

CANDIDA BOIDINIIBŐL IZOLÁLT ALKOHOL OXIDÁZ VIZSGÁLATA

Egyetemi doktori értekezés

Készítette: Dorgai László

Készült a JATE Biokémiai Tanszékén

Szeged, 1979



TARTALOMJEGYZÉK

	Oldal
Rövidítések	ii
I. Bevezetés	1
II. Anyagok és módszerek	9
III. Kisérleti rész	
1. Enzimmtisztítás	13
2. Az alkohol oxidáz tulajdonságai	
2/a A tisztított enzim spektruma	19
2/b Az aktivitás pH-függése	19
2/c Szubsztrátspecifitás	20
2/d Az enzim alegységmolsulya	20
2/e Az alkohol oxidáz hőinaktiválódása	21
2/f A pH hatása a 30 °C-on mért inaktiválódásra	22
2/g A disszociáció és az enzim aktivitásának összefüggése	24
2/h Az alkohol oxidáz aktiv formái	28
2/i A NaCl hatása az aktiválódási lépésre és az aktiv formák arányára	29
2/j A többszörös aktiv forma oka	30
2/k Az alkohol oxidáz és a kataláz kölcsönhatása	32
2/l Az SH-csoportok szerepe az AO stabilitásában	34
IV. A kísérletek összefoglalása és megbeszélés	37
V. Irodalomjegyzék	43
Köszönetnyilvánítás	iii



RÖVIDÍTÉSEK

AO	alkohol oxidáz E.C. 1.1.3.13.
BSA	marha szérumalbumin
cit.c <sub>1</sub>	citokróm c <sub>1</sub>
d	dalton
DAO	D-aminosav oxidáz EC. 1.4.3.3.
DEAE	dietil-aminoetil
DTNB	5,5'-ditio-bis-nitrobenzoát
E, ΔE	extinkció, extinkcióváltozás
EDTA	etiléndiamintetraecetsav.Na <sub>2</sub>
FAD	flavin adenin dinukleotid
GAPD	glicerinaldehid-3P dehidrogenáz
Gly	glicin
HAO	L-α-OH-sav oxidáz EC.1.1.3.a
IAA	monojódacetamid
IES	monojódecetsav
k, k <sup>#</sup> , k <sup>##</sup>	sebességi állandó, látszólagos sebességi állandó
KAT	kataláz EC.1.11.1.6.
K <sub>M</sub>	Michaelis állandó
NAD	nikotinsavamid adenin dinukleotid
NEM	N-etil-maleimid
PAGE	poliakrilamid gélelektroforézis
PCMB	p-Cl merkuri-benzoát
PEG	polietilénlikol
SDS	Na-dodecilszulfát
Seph	Sephadex ill. Sepharose
Tris	Tris /hidroximetil/aminometán
V <sub>m</sub>	maximális sebesség

## I. B E V E Z E T É S

A hatvanas évek második felében és a hetvenes évek elején az a felismerés, hogy a világ fehérjeprodukcója nem képes, és a jövőben még inkább nem lesz képes fedezni a rohamosan növekvő szükségleteket, sürgetővé tette új fehérjeforrások feltárását és új, nagytermelékenységű technológiák kidolgozását. Több járható ut is kínálkozott, az új, nagytermelékenységű és nagyobb fehérjetartalmu gabonafajták tömeges elterjesztésétől kezdve az ipari és mezőgazdasági hulladékok és melléktermékek mikrobiális úton történő fehérjévé való átalakításán át a földgáz, illetve a kőolaj fehérjévé való - szintén mikrobiális - konverziójáig.

Az utóbbi lehetőség - természetesen az első kettő létjogosultságát nem kizárva - számos előnnyel kecsegtetett, amelyek közül talán a legjelentősebbek a következők:

- a termelés ipari technológiával történhet
- független az időjárástól, ezért kedvezőtlen mezőgazdasági években sem csökken a termelése
- az alapanyagellátás nem szezonális, hanem folyamatos

Ekkor már számos, metánt, illetve paraffinokat hasznosítani képes baktériumot ismertek /36/ így a technológiák kidolgozásához minden objektív feltétel, beleértve az akkor még alacsony kőolajárakat is, adott volt. Természetesen az említett előnyökön kívül számos hátrány, illetve nehézség is jelentkezett, pl. a metán gyenge vizoldhatósága és veszélyessége, illetve az, hogy számolni kellett a kőolajon, vagy tisztított paraffinfrakciókon

növő sejtekből készített fehérjekoncentrátumok karcinogén hatásának veszélyével. Ehhez párosult az a szubjektív tényező is, hogy a baktérium eredetű fehérjét nehéz volt a felhasználókkal elfogadtatni.

A nehézségeket természetesen ki lehet kerülni pl. úgy, hogy szénforrásként metanolt használnak, illetve az élelmiszeriparban már régóta használt - és a közvélemény által mind emberi táplálkozásra, mind takarmányozásra elfogadott - élesztőgombákkal helyettesítik a baktériumokat. Megindult tehát a kutatás a metanolt hasznosítani képes élesztőgombákkal is.

Az említett okok indokolták a számításba jövő mikroorganizmusok mikrobiológiai és biokémiai vizsgálatát, a lehető legjobb hozamot biztosító eljárások kidolgozására, illetve az anyagcsereutak és az ezekben résztvevő enzimek megismerésére.

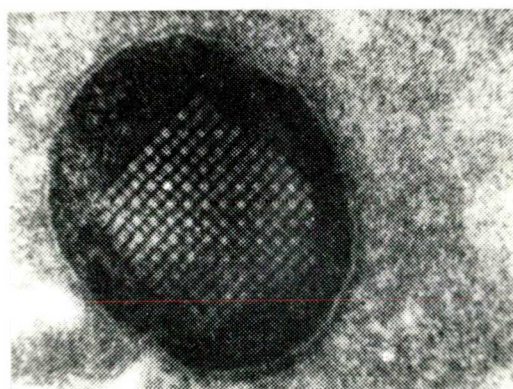
Az első beszámolót egy metanolt hasznosítani képes *Kloecera* faj izolálásáról Ogata és mtsi. közölték 1970-ben /36/. A metanol asszimilálásában kulcsszerepet játszó alkohol-oxidázt /E.C.1.1.3.13./ azonban ettől a kutatástól függetlenül F.W. Jansen R.M. Kerwin és H.W. Ruelius véletlenül fedezték fel néhány évvel korábban, 1965-ben, egy, a Basidiomicetes csoporthoz tartozó gomba glükóz-oxidázának vizsgálata közben /1/. Az enzimet frakcionált kicsapással tisztították és kristályos formában is izolálták. Az így előállított enzim molekulaszúlyát 300 000 d-nál nagyobbak találták Sephadex G-200-as kromatográfiával, prosz-tetikus csoportjaként a FAD-ot azonosították. Az aktivitás pH-optimumát pH 6,5-9,0 között adták meg, a stabilitását pH 7,0 és 9,0 között állandónak találták. Alacsonyabb pH-értékeken az enzim aktivitása és stabilitása gyorsan lecsökkent. Megállapi-

tották, hogy 1  $\mu$ mol metanolból 1  $\mu$ mol  $H_2O_2$  és 1  $\mu$ mol formaldehid képződik a reakció során. Legjobb szubsztrátnak a metanolt találták, a szénlánc növekedésével a  $K_M$  értékek a különböző n-alkoholokra rohamosan nőttek /2/.

Y. Tani és mtsi. izolálták a Kloeckera N<sup>o</sup> 2201 törzsből a metanolasszimiláció kulcsenzimét, ami oxidáznak bizonyult és szintén FAD volt a prosztetikus csoportja. Az enzim alapvető jellemzését is elvégezték /3,4/, ami alapján az nagyon hasonlónak bizonyult az F.W.Jansen által izolált enzimhez, bár részleteiben eltért attól. Ezt követően több munkacsoport is vizsgálta az időközben izolált metanolhasznosító élesztőfajokból az alkohol-oxidázt, /5,6,7,15/. Az ezekben szereplő eredményeket az I. táblázatban foglaltuk össze. Láthatjuk, hogy az eltérő forrásokból izolált enzimek az egyes tulajdonságaikban mutatkozó számszerű eltéréseik ellenére is alapvető hasonlóságot mutatnak. Az eltérések elsősorban a molekulasúlyban szembetűnőek.



a



b

a./ *Candida boidinii* sejtek mikroszkópos felvétele  
/ Lippai Klára, diplomadolgozat, 1977. /

b./ Egy peroxiszóma elektronmikroszkópos felvétele  
/ M. Veenhuis et al. Arch. Microbiol. 120 1979. /

## I. T á b l á z a t

Szerző	Ms	Alegység Ms	K <sub>M</sub>	Prosztt. csop.	Max. láthatóban	pH opt.	Gátlószer koncentráció/M/	Faj
1-2	300000	min 85000	1,52	FAD	---	6,5-9,0		Basidiomycetes sp.
3-4	570000	95000	1,25	FAD	373,393,461	8,0	PCMB, HgCl <sub>2</sub> 10 <sup>-3</sup> , 10 <sup>-6</sup>	Kloeckera N <sup>o</sup> 2201
5	210000	---	2,12	FAD	383, 458	---	---	Candida N-16
6	600000	74000	2,00	FAD	372,402,460	7,5-9,5	PCMB 10 <sup>-3</sup>	Candida boidinii
7	---	---	1,30	---	---	---	---	Hansenula polymorpha
15	670000	83000	0,44	FAD	375,395,460	8,0-9,0	---	Kloeckera sp.
	670000	83000	0,23	FAD	375,395,460	8,0-9,0	---	Hansenula polymorpha
23	520000	65000	0,019	FAD	375,397,465	7,5	PCMB 10 <sup>-4</sup>	Candida 25-A
sa ját vál- tozó		92-98000	0,50	---	372,403,470	7,0-8,0	PCMB, IAA	Candida boidinii





Van Dijken és mtsi. leírták, hogy az enzim légköri oxigénkoncentráció mellett nincs telítve oxigénnel, ezért a légköri oxigéntelítettség mellett meghatározott  $K_m$  értékek csak látszólagosnak tekinthetők /7/.

A glükózon és metanolon tenyésztett sejtekből végzett kezdeti enzimvizsgálatok azt bizonyították, hogy az alkohol oxidáz csak a metanol-tartalmazó tápközegben növekvő sejtekben van jelen, szintézise az ilyen tápoldatra való áttöltés után indul meg. Az egyéb, korábban végzett vizsgálatokból nyilvánvaló volt, hogy a növényi és egyes állati szövetekben a flavin oxidázok egy része a katalázzal és néhány más enzimmel együtt specifikus sejtorganellekben, az ún. peroxiszómákban lokalizálódik. Az a tény, hogy az alkohol oxidázzal egy időben a kataláz szintje is lényegesen megnő a metanol-hasznosító élesztőkben, indokolta a két enzim szubcelluláris lokalizációjának vizsgálatát. Az elvégzett elektronmikroszkópos vizsgálatok valóban be is bizonyították a peroxiszómák jelenlétét ezekben a sejtekben /8,9,10,16,17/. Ugyanezek a vizsgálatok kimutatták azt is, hogy a peroxiszómák egyáltalán nem, vagy csak igen kis számban - és ebben az esetben a méretük is lényegesen kisebb - fordulnak elő a glükózon vagy etanolon növekvő sejtekben. Metanolra történő áttöltés után megnő a számuk és a méretük, majd a mátrixukban kristályszerű inklúziók jelennek meg, amelyek néhány faj esetében csaknem teljesen ki is töltik a teljes mátrixot. A párhuzamos enzimvizsgálatok /9,10,11,12,16/ azt mutatták, hogy az alkohol oxidáz, a kataláz és a D-aminosav oxidáz "partikulált", illetve a peroxiszómákhoz kötődik. Veenhuis és mtsi. citokémiai festési módszereket használva kimutatták, hogy az alkohol oxidáz, D-aminosav oxidáz,

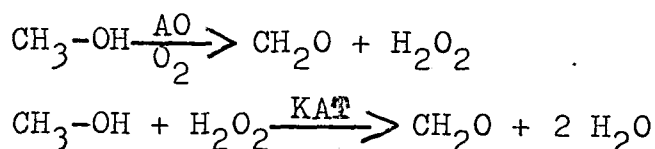
L- $\alpha$ -OH sav oxidáz és a kataláz mindegyike résztvesz a kristályszerű strukturában /14/. H. Sham és mtsi. egy olyan Candida boidinii mutánst használva, amely nem volt képes szintetizálni az alkohol oxidázt, bebizonyították, hogy a kristályszerű struktúra megjelenése szorosan az alkohol oxidázhoz kötődik, mivel a mutáns sejtekben az alkohol oxidázon kívül az összes többi enzim normális mennyiségben volt jelen, metanolra történő átoltság után a peroxiszómák száma is megnőtt, a mátrixuk azonban szerkezet nélkül maradt /8/.

Ezután a figyelem elsősorban a peroxiszómákra korlátozódott, és ezek a vizsgálatok néhány, az alkohol oxidázzal kapcsolatos érdekes tényre is rávilágítottak. Veenhuis és mtsi. /19/ kimutatták, hogy a sejtek osztódásakor a sarjakba kerülő kis peroxiszómák az anyasejt peroxiszómáiról fűződnek le. A sarjak növekedése során azután ezek száma és mérete is lényegesen megnő. Érdekes, hogy a lefűződő kis peroxiszómákban nem tudtak semmilyen oxidáz aktivitást kimutatni, annak ellenére, hogy a kristályszerű struktúra kimutatható volt bennük. Ez egy egyelőre még ismeretlen regulációs mechanizmusra utal. Megfigyelték azt is, hogy a strukturában lévő enzim kevésbé aktiv, mint az ezt körülvevő amorf matrixban lévő. Ezt jól alátámasztotta az a megfigyelésük is, hogy az intakt sejtek metanolasszimiláló képessége kb. háromszor kisebb, mint az ugyanezekből a sejtekből készített nyers kivonaté. Megfigyelték azt is, hogy a peroxiszómákból a kataláz enyhe ozmotikus sokkal eltávolítható anélkül, hogy a kristályszerű struktúra felbomlana. Ez azt bizonyítja, hogy a struktúra képzésében a kataláznak nincs szerepe, inkább csak társul a már meglévő szerkezethez.

L. Eggeling és H. Sham számoltak be arról /21/, hogy a metanol asszimilációjában résztvevő, korábban induktívnak tartott enzimek regulációja nem ilyen, hanem a szintézis katabolitrepresszió hatása alatt áll, így nem a metanol, vagy a metanolasszimiláció valamelyik anyagcseretermékének induktív hatása, hanem a glükóz elfogyása miatt megszűnő gátlás következtében indul meg a szintézisük. Ez a derepresszió lejátszódik a glükózon növekvő, de stationer fázisba került sejtekben is, ami összhangban van Veenhuis és mtsi. közleményével is /20/.

A peroxiszómák degradációját metanolról etanolra történő átváltás után vizsgálva C. Borman és mtsa azt találták, hogy az alkohol oxidáz aktivitásának csökkenése a metanolasszimilációban részt vevő többi enzimhez viszonyítva sokkal gyorsabb, nem magyarázható a sejtek szaporodása miatt bekövetkező kihígulással, és arra a következtetésre jutottak, hogy ez egy specifikus inaktiválódási folyamat, valamint arra, hogy a szubsztrát jelenléte stabilizálja az enzimet /18/.

A katalázról már régen tudott volt, hogy képes alkohol-peroxidázként is működni /24/, különösen ha a  $H_2O_2$  primer oxidációs rendszerekben termelődik és így az aktuális koncentrációja mindig alacsony. A peroxiszómákban az alkohol oxidáz és kataláz együttes jelenléte szinte kínálta azt a lehetőséget, hogy a metanolt nem csak az alkohol-oxidáz oxidálja formaldehiddé, hanem a kataláz is. Az elvégzett vizsgálatok valóban be is bizonyították ezt a feltételezést /5, 25, 26/. A metanol asszimilálásának első lépései tehát a következőképpen alakulnak:



Ez a kapcsolt reakció különösen előnyös a sejtek számára, hiszen a  $H_2O_2$  eliminálását egy újabb formaldehid molekula keletkezése kíséri, és ez az alkohol-oxidáz reakcióval ellentétben nem igényel oxigént.

A keletkező formaldehid sorsa ezek után kétféleképpen alakulhat:

1. Az egyik lehetőség az, hogy tovább oxidálódik széndioxiddá. Ebben a folyamatban további két enzim, a redukált glutation függő formaldehid dehidrogenáz és a formiát dehidrogenáz vesz részt /5, 28/. Mindkét enzim koenzime NAD, és ez a két oxidációs reakció biztosítja a sejt számára a szükséges energiát. A metanolban rejlő energiát az élesztők ilyen módon csak rossz hatásokkal tudják hasznosítani, hiszen a formaldehiddé történő oxidációkor a felszabaduló energia a sejt számára elvesz /27/. Ezért rosszabb az élesztők esetében kb. harmadával a sejthozam, mint baktériumoknál. Néhány élesztőfaj esetében a szokásos 40 %-os hozam helyett 55-66 %-ot irtak le, amit csak úgy lehetett megmagyarázni, hogy az alkohol oxidáz mellett egy, a metanolt oxidálni képes dehidrogenáz is jelen van ezekben a sejtekben és ennek a koenzime a visszaoxidálásakor már képes energiát szolgáltatni. Ezt az enzimet sikerült is kimutatni /29/. A gyakorlati felhasználás szempontjából ezek a fajok természetesen sokkal előnyösebbek.
2. A másik út a formaldehid számára a beépülés a sejt anyagaiba. Élesztőkben ez főleg a ribulóz-5-foszfát és a formaldehid kondenzációjával valósul meg, illetve az un. szerin uton, ahol az  $N^5-N^{10}$ -metilén tetrahydrofolát + glicin reakcióból keletkezik a szerin. A  $CO_2$  fixálása ribulóz-1, 5-difoszfáton ezek-

ben a fajokban általában nem jelentős. A pentóz-monofoszfát és a szerin ut a vizsgált fajokban eltérő aktivitásu lehet, esetenként egyik-egyik hiányozhat is.

Munkánkat 1975-ben kezdtük el ezen a területen. Célunk az volt, hogy az alkohol oxidázt részletes enzimológiai vizsgálatnak vessük alá és kiegészítsük az akkor még a mainál is hiányosabb jellemzést. A kezdeti kísérleteink azonban az enzim tulajdonságainak olyan anomáliáira utaltak, amelyek az enzimkinetikai méréseket irreálissá tették, ezért munkánk céljává elsősorban ezeknek a rendellenességeknek a vizsgálatát tettük.

