ASPERGILLUS CARBONARIUS-BÓL IZOLÁLT EXTRACELLULÁRIS β-D-XILOZIDÁZ

MŰKÖDÉSI MECHANIZMUSÁNAK VIZSGÁLATA

doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Kiss Tünde

Témavezető: Dr. Kiss László

Debreceni Egyetem, TTK
Biokémiai Tanszék
Debrecen, 2002

1. AZ ÉRTEKEZÉS ELŐZMÉNYEI ÉS CÉLKITŰZÉSEI

A növényi sejtfal fontos alkotóelemét képező xilánok a természetben legjelentősebb mennyiségben előforduló újrahasznosítható hemicellulózok. Többségük bonyolult összetételű heteropoliszacharid, amelyek xilóz egységekből felépülő alapvázához különböző szubsztituensek kapcsolódnak. A különféle forrásokból származó xilánok jelentős variabilitást mutatnak mind összetételüket, mind szerkezetüket illetően, így nem meglepő, hogy teljes mértékű hidrolízisükhöz egy komplex mikrobiális enzimrendszer hatékony működésére van szükség. Ezek az ún. xilánbontó vagy xilanolitikus enzimrendszerek, amelyek igen elterjedtek mind a baktériumok, mind a gombák körében. A xilanolitikus enzimrendszerek legfontosabb képviselői a *β-1,4-endoxilanázok* (EC 3.2.1.8), amelyek a xilán alapvázát hidrolizálják kisebb xilo-oligoszacharidokra, és a *β-D-xilozidázok* (EC 3.2.1.37), amelyek az így létrejövő xilo-oligoszacharid és xilobióz molekulák nem-redukáló végéről xilózt hasítanak le. A β-D-xilozidázok ily módon igen fontos szerepet játszanak az endoxilanázok végtermék gátlásának megszüntetésében is.

A xilanolitikus enzimrendszerek a természetben betöltött fontos szerepük mellett számottevő ipari jelentőséggel is bírnak. A mezőgazdasági és erdészeti hulladékok jelentős részét képező xilánok, mint megújítható erőforrások, mind a tüzelőanyag, mind a különböző kémiai alapanyagok (pl. furfuralok vagy az alacsony kalóriatartalmú, mesterséges édesítőszerként felhasznált xilitolok) előállításának fontos bázisát adják, újrahasznosításuk azonban elképzelhetetlen xilánbontó enzimrendszerek nélkül. Kutatásuk utóbbi időkben tapasztalt fellendüléséhez azonban legnagyobb mértékben a papíripari felhasználásukra irányuló, egyre fokozódó igény járult hozzá. Napjainkban egyre jobban elterjednek a papírpép enzimatikus úton történő fehérítésére irányuló biotechnológiák, amelyek egyrészt jelentős gazdasági haszonnal járnak, másrészt a felhasznált ill. képződő toxikus anyagok (pl. dioxin) mennyiségének csökkentésével környezetvédelmi szempontból fontosak. A papírpép fehérítéséhez elsősorban endoxilanázokat alkalmaznak. Az utóbbi évtizedben azonban egyre nagyobb mértékű érdeklődés mutatkozik a xilanázok hatékony működését elősegítő β-xilozidázok iránt is. Jelentőségük ellenére azonban az ezen enzimekre vonatkozó ismereteink igen hiányosak.

A Debreceni Egyetem TTK Biokémiai Tanszékén folyó enzimológiai kutatások egyik legjelentősebb témája a különböző eredetű ill. szubsztrátspecificitású glikozidázok (pl. β-glükozidázok, β-hexózaminidázok) vizsgálata. Ezt a kutatási irányt követve, a fent említett

tények inspiráltak bennünket egy újabb glikozidáz csoport, a mikrobiális β-D-xilozidázok tanulmányozására.

→ Célul tűztük ki egy mikrobiális β-D-xilozidáz izolálását, tisztítását, valamint biokémiai jellemzését.

→ Célunk volt az enzim működési mechanizmusának vizsgálata. Ennek érdekében az enzim aktív centrumában katalitikus szerepet játszó aminosav-oldalláncok módosítását terveztük specifikus kémiai reagensekkel, valamint aktív centrum specifikus inaktivátor (affinitás jelölő) alkalmazásával. Ehhez egy β-D-xilozidázokra specifikus affinitás jelölőnek, N-brómacetil-β-D-xilopiranozilaminnak a szintézisét terveztük. Célunk volt ezen módosítások enzimműködésre gyakorolt hatásának vizsgálata.

