Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	
Előszó	
1. A tioészteráz gén szerepének vizsgálata a bacítracin bioszintézisben	6
1.1. Bevezetés és célkitűzés	6
1.2. Irodalom áttekintése	7
1.2.1. Peptid bioszintézis multienzim komplexen	7
1.2.1.1. Adenilációs domén	
1.2.1.2. A peptid tartó domén (T, PCP)	9
1.2.1.3. A 4'PP transzferázok	
1.2.1.4. Módosító domén	
1.2.1.5. A kondenzációs domén (C)	
1.2.1.6. A tioészteráz modul (TE)	11
1.2.2. A bacitracin szintetáz	
1.3. Anyag és módszer	14
1.3.1. Mikroorganizmusok	14
1.3.1.1. Baktériumok	14
1.3.1.2. Plazmidok	14
1.3.2 Anyagok	14
1.3.2.1. Oldatok, pufferek, tápoldatok és táptalajok	14
1.3.3. Mikrobiológiai módszerek	
1.3.3.1. A baktériumok fenntartása és szaporítása	15
1.3.3.2. A lambda fág hőindukciója	15
1.3.3.3. E. coli transzformálása plazmid DNS-sel	15
1.3.3.4. B. licheniformis protoplasztok transzformálása plazmid DNS-sel	15
1.3.3.5. Bacitracin mérés biológia teszt alapján	15
1.3.3.6. A lacZ gén működésének vizsgálata X-gal segítségével	16
1.3.4. Fizikai és kémiai módszerek	16
1.3.4.1. Bakteriofágok koncentrálása	
1.3.4.2. Plazmid izolálás <i>E. coli</i> -ból	
1.3.4.3. Teljes DNS tisztítás	
1.3.4.4. DNS koncentráció mérése	
1.3.4.5. DNS elválasztás agaróz gélelektroforézissel	
1.3.4.6. DNS endonukleáz emésztés, defoszforilálás és ligálás	
1.3.4.7. DNS szekvenálás	
1.3.4.8. o-Nitrofenil-β-D-galactopyranosid (ONPG) mérés	
1.3.4.9. Szekvencia vizsgálatok	
1.3.4.10. HPLC vizsgálat	
1.4. Eredmények	
1.5. Megvitatás	
1.5.1. Új eredmények összefoglalása	
1.6. Összefoglalás	
1.6.1. Summary	
2. A növényi sejtfal-bontásában résztvevő enzimek vizsgálata	
2.1. Bevezetés	
2.2. Irodalom áttekintése	
2.2.1. A növényi sejtfal szerepe	
2.2.2. A növényi sejtfal felépítése	
2.2.2.1. A cellulóz szerkezete és lebontása	
2.2.2.2. A mátrix	
2.2.2.2.1. A hemicellulóz	
2.2.2.2.2. Pektinek	
2.2.2.3. Glikoproteinek	
2.2.2.2.4. Lignin	
2.2.3. A glikozil hidrolázok katalitikus mechanizmusa	
2.2.4. A glikozil hidrolázok általános felépítése	
2.2.4.1. A glikozil hidrolázok katalitikus doménie	
2.2.4.2. Szénhidrát-kötő modulok (CBM)	
2.2.5. Fehérje kristályosítás	
2.3. Anyagok és módszerek	
· •	

 2.3.2. Táptalajok, oldatok, pufferek. 2.3.3. Mikrobiológiai módszerek 2.3.3.1. Kompetens <i>E. coli</i> transzfomáció 2.3.3.2. Fehérje túltermeltetés <i>E .coli</i>-ban 2.3.3.3. Plazmid izolálás <i>E. coli</i>-ból 2.3.4. Fizikai és kémiai módszerek 2.3.4.1. Polimeráz láncerakció (PCR) 2.3.4.2. Helyspecifikus mutagenezis 2.3.4.3. Periplazma izolálás 	52 53 53 53 53 54 54 54 54 54 54
 2.3.3. Mikrobiológiai módszerek. 2.3.3.1. Kompetens <i>E. coli</i> transzfomáció 2.3.3.2. Fehérje túltermeltetés <i>E .coli</i>-ban 2.3.3.3. Plazmid izolálás <i>E. coli</i>-ból 2.3.4. Fizikai és kémiai módszerek. 2.3.4.1. Polimeráz láncerakció (PCR). 2.3.4.2. Helyspecifikus mutagenezis. 2.3.4.3. Periplazma izolálás 	53 53 53 54 54 54 54 54 54
 2.3.3.1. Kompetens <i>E. coli</i> transzfomáció	53 53 53 54 54 54 54 54 54
 2.3.3.2. Fehérje túltermeltetés <i>E</i> .coli-ban 2.3.3.3. Plazmid izolálás <i>E</i>. coli-ból 2.3.4. Fizikai és kémiai módszerek 2.3.4.1. Polimeráz láncerakció (PCR) 2.3.4.2. Helyspecifikus mutagenezis 2.3.4.3. Periplazma izolálás 	53 53 54 54 54 54 54 54
 2.3.3.3. Plazmid izolálás <i>E. coli</i>-ból 2.3.4. Fizikai és kémiai módszerek 2.3.4.1. Polimeráz láncerakció (PCR) 2.3.4.2. Helyspecifikus mutagenezis 2.3.4.3. Periplazma izolálás 	53 54 54 54 54 54 54
 2.3.4. Fizikai és kémiai módszerek 2.3.4.1. Polimeráz láncerakció (PCR) 2.3.4.2. Helyspecifikus mutagenezis 2.3.4.3. Periplazma izolálás 	54 54 54 54 54 54
 2.3.4.1. Polimeráz láncerakció (PCR) 2.3.4.2. Helyspecifikus mutagenezis 2.3.4.3. Periplazma izolálás	54 54 54 54 54
2.3.4.2. Helyspecifikus mutagenezis. 2.3.4.3. Periplazma izolálás	54 54 54 54
2.3.4.3. Periplazma izolálás	54 54 54
	54 54
2.3.4.4. His tag-es fehérje izolálás denaturáló és natív körülmények között	54
2.3.4.5. GST tagos fehérje izolálás	
2.3.4.6. Inclusion body-ban termelődő fehérjék refolding-ja	54
2.3.4.7. Fehérje izolálás ion-cserélő és gélszűrő oszlopon	55
2.3.4.8. Fehérje kristályosítás	55
2.3.4.9. DNS és fehérje koncentráció meghatározása	55
2.3.4.10. Agaróz DNS gélelektroforézis	55
2.3.4.11. Automatikus DNS szekvenálás	55
2.3.4.12. Fehérje elválasztása (SDS) poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE).	55
2.3.4.13. Natív PAGE	56
2.3.4.14. Kötési affinitás kvalitatív mérése	56
2.3.4.15. HPLC elválasztás	56
2.3.4.16. ITC (Isothermal Titration Calirometry)	57
2.3.4.17. CiDiSp (Circular Dichroism Spectroscopy)	57
2.4. Eredmények és megvitatásuk	58
2.4.1. A P. fluorescens Xyn10A enzim 10-es családba tartozó cellulózkötő moduljának vizsgálata	58
2.4.2. A GH10-es családba tartozó xylanáz F jellemzése	63
2.4.3. A CBM29 család jellemzése	70
2.4.4. Az X4 modul kristályosítása (esettanulmány)	76
2.5. Új eredmények összefoglalása	80
2.6. Összefoglalás	81
2.6.1. Summary	82
M1. Irodalomjegyzék	83
Köszönetnyilvánítás	

Rövidítések jegyzéke

A (Ala)	alanin
Ap	ampicilin
aphA'	(aminoglükozid foszfát transzferáz) terminátor nélküli Km rezisztencia
APS	ammónium-perszulfát
ATP	adenozin trifoszfát
B. licheniformis	Bacillus licheniformis
B. subtilis	Bacillus subtilis
Bt	bacitracin
Bts	bacitracin szintetáz
Cat	kloramfenikol acetil transzferáz
CBM	szénhidrát kötő modul (<u>C</u> arbohydrate <u>B</u> inding <u>M</u> odule)
CD	katalitikus domén (<u>C</u> atalytic <u>D</u> omain)
CiDiSp	Circular Dichroism Spectroscopy
Cm	kloramfenikol
ddH ₂ O	kétszeresen desztillált víz
DMSO	dimetil szulfoxid
DMF	N,N-Dimethil-formamid
DSP	termék kinyerés (<u>D</u> own <u>s</u> tream <u>P</u> rocessing)
E. coli	Escherichia coli
EDTA	etiléndiamin-tetraacetát
EtBr	3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridinium bromide (etídium bromid)
F (Phe)	fenilalanin
FAS	zsírsav szintáz (<u>Fatty A</u> cid <u>S</u> ynthase)
GH	glikozil hidroláz
His	hisztidin
His tag	6 hisztidinből álló peptid toldalék
ITC	Isothermal Titration Calirometry
kb	kilobázis
Km	kanamycin
lacZ	β-galaktozidáz enzimet kódoló gén
MCS	sokklónozó hely (<u>M</u> ultiple <u>C</u> loning <u>S</u> ite)
NBS	N-bromo-szukcinamid
NRPS	nem riboszómális peptid bioszintézis (<u>N</u> on <u>R</u> ibosomal <u>P</u> eptide <u>S</u> ynthesis)

ONPG	o-Nitrofenil-β-D-galactopyranosid
PDB	protein adatbank (fehérje 3D szerkezetek)
PEG	polietilénglikol
PKS	poliketid szintáz (<u>P</u> oly <u>k</u> etide <u>S</u> ynthase)
PNPC	p-Nytrofenil-β-D-cellobióz
PP*	rádióaktívan jelölt pirofoszfát
SDS	nátrium-dodecil szulfát
SelMet	Szeleno-metionin
TEMED	NNNN'-Tetrametiletiléndiamin
tf %	térfogat %
Tn	transzpozon
Tris	trisz-hidroximetil-aminometán
Trp	triptofán
Tyr	tirozin
v %	vegyes %
W	triptofán
WT	vad típus
Xyl	xylán
Y (Tyr)	tirozin

Előszó

Doktori tanulmányaim alatt, a bacitracin bioszintézis rejtelmeinek kutatása közben, lehetőségem adódott arra, hogy egy csereprogram keretében Angliában, a Newcastle Egyetem, Biológia és Táplálkozástudományi tanszékén (The University of Newcastle upon Tyne, Department of Biological and Nutritional Sciences), Harry Gilbert Professzor Úr vezetésével hat hónapig különböző mikroorganizmusokból származó növényi sejtfal bontó enzimek expressziójával, tisztításával, helyspecifikus mutagenezisével és a mutánsok biokémiai jellemzésével foglalkozhassam. A munka olyan érdekesnek bizonyult, hogy a kinttartózkodásom további 8 hónappal meghosszabbodott, de ekkor már mint Junior Research Scientist vettem részt a kutatásokban. Ekkor a feladat a vizsgált fehérjék kristályosításával is kiegészült. Ez az összességében több mint egy éves intenzív angliai munka sok érdekes eredményt és több tudományos publikációt eredményezett.

A disszertáció így két részből épül fel. Az első rész, amelyet 1. ponttal és alfejezeteivel jelöltem, a bacitracin peptid-antibiotikum szintézisben esszenciális tioészteráz enzim klónozását és funkciójának azonosítását taglalja. A második rész amelyet a 2. ponttal és alfejezeteivel jelöltem, megfelelő irodalom áttekintés után, az Angliában végzett, növényi sejtfalbontó enzimek vizsgálatával kapcsolatos eredmények rövid összefoglalója.

A dolgozatban összefoglalt munka és eredmények az 1997-2001 időszakban születtek és a dolgozat eredeti verziója 2001 végén készült el. Hosszú időt fiókban töltött, majd néhány formai változás után 2006 második felében nyerte el végleges formáját. Ezért az irodalom feldolgozás és az eredmények mások eredményeivel való összehasonlítása is a 2001-ig terjedő időszakot öleli fel.

1. A tioészteráz gén szerepének vizsgálata a bacitracin bioszintézisben

1.1. Bevezetés és célkitűzés

A molekuláris genetikai módszerek robbanásszerű fejlődése átalakította a gyógyszer hatóanyag keresés módszerét. A korábbi véletlenszerű próbálgatást felváltotta egy racionálisabb, a kiváltó ok megszüntetését célzó eljárás bevezetése. Először azonosítják a kórkép okának molekuláris mechanizmusát, majd nagy áteresztőképességű vizsgáló (screening) rendszerekben (HTS: high throughput screening) keresik azokat a molekulákat, amelyek képesek a kiváltó ok (patogén organizmus, enzim vagy regulátor nem megfelelő, vagy túlzott expressziója) célzott megszüntetésére. A nagy áteresztő képességű rendszerek rövid idő alatt nagy mennyiségű "molekula" tesztelését teszik lehetővé emberi hibalehetőség minimalizálásával, robotizált körülmények között. A folyamatban a szűk keresztmetszet az elegendő mennyiségben rendelkezésre álló, tesztelhető "molekulák" száma.

Nagyon sok olyan kémiai szerkezet létezik, melynek megfelelő mennyiségben történő előállítása szintetikus úton nehézkes vagy lehetetlen (nagy molekulatömeg, sok királis centrum stb.), biológia úton azonban előállítható megfelelő baktérium vagy gomba törzs irányított fermentációjával. Ide tartoznak a különböző peptid illetve poliketid szerkezetek is. Ahhoz, hogy a mikroorganizmusokkal a tesztelendő molekulák minél szélesebb palettáját előállíthassuk, ismernünk kell ezen molekulák szintézisének módját, azonosítani kell a bioszintézis lépéseit és jellemezni kell a lépéseket katalizáló enzimeket.

A bacitracin egy peptid antibiotikum, melynek szintézise nem riboszómákon, hanem egy 3 alegységből felépülő peptid szintetázon történik a nem riboszómális peptidszintézis (NRPS) folyamatában. Az aminosavakat összeépítő peptidszintetáz működésének feltárása már nagyrészt megtörtént, míg a szintézisben esszenciális egyéb enzimek vizsgálata jelenleg is folyik.

Munkánk során a bacitracin szintetázt kódoló DNS fragment környezetében kódolt, a nemriboszomális peptidszintézisben fontos enzim lokalizálását és szerepének meghatározását tűztük ki célul.

1.2. Irodalom áttekintése

A bacitracin peptidantibiotikumot sokáig hozamfokozó takarmány-kiegészítő komponensként használták, a hozamfokozó antibiotikumok betiltása után humán felhasználása kapott teret. Jelenleg főleg afrikai országokban használják, elsősorban makacs sebfertőzések külső kezelésére. Intramusculáris alkalmazása nem javallott, mert a hugyutakba kiválasztódva nephrocalcinosist okozhat, ami azonban az adagolás megszüntetése után hamar elmúlik. Szájon át adagolva az antibiotikum nem szívódik fel, így hatását a gyomor-bél traktusban fejti ki. Nagy előnye, hogy nehezen alakul ki vele szemben rezisztencia, illetve adagolása során esetlegesen kialakult tolerancia az antibiotikum alkalmazásának felfüggesztése után gyorsan megszűnik.

A több komponensből álló bacitracin peptidantibiotikum keveréket az Eubacteriales rendbe, a Bacillaceae családba, a *Bacillus* nemzetségbe tartozó Gram-pozitív szaprofita, fakultatív anaerob *Bacillus licheniformis* sejtek a stacioner fázis kezdetén szintetizálják A *B. licheniformis* pálcika alakú sejtjei (0.7-3 µm nagyságúak) nyolc-tíz tagból álló láncokat alkotnak, melyek a stacioner fázisban szétesnek és a sejtek endospórát képeznek. A *B. licheniformis*-t a bacitracin termeltetésen kívül a fermentációs iparban α -amiláz, β -laktamáz, alkalikus proteáz és alkalikus foszfatáz előállítására is felhasználják. (**Kleinkauf és von Döhren, 1987; Harwood, 1992**). A *B. licheniformis* bacitracin termelőképességének fokozásával a fermentáció hatékonysága és így gazdaságossága is javítható. A célzott és ezért hatékony beavatkozáshoz azonban a bacitracin szintézis részleteinek ismerete elengedhetetlen.

A kémiailag jól jellemzett 12 aminosavból álló bacitracin peptidantibiotikum szintézise egy 3 alegységből felépülő multienzim komplexen, a bacitracin szintetázon több mint ötven lépésben megy végbe (Laland és Zimmer, 1973). A lépések részletes analízisére már több nemriboszómális peptidszintetáz esetében is sor került (tirocidin, gramicidin S, surfactin). Ezekből a vizsgálatokból származó információk alapján a következőkben áttekintjük a multienzim komplexen végbemenő peptidbioszintézisről formálódott képet, majd elemezzük a bacitracin szintetázról eddig összegyűlt információt.

1.2.1. Peptid bioszintézis multienzim komplexen

Számos gomba vagy bakteriális eredetű antibiotikum (erythromycin), antitumor ágens (epothilone), immunoszupresszor (cyclosporin), enziminhibitor, növényi és állati toxin (HC-toxin) és egyéb, a





gyógyászatban felhasználható peptid nem a hagyományos úton, riboszómákon, hanem a tiotemplát mechanizmus alapján, nukleinsav közreműködése nélkül, multienzim komplexen szintetizálódik a nemriboszómális peptidszintézis folyamatában. Ezek a kisméretű, de biológiai szempontból nagy hatású peptidek szerkezetüket tekintve lehetnek lineárisak, ciklikusak, elágazóak vagy ezek keveréke, tartalmazhatnak D-aminosavakat vagy N-metilált, acilált, glikozilált L-aminosavakat, heterociklikus gyűrűt, és nem fehérjetermészetű komponenseket is (**1.2.1.1. ábra**).

Az adott peptid minden aminosavának beépítéséért egy-egy, kb. 1000 aminosavból felépülő modul felelős, ami a részfolyamatokat katalizáló, jól definiált funkciókkal rendelkező, flexibilis linker régiókkal egymáshoz kapcsolt doménekre bontható: adenilációs domén (A), peptid tartó domén (T: thioliation vagy PCP: peptidil carrier protein), módosító domén (M), és a kondenzációs domén (C). A szintetizált peptid termék leválasztását az esetek többségében a tioészteráz domén (TE) végzi. (Laland és Zimmer, 1973; Aharonowitz et al. 1993; Stachelhaus és Marahiel, 1995a; Stein et al. 1996; Marahiel et al. 1997; van Wageningen et al. 1998; Cane és Walsh, 1999). Az adott aminosavra specifikus modulok sorrendje és a szintetizálódó peptidlánc aminosavainak sorrendje kolineáris (Stein et al. 1996) és a szintézis elve hasonló a poliketid (PKS) és a zsírsavszintézis (FAS) elvéhez (Smith, 1994; Hopwood, 1997).

1.2.1.1. Adenilációs domén



1.2.1.1.1. ábra. A *B. brevis* GrsA PheA adenilációs doménjének szerkezete. 1AMU.pdb. (sárga: phenilalanin, lila: AMP)

Az átlagosan 55 kDa méretű adenilációs domén a peptid termék adott pozícióba építendő aminosavának specifikus felismeréséért és ATP jelenlétében történő aciladenilát képzésért, azaz az aminosav specifikus aktiválásáért felelős. A reakció eredményeképpen keletkező aciladenilát szerkezete megegyezik a riboszómális fehérjeszintézis megfelelő köztes termékével, de a reakciókat katalizáló adenilációs domén és a tRNS I és II szintetázok szerkezete között nincs kimutatható hasonlóság (Arnez és Moras, 1997). Az adenilációs domén elsődleges szerkezete a CoA ligázokhoz,

végső alakja (foldja) pedig a *Photinus pyralis* luciferázhoz hasonlít (**Conti et al. 1996**). A *Bacillus* brevis gramicidinS szintetáz első alegységének első, a fenilalanin beépítésért felelős moduljából származó fenilalanin adenilációs domént (PheA) ATP és fenilalanin jelenlétében kristályosították, és térszerkezetét meghatározták (Conti et al. 1997). A PheA egy 400 aminosavból álló N-terminális A és egy 100 aminosavból álló C-terminális B aldoménből épül fel (1.2.1.1.1. ábra). A fenilalanin kötésében résztvevő aminosavak közül a B aldoménben csak a fenilalanin α-karboxil csoportjához H kötéssel kapcsolódó és az AMP cukor-foszfát részét koordináló K517 aminosav található, az ATP vagy az AMP kötésében illetve a szubsztrát aminosav kötésében résztvevő összes többi aminosav az A aldoménben helvezkedik el (1.2.1.1.2. ábra). A Photinus pyralis luciferáz és a PheA domén elsődleges szerkezete csak 16%-ban hasonlít egymásra, foldjuk mégis megegyezik. Az adenilációs domének között a hasonlóság 30-60% között van (Turgai et al. 1992), így feltételezhető, hogy a PheA domén foldja elfogadható az adenilációs domének általános szerkezeteként (Stachelhaus et al. 1999; Weber és Marahiel, 2001). A különböző gomba és prokarióta eredetű adenilációs domének szekvencia összehasonlítása és helyspecifikus mutagenezise több konzerválódott (A1-A10) és variábilis régió jelenlétét mutatta ki (Konz és Marahiel, 1999). A fenilalanint és AMP-t is tartalmazó PheA domén 3D szerkezete alapján a fenilalanin kötésében résztvevő aminosavak és a konzerválódott régiók összehasonlítása alapján lehetővé vált az adenilációs domének szubsztrátspecifikusságában szerepet játszó aminosavak azonosítása, és így a "nemriboszómális kód" megfejtése. Az A4 (FDxS) és A5 (NxYGPTE) konzerválódott régiók között helyezkedik el a

fenilalanin kötő zseb. Ebből a körülbelül 100 aminosav méretű régióból 8 (Challis et al. 2000) vagy 10 (Stachelhaus et al. 1999), a megkötött fenilalanin közvetlen környezetét alkotó aminosavra szűkítették a szubsztrátspecifikusság kialakításáért felelős aminosavak körét. A 8 vagy 10 aminosav jellemezte adenilációs doméneket hasonlóság illetve a kialakuló zseb tulajdonsága és mérete alapján, és a korábban már jól jellemzett szubsztrátspecifikussággal rendelkező adenilációs doménekhez történő hasonlóság alapján specifikussági csoportokba osztották (Stachelhaus et al. 1999; Challis et al. 2000). A riboszómális fehérjeszintézis pontosságához képest a nemriboszómális peptidszintézis jóval nagyobb "lötyögést" tesz lehetővé (Silvian et al. 1999). Multienzim komplexen szintetizálódó peptidantibiotikum esetében egy sejten belül is, a fő terméken kívül, az antibiotikum egész (egy vagy több aminosavban eltérő) skálája szintetizálódik pl.: bacitracin 15 variáns, cyclosporin 30 variáns (Traber, 1997), tirocidin 4 variáns (Ruttenberg és Mach, 1966). Az adenilációs domén szerkezete alapján ez azzal magyarázható, hogy egy adott méretű és kémiai tulajdonságokkal rendelkező aminosav kötő zseb, kisebb gyakorisággal ugyan, de képes fő szubsztrátjához hasonló szerkezetű és tulajdonságú aminosavak megkötésére és aktiválására is (Stachelhaus et al. 1999).