## II. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. A kísérletekhez használt metanolasszimiláló élesztőtörzset a JATE Mikrobiológiai Tanszékén izolálták, és *Candida boidiniine* határozták meg. Tenyésztésze a következő tápoldatban történt:

5,0 g /  $\text{NH}_4 /_2\text{SO}_4$

1,0 "  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

0,5 "  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$

0,1 "  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$

0,1 " NaCl

0,5 " élesztőkivonat

+ 1% glükóz vagy 1 tf.% metanol, egy literre kiegészítve desztillált vízzel. A kezdeti pH-t 6,5-re állítottuk be, és a továbbiakban nem kontrolláltuk. A tenyésztés 30 °C-on, rázatott tenyészetben történt - ebben az esetben 2 literes Erlenmayer lombikokat használtunk 500-500 ml tápfolyadékkal - vagy pedig 4 literes folyadékkulturában, amit sterilre szűrt levegővel buborékolattunk át, és ez egyuttal a kevertetést

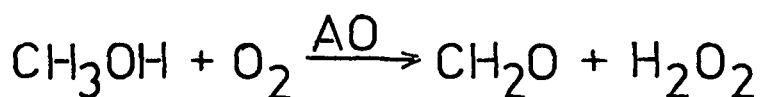
is elvégezte. A sejteket az exponenciális fázis végén /  $7 \times 10^7$   $2 \times 10^8$  sejt/ml / centrifugálással gyűjtöttük össze / Janetzky K 26, 4000 ford. 15 perc / és desztillált vizes mosás után  $-18^\circ\text{C}$ -on lefagyasztva tároltuk a felhasználásig.

## 2. Enzimaktivitásmérés:

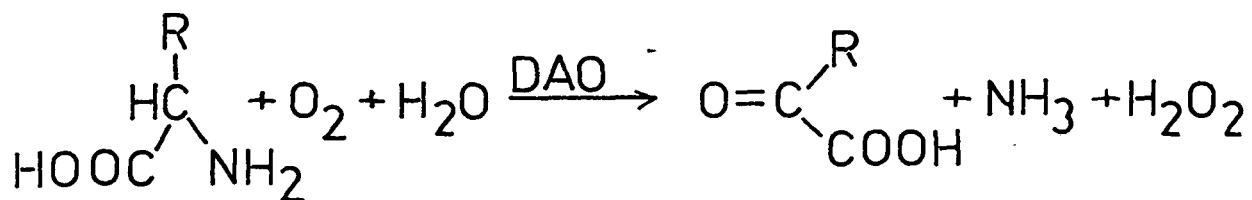
Mindegyik általunk vizsgált enzim aktivitását spektrofotometri-  
ásan határoztuk meg. / VSU2-P és Specord UV-VIS, Carl Zeiss  
Jena /. Az oxidázok reakcióit - alkohol oxidáz, L- $\alpha$ -OH-sav  
oxidáz és D- aminosav oxidáz - a képződő  $\text{H}_2\text{O}_2$  mennyiségének  
mérésével követtük, egy kapcsolt peroxidáz- o-dianizidin reak-  
ció segítségével.

A katalizált reakciók a következők:

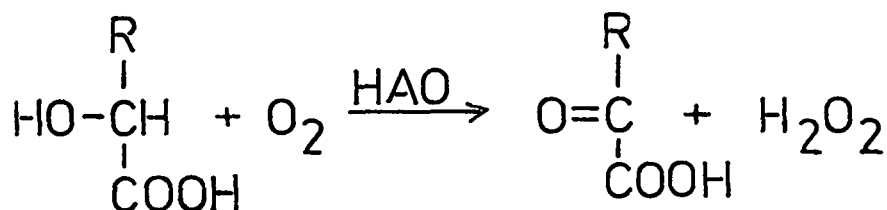
alkohol oxidáz:



D-aminosav oxidáz:



L- $\alpha$ -OH-sav oxidáz:



Az alkohol oxidáz mérésére a reakcióelegy a következő anyagokat tartalmazta:

- 0,5 mg o-dianizidin x 2 HCl
- 0,15 " peroxidáz, kb. 30 EU
- 165  $\mu$ mol metanol
- 0,1 M, pH 7,5 foszfátpuffer 3,0 ml végtérfogatra
- enzim a megfelelő mennyiségben /2-10  $\mu$ l/

A D-aminosav oxidáz mérésekor metanol helyett 120  $\mu$ mol DL alanint, az L- $\alpha$ -OH sav oxidáz mérésekor pedig 900  $\mu$ mol DL-Na-laktátot használtunk szubsztrátként. A DAO esetében az alkalmazott puffer is más volt, 0,2 M pH 8,1 pirofoszfát.

A termék koncentrációját folyamatos regisztrálás esetén 465 nm-nél  $\epsilon = 10,767 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  /, végpontos mérésnél pedig 400 nm-nél  $\epsilon = 9,882 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  / határoztuk meg. Az utóbbi esetben a reakciót 0,2 ml 4N HCl-al állítottuk le.

A katalázt a  $\text{H}_2\text{O}_2$  240 nm-nél mutatott abszorpciójának csökkenésével mértük, folyamatos regisztrálással  $\epsilon = 44,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  /. A reakcióelegy 60  $\mu$ mol  $\text{H}_2\text{O}_2$ -t tartalmazott 3,0 ml végtérfogatban. A használt puffer 0,1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ / citromsav, pH 7,0 volt. Egy enzimegységnek minden esetben azt az enzimmennyiséget tekintettük, amely 1  $\mu$ mol szubsztrátot alakított át egy perc alatt a megadott körülmények között.

3. A fehérjét a 280 nm-es abszorpció alapján mértük, és az  $\epsilon = 1 \text{ mg/ml}$  értékkel számoltunk.

4. Poliakrilamid gélelektroforézis

A gélelektroforézist 5%-os gélen végeztük, 3 mA/cső áramerősség mellett. A mintákat 10%-os szaharózos oldatban vittük fel. Elektródpufferként 5mM pH 8,3 Tris/Gly puffert használtunk.

A detergens jelenlétében végzett elektroforézisnél mind a gél,

mind az elektródpuffer 0,05% SDS-t is tartalmazott. A gél ebben az esetben 7,5%-os volt. A mintákat 1% SDS, illetve 1% SDS és 1% merkaptoetanol jelenlétében 50 °C-on két óráig kezeltük.

Az alkalmazott molsúlystandardok a következők voltak:

BSA, ovalbumin, GAPD, lizozim és cit.c<sub>1</sub>.

A géleket fehérjére Coomassie BB R-250-el festettük. A gélek enzimaktivitásra festésére az enzimaktivitás mérésénél már megadott összetételű reakcióelegyet használtuk, azzal az eltéréssel, hogy a géleket szobahőn 10 percig előinkubáltuk a reakcióelegyben és a szubsztrát hozzáadásával indítottuk a reakciót.

5. Az alkohol oxidáz SH-tartalmát /37/ szerint mértük:

0.1 ml fehérjeoldatot hozzáadtunk 0.8 ml 8M urea tartalmu pH 8.0-as 0.1 M-os Tris/HCl pufferhez, ami 10 mM EDTA-t is tartalmazott. Keverés után fél óráig denaturáltuk a fehérjét szobahőn, majd 0.1 ml 10 mM DTNB oldatot adtunk hozzá, amit 50 mM-os, pH 7.0-es foszfátpufferben oldottunk. Keverés után két perc múlva mértük a 412 nm-es  $\Delta E$ -t. A reagens- és az enzim-vak értékeket korrekcióba vettük, és az

$\mathcal{E}_{412} = 13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  értékkel számoltuk ki az -SH koncentrációt.

6. A kísérleteinkhez felhasznált vegyszereket a kereskedelmi forgalomból szereztük be és további tisztítás nélkül használtuk.



### III. K I S É R L E T I R É S Z

#### 1. Enzimtisztítás.

1/a. Az alkohol oxidáz tisztításához felhasználtuk az F.W.Jansen által alkalmazott polietilén-glikolos precipitációt /1/, majd a Tani és mtsi. által javasolt módszerrel tisztítottuk tovább az enzimet /3/ két módosítással, ugyanis egy második DEAE cellulóz kromatográfiát iktattunk a gélszűrés elé, amit nem Seph.G-200-on, hanem Seph 6-B-n végeztünk.

Az anyagok és módszerek fejezetben leírt módon nyert és  $-18^{\circ}\text{C}$ -on tárolt gombát 0,1 M-os, pH 7,5-ös foszfátpufferben /a továbbiakban foszfátpuffer/ szuszpendáltuk fel, egy gramm gombára 3ml puffert számolva. Az így nyert szuszpenziót French pressel 11000 psi nyomáson homogenizáltuk, majd pár percig tartó jeges vízfürdőben való állás után ismét átbocsátottuk a készüléken. A homogenizátor edényét előzőleg  $0^{\circ}\text{C}$ -ra hűtöttük, hogy elkerüljük a nagy nyomás okozta túlzott felmelegedést. Az így kapott homogenizátumot a feltáratlan sejtek és a durva sejttörmelék eltávolítására 30 percig, 2000g-vel centrifugáltuk. A felülusztót ezután 25000 g-vel, egy óráig centrifugáltuk a finom törmelék és a nagyobb sejtalkotók eltávolítása miatt. Az így kapott felülusztót használtuk sejtmentes kivonatként, és ezt tekintettük kiindulási anyagnak az enzimtisztításnál.

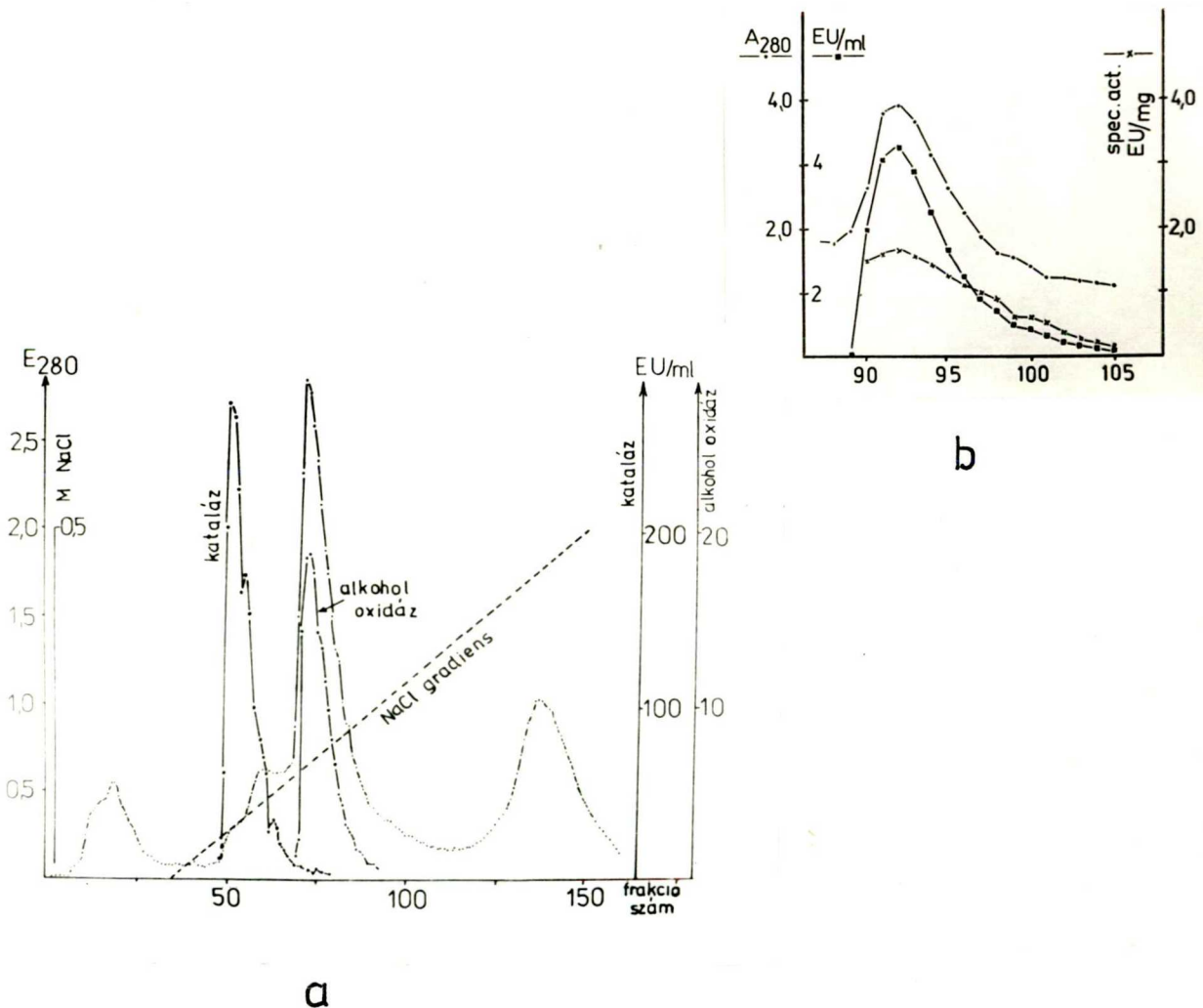
A sejtmentes kivonatot 20%-ig telítettük finoman elporított polietilén-glikol 6000-el /PEG 6000/. A PEG-et kis részletekben 30 perc alatt adtuk az oldathoz állandó kevertetés mellett, majd újabb 30 perc állás után a kivált csapadékot 2000 g-vel



egy órán át lecentrifugáltuk. Az üledéket kb. az eredeti térfogat harmadrészének megfelelő mennyiségű 0,05 M-os, pH 7,5-ös Tris/HCl pufferben / Tris puffer / felszuszpendáltuk. Egy éjszakai állás után a nem oldódó anyagot lecentrifugáltuk, és a felüluszt egy előzőleg Tris pufferrel egyensúlyba hozott DEAE cellulóz oszlopra vittük fel. Az oszlopot három oszloptérfogatnak megfelelő mennyiségű pufferral mostuk, majd 0-0,5 M NaCl gradienssel eluáltuk. Az alkohol oxidáz 0,1-0,15 M NaCl koncentrációnál eluálódik. Egy tipikus kromatogramot az 1. ábrán mutatunk be. Az aktív frakciókat összegyűjtöttük, PEG-20000-el szemben dializálva betöményítettük, majd a sötét 0,1%  $\text{NaN}_3$  tartalmu / a továbbiakban azidos / Tris pufferrel szemben dializálva eltávolítottuk. Az enzimoldatot újra egy DEAE oszlopra vittük fel, amelynek térfogata az előző oszlopénak kb. a harmada volt. Ezután a még eltávolítható kataláz és D-aminosav oxidáz kimosása végett öt oszloptérfogatnyi 0,05M NaCl tartalmu azidos Tris pufferrel mostuk. Az enzimet ezután egy lépésben eluáltuk 0,5 M NaCl tartalmu azidos Tris pufferrel. A lépés egyuttal az enzim töményítésére is szolgált. Az összegyűjtött aktív frakciókat azidos foszfát pufferben Sepharose-6B oszlopon kromatografáltuk. A 2. ábra mutat egy ilyen kromatogramot. Látható, hogy az enzimpreparátum már csak minimális mennyiségű, gélekromatográfiával eltávolítható szennyező fehérjét tartalmaz. Az itt összegyűjtött aktív frakciókat használtuk tisztított enzimeként. A preparátum poliakrilamid gélelektroforézissel kb. 90%-os tisztaságú /3. ábra/, de később tárgyalandó okok miatt a tisztaság ennél rosszabb, amire már az is utal, hogy az aktív csucsban a specifikus aktivitás erős változást mutat.

Egy tipikus tisztítás lépéseit a II. táblázatban foglaltuk össze.

Végeredményben az alkohol-oxidázt 40-50 %-os kitermelés mellett 70-75-szörös tisztulással izoláltuk. Az enzimet felhasználásig azidos foszfátpufferben tároltuk 4 °C-on. Felhasználás előtt az azidot Sephadex G25-ös oszlopon távolítottuk el.

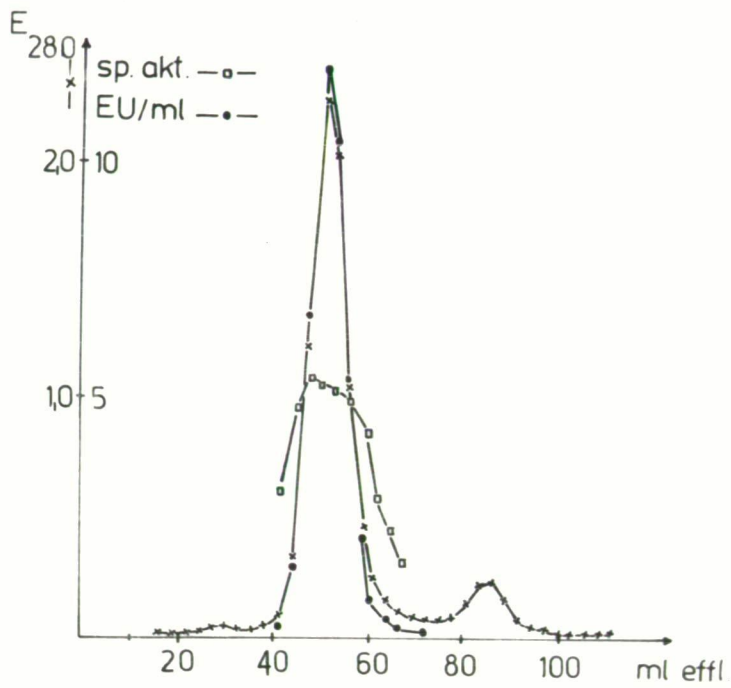


1. ábra: a/ Sejtmentes kivonat 20%-os PEG csapadékának ioncserés kromatográfiája DEAE cellulózon.

Oszlopméret: 1,5cm<sup>2</sup>x30,5cm

b/ Az alkohol oxidáz-aktív csúcson belül az enzim specifikus aktivitása

/ A két kromatográfia nem azonos! /



2. ábra: A második ioncserés lépés alkohol oxidáz-aktív frakcióinak gélkromatográfiája Seph. 6B oszlopon. Oszlopméret:  $1,5 \text{ cm}^2 \times 57 \text{ cm}$ , mintatérfogat:  $3,0 \text{ ml}$ .



