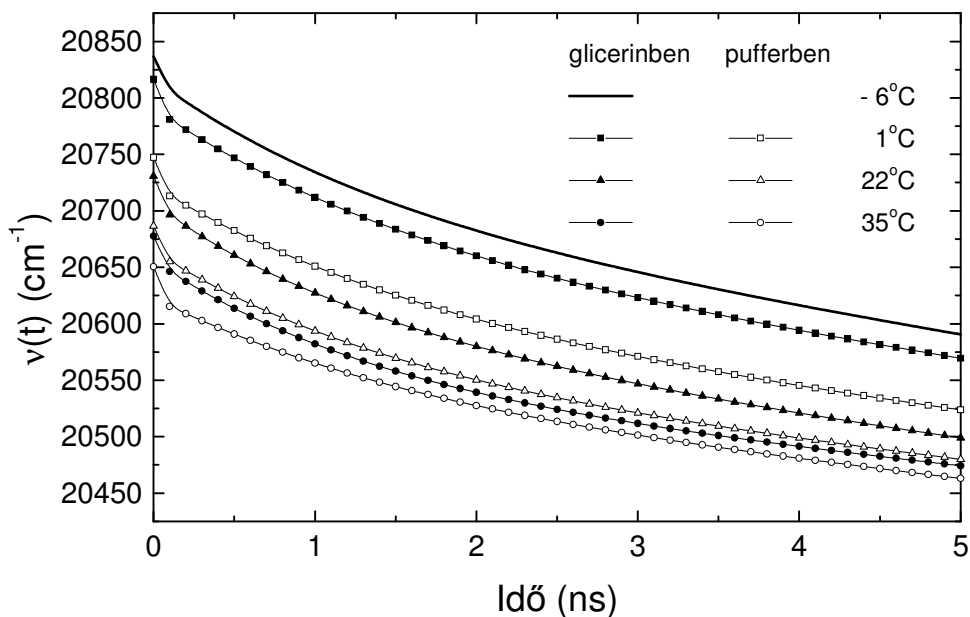
Az emissziós maximum környékén két komponenssel, a kék és a vörös oldalon három komponenssel lehet közelíteni a lecsengést. A kék oldali pozitív és a vörös oldali negatív komponens nagyon gyors (<10 ps). Az illesztéseknél a gyors komponens amplitúdóját ki tudtuk számolni, de értékét fixnek vettük, mert ez már a fázisfluoriméterünk méréshatárán kívül esik.

A vörös oldali negatív amplitúdójú komponens egyértelműen a DR jelenlétére utal. A fotogerjesztést követően az S_1 magasabb energiaszintjeire kerülő molekulák az új egyensúlyi helyzethez – a fluoreszcencia élettartamhoz képest gyorsabban – relaxálva növelik az alacsonyabb energiájú szintek betöltöttségét, ezért ez a vörös hullámhosszakon a kezdeti időpillanatokban az intenzitás növekedését okozza.

λ_{em} (nm)	a_1	a_2	a_3	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	τ_3 (ns)
420	0.52	0.42	0.06	3.81	0.95	0.01
430	0.61	0.35	0.04	3.76	1.05	0.01
440	0.70	0.26	0.04	3.71	1.17	0.01
450	0.76	0.22	0.02	3.84	1.20	0.01
460	0.86	0.14	-	3.76	0.94	-
470	0.93	0.07	-	3.76	0.78	-
480	0.91	0.08	-	4.00	1.31	-
490	0.85	0.15	-	4.18	2.25	-
500	0.88	0.13	-0.01	4.29	2.02	0.01
510	0.90	0.12	-0.02	4.30	2.46	0.01
520	0.90	0.12	-0.02	4.31	2.75	0.01
530	0.93	0.09	-0.02	4.36	2.21	0.01
540	0.93	0.09	-0.02	4.38	2.34	0.01
550	0.95	0.09	-0.04	4.44	1.99	0.01
560	0.95	0.09	-0.04	4.45	1.99	0.01

IV. Táblázat. Látszólagos fluoreszcencia élettartam komponensek.
HSA/AC pufferben, $T = 22^\circ\text{C}$, $\lambda_{ex} = 380$ nm.

Kiszámoltuk a megmért fluoreszcencia lecsengési görbékből az emissziós spektrumok súlypontjának időfüggését leíró $v(t)$ függvényeket (20. ábra).

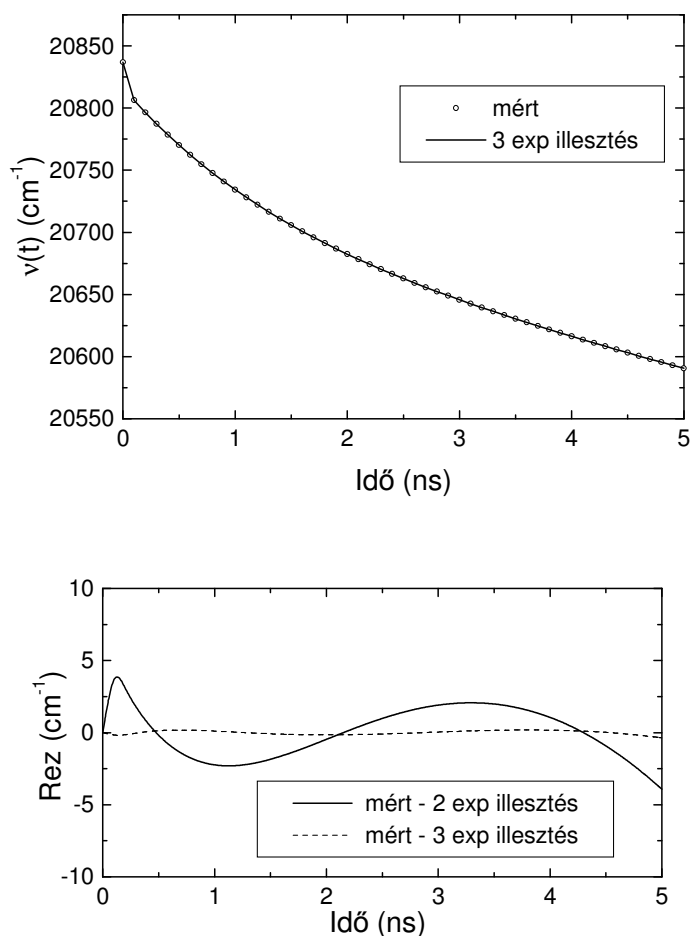


20. ábra. A Cys-34 körüli környezet dipoláris relaxációját jellemző $v(t)$ függvények. HSA/AC pufferben és glicerin/pufferben. $\lambda_{\text{ex}} = 380$ nm.

A DR időfüggését jellemző függvényeket három exponenciális összegével tudtuk megfelelően illeszteni (21. ábra, V. táblázat). A 21. ábrán jól látszik, hogy a két exponenciális összegével való közelítés nem írja le kielégítően a relaxációs függvényt.

A cisztein körüli környezet dipoláris relaxációjában megjelenik egy kezdeti gyors komponens, amiről csak azt tudjuk mondani, hogy 10 ps-nál rövidebb. A ns-os relaxáció nem monoexponenciális, s mivel a komponensek nagyságrendileg nem különböznek egymástól, ezért leírhatjuk néhány exponenciális összegével vagy egy eloszlás függvénnyel vagy akár „stretched” exponenciálissal is. A diszkrét komponensek összegével való illesztést választva, két időállandó jellemzi a relaxációt. Ezek közül a gyorsabb 900–1400 ps, a lassabb 6–14 ns között van.

A DR lecsengése gyakorlatilag nem változik a hőmérséklettel, tehát az AC szonda körüli fehérje-mátrix mozgását alig befolyásolja a hőmérséklet változása, legalábbis a vizsgált hőmérséklet tartományban.



21. ábra. Egy példa a $\nu(t)$ függvény illesztésére. Lecsengési görbe és rezidum. HSA/AC glicerin/pufferben, $T = -6^\circ\text{C}$, $\lambda_{\text{ex}} = 380 \text{ nm}$.

Hőmérséklet ($^\circ\text{C}$)		y_0 (cm^{-1})	a_1	a_2	a_3	t_1 (ns)	t_2 (ns)	t_3 (ns)
35	puffer	20262	27.3	74.2	287.0	0.01	1.39	13.72
	glicerin	20350	21.2	89.5	217.6	0.01	1.17	8.90
22	puffer	20346	22.0	78.5	240.4	0.01	1.20	8.50
	glicerin	20375	23.9	60.6	271.5	0.01	0.91	6.40
1	puffer	20327	25.1	89.2	305.6	0.01	1.43	10.99
	glicerin	20410	25.4	73.4	307.5	0.01	1.21	7.55
-6	glicerin	20437	19.3	62.2	318.2	0.01	0.96	6.89

V. Táblázat. A dipoláris relaxáció időállandói. HSA/AC pufferben és glicerin/pufferben különböző hőmérsékleteken, $\lambda_{\text{ex}} = 380 \text{ nm}$.

$$\nu(t) = y_0 + a_1 \cdot \exp(-t/t_1) + a_2 \cdot \exp(-t/t_2) + a_3 \cdot \exp(-t/t_3)$$

Kicsi, de szignifikáns különbség van a pufferes ill. glicerines minták között, a glicerines mintához tartozó $\nu(t)$ függvények minden egyes időpillanatban magasabb értékűek, mint a pufferes mintához tartozó értékek. Bár a glicerin koncentrációja csak 30%, még így is hatással van az AC körüli környezetre. A Cys34 a HSA-nak nem egy teljesen eltemetett részén van, így az AC jól érzékeli az oldószer polaritásának változását. Glicerin jelenlétében az oldószer polaritása alacsonyabb, a fluoreszcencia a magasabb energiájú állapotokból jön létre, következésképpen a $\nu(t)$ függvények értéke nagyobb.

Az összfluoreszcencia intenzitás lecsengés időfüggvényeket a különböző emissziós hullámhosszokon mért lecsengési görbékből számítottuk, melyeket két exponenciális összegével illesztettünk (VI. táblázat).

A fluoreszcencia élettartama glicerin jelenlétében rövidebb, megnő a nem sugárzásos átmenetek valószínűsége, aminek két oka lehet. Glicerin jelenlétében megnőhet az AC emissziójának oldószer molekulák általi ütközéses kioltása. De megváltozhat a glicerin jelenlétében az AC körüli fehérje-mátrix konformációja, és így megnőhet a szomszédos csoportok kioltó hatása. A Trp emisszió vizsgálatánál ugyanilyen élettartam rövidülést tapasztaltunk. A két jelenséget a rendelkezésre álló adatokból nem lehet megkülönböztetni.

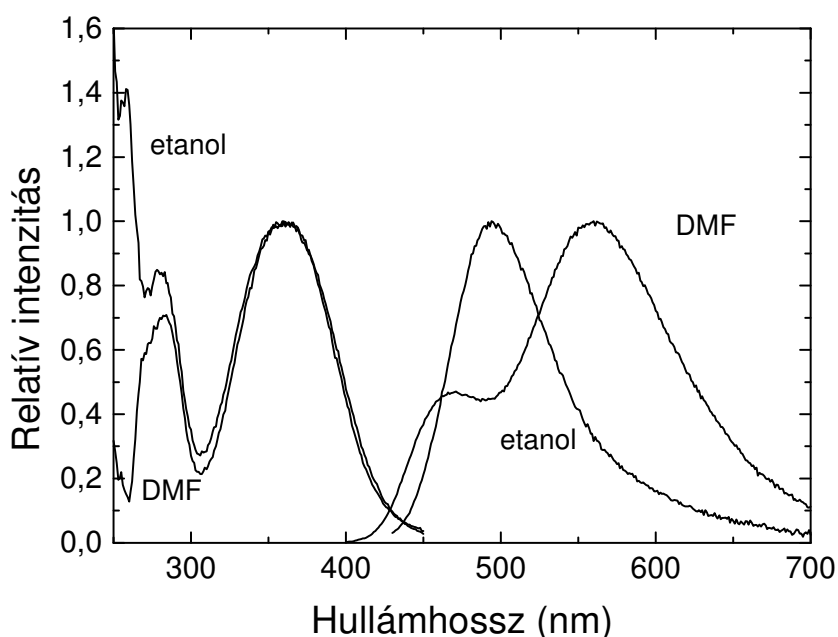
Hőmérséklet (°C)		a_1	a_2	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	$\bar{\tau}$ (ns)
35	glicerin	0.17	0.83	1.37	3.90	3.73
	puffer	0.13	0.87	1.28	3.97	3.85
22	glicerin	0.15	0.85	1.46	4.06	3.90
	puffer	0.11	0.89	1.33	4.07	3.97
1	glicerin	0.19	0.81	1.90	4.34	4.11
	puffer	0.14	0.86	1.72	4.36	4.20
-6	glicerin	0.26	0.74	2.64	4.46	4.15

VI. táblázat. Az összfluoreszcencia intenzitás lecsengése.
HSA/AC, $\lambda_{\text{ex}} = 380$ nm.

4. Eredmények, diszkusszió

4. 3. Az acrylodan körüli oldószer-környezet relaxációjának vizsgálata pumpa-próba mérésekkel.

Az AC-t etanolban és DMF-ben oldottuk és megmértük a steady-state gerjesztési és emissziós spektrumokat (22. ábra). Míg a gerjesztési spektrumok elég hasonlóak, addig az emissziós spektrumok különbözősége az eltérő oldószer-környezet hatását tükrözi.