A szubsztrát aminosav α -karboxil csoportját az A2 motívum K517 minden esetben konzerválódott aminosava, az amino csoportját pedig a D235 aminosav tartja pozícióban (1.2.1.1.2. ábra). A 236., 301. és 330. aminosavak a vizsgált esetek 93 %-ában hidrofób aminosavak, és a kötő zseb oldalának felépítésében vesznek részt. A 239., a 322. a 331. helyen lévő aminosavak a domén specifikusságától függően sokfélék lehetnek, de adott specifikusságú domén esetében kémiai tulajdonságaik megegyeznek egymással. A 278. és 299. aminosavak még adott specifikusságú domén esetében is jelentősen eltérhetnek egymástól, azaz a nemriboszómális kód esetében leginkább ezek az aminosavak felelősek a "lötyögésért". Az adott pozícióban előforduló aminosavak jellege alapján lehetséges az újonnan azonosított adenilációs domének szubsztrátspecifikusságának előrejelzése, és megfelelő aminosavak а megváltoztatásával az adott adenilációs domén



1.2.1.1.2 ábra. A fenilalanin kötő zseb 1AMU.pdb.

szubsztrátspecifikusságának módosítása (Stachelhaus et al. 1999; Challis et al. 2000).

1.2.1.2. A peptid tartó domén (T, PCP)

Az adenilációs domén által aktivált aminosav a 60-80 aminosavból felépülő peptid tartó domén



1.2.1.2.1 ábra Bacillus brevis TycC3-PCP domén. 1DNY.pdb (PCP) (1.2.1.2.1. ábra) egy kitüntetett szerinjéhez, kovalensen kötött foszfopantotén karhoz tioészter kötéssel kapcsolódik, és így kovalensen kötődik az adott modulhoz. A PCP domén funkciója megegyezik az ACP (acyl carrier protein) domén zsírsav- és poliketid-bioszintézisben betöltött szerepével: a beépítendő, kovalensen kötött szubsztrátot a soron következő reakciócentrumba továbbítja. Bár a PCP és az ACP domének foldja lényegében megegyezik, aminosav szekvencia hasonlóság csak a foszfopantotén kart tartó szerin (S) környezetében mutatható ki (L/I)GX(D/H)S(L/I) (Wakil, 1989; Hopwood és Sherman, 1990; Lambalot et al. 1996). A CoASH-ból származó 4'

foszfopantotén kart posztszintetikusan, a megfelelő 4'PP transzferáz köti a PCP domén megfelelő szerinjéhez. A PCP domén bármelyik, a foszfopantotén karhoz kötött aminosav mozgatására képes, azaz a szubsztrátra nem szelektív.

1.2.1.3. A 4'PP transzferázok



1.2.1.3.1. ábra. Sfp és szubsztrátjának (CoASH) szerkezete. 1QR0.pdb

A riboszómán szintetizálódó inaktív peptidszintetázok PCP aktiválásakor a PCP domén doméniének kitüntetett szerinjéhez a 4' foszfopantotén kart a 4'PP transzferázok kapcsolják CoASH felszabadulásával és ATP felhasználásával (Lambalot et al. 1996). Minden peptidpoliketid szint(et)áz rendelkezik saját 4'PPvagy transzferázzal, de előfordul, hogy az adott PCP aktiválására képes 4'PP transzferáz képes más szint(et)ázból vagy organizmusból származó PCP vagy akár ACP domének aktiválására is, pl. Sfp (1.2.1.3.1. ábra) (Kealey et al. 1998; Lambalot et al. 1996; Reuter et al. 1999). A legtöbb 4'PP

transzferáz azonban specifikus az ACP-re vagy a PCP-re, amit a fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakításában résztvevő aminosavak eltérésével és a PCP/ACP domének és 4'PP transzferázuk eltérő pI értékeivel (ACP pI≈3.8; PCP pI≈6-7; ACP 4'PPáz pI≈9.6; PCP 4'PPáz pI≈5.6-6) magyaráznak (**Weber és Marahiel, 2001**).

1.2.1.4. Módosító domén

Ez a domén nem része a minimális modulnak, azaz csak azokban a modulokban van jelen, ahol az aminosav módosul, mielőtt beépülne a szintetizálódó petidláncba. Leggyakrabban epimerizáció történik, ami az adott aminosavat az L-formából a D-be alakítja. A folyamat részletei még nem ismertek. Az epimerizációs domén (E) specifikus az aminosavra, azaz csak akkor végzi el a D-L átalakítást, ha az aktív helyére jól illeszkedő aminosav van jelen (**Stein et al. 1995**). A heterociklikus gyűrű képzéséért a cisztein és szerin vagy treonin oldalláncok között a heterocikláz (HC) domén a felelős (**Konz et al. 1997**). Az eukariótákban az α -karbon amino csoport metilálása a metilációs (Me) doménen megy végbe (**Zocher et al. 1986**). A domének mindegyike nagyon specifikus arra az aminosavra, aminek az átalakítását katalizálja. A módosító domének lehetővé teszik a peptid termék diverzitásának fokozását (**Konz és Marahiel, 1999**)

1.2.1.5. A kondenzációs domén (C)



A kb. 450 aminosavból felépülő kondenzációs domén a peptidkötés kialakításáért felelős. A peptidszintetázok legelső modulja nem tartalmaz kondenzációs domént, ezek az iniciációs modulok. A kondenzációs domént is tartalmazó elongációs modulok feladata az iniciációs által 4'foszfopantotenát modul karhoz kötött aminosavhoz további aminosavak kapcsolása (1.2.1.5.1. ábra) Az elongációs modulok nem képesek а peptidszintézis inicializálására, és mindaddig áll a peptidszintézis, amíg a kondenzációs domén akceptor helyére nem kerül az előző modul által specifikusan aktivált és 4'foszfopantotén karhoz tioészter kötéssel

kapcsolt aminosav (Stachelhaus et al. 1998).

A kondenzációs domén a mellette kétoldalról elhelyezkedő modulok aktiválta peptidek közötti kötés kialakításához valószínűleg két kötőhellyel, a donor és akceptor helyekkel rendelkezik. Az akceptor hely köti a downstream adenilációs modul által aktivált aminosavat, a donor hely pedig az upstream elhelyezkedő PCP-hez kötött - az előző modulokon összeépült - peptidláncot. A kondenzációs reakció után az upstream PCP domén 4'-foszfopantotén karja felszabadul, és így a

tőle upstream elhelyezkedő adenilációs modul által aktivált aminosav kovalens megkötésére lesz



1.2.1.5.2 ábra A nemriboszómális peptidszintézis folyamata (átvéve: Belshaw et al. 1999)

A kondenzációs domének

képes. A downstream PCP domén immáron egy taggal bővített peptidláncot hordozó 4'-foszfopantotén karja pedig a következő modul kondenzációs doménjénak donor helyéhez továbbítja a peptidláncot, ahol az akceptor helyen az adott modul adenilációs doménje aktiválta aminosav már készen áll a peptidlánc fogadására. (1.2.1.5.2. ábra)



1.2.1.5.3. ábra A kondenzációs domén feltételezett működési elve. kitöltött fekete kör: adenilációs domén, szürke csíkos: PCP, szürke kitöltött kondenzációs domén (átvéve: Stachelhaus et al. 1998)

tartalmazzák a HHxxxDG szekvencia motívumot, ami az aciltranszferázok His motívumához hasonlít. Az aciltranszferázok esetében már bebizonyították, hogy a második hisztidin felelős a katalízisért. Feltételezik, hogy ez a hisztidin "szívja el" a protont az akceptor helyen lévő aminosav amino-csoportjától, lehetővé téve ennek a csoportnak a nukleofil támadást a donor helyen kötött aminosav karbonil csoportján (1.2.1.5.3. ábra) (Shaw, 1983; Leslie, 1990, Russell et al. 1992; Mattevi et al. 1992; Lewendon és Shaw, 1993; Shaw, 1994).

A kondenzációs domén nagyfokú szelektivitást mutat az akceptor helyen, elhanyagolhatót a donor helyen. Ezt meghatározott aminosavat hordozó, aminoacil-CoA-val aktivált tirocidin szintetáz modulokkal egyértelműen bizonyították (**Belshaw et al. 1999; Linne és Marahiel, 2000**).

A kondenzációs doméneknek van egy olyan csoportja is, amit ciklizációs doménnek neveznek: ez a domén egyszerre katalizálja a peptid kötés kialakítását és a tiazolin gyűrű képződését (pl. bacitracin) (**Konz et al. 1997**).

A kondenzációs domén egyes esetekben az elkészült peptidlánc szintetázról történő leválasztásáért is felelős lehet pl. HC-toxin, cyclosporin, enniatin (**Marahiel et al. 1997**).

1.2.1.6. A tioészteráz modul (TE)



összes bakteriális és néhány gomba eredetű Az peptidszintetáz utolsó aminosav beépítéséért felelős moduljának C-terminálisán egy kb. 250 aminosavból álló, a zsírsavszintézisben az elkészült szénlánc 4'foszfopantotenát karról történő lehasadását katalizáló, tioészteráz I modulhoz hasonló domén foglal helyet (Schneider és Marahiel, 1998; Shaw-Reid et al. 1999). Ez az integrált, vagy belső tioészteráz modul tartalmazza a GxSxG motívumot és gyakran egy konzervált hisztidint kb. 140 aminosavnyira a

C-terminális irányában (Ming-Hong et al. 1993).

Az utolsó aminosav beépítéséért felelős modul PCP doménjének foszfopantotén karjához tioészter kötéssel kapcsolódó peptid a TE modul aktív helyén lévő szerin –OH csoportjára kerül, és így egy peptid-O-TE intermedier keletkezik (Lawson et al. 1994; Li et al. 1996). Az intermedier dezacilálása történhet hidrolízissel (így lineáris termék keletkezik), vagy ciklikus termékek esetében az egyik intramolekuláris nukleofillal való reakció során (1.2.1.6.1. ábra). A tirocidin A (Mootz és

Marahiel, 1997) és a gramicidin-S (Krätzschmar et al. 1989) esetében az intramolekuláris nukleofil az N-terminális amino csoport és így egy "fej-farok" irányban összekapcsolt, ciklikus peptid keletkezik. A ciklikus peptidek, mint pl. a bacitracin (Konz et al. 1997) és a daptomycin (Mchenney et al. 1998) esetében az intermolekuláris nukleofil egy aminosav oldallánc, a surfactin A (Cosmina et al. 1993) esetében pedig a zsírsav β -hidroxil csoportja, aminek eredményeképpen egy elágazó, ciklikus lipopeptid keletkezik.

A surfactin szintetáz esetében az integrált TE domén deléciója 2-3%-osra csökkentette a surfactin bioszintézisét a vad típusú törzs antibiotikum termeléséhez képest, és a TE domén előbbre helyezése kisebb peptid termékeket, azaz a peptidszintézis korábbi terminációját eredményezte (**de Ferra et al. 1997**). Több gomba eredetű peptidszintetázból illetve poliketid szintetázból az integrált TE domén hiányzik, esetükben az utolsó kondenzációs domén katalizálja a termék lehasadását (HC-toxin, cyclosporin, enniatin).

Bizonyos aminosavak és oldalláncok jelenlétében az izolált TE domén önmagában is, a peptidszekvenciától függetlenül katalizálja a peptidek gyűrűvé záródását. Ez lehetőséget ad ciklikus peptidek *in vitro* szintézisére (**Kohli et al. 2001**).

Az integrált TE modulon kívül a bakteriális peptid- és poliketid szintetázokat kódoló operonon belül gyakran található egy, az integrált TE-hez hasonló aktív centrummal rendelkező fehérjét kódoló DNS fragment. Ennek a tioészteráznak a peptidszintézisben betöltött szerepét még nem vizsgálták, de feltételezhető hogy jelenléte szükséges az optimális poliketid- és peptidbioszintézishez, hiszen gyakran egy átírási egységben található az alegységeket kódoló DNS-sel (Nakano et al. 1991; Hahn és Dubnau, 1991).

1.2.2. A bacitracin szintetáz

A *Bacillus licheniformis* sejtek a stacioner fázis kezdetén a 12 aminosavból felépülő tiazolin gyűrűt tartalmazó, elágazó, ciklikus peptideket: bacitracint állítanak elő. A legnagyobb mennyiségben termelődő komponens a bacitracinA (**1.2.2.1. ábra**). A dodekapeptidet tiotemplát mechanizmussal





1.2.2.1. ábra A bacitracin A1, B1, B2 és B3 peptid -antibiotikum

szintetáz állítja elő (1.2.2.2. ábra). Bacitracin szintézisre képtelen Tn917PF1 transzpozonos mutánsok (Prágai al. 1994b) et segítségével szintetáz а részleges fizikai térképét elkészítették, az alegységeket kódoló DNS fragmentet átíró izolálták, promótert és а transzkripció iniciáció pontos helyét primer extenzióval meghatározták (**Prágai**, nem publikált).



1.2.2.2. ábra. Az A, B és C alegységekből álló bacitracin szintetáz multienzim komplex sémája

A bacitracin szintetáz alegységeit kódoló 45 kb-os DNS fragmentet szekvenálták (**Konz et al. 1997**). (**1.2.2.3. ábra**) Az alegységeket kódoló DNS fragmenttől (*bacA*, *bacB*, *bacC*) downstream egy kétkomponensű regulátor rendszer két elemét (*bacR*, *bacS*), ezektől downstream pedig a bacitracin rezisztencia kialakításában szerepet játszó, eukarióta ABC transzporterekhez hasonló fehérjéket kódoló, DNS fragmenteket azonosítottak (*bcrA*, *bcrB*, *bcrC*). (**Podlasek et al. 1995**). Megállapították, hogy a kétkomponensű regulátor szenzorának (*bacS*) inaktiválása a sejtek bacitracin érzékenységét fokozta, de nem befolyásolta a bacitracin szintetáz alegységeit kódoló DNS fragment átírását. (**Neumuller et al. 2001**).

A bacitracin rezisztenciát kódoló DNS fragment amplifikálása a bacitracin rezisztencia növekedésén kívül - egyes törzsek esetében - a bacitracin termelés növekedését is okozta.

(Podlasek et al. 1995)



1.2.2.3. ábra. A bacitracin szintézisben résztvevő fehérjéket kódoló DNS fragment szerkezete (AF007865; AB096165; AB096166)

1.3. Anyag és módszer

1.3.1. Mikroorganizmusok

1.3.1.1. Baktériumok

Bacillus licheniformis törzsek

Baktérium törzsek	Forrás
B. licheniformis 19	laboratóriumunk
B. licheniformis 19F4	laboratóriumunk (β-galaktozidázt nem termelő törzs)

Escherichia coli törzsek

Törzsek	Genotípus
E. coli XL1-Blue	supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA46, thi, relA1, lac-,
	$F'[proAB+lacI^q lacZ\Delta M15, Tn10(tet^r)]$
E. coli DH5α	F-, ϕ 80d, lacZ Δ M15, enolA1, recA1, hsdR17, (r_k, m_n^+) ,
	supE44, Hin1, d, gyrA96, Δ (lacZYA-ingF), U169

Egyéb törzsek

Törzsek	Felhasználásuk
Micrococcus flavus ATCC10240	bacitracin termelés tesztelése

1.3.1.2. Plazmidok

Plazmidok	Méret (kb)	Rezisztencia	Gazda	Származás
pBlueScript II KS	2.9	Ар	E. coli	Stratagene
pNZ1	6.9	Ap, Cm	E. coli, Bacillus	Prágai, nem publikált
			ingázó vektor	
pQFBR	6.5	Ар	E. coli	Tran et al. 1998

1.3.2 Anyagok

1.3.2.1. Oldatok, pufferek, tápoldatok és táptalajok

YTA tápoldat (1000 ml): 5 g élesztőkivonat, 10 g Tripton, 5 g NaCl (pH 7.2) *YTA lágyagar:* Az YTA tápoldat kiegészítve 0.45 v% agar-agarral. *YTA táptalaj:* Az YTA tápoldat kiegészítve 1.2 v% agar-agarral.

Antibiotikumok: A törzsoldatok koncentrációja 10 mg/ml. Km:10 μg/ml, Cm: 20 μg/ml (*E. coli* és *B. licheniformis*), Ap: 50 μg/ml (*E. coli*) végkoncentrációban használtuk

 Plazmid izoláláshoz:

 Oldat I: 1000 ml-hez:15.7 g Tris-HCl, 3.72 g EDTA
 pH = 7.5

 Oldat II: 0.2 M NaOH, 2 % SDS
 Oldat III: 3 M K-acetát; pH=4.8 ecetsavval

 TE puffer: 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0).
 30 %-os PEG oldat:30 % PEG 8000 2.5 M NaCl-ban oldva

Teljes DNS izoláláshoz Oldat I:1000 ml-hez: 15.7 g Tris-HCl, 3.72 g EDTA + 5 mg/ml lizozim pH=7.5

Agaróz gélelektroforézishez

TBE oldat: 89 mM Tris, 89 mM bórsav, 2.5 mM EDTA (pH 8.3)

TAE oldat: 40 mM Tris-acetát, 2 mM EDTA (pH 8.0).

0.7 v% *agaróz gélhez:* 0.7 g agaróz 100 ml TBE vagy TAE oldatban kiolvasztva; 0.5 mg/ml EtBr-ot adunk hozzá.

STOP oldat:50 mM EDTA, 2% szarkozil, 60% glicerin, 0.05% brómfenolkék.

Protoplaszt transzformáláshoz

P-oldat (1000 ml): 25 g NH₄Cl, 15 g Tris, 0.075 g NaCl, 0.045 g KCl, 0.375 g Na₂SO₄H₂P, 5.33 g MgCl₂× 6H₂O, 171.15 g szacharóz (pH 8.4), autoklávban 20 percen át 121°C-on sterilezzük *P-lys oldat:* P-oldatban oldva 2 mg/ml lizozim, szűréssel sterilezve *PEG oldat:* 60 v% PEG 6000 P-oldatban oldva, autoklávban 20 percig 121°C-on sterilezzük.

ART tápoldat (1000 ml): 5 g élesztőkivonat, 5 g tripton, 5 g NaCl, 6.057 g Tris-HCl, 5 g glükóz,

171.15 g szacharóz, 1 ml 0.5 M CaCl₂, 1 ml 1 M MgSO₄, 1 ml 0.5 M MnSO₄ (pH 8.4). *ART lágyagar:* Az ART tápoldat kiegészítve 0.8 v% agarral.

ART táptalaj: Az ART tápoldat kiegészítve 1.8 v% agarral.

Szekvenáláshoz:

40 %-os akrilamid törzsoldat: 100 ml-hez: 38 g akrilamid, 2 g bisakrilamid

8 v%-os poliakrilamid gél: 23.2 g urea, 11 ml 40 %-os akrilamid oldat, 5.5 ml TBE oldat, 19.3 ml desztillált víz + 440 μl APS, 44 μl TEMED közvetlenül a gél öntés előtt

1.3.3. Mikrobiológiai módszerek

1.3.3.1. A baktériumok fenntartása és szaporítása

A *B. licheniformis* törzseket YTA táptalajon tartjuk, 4 °C-on tároljuk és 3-6 havonta átoltjuk. A táptalajról kacsnyi baktériumot 5 ml YTA tápoldatba oltunk és levegőztetve 30 vagy 37°C-on 14-16 órán át szaporítjuk.

Az *E. coli* törzseket YTA vagy LB táptalajon tartjuk. 4°C-on tároljuk és kéthavonta átoltjuk. 5 ml YTA vagy LB tápoldatba kacsnyi baktériumot oltva, rollerben forgatva 30 vagy 37°C-on 14-16 órán át szaporítjuk.

1.3.3.2. A lambda fág hőindukciója

A λ cIts758 Sam 7 hőérzékeny fágot az *E. coli* C600 törzsből indukáljuk úgy, hogy a baktériumot 30°C-on a logaritmikus fázis közepéig szaporítjuk (e=0.7-0.9), majd a fágot 15 percig 45°C-on indukáljuk. Két órán át 37°C-on rollerben levegőztetjük, majd mintát veszünk és pár csepp kloroformmal ellenőrizzük a fág szaporodását. Ha 5-10 perc alatt az oldat áttetszővé válik, akkor az egész tenyészethez 20 µl/ml kloroformot adunk. 30 percig állni hagyjuk. Centrifugálás után (20 °C, 3000 g, 15 perc) a felülúszót Hyflow-Supercellel derítjük, majd 0.45 mm pórusméretű membránon szűrjük. A fág *Hind*III fragementjeit molekula méret markernek használjuk.

1.3.3.3. E. coli transzformálása plazmid DNS-sel

A transzformálást a Molecular Cloning (Sambrook et al. 1989) szerint végezzük.

1.3.3.4. B. licheniformis protoplasztok transzformálása plazmid DNS-sel

A transzformálást Prágai et al. (1994/a) szerint végezzük

1.3.3.5. Bacitracin mérés biológia teszt alapján

A bacitracint Bt érzékeny *Micrococcus flavus* ATCC10240 törzs felhasználásával vizsgáljuk. A *M. flavus* sejteket tartalmazó agar lemezbe fúrt lyukakba adott mennyiségű szűrt fermentlevet

pipettázunk és lemezeket 24 óra hosszat 37°C-on inkubáljuk. A Bt termelő képesség a lyukak körül kialakult gátlási zóna mérete alapján, ismert koncentrációjú bacitracin oldat hígításaihoz hasonlítva állapítjuk meg.

1.3.3.6. A lacZ gén működésének vizsgálata X-gal segítségével

A telepeket 80 μ g/ml X-gal tartalmú YTA táptalajra oltjuk, 24-48 órás inkubálás után azok a telepek, melyekben a *lac*Z gén megnyilvánul a laktóz analóg X-galt elbontják, és a promóter aktivitásától függően világosabb vagy sötétebb kék színűek lesznek.