3. ábra: Tisztított alkohol oxidáz tisztaságellenőrzése  
poliakrilamid gélelektroforézissel.  
a/ fehérjére- b/ enzimaktivításra festett gél

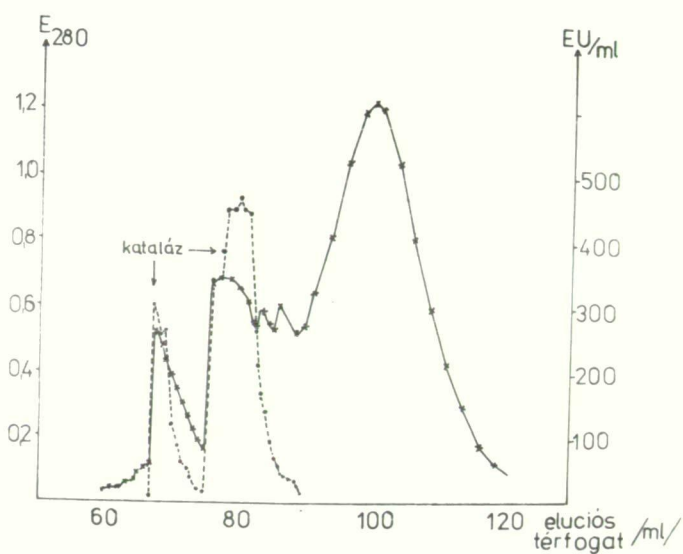
II. Táblázat

Az alkohol-oxidáz tisztításának összefoglalása

Térfogat /ml/	Kezelés	Össz.feh. /mg/	Össz. akt. EU	Spec.akt.	Tisztulás x	Kiterm. %
100	hom.	3588,0	244,7	0,0682	1	100
28,5	20% PEG csap	628,82	121,81	0,1937	2,84	49,78
35,5	1. DEAE után	84,845	42,04	0,4955	7,266	17,18
3,2	2. DEAE után	28,88	38,798	1,3434	19,698	15,855
22,4	Seph. 6B krom. fr.-i	21,50	108,80	5,064	74,25	44,46

### 1/b. A kataláz tisztítása

A tisztítás lényegében azonos volt a Fujii és mtsa által leírt módszerrel, kivéve, hogy mi  $\text{NH}_4/2\text{SO}_4$  helyett PEG-6000-t használtunk kicsapásra /22/, és az első ioncserés lépésig megegyezett az alkohol-oxidáz tisztításával. Az 1. ábrán az eluálódó kataláz aktivitást is feltüntettük, az elució 0,05 M NaCl koncentrációnál következik be. /A kataláz döntő többsége elválik az alkohol oxidáztól, ez azonban nem teljes, ezért iktattunk be az AO tisztításánál egy második ioncserés lépést/. Az összegyűjtött aktiv frakciókat PEG-20000-el szemben dializálva betöményítettük és Sephadex G-200-as oszlopon tisztítottuk tovább /4. ábra/. A kataláz két csucsban eluálódik az oszlopról. Az aktiv frakciókat betöményítés után rekromatografáltuk. Ekkor már csak egy aktiv csucsot kaptunk, az előző kromatográfia második csucsának megfelelő elucióstér-fogatnál. A második Sephadex G-200-as kromatográfia összegyűjtött aktiv frakcióit használtuk tisztított enzimként. A tisztítás lépéseit a III. táblázatban foglaltuk össze. Az enzimet 75 %-os kitermeléssel, 236-szoros tisztulással izoláltuk. A tisztított kataláz  $E_{280}/E_{407}$  értéke 0,93 volt, ami jól egyezik az irodalmi értékkel /0,923/.



4. ábra: Az első ioncserés lépés kataláz aktív frakcióinak gélkromatográfiája Seph. G-200 oszlopon.

Oszlopméret:  $1,5 \text{ cm}^2 \times 62 \text{ cm}$ , mintatérfogat: 10 ml.



### III. Táblázat

#### A kataláz tisztításának összefoglalása

Tisztítási lépés	Térfogat /ml/	Összes fehérje /mg/	Összes EU	Specifikus aktivitás	Tisztulás	Kitermelés %
Nyers kivonat	160	7476,8	12344	1,65	1	100
PEG csapadék	54	1986,4	20088	10,1	6,12	162,7
DEAE kromatográfia	46	107,5	17755	165,2	100	143,8
Sephadex G-200 I.	16	26,5	13085	494	300	106
Sephadex G-200 II.	10,6	24,3	9448	388,8	235,6	76,5

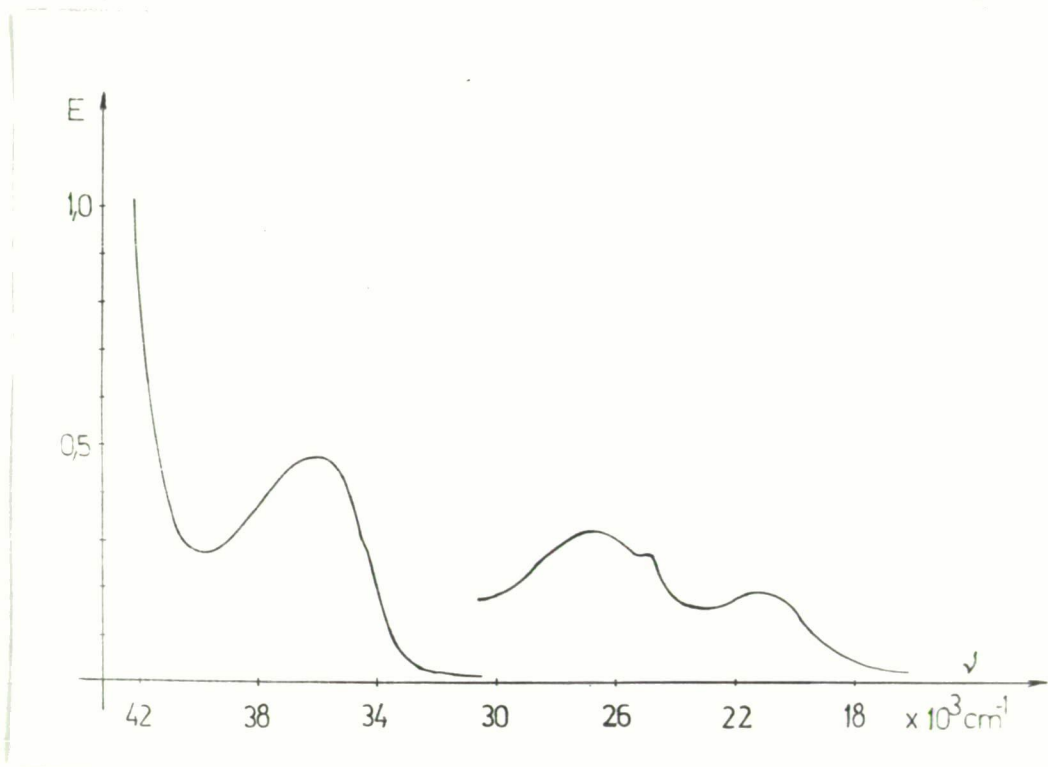
## 2. Az alkohol-oxidáz tulajdonságai:

2/a A tisztított enzim spektruma az 5. ábrán látható. Jellemző abszorpciós maximumai 278, 372 és 470 nm-nél találhatóak, 403 nm-nél egy vállal. A látható szinképtartományban lévő maximumok flavoproteinre utalnak, jól egyeznek az eddig vizsgált enzimekre közölt adatokkal /I. táblázat/ és összhangban állnak azzal a ténnyel, hogy az eddig vizsgált enzimek prosz-tetikus csoportja FAD. A 403 nm-es váll, amelyet a többi alkohol oxidáz preparátumban is megfigyeltek, más kromofor jelenlétére is utal és a porfirinekre jellemző Soret sávra enged következtetni, annál is inkább, mert a kataláz nyomok nem távolíthatók el az enzimpreparátumból az általunk használt módszerekkel.

### 2/b Az aktivitás pH-függése

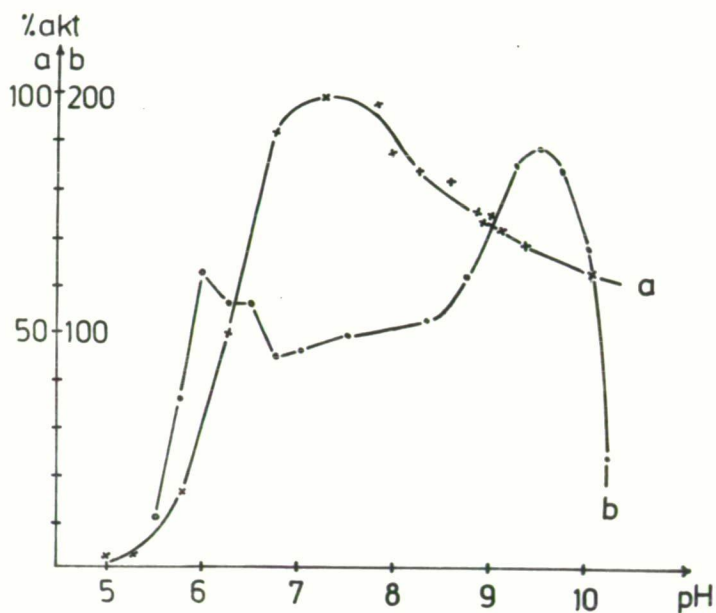
Az aktivitás pH-függését sejtmentes kivonatot és tisztított enzimet használva vizsgáltuk. A használt pufferek a sejtmentes kivonat esetében 0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  /  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , Tris/HCl és Gly/NaOH, a tisztított enzim esetében pedig 0,2 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  /  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , illetve bórsav-KCl/ $\text{Na}_2\text{CO}_3$  voltak. A sejtmentes kivonat esetében a kapott aktivitás - pH profil hasonló az irodalomban közöltekhöz, a maximális aktivitás pH 7,0-8,0 között mérhető. pH 7,0 alatt az aktivitás gyorsan csökken, míg pH 8,0 fölött a csökkenés lényegesen lassabb / 6/a ábra /.

Tisztított enzimmel végezve a kísérletet az előzőtől erősen eltérő eredményt kaptunk. Az aktivitásnak két maximuma van, pH 6,0-nál és pH 9,5-nél / 6/b ábra /. A kapott eredmény váratlan volt. A magyarázatot az enzim pH-stabilitásának kinetikájában találtuk meg, amire az inaktiválódás pH-függésénél térünk rá.



5. ábra: A tisztított alkohol oxidáz spektruma 0,1 M, pH 7,5 foszfátpufferben. Fehérjekoncentráció az UV tartományban 0,475 mg/ml, a látható tartományban 4 mg/ml.





6. ábra: Az alkohol oxidáz aktivitásának pH függése,  
 a/ sejtmentes kivonattal és b/ tisztított enzimmal mérve.  
 A mérés 2 perces reakcióidővel, végpontos módszerrel  
 történt, 30 °C-on. 100% mindkét esetben a pH 7,5-ön  
 mért aktivitás

## 2/c Szubsztrátspecifitás:

Meghatároztuk az enzim látszólagos  $K_M$  és  $V_m$  értékeit metanolra, etanolra, n-propanolra, n-butanolra és tejsavra. Vizsgáltuk továbbá az i-propanolt és az i-butanolt, valamint a propán-1,3- és a bután-1,4-diolt. Az eredményeket a IV. táblázatban foglaltuk össze. A kapott eredmények összhangban vannak az irodalmi adatokkal, az enzim legjobb szubsztrátjának a metanol bizonyult, az alkoholok szénláncának növekedésével a  $K_M$  érték rohamosan nő. A vizsgált alkoholokra kapott  $V_m$  értékek a kísérleti hibán belül azonosnak tekinthetők, ami arra utal, hogy a szubsztrátok enzimhez való kötődésében van a különbség, az egyszer már megkötött alkoholok azonos sebességgel oxidálódnak. A vizsgált izo- és hidroxiszubsztituált alkoholok nem szubsztrátjai az enzimnek. Szubsztrát ellenben a tejsav, amire a későbbiekben még visszatérünk.

IV. táblázat

Szubsztrát	$K_M$ mM	$V_m$ uM/perc
metanol	0,534	0,105
etanol	1,63	0,098
n-propanol	12,12	0,109
n-butanol	222,2	0,095
D,L-Na-laktát	295,2	0,103

2/d Az enzim alegységmolsúlyát SDS-gélelektroforézissel határoztuk meg. A gélkromatográfiával és elektroforézissel közel homogénnek bizonyult enzim azonban nem egy csíkot adott a kísérlet során / 7/a ábra /. Az alkohol oxidáz alegységének

a legintenzivebb csíkot tekintettük, aminek a molekulásúlya 92-98000 daltonnak felel meg. Merkaptoetanolos redukció hatására /7/b, ill. 7/c felső sor / a 132000 d-os csík gyengülése és a 106000 d-os csík eltűnése mellett a 92-98000 d-os csíkok megerősödtek. Erősödött továbbá a 70800 és 63000 d-os csík, és megjelent az 56200, 52500 és a 33900 d-os csík. A kísérletet megismételtük úgy is, hogy az enzimet elektroforizáltuk, és a domináns enzimformát / lásd később / kivágtuk a gélből, kiáztattuk belőle, és az így nyert fehérjét vizsgáltuk. Azonban ez a preparátum sem adott homogén csíkot az SDS elektroforézis során / 7/d ábra /. A legintenzivebb csík itt 84000 daltonnak felelt meg.

#### 2/e Az alkohol-oxidáz hőinaktiválódása

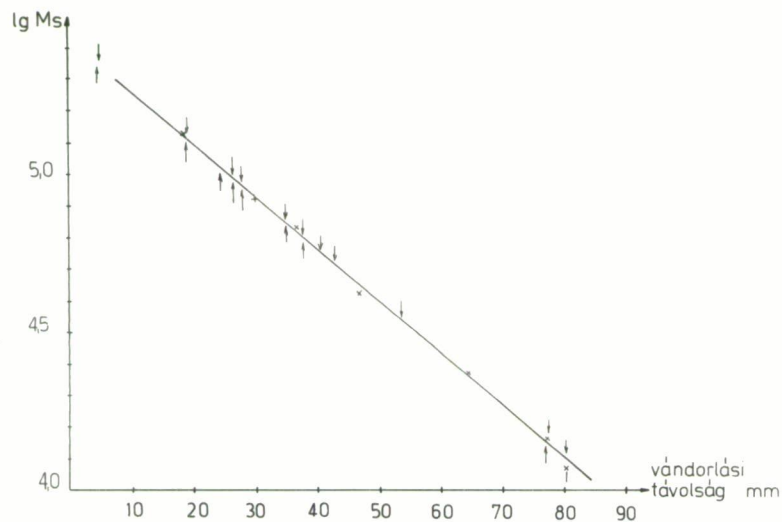
A hőinaktiválódást sejtmentes kivonatban vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy az inaktiválódás bonyolult lefutású és koncentrációfüggő folyamat. A 8. ábrán látható a 30 °C-on, pH 7,5-ön mért inaktiválódás, aminek az első lépése aktivitásnövekedéssel jár. Ezt követően csökkenés tapasztalható, ami után az enzim mérhető maradék aktivitása az eredeti érték 40-45 %-án hosszabb időn át állandó marad, majd bekövetkezik a teljes inaktiválódás. Az egész folyamat koncentrációfüggő, kisebb koncentrációban az enzim gyorsabban inaktiválódik. A teljes folyamat kinetikai analízise természetesen így nem lehetséges, ezért csak az utolsó, teljes inaktiválódást eredményező lépést tudtuk megvizsgálni. Azt találtuk, hogy a folyamat kinetikailag másodrendű, pontosabban másodrendű reakcióként kezelhető. Megvizsgáltuk az EDTA és a bovin albumin hatását ennek a lépésnek a sebességére.

A 9/a ábrán látható, hogy az EDTA nincs hatással a reakció lefutására, a bovin albumin viszont az alkalmazott koncentrációban stabilizál.

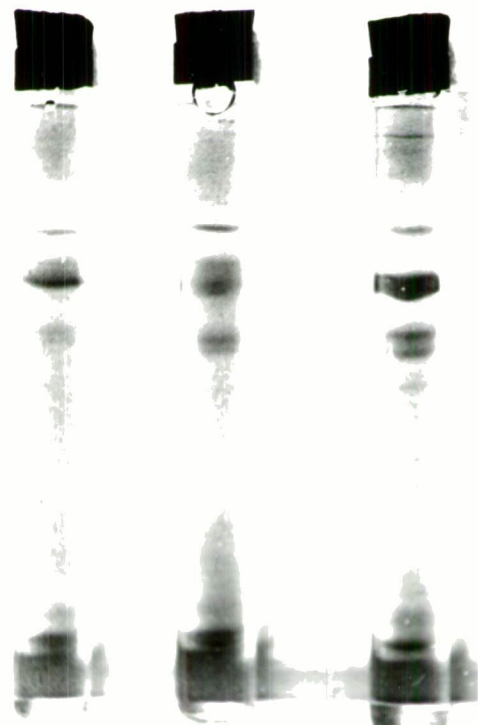
A tisztított enzim hőinaktiválódása / lásd 10. ábra pH 6,5, ill. 31. ábra / több lépcsős, amiből azt a következtetést lehet levonnunk, hogy a szokatlan lefutásu inaktiválódás nem a sejtmentes kivonatban lévő anyagok aspecifikus hatásának tulajdonítható, hanem az alkohol-oxidázra jellemző sajátság. Ezt támasztja alá az a kísérletünk is, amikor a hígítást nem pufferrel, hanem a már inaktiválódott és a kivált csapadéktól lecentrifugált sejtmentes kivonattal végeztünk / 9/a ábra /.

