

# HŐMÉRSÉKLET HATÁSA A LIZOZIM FLUORESZCENCIÁJÁRA ÉS ENZIMAKTIVITÁSÁRA

BAJUSZ TAMÁSNÉ DR.\*—DR. VÁRKONYI ZOLTÁN\*\*

## *Bevezetés, irodalmi áttekintés*

Az élő szervezetekben végbemenő valamennyi folyamat speciális, az előre jellemző fehérjekatalizátorok, enzimek hatására folyik le. Így a proteinek közvetlenül szerepet játszanak minden ismert biológiai folyamatban, és ezzel a proteinek struktúrája és funkciója közötti kapcsolat a molekuláris biológia kutatásának egy érdekes és fontos területévé vált. E terület megközelítése számos biofizikai és biokémiai módszerrel lehetséges. A funkció és a szerkezet kapcsolata vizsgálatának egy fontos módszere a fluoreszcenciás vizsgálati mód, amely dinamikus, ugyanakkor érzékeny eszközt szolgáltat a proteinek állapotában, struktúrájában, mikrokozonyetében beálló változások tanulmányozásához, és bizonyos felvilágosítást képes adni a biokémiai folyamatok lefolyásáról is [1]. A fluoreszcenciás módszer előnye más módszerekkel szemben továbbá az, hogy gyors, kényelmes, kevés anyag felhasználásával az objektum sérülése nélkül alkalmazható. (Pl. Perlmann [2.] 1%-os pepszinogén oldatot használt az optikai forgatás tanulmányozásához, és mindössze 0,025%-os oldatot a fluoreszcencia tanulmányozására.)

Az enzimek esetében a hőmérséklettől való függés ismerete és vizsgálata azért jelentős, mert az enzimek biológiai hatását, működését minden olyan fizikai jellemző befolyásolja, amely rájuk, mint fehérjemolekulákra hatással van. A hőmérséklet emelésével pedig a proteinek könnyen elveszthetik eredeti, nativ tulajdonságaikat, olyan konformációs változások jöhetnek létre, amelyek után a fehérjék már biológiai aktivitással nem rendelkeznek [3.].

Vizsgálati anyagul a lizozimet választottuk, amely megtalálható a tyúktojás fehérjében, de előfordul az élő szervezet különböző váladékaiban, pl. könny, nyál, stb. [4.] is. A glikozidázok közé tartozik, amelyekre jellemző, hogy a glikozidokban, az összetett cukrokban és a poliszaharidokban előforduló glikozidkötést hasítják fel vízfelvétel közben [5.]. A lizozim, amely ezen enzimek közül kiténik magas hőstabilitásával, acetilaminopoliszaharidokat hidrolizál [4, 5.]. Iparban több helyen is használják pl. az élesztőből történő enzimmányozásnál. Minthogy az invertáz és a laktáz endo-enzimek, ezek csak a sejtek elroncsolása (pl. dörzsölés) vagy autolízise után hozzáférhetőek, sejteltárasra lizozimet is használnak [5.].

A lizozim fluoreszcencia jellemzőinek hőmérséklet okozta változásával több szerző foglalkozott. Gally és Edelman [6.] eredményeivel megegyezően Joly [7.],

\* Élelmiszeripari Műveletek és Gépek Tanszék

\*\* JATE Biofizika Tanszék

Turoverov és munkatársai [8.], Konev [9.] és Chen [10.] is arra a megállapításra jutottak, hogy a lizozim fluoreszcenciájának termikus kioltási görbéje 15°—55 °C-ig pH 2,3 és 6,4 között majdnem lineáris, sőt [11.] függetlennek találták pH 6,04 és 8,5 között is. A fluoreszcencia intenzitás hőmérséklettel való változásának lineáris volta összhangban van azzal, hogy ebben a pH tartományban a hőmérséklet-emelkedés nem eredményez strukturális változást [12., 13.]. Ebben a tartományban a változások reverzibilisnek mutatkoztak.

Célunk az volt, hogy a tanulmányozott enzim esetében együtt vizsgáljuk a fluoreszcencia spektrumot és az enzimaktivitást, és a jellemzők alapján vonjunk le következtetést a konformációs átalakulás hőmérsékleti intervallumáról, az átmenet reverzibilitásáról és meghatározzuk az átmenet termodinamikai paramétereit.