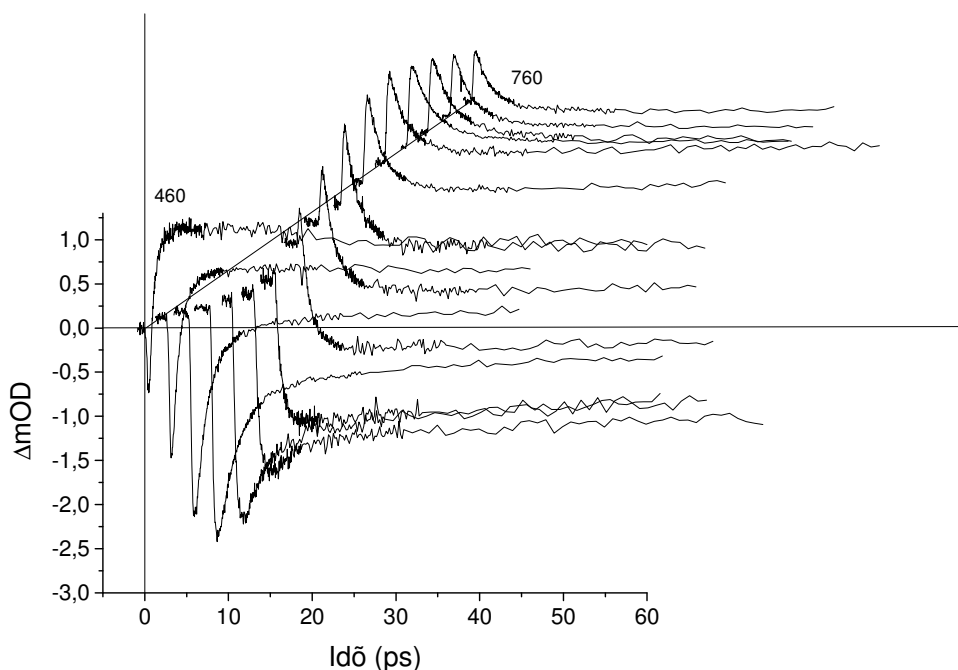


22. ábra. Gerjesztési és emissziós spektrumok. AC etanolban és DMF-ben.

A pumpa-próba méréseknél a gerjesztő impulzus hullámhossza 397 nm volt, ami a 22. ábráról láthatóan az abszorpciós sáv hosszabb hullámhosszú tartományára esik, azaz a festék S_1 gerjesztett állapotának alacsonyabb energiájú nivóit gerjesztjük. A 450 nm-nél nagyobb hullámhosszú gerjesztés esetén alapállapotú abszorpció gyakorlatilag nincs.

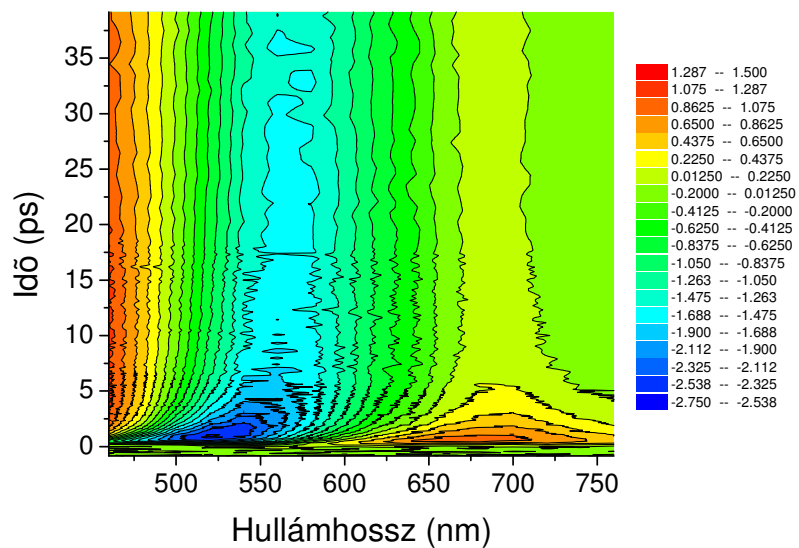
AC DMF-ben

Mértük a tranziens jel időbeli változását a pumpa utáni első 40 ps-os időtartományban, különböző próba hullámhosszakon (23. ábra). A gerjesztő hullámhossz: 397 nm volt, a próba nyaláb hullámhosszát 460-760 nm között változtattuk, 20 nm-es lépésekben.

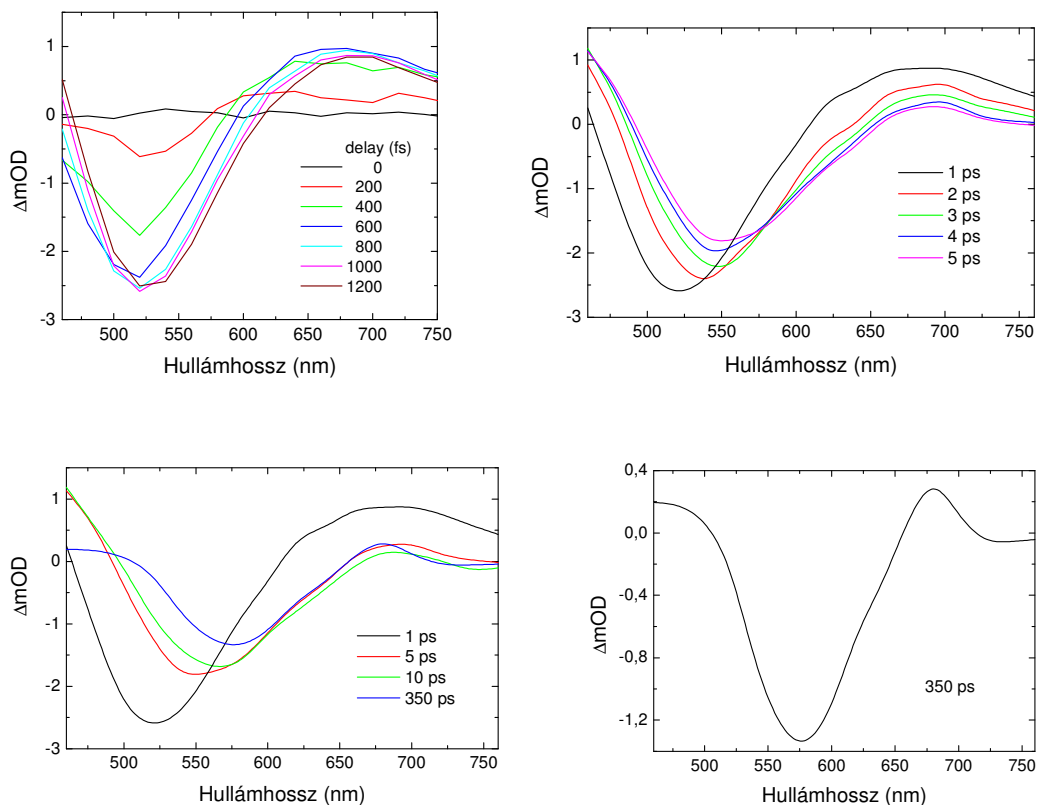


23. ábra. Tranziens jel lecsengési görbék különböző próbahullámhosszakon. AC DMF-ben.

A közvetlenül megmért lecsengési görbékől idő-tranziens jel mátrixot állítottunk össze. A 24. ábrán a mátrix kontúrtérképét ábrázoltuk. A 25. ábrán a tranziens spektrum időbeli fejlődését látjuk, néhány a mátrixból kiválasztott spektrum alapján, kiegészítve egy hosszabb idő-késleltetésű spektrummal, melyet külön vettünk fel. A kontúrtérképről és a spektrumokból is látszik, hogy a gerjesztés után rögtön két sáv jelenik meg. Az intenzív negatív sáv (maximuma 525 nm-nél) az indukált emisszió, a pozitív sáv (maximuma 675 nm-nél) a gerjesztett állapotú abszorpció, ami az $S_1 \rightarrow S_2$ átmenethez tartozik. Mindkét sáv gyorsan csökken az első néhány ps alatt és 5 ps múlva elér egy sokkal lassabban csökkenő fázist. A gyors csökkenést mindkét sávnál ugyanazzal az 1,4 ps-os időállandóval jellemezhetjük. Jól látható még az indukált emissziós sáv gyors és nagy mértékű eltolódása a hosszabb hullámhosszak felé, ez a dinamikus Stokes-eltolódás az oldószer-relaxáció következménye. Megfigyelhetünk még egy pozitív sávot a rövid hullámhosszaknál is (< 480 nm), ami az $S_1 \rightarrow S_3$ gerjesztett állapotok közötti átmenethez tartozó abszorpció.



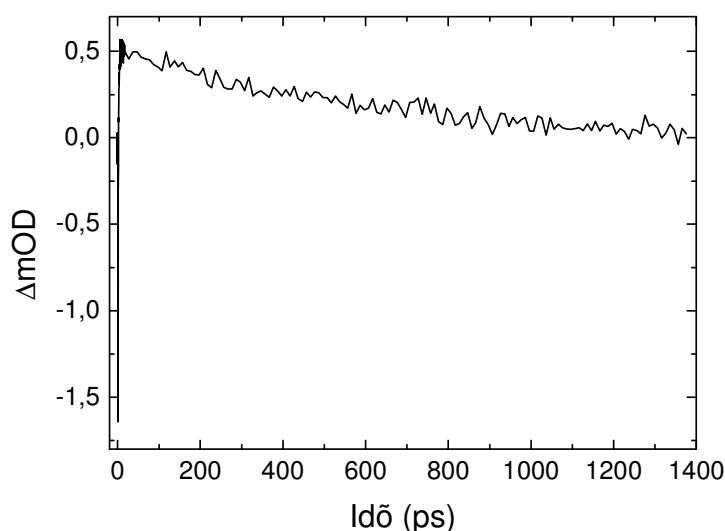
24. ábra. Idő-tranziens jel mátrix kontúrtérképe. AC DMF-ben.



25. ábra. Időbontott tranziens spektrumok. AC DMF-ben.

Megjelenését kétféle módon magyarázhatjuk: (1) A gerjesztés után kb. 5 ps alatt épül fel az $S_1 \rightarrow S_3$ abszorpció és hosszabb ideig fennmarad. A 25. ábráról is látszik, hogy 350 ps múlva is jelen van. (2) A gerjesztés után rögtön megjelenik az $S_1 \rightarrow S_3$ abszorpció, csak az erős indukált emisszió elfedi, majd az indukált emisszió vörös hullámhosszak felé történő tolódásával válik „láthatóvá”. Fenti mérésekből nem lehet eldönteni, hogy melyik jelenség játszódik le.

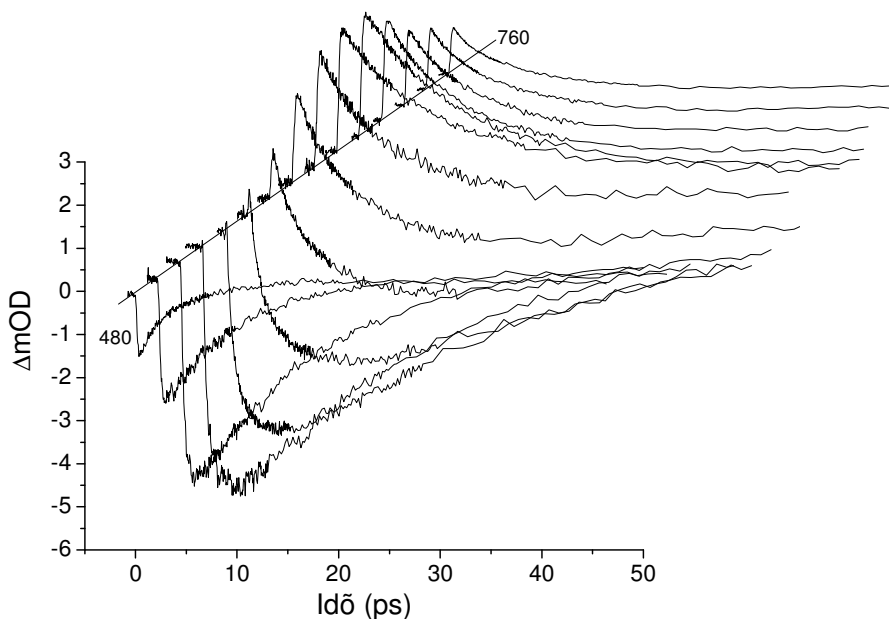
A 26. ábrán egy hosszabb időtartományú mérés eredményét láthatjuk, a gerjesztést követően 1,4 ns-ig figyeltük meg a tranziens jel változását. A gerjesztést egy gyors negatív jel követi, majd ez gyorsan pozitívvá változik. Az $S_1 \rightarrow S_3$ abszorpcióhoz tartozó pozitív jel 620 ps-os időállandóval cseng le, ami a S_1 állapot megszűnésével kapcsolatos, azaz ezt az időt a fluoreszcencia élettartammal azonosíthatjuk.



26. ábra. Hosszú időtartományon mért tranziens jel. AC DMF-ben,
 $\lambda_{\text{próba}} = 480 \text{ nm}$.

