

HŐMÉRSÉKLET HATÁSA A TORMAGYÖKÉR PEROXIDÁZ AKTIVITÁSÁRA ÉS FLUORESZCENCIÁJÁRA

BAJUSZ TAMÁSNÉ*—VÁRKONYI ZOLTÁN**

Bevezetés

Az élő szervezetekben lejátszódó biokémiai reakciókat katalizáló enzimek másod-, harmad- és negyedleges szerkezete a reakciók során megváltozik. Ismeretes tény az is, hogy az enzimek aránylag enyhe hatásra (hő, sav, lúg, detergensok hozzáadása stb.) elveszthetik eredeti natív sajátosságait. A denaturáció alkalmával a fehérje gyakran kicsapódik az oldatból, egyes csoportok, amelyek az eredeti molekulában rejtve voltak, reakcióképesekké válnak, megszűnik a protein biológiai aktivitása [1]. A szerkezetváltozást több módszerrel vizsgálták, többek között az abszorpciós a fluoreszcencia jellemzőkben tapasztalható eltérések figyelemmel kíséréssel [2, 3].

Célunk az volt, hogy kapcsolatot keressünk a peroxidáz enzim (HRP) esetében a hőmérséklet hatására létrejött enzimaktivitás változás és fluoreszcencia intenzitásváltozás között.

A peroxidázról régen ismert, hogy egyike a leghőellenállóbb enzimnek. A peroxidázmaradékoknak tulajdonították a kellemetlen szag kifejlődését rosszul pasztörizált savanyítmányokban [4], és KAPLAN és mts-ai [5], valamint DASTUR és mts-ai [6] a peroxidáz aktivitását használták fel a savanyú gyümölcsök, mint alma, körte és meggy megfelelő termikus kezelése kritériumaként.

A peroxidázoknak igen fontos fiziológiai szerepük is van, mint ismeretes, általában katalizálják bizonyos vegyületek oxidálását peroxid segítségével. A magasabbrendű állatoknál és az embernél a létfontosságú jódozási reakciók jó modelljeül szolgál [7, 8, 9], citokémiai módszerekkel sikerült kimutatni, hogy pajzsmirigyben a tiroxin képződése helyén peroxidázok találhatóak [10], és hasonló mechanizmust írtak le tengeri algák esetében is [11].

A peroxidáz teljes szekvenciája ma még nem ismeretes. WELINDER és mts-ai [12] csak részben tárták fel az enzim aminosav sorrendjét, továbbá azt tudjuk, hogy egy fehérje és egy hem részből áll, mégpedig úgy, hogy a vas atom 6 koordinációs helye közül négygel a pirrol gyűrűk nitrogénjeihez kötődik. A fennmaradó két kötéssel kapcsolódik az apoproteinhez, minden jel szerint egy karboxil csoporton és egy hisztidin aminosav oldallánc imidazol gyűrűjén keresztül.

A HRP fontos biológiai, fiziológiai szerepe, ipari alkalmazása indokolttá teszi tulajdonságainak, így optikai tulajdonságainak is jobb megismerését. Vizsgálatához a fluoreszcenciás módszer azért is jelentős [13], mert gyors, kényelmes, kevés anyag felhasználásával [14,15] az objektum sérülése nélkül alkalmazható.