1.3.4. Fizikai és kémiai módszerek

1.3.4.1. Bakteriofágok koncentrálása

A szűrt lizátumot Sorvall SE-12 rotorban ülepítjük (4 °C, 29000 g, 60 perc). A felülúszót a fágüledékről óvatosan leöntjük és a fágokat 0.05-0.1 térfogatnyi fágpufferben szuszpendáljuk.

1.3.4.2. Plazmid izolálás E. coli-ból

A Pharmacia Miniprep Kit Plus alapján végezzük.

1.3.4.3. Teljes DNS tisztítás

1.5 ml overnight baktérium szuszpenziót centrifugálás (maximális fordulatszám, 1 perc) után steril desztillált vízzel mossuk, majd újabb centrifugálás után a sejteket 500 μ l Oldat I-ben szuszpendáljuk és 20 percig 37°C-on inkubáljuk. Hozzáadunk 300 μ l 2 %-os SDS-t, 20 μ l Proteináz K-t (20 mg/ml) és inkubáljuk legalább 1 órát 60°C-on. Ezután az oldatot 500 μ l fenol/kloroformmal összekeverjük, majd centrifugáljuk (20°C, 5 perc, 6000g). A vizes fázist óvatosan, vágott végű pipettával tiszta eppendorf csőbe visszük át, és azonos térfogatú, semleges fenol/kloroformmal újra extraháljuk. A lépéseket addig ismételjük, amíg a határfázison már nem látható kicsapódott fehérje. Ekkor a felülúszót 2.5 térfogat etanollal összekeverjük. A csapadékot centrifugáljuk (20 °C, 5 perc, 6000 g), 70 tf%, -20°C-os etanollal mossuk, majd a felülúszót teljesen eltávolítjuk. A csapadékot 200 μ l TE pufferben oldjuk és 5 μ l RNázt (10 mg/ml) adunk hozzá. A keveréket 30 percig 37°C-on inkubáljuk, majd 100 μ l semleges fenol/kloroformmal extraháljuk. A centrifugálás (20°C, 5 perc, 6000 g) után a felülúszót 2.5 térfogat etanollal összekeverjük. A kicsapódott DNS-t centrifugáljuk (20°C, 5 perc, 6000 g), a csapadékot 70 tf%, -20°C-os etanollal mossuk, majd a felülúszót teljesen eltávolítjuk. Vákuumszárítás után a DNS-t 200 μ l steril desztillált vízben oldjuk és -20°C-on tároljuk.

1.3.4.4. DNS koncentráció mérése

A TE pufferrel higított DNS oldat koncentrációját Beckman DU-50 spektrofotométerrel 259 nm-en mért extinkció alapján számoljuk. Egy extinkciós egységnek 50 µg/ml DNS koncentráció felel meg.

1.3.4.5. DNS elválasztás agaróz gélelektroforézissel

A különböző DNS struktúrák elválasztására horizontális agaróz gélelektroforézist használunk. A nagyméretű DNS fragmenteket TAE pufferben kis feszültséggel (1-2 V/cm), a kis méretűeket TBE pufferben magasabb feszültséggel (5-10 V/cm) választjuk el. Végül az EtBr-ot tartalmazó agaróz gélt UV transilluminátoron vizsgáljuk. UV fényben az EtBr-os DNS jellegzetes vöröses fényt emittál.

1.3.4.6. DNS endonukleáz emésztés, defoszforilálás és ligálás

Az enzimeket (restrikciós endonukleázok, CIAP és a T4 DNS ligáz) különböző cégektől vásároltuk. Az emésztéseket, a defoszforilálást és a ligálást a gyártók javaslatai alapján végezzük.

1.3.4.7. DNS szekvenálás

A pBlueScript II KS plazmidba épült inszertet T7 DNS polimerázzal (T7 Sequencing Kit, Pharmacia) a gyártó javaslata szerint a Sanger-féle láncterminációs módszerrel szekvenáljuk.

1.3.4.8. o-Nitrofenil-β-D-galactopyranosid (ONPG) mérés

A *lac*Z fúziós gének β-galaktozidáz aktivitását **Nicolson** és **Setlow** (**1990**) alapján mérjük.

1.3.4.9. Szekvencia vizsgálatok

A szekvencia összehasonlításokat és vizsgálatokat a Wisconsin Package, Version 8, (September 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711) programcsomag segítségével végezzük.

1.3.4.10. HPLC vizsgálat

A HPLC méréseket a Phylaxia kutató laboratóriumában végezték a bacitracin minősítésének megfelelő módszerrel és paraméterekkel.

A bacitracin szintetázt alegységeit és a bacitracin rezisztencia kialakításáért felelős fehérjéket kódoló DNS régiótól downstream olyan ORF-ek találhatóak melyek nem kapcsolhatók a bacitracin bioszintézishez (**Podlasek et al 1994, Konz et al, 1997**). Ezért bacitracin szintézisben résztvevő esszenciális komponenst kódoló ORF keresését a bacitracin szintetáz alegységeit kódoló DNS régiótól upstream, a még nem jellemzett régióban kezdtük. Korábbi, a



1.4.2. ábra. A *bts*T gén inaktiválására használt pKSBSKm plazmid konstrukció Ap: ampicilin rezisztencia; Km: Km rezisztencia; *ori*: pBR322 replikációs origó, *'orf*T': *orf*T belső fragment

elhelyezkedő, részletesen még nem jellemzett, tioészteráz-szerű fehérjékkel. A tioészterázokhoz való hasonlóság alapján az ORF-et orfT-nek neveztük el. Az összehasonlítások alapján az ORF eleje azonban nem volt а BamHI-SmaI fragmenten. Az orfT bacitracin bioszintézisben betöltött szerepének tisztázásához olyan konstrukciót hoztunk létre, amely integrációja esetén inaktiválja az ORF-et (1.4.2. ábra).

Az orfT gén BamHI-Ecl136(SacI) darabját pBlueScript II KS plazmid BamHI-Ecl136 helyére szubklónoztuk, és az így kapott konstrukció EcoRV helyére a Tn1545-ből származó, gram-pozitív baktériumokban is működő, Km rezisztenciát kódoló DNS fragmentet ligáltuk. А lehetséges konstrukciók közül pKSBSKm azt a konstrukciót választottuk, ami az E. coli



1.4.1. ábra. A pNZ1 plazmid vizsgált régiója és a felhasznált szubklónok eredete

bacitracin szintetáz elegységeinek klónozását célzó kísérletekből, rendelkezésre állt egy bacitracint nem termelő transzpozonos mutánsból izolált, a bacitracin szintetáz promóterét is tartalmazó DNS fragment (pNZ1). A kb. 2 kb-os fragmentből a promóter (P_{bacA}) illetve a promótertől downstream elhelyezkedő kódoló régió (bacA) szekvenciájának meghatározása már korábban megtörtént nem publikált) (1.4.1. ábra). A promótertől (Prágai, upstream elhelyezkedő, esetleges bacitracin szintézisben szerepet játszó gén azonosításának érdekében a kb. 0.7 kbos BamHI-SmaI DNS fragmentet megfelelő restrikciós enzimekkel emésztett pBlueScript II KS vektorba klónoztuk (pKS700) és szekvenáltuk. A 705 bp-os fragmenten egy ORF-et találtunk, melyből a származtatott fehérje jelentős hasonlóságot mutatott eukarióta tioészteráz II fehérjékhez és prokarióta, a peptidszintetáz alegységeket DNS fragmentekkel egy átírási kódoló egységben



1.4.3. ábra. Campbell tipusú integráció esetei
 A: belső fragment integrációja esetén a gén inaktiválódik.
 B: a gén elejét vagy végét tartalmazó konstrukció integrációja esetén a gén egyik példánya nem sérül

replikációs origót, az *E. coli* Ap rezisztenciát, a *B. licheniformis* Km rezisztenciát és a klónozott orfT belső fragmentet a **1.4.2. ábrá**nak megfelelően hordozta. Ez a konstrukció nem tartalmazta sem a orfT gén elejét, sem a végét, így a bakteriális genomba történő homológ integrációja (Campbell típusú integráció) az orfT gén inaktiválásához vezet (**1.4.3. ábra**). Mivel nincs rajta gram-pozitív, azaz *B. licheniformis*-ban is működő replikációs origó, csak azok a *B. licheniformis* transzformánsok lesznek Km rezisztensek, amelyek genomjukba integrálva hordozzák a plazmid konstrukciót.

A plazmid konstrukcióval transzformált, eredetileg Bt szintézisre képes, *B. licheniformis* protoplasztokat 50 µg/ml Km antibiotikumot tartalmazó szelektív táptalajon regeneráltuk, és a kapott telepek Bt termelését *Micrococcus flavus* indikátor baktérium felhasználásával, agar diffúziós biológiai teszt alapján megvizsgáltuk. A megvizsgált Km rezisztens telepek bacitracin antibiotikum termelése az eredeti szint 10 %-ára csökkent. Mivel az *orf*T inaktivációja a bacitracin szintézist jelentősen csökkentette, az *orf*T-nek szerepe van a bacitracin szintézisben. Az ORF bacitracin szintézisben betöltött szerepe és az általa kódolt fehérje tioészterázokhoz való hasonlósága alapján az ORF-et *bts*T-nek neveztük el.

A *bts*T ORF inaktiválása az általa kódolt enzim termelődésének megszűnéséhez vezetett, ami a bacitracin szintézis jelentős csökkenését okozta. A kérdés az volt, hogy hogyan változik a bacitracin szintézis, ha az *bts*T ORF által kódolt enzim sejten belüli koncentrációja megnő.

A kérdés megválaszolásának egyik lehetséges módja a BtsT enzimet kódoló gén több példányban való bejuttatása a bacitracin termelő törzsbe. Ennek legegyszerűbb módja az ha, a *bts*T ORF-et és az ORF-et átíró promótert nagy kópiaszámú plazmidon juttatjuk a bacitracin termelő mikroorganizmus sejtjeibe. Ehhez szükség van egy *B. licheniformis*-ban nagy kópiaszámban replikálódni képes plazmidra, a teljes *bts*T ORF-re és az ORF-et átíró promóterre.

Nagy kópiaszámú *Bacillus licheniformis*-ban is replikálódni képes plazmid rendelkezésre állt. A pUB110 korábbi vizsgálatok alapján stabilan, több példányban van jelen Km szelekció mellett a *B. licheniformis* sejtekben (**Prágai et al, 1994b**).

A teljes *bts*T gén klónozásához a genom-walking technikát használtuk. Ennek a módszernek a lényege az, hogy egy már klónozott DNS fragment segítségével lehetséges a DNS fragment környezetének klóónozása. Az ismert DNS fragmentet a cél-organizmusban is szelektálható, integrációs vektorba kell klónozni, és egyszeres homológ rekombinációval integrálni a célgenomba. Megfelelő restrikciós endonukleázokkal a fragment egy része és annak környezete az integrációs vektorral együtt visszanyerhető. (**1.4.4. ábra**). A teljes *bts*T ORF klónozásához





előállítottunk egy olyan plazmid konstrukciót, amelyben а szekvenálásra használt pKS700 plazmidba, a btsT gén végét tartalmazó fragment elé a Tn1545-ből származó Km rezisztenciát építettük (pKS700Km). Mivel а pKS700Km konstrukció hordozza a btsT ORF végét, homológ rekombinációja nem rontja el a btsT gént (mivel az integráció után egy olyan ép hibrid gén keletkezik, melynek eleje a genomi btsT-ből, másik pedig pKS700Km fele a plazmid csonka 'btsT génjéből származik [1.4.3.ábra B eset]), de lehetővé teszi, hogy a plazmid konstrukciót integrálva

hordozó telepek genomiális DNS-éből megfelelő restrikciós enzim segítségével a btsT gén eleje is izolálható legyen (1.4.4. ábra). A pKS700Km plazmiddal transzformált Km rezisztens regenerált protoplasztok genomiális DNS-ét izoláltuk, és megfelelő restrikciós enzimekkel külön-külön emésztettük, majd megfelelő hígításban önmagukkal ligáltuk és *E. coli* DH5α kompetens sejteket transzformáltunk vele. A transzpozonos mutánsok segítségével konstruált fizikai térkép alapján (Prágai et al. 1994/b) a BamHI és az EcoRI restrikciós endonukleázok hasítóhelye található megfelelően közel az izolálni kívánt régióhoz. A BamHI enzim azonban nem használható, hiszen az izolálni kívánt fragmenten is van egy *Bam*H hasítóhely, így a restrikciós hasítás, majd ligálás után csak az eredeti konstrukciót kaphatnánk vissza. A fizikai térkép alapján választott EcoRI enzimen kívül a *Hind*III enzimet is használtuk, mivel előzetes tapasztalatok alapján megfelelő gyakorisággal hasítja a B. licheniformis genomját. Mivel az emésztések során a gramm-pozitívokban is működő Km rezisztencia elveszik, de az E. coli replikációs origó és az ampicillin rezisztencia megmarad (1.4.4. ábra), a ligátummal transzformált, 50 µg/ml-es Ap antibiotikumot tartalmazó szelektív táptalajon szaporodni képes E. coli DH5a sejtek tartalmazzák a btsT gén elejét kódoló DNS fragmentet is. Csak a HindIII restrikciós endonukleázzal emésztett és ligált genomiális DNS transzformálása eredményezett Ap rezisztens és a btsT gén elejét is tartalmazó klónokat. Az EcoRI restrikciós hasítás valószínűleg olyan nagy DNS fragmenteket eredményezett, melyek ligálása és transzformálása már nem volt hatékony.



1.4.5 ábra. A pKSbtsT klón hordozta DNS fragment szerkezete.

A *bts*T gén elejét is tartalmazó klónok közül egyet kiválasztottunk (pKSbtsT), részleges fizikai térképét elkészítettük, és a *bts*T gén elejét tartalmazó régiót (**1.4.5. ábra**) szekvenáltuk. Más prokarióta, a peptidszintetáz alegységeit kódoló DNS fragmenttel egy átírási egységben lévő tioészterázokhoz történő hasonlítások alapján megállapítottuk a start kodon (ATG) és a feltételezett riboszóma kötő hely (RBS)legvalószínűbb pozícióját (**1.4.6. ábra**). Azonban a *Bacillus* eredetű tioészterázok alapján legvalószínűbbnek tartott start kodonon kívül az ábrán kékkel jelzett ATG is lehet a start kodon (természetesen másik RBS-sel).

RBS CGGACGGCTG ACGTATCCGT CGATTAACGG GTTATTCACC AAAAAATATC TACAACGAAA GGGAATGATA 1 MetLys LeuPheCys LeuProTyrAla GlyGlySer GluSerAla PheTyrSerTrp LysGlyHis GAAATGAAAT TATTTTGCCT GCCTTACGCC GGCGGATCCG AATCCGCATT TTATTCCTGG AAAGGCCATA 71 MetGlnPro AspIleGluIle CysProIle GlnLeuLys GlyArgGlyArg ArgPheAsn GluProCysTyr TGCAGCCCGA CATTGAGATT TGTCCGATTC AGCTGAAGGG AAGGGGCCGG CGTTTCAACG AGCCTTGTTA 141 GluSerLeu GluGluAla ValGlnAsp IlePheGluGln ValGlnAla GluArgLys GlyAspAspTyr CGAAAGCCTT GAAGAAGCAG TTCAAGACAT TTTTGAGCAG GTTCAAGCTG AACGAAAAGG TGACGACTAC 211 ProLeuPhe GlyHisSer MetGlySerLeu LeuAlaTyr GluLeuTyr TyrGlnMetSer GlyAlaGly 281 CCTCTTTTCG GGCACAGCAT GGGAAGCCTT TTGGCATATG AACTTTACTA TCAAATGAGC GGGGCGGGAG AlaGluLys ProValHisIle PhePheSer GlyTyrLys AlaProAsnArg IleArgLys ThrGluLysLeu 351 CTGAAAAAACC GGTTCACATT TTTTTCTCGG GCTATAAAGC GCCAAACAGG ATCAGAAAGA CAGAAAAACT HisThrLeu ProAsnPro IlePheLys LysLysIleVal GluLeuGly GlyThrPro GluGluLeuIle 421 GCATACCTTG CCCAATCCTA TTTTTAAGAA AAAAATTGTC GAGCTCGGGG GAACGCCTGA GGAGCTCATC AsnHisGlu GluLeuPhe GluLeuPheIle ProIleLeu LysSerAsp PheLysMetVal GluAsnTyr 491 AATCATGAAG AGCTATTTGA ATTGTTTATC CCCATTCTCA AAAGCGACTT TAAAATGGTA GAAAACTATA IleTyrGln GluArqAsnSer LysIleAsp CysAspIle ThrValLeuAsn GlyLysGlu AspAlaMetSer 561 TCTATCAAGA AAGAAACAGC AAAATAGATT GCGACATTAC CGTTCTCAAC GGAAAAGAAG ACGCCATGAG

- LysGluHis ValSerAsp TrpLysHis HisThrSerGly HisPheThr AlaTyrTyr PheGluGlyAsn 631 CAAGGAACAT GTATCCGATT GGAAACATCA TACTTCAGGA CACTTTACAG CCTATTACTT TGAGGGGAAT
- HisPhePhe LeuHisHis HisValGluLys IleThrGlu IleIleAsn HisSerLeuThr AlaSerArg 701 CATTTCTTTT TGCACCATCA CGTTGAAAAG ATCACCGAAA TCATCAATCA TTCACTGACA GCCAGCCGGA

ThrPhe

771 CGTTTTAACC TGCGATTTCG GCGAGATTCA AGCCCGGG

1.4.6. ábra A btsT gén szekvenciája (AF050160)

A teljes *bts*T ORF izolálása után, a nagy kópiaszámú plazmidról történő fokozott BtsT expresszióhoz szükség volt még egy *bts*T ORF-et átíró promóterre is. Mivel az *bts*T ORF



1.4.7. ábra. A *bts*T ORF-et átíró promóter lokalizálása. Homológ rekombináció után csak akkor íródik át az ép *bts*T gén, ha a pKSHSKm plazmid *Hind*III-*Ecl*136 fragmentjén helyezkedik el a *bts*T ORF promótere (P)

kezdőpontját a rendelkezésre álló adatok alapján nem lehetett pontosan meghatározni és így, egy már ismert promótertől downstream klónozni megvizsgáltuk, hogy a genom walkingal izolált HindIII-SmaI fragment tartalmazza-e a btsT gén "természetes" promóterét. A HindIII-Ecl136I fragmentet pBlueScrip II KS plazmid HindIII-Ecl136I helyére klónoztuk, a HincII helyre pedig Tn1545 transzpozonból származó а Km rezisztenciát építettük. Az így kapott pKSHSKm plazmid konstrukció (1.4.7. ábra) nem tartalmazza btsT ORF a végét, így B. licheniformis genomba történő integrációja után csak akkor nem változik a rekombináns törzs bacitracin termelése, ha a *Hind*III-*Ecl*136I fragmenten jelen van a btsT gént átíró promóter is (1.4.7. ábra). А pKSHSKm plazmidot genomjukban integrálva hordozó B. licheniformis



1.4.8. ábra A pKSUBbtsT plazmid térképe Km: Bacillusban és E. coli-ban is működő neomicin-kanamicin rezisztencia; Ap: *E. coli* Ap rezisztencia; P: promoter; *bts*T: teljes *bts*T ORF

telepek Bt termelése kimutathatóan nem változott, így feltételeztük, hogy a *Hind*III-*Ecl*136I fragment tartalmaz olyan promóter szerű elemet, amely lehetővé teszi a *bts*T gén transzkripcióját.

Ezek alapján rendelkezésünkre állt egy, a bacitracin szintetáz alegységeit kódoló DNS szakasz promótertől upstream elhelyezkedő, a bacitracin szintézisben szerepet játszó, tioészteráz II enzimekhez hasonló fehérjét kódoló és expresszáló DNS fragment. A BtsT enzim túltermeltetésének bacitracin szintészre gyakorolt hatásának vizsgálatához a következő lépés a fragment nagy kópiaszámú plazmidba történő klónozása volt.

Ehhez a teljes *Hind*III-*Sma*I fragmentet (az intakt *bts*T ORF-et és promóterét) hordozó *Hinc*II restrikciós endonukleázzal hasított pKSbtsT plazmidot és a *Sca*I-el hasított, pUB110 *Bacillus*-okban replikálódni képes, közepes kópiaszámú, Km rezisztens plazmidot ligáltuk, és a ligátummal *E. coli* DH5 α sejteket transzformáltunk. Az 50 µg/ml Ap-t és 2 µg/ml Km-t tartalmazó táptalajon szaporodni képes *E. coli* sejtekből izolált plazmidkonstrukciók közül a pKSUBbtsT (**1.4.8. ábra**) rekombináns plazmidot használtuk munkánk során. A *Bacillus-E. coli* ingázó pKSUBbtsT plazmiddal *B. licheniformis* 19 törzs protoplasztjait transzformáltunk. A 10 µg/ml Km

antibiotikumot tartalmazó táptalajon regenerált protoplasztokból а pKSUBbtsT plazmid visszaizolálható volt, ami azt jelenti, hogy a plazmid replikálódótt, így a btsT gén nemcsak a bakteriális genomon egy példányban, hanem a plazmid kópiaszámának megfelelően, több példányban volt jelen egy-egy sejtben. A pKSUBbtsT plazmidot hordozó sejtek (btsT+) bacitracin termelését összehasonlítottuk az inaktivált btsT ORF-et hordozó (btsT-) és a vad típusú (WT) B. licheniformis 19 bacitracin



1.4.10 ábra. HPLC-vel elválasztott bacitracin fajták mennyiségének alakulása a változó *bts*T géndózisok hatására A, B1, B2: bacitracin A, B₁, B₂.