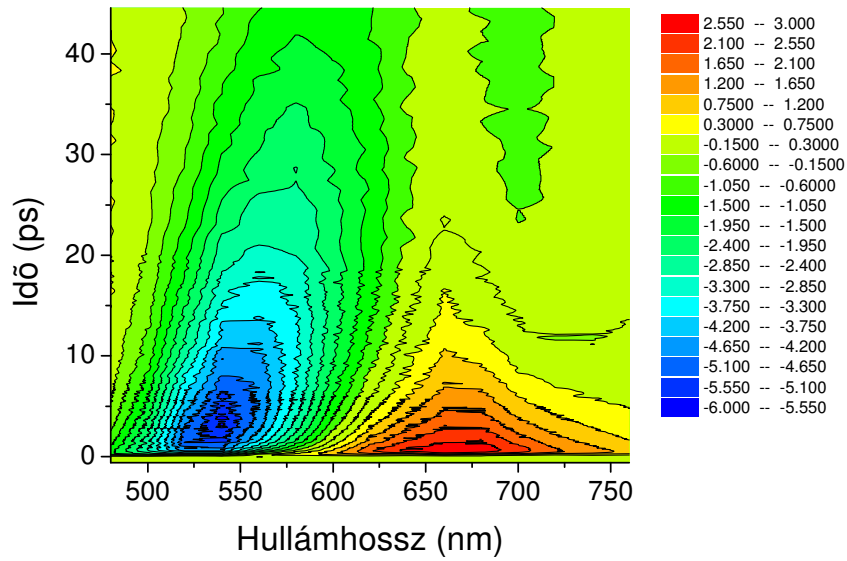
AC etanolban

Megmértük a tranziens jel időbeli változását a pumpa utáni első 40 ps-os időtartományban, különböző próba hullámhosszakon (27. ábra). A gerjesztő hullámhossz: 397 nm volt, a próba nyaláb hullámhosszát 480-760 nm között változtattuk, 20 nm-es lépésekben.

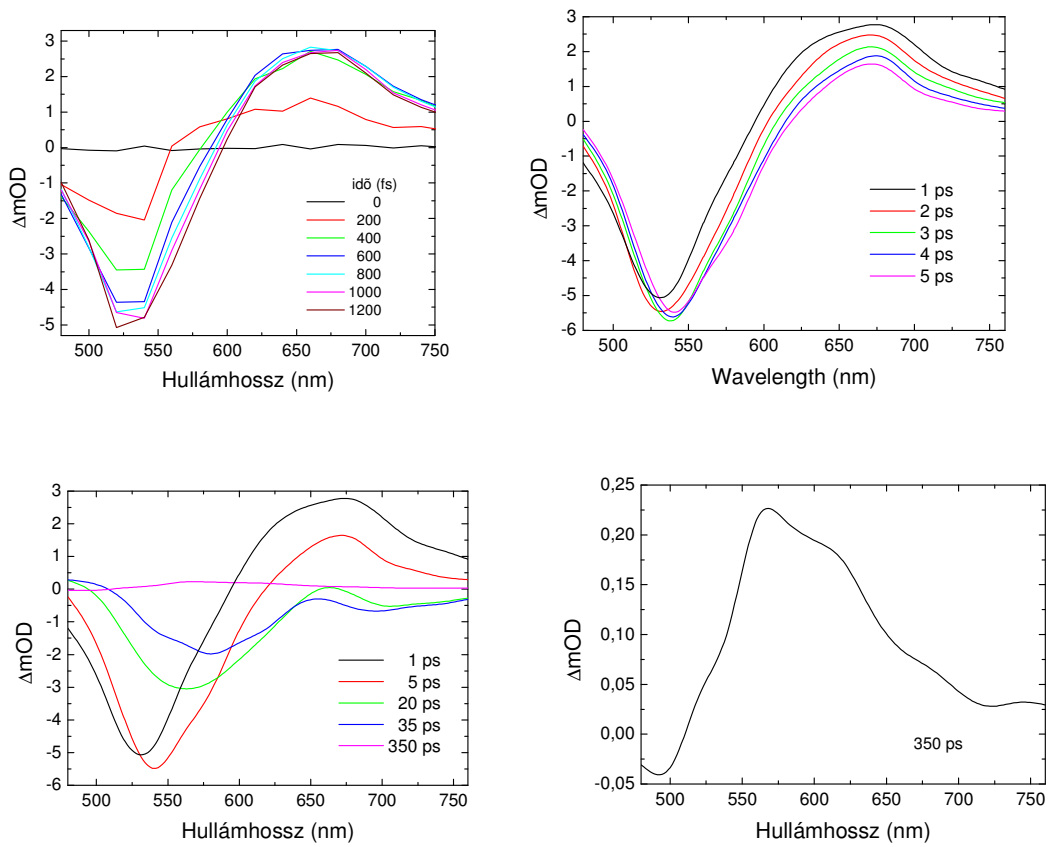


27. ábra. Tranziens jel lecsengési görbék különböző próbahullámhosszakon. AC etanolban.

A közvetlenül megmért lecsengési görbékből összeállítottuk az idő-tranziens jel mátrixot, kontúrtérképét a 28. ábrán látjuk. A tranziens spektrum időbeli fejlődését ábrázoltuk a 29. ábrán, néhány a mátrixból kiválasztott spektrum segítségével, kiegészítve egy hosszabb idő-késleltetésű spektrummal, melyet külön vettünk fel. Az etanolban mért tranziens spektrumok hasonlóságokat és különbségeket is mutatnak a DMF-ben mértékhez képest. A gerjesztés után két fő sáv figyelhető meg, egy erős negatív és egy pozitív. Ezek az etanolban mértékhez hasonlóan az indukált emisszióhoz ($S_1 \rightarrow S_0$), ill. a gerjesztett állapotú abszorpcióhoz ($S_1 \rightarrow S_2$) kapcsolhatók. Mindkét sáv gyakorlatilag ugyanazzal a 4,2 ps-os időállandóval cseng le, ami lassabb a DMF-ben mérthez képest. Közben az indukált emisszió sávja a hosszabb hullámhosszak felé tolódik, ez egyrészt lassabb, másrészt kisebb mértékű, mint a DMF-ben tapasztalt eltolódás. Természetesen ez itt is az oldószer-relaxációval kapcsolatos. Megfigyelhetjük még az $S_1 \rightarrow S_3$ gerjesztett állapotok közötti átmenethez tartozó abszorpciót is (< 500 nm), bár ez sokkal gyengébb, mint DMF esetében.



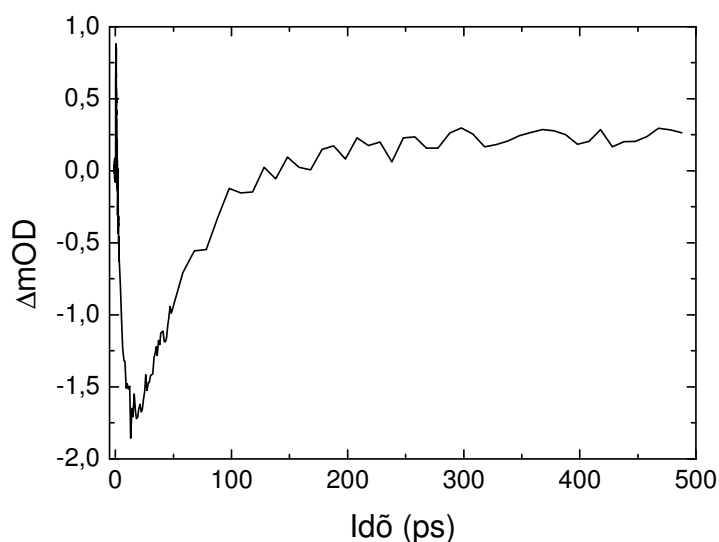
28. ábra. Idő-tranziens jel mátrix kontúrtérképe. AC etanolban.



29. ábra. Időbontott tranziens spektrumok. AC etanolban.

Az etanolban mért tranziens spektrumok az első 10 ps után is folyamatosan változnak. A 350 ps-os késleltetéssel felvett tranziens spektrumból látszik, hogy a kék hullámhosszú $S_1 \rightarrow S_3$ abszorpció eltűnik, az indukált emisszió sávja keskenyebb spektrális tartományra szűkül (470–510 nm) és megjelenik egy újabb, széles (520–760 nm), gerjesztett állapotú abszorpcióhoz tartozó sáv.

Ez tükröződik a hosszú időtartományon felvett lecsengési görbén is (30. ábra). A gerjesztés utáni pozitív jel a kezdeti gerjesztett állapotú abszorpcióhoz tartozik, és gyorsan lecseng. Eközben az indukált emisszió sávja a hosszabb hullámhosszak felé tolódik, ennek a két jelenségnek az eredményeként erős negatív jelet mérünk, mely 25 ps-nál a legerősebb. Később, kb. 100 ps múlva a tranziens jel ismét pozitív és hosszú távon az is marad.

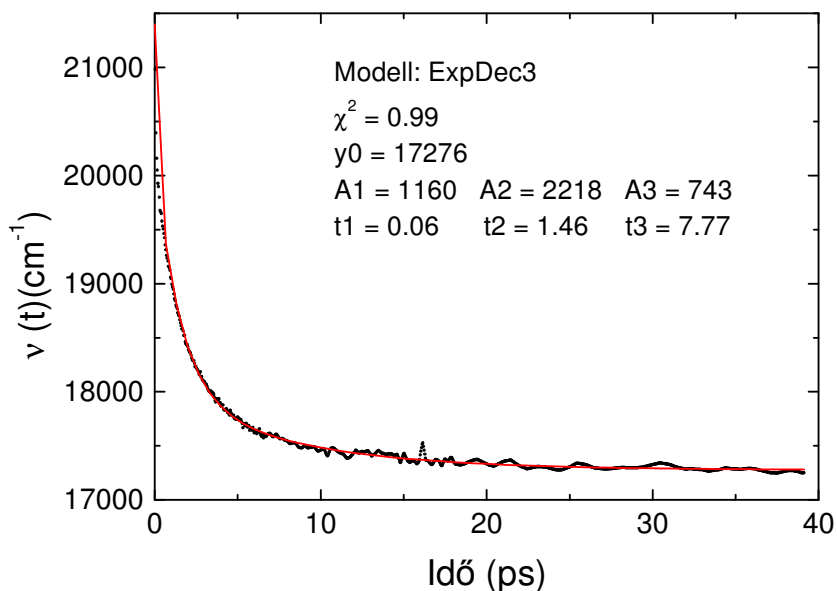


30. ábra. Hosszú időtartományon mért tranziens jel. AC etanolban,
 $\lambda_{\text{próba}} = 600 \text{ nm}$.

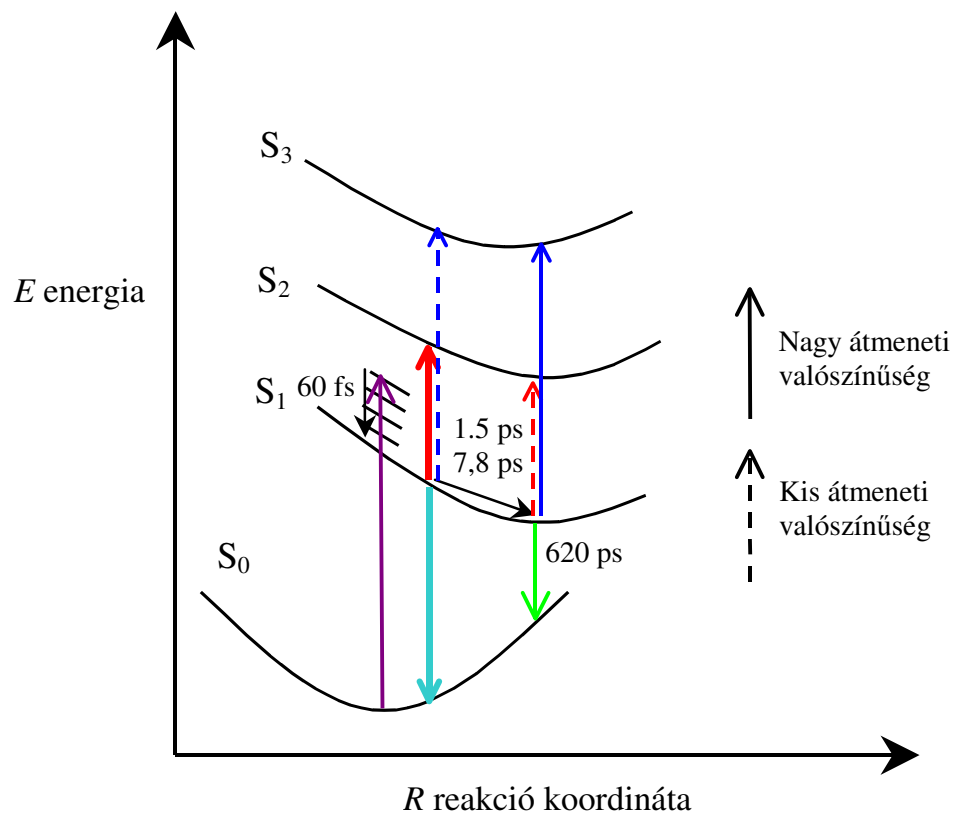
Oldószer dinamika DMF-ben és etanolban

A oldószerben lévő AC-ban mért tranziens spektrumokból egyértelmű, hogy egy oldatban a femtoszekundumoktól a nanoszekundumokig terjedő időskálán számos folyamat versenyez egymással. Az oldószer-relaxáció az egyik legfontosabb közülük, kinetikáját megkaphatjuk az indukált emissziós sáv időbeli eltolódásának vizsgálatából. A módszerek fejezetben leírtak szerint az $S(t)$ függvény helyett a $\nu(t)$ függvénnyel írjuk le a relaxáció időbeli lefolyását.

A 31. ábrán DMF esetén ennek és a három exponenciális összegeként való illesztés eredményét látjuk.