* Élelmiszeripari Gépek és Műveletek Tanszék

** JATE Biofizika Tanszék

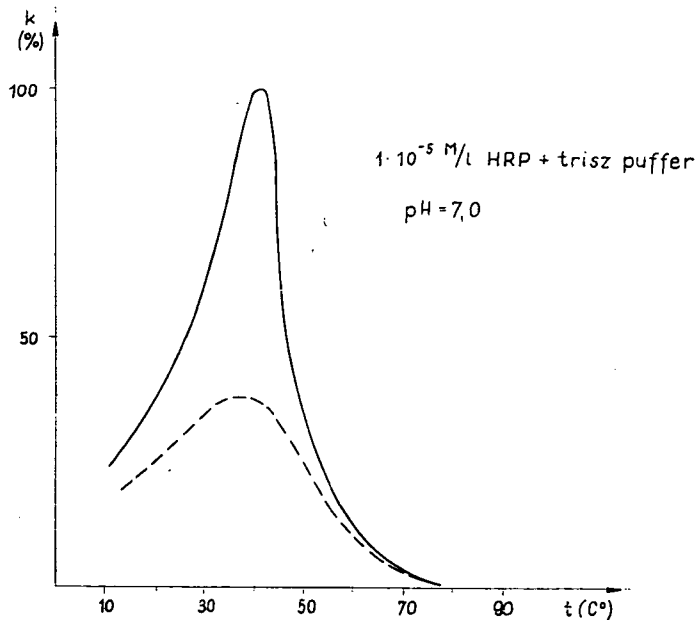
Vizsgált anyagok és kísérleti módszerek

Vizsgálatainkhoz Nutritional Biochemical Corporation (Cleveland) cég liofilizált, háromszor kristályosított tormagyökér peroxidáz készítményét használtuk. Ennek $1 \cdot 10^{-5}$ M/l koncentrációjú neutrális trisz pufferes oldatát vizsgáltuk 5—95 °C hőmérsékleti intervallumban. A fluoreszcencia színeképet a JATE Biofizika Tanszékén összeállított spektrofluoriméterrel [16], túlnyomórészt a gerjesztő fényre merőleges megfigyelés mellett temperálható küvetében vettük fel. A peroxidáz aktivitását [17] alapján vizsgáltuk spektrofotometrikan. Szubsztrát hidrogénperoxid, hidrogén donor a guajakol volt, termék pedig a tetra guajakol. Az aktivitásváltozással járó optikai denzitásváltozást egy Optica Milano CF4DR típusú spektrofotométeren 470 nm-nél figyeltük meg.

Mérési eredmények. Diskusszió

Mi a peroxidáz enzim aktivitását 10—90 °C hőmérsékleti tartományban határoztuk meg. Melegítéskor az enzim aktivitása növekedett egészen 38 °C-ig. Itt érte el a maximumot, amit 100%-nak vettünk. A hőmérséklet további növelésével az aktivitás egyre csökken és 75 °C-nál gyakorlatilag megszűnik. A 90 °C-ig felmelegített, majd lehűtött oldat 75 °C-nál kezd ismét aktív válni és 40 °C körül éri el a maximális aktivitást, amely az eredetinek mintegy 40%-a. Ez arra utal, hogy a peroxidáz a hőmérséklet hatására létrejött konformációs változás után is még jelentős biológiai aktivitással rendelkezik, amely a konformációs változás részben reverzibilis voltát igazolja. (1. ábra)

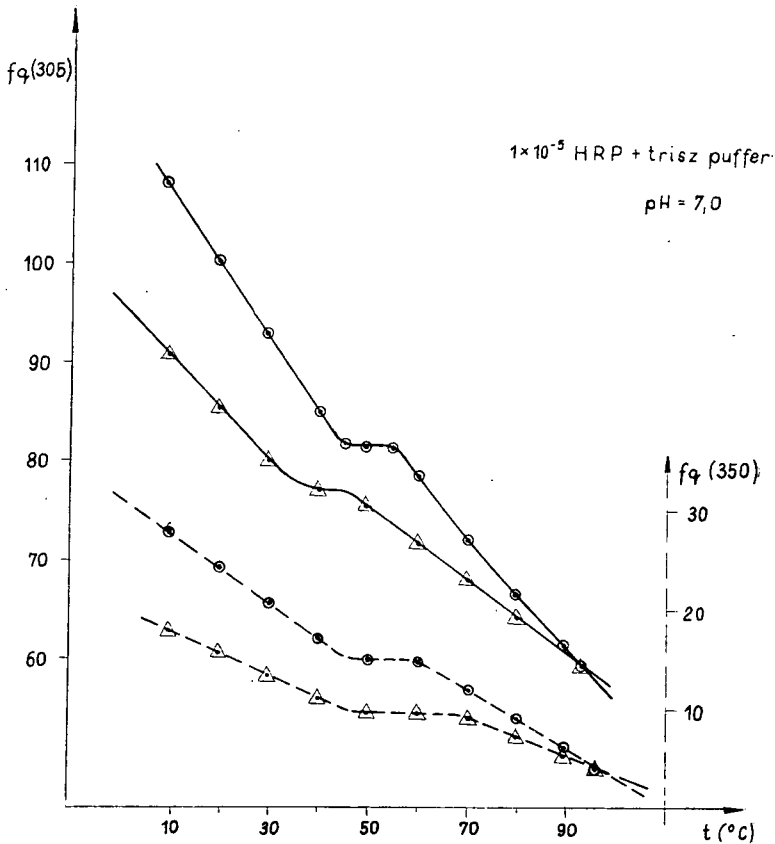
Ha a melegítést csak kb. 45 °C-ig végeztük, a visszahűtéskor kapott aktivitásértékek megegyeztek a melegítéskor kapott értékekkel.