→ Terveztük az enzim szubsztrát kötőhelyének feltérképezését szubsztrátanalóg inhibitorokkal végzett inhibíciós vizsgálatok révén.

→ Továbbá, tervbe vettük az enzim által katalizált reakciók sztereokémiájának felderítését transzferáz vizsgálatok révén.

2. ALKALMAZOTT VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

A vizsgálatainkhoz szükséges β-D-xilozidázt *A. carbonarius* szilárd táptalajon történő tenyésztésével nyertük. Az enzim tisztítása során az elválasztástechnika modern módszereit (hidrofób kölcsönhatás kromatográfia, kromatofókuszálás, affinitás kromatográfia) alkalmaztuk. Az enzimpreparátumok tisztaságát SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) ellenőriztük. Ugyanezt a módszert, valamint MALDI TOF MS technikát használtunk az enzim molekulatömegének meghatározására.

Az enzimaktivitásokat szintetikus, kromogén szubsztrátokkal, spektrofotometriásan mértük. Kinetikai vizsgálatainknál a klasszikus enzimkinetika módszereit alkalmaztuk. A reakciókinetikai paraméterek (K_m, V_{max}) meghatározásához nem lineáris módszeren alapuló illesztő programot használtunk. Inhibíciós vizsgálatainknál a K_i állandókat Dixon-féle illesztéssel határoztuk meg. A kinetikai paraméterek pH-függése során a disszociábilis aminosav-oldalláncok savi disszociációs állandóit a szabad enzimmolekulában (pK_{E1}, pK_{E2}) ill. az enzim-szubsztrát (ES) komplexben (pK_{ES1}) ugyancsak nem lineáris illesztő program segítségével határoztuk meg.

A katalitikus aminosav-oldalláncok típusának felderítését specifikus kémiai reagensek alkalmazásával, majd az oldalláncok módosulásának kinetikai analízisével végeztük.

A reaktív szubsztrátanalóg inaktivátor (N-brómacetil-β-D-xilopiranozilamin) szintézisénél a preparatív szerves kémia makro-, félmikro- és mikromódszereit alkalmaztuk. A reakciók követésére, a termékek izolálására, valamint tisztaságuk ellenőrzésére kromatográfiás módszereket (vékonyréteg kromatográfia, oszlopkromatográfia) alkalmaztunk. A termékek szerkezetének igazolása NMR technikával történt. Az enzim transzferáz aktivitásának vizsgálatánál ezeket a módszereket HPLC-s vizsgálatokkal egészítettük ki.

3. AZ ÉRTEKEZÉS ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEI

Értekezésem egy mikrobiális β-D-xilozidáz (*A. carbonarius*) izolálását, tisztítását, biokémiai jellemzését, valamint működési mechanizmusának vizsgálatát foglalja magába.

3. 1. Mikrobiális β-D-xilozidáz izolálása

Különböző *Aspergillus* fajok (*A. carbonarius*, *A. nidulans, A. niger, A. oryzae*) extracelluláris β-D-xilozidáz termelésének összehasonlítása révén megállapítottuk, hogy az irodalomból eddig ismeretlen *A. carbonarius* igen jó enzimforrás, β-D-xilozidáz termelése a többi fajénál 2-5-ször nagyobb. Ezért a vizsgálatainkhoz szükséges β-D-xilozidázt, a tenyésztési idő optimalizálása után, az *A. carbonarius* 4 napig, szilárd táptalajon (vizes búzakorpán) történő tenyésztésével nyertük.

3. 2. A. carbonarius β-D-xilozidázának tisztítása és biokémiai jellemzése

Kidolgoztunk egy gyors (mindössze 3 lépést igénylő) és hatékony tisztítási eljárást az enzim homogén, tiszta formában történő kinyerésére. A hidrofób kromatográfiát, kromatofókuszálást és affinitás kromatográfiát magába foglaló folyamat 48,5 %-os hozammal, a β-D-xilozidáz 61-szeres tisztulását eredményezte (1. táblázat). Az enzim tisztaságát SDS-PAGE-val igazoltuk.