31. ábra. Az indukált emissziós sáv súlypontjának időfüggése. AC DMF-ben.



32. ábra. Energia séma DMF-ben oldott acrylodanra.

A $\nu(t)$ függvény kezdeti értéke: $\nu(0)=21300\text{cm}^{-1}$, ami a hullámhossz skálán 470 nm-nek felel meg. Azaz a 397 nm-es, 180 fs-os gerjesztést követően, a méréseink számára feloldhatatlan időtartományban, vibrációs relaxáció valósul meg, amely befejeződik még az oldószer-relaxáció előtt.

A mérések és a számolások alapján készítettünk egy modellt a DMF-ben oldott AC energia szintjeire (32. ábra). A $\nu(t)$ függvény kezdeti szakaszát leíró legrövidebb, az illesztéskor 60 fs-osnak adódott komponens köthető a vibrációs relaxációhoz, de lehet az oldószer-relaxáció nagyon gyors komponense is. A két ps-os nagyságrendű komponens (1,5 ps és 7,8 ps) az oldószer-relaxációt jellemzi, ez idő alatt jön létre az $S_1 \rightarrow S_0$ indukált emisszió és a sáv a hosszabb hullámhosszak felé tolódik. A gyorsabb, 1,5 ps-os relaxáció komponens az oldószer molekulákban az elektronfelhő újrendeződését, az oldószer dielektromos állandójának gyors változását tükrözi. A lassabb, 7,8 ps-os relaxáció komponens az oldószer molekuláknak a festék molekulák körüli újra rendeződését, azaz rotációs diffúzióját írja le. A gerjesztés után 15-20 ps múlva az oldószer-relaxáció teljesen befejeződik. Érdekes megjegyezni, hogy a szolvatáció ideje alatt nem csak az indukált emissziós sáv súlypontja tolódik a hosszabb hullámhosszak felé, hanem 1,4 ps-os időállandóval a jel amplitúdója is csökken. Ez azt jelenti, hogy az indukált emisszió átmeneti valószínűsége rögtön a gerjesztés után a legnagyobb, majd ahogy a rendszer az új egyensúlyi helyzet felé relaxál, ez az átmeneti valószínűség gyorsan csökken.

A hosszabb hullámhosszakon megjelenő, $S_1 \rightarrow S_2$ átmenethez tartozó gerjesztett állapotú abszorpció szintén 1,4 ps-os időállandóval cseng le, tehát az egyensúlyi helyzet felé tartva az átmenet valószínűsége csökken. A rövid hullámhosszakon megjelenő, $S_1 \rightarrow S_3$ átmenethez tartozó gerjesztett állapotú abszorpció az indukált emissziós és a hosszú hullámhosszú gerjesztett állapotú abszorpciós sávval párhuzamosan jelenik meg. Természetesen a mátrix kontúrtérképén (24. ábra) ennek a sávnak csak a hosszú hullámú végét látjuk. A sáv fejlődésére kétféle magyarázat lehetséges: (1) A szolvatáció következtében idővel megnő az S_1 és az S_3 közötti átmenet valószínűsége, (2) Az S_1 és az S_3 közötti átmenet hatáskeresztmetszete állandó az időben, csak a nagyon erős

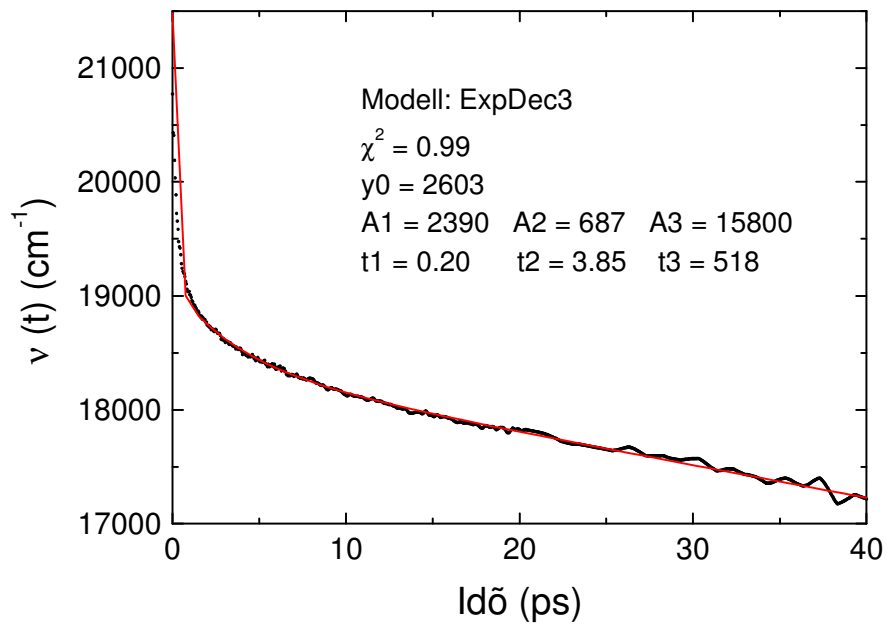
indukált emisszió elfedi, és annak eltolódásával válik megfigyelhetővé.

A szolvatáció befejeződése után a rendszer egyensúlyban marad az S_1 állapotban, a gerjesztés után 30 ps múlva mért tranziens spektrum szerkezete lényegében ugyanolyan, mint 350 ps után (25. ábra). A tanulmányozott hullámhossz tartományon két időskálán figyelhetünk meg jelenségeket. A gerjesztést követő ps-os tartományon oldószer-relaxáció történik. Később, 620 ps-os időállandóval $S_1 \rightarrow S_0$ emisszió valósul meg.

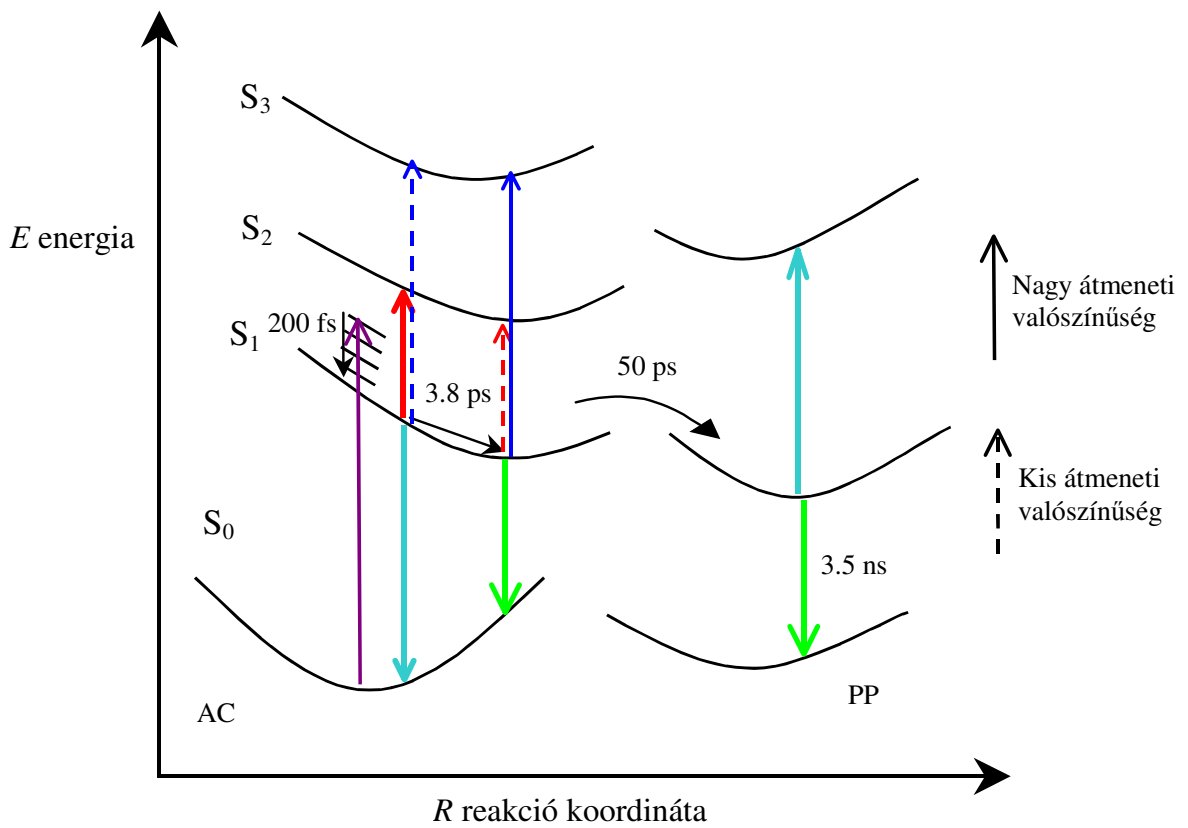
A 33. ábrán az etanolban oldott AC-ra számolt $\nu(t)$ függvényt és illesztésének eredményét látjuk. A kezdeti érték: $\nu(0)=20800\text{cm}^{-1}$, ami a hullámhosszskálán 480 nm-nek felel meg. Tehát a 397 nm-es, 180 fs-os gerjesztést követően, a méréseink számára feloldhatatlan időtartományban, – a DMF-es oldathoz hasonlóan – vibrációs relaxáció valósul meg, amely befejeződik még az oldószer-relaxáció előtt. Az etanolban oldott AC energia szintjeinek modelljét a 34. ábrán mutatjuk be.

A $\nu(t)$ függvény kezdeti szakaszát leíró legrövidebb 200 fs-os komponens köthető a vibrációs relaxációhoz és lehet az oldószer-relaxáció nagyon gyors komponense is. A ps-os komponens (3,8 ps) az oldószer-relaxációt jellemzi, ez idő alatt jön létre az $S_1 \rightarrow S_0$ indukált emisszió és a sáv a hosszabb hullámhosszak felé tolódik. Az indukált emisszió mellett itt is megjelenik egy vörös hullámhosszú és egy kék hullámhosszú gerjesztett állapotú abszorpció. Ezek mindegyike ugyanazzal az időállandóval (4,2 ps) cseng le, ami azt mutatja, hogy mindegyik sáv ugyanazzal az S_1 szinttel kapcsolatos átmenethez tartozik. Az $S_1 \rightarrow S_0$ átmenet (indukált emisszió) és az $S_1 \rightarrow S_2$ abszorpció oszcillátor erőssége a szolvatáció következtében csökken, míg az $S_1 \rightarrow S_3$ átmeneté nő az idővel.

A gerjesztés utáni első 15 ps után is vannak különbségek a két rendszer között. Etanolban a tranziens spektrum ezen az időskálán is változik. Ezt láthatjuk a 28., 29., 30. ábrákon. Az indukált emissziós sáv hullámhosszain a tranziens jel nem lesz zérus hosszabb időtartományon sem.



33. ábra. Az indukált emissziós sáv súlypontjának időfüggése. AC etanolban.



34. ábra. Energia séma etanolban oldott acrylodanra.

Ezekon a hullámhosszakon nagyobb időkéssleltetésnél pozitív jelet mérünk, ami egy új gerjesztett állapotú abszorpciós sáv felépülésére utal, mely folyamat időállandója 50 ps.

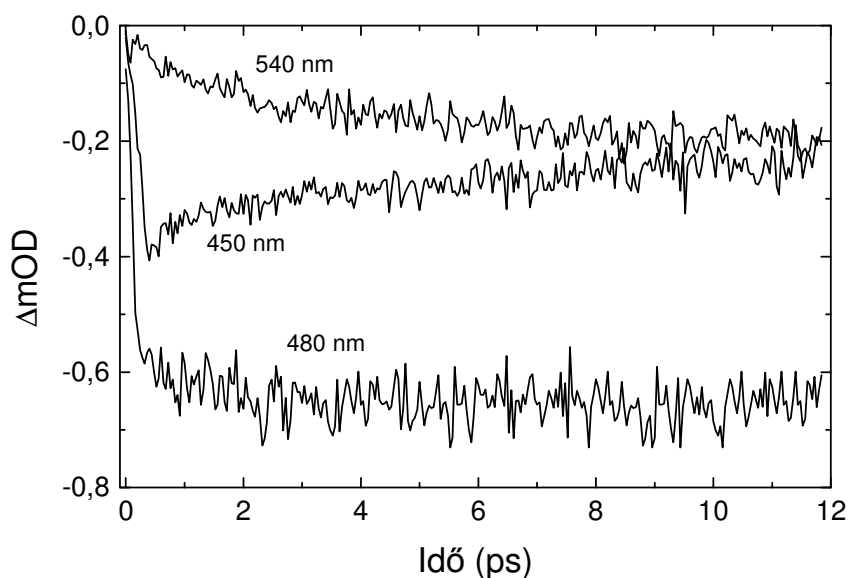
Az indukált emisszió eltűnése és az új abszorpciós sáv felépülése az AC egy új módosulatának megjelenésével kapcsolatos. Valószínű, hogy a molekula S_1 gerjesztett állapotának élettartama alatt izomerizáció történik, és az új izomer széles spektrális tartományú gerjesztett állapotú abszorpciója jelenik meg. Alapállapotban nem figyelhető meg ez az izomerizáció.

Végül tekintsük még egyszer a 33. ábrát. A megfigyelt időtartam alatt a görbe nem közelít aszimptotikusan egy értékhez, mint a DMF esetében. Sőt, határozottan tolódik a hosszabb hullámhosszak felé. Ennek időállandója az illesztésből 518 ps-nak adódik, ez azonban nem jellemzi az oldószer-relaxációt. A néhányszor 100 ps-os és annál nagyobb időskálán többféle jelenség versenyez egymással, az indukált emisszió, a vörös abszorpció, a kék abszorpció, az izomerhez tartozó abszorpció és ezek az idő folyamán változó módon fedik el egymást. A fenti 518 ps időállandó tehát látszólagos, nem rendelhető konkrétan egyik folyamathoz sem.