1. ábra. A peroxidáz $1 \cdot 10^{-5}$ M/l koncentrációjú neutrális trisz pufferes oldatának aktivitási görbéje a hőmérséklet függvényében (— melegítés, --- hűtés)

Az enzimaktivitásmérésekkel párhuzamosan fluoreszcencia intenzitásméréseket is végeztünk. A [18] alapján megállapítást nyert, hogy annak ellenére, hogy a peroxidáz molekulában tirozin és triptofán is van, ha mindkét aminosav gerjesztődik, a tirozin fluoreszcencia intenzitása meglepően sokkal nagyobb, mint a triptofáné. A fluoreszcencia színepekben a 305 nm illetve 350 nm-es sávokat vizsgáltuk, melyek a tirozin illetve a triptofán fluoreszcenciájához rendelhetők. $\lambda_{gerj}=276$ nm-nél a 305 nm-es tirozin csúcsot, $\lambda_{gerj}=290$ nm-nél a 350 nm-es maximummal rendelkező triptofán fluoreszcenciát néztük a hőmérséklet függvényében. Mérési eredményeinket a 2. ábra mutatja.

A 305 nm-es maximumértékek nagysága kb. 45 °C-ig és 55 °C felett jelentősen csökken, a 45—55 °C tartományban pedig közel változatlan. Ugyancsak a fluoreszcencia intenzitások csökkenését tapasztaltuk 350 nm-nél is, bár itt a 45—60 °C hőmérsékleti tartományban tekinthetők a fluoreszcencia intenzitások gyakorlatilag változatlanok. Ehhez hasonló jelenséget tapasztaltak BARENBOIM és mts-ai [19] ribonukleáz esetén, amelyet a konformációs változásokor fellépő tirozil-karboxilát



2. ábra. A peroxidáz $1 \cdot 10^{-5}$ M/l koncentrációjú neutrális trisz pufferes oldatainak fluoreszcencia maximumai a fluoreszcencia színek két fő sávjának megfelelően a hőmérséklet függvényében (○ melegítéssel nyert adatok, △ 95 °C-ra felmelegített és visszahűtéssel nyert adatok)

hidrogén kötések felszakadásával értelmeznek. A görbék alapján úgy tűnik, hogy a konformációs változás már 40—45 °C-nál megkezdődik és hosszabb ideig tart.

Az intenzitások mérését a 90 °C-ra melegített oldat hűtéskor is elvégeztük. A hűtéskor kapott intenzitásértékek a melegítéskor kapott értékekhez hasonlóan változtak, de az eredeti értéknél alacsonyabbakat vettek csak fel.

A 45 °C-ról történő visszahűtéskor mért intenzitásértékek megegyeztek a melegítéskor felvett értékekkel.

Az aktivitás és fluoreszcenciaintenzitás mérései alapján megállapíthatjuk, hogy a fluoreszcenciaintenzitás — hőmérséklet görbe menetéből meg tudjuk határozni azt a hőmérsékleti intervallumot, ahol az enzim elveszti biológiai aktivitását, továbbá a hűtéskor kapott értékek reverzibilitásának mértékéből következtetni tudunk a konformációs átalakulás jellegére. Ezek az eredmények összhangban vannak azokkal, amelyeket GABEL és mts-ai [20] kimotripsinnél, valamint PERLMANN [21] pepszinnél oldat esetén tapasztalt.

A fluoreszcencia és enzimaktivitás mérési eredmények továbbá összhangban vannak az abszorpcióra [22], valamint az enzim tisztasági fokának a hőmérséklettől való függésére kapott eredményekkel [23]. Mindegyik módszerrel azt kaptuk, hogy a konformációs változások esetén a görbék menete megváltozott.

Összefoglalás

Peroxidáz-oldat esetében a párhuzamosan végzett fluoreszcencia és aktivitásmérések azt mutatták, hogy a 45 °C-ig történő melegítés után, amikor még nem jött létre konformációs változás, hűtéskor az aktivitás és a fluoreszcencia értékek is 100%-osan helyreálltak. A konformációs átmenet után, a hűtéskor kapott értékek eltérőek a melegítéskor kapott értékektől, de méréseink alapján megállapíthatjuk, hogy a fluoreszcencia intenzitások mérése az aktivitás mérésekkel kapcsolatban alkalmas eszköz a konformációs átmenet hőmérsékleti intervallumának és a folyamat jellegének a meghatározásához.