Megállapítottuk, hogy a tisztított β-D-xilozidáz egy monomer fehérje, amelynek izoelektromos pontja 4,4. Az enzim molekulatömege SDS-PAGE-val meghatározva 100 kDa-nak, MALDI TOF MS technikával meghatározva 108 kDa-nak adódott. Az enzim 3,0-4,0 közötti pH-tartományban működött maximális aktivitással és 3,5-6,5 tartományban bizonyult stabilnak. Hőmérsékleti optimuma 60 °C-on volt, azonban 30 perces inkubálás után csak 50 °C-ig volt stabil.

1. táblázat

***A. carbonarius* –ból izolált β-D-xilozidáz tisztítási folyamata**

Tisztítási lépés	Teljes fehérje-tartalom (mg)	Teljes enzim-aktivitás (U)	Specifikus aktivitás (U/mg)	Tisztulás mértéke	Hozam* (%)
Extraktum	568	30,5	0,054	1,0	100
HIC (Phenyl-Sepharose CL-4B)	16,7	26,4	1,58	29,3	86,6
Kromatofókuszálás (PBE 94)	5,6	17,0	3,04	56,3	55,7
Affinitás kromatográfia	4,5	14,8	3,29	60,9	48,5

* A hozamot a teljes enzimaktivitás alapján számoltuk.

3. 3. Az enzim működési mechanizmusának vizsgálata:

3.3.1. Enzimkinetikai vizsgálatok

A tiszta enzim β-D-xilozidáz aktivitása mellett csekély α-L-arabinozidáz aktivitást is mutatott. Kevert szubsztrátos kísérletekkel bizonyítottuk, hogy a megfelelő szintetikus szubsztrátok (*p*-nitrofenil-β-D-xilopiranozid (*p*NP-Xyl) és *p*-nitrofenil-α-L-arabinopiranozid (*p*NP-Ara)) hasítása az enzim egyetlen, közös katalitikus centrumában történik. Ezt a megállapítást inhibíciós méréseink is igazolták, amelyek egyben azt is jelezték, hogy nemcsak a hasítóhely, hanem a kötőhely is azonos az adott szubsztrátok ill. inhibitorok számára.

Meghatároztuk a β-D-xilozidáz által katalizált reakciók jellemző kinetikai paramétereit (2. táblázat). Az eredmények azt mutatták, hogy az enzim sokkal nagyobb affinitást mutat a *p*NP-Xyl iránt (K_m alapján) és azt sokkal hatékonyabban is hidrolizálja (V_{max}/K_m alapján), mint a *p*NP-Ara-ot, ez utóbbi esetében viszont az enzimreakció maximális sebessége (V_{max}) valamivel nagyobb, mint a xilozidnál. Megállapíthattuk tehát, hogy a cukorgyűrű C-4 helyzetű hidroxilcsoportjának *ekvatoriális* konfigurációja meghatározó jelentőségű a szubsztrát kötődésénél, a hasításnál viszont az *axiális* konfiguráció kedvezőbb lehet.

2. táblázat

***A. carbonarius*-ból izolált β-D-xilozidáz kinetikai paraméterei**

Szubsztrát	**K_m (mM)**	**V_{max} (U/mg)**	**V_{max}/K_m ($U \times mg^{-1} \times mM^{-1}$)**
*p*NP-Xyl	0,198 ± 0,002	3,64 ± 0,01	18,4 ± 0,19
*p*NP-Ara	5,5 ± 0,64	6,3 ± 0,26	1,2 ± 0,14

3.3.2. A β-D-xilozidáz szubsztrát kötőhelyének vizsgálata

A szubsztrát kötőhely feltérképezésére irányuló inhibíciós és kinetikai vizsgálataink rámutattak, hogy –a korábban vizsgált β-D-glikozidázoktól eltérően – a szubsztrát ill. az inhibitor szénhidrát (glikon) része meghatározó szerepet játszik az aktív centrumba való kötődéskor. Megállapítottuk, hogy hexapiranozid szubsztrátok esetén a cukorgyűrű C-5 helyzetű hidroxilmetil-csoportja valószínűleg sztérikus gátat képez a kötődésénél, ezért ennek hiánya esszenciális az enzim-szubsztrát (ES) ill. enzim-inhibitor komplex kialakulásához. Kimutattuk, hogy a piranózgyűrű C-2 hidroxilcsoportja ugyancsak meghatározó szerepű a kötődésnél, ennek jelenléte ugyanis valószínűleg olyan kulcsfontosságú hidrogénkötések létesítéséhez szükséges, amelyek az átmeneti állapot stabilizálásával az ES komplex