4. 4. A cisztein körüli környezet relaxációjának vizsgálata HSA/AC-ban pompa-próba mérésekkel.

A 16. ábrán láttuk az AC-al jelölt HSA pufferes oldatának steady-state emissziós színeképét. Az emissziós maximum 486 nm-nél van, ami arra utal, hogy az AC hidrofób környezetben kötődik a HSA-hoz.

Megmértük a tranziens jel időbeli változását több különböző próba hullámhosszon. A fehérjeoldat fényérzékenynek bizonyult a nagy teljesítményű lézerténnyel való megvilágítással szemben, ez a fényérzékenység reverzibilis volt. A denaturáció elkerülése érdekében a pompa impulzusok intenzitását oly mértékben csökkentettük le, hogy a mért tranziens jel $0,7 \Delta mOD$ -nél kisebb legyen. Ennek következtében a mért jelek relatíve zajosabbak az oldószerben lévő AC-os mintákon mértekhez képest. A fluoreszcencia emisszió hullámhosszain mért (450, 460, 480, 500, 520, 540 nm) görbék közül a 35. ábrán mutatunk be hármat, az emissziós maximumban, az emissziós spektrum kék ill. vörös oldalán. A görbék mindegyikéhez negatív értékek tartoznak, minden időpontban, tehát indukált emisszióról van szó. A relaxáció miatt fellépő spektrum eltolódás következtében a kék oldalon gyors lecsengés, a vörös oldalon gyors felcsengés figyelhető meg.



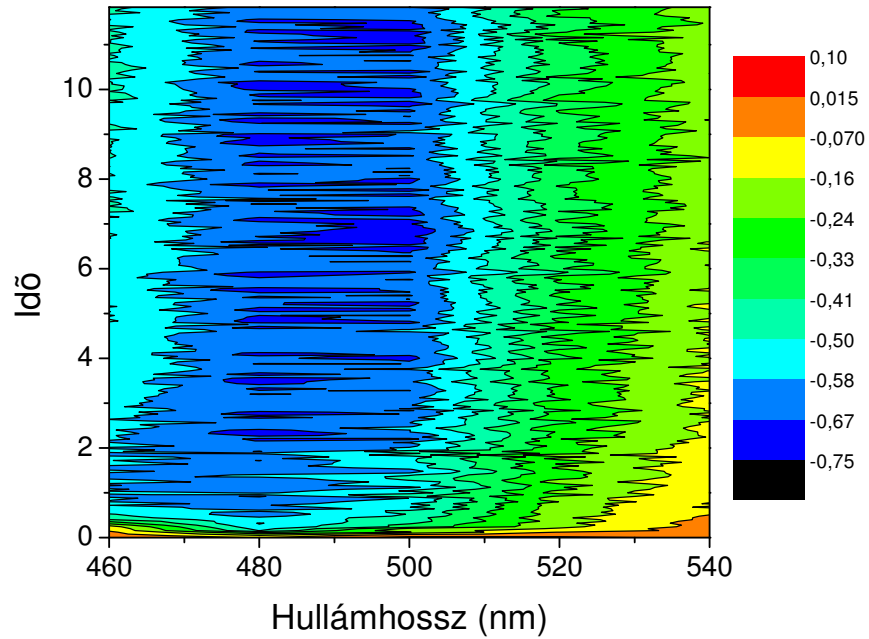
35. ábra. Az indukált emissziós sáv súlypontjának időfüggése. HSA/AC puffereben.

Elkészítettük a fenti mérésekből az idő-tranziens jel-mátrixot, melynek kontúrtérképét látjuk a 36. ábrán.

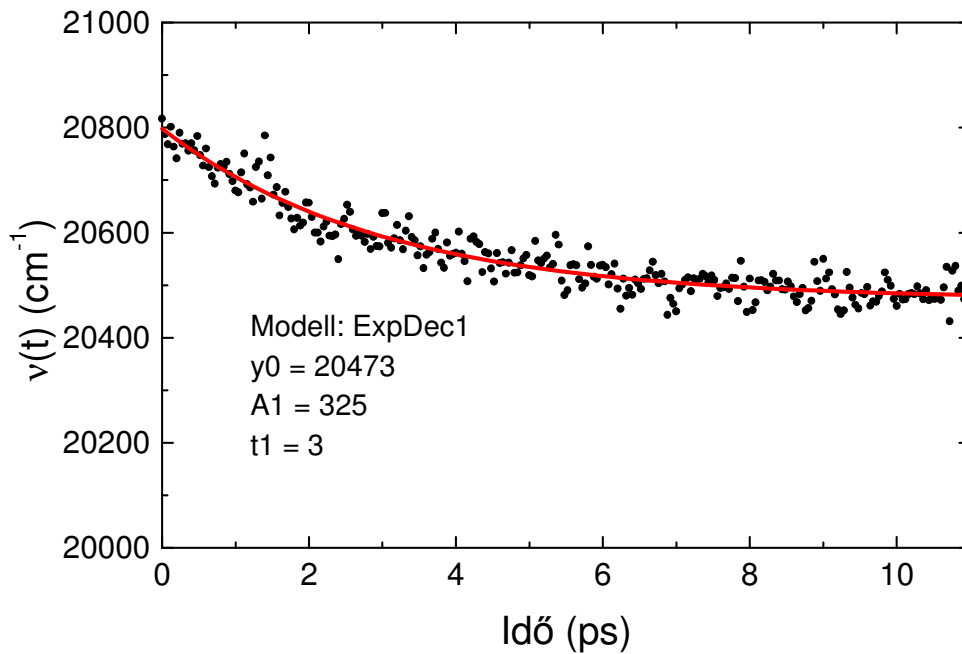
Bár a mért tranziens jel görbék zajosak, kiszámoltuk az indukált emissziós sáv súlypontjának időfüggését, a $\nu(t)$ függvényt. Egy exponenciális függvénnyel való illesztés kielégítő eredményt szolgáltatott (37 ábra). A dipoláris relaxációt jellemző időállandó 3 ps.

A fázisfluorimetriás mérésekből láttuk, hogy a HSA ciszteinjéhez kovalens módon kötött AC körüli környezet dipoláris relaxációjának ns-os nagyságrendű időállandóján kívül van egy rövidebb (< 10 ps) komponens is, amit a pumpa-próba mérésekkel a fentiek szerint meghatároztunk. Az AC körüli környezet a fehérje mátrix és az oldószer, esetünkben víz. A szubns-os és ns-os relaxációs idők a fehérje mátrixot jellemzik, a ps-os relaxációs idő – etanolban és DMF-ben is mértünk ps-os relaxációs időállandót – egyértelműen az oldószer relaxációjához köthető.

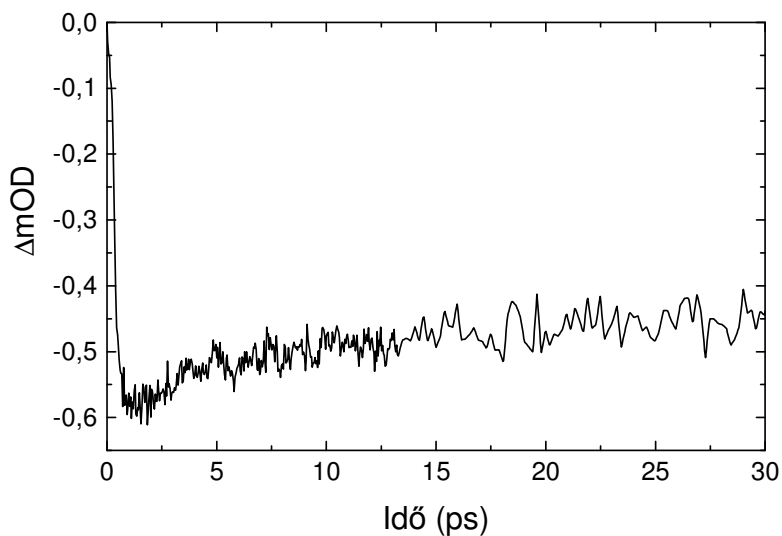
Megmértük a kék oldali tranziens jelet egy kicsit hosszabb időtartományon is (38. ábra). A fel- és lecsengés az első 10–15 ps alatt történik, utána az indukált emissziós jel egy konstans érték körül fluktuál. Ez jelzi, hogy a 100 ps-ig terjedő időtartományon más relaxációs komponens nincs.



36. ábra. Idő-tranziens jel mátrix kontúrtérképe. HSA/AC pufferben.



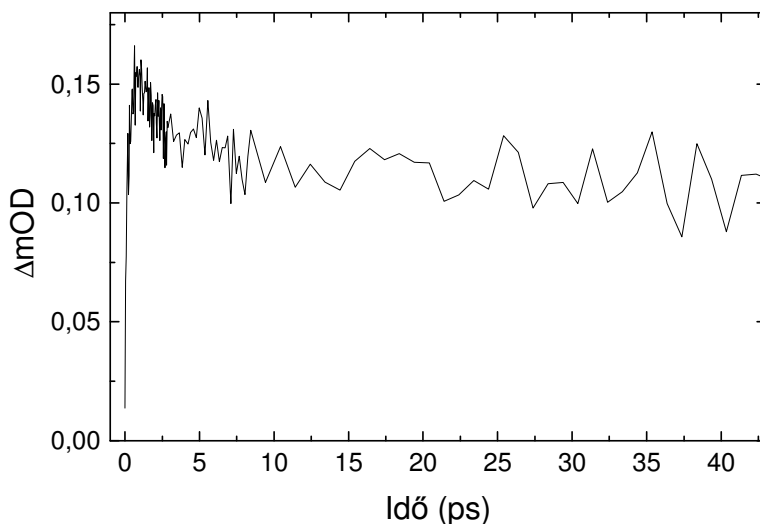
37. ábra. Az indukált emissziós sáv súlypontjának időfüggése. HSA/AC pufferben.



38. ábra. Hosszabb időtartományú tranziens jel. HSA/AC pufferben.

$$\lambda_{\text{próba}} = 460 \text{ nm.}$$

Az oldószerben oldott AC-ra kapott eredményekhez hasonlóan, a vörös hullámhosszakon (650–720 nm) pozitív jelet mértünk, ami $S_1 \rightarrow S_2$ gerjesztett állapotú abszorpcióra utal. Ezek közül egyet mutat be a 39. ábra. A tranziens jelek azonban nagyon kicsik és zajosak voltak, így nem tudtunk elfogadható mátrixot készíteni ezen a hullámhossz tartományon.



39. ábra. Tranziens jel a hosszabb hullámhossztartományon. HSA/AC pufferben.

$$\lambda_{\text{próba}} = 700 \text{ nm}$$

5. Az eredmények összefoglalása

1. Fázisfluoriméterrel megmértük a HSA-ban a Trp fluoreszcencia lecsengését több emissziós hullámhosszon. Ezekből a lecsengési görbékből idő – emissziós mátrixot állítottunk össze. Az időbontott emissziós spektrumokból kiszámoltuk a spektrumok súlypontjának időfüggését, a $\nu(t)$ függvényt. A méréseket több különböző hőmérsékleten és kétféle oldószer (víz és víz/glicerin keverék) jelenlétében végeztük.

2. A HSA-ban levő Trp fluoreszcencia lecsengése nem monoexponenciális. Az emissziós spektrumok a megfigyelt idő tartományon (0,1–10 ns) a hosszabb hullámhosszak felé tolódnak.

3. Az emissziós spektrumok vörös eltolódása dipoláris relaxációra utal. Annak eldöntéséhez, hogy ez a relaxáció a Trp körüli fehérje-mátrixhoz vagy az oldószer relaxációjához köthető, megmértük a NATA vizes oldatában a fluoreszcencia lecsengési görbéket több emissziós hullámhosszon. A lecsengési görbék nem különböztek egymástól, ami arra utal, hogy a NATA vizes oldatában a megfigyelt időtartományon nem észlelhető oldószer-relaxáció. A HSA-ban lévő Trp körüli relaxáció tehát egyértelműen a fehérje-mátrix dipoláris relaxációja.

4. A glicerin a fehérje konformációjára is hatással van, és nem csak a viszkozitást változtatja meg, hanem kis mértékben a dielektromos állandót és a pH-t is. 30%-nál nagyobb glicerin koncentráció esetén lecsökken a fluoreszcencia átlagélettartama. Glicerin jelenlétében megváltozik a fehérje hidratációja, a kémiai potenciál minimalizálása érdekében a HSA kompaktabb konformációt vesz fel. A fehérje-mátrix rigidebbé válik, tehát a relaxáció lassul, miközben a szomszédos csoportok kioltó hatása megnő, azaz a fluoreszcencia átlagélettartama lecsökken.

5. Meghatároztuk a DR időállandóit -4°C és 37°C között víz és víz/glicerin keverék jelenlétében. Megállapítottuk, hogy a DR időállandója a hőmérséklettől és az oldószer összetételétől függ. Alacsonyabb hőmérsékleten, ill. glicerin jelenlétében a dipoláris relaxáció lassabb. A két különböző időállandójú DR-t – a

rövidebb néhány száz ps, a hosszabb néhány ns – a HSA mátrixának különböző frekvenciájú rezgéseikhez kapcsolhatjuk.