1.4.9. ábra. A bacitracin érzékeny *M. flavus* növekedésének gátlása alapján meghatározott antibiotikum termelés változása a géndózis hatására

*bts*T: inaktív *bts*T gént hordozó, btsT+: a *bts*T gént amplifikálva hordozó, WT: a vad tipusú *B. lichenifromis* 19 bacitracin termelése

termelésével. A vad típusú, az amplifikált btsT gént hordozó és az inaktivált btsT gént hordozó B. licheniformis 19 sejteket azonos körülmények között, YTA folyékony tápközegben szaporítottuk. 24 óra után a felülúszóban lévő bacitracin mennyiségét M. flavus tesztbaktérium segítségével, biológia tesztben összehasonlítottuk, (1.4.9. illetve az antibiotikum három ábra) legnagyobb mennyiségben termelődő komponensét HPLC segítségével elválasztottuk egymástól (1.4.10. ábra). A btsT- mutáns a korábbi eredményeknek megfelelően, a vad tipusú törzs bacitracin szintézisének alig 10 %-ának megfelelő bacitracint szintetizált. A btsT+ törzs bacitracin termelése, biológia alapján, a vad típusú értékmérés törzs bacitracin termelésének 80 %-a volt, azonban a bacitracin antibiotikum komplex összetétele jelentősen megváltozott. A btsT+ törzs fermentlevében a biológiailag legaktívabb bacitracinA komponens mennyisége alig, a bacitracinB1 és bacitracinB2 komponensek mennyisége pedig közel a felére csökkent a vad típusú törzs fermentlevében meghatározott bacitracin komplex összetételhez viszonyítva.

A másodlagos metabolitok, és így az antibiotikumok termelése általában akkor kezdődik, amikor a tápközegből az esszenciális tápelemek bármelyike kimerül, és így a sejtszám további növekedése lehetetlenné válik, azaz a sejtek a szaporodás stacioner fázisába kerülnek (**Modest et al. 1984; Horinouchi és Beppu, 1990; Willey et al. 1991**). A szekvencia adatok és promóter tesztelő kísérletek alapján feltételezhető volt, hogy több, eddig azonosított peptidszintetázt kódoló operon szerkezetétől eltérően (pl.: gramicidin-S, surfactin) a bacitracin szintetáz alegységeinek átírása és a tőle upstream elhelyezkedő tioészteráz gén átírása egymástól függetlenül történik (**1.4.11. ábra**). Az



1.4.11 ábra A surfactin, a gramicidin és a bacitracin operonok szerkezete és a *bts*T illetve *bac*A ORF-ekbe történt β-galaktozidáz gén inszerciójának helye. P: promóter; T: terminátor; β-galaktozidáz: kitöltött sötétkék téglalap

azonosított promótereken kívül ezt valószínűsíti az is, hogy a *bts*T ORF-től downstream egy terminátor-szerű szekvencia található (**1.5.3. ábra**). Annak részletes vizsgálatára, hogy a *bts*T és a szintetáz alegységeinek átírása hogyan alakul, olyan rekombináns *B. licheniformis 19* törzseket állítottunk elő, amelyek a *bts*T illetve a szintetáz első alegységét kódoló ORF-ekben, integrálva, egy β -galaktozidáz enzimet kódoló DNS fragmentet hordoztak (**1.4.11. ábra**). A konstrukciók





elkészítéséhez a promóter nélküli β-galaktozidázt tartalmazó pQFBR plazmidot (Tran et al. 1998) használtuk, melynek HindIII-SmaI illetve BamHI-SmaI helyére a btsT ORF HindIII-SmaI (pINTbtsT) illetve a bacA ORF BglII-EcoRV (pINTbacA) fragmentjét klónoztuk, majd az ampicillin rezisztencia ScaI helyére a B. licheniformisban is működő Km rezisztenciát építettük (1.4.12. ábra). Rendelkezésünkre állt egy olyan B. licheniformis 19 törzs melynek β-galaktozidáz génje inaktív volt, így a *B.licheniformis* 19F sejtek β-galaktozidáz aktivitása az integrált plazmidon kódolt, az eredeti konstrukcióban promóter nélküli gal gén expressziójából származott (Tran et al. 1998). A promótereket is tartalmazó konstrukciókkal B. licheniformis 19F protoplasztokat transzformáltunk. Mivel a plazmidok nem tartalmaznak gram+ replikációs origót, 10 µg/ml Km-t tartalmazó szelektív táptalajon csak azok a transzformáns protoplasztok regenerálhatók, melyek genomjukban integrálva hordozzák az adott konstrukciót. A plazmidok integrációja után a rekombináns B. licheniformis 19F törzsek képesek a bacitracin szintézisre, mivel a használt konstrukciók tartalmazzák legalább az adott gén elejét, így az integráció után is marad intakt btsT illetve bacA gén. A β-galaktozidázt kódoló DNS fragment önálló promóterrel nem rendelkezik, így róla expresszió csak akkor van, ha a tőle upstream elhelyezkedő elemekkel együtt íródik át. Így a βgalaktozidáz aktivitás mérésével nyomon kísérhető a *bts*T illetve a *bac*A gének transzkripciója. Az INTbtsT és az INTbacA plazmidokat integrálva hordozó és vad típusú B. licheniformis 19 törzs sejtjeit YTA táptalajban szaporítottuk, és óránként mintát vettünk, meghatároztuk a szaporodás mértékét (OD600), a felülúszó bacitracin antibiotikum tartalmát és a sejtek β-galaktozidáz aktivitását ONPG segítségével (1.4.13. ábra). Mivel a vad típusú törzs és az integrációt hordozó törzsek bacitracin termelése illetve szaporodása nem tért el számottevően, ezért a könnyebb áttekinthetőség kedvéért csak ezek átlagértékét (Bt termelés, OD₆₀₀) ábrázoltuk.



1.4.13. ábra. A btsT és bacA gének átírásának vizsgálata transzkripciós fúziós β-galaktozidáz riporter gén felhasználásával INTbtsT: az INTbtsT plazmidot integrálva hordozó *B. licheniformis* 19F törzs β-galaktozidáz aktivitása; INTbacA: az INTbacA plazmidot integrálva hordozó *B. licheniformis* 19F törzs β-galaktozidáz aktivitása; OD₆₀₀: sejszaporodás (az elért maximum %-ában kifejezve); Bt termelés: bacitracin peptidantibiotikum termelés (az elért maximum %-ában kifejezve)

1.5. Megvitatás

Vizsgálataink kezdetén (1996-97) a bacitracin peptidantibiotikum szerkezete már ismert és jól jellemzett volt (**Jawetz, 1956; Craig és Konigsberg, 1957; Hickey, 1964**), de szintézisének részleteit homály fedte. Vizsgálatok bizonyították, hogy a bacitracin peptidantibiotikum nem riboszómákon, hanem egy nagyméretű, 3 alegységből felépülő multienzim komplexen - a bacitracin szintetázon – képződik (**Laland és Zimmer, 1973**). Meghatározták a szintetáz alegységeinek méretét és azt, hogy melyik alegység mely aminosavak beépítéséért felelős (**Froyshow és Mathiesen, 1979; van Dören, 1993**). A bacitracin peptidantibiotikumhoz hasonló módon szintetizálódó peptidek közül a gramicidin-S, a surfactin és a tirocidin szintéziséért felelős fehérjéket kódoló DNS fragmentek szekvenciája és a róluk történő transzkripció regulációja már részleteiben is hozzáférhetővé vált, (**Marahiel et al. 1987; Krätzschmar et al. 1989; Marahiel et al. 1993**; **Stachelhaus és Marahiel, 1995a, 1995b**), de a bacitracin szintézisében résztvevő alegységeket kódoló ORF-ek egymáshoz viszonyított helyzetéről és átírásukat végző promóterek számáról illetve pozíciójáról még ádáz vita folyt (**Korsnes et al. 1986; Ishihara et al. 1989; Prágai et al. 1994/b; Podlasek et al. 1995**). Ekkoriban a kutatások jó része a már meghatározott szekvenciájú peptidszintetázok részletes genetikai analízisére korlátozódott.

Az idő előrehaladtával azonban több, anyagilag jól támogatott kutatócsoport is bekapcsolódott a bacitracin bioszintézis rejtelmeinek kutatásába, mivel a gyógyszeripar részéről megjelent az igény olyan módszerekre, melyek lehetővé teszik bármilyen peptid vegyület nem szintetikus úton történő előállítását. Mivel riboszómákon rövid peptidek szintézise nehezen kivitelezhető, a figyelem a nemriboszómális peptidszintetázokra irányult. A hatékony működéshez elengedhetetlené vált a nemriboszómális peptid bioszintézis minden részletének beható ismerete, ezért óriási erővel indult meg a peptidszintetázokat kódoló DNS fragmentek szekvenálása és a peptidszintetázok doménjeinek genetikai és biokémiai analízise. A bacitracin peptidantibiotikum in vitro nem szintetizálható tiazolin gyűrűt tartalmaz (1.2.2.1. ábra), így a bacitracin szintézisében résztvevő multienzim komplex tiazolin gyűrű kialakításáért felelős régiója az érdeklődés központjába került, és a bacitracin szintetázt kódoló DNS régió szekvenálása is hamarosan megtörtént (Konz et al. 1997). A mások által publikált munkák mindig újabb és újabb irányokba terelték tevékenységünket, mivel olyan részletek vizsgálatával szerettünk volna foglalkozni, amibe más csoportok még nem kezdtek bele. Mivel a teljes bacitracin szintetázt kódoló DNS fragment szekvenciáját publikálták (Konz et al. 1997), és a tőle downstream elhelyezkedő, a bacitracin rezisztencia kialakításában szerepet játszó DNS fragment szerkezete is ismert volt (Podlasek et al. 1995), figyelmünket a bacitracin szintetázt kódoló DNS fragmentet átíró promótertől upstream elhelyezkedő régióra irányítottuk.

Már a bacitracin szintetázt kódoló DNS fragment szekvenciájának publikálása előtt rendelkezésünkre állt öt bacitracint nem termelő transzpozonos mutáns, és a transzpozon beépülések alapján konstruált részleges fizikai térkép (**Prágai et al. 1994/b**). Az egyik Tn917PF1 transzpozonos mutánsból a bacitracin szintetáz promóterét is tartalmazó fragment klónozása, a fragmenten a promóter lokalizálása és a promóter régió 800 bp-os részének szekvenálása is megtörtént. A szintetázt kódoló DNS fragment szekvenciájának közzététele után (**Konz et al. 1997**) az addig vizsgált bacitracin szintetázt kódoló régió elvesztette újdonságértéket, ezért a pNZ1 klón eddig nem analizált (azaz a már jellemzett bacitracin szintetázt kódoló ORF-et átíró promótertől upstream elhelyezkedő) régióját kezdtük el vizsgálni.

A fragmentet klónoztuk (**1.4.1. ábra**) és mindkét irányból szekvenáltuk. A DNS szakaszon egy ORF-et találtunk, melyből származtatott fehérje (BTST_BACLI) szekvenciája teljes hosszában hasonlóságot mutatott a II. csoportba tartozó, eukarióta eredetű tioészterázokkal (SAST_ANAPL, SAST_RAT), poliketid szintézisben résztvevő fehérjékkel (BIAL_STRH, ERY_SAPE) és más peptidszintetáz alegységeket kódoló ORF-ekkel egy átírási egységben lévő fehérjékkel (GRST_BACBR, SRF4_BACSU) (**1.5.1. ábra**).



1.5.1. ábra. A BtsT fehérje és homológjainak összehasonlítása.

BACT_BACLI: az általunk izolált *bts*T gén kódolta fehérje O68552; GRST_BACBR: *Bacillus brevis* gramicydin S szintetáz alegységekkel egy átírási egységben elhelyezkedő ORF1-ről átíródó fehérje P14686; SRF4_BACSU: *Bacillus subtilis* surfactin szintetáz alegységeivel egy átírási egységben elhelyezkedő ORF4 kódolta fehérje Q08788; SAST_ANAPL: vadkacsa középhosszú szénláncú zsírsavak szintézisében résztvevő tioészteráz II fehérje P00633: SAST_RAT: patkány középhosszú szénláncú zsírsavak szintézisében résztvevő tioészteráz II fehérje P08635; BIAL_STRH: *Streptomyces hygroscopicus* bialaphos poliketid szintézisében szerepet játszó fehérje Q03094; ERY_SAPE: *Saccharopolyspora erythrea* erythromycin poliketid szintézisében szerepet játszó fehérje Q00442. Aminosav hasonlóság mértéke: =100; >=75; >=50; <50.

Eukariótákban a II csoportba tartozó tioészterázok (TEII) csak bizonyos szövetféleségekben expresszálódnak (nemkérődzők emlőmirigye; viziszárnyasok faggyúmirigye), és ott a készülő

zsírsavláncot C8-C12-es hosszúságánál a zsírsavszintázról lehasítják, így lehetővé teszik az adott szövetféleségben a közepes lánchosszúságú zsírsavak szintézisét is. A II csoportba tartozó tioészterázok hiányában a zsírsavszintézis tovább folytatódik, és a szénlánc csak akkor hasad le a zsírsavszintázról, ha mérete elérte a C16-C18-as hosszúságot. Az elkészült zsírsavlánc lehasítását ebben az esetben a zsírsavszintáz komplex tioészteráz I modulja (TEI) végzi, melynek aminosav szekvenciája az aktív centrumot kivéve nem mutat hasonlóságot a TEII fehérjék aminosav

szekvenciájával (Libertini és Smith, 1978; Wakil et al. 1983; Pazirendeh et al. 1989; Pazirendeh et al. 1991). A patkány TEII tioészterázát kódoló génjét klónozták, biokémiailag jellemezték, és helyspecifikus mutagenezissel a hidrolízisben résztvevő aminosavakat azonosították. (Tai et al. 1993). A TEII katalizálta folyamat hasonlít a szerin proteázok katalitikus triádja által katalizálta



reakcióhoz (**1.5.2. ábra**). A legjobban jellemzett szerin proteáz: a tripszin – szubsztrát hasítása a következőképpen történik: A Ser195 OH-ból a proton a His57-re kerül. Az így keletkezett pozitív töltésű His 57-et az Asp102 negatív töltése stabilizálja. A Ser195 aktivált O-ja megtámadja a szubsztrát karbonil csoportjának C-atomját, ekkor a karbonil csoport oxigénjének kettős kötése egyszeresre változik és így az O-nek negatív töltése lesz. Ezt a negatív töltésű O csoportot (oxianion) az enzim 193. és 195. aminosavának főláncbeli NH csoportja H híd kölcsönhatás révén stabilizálja. A His57 protonállt formája által megtartott proton a hasítódó peptidkötés NH csoportjához kapcsolódik, így a peptidkötés elhasad. Az amin rész H híd kölcsönhatással a His57-tel, a sav rész pedig egy észter kötésen keresztül kovalensen a Ser195-tel kapcsolódik. Az amin rész eldiffundál és így a reakció első része, az aciláció befejeződik. A dezaciláció folyamata során a His57 elvon egy protont egy vízmolekulától. A keletkező OH- reagál az Ser195-höz kapcsolódó acil



viszonyított helyzete és az intergenikus régió szerkezete

csoport karbonil szénatomjával. A His57-ről a proton a Ser 195 oxigénjére kerül, amelyről így a szubsztrát maradéka távozik. (**Pazirandeh et al. 1991**). A patkány TEII fehérjéjét vizsgáló **Tai et al. (1993**) azt feltételezték, hogy a TEII enzimek esetében a Ser101 és a His237 mellett a triád harmadik eleme az Asp236. Ennek alaninra cserélése azonban nem befolyásolta jelentősen a TEII katalizálta reakciót, így azt állították, hogy a triád harmadik tagja, a szerin proteázoktól eltérően, nem játszik szerepet a reakcióban. A többi hasonló fehérje (SRF4_BACSU, GRST_BACBR, BIAL_STRH, ERY_SAPE) funkcióját ekkor még nem vizsgálták, így ezeknek a TEII homológ fehérjéknek nemriboszómális peptidszintézisben, illetve a poliketid szintézisben betöltött szerepéről ebben az időben még nem állt rendelkezésünkre információ. Mivel a bacitracin szintetáz alegységeit kódoló DNS fragmentet átíró promótertől upstream elhelyezkedő, újonnan azonosított ORF kódolta fehérje (BTST_BACLI) hasonlóságot mutatott több olyan fehérjével, melyek nemriboszómális peptidszintézisben.

Az *orf*T inszerciós inaktiválása a bacitracin szintézis jelentős csökkenéséhez vezetett. Mivel a bacitracin szintetáz alegységeit kódoló DNS fragment átírásáért egy, az ORF-től downstream elhelyezkedő erős promóter (P_{bacA}) a felelős, és az ORF TAA stop kodonja és a bacitracin szintetáz promóterének –35-ös régiója között hairpin szerkezet képzésére alkalmas transzkripciós terminátor szerű szekvencia (T_{btsT}) is található, feltételezhető, hogy a bacitracin szintézis jelentős csökkenése nem a bacitracin szintetáz alegységeket kódoló ORF-ek - inszerció okozta - csökkent mértékű átírásával magyarázható, hanem azzal, hogy az inaktivált ORF kódolta TE II homológ fehérje közvetlen szerepet játszik a bacitracin szintézisben (**1.5.3. ábra**). Hasonló eredményt kaptak a tirocidin szintetáz alegységeit kódoló ORF-ektől downstream, de velük egy átírási egységben lévő TEII homológ fehérjét kódoló ORF inaktiválása során is (**Schneider és Marahiel, 1998**).

Az ORF-et a tioészterázokkal való hasonlóság és a bacitracin szintézisben betöltött szerepe miatt btsT-nek neveztük el. Megvizsgáltuk a teljes btsT ORF géndózisának a bacitracin peptidantibiotikum komplex szintézisére gyakorolt hatását úgy, hogy összehasonlítottuk az eredeti, a btsT inaktivált (BlbtsT) és a btsT amplifikált ($BlbtsT^{+}$) Bacillus licheniformis törzsek bacitracin termelő képességét, és megvizsgáltuk a képződő bacitracin peptidantibiotikum komplex összetételét.

					D-Phe ——L-His
Bacitracin	Χ	Y	1. hely	R	X D Asp
А	L-Ile	L-Ile	L-Ile	А	
					D-Om L-Asn
\mathbf{B}_1	L-Ile	L-Ile	L-Val	В	1-Lys
B_2	L-Val	L-Ile	L-Ile	А	Y 1.5.4. abra. A
B_3	L-Ile	L-Val	L-Ile	А	p-Glu bacitracin
D_1	L-Val	L-Ile	L-Val	В	L-Leu komponensek
D_2	L-Ile	L-Val	L-Val	В	szerkezete
D_3	L-Val	L-Val	L-Ile	А	° [™] R
Е	L-Val	L-Val	L-Val	В	А СН. В
F	L-Ile	L-Ile	L-Ile	С	
H_1	L-Ile	L-Ile	L-Val	D	
H_2	L-Val	L-Ile	L-Ile	С	$H \setminus S$ $H \setminus S$ $H \setminus S$
H_3	L-Ile	L-Val	L-Ile	С	
I_1	L-Val	L-Ile	L-Val	D	CH3
I_2	L-Ile	L-Val	L-Val	D	
I ₃	L-Val	L-Val	L-Ile	С	
					<u>∖`</u> s` \ <u>`</u> s`

A bacitracin peptidantibiotikum több különböző dodekapeptid keveréke (**Ikai et al. 1994**; **Morris, 1994**; **Siegel et al. 1994**; **Epperson és Ming, 2000**). Legnagyobb mennyiségben a bacitracin A komponens szintetizálódik, mely az N-terminálisán egy L-Ile és egy L-Cys által alkotta aminotiazolin, a C-terminálisán pedig egy heptapeptid gyűrűt tartalmaz (**1.5.4. ábra**). A heptapeptid részben a 6. pozícióban lévő L-Lys oldallánca kapcsolódik egy amid kötésen keresztül a C-terminális L-Asn aminosavával. A minor komponensek az **1.5.4. ábrá**n X és Y jelzett pozíciókban, illetve a tiazolin gyűrű első aminosavában (1. hely) térnek el egymástól. A minor komponensek közül az amino-tiazolin gyűrűt (**1.5.4. ábra** A, B) tartalmazó A-E szerkezetek biológiailag aktív struktúrákat takarnak, míg a keto-tiazolin gyűrűt (**1.5.4. ábra** C. D) tartalmazó F-I komponensek biológiailag inaktívak. A biológiailag aktív minor komponensek közül legnagyobb mennyiségben a B₁ és a B₂ forma szintetizálódik (**Ikai et al. 1994**). A keto-tiazolin gyűrűt tartalmazó komponensek az amino-tiazolin gyűrűs komponensekből az N-terminális tiazolin rész oxidációjával, nem biológiai úton keletkeznek (**Craig et al. 1952; Newton és Abraham, 1953; Craig et al. 1957**).

A biológiai úton szintetizálódó komponensek (A-E) csak abban különböznek egymástól, hogy L-Val-t vagy L-Ile-t tartalmaznak az első, az ötödik (X) és a nyolcadik pozícióban (Y).



1.5.5. ábra. Az összes bacitracin és ezen belül a bacitracin komponensek mennyiségének alakulása a különböző törzsekben

peptidantibiotikum minden formájának mennyisége csökkent, míg a BlbtsT⁺ törzs esetében az

összes bacitracin mennyiségének csökkenése lényegében a bacitracin B_1 és B_2 komponensek csökkenésére vezethető vissza (**1.5.5. ábra**). A bacitracin A és B_1 illetve B_2 formája között egyetlen egy aminosavban van eltérés. A B_1 forma az első helyen (a tiazolin gyűrűben) a B_2 forma pedig a 8. (X) pozícióban tartalmaz L-Val-t a L-Ile helyett (**1.5.4. ábra**). A két aminosav (L-Val, L-Ile) szerkezete, csak az oldallánc méretében tér el egymástól, az izoleucin oldallánca hosszabb mint a valin oldallánca (**1.5.6. ábra**).

Az izoleucin helyett a valin beépülése a bacitracin

végtermékbe a következőképpen magyarázható. Egy meghatározott pozícióban beépülő aminosav kiválasztásáért és aktiválásáért (a nemriboszómális peptidszintézis során) az adenilációs domén a felelős. Az adenilációs domén specifikusságát szubsztrát kötő zsebének kialakításában résztvevő, jól definiált pozíciókban elhelyezkedő aminosavak határozzák meg (Challis et al. 2000) (1.2.1.1.2 ábra). Az önállóan klónozott és expresszált fengycin szintetáz FenB és izoenzimjének (Fen5) adenilációs doménjei elsősorban L-izoleucint aktiválnak, de a FenB az izoleucin aktiváló képességéhez mért 10 %-ban L-valin aktiválására is képes (Steller et al. 1999; Lin et al. 1998). Az ugyancsak L-izoleucint aktiváló lichenisin szintetáz harmadik modulja a LicC az L-izoleucinen kívül az L-leucint és az L-valint is egyformán, kb. 25 %-os gyakorisággal képes aktiválni (Konz et al. 1999). A bizonyítottan L-izoleucint aktiváló adenilációs domének (FenB és LicC) szubsztrátkötő

Vizsgálataink azt mutatták, hogy a btsT gént egy példányban hordozó vad típusú törzs bacitracin termeléséhez képest az inaktivált btsT gént hordozó törzs (BlbtsT -) bacitracin esetében а termelés jelentősen, a btsT nagy kópiaszámú gént plazmidon hordozó törzs (BlbtsT⁺) esetében pedig kisebb mértékben ugyan, de csökkent (1.4.9. ábra). bacitracin keletkező А peptid keverék vizsgálata azt mutatta, hogy az inaktív btsT gént hordozó törzseknél bacitracin a



1.5.6. ábra. Az L-valin és a L-izoleucin szerkezete

zsebének kitüntetett pozícióiban lévő aminosavakat összehasonlítottuk a bacitracin szintetáz A1 (BAC_A1), A5 (BAC_A5) és C8-as (BAC_C8), és a feltételezhetően L-izoleucint aktiváló LchA adenilációs domének (LCH_A) szubsztrátkötő zsebeinek kialakításában résztvevő aminosavakkal a már ismert térszerkezetű GrsA adenilációs domént (GRS_A1) használva mintaként (**1.5.7. ábra**).