### *Vizsgált anyagok és kísérleti módszerek*

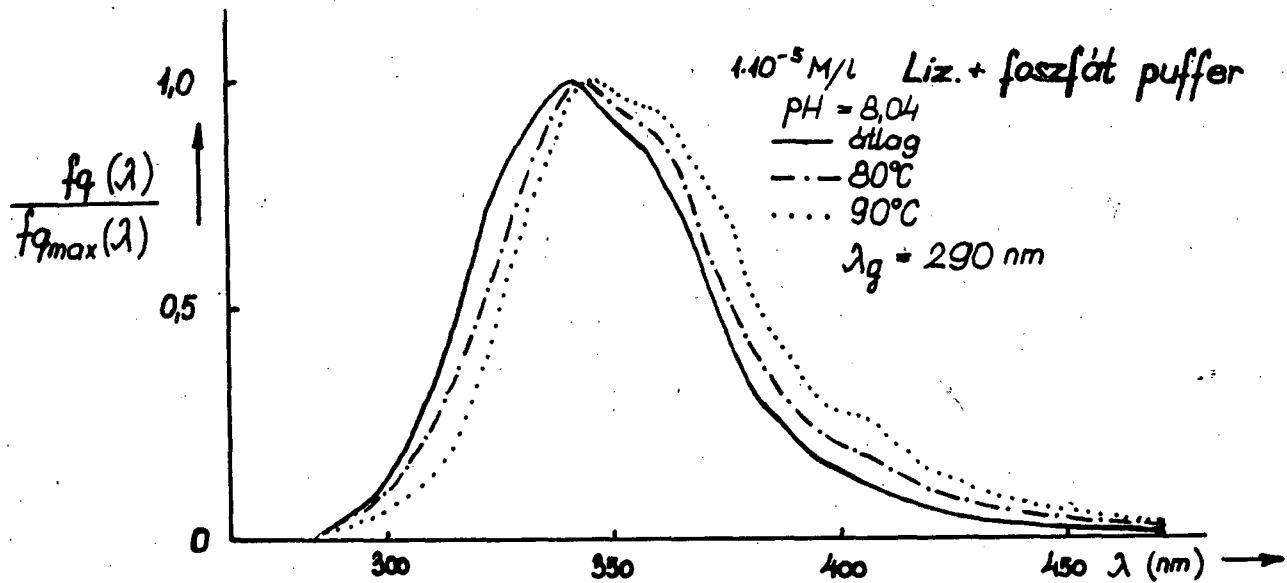
Vizsgálatainkhoz Nutritional Biochemical Corporation (Cleveland) cég lizozim készítményét használtuk, amely háromszor kristályosított 6000—10 000 egység/mg aktivitású. Aminosav szekvenciája és szerkezete jól ismert [14.], fluoreszcenciájára viszonylag sok irodalmi adat is a rendelkezésünkre állt, sőt fluoreszcencia jellemzőinek a változását is vizsgálták már bizonyos hőmérsékleti tartományban és pH értékek esetén [6., 11., 10., 8., 7., 15.].

A fluoreszcencia színeket a JATE Biofizika Tanszékén összeállított spektrofotométerrel [14.], túlnyomórészt a gerjesztő fényre merőleges megfigyelés mellett temperálható küvettában vettük fel.