#### 2/f A pH hatása a 30 °C-on mért inaktiválódásra

A pH inaktiváló hatását két módszerrel vizsgáltuk. Először a hőinaktiválódásnál már említett utolsó szakaszból számoltuk ki a sebességi állandókat. Az egyes pH-értékeken az inaktiválódás folyamatát a 10. ábra mutatja. Az ezekből számolt  $k$  értékek logaritmusát a pH függvényében ábrázolva / 11/a ábra / a kapott értékek mind a két pH-tartományban közel 4-es meredekségű egyenest adnak, ami az elektrolitikus disszociációra képes aminosav oldalláncok szerepére utal az enzim stabilitásában. Ezek természete a következő lehet: az enyhén savas pH-tartományban a görbe törése pH 6 körül van, ami a szerencsésebb eset, mert az aminosavak közül egyedül a hisztidinnek van ebben a környezetben a  $pK$ -ja / $pK=6,0$ /. A lúgos tartományban a törés valamivel pH 9 fölött van. Figyelembevéve, hogy a szabad aminosav oldalláncok  $pK$ -i a fehérjébe beépülve  $\pm 1$  pH értéket, esetenként többet is változhatnak, a számításba jöhető aminosavak a következők: cisztein / $pK=8,33$ /, tirozin / $pK=10,07$ /és lizin / $pK=10,53$ /.



c

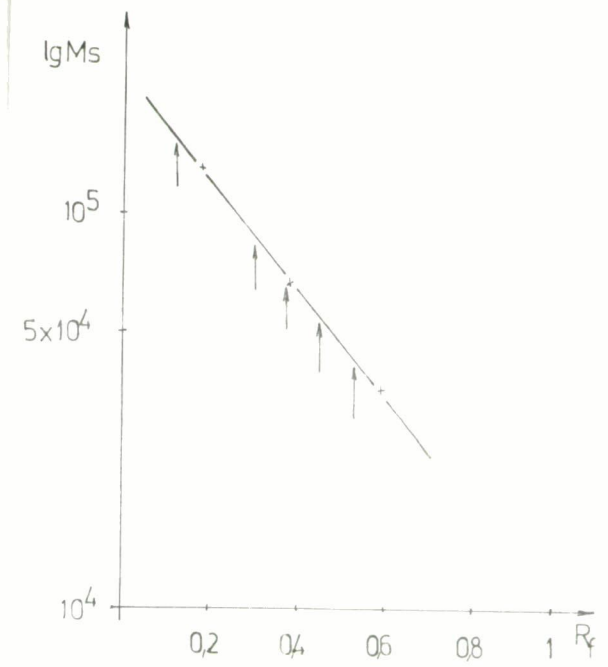


10 μl

20 μl

a

b

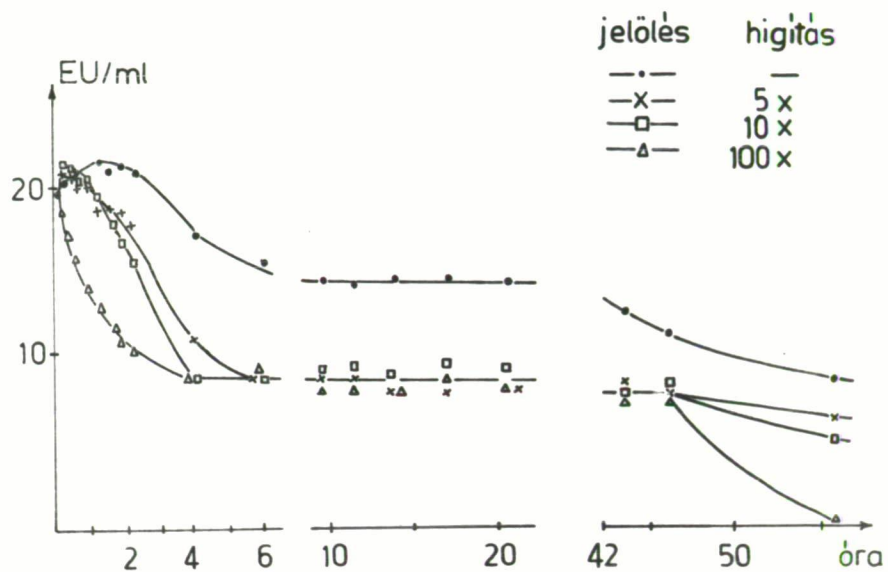


d

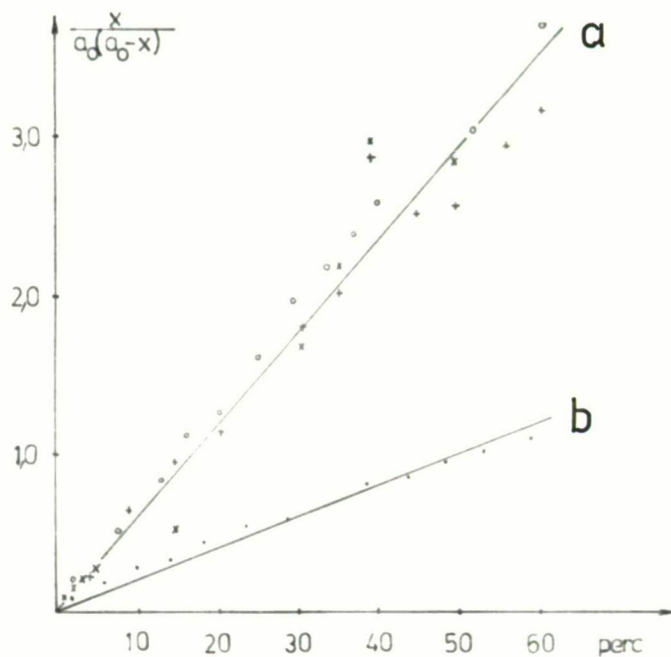
7. ábra : a/ tisztított alkohol oxidáz SDS gélelektroforézise b/ ua. 1% merkaptotanol jelenlétében c/ kalibrációs egyenes a Ms-ok meghatározásához, alsó sor az "a" gélnek, a felső sor pedig a "b" gélnek felel meg. A Ms-ok csökkenő sorrendben: 224000, 132000, 106000, 97700, 92300, 70800, 63100, 56200, 52500, 33900, 13800, és 12100 dalton. d/ a kivágott domináns enzimforma analizise merkaptotanol nélkül. A Ms-ok: 160000, 84000, 68000, 54000, 42000 dalton.







8. ábra: Az alkohol oxidáz hőinaktiválódása sejtmentes kivonatban, 30 °C-on, pH 7,5 0,1 M foszfátpufferben mérve. A higitásoknál a mért aktivitásértékeket visszaszámoltuk az eredeti oldatra.



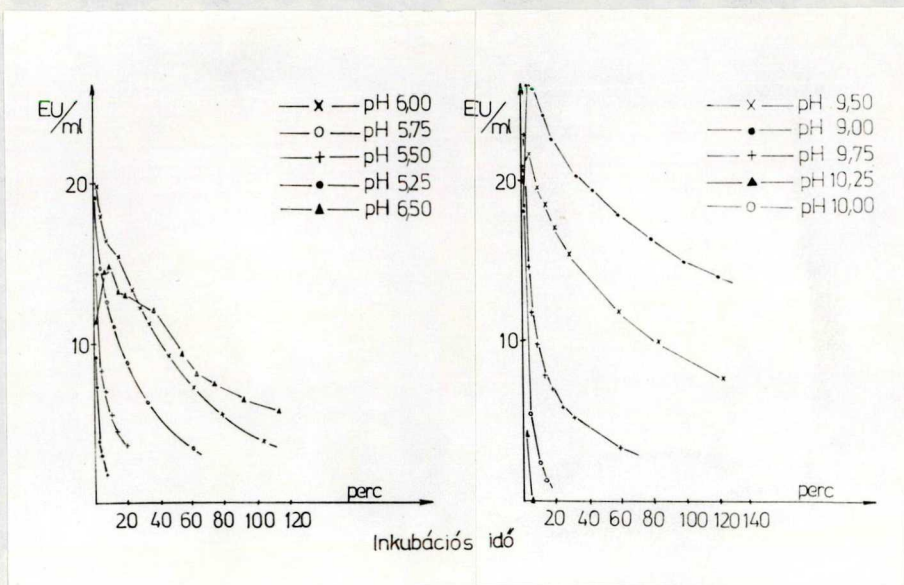
9. ábra: A hőinaktiválódás utolsó, teljes inaktiválódást eredményező lépésének kinetikai analizise.

a/ kezeletlen sejtmentes kivonat -x-

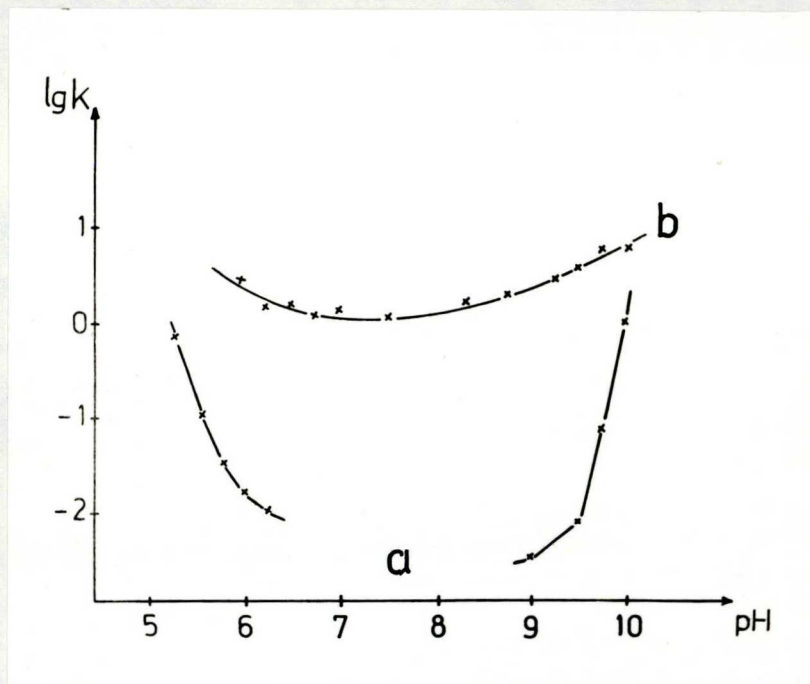
ua.  $10^{-3}$ M EDTA jelenlétében --+-

ua. inaktiválódott sejtmentes kivonattal higitva -o-

b/ 10 mg/ml BSA jelenlétében



10. ábra: A pH hatása a tisztított enzim 30 °C-on mért hőinaktiválódására.



11. ábra: A pH hatása a hőinaktiválódás sebességi állandóira  
 a/ az utolsó inaktiválódási lépés sebességi állandói  
 b/ az első, aktiválódással járó lépés látszólagos sebességi állandói

Ezek között csak specifikus kémiai módosítással lehet dönteni.

A második alkalmazott módszerrel az első, aktiválódással járó lépésre vizsgáltuk a pH hatását. A módszert a következő fejezetben tárgyaljuk részletesen. Ennek alapján kiszámoltuk az egyes pH-értékekre a látszólagos sebességi állandókat, így az inaktiválódás első lépésének pH-függéséről is összehasonlításra alkalmas adatokat kaptunk.

A logaritmus  $k^{**}$  értékeket a 11/b ábrán tüntettük fel a pH függvényében. Ebben az esetben is hasonló a helyzet az előzőhöz, ugyanis a lúgos tartományban nem dönthető el az asszociációért felelős, vagy részben felelős aminosav oldallánc természete. Az aktiválódási lépés pH-függése arra utal, hogy ebben a folyamatban a töltéssel rendelkező aminosav oldalláncok csak részleges szerepet játszanak, mivel a kapott görbe meredeksége lényegesen kisebb 1-nél. A folyamatban így a nem ionizálható aminosav oldalláncoknak, tehát a van der Waals erőnek is szerepet kell tulajdonítanunk.

A két görbe lefutása egyuttal magyarázatot ad a tisztított enzim esetén kapott szokatlan aktivitás-pH profilra is. A 11. ábrán látható, hogy a pH függvényében erősen változik a sebességi állandók aránya, az aktiválódási lépés az alkalmazott nagy hígítás mellett a lúgos tartományban már kisebb, a savas tartományban pedig nagyobb pH-értékeknél gyorsul, mint az utolsó inaktiválódási lépés, így a kettő eredője két optimum aktivitás - pH függési görbét eredményez. A sejtmentes kivonatban, ahol az enzim sokkal higabb, mint a tisztított preparátumban, a lényegesen kevesebb asszociált alak diszszociációja miatt bekövetkező aktivitásnövekedés valószínűleg a mérési hibán belül marad.

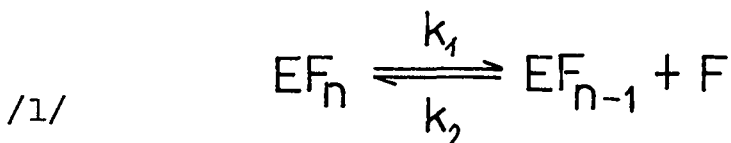
2/g A disszociáció és az enzim aktivitásának összefüggése

Az enzimreakciót nem végpontos, hanem folyamatos regisztrálással mérve megfigyeltük, hogy a termék keletkezése a reakció kezdetén nem lineáris, hanem "lag" fázissal indul, és csak egy bizonyos idő eltelte után válik lineárisrá / 12/a ábra /. Figyelembe véve a hőinaktiválódási kísérleteknél tapasztalt aktivitásnövekedést, feltételeztük, hogy ez a "lag" fázis azért jelentkezik, mert az enzim a reakcióelegyben meghigul, disszociál, és a disszociált forma aktívabb. A reakció ezért csak az új egyensúly beállta után válik lineárisrá, természetesen csak telített szubsztrátkoncentráció mellett.

Azt, hogy a "lag" periódus valóban disszociáció következménye, a következő megfontolás alapján bizonyítottuk: A "lag" periódust akkor észleltük, amikor a reakciót enzimmal indítottuk. Ha az enzimet a reakcióelegyben megfelelő ideig előinkubáljuk, és a reakciót a szubsztráttal indítjuk, akkor az előinkubáció alatt a disszociációnak le kell játszódnia, és az aktivitásnövekedési szakasznak nem szabad jelentkeznie. Az elvégzett kísérletek valóban ezt az eredményt adták / 12. ábra, b, c, d /.

Mivel az aktivitásnövekedéssel kísért disszociáció ilyen módon az inaktiválódás első lépésének tekinthető, megpróbáltuk kinetikai analízisnek alávetni, hogy a lépés pH-függését kvantitatíve mérni tudjuk. Elgondolásunk a következő volt:

Mint legegyszerűbb esetet, feltételeztük, hogy az enzimnek két, egymással egyensúlyban lévő aktív formája van:



ahol E az enzim, F a vele komplexben lévő fehérje, n pedig az

egy enzim molekulára jutó komplexelő fehérje száma, ami  $\geq 1$ , és az  $EF_n$  molekuláris aktivitása kisebb, mint az  $EF_{n-1}$ -é.

Az aktivitásnövekedési szakasz egy eredő folyamat, a disszociáló  $EF_n$  mennyisége miatt bekövetkező aktivitáscsökkenés, és az ezzel párhuzamosan keletkező  $EF_{n-1}$  mennyisége miatt bekövetkező aktivitásnövekedés összege.

$t_0$  időpontban a rendszerünk egyensúlyban van, és felírható rá, hogy:

$$/2/ \quad K = \frac{[EF_{n-1}]_0 \cdot [F]_0}{[EF_n]_0} = \frac{[EF_{n-1}]_0^2}{[EF_n]_0}$$

ugyanekkor meghigitjuk az enzimet  $x$ -szer. Az  $EF_n$  komplex fogyásának a kezdeti sebessége:

$$/3/ \quad \frac{d[EF_n]}{dt} = -k_1 \cdot \frac{[EF_n]_0}{x} + k_2 \cdot \frac{[EF_{n-1}]_0 \cdot [F]_0}{x}$$

$[EF_{n-1}]_0 = [F]_0$ , és felhasználva, hogy  $[EF_{n-1}]_0^2 = K \cdot [EF_n]_0$ , /3/ a következőképpen alakul:

$$/4/ \quad \frac{d[EF_n]}{dt} = -k_1 \cdot \frac{[EF_n]_0}{x} + k_2 \cdot \frac{[EF_n]_0 \cdot K}{x^2}$$

$[EF_{n-1}]$  keletkezési sebessége egyenlő  $EF_n$  bomlásának sebességével, csak előjelük különbözik:

$$/5/ \quad \frac{d[EF_{n-1}]}{dt} = k_1 \cdot \frac{[EF_n]_0}{x} - k_2 \cdot \frac{[EF_n]_0 \cdot K}{x^2}$$

Mind a két enzimforma aktiv, de aktivitásuk különböző. Mi a két enzimforma együttes aktivitását tudjuk mérni, de nem a szögletes zárójellel jelölt abszolút koncentrációt, hanem az enzimegységet, amit a következőképpen definiáltunk, feltételezve, hogy igaz az alkohol oxidázra a Michaelis-Menten megköze-



lités:

$$EU_n = k_3 \cdot /EF_n/ \text{ és } EU_{n-1} = k_4 \cdot /EF_{n-1}/$$

ahol  $k_3$  és  $k_4$  az enzim-termék komplex disszociálásának sebességi állandója, és  $k_4 > k_3$ .

Az össz-enzimegység időbeli változása:

$$/6/ \quad \frac{dEU}{dt} = \frac{dEU_n}{dt} + \frac{dEU_{n-1}}{dt}$$

/4/-et és /5/-öt  $k_3$ -al és  $k_4$ -el beszorozva és /6/ szerint összeadva:

$$/7/ \quad \left. \frac{dEU}{dt} \right|_{t=0} = -k_1 k_3 \frac{[EF_n]_0}{x} + k_2 k_3 \frac{[EF_n]_0 K}{x^2} + k_1 k_4 \frac{[EF_n]_0}{x} - k_2 k_4 \frac{[EF_n]_0 K}{x^2}$$

$/EF_n/_0$ -t kiemelve:

$$/8/ \quad \left. \frac{dEU}{dt} \right|_{t_0} = [EF_n]_0 \cdot \left( \frac{k_2 K (k_3 - k_4)}{x^2} + \frac{k_1 (k_4 - k_3)}{x} \right) \text{ ahol a zárójeles tag} = k^\ddagger$$

Az általunk mérhető enzimkoncentráció változásának a kezdeti sebessége tehát felírható egy látszólag elsőrendű reakció sebességeként, ahol a  $k^\ddagger$  egy látszólagos sebességi állandó. Mivel azonban szerepel benne a higitás, ezért koncentrációfüggőnek kell lennie. Ezek után megpróbáltunk az aktivitásmérési görbénken olyan mérhető mennyiséget keresni, amellyel mérni tudnánk a keletkező  $EF_{n-1}$ , illetve a fogyó  $EF_n$  mennyiségét. Az új egyensúlyban mérhető egyenest a 13. ábrán látható módon  $t_0$ -ra extrapoláltuk, és  $t_1$   $t_2$   $t_n$  időknél megmértük az extrapolált egyenes és a tényleges mérési görbe közötti különbséget  $/d_n/$ . Ez az a termékmennyiség, amivel a rendszerünk kevesebbet termel  $t_e - t_n$  idő alatt, mint az új egyensúlyba került rendszer termelt volna ugyanennyi idő alatt. Ebből, és a hozzátartozó  $t_e - t_n$  időkből számítható egy enzimegység mennyiség. Ez, bár nem azonos az adott időpontban aktuálisan

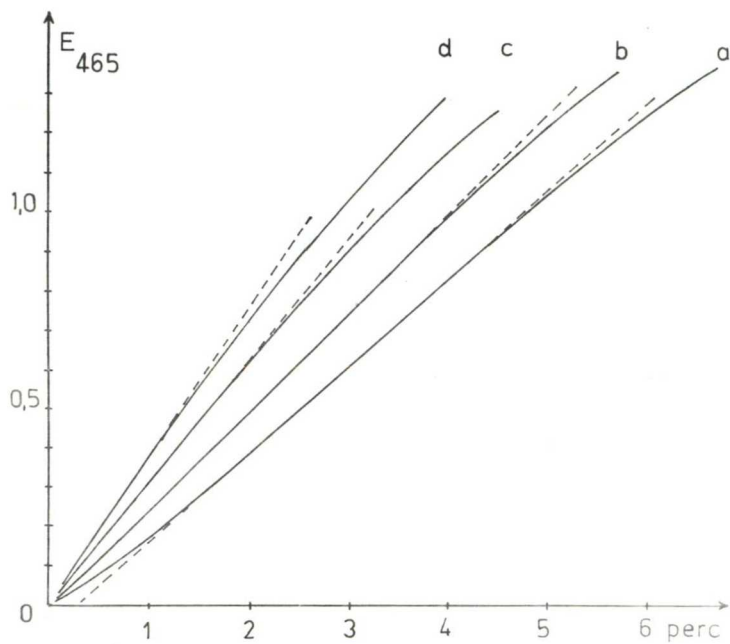
még hiányzó enzimegységgel, de azzal valamilyen módon arányos mennyiség, és alkalmas mérőszámnak látszik arra, hogy az új egyensúly beálltának sebességét mérni tudjuk vele. Az így számolt értékek elsőrendű kinetika szerint kezelhetőek a hiány 50-70%-os csökkenéséig. /Ismételten hangsúlyozzuk, hogy ez nem valódi reakciókinetika, hanem egy alkalmasan megválasztott mérőszám változásának kinetikája, aminek a sebesség állandóját  $k^{**}$ -al jelöltük/. Azt, hogy ez mégsem teljesen önkényes, és elég szoros kapcsolatban áll az új egyensúly beálltának kinetikájával, bizonyítja az az eredményünk, hogy a különböző enzimkoncentrációknál így meghatározott  $k^{**}$  értékek koncentrációfüggést mutatnak, és a /8/-nak megfelelően a higitással beszorozva közel állandó értéket adnak, amint az a következő táblázatból kitűnik.