			235 2	36 239		
GRS A1	217	SLNVTEKDRI	GQFASISFDA	SVWEMFMALL	TGASLYIILK	DTINDFVKFE
BAC A1	197	YIDITEDNVI	LQLSNYSFDG	SVFDIFGALL	NGASLVMIEK	EALLNINRLG
BAC A5	195	YIDITGNDVI	LQLSNYSFDG	SVFDIFGALL	NGASLVLIEK	ETVLNTHELA
BAC C8	191	YIDITEDDAI	LQLSNYSFDG	SVFDIFGALL	NGASLVLIEK	ETVLNTHELA
FEN B	197	YTSASVNDRF	ILTGSISFDA	VTFEMFGALL	KGATLHIIDK	STMLTPDRFG
LCH A	200	YISLSEKDTL	LSLSNYAFDG	FTFDVYGALL	NGAKLVVADQ	ATILHIGKLT
LIC C	200	YISLSEKDTL	LSLSNYAFDG	FTFDVYGALL	NGAKLVVADQ	ATILHIGKLT
			**	• • • • * * *	* ** * •	
			278			299 301
GRS_A	267	QYINQKEITV	ITLPPTY	VVHLDPE	RILS-IQT	LITAGSATSP
BAC A1	247	SAINEEKVSV	MFITTALFNM	IADIHVD	CLSN-LRK	ILFGGERASI
BAC A5	245	EVIKKEQVSV	MFITTAL	FNTLADI	NIGCLAKLRK	ILFGGERASI
BAC C8	241	EVIKKEQVSV	MFITTAL	FNTLADI	NIGCLAKLRK	IFLGGERASI
FEN B	247	AYLIENNITV	LFLTTAL	FNQLAQAQAD	MFHR-LHT	LYVGGEALSP
LCH A	250	ETIQKENITV	MFVTTALFNL	LVDAGTE	WMKG-IRK	VLFGGERSSV
LIC C	250	ETIQKENITV	MFVTTALFNL	LVDAGTE	WMKG-IRK	VLFGGERSSV
		• ••*				• •* *
			3	22 330 3	31	
GRS_A	308	SLVNK-WKE-	3 -KVTYIN	22 330 3 AYGPTETTIC	31 ATTW-VATKE	TIGHSVPIGA
GRS_A BAC A1	308 291	SLVNK-WKE- PHVRK-VLN-	3 -KVTYIN -HVGRDKLIH	22 330 3 AYGPTETTIC VYGPTESTVY	31 ATTW-VATKE ATYYFINEID	TIGHSVPIGA DEAETIPIGS
GRS_A BAC A1 BAC A5	308 291 289	SLVNK-WKE- PHVRK-VLN- PHVRK-VLD-	3 -KVTYIN -HVGRDKLIH -HVGRDKLIH	22 330 3 AYGPTETTIC VYGPTESTVY VYGPTESTVY	31 ATTW-VATKE ATYYFINEID ATYYFINEID	TIGHSVPIGA DEAETIPIGS DEAETIPIGS
GRS_A BAC A1 BAC A5 BAC C8	308 291 289 285	SLVNK-WKE- PHVRK-VLN- PHVRK-VLD- PHVRK-VLN-	3 -KVTYIN -HVGRDKLIH -HVGRDKLIH -HVGRDKLIH	22 330 3 AYGPTETTIC VYGPTESTVY VYGPTESTVY VYGPTESTVY	31 ATTW-VATKE ATYYFINEID ATYYFINEID ATYYFINEID	TIGHSVPIGA DEAETIPIGS DEAETIPIGS DEAETIPIGS
GRS_A BAC A1 BAC A5 BAC C8 FEN B	308 291 289 285 291	SLVNK-WKE- PHVRK-VLN- PHVRK-VLD- PHVRK-VLN- ELINAVRRAC	3 -KVTYIN -HVGRDKLIH -HVGRDKLIH -HVGRDKLIH PNLSLYN	22 330 3 AYGPTETTIC VYGPTESTVY VYGPTESTVY VYGPTESTVY IYGPTENT-T	31 ATTW-VATKE ATYYFINEID ATYYFINEID ATYYFINEID FSTF-FEIKR	TIGHSVPIGA DEAETIPIGS DEAETIPIGS DEAETIPIGS DYATPIPIGK
GRS_A BAC A1 BAC A5 BAC C8 FEN B LCH A	308 291 289 285 291 294	SLVNK-WKE- PHVRK-VLN- PHVRK-VLD- PHVRK-VLN- ELINAVRRAC SHVKKAFAA-	3 -KVTYIN -HVGRDKLIH -HVGRDKLIH -HVGRDKLIH PNLSLYN -MGPD-RIIH	22 330 3 AYGPTETTIC VYGPTESTVY VYGPTESTVY VYGPTESTVY IYGPTENT-T VYGPTETTVF	31 ATTW-VATKE ATYYFINEID ATYYFINEID ATYYFINEID FSTF-FEIKR ATFYPVNRIE	TIGHSVPIGA DEAETIPIGS DEAETIPIGS DEAETIPIGS DYATPIPIGK DNAVSIPIGK
GRS_A BAC A1 BAC A5 BAC C8 FEN B LCH A LIC C	308 291 289 285 291 294 294	SLVNK-WKE- PHVRK-VLN- PHVRK-VLD- PHVRK-VLN- ELINAVRRAC SHVKKAFAA- SHVKKAFAA-	3 -KVTYIN -HVGRDKLIH -HVGRDKLIH -HVGRDKLIH PNLSLYN -MGPD-RIIH -MGPD-RIIH	22 330 3 AYGPTETTIC VYGPTESTVY VYGPTESTVY VYGPTESTVY IYGPTENT-T VYGPTETTVF VYGPTETTVF	31 ATTW-VATKE ATYYFINEID ATYYFINEID FSTF-FEIKR ATFYPVNRIE ATFYPVNRIE	TIGHSVPIGA DEAETIPIGS DEAETIPIGS DYATPIPIGK DNAVSIPIGK DNAVSIPIGK
GRS_A BAC A1 BAC A5 BAC C8 FEN B LCH A LIC C	308 291 289 285 291 294 294	SLVNK-WKE- PHVRK-VLN- PHVRK-VLD- PHVRK-VLN- ELINAVRRAC SHVKKAFAA- SHVKKAFAA-	3 -KVTYIN -HVGRDKLIH -HVGRDKLIH -HVGRDKLIH PNLSLYN -MGPD-RIIH -MGPD-RIIH	22 330 3 AYGPTETTIC VYGPTESTVY VYGPTESTVY IYGPTESTVY IYGPTETTVF VYGPTETTVF ***** *	31 ATTW-VATKE ATYYFINEID ATYYFINEID FSTF-FEIKR ATFYPVNRIE ATFYPVNRIE	TIGHSVPIGA DEAETIPIGS DEAETIPIGS DYATPIPIGK DNAVSIPIGK DNAVSIPIGK ***
GRS_A BAC A1 BAC A5 BAC C8 FEN B LCH A LIC C	308 291 289 285 291 294 294	SLVNK-WKE- PHVRK-VLN- PHVRK-VLD- PHVRK-VLN- ELINAVRRAC SHVKKAFAA- SHVKKAFAA-	3 -KVTYIN -HVGRDKLIH -HVGRDKLIH -HVGRDKLIH PNLSLYN -MGPD-RIIH -MGPD-RIIH	22 330 3 AYGPTETTIC VYGPTESTVY VYGPTESTVY VYGPTESTVY IYGPTETTVF VYGPTETTVF ***** *	31 ATTW-VATKE ATYYFINEID ATYYFINEID ATYYFINEID FSTF-FEIKR ATFYPVNRIE ATFYPVNRIE	TIGHSVPIGA DEAETIPIGS DEAETIPIGS DYATPIPIGK DNAVSIPIGK ***
GRS_A BAC A1 BAC A5 BAC C8 FEN B LCH A LIC C	308 291 289 285 291 294 294	SLVNK-WKE- PHVRK-VLN- PHVRK-VLD- PHVRK-VLN- ELINAVRRAC SHVKKAFAA- SHVKKAFAA-	3 -KVTYIN -HVGRDKLIH -HVGRDKLIH -HVGRDKLIH PNLSLYN -MGPD-RIIH -MGPD-RIIH 517	22 330 3 AYGPTETTIC VYGPTESTVY VYGPTESTVY VYGPTESTVY IYGPTENT-T VYGPTETTVF ***** *	31 ATTW-VATKE ATYYFINEID ATYYFINEID ATYYFINEID FSTF-FEIKR ATFYPVNRIE ATFYPVNRIE	TIGHSVPIGA DEAETIPIGS DEAETIPIGS DYATPIPIGK DNAVSIPIGK DNAVSIPIGK
GRS_A BAC A1 BAC A5 BAC C8 FEN B LCH A LIC C GRS_A	308 291 289 285 291 294 294 294	SLVNK-WKE- PHVRK-VLN- PHVRK-VLD- PHVRK-VLN- ELINAVRRAC SHVKKAFAA- SHVKKAFAA-	3 -KVTYIN -HVGRDKLIH -HVGRDKLIH -HVGRDKLIH PNLSLYN -MGPD-RIIH -MGPD-RIIH 517 KMPLTSNGKI	22 330 3 AYGPTETTIC VYGPTESTVY VYGPTESTVY VYGPTESTVY IYGPTETTVF VYGPTETTVF ***** * DRKQLPEPDL	31 ATTW-VATKE ATYYFINEID ATYYFINEID FSTF-FEIKR ATFYPVNRIE ATFYPVNRIE TFF	TIGHSVPIGA DEAETIPIGS DEAETIPIGS DYATPIPIGK DNAVSIPIGK DNAVSIPIGK ***
GRS_A BAC A1 BAC A5 BAC C8 FEN B LCH A LIC C GRS_A BAC A1	308 291 289 285 291 294 294 294 499 486	SLVNK-WKE- PHVRK-VLN- PHVRK-VLD- PHVRK-VLN- ELINAVRRAC SHVKKAFAA- SHVKKAFAA- MIPSYFIQLD MIPAYFVKLD	3 -KVTYIN -HVGRDKLIH -HVGRDKLIH PNLSLYN -MGPD-RIIH -MGPD-RIIH 517 KMPLTSNGKI KLPLTKNGKV	22 330 3 AYGPTETTIC VYGPTESTVY VYGPTESTVY VYGPTESTVY IYGPTETTVF VYGPTETTVF VYGPTETTVF ***** *	31 ATTW-VATKE ATYYFINEID ATYYFINEID FSTF-FEIKR ATFYPVNRIE ATFYPVNRIE TFF TAGAENEYEA	TIGHSVPIGA DEAETIPIGS DEAETIPIGS DYATPIPIGK DNAVSIPIGK DNAVSIPIGK *** PRNETEE
GRS_A BAC A1 BAC A5 BAC C8 FEN B LCH A LIC C GRS_A BAC A1 BAC A5	308 291 289 285 291 294 294 294 499 486 484	SLVNK-WKE- PHVRK-VLN- PHVRK-VLD- PHVRK-VLN- ELINAVRRAC SHVKKAFAA- SHVKKAFAA- MIPSYFIQLD MIPAYFVKLD MIPAYFVKMD	3 -KVTYIN -HVGRDKLIH -HVGRDKLIH PNLSLYN -MGPD-RIIH -MGPD-RIIH 517 KMPLTSNGKI KLPLTKNGKV KLPLTKNGKV	22 330 3 AYGPTETTIC VYGPTESTVY VYGPTESTVY VYGPTESTVY IYGPTETTVF VYGPTETTVF VYGPTETTVF ***** * DRKQLPEPDL DRKALPEPDR DRKALPEPDR	31 ATTW-VATKE ATYYFINEID ATYYFINEID FSTF-FEIKR ATFYPVNRIE ATFYPVNRIE TFF TAGAENEYEA SAGT	TIGHSVPIGA DEAETIPIGS DEAETIPIGS DYATPIPIGK DNAVSIPIGK DNAVSIPIGK *** PRNETEE
GRS_A BAC A1 BAC A5 BAC C8 FEN B LCH A LIC C GRS_A BAC A1 BAC A5 BAC C8	308 291 289 285 291 294 294 294 499 486 484 480	SLVNK-WKE- PHVRK-VLN- PHVRK-VLD- PHVRK-VLN- ELINAVRRAC SHVKKAFAA- SHVKKAFAA- MIPSYFIQLD MIPAYFVKLD MIPAYFVKMD MIPAYFVKMD	3 -KVTYIN -HVGRDKLIH -HVGRDKLIH PNLSLYN -MGPD-RIIH -MGPD-RIIH 517 KMPLTSNGKI KLPLTKNGKV KLPLTKNGKV KLPLTKNGKV	22 330 3 AYGPTETTIC VYGPTESTVY VYGPTESTVY IYGPTESTVY IYGPTETTVF VYGPTETTVF ***** * DRKQLPEPDL DRKALPEPDR DRKALPEPDR DRKALPEPDR	31 ATTW-VATKE ATYYFINEID ATYYFINEID FSTF-FEIKR ATFYPVNRIE ATFYPVNRIE TFF TAGAENEYEA SAGT TAG	TIGHSVPIGA DEAETIPIGS DEAETIPIGS DYATPIPIGK DNAVSIPIGK DNAVSIPIGK ***
GRS_A BAC A1 BAC A5 BAC C8 FEN B LCH A LIC C GRS_A BAC A1 BAC A5 BAC C8 FEN B	308 291 289 285 291 294 294 294 499 486 484 480 483	SLVNK-WKE- PHVRK-VLN- PHVRK-VLD- PHVRK-VLN- ELINAVRRAC SHVKKAFAA- SHVKKAFAA- MIPSYFIQLD MIPAYFVKLD MIPAYFVKMD MIPAYFVKMD MIPAYFVKMD	3 -KVTYIN -HVGRDKLIH -HVGRDKLIH PNLSLYN -MGPD-RIIH -MGPD-RIIH 517 KMPLTSNGKI KLPLTKNGKV KLPLTKNGKV KLPLTKNGKV RMPLTGNGKI	22 330 3 AYGPTETTIC VYGPTESTVY VYGPTESTVY IYGPTESTVY IYGPTETTVF VYGPTETTVF ***** * DRKQLPEPDL DRKALPEPDR DRKALPEPDR DRKALPEPDR NRSALPVPEN	31 ATTW-VATKE ATYYFINEID ATYYFINEID FSTF-FEIKR ATFYPVNRIE ATFYPVNRIE TFF TAGAENEYEA SAGT TAG ESENRQDLTP	TIGHSVPIGA DEAETIPIGS DEAETIPIGS DYATPIPIGK DNAVSIPIGK DNAVSIPIGK *** PRNETEE PRNWVEQ
GRS_A BAC A1 BAC A5 BAC C8 FEN B LCH A LIC C GRS_A BAC A1 BAC A5 BAC C8 FEN B LCH A	308 291 289 285 291 294 294 294 499 486 484 480 483 491	SLVNK-WKE- PHVRK-VLN- PHVRK-VLN- ELINAVRRAC SHVKKAFAA- SHVKKAFAA- MIPSYFIQLD MIPAYFVKLD MIPAYFVKMD MIPAYFVKMD MIPAYFVKMD MIPAYFVKMD	3 -KVTYIN -HVGRDKLIH -HVGRDKLIH PNLSLYN -MGPD-RIIH -MGPD-RIIH -MGPD-RIIH 517 KMPLTSNGKI KLPLTKNGKV KLPLTKNGKV KLPLTKNGKV RMPLTGNGKI ELPLTANGKV	22 330 3 AYGPTETTIC VYGPTESTVY VYGPTESTVY IYGPTESTVY IYGPTETTVF VYGPTETTVF ***** * DRKQLPEPDL DRKALPEPDR DRKALPEPDR NRSALPVPEN NRRLLPEADG	31 ATTW-VATKE ATYYFINEID ATYYFINEID FSTF-FEIKR ATFYPVNRIE ATFYPVNRIE TFF TAGAENEYEA SAGT TAG ESENRQDLTP RPNPTEHRAP	TIGHSVPIGA DEAETIPIGS DEAETIPIGS DYATPIPIGK DNAVSIPIGK DNAVSIPIGK *** PRNETEE PRNWVEQ RNMTEE
GRS_A BAC A1 BAC A5 BAC C8 FEN B LCH A LIC C GRS_A BAC A1 BAC A5 BAC C8 FEN B LCH A LIC C	308 291 289 285 291 294 294 294 499 486 484 480 483 491 491	SLVNK-WKE- PHVRK-VLN- PHVRK-VLN- ELINAVRRAC SHVKKAFAA- SHVKKAFAA- MIPSYFIQLD MIPAYFVKLD MIPAYFVKMD MIPAYFVKMD MIPAYFVKMD MIPAYFVKMD MIPAYFVKMD	3 -KVTYIN -HVGRDKLIH -HVGRDKLIH PNLSLYN -MGPD-RIIH -MGPD-RIIH -MGPD-RIIH -MGPD-RIIH KLPLTKNGKV KLPLTKNGKV KLPLTKNGKV KLPLTKNGKV KLPLTANGKV ELPLTANGKV	22 330 3 AYGPTETTIC VYGPTESTVY VYGPTESTVY IYGPTESTVY IYGPTETTVF VYGPTETTVF ***** * DRKQLPEPDL DRKALPEPDR DRKALPEPDR NRSALPVPEN NRRLLPEADG NRRLLPEADG	31 ATTW-VATKE ATYYFINEID ATYYFINEID FSTF-FEIKR ATFYPVNRIE ATFYPVNRIE TFF TAGAENEYEA SAGT TAG ESENRQDLTP RPNPTEHRAP RPNPTEHRAP	TIGHSVPIGA DEAETIPIGS DEAETIPIGS DYATPIPIGK DNAVSIPIGK DNAVSIPIGK *** PRNETEE PRNWVEQ RNMTEE RNMTEE



1.5.7. ábra. Felső rész: GrsA adenilációs domén szerkezete alapján a szubsztrátkötő zseb kialakításában résztvevő aminosavak azonosítása az ismert szubsztrátspecifikusságú FenB (Q45563) és LchA (O49247) adenilációs domének és a feltételezett L-izoleucint aktiváló Bac A1, Bac A5, Bac C8 (AAC06346) és Lic C (O66071) adenilációs domének esetében

Alsó rész: az L-Ile szubsztrátkötő zseb kialakításában résztvevő, konzerválódott aminosavak elhelyezkedése

A bacitracin peptidantibiotikum első, ötödik és nyolcadik pozíciójába beépülő aminosav aktiválásáért felelős adenilációs modulok - a szubsztrát specifikusság kialakításában résztvevő aminosavak szempontjából - megegyeznek a már jellemzett, és bizonyítottan L-Val aktiválására is képes FenB és LicC adenilációs doménekkel. Ez alapján a bacitracin B_1 és B_2 forma képződése az L-Ile-t aktiváló domének kisebb százalékban előforduló L-Val aktiválására vezethető vissza.

A valint aktiváló adenilációs domén szubsztrátkötő zsebének felépítése nagyon hasonlít az izoleucint aktiváló domén szerkezetéhez, kivéve azt, hogy a zseb falát alkotó 278-as pozícióban fenilalanin helvett, egy nagyobb térkitöltésű triptofán helyezkedik el. Feltehetően ez biztosítja, hogy a valint aktiváló domének izoleucin aktiválására csak alig képesek, míg az izoleucint aktiváló domének nagy gyakorisággal aktiválnak valint is (Vater et al. 1975; Galli és Grandi 1994; Elsner et al. 1997; Steller et al. 1999). Nemcsak az izoleucint aktiváló domének képesek kisebb-nagyobb hatékonysággal más, eredeti szubsztrátjukhoz csak részben hasonló aminosav aktiválására. Az tirocidin szintetázból származó Ile-Phe adenilációs modult tartalmazó dipeptid szintetáz Ile és a Phe aktiválásán kívül képes a Leu, Val, Trp és Tyr aminosavak detektálható aktiválására is (Doekel és Marahiel, 2000). Általánosságban megfigyelhető, hogy a külön izolált és expresszált adenilációs domének döntő többsége kisebb vagy nagyobb mértékben, de több mint egyfajta, szerkezetében eltérő aminosav aktiválására képes az ATP-PP* cserélő reakciók alapján. (Az ATP-PP* cserélő reakciókban azt vizsgálják, hogy az adott izolált domén yP*-ATP és egy adott aminosav jelenlétében milyen mértékben képez PP*-ot. Mivel az adenilációs domén PP felszabadulás mellett katalizálja az adenilált aminosav képződését, a PP* felszabadulásának mértéke utal arra, hogy az adott domén a vizsgált aminosavat mennyire fogadja el szubsztrátjának) (Fujikawa et al. 1968; Mootz és Marahiel, 1997; Wageningen et al. 1998; Guenzi et al. 1998; Stachelhaus et al. 1998; Weinreb et al. 1998; Konz et al. 1999).



1.5.8. ábra. A kondenzációs domén működése. **D**: donor hely: a kondenzációs doméntől upstream elhelyezkedő peptidszintetáz által összeállított peptidet ideiglenesen befogadja ; **A**: akceptor hely: a kondenzációs doméntől downstream elhelyezkedő adenilációs modul által aktivált és PCP-hez kötődő aminosavhoz a D részen várakozó peptidláncot hozzákapcsolja.