6. Megmértük a HSA/AC-ban az AC fluoreszcencia lecsengését több emissziós hullámhosszon. Ezekből idő-emissziós mátrixot állítottunk össze. Az időbontott emissziós spektrumokból kiszámoltuk a spektrumok súlypontjának időfüggését, a $\nu(t)$ függvényt. A méréseket több különböző hőmérsékleten és kétféle oldószer (víz és víz/glicerín keverék) jelenlétében végeztük.

7. Az AC-al jelölt HSA fluoreszcencia lecsengése nem monoexponenciális. A Cys34-hez kovalensen kapcsolt fluoreszcencia sonda emissziójának tanulmányozása DR jelenlétére utal. A DR három időállandóval jellemezhető. A lassabb (0,1 ns, ill. néhány ns) komponensek a fehérje-mátrix relaxációjához köthetők, és annak különböző frekvenciájú mozgását tükrözik. A gyors (<10 ps) komponens feltehetően nem a fehérje-mátrix, hanem az oldószer relaxációjához tartozik.

8. Megvizsgáltuk tehát a HSA fehérje-mátrixának relaxációját a molekula két különböző részében. A Trp fluoreszcenciájának megfigyelésével (a Trp a molekula belsejében a IIA doménben, egy hidrofób zsebben van) a biokémiai kötések szempontjából fontos kötőhely körüli fehérje-mátrix relaxációjának időfüggését határoztuk meg. Az HSA/AC fluoreszcenciájának megfigyelésével (a Cys34 az IA doménben, a molekula felszínének közelében hidrofób zsebben található) a fehérje-mátrix olyan részének megfigyelése lehetséges, amely az oldószer számára jobban hozzáférhető. A fehérje-mátrix két részében a DR különbözik. Míg a molekula belsejében a hőmérséklet és az oldószer összetételének megváltozása nagymértékben befolyásolja a relaxáció sebességét, addig a felszín közelében – legalábbis a vizsgált hőmérséklet tartományban – alig függ a DR sebessége a hőmérséklettől és az oldószer összetételétől.

9. A fentebb említett 10 ps-nál rövidebb DR komponens meghatározása érdekében pumpa-próba méréseket végeztünk. Megmértük az oldószerben (DMF-ben és etanolban) oldott AC-ban a tranziens jel időfüggését több próba hullámhosszon. Az időbontott tranziens spektrumok mérésével indukált

emissziót és gerjesztett állapotú abszorpciót leíró színképi sávokat határoztunk meg és követtük azok időbeli fejlődését.

10. A fluoreszcencia hullámhosszakon megjelenő indukált emissziós sávhoz tartozó tranziens spektrumokból meghatároztuk a DR-t jellemző időállandókat. DMF esetében három exponenciális összegével közelítettük a $\nu(t)$ függvényt, a legrövidebb 60 fs-os komponens véleményünk szerint a vibrációs relaxációt, a két ps-os komponens (1,5 ps ill. 7,8 ps) az oldószer-relaxációt jellemzi. Etanol esetében is három exponenciális összegével tudtuk a $\nu(t)$ függvényt közelíteni. A legrövidebb, 200 fs-os komponens a vibrációs relaxációhoz tartozik, a 3,8 ps-os komponens az oldószer-relaxációt jellemzi, a hosszabb 518 ps-os komponens megjelenése több egymással versenyző folyamat eredménye.

11. A mérések és számítások alapján modellt állítottunk fel a DMF-ben és etanolban oldott AC alap- és szinglett gerjesztett állapotainak energiaszintjeire. DMF-ben az AC fényabszorpciót követően az S_1 gerjesztett állapotba kerül, innen indukált emisszió ($S_1 \rightarrow S_0$) és kétféle gerjesztett állapotú abszorpció (nagyobb valószínűséggel $S_1 \rightarrow S_2$, kisebb valószínűséggel $S_1 \rightarrow S_3$) lehetséges. Az oldószer-relaxáció ps-os időtartományon következik be, ezt követően lecsökken az $S_1 \rightarrow S_0$ és a $S_1 \rightarrow S_2$, megnő az $S_1 \rightarrow S_3$ átmenet valószínűsége. Az első 15–20 ps után a rendszer S_1 állapotban egyensúlyba kerül és energetikai állapota hosszabb (350 ps) idő múlva is változatlan. Az egyensúlyi állapotból spontán emisszióra kerül sor. Etanolban a modell bonyolultabb. Az abszorpció után itt is megfigyelhetjük, hogy az oldószer-relaxációt követően lecsökken az indukált emisszió és a vörös gerjesztett állapotú abszorpció átmeneti valószínűsége, miközben a kék abszorpció megerősödik. A ps-os oldószer-relaxáció után azonban a molekula átalakul, izomerizáció következik be. Az új állapothoz más S_1 szint tartozik és innen újabb gerjesztett állapotú abszorpció és spontán emisszió lehetséges.

12. Megmértük HSA/AC-ban a tranziens jel időfüggését több próba hullámhosszon. Az időbontott tranziens spektrumok mérésével indukált emissziót és gerjesztett állapotú abszorpciót leíró színképi sávokat határoztunk

meg és követtük azok időbeli fejlődését.

13. A fluoreszcencia emisszió hullámhosszain megjelenő indukált emissziós sávhoz tartozó tranziens spektrumokból meghatároztuk a DR-t jellemző időállandót. A megfigyelt 200 fs–20 ps időtartományon az AC körüli környezet DR-ját jellemző komponens 3,0 ps. Az oldószeres mérésekkel összevetve mondhatjuk, hogy ez nem a fehérje-mátrix, hanem az oldószer relaxációját jellemzi és azonos a fázisfluoriméteres mérésekben talált <10 ps-nál gyorsabb komponenssel.

Irodalomjegyzék

- [1] C. A. Parker: Photoluminescence of solutions, Elsevier, 1968
- [2] J. R. Lakowicz: Principles of fluorescence spectroscopy, Plenum Press, 1983
- [3] J. R. Lakowicz: Topics in fluorescence spectroscopy, vol. 1-3, Plenum Press, 1991
- [4] Szalai L, Damjanovich S.: Lumineszcencia a biológiában és az orvostudományban, Budapest, 1983
- [5] G. R. Fleming: Chemical applications of ultrafast spectroscopy, Oxford University Press, 1986
- [6] J. C. Diels and W. Rudolph: Fundamentals, techniques and applications on a femtosecond time scale, Academic press, 1996
- [7] Duneau J. P. et al.: Time resolved fluorescence properties of phenylalanine in different environments. *Biophys. Chem.*, 1998, 73, 109-119
- [8] E. Leroy et al.: *Photochem. Photobiol.* , 1971, 14, 411-421
- [9] E. A. Permyakov et al.: *Biophys. Chem.*, 1984, 19, 265-271
- [10] K. Sudhakar et al.: *J. Fluorescence* , 1993, 3, 57-64
- [11] M. Eftink: Quenching-resolved emission anisotropy studies with single and multityryptophan-containing proteins. *Biophys. J.* , 1983, 43, 323-334.
- [12] S. T. Ferreira: Fluorescence studies of the conformational dynamics of parvalbumin in solution: Lifetime and rotational motions of the single tryptophan residue. *Biochemistry*, 1989, vol. 28, no. 26, 10066-10072.
- [13] M. R. Eftink and C. A. Ghiron: Exposure of tryptophanyl residues and protein dynamics. *Biochemistry*, 1977, vol. 16, no. 25, 5546-5551.
- [14] L. Tilstra, M. C. Sattler, W. R. Cherry and M. D. Barkley: Fluorescence of a rotationally constrained tryptophan derivative, 3-carboxy-1,2,3,4-tetrahydro-2-carboline. *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, vol. 112, no. 25, 9176-9182.
- [15] W. J. Colucci, L. Tilstra, M. C. Sattler, F. R. Fronczek and M. D. Barkley: Conformational studies of a constrained tryptophan derivatives: Implications for fluorescence quenching mechanism. *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, vol. 112, no. 25, 9182-9190.
- [16] L. P. McMahon, W. J. Colucci, M. L. McLaughlin and M. D. Barkley: Deuterium isotope effects in constrained tryptophan derivatives: Implication for tryptophan photophysics. *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, vol. 114, no. 22, 8442-8448.
- [17] H. T. Yu, W. J. Colucci, M. L. McLaughlin and M. D. Barkley: Fluorescence quenching in indoles by excited-state proton transfer. *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, vol. 114, no. 22, 8449-8454.
- [18] H. T. Yu, M. A. Vela, F. R. Fronczek, M. L. McLaughlin and M. D. Barkley: Microenvironmental effects on the solvent quenching rate in constrained tryptophan derivatives. *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, vol. 117, no. 1, 348-357.

- [19] K. J. Willis, A. G. Szabo, M. Zukker, J. M. Ridgeway and B. Alpert: Fluorescence decay kinetics of the tryptophyl residues of myoglobin: effect of heme ligation and evidence for discrete lifetime components. *Biochemistry*, 1990, 29, 5270-5275.
- [20] E. A. Permyakov, A. V. Ostrovsky, E. A. Burstein, P. G. Pleshanov and Ch. Gerday: Parvalbumin conformers revealed by steady-state and time-resolved fluorescence spectroscopy. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1985, vol. 240, no. 2, 781-791.
- [21] S. J. Kim, F. N. Chowdhury, W. Stryjewski, E. S. Younathan, P. S. Russo and M. D. Barkley: Time-resolved fluorescence of the single tryptophan of *Bacillus Stearothermophilus* Phosphofructokinase. *Biophys. J.*, 1993, 65, 215-226.
- [22] R. Vos, Y. Engelborghs, J. Izard and D. Baty: Fluorescence study of the three tryptophan residues of the pore-forming domain of Colicin A using multifrequency phase fluorometry, *Biochemistry* 34 (1995) 1734-1743
- [23] Munro, I. Precht and L. Stryer: Subnanosecond motions of tryptophan residues in proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, 76, 56-60.
- [24] B. Albinsson, M. Kubista, B. Norden, and E. W. Thulstrup, *J. Phys Chem*, 1989, 93, 6646-6654
- [25] P. R. Callis, *Methods Enzymol.*, 1997, 278, 113-151.
- [26] M. C. Chang, J. W. Petrich, D. B. McDonald and G. R. Fleming: Nonexponential fluorescence decay of tryptophan, tryptophylglycine and glycytryptophan. *J. Am. Chem. Soc.*, 1983, 105, 3819-3824.
- [27] J. W. Petrich, M. C. Chang, D. B. McDonald and G. R. Fleming: On the origin of nonexponential fluorescence decay in tryptophan and its derivatives. *J. Am. Chem. Soc.*, 1983, 105, 3824-3832.
- [28] P. Demchenko, J. Gallay, M. Vincent. H.-J. Apell: Fluorescence heterogeneity of tryptophans in Na,K-ATPase: evidences for temperature-dependent energy transfer. *Biophys. Chem.* 1998, 72, 265-283.
- [29] K. Döring, L. Konermann, T. Surrey and F. Jähnig: A long lifetime component in the tryptophan fluorescence of some proteins. *Eur. Biophys. J.* 1995, 23, 423-432.
- [30] Grinvald and I. Z. Steinberg: The fluorescence decay of tryptophan residues in native and denatured proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1976, 427, 663-578.
- [31] W. B. de Lauder and Ph. Wahl: Fluorescence studies on human serum albumin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1971, 42, 398-402.
- [32] R. F. Chen and V. J. Koester: Fluorescence properties of human serum albumin: Effect of dialysis and charcoal treatment. *Analytical Chemistry* 1980, 105, 348-353.
- [33] B. D. Schlyer, J. A. Schauerte, D. G. Steel and A. Gafni: Time-resolved room temperature protein phosphorescence: nonexponential decay from single emitting tryptophans. *Biophys. J.* 1994, 67, 1192-1202.
- [34] Vix and H. Lami: Protein fluorescence decay: Discrete components or distribution of lifetimes? Really no way out of the dilemma? *Biophys. J.* 1995, 68, 1145-1151.