kialakulását segítik elő, ill. a katalitikus csoportok optimális orientációjának kedveznek. Ezt a megállapítást részint a 2-dezoxi-D-xilózzal végzett, részint az 1,2-telítetlen kötést tartalmazó inhibitorokkal végzett kísérleteink igazolták. Ez utóbbiaknál tapasztalt drasztikus enzimaktivitás csökkenéshez valószínűleg a C-2 hidroxilcsoport hiánya mellett, a piranózgyűrű C-1 körüli részében kialakult rigiditás is hozzájárult. Az a tény, hogy az 5-tio-D-xilóz jobban gátolta az enzim működését, mint a D-xilóz arra utalt, hogy a cukorgyűrűben lévő heteroatom is érdemleges szerepet játszik a szubsztrát kötődésében. A szubsztrát kötőhely aglikon kötőrészére irányuló vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy az aglikon kötődésénél elsősorban hidrofób jellegű, valamint elektrosztatikus kölcsönhatások játszanak fontos szerepet, de sztérikus tényezők is befolyásolhatják az ES komplex kialakulását.

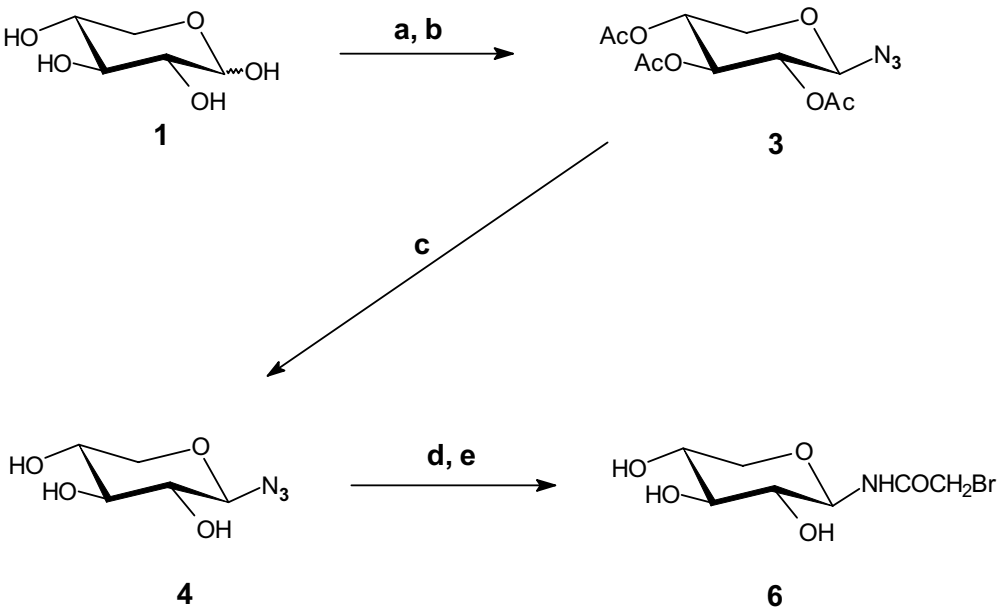
3.3.3. Az enzim katalitikus csoportjainak vizsgálata

A *p*NP-Xyl hidrolízis kinetikai paramétereinek pH függéséből származó eredmények arra utaltak, hogy az ES komplex kialakításában két ionizálható aminosav-oldallánc vesz részt, amelyek közül az egyiknek ionizált, a másiknak protonált állapota szükséges a β-D-xilozidáz hatékony működéséhez. Az ionizált feltehetően egy karboxilát maradék (pK_{E1} = 2,7), a protonált pedig egy karboxil oldallánc vagy egy hisztidin imidazolil csoportja (pK_{E2} = 6,4). Megállapítottuk továbbá, hogy a szubsztrát glikozidos kötésének hasításában egy ionizálható oldallánc – igen nagy valószínűséggel egy Glu vagy Asp karboxil oldallánc (pK_{ES1} = 4,0) – közreműködése elengedhetetlen.