Színkódok: PCP; kondenzációs domén; adenilációs domén; részben elkészült peptidlánc; beépítés alatt álló aminosav

Az adenilációs domén által tévesen aktivált - a gyakorisággal legnagyobb aktivált szubsztráttól eltérő szerkezetű - aminosavak azonban az esetek döntő többségében nem jelennek meg a végtermékekben. Ennek oka az, hogy az adenilációs domén által aktivált, és a PCP domén foszfopantotén karjához tioészter kötéssel kapcsolódó aminosavak összekapcsolásáért felelős kondenzációs domének szubsztrátspecifikussága nagy, azaz nem képesek bármilyen aminosav beépítésére a növekvő peptidláncba (1.5.8. ábra).

A kondenzációs domén szerkezete még nem ismert, ezért csak elméleti modellek állnak rendelkezésre működési mechanizmusáról. Ez alapján a két aminosav/peptid szubsztrátot összekapcsoló kondenzációs domén két részre,

a készülő peptidlánc C-terminális aminosavát ideiglenesen rögzítő donor, és a beépítendő átmenetileg aminosavat tartó akceptor részre bontható. А kondenzációs domén szubsztrátspecifikussága a donor oldalon elhanyagolható, csak sztereospecifikussága van. Ezzel szemben in vitro mesterséges aminoacil szubsztrátokkal bizonyították, hogy a kondenzációs domén az akceptor oldalon - ahol a tőle downstream elhelyezkedő adenilációs domén által aktivált aminosavhoz kapcsolja a már elkészült peptidláncot - nagy szubsztrátspecifikusságot mutat (Stachelhaus et al. 1998; Belshaw et al. 1999; Ehmann et al. 2000). A peptidlánc szintézise mindaddig nem folytatódhat, amíg a kondenzációs domén akceptor oldalára egy oda megfelelően illeszkedő aminosav nem kerül (Linne és Marahiel, 2000). Ezek alapján egy, az adenilációs domén által hibásan felismert és aktivált (azaz a kondenzációs domén akceptor helyére nem megfelelően illeszkedő) aminosav a peptidszintézist "megakasztja". Az, hogy az adenilációs domén gyakran aktivál és köt a PCP domén foszfopantotén karjához olyan aminosavakat, amelyeket a nagy

szubsztrátspecifikusságot mutató kondenzációs domén nem képes a peptidláncba beépíteni, és a peptidszintézis mindaddig nem folytatódhat, amíg a PCP foszfopantotén karján le nem cserélődik a tévesen aktivált aminosav egy, a kondenzációs domén számára is elfogadható aminosavra, felveti azt a kérdést, hogy mégis miért nem akad el természetes körülmények között a peptidszintézis; azaz mi az a mechanizmus, ami a tévesen aktivált aminosavat eltávolítja a PCP foszfopantotén karjáról.

A bacitracin szintetáz promóterétől upstream elhelyezkedő tioészteráz II fehérjékkel hasonlóságot mutató *bts*T gén inaktiválása a bacitracin szintézis jelentős csökkenését okozta (**1.5.5. ábra**). Mivel a bacitracin szintézisében résztvevő, eddig ismert faktorok (peptidszintetáz alegységek, rezisztencia, PCP aktiváló foszfopantotén transzferáz) a BlBtsT⁻⁻ törzsben érintetlenek voltak, a bacitracin szintézis csökkenése a peptidszintézis lassulásával, azaz korai vagy gyakori megakadásával magyarázható. A *bts*T géndózisának fokozása (BlBtsT⁺) a fő komponensként szintetizálódó bacitracin A-tól egy-egy aminosavban eltérő B₁ és B₂ komponensek mennyiségének jelentős csökkenését okozta (**1.5.5. ábra**). A BlBtsT⁺ törzs esetében vagy az adenilációs domének szubsztrát specifikussága nőtt meg, vagy az a mechanizmus vált aktívabbá, ami a PCP foszfopantotén karjáról eltávolítja a kondenzációs domén által nehezebben elfogadott, szerkezetében némileg különböző, és így lassabban beépíthető szubsztrátokat.

Mivel a *bts*T ORF-et egy kópiában, amplifikálva vagy egyáltalán nem hordozó törzsek esetében a különbség csak a *bts*T géndózisában volt, és ez jelentős változásokat okozott az összes bacitracin termelés, illetve a peptidantibiotikum komplex összetétele szempontjából, feltételezzük, hogy a *bts*T ORF terméke felelős a PCP foszfopantotén karjához tioészter kötéssel kapcsolt aminosavak lehasításáért, azaz a bacitracin szintetázról a peptidszintézis folyamatosságát akadályozó, tévesen aktivált PCP-hez kötött aminosavak eltávolításáért. Ezek alapján a *bts*T hiányának illetve fokozott jelenlétének hatása a következőképpen magyarázható:

- ha a BtsT enzim nincs jelen (BlBtsT) az adott peptidszintetázon a peptidszintézis elakad, amikor az első tévesen aktivált és a kondenzációs domén akceptor oldal számára el nem fogadható aminosav a PCP-foszfopantotén karjához kapcsolódik. Bár a sejtben sok peptidszintetáz képződik, mindig csak az újonnan szintetizálódó peptidszintetázok képesek hosszabb-rövidebb ideig a bacitracin szintézisre. Ezért az adott fermentáció során előállított összes bacitracin mennyisége kevés lesz.
- ha a BtsT enzim nagy mennyiségben van jelen a kondenzációs domén akceptor oldalára csak lassan, vagy egyáltalán át nem kerülő és ezért az adenilációs domén és a kondenzációs domén között sokáig "lebegő", aktivált, a foszfopantotén karhoz tioészter kötéssel kovalensen kapcsolt aminosavak nagyobb valószínűséggel hasadnak le. Ezért a végtermékben csak a leggyakrabban aktivált és a kondenzációs domén akceptor helyére legpontosabban illeszkedő, azaz a leggyorsabban beépített aminosavak lesznek csak jelen.

Ezek alapján az eddig vizsgált legtöbb prokarióta peptidszintetázt kódoló régióban található egy a tioészteráz II homológ enzimet kódoló ORF, mely TEII enzimek általánosan felelősek a nemriboszómális peptidszintézist elakasztó (azaz a tévesen aktivált) aminosavak eltávolításáért.

A I típusú prokarióta poliketid szintetázok (PKS) esetében is megfigyelhető egy TEII homológ fehérjét kódoló ORF jelenléte a poliketid szintetázt kódoló DNS régióban. Poliketid bioszintézis történhet a zsírsavszintézishez hasonlóan iteratív módon (II típusú), amikor a szintáz ugyanazon doménjei több egymást követő ciklusban építik fel a poliketid láncot, vagy a nemriboszómális peptidszintézishez hasonlóan nem iteratív módon (I típus), ahol minden építőegység beépítéséért más-más modul felelős, és a modulok egymás utáni sorrendje határozza meg a poliketid végső szerkezetét. A poliketidek alapvető építőköve a malonil-CoA illetve a lánckezdő acetil/butitril-CoA. Ez az ACP-hez (acil carrier protein) kötődik az acil transzferáz (AT) domén közreműködésével. Ezután egy CO₂ felszabadulása mellett a ketoszintáz domén (KS) hozzákapcsolja az előző modul ACP-jén lévő malonil vagy metil/etil-malonil CoA-ból származó egységet az adott domén ACP-jéhez kapcsolt malonil csoporthoz. Az így kibővült lánc utolsó tagja általános esetben egy ketoreduktáz (KR), egy dehidratáz (DH) és egy enoilreduktáz (ER) domén közreműködése után éri el végleges, redukált formáját (1.5.9. ábra) (Donadio, 1991; Gokhale, 1999; Lau, 1999; Ranganathan, 1999). Bármelyik domén hiánya egyáltalán nem, vagy csak részlegesen redukált



1.5.9. ábra A poliketid bioszintézis folyamata. A: felső rész: az első modulon történő lánckezdő reakció; alsó rész: a 2. modul és az azt követő modulokon végbemenő lánchosszabbító folyamat. B: A β-C atomon történő lehetséges módosítások (átvéve: Carreras és Santi, 1998)

poliketid tagot eredményez. Ezek alapján a I típusú poliketid szintézisnél a malonil transzferáz a nemriboszmómális peptidszintézis adenilációs, az ACP a PCP, a ketoszintáz a nemriboszmómális peptidszintézis kondenzációs, a KR, DH, ER a nemriboszmómális peptidszintézis átalakító doménjeinek funkcionális megfelelője (**Cane és Walsh, 1999**). Az elkészült poliketidlánc leválását a poliketidszintázról egy TEI domén katalizálja, melynek funkciója és fehérje szekvenciája hasonlít a nemriboszómális peptidszintetázok TEI doménjéhez.

A poliketid szintetázok környezetében kódolt TEII fehérje eliminálása a pikromycin esetében az eredeti szint 5%-ára, a tylosin esetében az eredeti szint 10 %-ára redukálta a poliketid termelést (**Xue et al. 1998; Butler et al. 1999; Doi-Katayama et al. 2000**) csakúgy, mint a nemriboszómális peptidszintetázok esetében. A poliketid tylosin szintáz II-es tioészterázát önállóan klónozták, expresszálták, kitisztították és meghatározták szubsztrátspecifictását különböző lánchosszúságú ACP-foszfopantotén kart utánzó NAC-tioészterekre és szerin proteázok jó szubsztrátjaként számontartott p-Nitrofenil-észterekre vonatkozóan. A kísérletben azt vizsgálták, hogy a NAC vagy p-Nitrofenil-hez tioészter kötéssel kapcsolódó, hibás szénláncot utánozó acetil, propionil, butiril és pentanoil csoportok, illetve a 2 és 3 tagú poliketidnek megfelelő szerkezetű szubsztrátok közül az izolált TEII enzim melyiket milyen hatékonysággal hidrolizálja. Eredményként azt kapták, hogy a poliketid szerkezetnek nem megfelelő szubsztrátokat a TEII méretükkel fordítottan arányosan hidrolizálta, és ez alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a tylosin TE II specifikusan képes a hibásan dekarboxilezett ACP-hez kötött intermedierek hidrolízisére (**Heathcote et al. 2001**). A nemriboszómális peptidszintetázok esetében elméleti alapon lehetetlen az, hogy a TEII fehérje képes különbséget tenni az adenilációs domén által pontosan vagy nem pontosan felismert,

megkötött és aktivált aminosavak között, hiszen az aminosavak szerkezetei - eltérően a poliketidek

egységes építőelemeitől – jelentősen különböznek egymástól. Ráadásul a poliketidek esetében is előfordul, hogy nem malonil, hanem etil/metil-malonil vagy más építőegység szükséges egyes vegyületek bizonyos pozícióiba (FK520, FK506) így, ha ezeket az egységeket a PKS TEII hibás építőelemként felismerné és eliminálná, bizonyos vegyületek nagyon rossz hatékonysággal szintetizálódhatnának csak. Ahhoz, hogy a tioészteráz II működési mechanizmusát és ezen keresztül funkcióját megértsük, megpróbáltuk a BtsT fehérje szerkezetét jellemezni ismert 3D szerkezetek alapján.



1.5.10. ábra A BtsT fehérje másodlagos szerkezete, és a nemriboszómális peptidszintetázok TEII fehérjéinek konzerválódott aminosavai E: β -redő, H: α -helix.

A tioészteráz II csoportba tartozó fehérjék közül még egyiknek sem ismert a 3D szerkezete. Napjainkra már több, különböző organizmusokból származó tioészteráz II homológ fehérje szekvenciája elérhető. A szekvenciák megfelelő módon egymáshoz illesztve lehetővé teszik az egyes pozíciókban a különböző aminosavak előfordulási gyakoriságának meghatározását. Az adott pozíció és környezetének lehetséges aminosav variációi alapján megjósolható az adott pozíció, és ezekből a teljes fehérje másodlagos szerkezete. A másodlagos szerkezeti elemek sorrendjének ismert 3D struktúrák másodlagos szerkezetével történő összehasonlítás alapján az adott fehérje foldja megadható, így 3D szerkezete előrejelezhető. A Pfam (Protein families database of alignments and HMMs) adatbázis 93 tioészteráz doménja közül kiválogattuk azokat a TEII homológ fehérjéket (13 db), melyek egyértelműen nemriboszómális peptidszintetázok alegységeit kódoló ORF-ek környezetéből származnak. Azonosítottunk 11 poliketid TEII fehérjét és 3 zsírsav szintézisben szerepet játszó TEII fehérjét is. A többi tioészteráz a nemriboszomális peptidszintetázok, poliketid szintetázok és zsírsavszintázok utolsó doménjei, azaz termékleválasztó TE I enzimek voltak. A kiválogatott szekvenciákat a SAM (Sequence Alignment and Modeling Software System; http:// www.cse.ucsc.edu/research/compbio/sam.html) (Hughey és Krogh, 1996; Karplus et al. 1999; Krogh et al. 1994) egymáshoz igazította, és a konszenzus fehérje szekvencia alapján előre jelezte a BtsT fehérje másodlagos szerkezetét (1.5.10. ábra).

A BtsT fehérje foldja másodlagos szerkezeti elemeinek sorrendje alapján az α/β -hidroláz fold-nak felel meg (**1.5.11. ábra**). A kanonikus α/β -hidroláz fold szerint a fehérje vázát egy β -redők alkotta csavarodó sík alkotja, mely alatt és fölött α -hélixek helyezkednek el. A β 2 redő antiparallel lefutású



1.5.11. ábra Az α/β hidroláz fold. <u>A</u>: sematikus rajz: fekete: minimális fold; fekete+kék: kanonikus fold; fehér: a lehetséges kiterjesztések. Nyilak: β -lemez; téglalapok: α -hélix; Nu: nukleofil (S/C); Ac: sav (E/D); H: hisztidin. <u>B</u>: térbeli szerkezet: (180°-al elfordítva a sematikus rajzhoz képest) kék nyilak: β -redő; piros hengerek: α hélix; zöld: katalitikus triád aminosavai

a többi β -redőhöz képest. A β -redők által kialakított csavart lemez szerkezet első és utolsó β szerkezeti eleme által bezárt szög kb. 90°. A β 5-ön található nukleofil aminosav és környezete alkotják a jól konzerválódott nukleofil könyököt. A hidroláz reakcióban fontos oxianion lyuk kialakításában résztvevő aminosavak általában a β 5 és β 3 redőkön találhatóak. Az α/β hidroláz fold-dal rendelkező fehérjék szerkezetük kanonikus szerkezettől való eltérése alapján családokba sorolhatók (CUT: cutinázok; BLP: bakteriális lipázok; DLH: diénlacton hidrolázok; HAL: haloperoxidázok; PLP: pankreáz eredetű lipázok; FLP1: gomba eredetű lipázok; SCP: szerin karboxipeptidázok; LES: nagy észterázok) (**Heikinhemino et al. 1999**).

A BtsT fehérje másodlagos szerkezeti elemeinek sorrendje legjobban a HAL (haloperoxidáz) család másodlagos szerkezetéhez hasonlít eltekintve attól, hogy a β 1 és β 2 β -redők hiányoznak, és az aktív centrum fölé boruló, az elsődleges szekvenciában β 6 redő és α D hélix között található flexibilis régió szerkezete más (**1.5.12. ábra**). A két fehérje között az elsődleges szekvencia hasonlóság a nukleofil könyököt kivéve elhanyagolható.



1.5.12. ábra. A HAL család egyik tagjának (1a88.pdb) és a BtsT fehérje feltételezett szerkezete

A BtsT fehérje feltételezett másodlagos szekvenciája és konzerválódott aminosavainak helyzete alapján a katalitikus triád aminosavai meghatározhatók. Az erősen konzerválódott nukleofil könyökben elhelyezkedő Ser75 a nukleofil (Nu), a $\beta 8$ és αF részek közötti hurkon található His208 a protont ideiglenesen tároló aminosav (H) és a $\beta 7$ és αE közötti hurkon elhelyezkedő Asp181 a hidrolízis során pozitívan töltött His208-at stabilizáló sav (Ac) komponens. A patkány TEII fehérjéje és a BtsT fehérje illesztése (alignment) alapján a patkány tioészteráz II fehérjéjében a katalitikus triád savkomponenseként vizsgált Asp236 (**Tai et al. 1993**) nem része a triádnak, így megmagyarázható, hogy alaninra cserélése miért nem okozta a TE aktivitás megszűnését. Helyette a BtsT szerkezete alapján a patkány TEII fehérjéje esetében a katalitikus triád az Ser101, Asp185 és His237 aminosavakból épül fel.

A B. licheniformis F törzsben a PQFBR plazmid származékainak felhasználásával előállított βgalaktozidáz riporter génes konstrukciók lehetővé tették a bacitracin szintetáz gén (INTbacA) és a tioészteráz gén (INTbtsT) expressziójának egymástól független meghatározását és a sejtszaporodáshoz (OD₆₀₀) illetve a bacitracin termeléshez történő viszonyítását. Az eredmények alapján (1.4.13 ábra) a bacitracin bioszintézisért felelős templát fehérje (bacitracin szintetáz) expressziója már az exponenciális fázisban, korán elkezdődik, és 1 órán belül eléri maximumát. A tioészteráz gén expressziója hasonló mintázatot követ, de a maximális expresszió mértéke csak 25-30 %-a a bacA gén expressziójának. A bacitracin termelés az exponenciális fázis vége felé kezdődik el, és legintenzívebb akkor, amikor mindkét vizsgált gén expressziója elérte maximumát. Bár a bacitracint a másodlagos metabolitok között tartják számon már régóta ismert, hogy termelése az exponenciális fázisban megkezdődik (Hanlon és Hodges, 1981). Leírtak olyan bacitracin termelő Bacillus licheniformis törzset (ATCC14580) is, amely csak az exponenciális fázisban termeli a bacitracint (Haavik, 1975), és a stacioner fázisban már nem. (Bár később erről a törzsről kiderült, hogy nem bacitracint, hanem csak lichenisint termel.)

Bár az expresszió mértéke nem mindig áll közvetlen kapcsolatban a termelődő enzim mennyiségével és annak aktivitásával, a 25%-nyi tioészteráz expresszió felveti azt a lehetőséget, hogy a tioészteráz fehérje és a bacitracin szintetáz fehérje sejten belüli aránya fontos faktor, és a túl magas tioészteráz koncentráció nem hasznos, esetleg kedvezőtlen a sejt számára. Ha a tioészteráz mennyiségét mesterséges módon növeltük meg - a plazmidon kódolt *bts*T bevitelével -, akkor a bacitracin szintézis abszolút mértéke csökkent. Ez azt jelenti, hogy a termelődő BtsT fehérje aktivitása a fehérje koncentrációjának további növelésével fokozható, azaz a *bts*T gén expressziója nem azért kisebb mint a bacitracin szintetáz expressziója, mert kisebb BtsT aktivitás is elég az adott funkció ellátásához, hanem azért, mert a sejtben ennél nagyobb BtsT koncentrációra nincs szükség. Ez a BtsT-szintetáz arány biztosítja a sejt számára, hogy a biológiailag leghatékonyabb bacitracin komponensből sokat állítson elő, de megadja a lehetőséget a többi bacitracin komponens
képződésének is, hátha a főkomponensre rezisztenssé váló versenytársak versenyelőnye csökken valamelyik egyéb komponens hatására.

Az ipari fermentációkban a mikroorganizmusok által előállított NRPS peptid illetve PKS eredetű poliketidek mellett gyakran szintetizálódnak a célmolekulától szerkezetileg alig különböző termékek is, melyek a fő terméktől a nagy hasonlóság miatt a termék kinyerése (DSP) során nehezen elválaszthatók. Ezeket a hasonló szerkezetű termékeket a fermentációs iparban "szennyező"-knek nevezik, és a fermentációs technológia vagy a feldolgozási technológia megváltoztatásával igyekeznek szintjüket az előírt értékek alá szorítani. A szennyező csökkentés gyakran csak a fő termék kihozatalának csökkenése mellett érhető el. A gyógyszeripari alapanyagoknál (API) általában jellemző, hogy a termék maximum 1 %-a lehet nem főtermék, és egy-egy különböző típusú szennyező (specifikációtól függően) maximum 0,1-0,5 %-ban fordulhat elő. A bacitracin bioszintézis vizsgálata során előállított TEII enzimet kódoló DNS fragmentet nagy kópiaszámban hordozó klón bacitracin szennyező termelése jelentősen csökkent, így a TEII enzim egy potenciális "szennyező csökkentő" eszköz lehet ipari alkalmazásokban.

1.5.1. Új eredmények összefoglalása

- azonosítottunk egy a bacitracin bioszintézisben szerepet játszó fehérjét kódoló ORF-et amit a származtatott fehérje hasonlósága alapján *bts*T-nek neveztünk el;
- bebizonyítottuk, hogy a *bts*T gén inaktiválása csökkenti a mutáns sejtek bacitracin termelő képességét;
- bebizonyítottuk, hogy a *bts*T gén nagy kópiaszámú plazmidon történő bevitele a termelő mikroorganizmusba kismértékben csökkenti a bacitracin A főkomponens nagymértékben pedig a bacitracin B1 és a bacitracin B2 alkomoponens termelését, így mint potenciális szennyező csökkentő faktor használható ipari fermentációkban, nemriboszómális úton készülő peptid illetve poliketid szintetázok által előállított termékek esetében;
- az újonnan azonosított és más nemriboszómális peptidszintézisben résztvevő tioészteráz II molekulák vizsgálatával meghatároztuk, hogy a BtsT fehérje foldja α-β fold és ezen belül a haloperoxidázok foldjához hasonlít a legjobban;
- a haloperoxidáz 3D szerkezete alapján azonosítottuk a katalitikus triád tagjait;
- létrehoztunk egy a bacitracin szintetáz és a tioészteráz gén expressziójának mérésére alkalmas riporter génes biológiai rendszert, amit felhasználtunk a két gén expressziójának és a bacitracin termelés időbeni lefutásának vizsgálatára;
- a mérési eredmények alapján a bacitracin szintetázt kódoló DNS fragmentről történő átírás jelentősen nagyobb mint a vele egy időben kezdődő tioészteráz génről történő átírás. A vizsgált gének expressziójának maximumánál van a bacitracin szintézis legintenzívebb szakasza.

1.6. Összefoglalás

A modern gyógyszerkutatásban az elegendő mennyiségben rendelkezésre álló, tesztelhető kémiai szerkezetek száma vált a szűk keresztmetszetté. Sok olyan komplex kémiai szerkezet létezik, melynek megfelelő mennyiségben történő előállítása szintetikus úton nehézkes vagy lehetetlen biológia úton, fermentálva azonban nagy mennyiségben is előállítható. Ide tartoznak különböző peptidek és poliketidek is. A bacitracin egy *Bacillus licheniformis* által termelt, legalább 15 komponensből álló peptid antibiotikum komplex, melynek szintézise nem riboszómákon hanem egy 3 alegységből felépülő peptid szintetázon történik, a nem riboszómális peptidszintézis folyamatában.