- [35] N. Rosato, E. Gratton, G. Mei and A. Finazzi-Agro: Fluorescence lifetime distributions in human superoxide dismutase: Effect of temperature and denaturation. *Biophys. J.* 1990, 58, 817-822.
- [36] J. R. Lakowicz and H. Cherek: Dipolar relaxation in proteins on the nanosecond timescale observed by wavelength-resolved phase fluorometry of tryptophan fluorescence. *J. Biological Chemistry* 1980, vol. no. 3, 255, 831-834.
- [37] J. R. Alcala, E. Gratton and F. G. Prendergast: Fluorescence lifetime distributions in proteins. *Biophys. J.* 1987, 51, 597-604.
- [38] J. R. Alcala, E. Gratton and F. G. Prendergast: Interpretation of fluorescence decays in proteins using continuous lifetime distributions. *Biophys. J.* 1987, 51, 925-936.
- [39] J. R. Alcala, E. Gratton and F. G. Prendergast: Resolvability of fluorescence lifetime distributions using phase fluorometry. *Biophys. J.* 1987, 51, 587-596.
- [40] R. W. Yip, Y. X. Wen and A. G. Szabo: Decay associated fluorescence spectra of coumarin 1 and coumarin 102: Evidence for a two-state solvation kinetics in organic solvents. *J. Phys. Chem.* 1993, 97, 10458-10462.
- [41] Lakowicz, J. R. et. al: Rotational freedom of tryptophyl residues in proteins and peptides, *Biochemistry*, 1983, 22, 1741-1752
- [42] Chen, L. X. Q. et. al: Dynamics simulation studies of apoazurin of *alcaligenes denitrificans*, *Biochemistry*, 1988, 27, 6908-6921
- [43] X. M. He and D. C. Carter, Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature* 1992, 358, 209-215.
- [44] F. G. Prendergast, M. Meyer, G. L. Carlson, S. Iida and J. D. Potter: Synthesis, spectral properties and use of 6-acryloyl-2-dimethylaminonaphtalene (Acrylodan), *J. Biol. Chem.* 1983, 258 (12) 7541-7544.
- [45] G. Weber and F. J. Farris: Synthesis and spectral properties of a hydrophobic fluorescent probe: 6-propionyl-2- dimethylaminonaphtalene. *Biochemistry*, 1979, 18, 3075-3078.
- [46] M. Lasagna, V. Vargas, D. M. Jameson and J. E. Brunet: Spectral properties of environmentally sensitive probes associated with horseradish peroxidase, *Biochemistry* 35 (1996) 973-979.
- [47] R. Wang and F. V. Bright: Rotational reorientation kinetics of dansylated bovine serum albumin, *J. Phys. Chem.* 97 (1993) 4231-4238.
- [48] A. Sytnik and I. Litvinyuk: Energy transfer to a proton-transfer fluorescence probe: Tryptophan to a flavonol in human serum albumin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996) 12959-12963.
- [49] F. Moreno, M. Cortijo and J. Gonzalez-Jimenez: The fluorescent probe prodan characterizes the warfarin binding site on human serum albumin, *Photochem. Photobiol.* 69(1) (1999) 8-15.
- [50] A. Sytnik and M. Kasha: Excited-state intramolecular proton transfer as a fluorescence probe for protein binding-site polarity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91, 8627-8630.

- [51] J. R. Lakowicz, F. G. Prendergast and D. Hogen: Fluorescence anisotropy measurements under oxygen quenching conditions as a method quantify the depolarizing rotations of fluorophores. Application to diphenylhexatriene in isotropic solvents and lipid bilayers. *Biochemistry*, 1979, 520-527.
- [52] E. K. Krasnowska, E. Gratton and T. Parasassi: Prodan as a membran surface fluorescence probe: Partitioning between water and phospholipid phases. *Biophysical J.*, 1998, 74, 1984-1993.
- [53] T. Hiratsuka: ATP-induced opposite changes in the local environments around Cys697 (SH2) and Cys707 (SH1) of the myosin motor domain revealed by the prodan fluorescence. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274, 29156-29163.
- [54] E. von Lippert: Spektroskopische Bestimmung des Dipolmomentes aromatischer Verbindungen im ersten angeregten Singulettzustand, *Z. Electrochem*, 1957, 61, 962-975.
- [55] N. G. Bakhsiev, Y. T. Mazurenko and I. V. Piterskaya: Luminescence decay in different portions of the luminescence spectrum of molecules in viscous solution. *Opt. Spectrosc.*, 1966, 21, 307-309.
- [56] N. G. Bakhsiev, Y. T. Mazurenko and I. V. Piterskaya: Relaxation effects in the luminescence characteristics of viscous solution. *Akad. Nauk. USSR, Bull. Phys. Sci.*, 1969, 32, 1262-1266.
- [57] Y. T. Mazurenko and N. G. Bakhsiev: Effect of orientation dipole relaxation on spectral time and polarization characteristics of luminescence of solutions. *Opt. Spectrosc.*, 1970, 21, 490-494.
- [58] A. P. Demchenko: Ultraviolet spectroscopy of proteins, Springer Verlag, Berlin, 1986
- [59] B. Bagchi, D. W. Oxtoby and G. R. Fleming: Theory of the time development of the stokes shift in polar media. *Chem. Phys.*, 1984, 86, 257-267.
- [60] X. Song, D. Chandler and R. A. Marcus: Gaussian field model of dielectric solvation dynamics. *J. Phys. Chem.*, 1996, 100, 11954-11959.
- [61] X. Song and D. Chandler: Dielectric solvation dynamics of molecules of arbitrary shape and charge distribution. *J. Chem. Phys.*, 1998, 108, 2594-2600.
- [62] R. M. Stratt and M. Maroncelli: Nonreactive dynamics in solution: The emerging molecular view of solvation dynamics and vibrational relaxation. *J. Phys. Chem.*, 1996, 100, 12981-12996.
- [63] A. Yoshimori: Nonlinear effects of number density of solvent molecules on solvation dynamics. *J. Chem. Phys.*, 1996, 105, 5971-5978.
- [64] M. V. Basilevsky and D. F. Parsons: An advanced continuum medium model for treating solvation effects: Nonlocal electrostatics with cavity
- [65] K. Seki: Reorientational dynamics of an electric dipole in fluctuating electric field. *J. Chem. Phys.*, 1996, 105, 4274-4283.
- [66] J. R. Lakowicz: Time-dependent rotational rates of excited fluorophores. Linkage between fluorescence depolarization and solvent relaxation. *Biophys. Chem.*, 1984, 19, 13-23.

- [67] L. Reynolds, J. A. Gardecki, S. J. V. Frankland, M. L. Horng and M. Maroncelli: Dipole solvation in nondipolar solvents. *J. Phys. Chem.*, 1996, 100, 10337-10354.
- [68] T. Fonesca and B. Ladanyi: Breakdown of linear response for solvation dynamics in methanol. *J. Phys. Chem.*, 1991, 95, 2116-2119.
- [69] T. Simonson, Ch. F. Wong and A. T. Brünger: Classical and quantum simulations of tryptophan in solution. *J. Phys. Chem. A*, 1997, 101, 1935-1945.
- [70] B. Bursulaya, D. A. Zichi and H. J. Kim: Molecular dynamic simulation study of polarizable solute solvation in water. I. Equilibrium solvent structure and solute rotational dynamics. *J. Phys. Chem.*, 1996, 100, 1392-1405.
- [71] B. M. Ladanyi and M. S. Skaf: Wave vector-dependent dielectric relaxation of methanol-water mixtures. *J. Phys. Chem.*, 1996, 100, 1368-1380.
- [72] M. S. Skaf and B. M. Ladanyi: Molecular dynamics simulation of solvation dynamics in methanol-water mixtures. *J. Phys. Chem.*, 1996, 100, 18258-18268.
- [73] N. Nandi and B. Bagchi: Ultrafast solvation dynamics of an ion in the γ -cyclodextrin cavity: The role of the restricted environment. *J. Phys. Chem.*, 1996, 100, 13914-13919.
- [74] C. P. Hsu, Y. Georgievskii and R. A. Marcus: Time-dependent fluorescence spectra of large molecules in polar solvents. *J. Phys. Chem. A*, 1998, vol. 102, no. 16, 2658-2666.
- [75] W. R. Ware, S. K. Lee, G. J. Brant and P. P. Chow: Nanosecond time-resolved emission spectroscopy: Spectral shift due to solvent-excited solute relaxation. *J. Chem. Phys.*, 1971, 54, 4729-4737.
- [76] V. Nagarajan, A. M. Brearley, T. J. Kang and P. F. Barbara: Time-resolved spectroscopic measurements on microscopic solvation dynamics. *J. Chem. Phys.*, 1987, 86, 3183-3196.
- [77] E. W. Castner, M. Maroncelli, G. R. Fleming: Subpicosecond resolution studies of solvation dynamics in polar aprotic and alcohol solvents. *J. Chem. Phys.*, 1987, 86, 109-1097.
- [78] T. O. Harju, A. H. Huizer and C.A. Varma: Non-exponential solvation dynamics of electronically excited 4-aminophthalimide in *n*-alcohols. *Chem. Phys.*, 1995, 200, 215-224.
- [79] E. Laitinen, K. Salonen and T. O. Harju: Solvation dynamics of 4-amino-N-methyl-phthalimide in *n*-alcohol solutions. *J. Chem. Phys.*, 1996, 104, 6138-6148.
- [80] E. Laitinen, K. Salonen and T. O. Harju: Solvation dynamics of 3-aminophthalimide in *n*-butanol solution at different temperatures. *J. Chem. Phys.*, 1996, 105, 9771-9780.
- [81] M Viard, J Gallay, M Vincent, O Meyer, B Robert, and M Paternostre: Laurdan solvatochromism: solvent dielectric relaxation and intramolecular excited-state reaction. *Biophys. J.*, 1997, 73, 2221-2234.
- [82] M. Vincent, J. Gallay and A. P. Demchenko: Dipolar relaxation around indole as evidenced by fluorescence lifetime distributions and time-dependence spectral shifts. *J. of Fluorescence*, 1997, 7, No. 1., 107S-110S.

- [83] W. C. Flory and G. J. Blanchard: Excitation energy-dependent transient spectral relaxation. *Applied Spectroscopy*, 1998, 52, 82-90.
- [84] M. J. van der Meer, H. Zhang, W. Rettig and M. Glasbeek: Femto- and picosecond fluorescence studies of solvation and non-radiativ deactivation of ionic styryl dyes in liquid solution. *Chem. Phys. Lett.*, 2000, 320, 673-680.
- [85] D. Toptygin and L. Brand: Spectrally- and time-resolved fluorescence emission of indole during solvent relaxation: a quantitative model. *Chem. Phys. Lett.*, 2000, 322, 496-502.
- [86] J. Daub, R. Engl, J. Kurzawa, S. E. Miller, S. Schneider, A. Stockmann and M. R. Wasielewski: Competition between conformational relaxation and intramolecular electron transfer within phenothiazine-pyrene dyads. *J. Phys. Chem. A*, 2001, 105, 5655-5665.
- [87] S. A. Kovalenko, N. E. König, T. A. Senyushkina and N. P. Ernsting: Charge transfer and solvation of betaine-30 in polar solvents. A femtosecond broadband transient absorption study. *J. Phys. Chem. A*, 2001, 105, 4834-4843.
- [88] Y. Nagasawa, A. Watanabe, Y. Ando and T. Okada: Solvent dependence of the ultrafast ground state recovery dynamics of phenol blue. *J. Mol. Liquids*, 2001, 90, 295-302.
- [89] L. Onsager, *J. Chem. Phys.*, 1936, 58, 1486
- [90] P. Debye: Polar molecules, Reinhold, New York, 1929
- [91] M. Maroncelli: The dynamics of solvation in polar liquids. *J. Mol. Liquids*, 1993, 57, 1-37.
- [92] E. W. Castner Jr. and Mark Maroncelli: Solvent Dynamics Derived from Optical Kerr Effect, Dielectric Dispersion, and Time-Resolved Stokes Shift Measurements: An Empirical Comparison, *J. Mol. Liquids*, 1998, 77, 1-36.
- [93] A. P. Demchenko and A. S. Ladokhin: Red-edge-excitation fluorescence spectroscopy of indole and tryptophan. *Eur. Biophys. J.*, 1988, 15, 369-379.
- [94] A. P. Demchenko: Red-edge-excitation fluorescence spectroscopy of single-tryptophan proteins. *Eur. Biophys. J.*, 1988, 16, 121-129.
- [95] A. P. Demchenko and A. S. Ladokhin: Temperatures-dependent shift of fluorescence spectra without conformational change in protein studies of dipole relaxation in the melittin molecules. *BBA*, 1988, 955, 352-360.
- [96] R. B. Macgregor and G. Weber: Fluorophores in polar media: Spectral effects of the Langevin distribution of electrostatic interactions. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1981, 366, 140-154.
- [97] A. Grinvald and I. Z. Steinberg: Fast relaxation process in a protein revealed by the decay kinetics of tryptophan fluorescence. *Biochemistry*, 1974, 13, 5170-5177.
- [98] J. R. Lakowicz and H. Cherek: Dipolar relaxation in proteins on the nanosecond timescale observed by wavelength-resolved phase fluorometry of tryptophan fluorescence. *J. Biological Chemistry*, 1980, vol. no. 3, 255, 831-834.
- [99] J. R. Lakowicz, H. Szmanski and I. Gryzynski: Picosecond resolution of indol anisotropy decay and spectral relaxation by 2 GHz frequency-domain fluorometry. *Photochem. Photobiol.*, 1988, 47, 31-41.