Ezen oldallánc típusok vizsgálatára az enzimet kémiailag, szelektíven módosítottuk karboxil oldallánc specifikus Woodward K reagenssel (WRK), valamint karbodiimid (EDAC) katalizálta amidképzéssel glicin-metil-észter alkalmazásával. A reakciók kinetikai analízise azt mutatta, hogy az alkalmazott reagensek pszeudo-elsőrendű kinetika szerint inaktiválták a β-D-xilozidázt, s bizonyította, hogy az enzim tartalmaz olyan karboxilcsoportokat, amelyek működése elengedhetetlen a hatékony katalízishez, valamint, hogy ezek közül legalább egy esszenciális szerepet játszik az enzim működésében. A módosított karboxil maradék aktív centrumbeli lokalizációját kompetitív inhibitor alkalmazásakor fellépő védőhatás bizonyította. Az inaktiváció pH-függését vizsgálva megállapítottuk, hogy a módosított karboxil oldallánc, pK_A értéke alapján (pK_A = 4,4), egy Asp vagy Glu maradéka lehet. Figyelembevéve a V_{max} pH függésénél kapott hasonló p*K* értéket (pK_{ES1}= 4,0), feltételeztük, hogy a β-D-xilozidáz aktív centrumában, a katalízisben szerepet játszó Glu vagy Asp karboxil oldalláncát módosítottuk. A módosított karboxilcsoport szubsztráthasításban betöltött központi szerepét a módosítás

kinetikai paramétereinek vizsgálata igazolta. A karboxilcsoport blokkolása során ugyanis a V_{max} értéke jelentős mértékben csökkent, majd az enzim teljesen inaktiválódott, a K_m értéke viszont ugyanakkor nem változott. A módosítási reakciók hatásának vizsgálata révén tehát megállapíthattuk, hogy az *A. carbonarius* β-D-xilozidáza tartalmaz olyan karboxil oldalláncokat, amelyek működése elengedhetetlen a hatékony katalízishez, ezek közül legalább egy –valószínűleg Glu vagy Asp oldallánc– az enzim aktív centrumában található és feltehetően protondonorként esszenciális szerepet játszik a *p*NP-Xyl glikozidos kötésének hasításában.

A katalitikus karboxilcsoport szerepének igazolására, ill. annak azonosítására egy új, β-D-xilozidázokra specifikus, reaktív szubsztrátanalóg inaktivátort, N-brómacetil-β-D-xilopiranozilamint szintetizáltunk (1. ábra).



1. ábra

N-brómacetil-β-D-xilopiranozilamin szintézise

a) piridin/Ac_2O; **b**) $(CH_3)_3SiN_3$, $SnCl_4$, DKM; **c**) NaOMe, MeOH;

d) $H_2/Pd(OH)_2$, DMF; **e**) $(BrCH_2CO)_2O$/piridin, CCl_4

Kinetikai vizsgálatokkal igazoltuk, hogy a szintetizált vegyület irreverzibilis inaktivátorként viselkedik az *A. carbonarius* β-D-xilozidázával szemben és pszeudo elsőrendű kinetika szerint inaktiválja azt. Kompetitív inhibitor jelenlétében az inaktiváció sebességének csökkenését

tapasztaltuk, ami a módosítás aktív centrum specifikus (affinitás jelölő) jellegét bizonyította. Az inaktivált enzim tiol reagenssel szemben mutatott stabilitása kovalens módosulást jelzett és kizárta metionil oldallánc módosulását, amelyről *Escherichia coli* β-D-galaktozidáza esetében számoltak be. Inaktivációs kísérleti eredményeink tehát egyértelműen bizonyították, hogy az N-brómacetil-β-D-xilopiranozilamin az *A. carbonarius* β-D-xilozidáza esetében az aktív centrumban lévő katalitikus karboxil oldallánccal stabil, kovalens kötést alakított ki, s ezáltal lehetőséget teremtett annak későbbi, az enzim szekvenálása utáni azonosítására.

3.3.4. A β-D-xilozidáz transzferáz aktivitásának vizsgálata

Az enzim transzferáz aktivitására irányuló vizsgálataink egyértelműen bizonyították, hogy az *A. carbonarius* β-D-xilozidáza, megfelelő körülmények között, nemcsak glikozidos kötés hidrolízisére, hanem annak kialakítására is alkalmas. Az enzim transzferáz aktivitása egyben lehetőséget teremtett az enzim által katalizált reakciók sztereokémiájának meghatározására is. Ez alapján megállapítottuk, hogy az általunk vizsgált *A. carbonarius* β-D-xilozidáza retenciós mechanizmussal működő ($e \rightarrow e$) glikozidázok csoportjába sorolható.

4. AZ EREDMÉNYEK HASZNOSÍTÁSÁNAK LEHETŐSÉGEI

A szintetizált N-brómacetil-β-D-xilopiranozilamin, mint az első β-D-xilozidázokra specifikus affinitás jelölő, általánosan alkalmazható β-D-xilozidázok katalitikus szerepet játszó aminosav-oldalláncának azonosítására, amely egyben lehetőséget teremt ezen enzimcsalád kevéssé ismert működési mechanizmusának a felderítésére.