Munkánk során a bacitracin szintetázt kódoló DNS fragment környezetében kódolt, a nemriboszomális peptidszintézisben esszenciális enzim lokalizálását és szerepének meghatározását tűztük ki célul.

Egy transzpozonnal inaktivált, bacitracint nem termelő mutánsból a bacitracin szintetáz promótertől upstream elhelyezkedő fragment bázissorrendjét meghatároztuk, és ott egy tioészteráz II fehérjékhez hasonló fehérjét kódoló csonka ORF-et találtunk. Campbell típusú integrációval bebizonyítottuk, hogy az ORF szerepet játszik a bacitracin szintézisben, mivel inaktiválása a bacitracin szintézist az eredeti szint 5-10 %-ára csökkentette. Az ORF-et *bts*T-nek neveztük el. Az ORF eleje nem volt a vizsgált fragmenten, ezért azt "genome walking" technikával izoláltuk, szekvenáltuk és bebizonyítottuk, hogy az újonnan izolált fragment rendelkezik promóter aktivitással.

Megvizsgáltuk a tioészteráz túltermelésének hatását a bacitracin szintézisre, és azt tapasztaltuk, hogy a bacitracin komplex termelése úgy csökkent le, hogy a bacitracin A főkomponens mennyisége alig, még a bacitracin B1 és a bacitracin B2 alkomponensek mennyisége jelentősen csökkent.

Nemriboszómális tioészteráz II fehérjék részletes "*in silico*" vizsgálatai alapján megállapítottuk, hogy a tioészteráz II fehérje foldja α - β -hidroláz fold és ezen belül a haloperoxidáz csoporthoz hasonlít a legjobban. Egy haloperoxidáz rendelkezésre álló szerkezetét modellként használva meghatároztuk a katalitikus triád tagjait, amelyben a sav komponens helye különbözött a korábban publikálttól.

A bacitracin szintetáz és a tioészteráz transzkripciójának vizsgálatára olyan bacitracint termelő törzseket állítottunk elő, melyek a β -galaktozidáz riporter gént a *bts*T és a bacitracin szintetázt kódoló génekben integrálva hordozzák, és így a tenyészetek különböző időpontokban gyűjtött mintáiból a β -galaktozidáz aktivitás mérés alapján a bacitracin szintetáz és a tioészteráz gének transzkripcióját összehasonlítottuk.

A BtsT fehérje inaktiválása jelentősen csökkentette a bacitracin termelést, túltermeltetése pedig csökkentette a nem ideális aminosavat tartalmazó bacitracinB1 és bacitracinB2 mennyiségét. Ezek alapján az bacitracin szintézisben esszenciális BtsT fehérje a bacitracin szintézis hiba javító komponense.

Mivel a tioészteráz fehérje túltermelése csökkentette a bacitracin szennyezők mennyiségét (bacitracin B1, bacitracin B2), a tioészteráz fehérje fontos eszköz lehet a nemriboszómális peptidszintézis illetve a poliketid szintetázok által összerakott gyógyszer hatóanyag molekulák fermentációja közben keletkező "szennyezők" szabályozásában.

1.6.1. Summary

In the modern drug research the number of readily available chemical structures became the tight cross section of the new drug screening process. Many complex chemical structures do exists where the chemical synthesis is uneasy or impossible but can be produced biologically, by fermentation in huge quantity. Polyketides and polypetides belong to this class of compounds. The 15 member bacitracin peptide antibiotic complex is produced by the three domain peptide synthetase of *Bacillus licheniformis* via non-ribosomal peptide synthesis.

The main aim of this work was to localize and characterize an essential enzyme in the nonribosomal peptide synthesis situated around the coding region of the bacitracin synthetase.

From a bacitracin non-producer transposon mutant the upstream region of the bacitracin synthetase was cloned and sequenced and a non-complete ORF was identified. The newly identified ORF showed similarity with thioesterase II proteins. The essentiality of the protein was proved by Campbell type integration. The inactivation of the ORF resulted 5-10 % bacitracin production compared to the wild type bacitracin level. The ORF was named *bts*T. Since the beginning of the ORF was not present on the cloned fragment genome walking was used to isolate the missing part of the gene. The newly isolated fragment was sequenced and was shown to have promoter activity.

The overproduction of the thioesterase was tested on bacitracin synthesis. It was found that the production of the bacitracin complex was decreased in such a way that the level of the main component (bacitracin A) was only slightly but the bacitracinB1 and bacitracinB2 minor components significantly decreased.

Proteins belonging to the thioesterase II group were analyzed "*in silico*" and were shown to have α - β -hydrolase fold showing highest similarity to the haloperoxidase group. Using the haloperoxydase 3D structure as a model the components of the catalytic triad were determined. The acid component of the triad turned out to be different from the published one.

To determine the transcription of the *bts*T and the bacitracin synthetase coding region such kind of bacitracin producer strains were constructed where the β -galactosidase reporter gene was integrated into the *bts*T or into the bacitracin synthetase coding region respectively. Using these reporter gene carrying strains the transcription from the two genes were compared.

Since the inactivation of the BtsT significantly decreased the overall bacitracin production and the overproduction of BtsT significantly reduced mostly the "non ideal" amino acid containing bacitracin B1 and bacitracin B2 quantity, the function of the BtsT was defined as the error prone component of the non-ribosomal peptide synthesis.

During the work it become obvious that the overproduction of the thioesterase component significantly reduces the bacitracin impurities, so it is a utilizable tool for the impurity control of compounds produced by the non-ribosomal-peptide or polyketide biosynthesis in large scale industrial fermentations.

2. A növényi sejtfal-bontásában résztvevő enzimek vizsgálata

2.1. Bevezetés

A dolgozatnak ez a része a 6 majd 9 hónapos angliai The University of Newcastle upon Tyne egyetem Biological and Nutritional Sciences tanszéken, prof. Harry Gilbert vezette laboratóriumban végzett munka eredményeinek rövid kivonata. Azok a témák, amelyekbe bekapcsolódhattam, főleg a növényi sejtfalbontás enzimjeinek szerkezet-funkció összefüggéseit vizsgálták elsősorban biokémiai módszerekkel.

Az ismert funkciójú fehérjék működésének pontos megértése, azaz a szerkezet-funkció kapcsolat megértésének szempontjából fontos aminosavak lokalizálására több lehetőség kínálkozik:

- helyspecifikus mutagenezissel és a mutánsok biokémiai jellemzésével lehetséges a funkció ellátásához szükséges aminosavak azonosítása. Erre mutat egy példát a *P. fluorescens* Xyn10A enzim 10-es családba tartozó cellulózkötő moduljának vizsgálata című fejezet. A helyspecifikus mutagenezis azonban csak akkor használható hatékonyan ha rendelkezésre áll olyan – általában aminosav sorrend hasonlóságon alapuló információ - aminek alapján a funkció szempontjából jelentős aminosavak lokalizálhatók.

előfordul olyan eset is, ahol a fehérje domén funkciója ismert, de nincs jellemzett homológja, így a fontos aminosavak azonosításának legkézenfekvőbb - és szerencsés esetben leggyorsabb és legtöbb információt kínáló - módja a fehérje 3D szerkezetének meghatározása szubsztrát jelenlétében.
 Erre mutat példát a CBM29 család jellemzéséről szóló fejezet.

Az ismert szerkezetű GH10 családba tartozó XylF fehérje térszerkezetének meghatározása és a családon belüli apró eltérések jelentőségét emeli ki a GH10 családba tartozó XylF-et jellemző fejezet. A xylohexóz jelenlétében kristályosított XylF enzim xylán kötő modul térszerkezetének megfejtésével igazolódtak a xylán molekula szerkezetével kapcsolatos korábbi, csak számításokon alapuló feltételezések. Az X4 modul kristályosításáról szóló esettanulmány pedig egy nehezen kristályosítható fehérje rendezett szerkezetbe kényszerítésének lépéseiből ad ízelítőt.

2.2. Irodalom áttekintése

2.2.1. A növényi sejtfal szerepe

A növényi sejtfal azon túl, hogy a Földön képződő biomassza jelentős része és az étkezési rost egyetlen forrása, alapvetően egy megújuló energiaforrás. Évente a növények csak a növényi sejtfal anyagainak átlagosan 20-30 %-át kitevő cellulózból 4x10¹⁰ tonnát szintetizálnak (**Coughlan, 1985**). Az átlagos növényi sejtfal tartalmaz még 50-60 %-ban nem cellulóz poliszacharidokat: pektineket és a hemicellulózokat (7:5 arányban), és maximum 20 %-ban glükoproteineket (**Albersheim et al. 1994; Knox et al. 1990**). A bakteriális és gomba eredetű növényi sejtfalbontás eredményeként azonban ez az óriási mennyiségű, rendkívül sok komponensből felépülő, számos funkciót betöltő, komplex és stabil anyag nem akkumulálódik, hanem más élőlények számára is felhasználható alkotóelemeire bomlik, és így visszakerül a biológiai körforgásba, biztosítva ezzel a heterotróf élet energiaigényét.

A szén biológiai körforgásában betöltött fontos szerepén túl a növényi sejtfal-bontásában résztvevő enzimeket az élelmiszer- ruha és a papíripar is használja. A gyümölcslevek előállításában a hatékonyabb lékinyerésért és a zavarosság megszüntetéséért pektinázokat, arabinázokat alkalmaznak (Baumann, 1981; Braddock és Kesterson, 1979; Voragen et al. 1982). A sütőiparban xylanázok segítségével javíthatják a liszt minőségét (Maat et al. 1992). Cellulázok segítségével lehetséges a farmeranyagok "enzimatikus kőkoptatása" és a pamut anyagok simaságának és puhaságának fokozása. A mosószerekhez adott cellulázok segítik a talajrészecskékkel szennyeződött pamut ruhák tisztulását, puhítását (Coughlan, 1985). A faanyagok időtállóságának növelése érdekében végzett tartósítószeres kezelés előtti pektinázos kezelés lehetővé teszi a tartósítószerek jobb behatolását az anyagba (Fogarty és Kelly, 1983). A fűfélék cellulázokkal és xylanázokkal történő előkezelése jobb minőségű szilázs készítését teszi lehetővé (Gilbert és Hazlewood, 1991). Xylanázok hozzáadásával elérhető, hogy a nátronpapír pép kevesebb klór felhasználásával legyen fehéríthető, és így a mérgező klór-fenolok képződésének valószínűsége is csökken (Biely, 1991; Nissen et al. 1992; Wong et al. 1988; Ragauskas et al. 1994). Az óriási mennyiségben termelődő növényi cellulóz és más glükóz vagy glükózzá átalakítható cukrokat tartalmazó növényi sejtfal komponensek lebontása során keletkező glükóz alkohollá erjeszthető, és nem környezet-szennyező, növényi eredetű hulladékokból nyerhető, olcsó üzemanyagként felhasználható. A nagy cukortartalmú és ezért jó tápértékű köztes termékek állati takarmánynak alkalmasak (Gilbert és Hazlewood, 1993).

Mivel szinte mindegyik felhasználási terület más-más tulajdonságokkal rendelkező enzimeket igényel, elengedhetetlen a természetben jelenlévő, növényi sejtfal-bontásban résztvevő enzimek számbavétele, működési mechanizmusuk megismerése és a katalizált reakciók hatékonyságát befolyásoló tényezők vizsgálata, majd a felmerülő igények alapján a fehérjék megváltoztatása.

A következőkben áttekintjük a növényi sejtfal felépítésében résztvevő egyszerű és bonyolult vegyületeket, melyek lebontásához az evolúció az évmilliók során sokféle enzimrendszert dolgozott



2.2.2.1. ábra. A növényi sejtfal felépítése

ki. A növényi sejtfalbontó enzimek működésének megértéséhez elengedhetetlen szubsztrátiaik szerkezetének ismerete. Áttekintjük a növényi sejtfalbontó enzimek általános szerkezetét, és a vízoldhatatlan szubsztrátok bontásában komplex. jelentős szereppel rendelkező szénhidrát kötő domének fajtáit és osztályozási rendszerét. Rövid ízelítőt adunk a fehérjék szerkezet-funkció összefüggéseinek vizsgálatában egyre nagyobb röntgendiffrakciós szerepet kapó térszerkezet meghatározás elengedhetetlen előfeltételének, а fehérje kristály előállításának elméletéről és gyakorlati megvalósításáról.

2.2.2. A növényi sejtfal felépítése

A növényi sejtfal (**2.2.2.1. ábra**) komplex struktúra, amelyet a cellulóz mikrofibrillumokból felépülő váz és a mikrofibrillumok közötti teret kitöltő amorf mátrix alkot. A mátrix több komponens bonyolult szövedéke, melyek növényi sejtfalból való kinyerhetőségük alapján csoportosíthatók. Híg, forró savas kezelés hatására a galakturon savban, ramnózban, arabinózban és galaktózban gazdag poliszacharidok a *pektin*ek extrahálódnak. Az ezt követő lúgos kezelés hatására kapott frakció a *hemicellulóz*. A maradék a vázat alkotó *cellulóz* komponens (**Dey és Brinson**, **1984**). Bizonyos sejtek esetében a sejtek növekedésének befejezése után az elsődleges és a másodlagos sejtfalba a fenilalaninból vagy tirozinból szintetizálódó di- és trihidroxi fenolokból álló komplex polimer, a *lignin* épül, amely a sejtfal szilárdságát biztosítja (**Varner és Lin, 1989**).

2.2.2.1. A cellulóz szerkezete és lebontása

A cellulóz β -1,4 kötéssel kapcsolt glükóz alegységekből felépülő, kémiailag egyszerű homopolimer. Minden cukor egység az előzőhöz képest 180 °-kal elforgatva helyezkedik el, így az ismétlődő egység egy diszacharid, a cellobióz (**2.2.2.1.1. ábra**). A cellulóz láncot felépítő összes cukorgyűrű egy síkban helyezkedik el.



2.2.2.1.1 ábra. A cellulóz szerkezete és lebontásában résztvevő enzimek. NR: nem redukáló vég; A: amorf régió; C: kristályos régió; EG: endo-β-1,4-glükanázok; CBH: exocellobiohidroláz; β-G: β-glükozidázok

A mikrofibrillumban a cellulóz láncok egymással párhuzamosan találhatók, számos inter és intramolekuláris H és apoláros kötéssel kapcsolódnak egymáshoz (**Coughlan, 1985**). A röntgendiffrakciós vizsgálatok alapján a mikrofibrillumok nem homogének, kristályos (C) és amorf régiók (A) egyaránt előfordulhatnak benne. Az amorf régiók elhelyezkedhetnek a mikrofibrillumok felszínén vagy teljesen átérhetik azt (**Terri, 1997**). A cellulóz bontásához legalább három különböző funkciójú enzim szükséges (**2.2.2.1.1 ábra**). Az exo-cellobiohidrolázok (EC 3.2.1.91 CBH) a nem redukáló vég (NR) felől cellobióz alegységeket hasítanak le. A szabad cellulóz láncvégeket az endo-β-1,4-glükanázok (EC 3.2.1.3 EG) hozzák létre, hasítva a cellulóz láncot a mikrofibrillum amorf régióban. Az endoglükanáz nem képes a kristályos régiók megtámadására, de a cellobiohidroláz az amorf régióban képzett szabad, nem redukáló vég degradálása után képes a kristályos részeken is folytatni a cellobióz előállítást. Végül a cellobiózt és az endoglükanázok által

előállított cello-oligoszacharidot a β -glükozidázok (EC 3.2.1.21 β G) bontják minden életforma számára hasznosítható glükózzá (**Warren, 1996**; **Henrissat, 1994**). Ez az endo-exo cellulóz bontási modell több gomba esetében nem ennyire leegyszerűsíthető, mivel az endoglükanáz és a cellobihidroláz szubsztrát specifikussága átfedhet, illetve a cellobiohidroláz a redukáló vég felől is



2.2.2.1.2 ábra. A celluloszóma felépítése. Színes kép: a gomba sejt tapadása a növényi sejtfalhoz a celluloszóma segítségével. Fekete-fehér kép: a celluloszóma szerkezete: CBD: cellulózkötő domén; CD: katalitikus domén

képes lehet a cellulóz lánc hidrolízisére (Vranska és Beily, 1992).

Több anaerob gomba aggregálódott cellulóz bontó rendszerrel. а celluloszómával rendelkezik (2.2.2.1.2. ábra), ami a sejtet a cellulózlánchoz kapcsolja, és nagyon effektíven bontja azt. A celluloszómában egy nagy méretű scaffolding fehérje kohezin doménjeihez különböző funkciójú egységek kapcsolódnak dokerin doméneken keresztül. A kapcsolódó

egységek többsége a cellulóz bontásban résztvevő katalitikus domén, de előfordulhatnak xylanáz illetve szénhidrát kötő domének (CBM) is. Legjobban az obligált anaerob *Clostridium thermocellum* celluloszómája jellemzett (**Bayer et al. 1988**), de kimutatták, hogy a *Ruminococcus albus* (**Wood et al. 1992**), a *Piromyces* fajok (**Ali et al. 1995**) és *Neocallimastix frontalis* (**Wilson és Wood, 1992**) is képes hatékony cellulózbontást lehetővé tevő, nagy molekulatömegű celluloszóma szintézisre. Az aggregált celluloszóma rendszer hatékonyságának pontos oka még nem ismert, de feltételezhető, hogy az adott helyen megkezdett cellulóz mikrofibrillum bontása hatékonyabb, mint a nem aggregálódó rendszerek enzimjeinek véletlenszerű próbálkozásai (**Béguin és Alzari. 1998**).

2.2.2.2. A mátrix

A vasbetonhoz hasonló szerkezetű növényi sejtfalban а vasakat jelentő cellulóz mikrofibrillumok közötti teret az amorf mátrix (2.2.2.2.1. ábra) tölti ki, ami a hemicellulózok, glükoproteinek és egyes pektinek. esetekben ligninek bonyolult kusza szövedéke és (Albersheim et al. 1994).

2.2.2.1. A hemicellulóz

A hemicellulóz a növényi sejtfal legnagyobb mennyiségben előforduló, nem cellulóz alapú

komponense, ami általában hidrogén hidak segítségével szorosan kapcsolódik a cellulóz mikrofibrillumokhoz, és így meghatározott pozícióban tartja azokat mindaddig, amíg a lignin berakódás meg nem kezdődik. A hemicellulóz kémiailag sokkal összetettebb, mint a cellulóz és gyakran tartalmaz oldalláncokat illetve elágazásokat, ezért szerkezete is kevésbé szabályos. A hemicellulózok a fő láncot felépítő cukor alapján xylán, mannán, glükomannán, xyloglükán, kallóz, β -1,3 β -1,4 glükán és arabinogalaktán csoportokba sorolhatók (**Brett és Waldren, 1996**).



^{2.2.2.1.} ábra. A mátrix szerkezetet

2.2.2.2.1.1. Xylánok

A β-1,4 kötéssel összekapcsolódó xylóz alegységekből felépülő polimer a növények száraz tömegének kb. 30%-át alkotja (**Joseleau et al. 1992**). A xylóz alegységekhez gyakran acetil, glükoronsav vagy arabinóz oldalláncok kapcsolódnak (**Gilbert és Hazlewood, 1993**). A keményfák xylánja 200 alegységből épül fel és a xylóz kb. 10 %-án a C2-es pozícióban metil-glükuronsav, a



2.2.2.1.1.1. ábra. A xylán szerkezete és lebontásában résztvevő enzimek

maradék C2 és a C3-as pozíciókban pedig nagyon gyakran acetil csoport található (Darvill et al. 1980). füvek xylánja ezzel А szemben általában csak 70 xylán egységet tartalmaz és a C2 illetve C3 pozícióban 2-5 %-ban arabinóz alegység található (Coughlan és Hazlewood, 1993).

Mivel a xylánok a xylóz láncon kívül heterológ oldalláncokat is tartalmaznak, ezért az alaplánc lebontásán kívül az oldalláncok eltávolítása is specializált

enzimeket igényel (**2.2.2.1.1.1. ábra**). A glükuronsav oldalláncot az α-glükuronidázok (EC 3.2.1.139), az acetil oldalláncot az acetil xylán észterázok (EC 3.1.1.6), az arabinóz oldalláncot az α-aribinoxylán-arabinofuranozidázok (EC 3.2.1.55) hasítják le. A lecsupaszított β-1,4 xylán láncot az endoxylanázok (EC 3.2.1.8) darabolják oligo-xylánokká, amit az exo-β-xylozidázok (EC 3.2.1.37) hasítanak xylózokra (**Dekker és Richards, 1976; Biely et al. 1985; Poutanen, 1988; Kormelink et al. 1993**).

2.2.2.1.2. Mannán és galaktomannán

 β -1,4 kötéssel összekapcsolódó mannóz alegységek építik fel a mannánt. A galaktomannánban a mannán vázhoz α -1,6 kötéssel galaktóz egységek is kapcsolódnak. A mannóz galaktóz aránya a növény fajától függően 1:1 és 1:5 között változik (**Brett és Waldren, 1996**). Mannán leggyakrabban a növényi magok endospermiumában található, ahol tartalék tápanyagforrásként szolgál. Az oldalláncot nem tartalmazó mannán szerkezete akár kristályos is lehet, így egyes zöldalgák sejtfalában a cellulóz szerepét a kristályos mannán tölti be (**Yui et al., 1997**). A galaktóz oldalláncokat is tartalmazó galaktomannán szerkezete sokkal nyitottabb, és így nagy mennyiségű víz megtartására képes, ami a magok csírázásakor lehet fontos (**Brett és Waldren, 1990**).

Az oldalláncot nem tartalmazó mannán lebontását mannobiózzá és manno oligoszacharidokká az endo-1,4-mannanázok (EC 3.2.1.78) végzik, amiket az exo- β -1,4-mannozidázok (EC 3.2.1.25) hasítanak mannánná. A galaktomannánokból a galaktóz oldalláncot az α -galaktozidázok távolítják el (EC 3.2.1.22).