V. táblázat

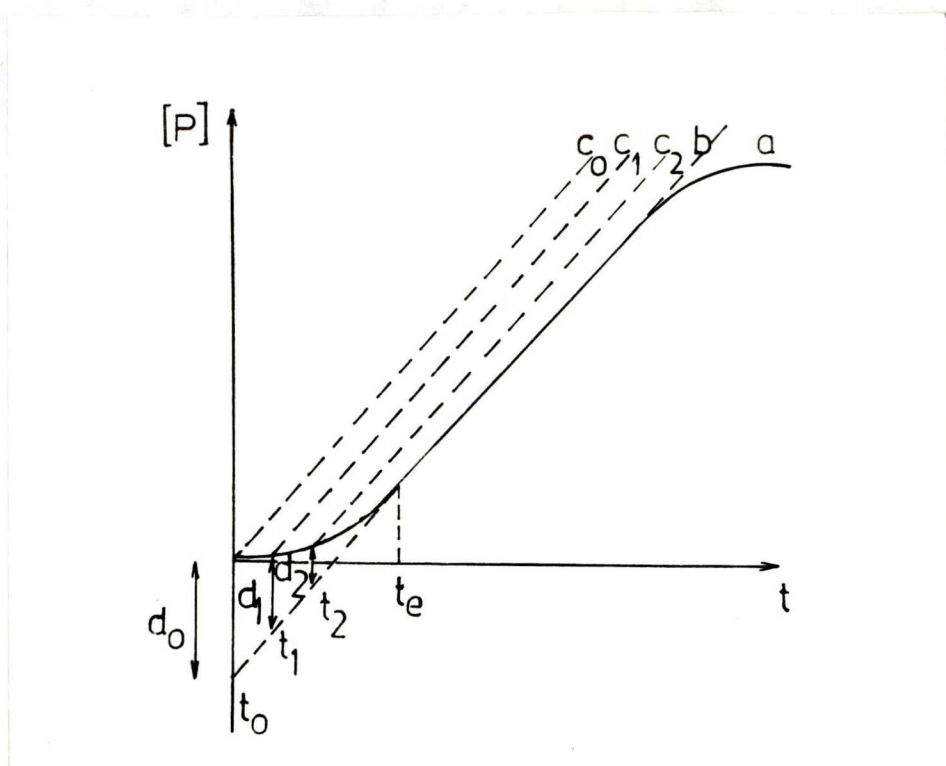
higitás	$k^{**}$ /perc <sup>-1</sup> /	$k^{**}$ x hig.	$k^{**}$ x hig <sup>2</sup>
151	2,4718	373,24	56,36 x 10 <sup>3</sup>
167,7	1,5906	266,74	44,73 "
201	2,1719	436,55	87,75 "
231,8	1,215	281,63	65,28 "
301	0,7554	153,15	68,44 "
429,6	0,3379	145,17	62,37 "
601	0,3661	220,05	132,25 "

Ilyen módon az aktiválódási lépés formálisan elsőrendű kinetika szerint kezelhető, és ezt használtuk fel a folyamat pH-függésének vizsgálatára.





12. ábra: Az alkohol oxidáz aktivitásmérési görbéi  
 a/ a reakció enzimmel indítva  
 b/ az enzim 2 percig, c/ 5 percig d/ 10 percig elő-  
 inkubálva a reakcióelegyben, a reakció szubsztráttal  
 indítva.



13. ábra: Az alkohol oxidáz aktivitásmérési görbéjének formális analizise

a/ mért görbe

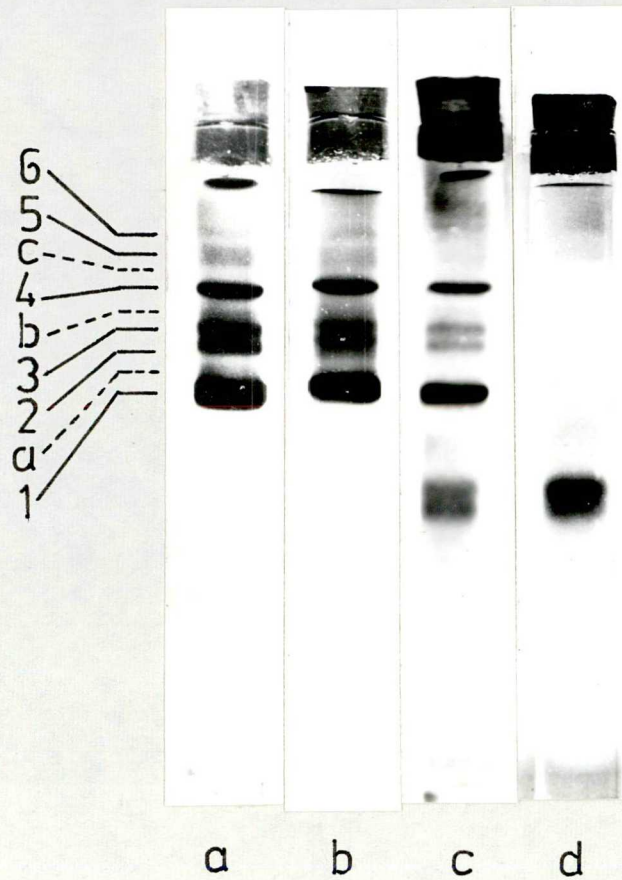
b/ a termékkoncentráció időbeli növekedése az új egyensúly beállta után,  $t_0$ -ra extrapolálva

$c_n$ / mint b, de  $t_n$  időből indulva

$d_n$ / az a termékmennyiség, amivel az új egyensúlyba került rendszer  $t_e - t_n$  idő alatt többet termel, mint a valódi rendszerünk, ugyanannyi idő alatt.

## 2/h Az alkohol oxidáz aktiv formái

Az eddigi kísérleteink egyre inkább arra utaltak, hogy az alkohol-oxidáznak legalább két, egymással asszociációs-disszociációs egyensúlyban lévő aktiv formája van. Ezeket azonban az enzim tisztítása során sem az ioncserés, sem a géلكromatográfiás lépés során nem tudtuk izolálni. Erre a poliakrilamid gélelektroforézis bizonyult alkalmasnak. Az enzimnek 9 aktiv formáját tudtuk ezen a módon egymástól elválasztani / 14/a ábra/. Ezek közül 3 minor komponens, amelyek csak friss, kb. 1 napos homogenizátumban mutatható ki, és gyorsan eltűnnek a rendszerből. Ezen kívül a gél tetje is festődik, ez a csík azonban a reelektroforetikus kísérletek alapján inkább részben denaturálódott enzimnek felel meg, amely az aggregáció miatt nem tud bevándorolni a gélbe. Azt, hogy ezek az aktiv formák valóban asszociációs-disszociációs egyensúlyban vannak egymással, a reelektroforézises kísérleteink igazolják. A gélből kivágott aktiv csíkokat újra elektroforizáltuk, és amint azt a 15/a ábra is mutatja, a kiindulási enzimforma mellett más enzimformák is megjelentek. A reelektroforetikus kísérletekből azt a következtetést is levonhatjuk, hogy az egyensúly az 1. forma irányában van eltolva. Felmerül a kérdés, hogy miért nem válnak el a géلكromatográfia, illetve az ioncserés kromatográfia során egymástól ezek az aktiv formák. A PAGE lehetőséget nyújtott a kromatográfiai aktiv csucsainak analizisére. A 16. ábra egy DEAE ioncserés kromatográfia aktiv csucsainak analizisét mutatja, és látszik, hogy a csucs nem homogén, az elektroforetikus kisebb mobilitású enzimformák később eluálódnak az oszlopról, tehát felületi töltéskülönbségeik alapján részben elválnak egymástól. Ez az elválás azonban lényegesen rosszabb, mint a PAGE során tapasztalt, így arra kell



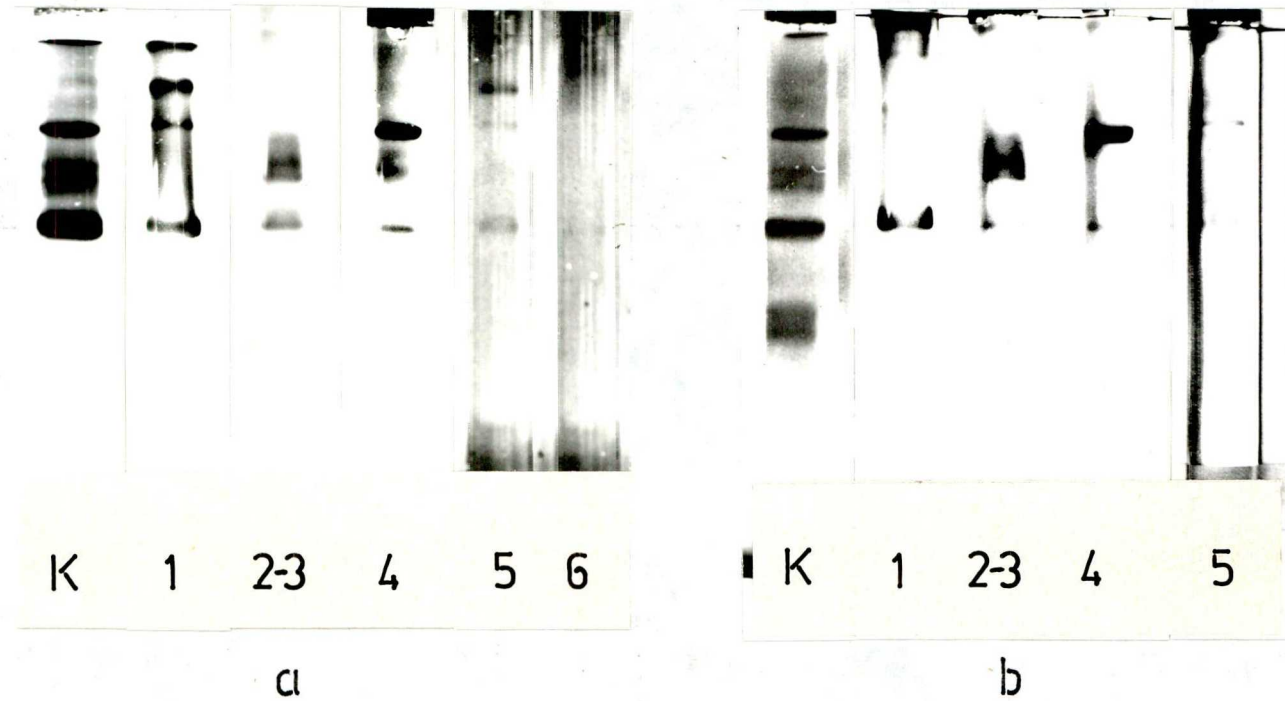
14. ábra: Sejtmentes kivonatok elektroforézise, enzimaktivitásra festett gélek.

a/ alkohol oxidáz

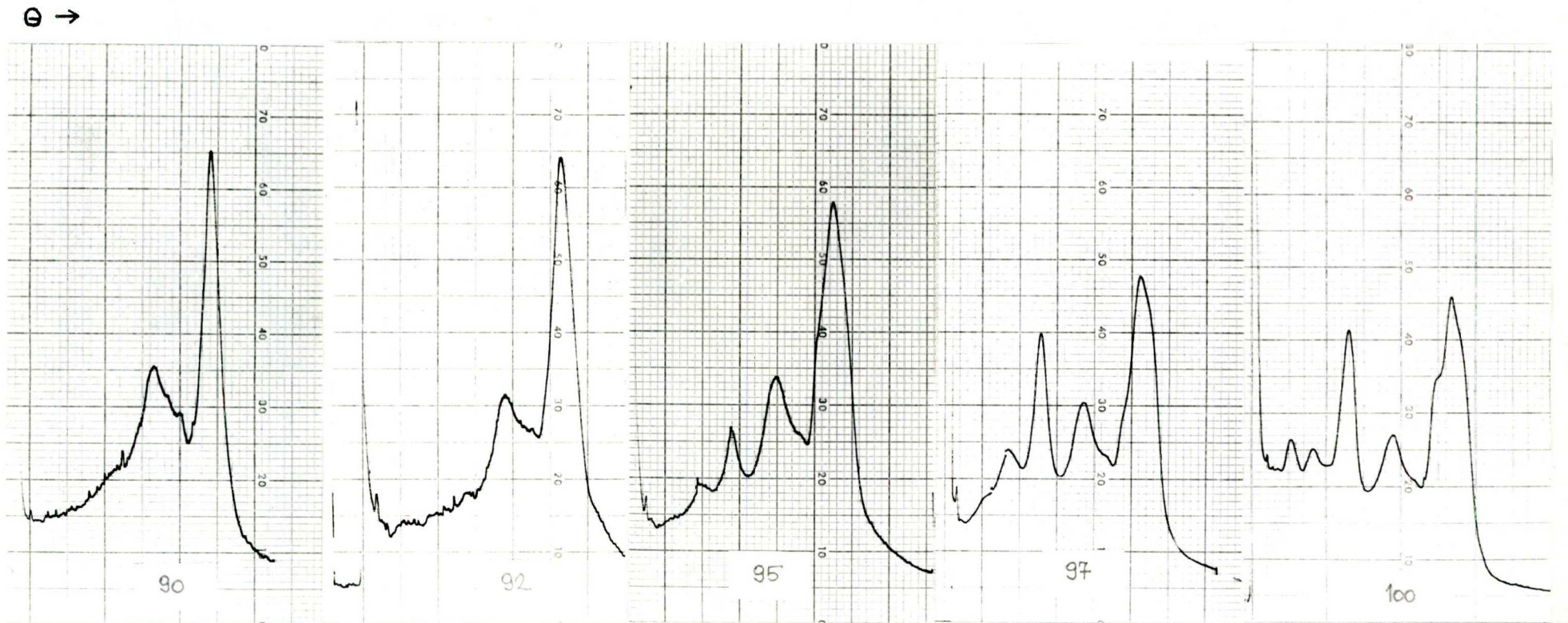
b/ L- $\alpha$ -OH-sav oxidáz

c/ D-aminosav oxidáz, metanolon nőtt sejtek sejtmentes kivonatából

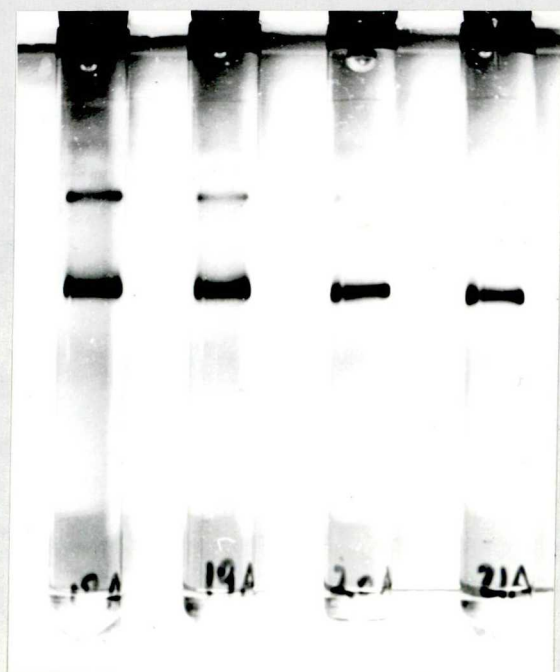
d/ D-aminosav oxidáz glükózon nőtt sejtek sejtmentes kivonatából



15. ábra: Izolált aktív enzimformák reelektroforézise. A gélek számozása azonos a vizsgált enzimformák számozásával / vö. 14/a ábra / a/ alkohol oxidáz és b/ D-aminosav oxidáz aktivitásra festve. K= kontroll.



16. ábra: DEAE ioncserés kromatográfiával nyert / vö. 1.ábra / alkohol oxidáz-aktív frakciók PAGE analizise, aktivitásra festett gélek scanning képei. A számok a frakciószámot jelentik.



17. ábra: Egy Seph. 6B kromatográfia / vö. 2.ábra / alkohol oxidáz-aktiv frakcióinak elektroforetikus analizise, aktivitásra festett gélek.

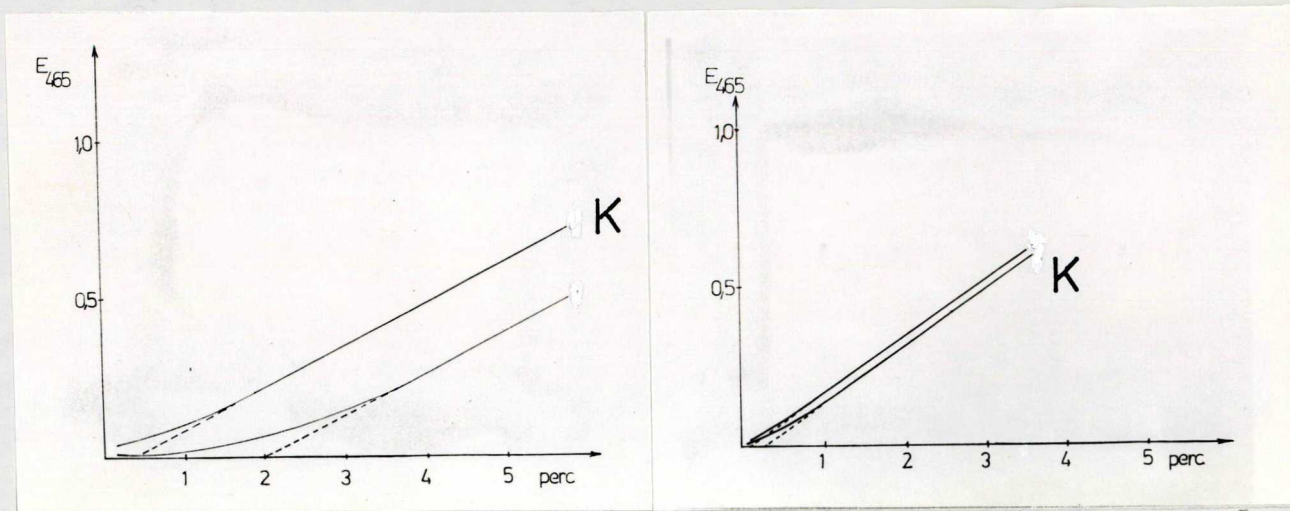
következtetnünk, hogy a PAGE elválás nem elsősorban a töltés-különbségnek, hanem inkább az eltérő molekulaméretnek tulajdonítható. Ezt támasztja alá a Seph. 6B kromatográfia aktív csúcsa frakcióinak analizise is. A 17. ábrán látható, hogy a kisebb elektroforetikus mobilitású enzimformák az eluciós térfogat növekedésével eltűnnek, így legkisebb molekulásulymuk az 1. forma, legnagyobbak pedig a 6. forma tekinthető.