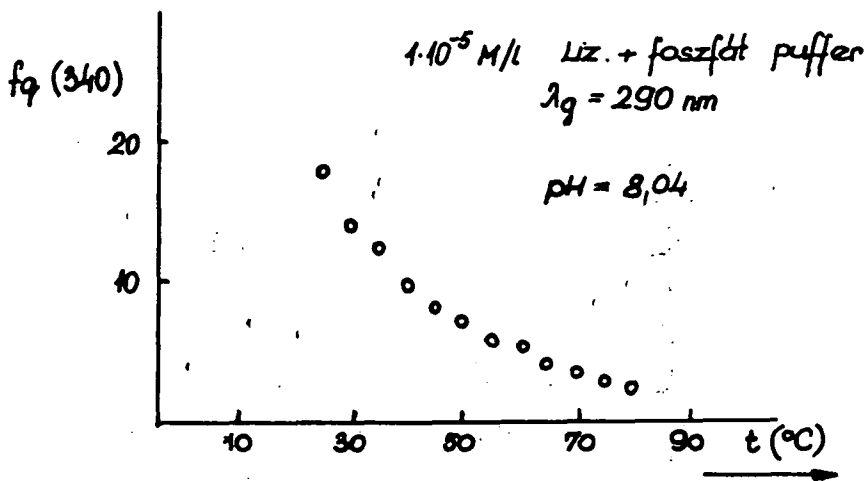
A lizozim aktivitását spektrofotometrikan vizsgáltuk [16.]. Szubsztrátként *Micrococcus Lysodeikticus* (Worthington Biochemical Corporation, Freehold, New Jersey) készítményt használtunk. Az aktivitásváltozással járó optikai denzitásváltozást egy Optica Milano CF4DR típusú spektrofotométeren 650 nm-nél figyeltük meg. A mérés során az oldat melegítése folyamatosan történt. A leolvasást mindig akkor végeztük, amikor az oldat a küvettában felvette a kívánt hőmérsékletet. A 90 °C hőmérséklet elérése után az oldatot azonnal hűteni kezdtük.

### *Mérési eredmények, diszkusszió*

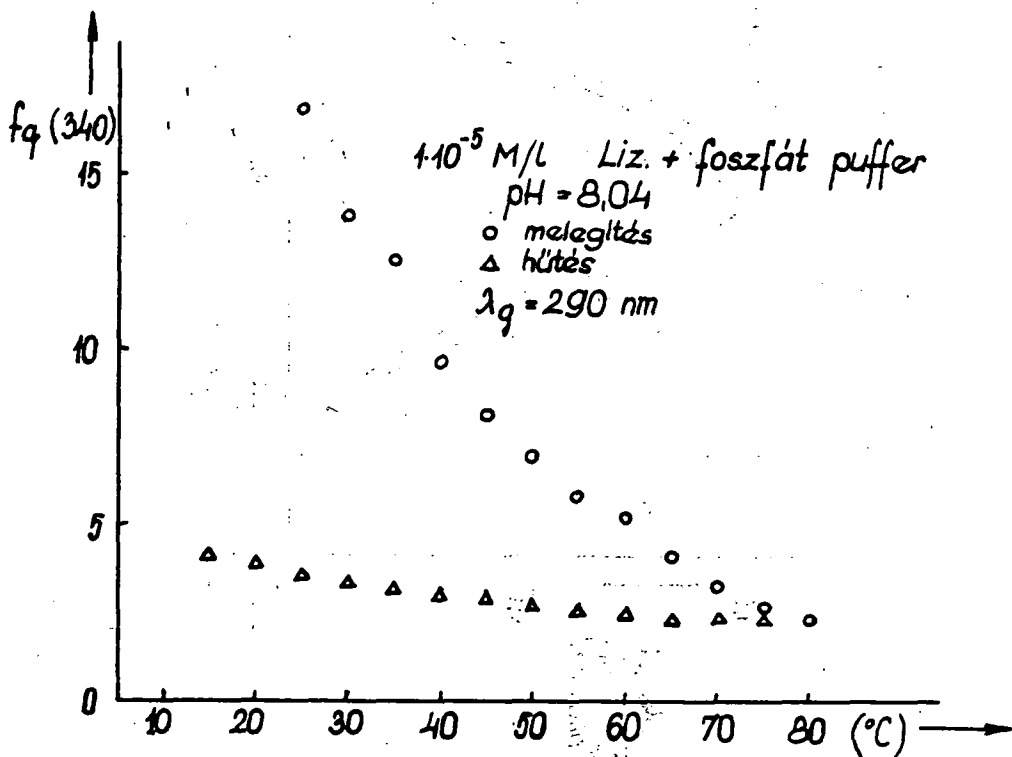
Meghatároztuk a lizozim-oldat fluoreszcencia színeket 10—90 °C hőmérsékleti intervallumban úgy, hogy a hőmérsékletet 5 °C-onként emeltük. Az  $1 \times 10^{-5}$  M/l koncentrációjú lizozim oldat (pH=8,04) emissziós színeket ( $\lambda_{gerj}=290$  nm) az 1. ábra mutatja. A hőmérséklet emelése során azt tapasztaltuk, hogy kb. 50 °C-ig melegítve az oldatokat a spektrális eloszlás jelentősen nem változott. Magasabb hőmérsékleten azonban eltérés mutatkozott a spektrális eloszlásban és csekély mértékű maximum eltolódás is tapasztalható a hosszabb hullámok felé. A spektrum hosszuhullámú eltolódása Barenboim és munkatársai [17.] által a tripszinre talált eredményekhez hasonlóan arról tanúskodik, hogy a triplofán maradványok, amelyek a nativ makromolekulánál hidrofób környezetben vannak, átmenet következtében az oldószer számára hozzáférhetővé válnak, és ez a makromolekulák szétszakadásáról tanúskodik. Másrészt oka lehet az is [18.], hogyha a makromolekula rezgési energiája jelentősen megnő, és az intramolekuláris kötések a hőmérséklet emelése következtében meggyengülnek, a gerjesztés pillanatában létrejöhét a molekula denaturációja, vagy a molekula más nagyobb potenciális energiának megfelelő módosulatba mehet át. A spektrum enyhe kiszélesedése pedig kapcsolatban lehet a tirozin maradványok hatásának megnövekedésével a fluoreszcencia spektrumban [17.].