IRODALOM

1. Puskás A.: Biokémia és enzimológia. Tankönyvkiadó, Budapest, 1969.
2. Barenboim, G. M., Domanskii A. N., Turoverov K. K.: Luminescence of biopolymers and cells. Plenum Press, New York—London, 1969.
3. Konev, S. V.: Fluorescence and Phosphorescence of Proteins and Nucleic Acids. Plenum Press, New York, 1967.
4. Labbie, M. D., Esselen W. B.: Food Technol. 8, 50 (1954).
5. Kaplan, A. M., Esselen W. B.: Food Technol. 5, 110. (1951).
6. Dastur, K., Weckel K. G., Elbe J.: Food Technol. 22, 1177 (1968).
7. Björkstén, F.: Biochim. Biophys. Acta 212, 407. (1970).
8. Björkstén, F.: Biochim. Biophys. Acta 212, 396. (1970).
9. Björkstén, F.: Eur. J. Biochem. 5 (1), 133. (1968).
10. Strum, J. M., Karnovsky M. J.: J. Cell. Biol. 44, 655. (1970).
11. Murphy, M. J., Heocha C. O.: Biochem. J. 119, 21 (1970).
12. Wellinder, L. B., Smillie, L. B., Schonbaum G. R.: Canad. J. Biochim 50, 44. (1972).
13. Stryer, L.: Science 162, 526. (1968).
14. Brand, L., Witholt B.: Methods Enzymol. 11, 776 (1967).
15. Laurence, D. J. R.: Methods Enzymol. 4, 174 (1957).
16. Várkonyi Z.—Kovács K.: Acta Biochim et Biophys. Acad. Sci. Hung. 7, 89 (1972).
17. Methods in Food Analysis: Ed. by M. A. Joslyn Acad. Press, New York—London, 1970.
18. Várkonyi Z.—Szalay L.: Acta Biochim. et Biophys. Acad. Sci. Hung. (1974) (Megjelenés alatt).

19. Баречбойм, Г. М., Соколичко В. А., Турочеров К. К.: Цитология 10, 336 (1938)
20. Gabel, D., Steinberg I. Z., Katschalski E.: Biochemistry 10, 4661, (1971).
21. Perlmann, G.: Biopolymers Symposia, No 1, pp 383 (1964).
22. Várkonyi Z.—Kabók K.: Acta Biochim. et Biophys. Acad. Sci. Hung. (1974) (megjelenés alatt).
23. Bajuszné Kabók K.: Egyetemi doktori disszertáció (1974).

EFFECT OF TEMPERATURE ON ACTIVITY AND FLUORESCENCE OF HORSE RADISH PEROXIDASE

K. Bajusz and Z. Várkonyi

Parallel fluorescence and activity measurements on peroxidase solutions showed that after heating to 45 °C, when there was still no conformational change, the activity and fluorescence intensity values were retained 100% on cooling. After the conformational transition the values obtained on cooling differed from those obtained on heating, but our results indicated that the measurement of the fluorescence intensities, in agreement with the enzyme-activity measurements, is a suitable means of determining the temperature interval of the conformational transition and the irreversible or reversible nature of the process.

DER EINFLUSS DER TEMPERATUR AUF DIE PEROXYDASE AKTIVITÄT UND DIE FLUORESCENZ DER MERETTICHWURZEL

K. Bajusz—Z. Várkonyi

Parallel durchgeführte Fluoreszenz- und Aktivitätsmessungen in Peroxydaselösungen haben gezeigt, dass nach der Erwärmung bis zu 45 °C, wenn Konformationsänderungen noch nicht aufgetreten sind, beim Abkühlen die Aktivitätswerte und auch die Fluoreszenzintensitätswerte hundertprozentig wiederhergestellt werden. Nach dem Konformationsübergang weichen die beim Kühlen erhaltenen Werte von den bei der Erwärmung erhaltenen Werten ab, doch kann aufgrund unserer vorliegenden Messungen festgestellt werden, dass die Messung der Fluoreszenzintensitäten in unklarer Weise mit den Enzymaktivitätsmessungen ein geeignetes Mittel zur Bestimmung der Temperaturintervalle des Konformationsüberganges und des irreversiblen bzw. reversiblen Charakters des Vorganges darstellt.

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА АКРИВИЗАЦИЮ ПЕРОКСИДАЗЫ И ФЛЮОРЕСЦЕНЦИЮ КОРНЯ ХРЕНА

Т. Баюс, З. Варкони

В случае раствора пероксидазы проводимые параллельно измерения флюоресценции и активности показали, что при охлаждении после нагревания до 42°C, когда ещё не наступает конформационное изменение, показатели активизации и интенсивности флюоресценции также восстанавливаются на 100%. Показатели, полученные при охлаждении после конформационного перехода, отличаются от полученных при нагревании, но на основании наших измерений можно установить, что измерение интенсивности флюоресценции совместно с измерениями активности энзима может быть использовано для определения температурного интервала конформационного перехода и обратимого или необратимого характера процесса.