## 2/i A NaCl hatása az aktiválódási lépésre és az aktív formák arányára

Az enzim tisztítása során láttuk, hogy az ioncserés kromatográfiát követően a mérhető össz. enzimegység mindig kevesebb, mint a következő tisztítási lépés, a Sepharose 6B kromatográfia után. Erre az egyik lehetséges magyarázat az, hogy az elucióhoz használt NaCl gátolja az enzim aktivitását. Ennek bizonyítására sejtmentes kivonatot inkubáltunk 0,3 M NaCl jelenlétében 0 °C-on és folyamatos regisztrálással mértük az enzim aktivitását, illetve elektroforetikusan analizáltuk az aktív enzimformákat / 18. ábra /.

Azt tapasztaltuk, hogy a NaCl erősen megnöveli az aktiválódási szakasznál az egyensúly beálltához szükséges időt, illetve jelenlétében erősödnek a kisebb mobilitású enzimformák csikjai. Ezek alapján arra kell következtetnünk, hogy a NaCl jelenléte csökkenti a disszociáció sebességét és így stabilizálja a nagyobb molekulásulyu komplexeket. Ez az eredmény magyarázatot ad arra is, hogy az enzim tisztítása során a Sepharose 6B kromatográfia után miért mérünk mindig több enzimegységet az eluensben, mint amennyit az oszlopra felvittünk. A NaCl hatása azt a következtetést is megengedi, hogy a komplexet összetartó erők elsősorban nem ionos természetűek - amint erre már az inaktiválódás pH-függésénél is következtettünk - hiszen





$a_1$

$a_2$



18. ábra:  $a_1$ / 0,3 M NaCl és  $a_2$ / 45% glicerín hatása az aktíválódási lépésre, 24 órás, 0 °C-os inkubálás után.  
 $b_1$  és  $b_2$ /  $a_1$  és  $a_2$  PAGE analízise, K/ kontroll

akkor a NaCl-nak elő kellene segítenie a disszociációt. Ezt erősíti meg az a kísérletünk is, amikor az enzimet 45 % glicerin jelenlétében inkubáltuk. A glicerin enyhe hidrofób ágens és amint azt a 18. ábra mutatja, valóban lecsökkenti az aktiválódási lépésnél az egyensúly beálltához szükséges időt, illetve csökkenti a kisebb mobilitású enzimformák arányát.

## 2/j A többszörös aktiv forma oka

Felmerült a kérdés, hogy mi okozza az alektroforetikusan megkülönböztethető 9 aktiv formát. Azt, hogy ezek azonos alegységekből álló oligomerek, a tisztított enzim SDS-PAGE analízise alapján elvetettük, és más irányban kerestük a jelenség okát. Az irodalmi összefoglalóban már hivatkoztunk arra, hogy az alkohol-oxidáz strukturában lévő enzim, a D-aminosav oxidázzal, az L- $\alpha$ -OH sav oxidázzal és a katalázzal együtt, bár a kataláz eltávolítása után megmarad a peroxiszómák jellegzetes strukturája.

Feltételeztük ennek alapján, hogy a többszörös aktiv formát az AO, a DAO és a HAO különböző arányú komplexei okozzák. Mivel az utóbbi két enzim is oxidáz, ezért az AO-hoz hasonlóan jól vizsgálhatók aktivitásra festéssel poliakrilamid gélekben. A 14/b,c ábrán látható, hogy mind a HAO, mind a DAO ugyanolyan elektroforetikus mobilitású aktiv formákkal rendelkezik, mint az AO. A DAO esetében további két, nagyobb mobilitású enzimformát is találtunk. A glükózon növekvő sejtekből készített sejtmontes kivonatban csak ez az utóbbi két DAO forma volt jelen / 14/d ábra/, AO és HAO aktivitás nem mutatható ki.

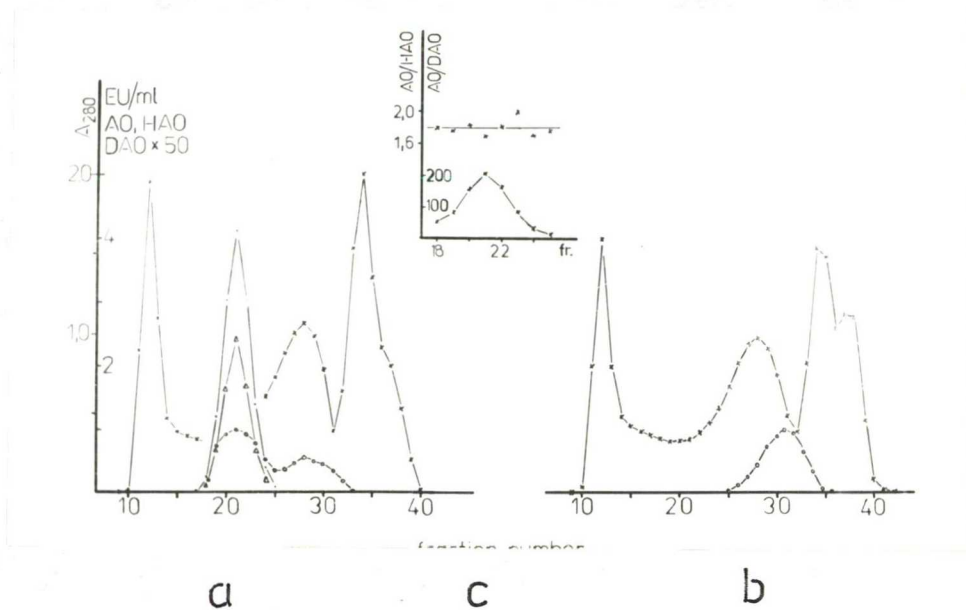
A három enzim azonos, illetve közel azonos elektroforetikus mobilitása megerősítette feltételezésünk helyességét, ezért ebbe az irányba folytattuk tovább vizsgálódásunkat. Elvégeztük

a kivágott aktív formákkal a re-elektroforetikus kísérleteket a DAO és a HAO esetében is. Ezek eredménye mindkét enzim esetében azonos volt az alkohol oxidázzal végzett kísérletekben kapott eredménnyel / 15/b ábra, a HAO-t nem tüntettük fel külön /. Az ellenőrző kísérletekben, a katód felé futtatott gélek esetében nem találtunk aktív csúkokat egyik enzimmél sem.

A komplex létezésére további bizonyítékot kaptunk Seph.6B-n végzett gélkromatográfiával / 19. ábra /. Metanolon nőtt sejtek sejtmentes kivonatát kromatografálva azt kaptuk, hogy az AO együtt eluálódik a HAO-val és a DAO két aktív csúcsa közül az elsővel. A glükózon nőtt sejtek kivonatát kromatografálva AO és HAO aktivitást nem sikerült kimutatni, és csak a kisebb molekulasúlyú DAO csúcs jelent meg. Az ábra inzertjén feltüntettük az AO arányát a másik két enzimhez viszonyítva. Az AO/HAO arány az aktív frakcióban végig azonosnak tekinthető, míg az AO/DAO arány változik. Ehhez hasonlóan vizsgáltuk az AO/DAO arányt az ioncserés kromatográfia frakcióiban is /20. ábra /. A két enzim aránya itt is változik. Az első frakciókban az egy AO egységre jutó DAO mennyisége nagy, ami még magyarázható az AO előtt eluálódó DAO csúcs átfedésével. Ezután a DAO relatív mennyisége lecsökken, majd erős növekedés után ismét csökken.

Annak alapján, hogy a gélkromatográfia AO aktív frakcióiban az AO/HAO arány állandó, felvetődött az a lehetőség, hogy a HAO nem önálló enzim, hanem azonos az alkohol oxidázzal. Ezt az előző eredményeink közül még a következők is alátámasztják:





19. ábra: a/ metanolon és b/ glükózon nőtt sejtek sejtmentes kivonatának gélkromatográfiája Seph. 6B oszlopon.

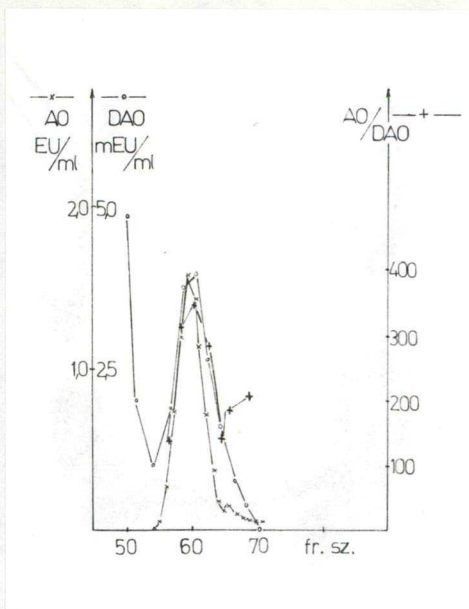
-x- fehérje

-.- AO

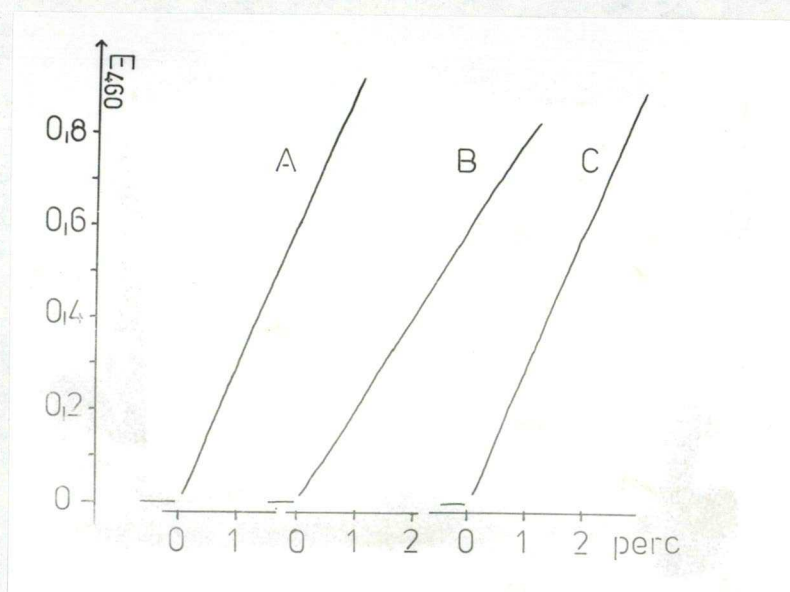
-- HAO

-o- DAO

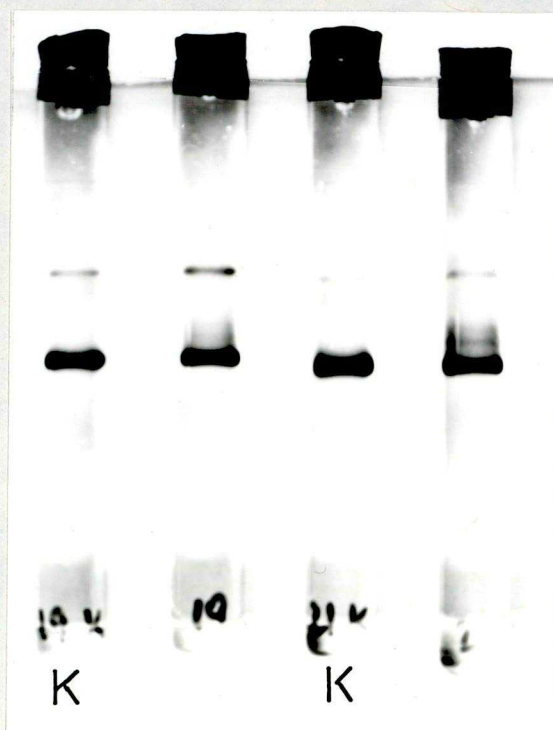
c/ AO/DAO és AO/HAO arányok a közös aktív csucsban.



20. ábra: AO/DAO arányok egy ioncserés kromatográfia / vö. 1. ábra / közös aktív csúcsában



21. ábra: Tisztított enzim aktivitásmérési görbéi A/ metanol, B/ tejsav és C/ a két szubsztrát együttes jelenlétében



22. ábra: Seph. 6B kromatográfiával nyert alkohol oxidáz-aktív frakciókhoz hozzáadva a glükózon nőtt sejtek sejtmentes kivonatából ugyanígy nyert D-aminosavoxidáz. 2 óra inkubálás után elektroforetikusán analizálva, alkohol oxidázra festve.

- a DL-tejsavra kapott  $V_m$  érték azonos az AO többi szubsztrájtjára kapott értékkel;
- az AO-val azonos számú és elektroforetikus mobilitású aktiv formája van;
- az aktiv formák re-elektroforetikus mobilitása és változása is azonos az AO-éval.

A feltételezést az eddigieken kívül a következő kísérlettel is igazoltuk: amennyiben egymástól független enzimekről van szó, akkor ezek reakcióinak / mindkét esetben a  $H_2O_2$  termelést mértük / a két szubsztrát együttes jelenlétében összegződnie kell. Ezzel szemben az elvégzett kísérlet azt mutatta, hogy a két reakció nem összegződik, tehát a HAO azonosnak tekinthető az AO-val /21. ábra/, így a komplexben résztvevő enzimek körét szűkíteni lehet.

A felsorolt bizonyítékok alapján az aktiv enziformák elektroforetikus különbségét elsősorban az AO/DAO arány változásának lehetett tulajdonítani. Ezt a következő, közvetlen bizonyítékot szolgáltató kísérlettel igazoltuk: a glükózon nőtt sejtek kivonatának Seph 6B kromatográfiája során kapott DAO aktiv frakciókat összegyűjtöttük, és betöményítés után hozzáadtuk a metanolon nőtt sejtek kivonatának kromatográfiája során nyert AO aktiv frakciókhoz. Két óra inkubálás után az elegyet elektroforetikusan analizáltuk / 22. ábra /. Mind az AO, mind a DAO esetében azt találtuk, hogy az 1. csík intenzitásának csökkenése mellett a 4. csík erősödött, illetve megjelent az "a" és a 2. csík.

#### 2/k Az alkohol oxidáz és a kataláz kölcsönhatása

Az irodalmi bevezetőben már hivatkoztunk arra, hogy a kristályszerű strukturában a kataláz is résztvesz. Ez azon-

ban nem tekinthető erős kölcsönhatásnak, mert ozmotikus sokkal a kataláz eltávolítható úgy, hogy az erősen rendezett struktúra megmarad.

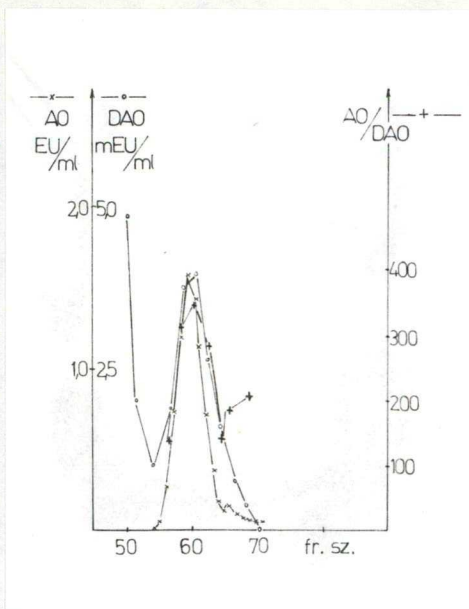
Elvégeztük a kataláz PAGE analízisét metanolon nőtt sejtek sejtmentes kivonatából / 23. ábra /. A kataláz is több aktiv enziformával rendelkezik, ezek  $R_f$  értékeit azonban nem lehet az oxidázokkal kielégítően összehasonlítani, mert a kataláz aktivitásra festésre sokkal diffuzabb csíkokat eredményez. Ezért a két enzim kölcsönhatásának vizsgálatára az előzőektől eltérő módszereket alkalmaztunk:

a/ Vizsgáltuk az alkohol-oxidáz hatását a kataláz hőinaktiválódására. Ehhez előzőleg megmértük a kataláz hőinaktiválódását egyrészt sejtmentes kivonatban, másrészt tisztított enzimet használva, pH 7,5-ön, 50 °C-on. Az enzim inaktiválódása sejtmentes kivonatban mérve kétlépcsős folyamat, az aktivitás kb. 40-45 %-ának gyors elvesztése után egy, az előzőnél lassabb folyamatban következik be a teljes inaktiválódás / 24/a ábra /. A tisztított enzim hőinaktiválódása ugyanilyen körülmények között erősen eltér a sejtmentes kivonatban lévő enzimetől, ebben az esetben a kétlépcsős inaktiválódás alig észrevehető /24/b-1 ábra/. A két enzim kölcsönhatását a tisztított enzimek összeöntése után vizsgáltuk.