1. ábra.  $1 \times 10^{-5} \text{ M/l}$  koncentrációjú foszfát pufferes (pH 8,04) lizozim oldat relatív emissziós színeképei különböző hőmérsékleteken 290 nm-es gerjesztésnél



2. ábra.  $1 \times 10^{-5} \text{ M/l}$  koncentrációjú foszfát pufferes (pH 8,04) lizozim oldat fluoreszcencia maximumai önkényes egységben a hőmérséklet függvényében 290 nm-es gerjesztésnél



3. ábra. A lizozim  $1 \times 10^{-5} \text{ M/l}$  koncentrációjú pH 8,04-es foszfát pufferes oldatának fluoreszcencia maximumai a hőmérséklet függvényében (○-melegítéssel nyert adatok, △-90 °C-ra felmelegített és visszahűtéssel nyert adatok)

A 80–90 °C-ra felmelegített, majd lehűtött oldatok fluoreszcencia spektrumainak alakja hasonló volt a melegítéskor kapottakéhoz.

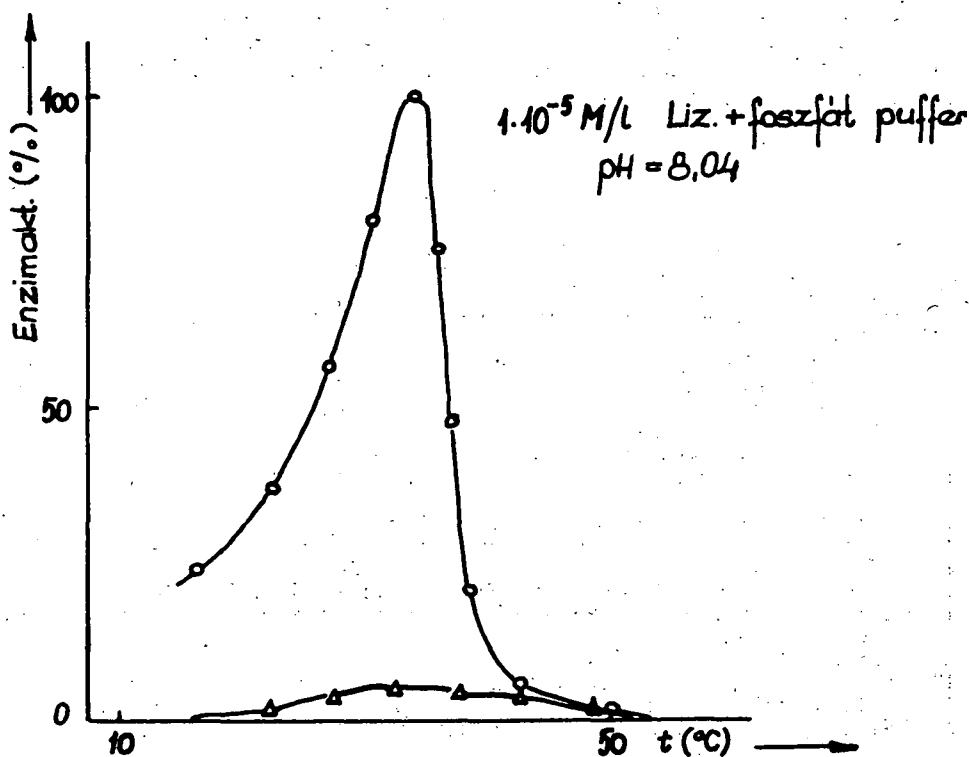
A fluoreszcencia spektrumokat úgy is felvettük, hogy az 50 °C-ra melegített oldatokat hűtöttük le. A hűtve, illetve melegítve felvett spektrumok alakjában nincs különbség.