- [100] A. Sommer, F. Paltauf and A. Hermetter: Dipolar solvent relaxation on a nanosecond time scale in ether phospholipid membranes as determined by multifrequency phase and modulation fluorometry. *Biochemistry*, 1990, 29, 11134-11140.
- [101] D. W. Pierce and S. G. Boxer: Dielectric relaxation in a protein matrix. *J. Phys. Chem.*, 1992, 96, 5560-5566.
- [102] Z. Wasylewski, H. Koloczek, A. Wasniowska and K. Slizowska: Red-edge excitation fluorescence measurements of several two-tryptophan-containing proteins. *Eur. J. Biochem.*, 1992, 206, 235-242.
- [103] A. P. Demchenko, I. Gryczynski, Z. Gryczynski, W. Wiczk, H. Malak and M. Fishman: Intramolecular dynamics in the environment of the single tryptophan residue in staphylococcal nuclease. *Biophys. Chem.*, 1993, 48, 39-48.
- [104] K. Chu, R. M. Ernst, H. Frauenfelder, J. R. Mourant, G. U. Nienhaus and R. Philipp: Light-induced and thermal relaxation in a protein. *Phys. Rev. Lett.*, 1995, vol. 74, no. 13, 2607-2610.
- [105] R. Vos and Y. Engelborghs: Fluorescence study of the three tryptophan residues of the pore-forming domain of Colicin A using multifrequency phase fluorometry. *Biochemistry*, 1995, 34, 1734-1743.
- [106] S. J. Hagen and W. A. Eaton: Nonexponential structural relaxations in proteins. *J. Chem. Phys.*, 1996, 104 (9), 3395-3398.
- [107] R. R. Riter, M. D. Edington and W. F. Beck: Protein-matrix solvation dynamics in the α subunit of C-phycocyanin. *J. Phys. Chem.*, 1996, 100, 14198-14205.
- [108] N. A. Nemkovich, W. Baumann, Y. V. Kruchenok, H. Reis and A. N. Rubinov: Dipole moments of phenylnaphthylamine fluorescence probes and study of dielectric interactions in human erythrocyte ghosts. *J. Fluorescence*, 1997, 7, 363-370.
- [109] M. Vincent, A. M. Gilles, I. M. Li de la Sierra, P. Briozzo, O. Barzu and J. Gallay: Nanosecond fluorescence dynamic Stokes shift of Tryptophan in a protein matrix. *J. Phys. Chem. B*, 2000, 104 (47), 11286-11295.
- [110] S. K. Pal, D. Mandal, D. Sukul, S. Sen and K. Bhattacharyya: Solvation dynamics of DCM in human serum albumin. *J. Phys. Chem.*, 2001, 105, 1438-1441.
- [111] X. J. Jordanides, M. J. Lang, X. Song and G. R. Fleming: Solvation dynamics in protein environments studied by photon echo spectroscopy. *J. Phys. Chem. B*, 1999, 103, 7995-8005.
- [112] P. Changement-Barret, C. T. Choma, E. F. Gooding, W. F. DeGardo and R. M. Hochstrasser: Ultrafast dielectric response of protein from dynamics Stokes-shifting of coumarin in calmodulin. *J. Phys. Chem. B*, 2000, 104, 9322-9329.
- [113] S. Devanathan, S. Lin, M. A. Cusanovich, N. Woodbury and G. Tollin: Early photocycle kinetic behavior of the E46A and Y42F mutants of photoactive yellow protein: femtosecond spectroscopy. *Biophys. J.*, 2001, 81, 2314-2319.
- [114] C. Wan, T. Fiebing, O. Schiemann, J. K. Barton and A. H. Zewail: Femtosecond direct observation of charge transfer between bases in DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2000, 97, 14052-14055.

- [115] D. Zhong, A. Douhal and A. H. Zewail: Femtosecond studies of protein-ligand hydrophobic binding and dynamics: Human serum albumin. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2000, 97, 14056-14061.
- [116] C. Y. Ruan, V. A. Lobastov, B. M. Goodson and A. H. Zewail: Ultrafast diffraction and structural dynamics: The nature of complex molecules far from equilibrium. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2001, 98, 7117-7122.
- [117] D. Zhong, S. K. Pal, D. Zhang, S. I. Chan and A. H. Zewail: Femtosecond dynamics of rubredoxin: Tryptohan solvation and resonance energy transfer in the protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2002, 99, 13-18.
- [118] H. Kandori, Y. Furutani, S. Nishimura, Y. Shichida, H. Chosrowjan, Y. Shibata and N. Mataga: Excited-state dynamics of rhodopsin probed by femtosecond fluorescence spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.*, 2001, 334, 271-276.
- [119] N. Mataga, H. Chosrowjan, Y. Shibata, Y. Imamoto, F. Tounaga and F. Tanaka: Femtosecond fluorescence studies on ultrafast reaction dynamics of photoactive proteins. *J. Luminescence*, 2000, 87-89, 821-823.
- [120] Y. Hamanaka, h. Kurasawa, A. Nakamura, Y. Uchiyama, K. Marumoto and S. Kuroda: femtosecond transient absorption study of mercyanine J-aggregates. *J. Luminescence*, 2001, 94-95, 451-455.
- [121] E. Gratton and M. Limkeman: A continuously variable frequency cross-correlation phase fluorometer with picosecond resolution. *Biophys. J.*, 1983 44: 315-324.
- [122] M. Maroncelli, J. MacInnis, G. R. Fleming: Polar solvent dynamics and elektron transfer reactons. *Science*, 1989, 243, 1674-1681.
- [123] J. C. Brochon: Maximum Entropy Method of Data Analysis in Time Resolved Spectroscopy. *Methods Enxymol.*, 1994, 240, 262-311.
- [124] N. Nandi and B. Bagchi: Anomalous dielectric relaxation of aqueous protein solution. *J. Phys. Chem. A*, 1998, 102, 8218-8221.
- [125] S. Boresh and O. Steinhauser: Comments on „Anomalous dielectric relaxation of aqueous protein solution”. *J. Phys. Chem. A*, 2001, 105, 5507-5508.
- [126] R. Narazaki, T. Maruyama and M. Otagiri: Probing the cystein 34 residue in human serum albumin using fluorescence techniques. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1997, 1338, 275-281.
- [127] R. Wang, S. Sun, E. J. Bekos and F. V. Bright: Dynamics surrounding Cys-34 in native, chemically denaturated and silica-adsorbed Bovine Serum Albumin. *Anal. Chem.* 1995, 67, 149-159.
- [128] J. D. Jordan, R. A. Dunbar and F. V. Bright: Dynamics of acrylodan-labeled bovine and human serum albumin entrapped in a sol-gel-derived biogel, *Anal. Chem.* 1995, 67, 2436-2443.
- [129] J. S. Lundgren, M. P. Heitz and F. V. Bright: Dynamics of acrylodan-labeled bovine and human serum albumin sequestered within aerosol-OT reverse micelles. *Anal. Chem.* 1995, 67, 3775-3781.
- [130] A. M. Ingersoll, J. D. Jordan and F. V. Bright: Accessibility of the fluorescent reporter group in native, silica-adsorbed, and covalently attached acrylodan-labeled serum albumins. *Anal. Chem.* 1996, 68, 3194-3198.

- [131] J. S. Lundgren and F. V. Bright: Effects of surfactants on the dynamical behavior of acrylodan-labeled bovine serum albumin. *J. Phys. Chem.*, 1996, 100, 8580-8586.
- [132] K. Flora, J. D. Brennan, G. A. Baker: M. A. Doody and F. V. Bright: Unfolding of acrylodan-labeled human serum albumin probed by steady-state and time-resolved fluorescence methods. *Biophys. J.*, 1998, 75, 1084-1096.
- [133] W. G. J. Hol, L. M. Halie and C. Sander: Dipoles of the α -helix and β -sheet: their role in protein folding. *Nature*, 1981, 294, 532-536.

Saját közlemények

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

Folyóiratban:

A. Buzády, J. Erostyák, B. Somogyi:

Phase-fluorimetry study on dielectric relaxation of human serum albumin.

Biophys. Chem., 88 (2000) 153-163.

A. Buzády, J. Erostyák, B. Somogyi:

Phase-fluorimetry study on dielectric relaxation of acrylodan-labeled human serum albumin.

Biophys. Chem., 94/1-2 (2001) 75-85.

A. Buzády, J. Savolainen, J. Erostyák, P. Myllyperkiö, B. Somogyi and J. Korppi-Tommola:

Femtosecond transient absorption study of dynamics of acrylodan in solution and attached to human serum albumin

J. Phys. Chem. B, (2002) közlésre elküldve

Konferencia előadások és poszterek

Buzády A., Erostyák J., Somogyi B., Kozma L.:

Szub-n-s-os dipól relaxáció fehérjék oldataiban.

XXI. OLSK, Pécs, Hungary, 6-8 Oct. (1998)

Erostyák J., Buzády A.:

Pikoszekundumos fluoreszcencia spektroszkópia.

Fény-anyag kölcsönhatás, kvantumoptika. Tavaszi Iskola. Pécs, (1999) április 6-9., pp.109-117.

J. Erostyák, A. Buzády, B. Somogyi:

Limits and Artifacts of fitting of dipolar relaxation's parameters using series of exponentials.

6th International Conference on Methods and Applications of Fluorescence Spectroscopy. Paris, France. (1999), P28.

A. Buzády, J. Erostyák, B. Somogyi:

Dielectric relaxation of human serum albumin in aqueous and viscous solutions.

6th International Conference on Methods and Applications of Fluorescence Spectroscopy. Paris, France. (1999), P151.

Buzády A., Erostyák J., Somogyi B.:

Humán szérum albumin dipoláris relaxációja vizes és glicerines oldatokban.

XXII. OLSK, Pécs, Hungary, 19-21 Oct. (1999).

J. Erostyák, A. Buzády, B. Somogyi:

Time-resolved spectroscopy measurements by phase-fluorometer.

5th Symposium on Instrumental Analysis. Pécs, Hungary, 24-27 Oct. (1999).

Az értekezés témájához nem kapcsolódó egyéb közlemények:

Folyóiratban:

J. Erostyák, A. Buzády, I. Hornyák, L. Kozma:
Sensitized luminescence of $\text{Eu}^{3+}/\text{La}^{3+}$ /cinnamic acid mixed complex. Comparison to $\text{Eu}^{3+}/\text{Gd}^{3+}$ /cinnamic acid mixed complex.
J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry. 121 (1999) p. 43-48.

J. Erostyák, A. Buzády, I. Hornyák, L. Kozma:
Sensitized luminescence of $\text{Eu}^{3+}/\text{Gd}^{3+}$ /cinnamic acid mixed complex.
J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry. 115 (1998) p. 21-26.

M. Koós, I. Pócsik, J. Erostyák, A. Buzády:
Amorphous Carbon Luminescence; Excitation and Emission in a Broad Energy Range.
Journal of Non-Crystalline Solids., Vol.: 227-230, pp.: 579-582 (1998).

I. Hornyák, J. Erostyák, A. Buzády, A. Kaszás, L. Kozma:
Enhanced fluorimetric determination of samarium with dibenzoylmethane and diphenylguanidine by gadolinium.
Spec. Lett., 30(7), 1475-1783 (1997).

J. Erostyák, A. Buzády, A. Kaszás, L. Kozma, I. Hornyák:
Time-Resolved Study of Intramolecular Energy Transfer in Eu^{3+} , Tb^{3+}/β -diketone/o-Phenanthroline Complexes in Aqueous Micellar Solutions.
Proceedings of the International Conference on Luminescence and Optical Spectroscopy of Condensed Matter, Prague, Czech Republik, 18-23 aug. (1996).
J. of Lumin., 72-74, (1997) pp. 570-571.

J. Erostyák, A. Buzády, L. Kozma, I. Hornyák:
Time-resolved luminescence of Eu(III) /Thenoyltrifluoroacetone/Surfactant systems in aqueous solutions.
Spec. Lett., 28(3) (1995) pp.473-487

Konferencia előadások és poszterek

A. S. Ndao, J. Erostyák, A. Buzády, I. Hornyák, L. Kozma:
Luminescence properties of Eu^{3+}/QA and $\text{Eu}^{3+}/\text{DOQCA}$ complexes.
International Workshop on Spectroscopy and Applications. Dakar, Senegal. 14-18 Dec. (1998).

J. Erostyák, A. Buzády, I. Hornyák, L. Kozma:
Intra-, and intermolecular energy transfer processes in $\text{Eu}^{3+}/\text{La}^{3+}$ /Cinnamic acid complexes.
The Jablonski Centennial Conference. P97, p. 180., Torun, Poland, July 23-27 (1998).

J. Erostyák, A. Buzády, L. Kozma:
Intramolekuláris energia-átadás hatásfokának meghatározása termális lencse módszerrel.
3rd Symposium on Results of Hungarian Researches in Quantumelectronics, Budapest, Hungary, Oct. 30., (1997). P-51.

J. Erostyák, A. Buzády, I. Hornyák, L. Kozma, A. Kaszás:
Eu³⁺/Fahéjsav komplex lumineszcencia tulajdonságai por mintában.
XX. OLSI, Pécs, Hungary, 1-3 Oct. (1997). p. 219-223.

A. Buzády, L. Kozma, A. Kaszás, I. Hornyák, J. Erostyák:
Research of new analytical possibilities with time-resolved luminescence spectroscopy methods.
5th Symposium on Analytical Sciences, Nice, France, 2-4 June (1997), p. 47.

I. Hornyák, J. Erostyák, L. Kozma, A. Buzády, A. Kaszás:
Enhanced fluorimetric determination of samarium with dibenzoylmethane and diphenylguanidine by gadolinium.
4th Symposium on Instrumental Analysis, Graz, Austria, 20-23 May (1997), L8.

Erostyák J., Buzády A., Kaszás A., L. Kozma, I. Hornyák:
Az o-fenantrolin szerepe az Eu/TTA/o-fenantrolin komplexben lejátszó energiátadásban.
XIX. OLSI, Pécs, Hungary, 1-3 Oct. (1996).

Erostyák J., Buzády A., Kaszás A., Kozma L., Hornyák I.:
Európium(III)/TTA/Phenantrolin komplexek vizes micelláris oldataiban lejátszó energiátadási folyamatok időbontásos lumineszcencia vizsgálata.
XVIII. OLSI, Pécs, Hungary, 5-7 Oct. (1995). p. 75-80.

J. Erostyák, A. Buzády, L. Kozma, I. Hornyák, A. Kaszás:
Luminescence of Eu(III)/TTA/Surfactant systems.
XVII. OLSI, Pécs, Hungary, 4-6 Oct. (1994).

J. Erostyák, A. Buzády, L. Kozma, I. Hornyák:
Time-resolved luminescence of Eu(III)/Thenoyltrifluoroacetone complex in aqueous micellar solutions.
2nd Symposium on Results of Hungarian Researches in Quantumelectronics, Budapest, Hungary, Oct. 19., (1994), P43.