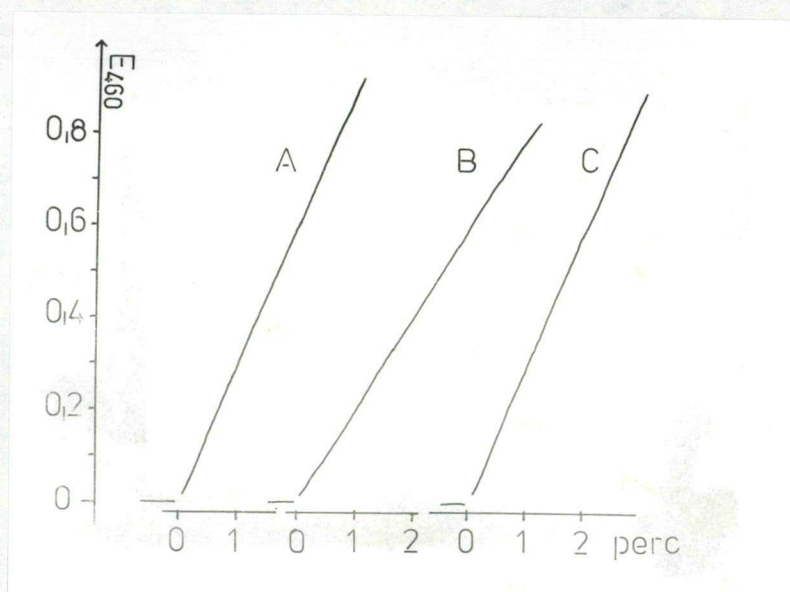
Alkohol-oxidáz jelenlétében a kataláz hőinaktiválódásának jellege ismét a sejtmentes kivonatban mért inaktiválódáshoz válik hasonlóvá / 24/b-2 ábra /.

b/ A két enzim kölcsönhatását spektrofotometriás vizsgálatokkal is megpróbáltuk bizonyítani. Erre az enzimek látható színképtartományában felvett spektrumának vizsgálatát használtuk. Az összegspektrumot úgy vettük fel, hogy izolált küvetékbe

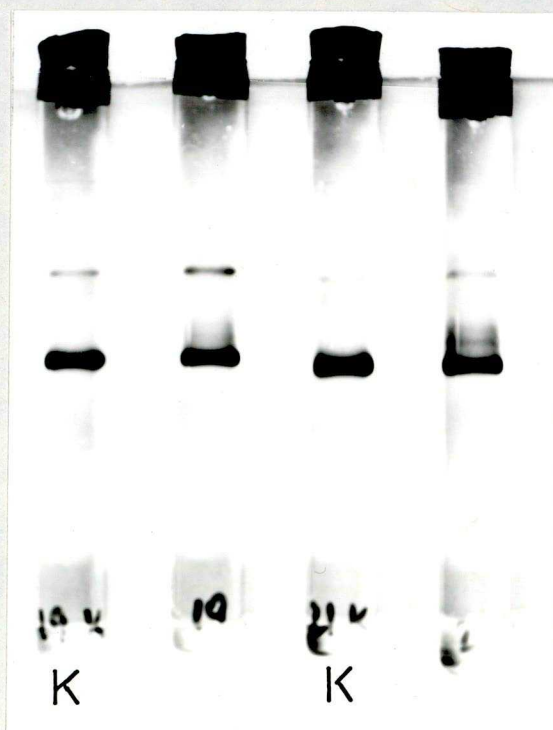




20. ábra: AO/DAO arányok egy ioncserés kromatográfia / vö. 1. ábra / közös aktív csúcsában



21. ábra: Tisztított enzim aktivitásmérési görbéi A/ metanol, B/ tejsav és C/ a két szubsztrát együttes jelenlétében



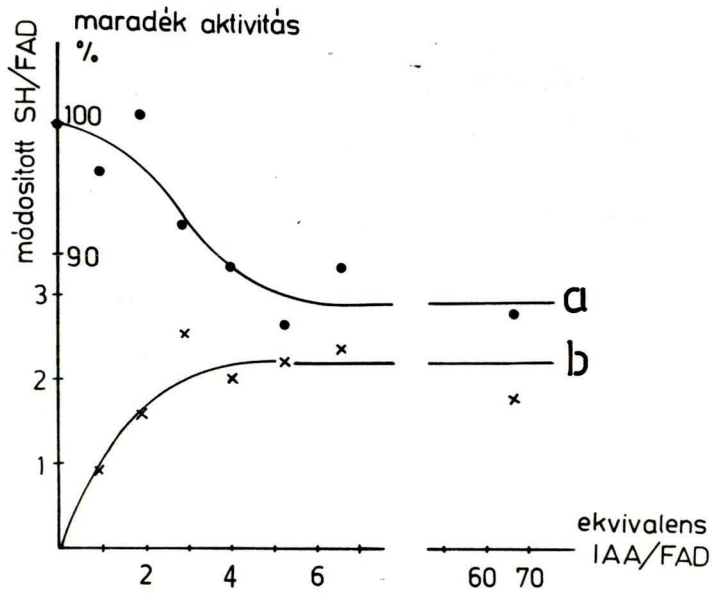
22. ábra: Seph. 6B kromatográfiával nyert alkohol oxidáz-aktív frakciókhoz hozzáadva a glükózon nőtt sejtek sejtméntes kivonatából ugyanígy nyert D-aminosavoxidáz. 2 óra inkubálás után elektroforetikusán analizálva, alkohol oxidázra festve.

helyeztük a 2x higitott AO-t és KAT-t. Ezután felvettük a két enzim 1:1 térfogatarányban összeöntött elegyének spektrumát is. A kettő különbségéből számoltuk ki a differenciaspektrumot közvetlenül az összeöntés, illetve négy órás inkubálás után. Amint azt a 25. ábrán bemutatjuk, az összeöntés jól mérhető spektrumváltozást okoz az összegspektrumhoz viszonyítva. Az extinkciókülönbségek 4 órás inkubálás után, különösen a rövidebb hullámhosszokon nagyobbakká válnak, ami figyelembevételre, hogy a differenciaspektrum jellege nem változik meg, inkább a fényszórás növekedésének tulajdonítható. Ez viszont az oldott molekulák méretének növekedésére, azaz a komplexképződésre utalhat.

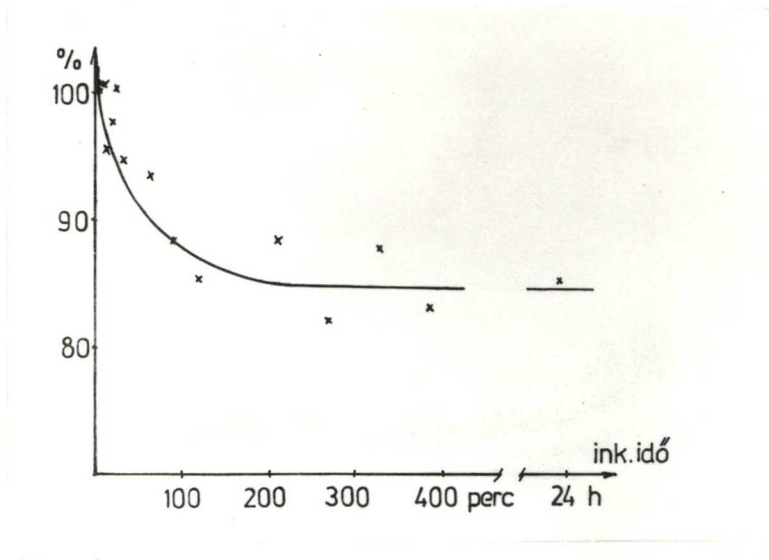
#### 2/1 Az SH-csoportok szerepe az AO stabilitásában

Az aktivitás és a hőinaktiválódás pH-függése vizsgálatakor kapott eredményeink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az elektrolitikus disszociációra képes aminosav oldalláncok nem a katalizisért, hanem az aktivitáshoz szükséges konformáció fenntartásáért felelősek. Említettük már, hogy az enyhén lúgos pH-tartományban nem lehet eldönteni az aminosav oldallánc természetét, ezért specifikus kémiai módosítással próbálkoztunk. A számbajöhető aminosavak közül a ciszteint választottuk ki, elsősorban azért, mert az irodalomban közölt adatok, és saját méréseink is azt mutatták, hogy az alkohol oxidáz 100 %-ig gátolható p-Cl-merkuribenzoáttal /PCMB/. A PCMB-n kívül megvizsgáltuk a jódecetsav /IES/ és az N-etilmaleimid /NEM/ gátló hatását is a sejtmentes kivonatban lévő enzimre /26. ábra/. A kísérleteket úgy végeztük, hogy az adott koncentrációju reagens jelenlétében 30'-ig, 0 °C-on előinkubáltuk az enzimet, majd visszamértük a maradék aktivitást. A PCMB-vel ellentétben azt kaptuk, hogy

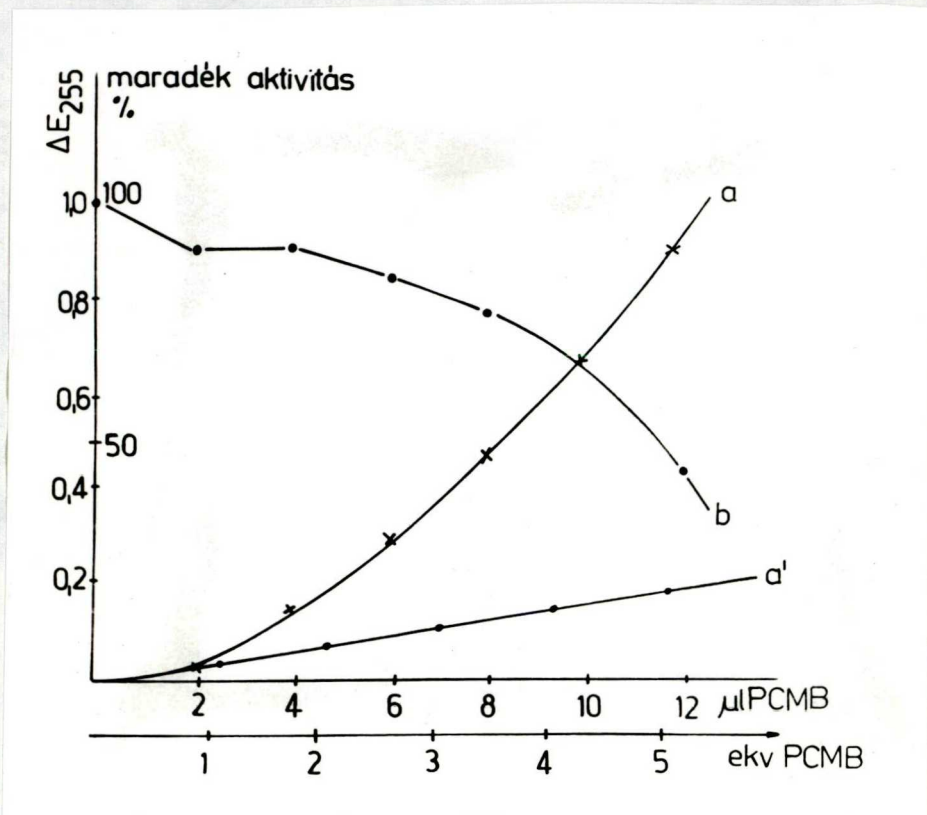
az IES 50 %-os gátlást okoz, míg a NEM nem gátolja az enzimet. Ez az eredmény kétségesé teszi az SH csoportok kizárólagos konformációstabilizáló szerepét, azonban ahhoz, hogy ezt biztosan állíthassuk, a kísérleteket tisztított enzimmel is el kellett végeznünk, célszerűen úgy, hogy a gátló hatást az SH-csoportok mérésével kapcsoltuk össze. Mivel a tisztított enzimpreparátumunk az előző fejezetek tanúsága szerint AO-DAO komplexnek tekinthető, ezért az SH-csoportok számának vonatkoztatási alapja nem lehet az enzimmolekula, vagy az alegység, így a preparátum FAD-koncentrációját tekintettük vonatkoztatási alapnak. A tisztított enzim esetében a jódacetamid /IAA/ és a PCMB gátló hatását vizsgáltuk úgy, hogy az enzimet 30'-ig, 0 °C-on inkubáltuk a legkisebb reagenskoncentráció mellett, majd aktivitás és össz SH mérésre kivettünk mintát, és újabb reagensmennyiséget adtunk a rendszerhez. A növekvő koncentrációju IAA gátló hatását a 27. ábra mutatja. A maximálisan elérhető gátlás kb. 15 % volt, miközben FAD-onként 2,2 SH-csoport módosult, a maximálisan mérhető 10-10,5-ből. Ennél több SH még 60x feleslegű reagens hatására sem módosult a kísérleti körülmények között, illetve a gátlás sem növekedett. A gátlás kinetikájának mérésekor / 28. ábra / is azt tapasztaltuk, hogy 4x reagens-felesleg is csak 15 %-ig gátol még 25 órás inkubálás után is. A növekvő koncentrációju PCMB hatására kialakuló gátlásban szintén megfigyelhető egy kb. 15 %-os gátlás 2 ekvivalens reagens hatására, azonban ebben az esetben a reagens koncentrációjával a gátlás is növekszik / 29. ábra /. A kérdés az volt, hogy a teljes gátlás PCMB esetében annak köszönhető-e, hogy a reagens azokkal az SH-csoportokkal is el tud reagálni, amivel az IAA már nem,



27. ábra: Növekvő koncentrációju IAA hatása a tisztított alkohol oxidáz a/ aktivitására és b/ SH tartalmára



28. ábra:  $10^{-3}$ M IAA gátlás kialakulása  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, 4x-es reagensfelesleg mellett.



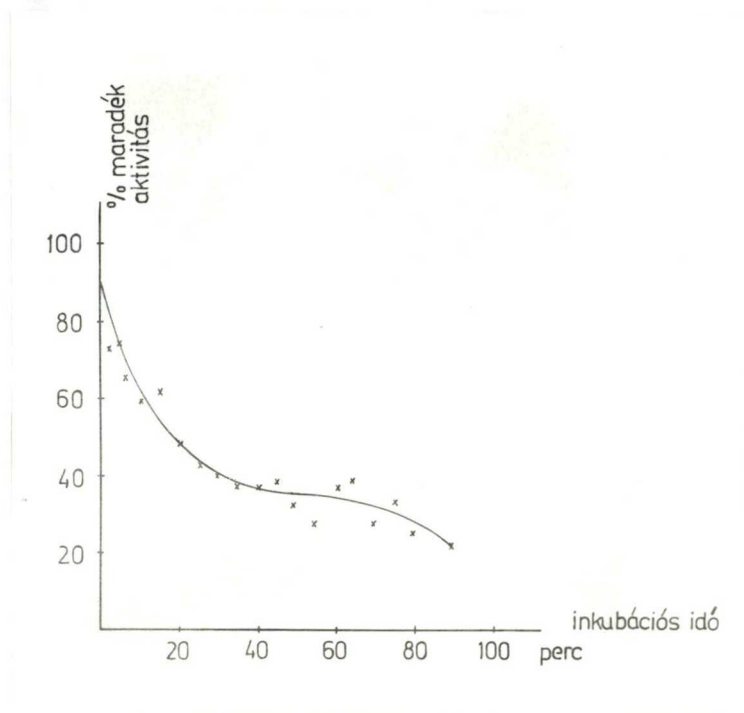
29. ábra: Növekvő koncentrációju PCMB gátló hatása a tisztított alkohol oxidázra. Egy-egy reagenskoncentrációnál 5 percig inkubáltunk szobahőn, majd aktivitásméréshez mintát kivéve a következő reagensmennyiség hozzáadásával folytattuk a mérést.

a/  $\Delta E_{255}$

a'/ számított maximális  $\Delta E_{255}$

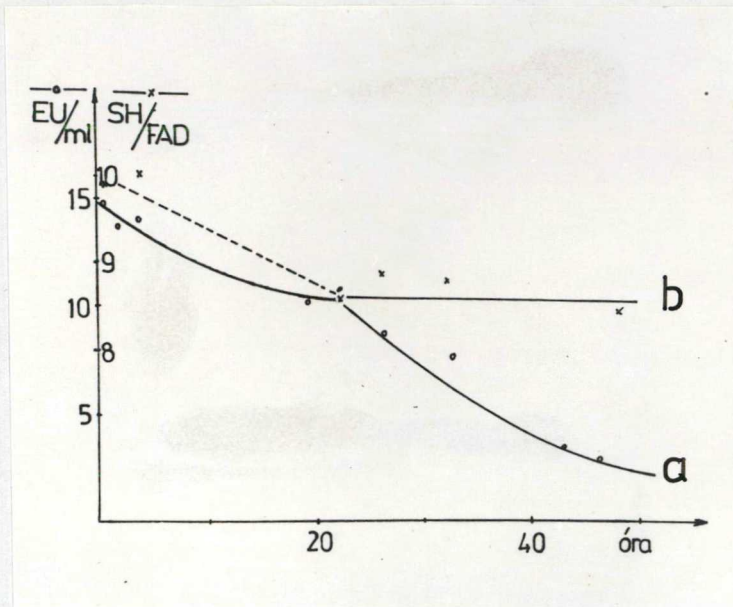
b/ maradék aktivitás

A  $\Delta E_{255}$  számításához a  $\Delta \epsilon_{255}^M = 6,286 \times 10^3$  értéket használtuk, amelyet ismert koncentrációju cisztein titrálásával határoztunk meg.

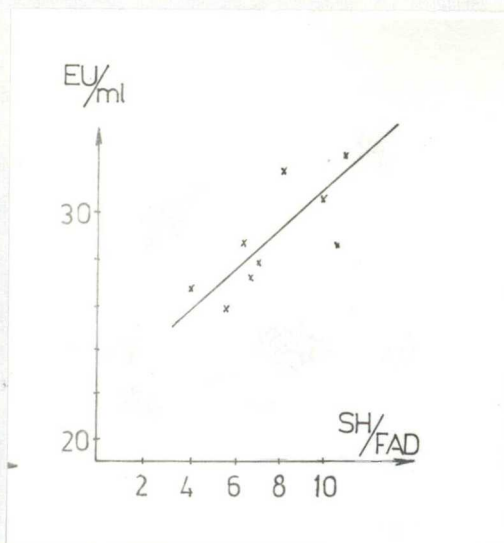


30. ábra:  $10^{-3}$ M PCMB gátló hatásának kialakulása 0 °C-on,  
4x-es reagensfelesleg mellett.





31. ábra: Tisztított alkohol oxidáz hőinaktiválódása 30 °C-on /a/ és SH tartalmának változása /b/



32. ábra: Tisztított alkohol oxidáz enzimpreparátumok SH tartalmának és aktivitásának viszonya 0 °C-on tárolt enzimek esetében.

vagy pedig aspecifikus denaturáló hatásról van szó, ami a PCMB esetében gyakori. Ezekben a kísérletekben az SH-val való reakciót a 225 nm-es  $\Delta E$  mérésével követtük. Az így kapott  $\Delta E$  értékek azonban lényegesen nagyobbak, mint az elméletileg várható / 29/a ábra/, ezért inkább az aspecifikus denaturáló hatás látszik valószínűbbnek, annál is inkább, mert a 3. ekvivalens PCMB hozzáadásától kezdve az oldat enyhén opállossá vált. Erre utal a gátlás kinetikája is, ahol a görbe lefutása emlékeztet a hőinaktiválódás kinetikájára / 30. ábra /.

Megmértük a 30 °C-os hőinaktiválódás során az SH-csoportok spontán módosulását is / 31. ábra /. Ekkor az aktivitás 85 %-ának elvesztése után is csak 2,2 SH-csoporttal kevesebb mutatható ki FAD-onként. A többi SH-csoport részvétele a konformáció stabilizálásában valószínű nem jelentős. A 0 °C-on, tehát kevésbé denaturáló körülmények között tartott enzimpreparátumok aktivitása és SH-tartalmának változása / 32. ábra / mindenesetre szintén erre utal, ugyanis ekkor még 6-6,5 SH/FAD spontán módosulása is csak 20-25 % aktivitásveszteséggel jár.

#### IV. A KISÉRLETEK ÖSSZEFOGLALÁSA ÉS MEGBESZÉLÉS

Munkánk célja a rendelkezésünkre álló *Candida boidinii* törzsből izolált alkohol oxidáz jellemzése, illetve anomális viselkedésének magyarázata volt.

Az alkohol oxidázt 70-75-szörös tisztulással, 40-50%-os kitermeléssel izoláltuk / II. táblázat /. Az enzim - spektruma alapján egy flavoprotein, abszorpciós maximumhelyei közel azonosak a különböző fajokból és törzsekből eddig vizsgált enzimek maximumhelyeivel /5. ábra, I.tábl./ . Katalitikus tulajdonságai szintén igen hasonlóak: legjobb szubsztrátja a metanol, az alkoholok szénláncának növekedése a  $K_M$  értékek rohamos növekedésével jár együtt, miközben a  $V_m$  értékek a megvizsgált alkoholokra azonosak maradnak / IV. táblázat /. Ebből azt a következtetést vontuk le, hogy az egyes alkoholok enzimen való megkötődésében van a különbség, az egyszer már megkötődött alkoholok átalakulásának sebessége azonos. Az aktivitás pH-függésének görbéje szintén hasonló az eddig közöltekhez. A legmagasabb aktivitás pH 7,0-8,0 között mérhető, pH 7,0 alatt az aktivitás meredeken csökken, míg pH 8,0 fölött a csökkenés lassabb. Tisztított enzim esetében azonban két maximumu görbét kaptunk, a maximumuk pH 6,0 és 9,5-nél vannak / 6.a.,b. ábra /.