A 290 nm-nél gerjesztett fluoreszcencia spektrumok maximumai a hőmérséklet növelésével jelentősen csökkentek (2. ábra). Ez a csökkenés kb. 40–45 °C-ig monoton itt az egyenes iránytényezője –0,9. Kb. 40–45 °C-nál a görbe iránya és meredeksége megváltozott, az iránytényező most –0,4.

Melegítéskor a fluoreszcencia intenzitás jelentősen csökkent (3. ábra), míg visszahűtéskor csak csekély mértékben növekszik. Visszahűtéskor az intenzitás jóval kisebb, mint ugyanazon a hőmérsékleten melegítéskor volt. A visszahűtés és a melegítés közötti különbség a hő okozta irreverzibilis változásról tanúskodik.

A fluoreszcencia 340 nm-nél mért intenzitása megegyezett a melegítéskor kapott értékekkel. Tehát 50 °C-ig a melegítés hatására az enzimből maradó változás nem következett be, azaz a változás reverzibilis, eltérően a magasabb hőmérsékletre történő melegítéstől. Az 50 °C-ról történő visszahűtéskor kapott eredmények arról tanúskodnak, hogy ebben a hőmérsékleti intervallumban tisztán hőmérsékleti kioltással van dolgunk.

Az emisszióméréssel párhuzamosan meghatároztuk az  $1 \times 10^{-5}$  M/l koncentrációjú és 8,04 pH-jú lizozimoldat aktivitását is %-ban, a hőmérséklet függvényében (4. ábra).



4. ábra. A lizozim  $1 \times 10^{-5}$  M/l koncentrációjú foszfát pufferes (pH 8,04) oldatának aktivitási görbéje a hőmérséklet függvényében (—○— melegítés, —△— hűtés)

Az aktivitás kb. 35 °C-nál éri el a maximumát, 10—35 °C-ig jelentős növekedést 35 °C felett pedig nagymértékű csökkenést mutat a hőmérséklet emelésekor. Az enzim 60 °C környékén már teljesen inaktívvá válik. Az oldat visszahűtésekor mért értékek — bár csekély mértékben — 35 °C-ig szintén növekednek, majd csökkennek, de a hűtés után kapott maximális aktivitás értéke a melegítéskor kapott maximum értéknek csupán 5%-a.

Az aktivitás és a fluoreszcencia intenzitás mérései alapján megállapíthatjuk, hogy a fluoreszcencia intenzitás — hőmérséklet görbe menetéről meg lehet határozni azt a hőmérsékleti intervallumot, ahol az enzim elveszti biológiai aktivitását. A hűtéskor kapott értékek reverzibilitásának mértékéből pedig következtetni tudunk a konformációs átalakulás jellegére. Ezek az eredmények összhangban vannak azokkal, amelyeket Gabel és munkatársai [19.] kimotripsinnél, valamint Perlmann [2.] pepszinogén oldat esetében tapasztaltak.

### Összefoglalás

Párhuzamosan végzett fluoreszcencia és aktivitásmérések azt mutatták, hogy a lizozim oldat aktivitásának és fluoreszcencia intenzitásának az értéke teljesen helyreáll, ha az oldatot 50 °C-ig történő melegítés után hűtjük. Ekkor még nem jött létre konformációs változás. Az 50—90 °C tartományban a változások irreverzibilisek. A fluoreszcencia intenzitásmérése és összevetése az aktivitás mérésekkel alkalmas eszköz a konformációs átmenet hőmérsékleti intervallumának és a folyamat jellegének a tanulmányozására.