Az *A. carbonarius*-ból izolált β-D-xilozidáz transzferáz aktivitása révén kemoenzimatikus szintézisek hasznos eszköze lehet.

Eredményeink újabb információkkal gyarapították a fungális β-D-xilozidázokra, különösen azok működési mechanizmusára vonatkozó szűkös ismereteket. Figyelembe véve az utóbbi évtizedben, elsősorban papíripari felhasználásuk iránt mutatkozó jelentős mértékű igényt, ezen információk elősegíthetik a β-D-xilozidázok nagyobb arányú biotechnológiai ill. ipari alkalmazását.

5. PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

1. **Tünde Kiss** and László Kiss
   Purification and characterisation of an extracellular β-D-xylosidase from *Aspergillus carbonarius*
   World Journal of Microbiology and Biotechnology (2000) **16(5),** 465-470

2. **Tünde Kiss**, Anikó Erdei and László Kiss
   Investigation of the active site of the extracellular β-D-xylosidase from *Aspergillus carbonarius*
   Archives of Biochemistry and Biophysics, (2002) **399(2),** 188-194

3. **Tünde Kiss**, Andrea Székely, Marietta Tóth, László Somsák, László Kiss
   Inhibition of β-D-xylosidase (EC 3.2.1.37) from *Aspergillus carbonarius* by β-D-xylopyranose and D-xylal derivatives
   Carbohydrate Research, közlés alatt

EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

4. **Kiss Tünde**, Gyémánt Gyöngyi, Dános Béla és Nánási Pál
   A *Glycyrrhiza glabra* L. és a *Glycyrrhiza echinata* L. poliszacharidjainak vizsgálata Gyógynövény poliszacharidok II.
   Acta Pharmaceutica Hungarica (1998) **68**, 263-268

5. Marcelis van der Stelt, Minke A. Noordermeer, **Tünde Kiss**, Guus van Zadelhoff, Ben Merghart, Gerrit A. Veldink, Johannes F. G. Vliegenthart
   Formation of a new class of oxylipins from N-acyl(ethanol)amines by the lipoxygenase pathway
   European Journal of Biochemistry (2000) **267**, 2000-2007

6. Zoltán Nagy, **Tünde Kiss**, Attila Szentirmai and Sándor Biró
   β-Galactosidase of *Penicillium chrisogenum*: Production, purification and characterisation of the enzyme
   Protein Expression and Purification, (2001) **21,** 24-29

ELŐADÁSOK ÉS POSZTEREK

1. **Kiss Tünde** és Kiss László
   *Aspergillus carbonarius*ból izolált β-xilozidáz enzim szubsztrátspecificitása és kinetikai vizsgálata
   MTA Szénhidrátkémiai Munkabizottsága 1997. évi előadóülése, 1997. május 21-22, Mátrafüred

2. László Kiss and **Tünde Kiss**
   Purification, substrate specificity and kinetic investigation of β-xylosidase from *Aspergillus carbonarius*
   3rd International Conference of the Hungarian Biochemical Society, 6-9 July, 1997, Pécs, Hungary

3. **Tünde Kiss**, László Kiss and Göte Johansson
   Purification of β-xylosidase by partitioning in aqueous two-phase systems
   Annual Meeting of the Committee of Carbohydrate Chemistry of the Hungarian Academy of Sciences, 26-27 May 1999, Mátrafüred, Hungary

4. **Tünde Kiss** and László Kiss
   Purification and characterisation of an extracellular β-xylosidase from *Aspergillus carbonarius*
   26th Meeting of the Federation of European Biochemical Societies, June 19-24, 1999, Nice, France

5. **Tünde Kiss**, Andrea Székely, László Somsák and László Kiss
   Synthesis of xylosidase inhibitors and their enzymatic investigations using β-D-xylosidase from *Aspergillus carbonarius*
   20th International Carbohydrate Symposium, August 27-September 1, 2000, Hamburg, Germany

6. **Kiss Tünde**, Kiss László
   Aspergillus carbonarius-ból izolált extracelluláris β-D-xilozidáz vizsgálata
   IX. Fermentációs Kollokvium, 2000. október 5-8, Debrecen
   Acta Biol. Debrecina (2000) 140-144