Ezt a jelenséget és a tisztítás során felmerült következő kérdéseket nem tudtuk az irodalomban rendelkezésünkre álló adatok alapján magyarázni.

- Miért csökken lépcsőzetesen a specifikus aktivitás az ioncserés kromatográfia aktív frakcióiban?
- Miért mérünk 2-3x több enzimegységet a Seph. 6B kromatográfia frakcióiban, mint amit az oszlopra felvittünk?
- A kromatográfia szimmetrikus fehérjecsúcsán belül miért változik 100-200%-kal a specifikus aktivitás?

Az első kísérleti eredményeket, amelyek a kérdéseink megválaszolásához elvezettek, az enzim hőinaktiválódásának vizsgálatakor kaptuk. Ez bonyolult lefutású folyamat, sebessége fordított arányban függ a koncentrációtól és az első lépés az enzim aktiválódásával jár / 8. ábra /.

Ennek alapján feltételeztük, hogy az alkohol oxidáz asszociációs-disszociációs egyensúlyban vesz részt, és a disszociáció aktivitásnövekedéssel jár együtt. Feltételezésünket alátámasztotta az enzimreakció "lag" fázisának megfigyelése, ennek előinkubálással való megszüntethetősége, valamint az, hogy a feltételezések alapján levezetett egyszerű rendszerre jellemző reakciókinetikát jól követi a "lag" fázis kinetikája / 12,13. ábra, V. tábl. /.

Az asszociációs-disszociációs rendszerre közvetlen bizonyítékot szolgáltatott az, hogy kimutattuk az enzim 9 aktív formáját, és ezek kölcsönös átalakulását egymásba / 14/a, 15/a ábrák /. Kimutattuk továbbá az ioncserés és gélkromatográfia aktív csucsának inhomogenitását, azt, hogy az aktív csucok frakciói az egyes, elektroforetikusan elválasztható enzimformákat eltérő arányban tartalmazzák /16. és 17. ábrák /. Megmértük a pH-nak a hőinaktiválódás utolsó szakaszára és az enzimreakció "lag" fázisa lefutására gyakorolt hatását, /10,11. ábrák/. Az előbbi egyértelműen függ a pH-tól, az aktív konformáció fenntartásában egy 6,0 körüli pK-ju aminosav oldallánc / valószínűleg hisztidil / és egy valamivel 9,0 fölötti pK-ju aminosav oldallánc vesz részt. A "lag" fázis, vagyis az aktivitásnövekedéssel járó disszociációs lépés pH függése csak részleges, és a NaCl-nak a "lag" fázis megnyulását, valamint a glicerinnek a fázis lerövidülését eredményező hatását figyelembe véve a hidrofób kölcsönhatásoknak is

szerepet kell tulajdonítanunk az asszociációban. Az eddig felsorolt kísérleti eredményeinket figyelembe véve a következő választ adhatjuk a fejezet elején feltett kérdésekre:

Az alkohol oxidáz több, számszerint kilenc aktív formával rendelkező enzim, amelyek közül többnek lényegesen eltér a specifikus aktivitása. Az egyes aktív formák eltérő specifikus aktivitását az irodalomban közölt adatok közül alátámasztja Veenhuis és mts-i megfigyelése is, akik kimutatták, hogy az intakt sejtek - tehát a strukturában lévő enzim - metanoloxidáló képessége körülbelül 3x kisebb, mint a sejtmentes kivonaté, /19/. Ezek felületi töltéskülönbségeik alapján részben elválhatnak egymástól a DEAE cellulózon végzett ioncserés kromatográfia során, ami a specifikus aktivitás lépcsőzetes csökkenését eredményezi az aktív frakcióban. Az elucióhoz használt NaCl elősegíti a kisebb specifikus aktivitású asszociált formák kialakulását. A Seph. 6B kromatográfia során a NaCl elválik az enzimtől, és ez a kromatográfia során bekövetkező higulással együttesen folyamatos disszociálódást eredményez, ami aktivitásnövekedéssel jár együtt. Az aktív csúcs inhomogenitása azt is bizonyítja, hogy az enzim aktív formái molekulasúlyukban is különböznek egymástól. Ebből következik egyúttal az is, hogy az enzim Ms-át nem lehet gélkromatográfián meghatározni, hiszen az aktív csúcs elució s térfogata a Ms szerinti elválás, az eltérő specifikus aktivitások és a kromatográfia során bekövetkező folyamatos disszociáció eredője. A tisztított enzim esetében kapott kétmaximumu aktivitás-pH függési görbe nem az enzim tisztaságával, hanem töménységével - a nyers kivonathoz képest 20x-os - és az aktiválódással járó, valamint a teljes inaktiválódást eredményező lépés eltérő pH függésével magyarázható, és a két folyamat eredőjeként jön létre.



Ezek után arra a kérdésre kerestünk választ, hogy mi okozza az alkohol oxidáz nagyszámu aktiv formáját. Kimutattuk, hogy a D-aminosav oxidáz két aktiv csucsa közül az egyik a géلكromatográfia és az ioncserés kromatográfia során együtt eluálódik az alkohol oxidázzal, míg az L- $\alpha$ -OH-sav oxidáz mindkét kromatográfia során kizárólag csak az AO aktiv frakciókban van jelen. Az AO/DAO arány ezekben a frakciókban változik, míg az AO/HAO arány állandó / 19, 20. ábrák /. Bizonyítottuk továbbá, hogy az alkohol oxidáz PAGE-vel elválasztható aktiv formáival azonos számu és mobilitásu HAO aktiv forma van jelen a sejtmentes kivonatban, míg a DAO az ugyanennyi számu és mobilitásu aktiv formán felül további két, elektroforetikusan elkülöníthető aktiv formával rendelkezik / 14/b, c ábra /. A három enzim együttes aktivitásával rendelkező aktiv zónák reelektroforetikus változásai mindhárom enzimre azonosak / 15/b ábra /. Mivel az alkohol oxidáz és az L- $\alpha$ -OH-sav oxidáz között sem az ioncserés és géلكromatográfia, sem az elektroforézis és reelektroforézis során nem tudtunk különbséget tenni, és a két enzim reakciója sem összegeződik a két szubsztrát együttes jelenlétében / 21. ábra /, valamint a két szubsztrátra kapott  $V_m$  érték is azonos, az L- $\alpha$ -OH-sav oxidázt azonosnak kell tekintenünk az alkohol oxidázzal. A D-aminosav oxidáz viszont különböző enzim, és a géلكromatográfia során nyert AO aktivitás mentes DAO-t hozzáadva az alkohol oxidázhoz, közvetlenül is bizonyítottuk a két enzim kölcsönhatását, illetve a DAO szerepét az alkohol oxidáz aktiv formáinak kialakulásában / 22. ábra /. Az alkohol oxidáznak a kataláz hőinaktiválódására gyakorolt hatása / 24. ábra / és a két enzim összeöntése után bekövetkező spektrumváltozások / 25. ábra /

alapján valószínűsítettük ennek a két enzimnek a kölcsönhatását is, bár nem tudtuk olyan egyértelműen bizonyítani, mint a D-aminosav oxidáz esetében. A katalázsal való kölcsönhatás mellett szól még az is, hogy a tisztított enzim spektrumában jelen van egy, a porfirinekre jellemző 403 nm-es váll. / 5. ábra/.

A felsorolt kísérleteink alapján ezek után az általunk izolált alkohol oxidázt AO-DAO-/KAT/ enzimkomplexnek kell tekintenünk, és az alkohol oxidáz aktív formáinak okát a két /vagy három/ enzimnek az egyes aktív formákban való eltérő arányú résztvételében jelölhetjük meg. Az így kialakított kép azonban valószínűleg csak leegyszerűsítve tükrözi a valóságot, mert a tisztított enzim SDS-PAGE analízise során kapott nagyszámu és erősen eltérő intenzitású csíkok, és az AO alegységének tekintett legintenzívebb csík molsúlyának különbsége a tisztított enzim, illetve a gélből kivágott domináns enzimforma esetében / 7. ábra / arra utal, hogy a valóságban a komplex szerkezete ennél bonyolultabb.

Megvizsgáltuk az SH csoportok szerepét a katalízisben és a stabilitásban. Az irodalmi adatokkal egyezően azt találtuk, hogy a PCMB 100%-ig gátolja az enzimet / 26/c ábra /. Az azonban, hogy a IES csak 50%-ig / 26/b ábra /, az IAA pedig csak 15%-ig gátolja az aktivitást még nagy feleslegben is / 27. ábra /, arra utal, hogy az -SH csoportoknak nincs szerepe a katalízisben és inkább az aktív konformáció fenntartásában lehet szerepük. A gátlás kialakulásának kinetikája az IAA és a PCMB esetében / 28, 30. ábra /, valamint a gátlás mértékének különbsége az IES és az IAA esetében, és a növekvő koncentrációjú PCMB denaturáló hatása / 29. ábra / azonban arra utal, hogy nem az -SH csoportok kémiai módosítása, hanem a módosítással az enzim molekulába

bevitt csoportok aspecifikus térszerkezetváltoztató hatása okoz részleges gátlást, illetve teljes denaturálódást. Ezt támasztja alá az is, hogy az -SH csoportok spontán oxidálódása 0 °C-on csak 15-20%-os aktivitásvesztéssel jár / 32.ábra /, míg 30 °C-on a denaturálódást nem követi az -SH csoportok párhuzamos változása / 31.ábra /.

Az eddig elmondottakon kívül még egy következtetést szeretnénk levonni. Azokban a kísérletekben, amelyekben a "lag" fázis előinkubációval történő megszüntethetőségét vizsgáltuk, azt tapasztaltuk, hogy az előinkubáció valóban megszünteti ezt a fázist, de egyuttal az előinkubáció idejével párhuzamosan lényegesen megnőtt a rendszerben mérhető összaktivitás / 12/b,c,d ábra /. Ez arra utal, hogy a szubsztrát jelenléte stabilizálja az asszociált formát, illetve az egyensúlyi állandó kisebb a szubsztrát jelenlétében. Erre már C. Borman és mtsa is következtettek a peroxiszómák in vivo denaturációját vizsgálva /18/.

Az alkohol oxidáznak, a D-aminosav oxidáznak és valószínűleg a kaataláznak is a komplexképzési hajlama magyarázatot adhat a peroxiszómák igen rendezett kristályszerű strukturájára, és valószínűleg fontos szerepe lehet ennek a sejtszervecskének a sejten belüli spontán kialakulásában.



V. IRODALOMJEGYZÉK

1. F.W. Jansen, R.M. Kerwin and H.W. Ruelius: Alcohol oxidase, a novel enzyme from a Basidiomycete. BBRC, 20, /5/, 630-634, 1965.
2. J.W. Frank and H.W. Ruelius: Crystallization by fractional precipitation with polyethylene glycol. BBA, 151, 330-342, 1968.
3. Y. Tani, T. Miya, H. Nishikawa and K. Ogata: The microbial metabolism of methanol. Agr. Biol. Chem., 36, /1/, 68-75, 1972. /Part I./
4. Y. Tani, T. Miya and K. Ogata: The microbial metabolism of methanol. Part II. Agr. Biol. Chem 36, /1/, 76-83, 1972.
5. T. Fujii and K. Tonomura: Oxidation of methanol, formaldehyde and formate by a Candida species. Agr. Biol. Chem., 36, /13/, 2297-2306, 1972.
6. H. Sahn and F. Wagner: Microbial assimilation of methanol. The ethanol- and methanol-oxidizing enzymes of the yeast Candida boidinii. Eur. J. Biochem., 36, 250-256, 1973.
7. J.P. Van Dijken, R. Otto and W. Harder: Growth of Hansenula polymorpha in a methanol-limited chemostat. Arch. Microbiol., 111, 137-144, 1976.
8. H. Sahn, R. Roggenkamp, F. Wagner and W. Hinkelmann: Microbodies in methanol-grown Candida boidinii. J. General Microbiol. 88, 218-222, 1975.
9. S. Fukui et.al.: Ultrastructure of methanol-utilizing yeast cells: Appearance of microbodies in relation to high catalase activity. J. Bacteriol., 123, /1/, 317-328, 1975.

10. A. Tanaka et.al.: Development of micribodies in the yeast *Kloeckera* growing on methanol. *J. Bacteriol.*, 126, /2/, 919-927, 1976.
11. R. Roggenkamp, H. Sahm, W. Hinkelmann and F. Wagner: Alcohol oxidase and catalase in peroxisomes of methanol-grown *Candida boidinii*. *Eur. J. Biochem.*, 59, 231-236, 1975.
12. J.P. Van Dijken, M. Veenhuis, C.A. Vermeulen and W. Harder: Cytochemical localization of catalase activity in methanol-grown *Hansenula polymorpha*. *Arch. Microbiol.*, 105, 261-267, 1975.
13. N.E. Tolbert: Microbodies-peroxisomes and glyoxisomes. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 22, 45-74, 1971.
14. M. Veenhuis, J.P. Van Dijken and W. Harder: Cytochemical studies of methanol oxidase and other oxidases in peroxisomes of methanol-grown *Hansenula polymorpha*. *Arch. Microbiol.*, 111, 123-135, 1976.
15. N. Kato et.al.: Alcohol oxidases of *Kloeckera* sp. and *Hansenula polymorpha*. Catalytic properties and subunit structures. *Eur. J. Biochem.*, 64, 341-350, 1976.
16. S. Fukui et al.: Microbody of methanol-grown yeasts. Localization of catalase and flavin-dependent alcohol oxidase in the isolated microbody. *Eur. J. Biochem.*, 59, 561-566, 1975.
17. W. Hazen et al.: The fine structure of microbodies in the yeast *Pichia pastoris*. *Experientia*, 31, 926-927, 1976.
18. C. Bormann and H. Sahm: Degradation of microbodies in relation to activities of alcohol oxidase and catalase in *Candida boidinii*. *Arch. Microbiol.*, 117, 67-72, 1978.

19. M. Veenhuis, J.P. Van Dijken, S.A.F. Pilon and W. Harder: Development of crystalline peroxisomes in methanol-grown cells of the yeast *Hansenula polymorpha* and its relation to environmental conditions. *Arch. Microbiol.*, 117, 153-163, 1978.
20. M. Veenhuis, I. Keiser and W. Harder: Characterization of peroxisomes in glucose-grown *Hansenula polymorpha* and their development after the transfer of cells into methanol-containing media. *Arch. Microbiol.*, 120, 167-175, 1979.
21. E. Eggeling and H. Sahm: Depression and partial insensitivity to carbon catabolite repression of the methanol dissimilating enzymes in *Hansenula polymorpha*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 5, 197-202, 1978.
22. T. Fujii and K. Tonomura: Purification and properties of catalase from a methanol-utilizing yeast, *Candida* sp. N-16. *Agr. Biol. Chem.*, 39, /9/, 1891-1892, 1975.
23. H. Yamada et al: Purification and characterization of alcohol oxidase from *Candida* 25-A. *Agr. Biol. Chem.* 43, /4/, 877-878, 1979.
24. D. Keilin and E.F. Hartree: Properties of catalase. Catalysis of coupled oxidation of alcohols. 39 293-301, 1945.
25. R. Rogenkamp, H. Sahm and F. Wagner: Microbial assimilation of methanol. Induction and function of catalase in *Candida boi-dinii*. *FEBS Letters* 41 /2/ 283-286, 1974.
26. J.P. van Dijken, R. Otto and W. Harder: Oxidation of methanol, formaldehyde and formate by catalase purified from methanol-grown *Hansenula polymorpha*. *Arch. Microbiol* 106 221-226, 1975.
27. J.P. van Dijken and W. Harder: Growth yields of microorganisms on methanol and methane. A theoretical study. *Biotechnol. Bioeng.* XVII, 15-30, 1975.

28. H. Schütte, J. Flossdorf, H. Sahm and M.-R. Kula: Purification and properties of formaldehyde dehydrogenase and formate dehydrogenase from *Candida boidinii*. Eur. J. Biochem., 62, 151-160, 1976.
29. L.P. Dudina, L.V. Sukovatova and V.K. Eroshin: Detection of inducible methanol dehydrogenase in the yeast *Hansenula polymorpha* DL-1. Microbial growth on C<sub>1</sub>-compounds. Second International Symposium. Puschino. 1977. 89.
30. T. Fujii and K. Tonomura: Hexose-phosphate as an intermediate in the assimilation of methanol by *Candida* sp. Agr. Biol. Chem. 37, /2/, 447-449, 1973.
31. T. Fujii, Y. Asade and K. Tonomura: Assimilative pathway of methanol in *Candida* sp. Incorporation of <sup>14</sup>C-methanol, <sup>14</sup>C-formaldehyde, <sup>14</sup>C-formate and <sup>14</sup>C-bicarbonate into cell constituents. Agr. Biol. Chem., 38, /6/, 1121-1127, 1974.
32. T. Fujii and K. Tonomura: Incorporation of <sup>14</sup>C-formaldehyde into hexose phosphate by cell-free extract of a methanol-utilizing yeast, *Candida* sp. Agr. Biol. Chem., 38, /9/, 1763-1765, 1974.
33. T. Fujii, Y. Yasuo and K. Tonomura: Assimilation of methanol by *Candida* species N-16. Microbial growth on C<sub>1</sub>-compounds 121-137, 1975.
34. K. Sakaguchi, R. Kurane and M. Murata: Assimilation of formaldehyde and other C<sub>1</sub>-compounds by *Gliocladium deliquescens* and *Paecilomyces varioti*. Agr. Biol. Chem., 39, /9/, 1695-1702, 1975.
35. N. Kato, K. Tsuji, H. Ohashi Y. Tani and K. Ogata: Two assimilation pathways of C<sub>1</sub>-compound in *Streptomyces* sp. No. 239 during growth on methanol. Agr. Biol. Chem., 41, /1/ 29-34 1977.



36. N.Kosaric and J.E.Zajic: Microbial oxidation of Methane and methanol. in: Adv. Biochem. Eng. 3, 89-125  
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1974.
37. A.N.Glazer, R.J.Delange and D.S.Sigman: Chemical modification of proteins 113-117. North-Holland/American Elsevier, 1975.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni dr. Boross László professzornak, hogy lehetőséget nyújtott tanszékén a munka elvégzésére, illetve, hogy ennek feltételeit folyamatosan megteremtette számomra. Köszönöm a munka közben tanúsított folyamatos érdeklődését és hasznos utmutatásait, szakmai tanácsait.

Dr. Ferenczi Lajosnak, a Mikrobiológiai Tanszék vezetőjének köszönöm, hogy rendelkezésemre bocsátotta az általa izolált *Candida boidinii* törzset.

Zsiga Ágnes vegyésznek azt, hogy mint szakdolgozó, a katalázzal kapcsolatos méréseket elvégezte. A dolgozatomban a katalázzal kapcsolatos összes mérés és adat részét képezi diplomamunkájának, illetve diákköri dolgozatának.

Dr. Marosi Csabáné és Tóth Katalin laboránsoknak a pontos és figyelmes munkájukat.

A Biokémiai Tanszék dolgozóinak azt, hogy munkám során, a szakmai beszélgetésekben hibáimat javították, tanácsaikkal pedig elősegítették munkámat.