### IRODALOM

1. *Styer, L.*: Science 162, 526, (1968)
2. *Perlmann, G. E.*; Biopolymers Symposia No. 1 pp 383 (1964)
3. *Straub F. B.*; Biokémia Medicina Könyvkiadó, Bp., 1961.
4. *Rapoport, S. M.*; Medizinische Biochemie, VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, 1969.
5. *Dr. Tolnay P.*; Ipari enzimológia. Műszaki Könyvkiadó, Bp., 1963.
6. *Gally, J. A., Edelman, G. H.*: Biochim. Biophys. Acta 60, 499, (1962)
7. *Жоли, М.*: „Физическая химия денатурации белков,” Мир, Москва, 1968.
8. *Barenboim, G. M., Domanskii A. N., Turoverov K. K.*: „Luminescence of biopolymers and cells” Plenum Press, New York—London, 1969.
9. *Konev, S. V.*: Dok. Akad. Nauk. SSSR 116, 594, (1957)
10. *Chen, R. F.*: „Fluorescence: Theory, Instrumentation and Practice” M. Dekker, Inc. New York, 1967.
11. *Steiner, R. F., Edelhoch G. H.*; Biochim. Biophys. Acta 66, 341, (1963)
12. *Donovan, J., Laskowski M., Jr and H. A. Scheraga*: J. Am. Chem. Soc. 82, 2154, (1960)
13. *Tanford, C., Wagner M.*; J. Am. Chem. Soc. 76, 3331, (1954)
14. *Várkonyi Z.—Kovács K.*; Acta Biochim. et Biophys. Acad. Sci. Hung. 7, (1972)
15. *Konev, S. V.*: Fluorescence and Phosphorescence of Proteins and Nucleic Acids. Plenum Press, New York, 1967.
16. *Schugar, D.*; Biochim. Biophys. Acta 8, 302, (1952)
17. *Баренбойм, Г. М., Соколенко, В. А., Туреверов, К. К.*: Цитология 10, 636, (1968)
18. *Ljovsin, V. L.*; Folyékony és szilárd anyagok fotolumineszcenciája. Akadémiai Kiadó, Bp., 1956.
19. *Gabeli D., Steinberg I. Z., Katschalki E.*: Biochemistry 10, 4661, (1971)

## EFFECT OF TEMPERATURE ON THE FLUORESCENCE AND ENZYMIC ACTIVITY OF LYSOZYME

*K. Bajusz and Z. Várkonyi*

Parallel measurements of fluorescence and activity showed that the values of the activity and the fluorescence intensity of a lysozyme solution were fully restored if the solution was cooled after heating to 50 °C; no conformational change had as yet taken place. In the range 50—90 °C the changes were irreversible. Measurement of the fluorescence intensities and their comparison with activity measurements is a suitable means of studying the temperature interval of the conformation transition and the nature of the process.

## DER EINFLUSS DER TEMPERATUR AUF DIE FLUORESCENZ UND ENZYMAKTIVITÄT DES LYSOZYM

*K. Bajusz—Z. Várkonyi*

Parallel angestellte Fluoreszenz- und Aktivitätsmessungen haben gezeigt, dass die Aktivität und Fluoreszenzintensitätswerte der Lysozymlösung vollkommen wiederhergestellt werden, wenn die Lösung nach Erwärmen auf 50 °C gekühlt wird. Zu dieser Zeit ist noch keine Konformationsänderung eingetreten. Im Temperaturbereich von 50—90 °C sind die Veränderungen irreversibel. Die Messung der Fluoreszenzintensitäten und ihr Vergleich mit den Aktivitätsmessungen stellen ein geeignetes Mittel zum Studium des Temperaturintervalles des Konformationsüberganges und des Charakters des Vorganges dar.

## ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА ФЛУОРЕСЦЕНЦИЮ ЛИЗОЗИМА И АКТИВНОСТЬ ЭНЗИМА

*Т. Байус—З.—Варкони*

Проводимые параллельно измерения флуоресценции и активности свидетельствуют о том, что показатель активности раствора лизозима и интенсивности флуоресценции полностью восстанавливаются, если после подогревания до 50 °C раствор лизозима подвергался охлаждению, так как при этом ещё не произошло изменение конформации. В области температур от 50 до 90 °C изменения уже необратимы. Измерения интенсивности флуоресценции и сопоставление их с измерениями активности является одним из целесообразных путей исследования температурного интервала и характера процесса конформационного обращения (перехода).