2.2.2.1.3. Glükomannán

 β -1,4 kötéssel összekapcsolt glükóz és mannóz egységek építik fel a glükomannánt. A glükóz mannóz arány a nyitvatermőkben (gymnospermium) 1:3 a zárvatermőkben 1:2 (**Puls és Schuseil, 1993**). A nyitvatermők esetében a glükóz vagy mannóz egységhez α -1,6 kötéssel galaktóz kapcsolódhat. Ez a glükogalaktomannán vízben jobban oldódik mint a glükomannán. A mannán váz a C2 vagy C3 helyen acetil csoportot is tartalmazhat (**Hazlewood és Gilbert, 1998a és 1998b**).

A glükomannán lebontásában a mannán bontásában résztvevő enzimeken kívül a galaktóz oldalláncok eltávolítást a α -galaktozidázok (EC 3.2.1.22), a glükóz hasítását a β -glükozidázok (EC

3.2.1.21) az acetil csoport eltávolítását az acetilmannán észterázok (EC 3.1.1.72) végzik (**McCleary, 1988**).

2.2.2.2.1.4. Xyloglükán

A xyloglükán a kétszikűek és a nem fűféle egyszikűek elsődleges sejtfalának legfőbb hemicellulóz komponense (**Pauly et al. 1999**). A β -1,4 kötéssel összekapcsolódó glükóz vázhoz gyakran xylóz kapcsolódik α -1,6 kötéssel. Ezek a xylóz oldalláncok gyakran további α -1,2 kapcsolt fukóz, galaktóz, arabinóz oldalláncokat tartalmaznak (**Brett és Waldren, 1996**). A xyloglükán nem kovalensen, hanem hidrofób kölcsönhatás és H hidak segítségével erősen kapcsolódik a cellulózhoz, így a cellulózláncok közötti keresztkötések kialakításában, azaz a sejtfal szerkezetének fenntartásában van kiemelt szerepe (**McCann et al. 1990**).

2.2.2.1.5. Más hemicellulózok

A növények felületi sebein képződő kallóz β -1,3 kötéssel kapcsolódó glükóz alegységekből épül fel. Szerkezete helikális, így mikrofibrillumok képzésére hajlamos, illetve víz jelenlétében gélesedhet.

A kevert β -1,3 / β -1,4 kötésekkel kapcsolódó glükán a fűfélék sejtfalában gyakori. Az 1,3 és 1,4 kötések aránya 1:2 vagy 1:3, és az 1,3 kötések 2, 3 vagy 4 darab 1,4 kötéssel kapcsolt glükóz molekulát választanak el egymástól.

Az arabinogalaktán II egyes nyitvatermők (gymnosperm) sejtfalában található, β -1,3 és β -1,6 kötéssel kapcsolódó galaktóz alegységekből épül fel. Tartalmazhat β -1,3 kötéssel kapcsolódó arabinóz oldalláncot is (**Bacic et al. 1988**).

2.2.2.2.2. Pektinek

A galakturonsavban, ramnózban, arabinózban és galaktózban gazdag pektinek komplex savas poliszacharidok (**2.2.2.2.1. ábra**). Idetartozik a ramnogalacturonan, az arabán a galaktán és az arabinogalaktán. A kétszikűek középső lamellájában a pektinek rövid oldalláncúak és kevés ramnózt tartalmaznak, míg az elsődleges sejtfalban lévő pektinek sok hosszú oldalláncot tartalmaznak és sűrűn elágaznak (**Brett és Waldren, 1996; Hwang et al. 1993**). A pektinek saját szövedéket alkotnak, amely kovalensen vagy másodlagos kötésekkel a cellulóz mikrofibrillumokkal és a hemicellulózokkal kapcsolódik. A pektin szerkezetét tekintve csak rövid oldalláncokat vagy oldalláncokat egyáltalán nem tartalmazó "sima" (S) és hosszú oldalláncokban gazdag "szőrös" (H) régiók építik fel. A növényi sejtfal középső lamellájában főleg "sima", az elsődleges sejtfalában "szőrös" szerkezetű pektinek fordulnak elő gyakrabban.

2.2.2.3. Glikoproteinek

A növényi sejtfal a poliszacharidokon kívül fehérjét is tartalmaz, melyek többsége glikozilált. Ezekre a fehérjékre általában jellemző, hogy nagy mennyiségben tartalmaznak más élőlényekben elő nem forduló hidroxiprolint, ezért hidroxiprolin gazdag glükoproteineknek (HRGPs) nevezik őket. A leggyakrabban előforduló extenzin kb. 40 %-ban tartalmaz hidroxiprolint, amihez gyakran tri- és tetra-arabinooligoszacharidok, a szerinekhez pedig galaktóz molekulák kapcsolódnak. A molekulában előforduló tirozinok inter- és intramolekuláris keresztkötések kialakításával stabilizálják a fehérje hélix szerkezetét.



2.2.2.2.1. ábra. A pektinek általános szerkezete. H: szőrös régió; S: sima régió. A nyilak a szagatott vonallal bekeretezett régiók kinagyított részleteire mutatnak

Az egyszikűekben treoninban, alaninban hisztidinben és gazdag HRGP található. Ezek csoportjában, egy az arabinogalaktán fehérjékben (AGPs) a hidroxiprolinhoz arabinogalaktán oldalláncok kapcsolódnak. nitrogén А szerepet kötésben játszó növényi részek sejtfalában található nodulinok а hidroxiprolinon kívül nagy mennyiségben tartalmaznak prolint (PRPs).

A glicin gazdag fehérjékben (GRPs) az összes aminosav akár 1/3-át kitevő glicin nagy flexibilitást biztosít a fehérje számára. Feltételezések szerint a lignin berakódás kiindulási pontjaként szolgálnak.

A növényi sejtfal tartalmaz peroxidázt, invertázt, cellulázt, foszfatázt, pektinázt, pektin metilészterázt, malát-

dehidrogenázt, exoglükozidázokat, endoglükanázt és endotranszglükozilázt. Ezeknek az enzimeknek a növényi sejtfal fenntartásában illetve szükség szerinti módosításában lehet szerepe (**Brett és Waldren**, **1990**).

2.2.2.2.4. Lignin

Egyes sejtek növekedésük befejezte után lignint építenek sejtfalukba. A lignin a kumaril-, konferilés szinapil- alkoholok kovalens kötésekkel összekapcsolt, teljesen szabálytalan, hidrofób, rendkívül sűrű szövedéke. Mivel a polimerizáció nem enzimatikus, ezért addig folytatódik, amíg az összes rendelkezésre álló aktivált anyagot fel nem használva az adott térrész fel nem töltődik. A sejt növekedése a lignin berakódása után lehetetlen, és mind a tápanyagok, mind a kórokozók behatolását lehetetlenné teszik azaz a lignifikálódott sejtfalú sejt mindig halott, de tartást és védelmet nyújt a többi sejt számára (**Brett és Waldren**, **1990**).



2.2.3.1. ábra. A "reatiner" enzimek mechanizmusa. A: sav/bázis; B: bázis

2.2.3. A glikozil hidrolázok katalitikus mechanizmusa

A glikozidos kötéseket hidrolizáló enzimek összefoglaló neve glikozil hidrolázok (GH). Mivel a növényi sejtfal főként glikozidos kötésekkel egymáshoz kapcsolt cukormolekulákból épül fel, a növényi sejtfal lebontásában résztvevő enzimek döntő többsége glikozil hidroláz. Ezek az enzimek működésük alapján két csoportba sorolhatók: a glikozidos hasítása után cukormolekula kötés a glükozidos-OH csoportját eredeti

konformációban megtartó "retainer"-ek (**2.2.3.1. ábra**) és az ellenkezőjére változtató "inverter"-ek (**2.2.3.2. ábra**) (**Koshland, 1953**). Mindkét mechanizmus esetében a katalízisben két karboxilos aminosav (D, E) játszik szerepet, de az aminosavak szerepe a mechanizmustól függően különböző.



Az "inverter" enzimek esetében az egyik aminosav az általános sav (general acid), a másik az általános bázis (general base), a "retainer" enzimek esetében az egyik az általános sav/bázis, a másik pedig a nukleofil aminosav (**McCarter és Withers, 1994**).

Az "inverter" enzimek esetében a reakció egy lépéses, az általános bázis elvon egy protont egy vízmolekulától, és az aktivált

vízmolekula hasítja a kötést a glükozidos C atomnál, és beépül oda. Ezzel egyidőben az általános sav protonálja a szabaddá váló oxigént.

A "retainer" enzimek esetében a folyamat két jól elkülöníthető lépésből áll. Első lépésben az általános sav/bázis protonálja a glükozidos oxigént, ami a glikozidos kötés hasítását eredményezi, a felszabaduló glükozidos szénatom pedig a nukleofilhoz kapcsolódik egy kovalensen kapcsolt glikozil-enzim intermediert hozva létre. A második lépésben a deprotonált karboxil csoport általános bázisként viselkedve deprotonál egy vízmolekulát, ami megtámadja a glikozil-enzim kötést, hasítja és beépül oda, aminek eredményeként a termék és az enzim közötti kovalens kapcsolat megszűnik (Withers és Aebersold, 1995). A katalízisben résztvevő aminosavak pozíciója eltér egymástól a két mechanizmus esetében. A "retainer" enzimek esetében a nukleofil aminosav a szubsztráthoz közel helyezkedik el, hogy a kovalens kapcsolat kialakulhasson, még az "inverter" enzimek esetében még egy vízmolekulának is el kell férnie a két katalitikus aminosav távolsága nem nagyobb mint ~5.5 Å, míg az "inverterek" esetében ez a távolság legalább ~10 Å (Davies és Henrissat, 1995).

2.2.4. A glikozil hidrolázok általános felépítése



2.2.4.1. ábra. A glikozil hidrolázok általános felépítése: CD: katalitikus domén; fekete: linker régiók; zöld téglalapok: általában szénhidrát kötő modulok

glikozil hidrolázok döntő többsége А moduláris szerkezetű (2.2.4.1. ábra), azaz a katalitikus doménen (CD) kívül, direkt vagy kapcsoló régiókkal flexibilis (linker) összekötött, több. különböző funkciójú modulból állnak (Tomme et al. 1995; Warren, 1996). Mivel a flexibilis linker régiók a proteázok számára könnyen hozzáférhetők, limitált proteolízissel a modulok elválaszthatók

egymástól és független egységekként vizsgálhatók (**Gilkes et al. 1988; Tomme et al. 1988**). A glikozil hidroláz katalitikus doménhez kapcsolódó modulok leggyakrabban szénhidrát kötő modulok (Carbohydrate Binding Module; CBM), de előfordulnak észteráz, termostabilizáló, baktérium sejtfalhoz kötő SLH, linker szerepet betöltő Fn3, a scaffolding fehérjével kapcsolódó dokerin és eddig még ismeretlen funkcióval rendelkező, hasonlóság alapján számos családba sorolt "X" modul is. (Hansen, 1992; Little et al. 1994; Fujino et al. 1992, 1993; Bayer et al. 1994; Henrissat és Coutinho, 2000)

A domének közötti linker régió szerinben, treoninban, prolinban és glicinben gazdag, és olyan flexibilis szerkezettel rendelkezik, ami lehetővé teszi az összekapcsolt, és ezért feltehetően együtt funkcionáló modulok térbeli elrendeződésének dinamikus (megfelelő időben a megfelelő helyen) kialakulását. A *P. fluorescens* Xyn10A xylanáz CBM és a CD közötti linker régió deléciója jelentősen csökkentette oldhatatlan szubsztráton a xylanáz enzim aktivitását, a CD folding-ját nem befolyásolta, és oldható szubsztráton az aktivitás nem változott. Ezek alapján feltételezhető, hogy a

CBM által a szubsztráthoz rögzített CD-nak rendelkeznie kell valamilyen szintű mozgási lehetőséggel a teljes enzimaktivitás megtartásához (**Black et al. 1995**).

2.2.4.1. A glikozil hidrolázok katalitikus doménje

A korábban használt IUB (International Union of Biochemistry) szubsztrátspecifikusságon és katalizált reakciótípuson alapuló EC csoportosítás nem tette lehetővé a széles vagy kevert szubsztrátspecifikusságú enzimek besorolását és bizonytalanná tette az újabban talált glikozil hidroláz homológok biokémiai karakterizálás nélküli besorolását. Ezért a glikozil kötések hidrolízisét végző glikozil hidroláz katalitikus doméneket aminosav szekvencia hasonlóság alapján 85 családba sorolták. Az egy családba tartozó enzimek 3D szerkezete hasonló, azonos őstől származnak, és a család minden tagjának bizonyos tulajdonságai megegyeznek. Az EC besorolással ellentétben a családon belül a szubsztrátspecifikusság és az endo- vagy exo- mechanizmus eltérhet, de a térszerkezet, a katalitikus aminosavak és a katalitikus mechanizmus mindig megegyezik. Ezért a család egy tagjának jellemzése a család minden tagjáról sok strukturális információval szolgál (**Henrissat és Davies, 1997; Davies, 1998**).

A családok hasonló fold-juk alapján további nagyobb csoportokba, klánokba sorolhatók. Az egy klánba tartozó családok mindegyik tagjának 3D szerkezete hasonló, így a katalitikus aminosavak helyzete megegyezik és a katalitikus mechanizmusuk is egyforma (**Henrissat és Bairoch, 1996; Henrissat és Davies, 1997; Warren, 1996**). A klánba sorolás alapja a hasonló fehérje fold, ami csak akkor áll rendelkezésre, ha az adott család legalább egy tagjának 3D szerkezete ismert. Eddig 20 GH család 3D szerkezete ismert, de hidrofób klaszter analízissel (HCA) lehetséges a hidrofób klaszterek elrendeződésén alapuló nagyon távoli hasonlóságok feltárása is, mivel a hidrofób klaszterek alakja és elrendeződése azonos fold esetében hasonló. A HCA és a 3D szerkezetek felhasználásával 35 családot lehetett 11 klánba (GH-A..GH-K) besorolni. Az első klán (GH-A) a legnagyobb 15 család tartozik ide, 9 3D szerkezete is ismert, a többit HCA homológia alapján sorolták be. A B, C, E, I, K klánok léte ismert 3D szerkezet hasonlóságán alapul, az F, G, J klánok HCA analízisen. A HCA analízis elég szubjektív, így ezen klánok tényleges létét a 3D szerkezet hiányában a katalitikus mechanizmus és a katalitikus aminosavak helyének vizsgálatával lehet igazolni.

Mivel az egy-egy klánba tartozó családok hasonló 3D fold-ja azonos evolúciós eredetre utal, de akár a családon belül is eltérő lehet a szubsztrátspecifikusság, illetve a különböző klánokba tartozó enzimeknek is megegyező lehet a szubsztrátspecifikussága; a glikozil hidrolázok evolúciója lehet



2.2.4.1.1. ábra. A katalitikus aminosavak környezetének térbeli szerkezete. A: árok; B: alagút; C: zseb

divergens illetve konvergens is. A gomba eredetű és a baktérium eredetű glikozil hidrolázok közötti jelentős hasonlóság pedig gyakori horizontális géntranszferre utal (**Béguin és Aubert, 1994**).

A meglévő 3D szerkezetek azt mutatják, hogy az enzim működési

mechanizmusát (endo/exo/diszacharid bontás) nem annyira a katalitikus aminosavak pozíciója, hanem a katalitikus aminosavak környezetének térbeli kialakulása határozza meg (**2.2.4.1.1. ábra**). A endo enzimek katalitikus aminosavai egy árokban (cleft), az exo enzimek katalitikus aminosavai alagútban (tunnel) és a diszacharidok bontására specializált enzimek katalitikus aminosavai zsebben (pocket) helyezkednek el (**Aleshin et al. 1992; Spezio et al. 1993; Divne et al. 1994**).

A glikozil hidrolázok hivatalos elnevezése általában tartalmazza az organizmus nevét amiből származik (Pf), a preferált szubsztrátot (Xyn=xylán) a GH család számát, ahová hasonlóság alapján

tartozik (10) és a felfedezés sorrendjétől függő betűt (A) pl.: PfXyn10A = *Pseudomonas flurosecens* elsőként felfedezett 10-es családba tartozó xylanáz. (**Henrissat et al. 1998**)

2.2.4.2. Szénhidrát-kötő modulok (CBM)

A növényi sejtfalat bontó enzimek többségében a glikozil hidroláz katalitikus doménhez kapcsolódó, katalitikus aktivitással nem rendelkező egyéb modulok legtöbbje szénhidrát, főleg cellulóz-kötő modul. Szinte minden vízben nem oldható szubsztrátot hidrolizáló GH enzim katalitikus doménjéhez kapcsolódik az enzim szubsztrátját specifikusan kötni képes CBM. Ez azt jelenti, hogy a CBM jelenléte a vízben oldhatatlan szubsztrátok bontásában fontos szerepet tölt be (Coutinho és Reilly, 1993; Blakk és Schrempf, 1995; Jesperson et al. 1991).

A cellulózt specifkusan kötő CBM-eket cellulózkötő doménnek (CBD) nevezik. CBD jelenléte mind a bakteriális, mind a gombákból izolált cellulázok esetében megfigyelhető, de xylanáz, arabinofuranozidáz és észteráz aktivitású katalitikus doménekhez is kapcsolódhat (Kellet et al. 1990; Ferreira et al. 1993; Linder és Teeri, 1997). A xylánt specifikusan kötő CBM-ek a xylán kötő domének (XBD) (Black et al. 1995; Dupont et al. 1998; Simpson et al. 1999; Kuno et al. 2000). Az eddig talált XBD-ek mindegyikéhez xylán bontásában résztvevő CD kapcsolódik, azaz előfordulhat xylanáz, acetil xylán észteráz és arabinoxylán-arabinofuranozidázban, de XBD-t celluláz aktivitású katalitikus doménhez kapcsolódva eddig még nem találták (Sunna et al. 2000). A keményítőt kötő modul az SBM, főleg amiláz illetve ciklodextrináz CD-hoz kapcsolódva fordul elő (Nunberg et al. 1984). A CBM-eket aminosav hasonlóság alapján 26 családba sorolták (Henrissat és Coutinho, 2000).

A szénhidrát fehérje kölcsönhatás kialakításában az aromás aminosavak kiemelt szerepet játszanak. A tirozin (Y) és triptofán (W), esetenként a fenilalanin (F) és a hisztidin (H) gyűrűje erős hidrofób kölcsönhatást (hidrophobe stacking) alakít ki a cukorgyűrűvel, amit a cukor-OH csoportjainak más aminosavakkal kialakított hidrogénhídjai tovább erősíthetnek (**Quiocho, 1986; Vyas, 1991**).

A szerkezet, funkció és ligandum kötő képesség alapján a CBM–ek három osztályba sorolhatók (**2.2.4.2.1. ábra**). Az A osztályba tartozó CBM-ek vízben nem oldható szubsztrátok felszínéhez kötnek, a B osztályba tartozók 3 cukormolekulánál hosszabb oligoszacharidokat kötnek meg, és a C osztályba tartozók mono- és diszacharidok kötésére képesek (**Boraston et al. 1999**).

Az A osztályba tartozik az 1, 2a, 3, 5, 10 és 12 család. Az osztály minden tagja oldhatatlan cellulózt



2.2.4.2.1. ábra. A cellulózkötő modulok szubsztrátkötésben résztvevő aminosavainak lehetséges elrendeződései. A: egy sík mentén: A osztály CBM1 család (*Trichoderma reesei*, 1CBH.pdb); B: árokban: B osztály CBM4 család (Cellulomonas fimi, 1ULO.pdb); C: zsebben: C osztály CBM13 család (*Streptomyces olivaceoviridis*,:1XYF.pdb)

köt, és cello-oligoszacharidokhoz való affinitása elenyésző. A kötő domén egyik oldalán aromás aminosavak találhatók, melyek aromás gyűrűi egy sík felület mentén szabályosan helyezkednek el (**Din et al. 1994; Braun et al. 1997**).

A három monoszacharidnál hosszabb oligoszacharidokat és az oldható polimer láncot kötő B osztály tagjai a 2b, 4, 17 és 22 családok. A 2b család kivételével a domének egy árkot tartalmaznak, melynek oldalain helyezkednek el az aromás aminosavak. A 2b CBM a felületén két egymással 90°-ot bezáró triptofánt hordoz olyan távolságban, hogy lehetővé tegyék a molekulánként 120°-ot csavarodó xylán lánc megkötését (**Simpson et al. 1999: Simpson et al. 2000**).

A főleg mono- és diszacharidokat kötő C osztály tagjai vízoldható és vízoldhatatlan szubsztrátot is köthetnek, ahonnan egyszerű cukrokkal könnyen eluálhatók. Idetartozik a 6, 9 és *13* család. Az osztály tagjainak cukorkötő része zsebhez hasonlít, amelynek oldalán helyezkednek el a cukorkötésben résztvevő aromás aminosavak (**Sakka et al. 1996; Winterhalter et al. 1995; Boraston et al. 2000**).

A CBM funkciója még nem tisztázott teljesen. Oldhatatlan szubsztráttal szemben jelentősen fokozzák a hozzájuk kapcsolódó katalitikus domén aktivitását, oldható szubsztrátok esetében azonban jelenlétük vagy hiányuk nem befolyásolja a reakció hatékonyságát (**Tomme et al. 1988; Hall et al. 1995**). A CfCel6A-CBM2a megbontotta (nem hidrolízis útján) a gyapotszálak felszínét, és így valószínűleg a hidrolázok számára nagyobb felületet tett hozzáférhetővé (**Din et al. 1991**), azonban ehhez hasonló hatást más CBM-ek esetében nem tudtak kimutatni. Feltételezhető, hogy a CBM-ek a hozzájuk kapcsolódó adott szubsztrátspecifikusságú katalitikus domént a neki megfelelő szubsztráthoz irányítják és rögzítik, így hatékonnyá válik még egy olyan strukturálisan és összetételben is rendkívül komplex szubsztrát hatékony lebontása, mint a növényi sejtfal (**Carrard et al. 2000**).

2.2.5. Fehérje kristályosítás

Egy fehérje kristályosítása során az a cél, hogy olyan túltelített egy fehérjeoldatot állítsunk elő ami a túltelítettségéből eredő szabad energia többlettől a fehérje kristályosodásával és nem annak amorf kicsapódásával "szabadul meg". А tökéletesen rendezett kristályos állapot az anyag legalacsonyabb szintű szabad energia állapota, kialakulásához azonban elengedhetetlen egy magasabb energiaszintű intermedier: a kritikus



2.2.5.1. ábra. A fehérjekristályosodás körülményeit meghatározó szabad energia viszonyok

méretű kristályosodási mag létrejötte. (**2.2.5.1. ábra**) A rendezettséget nélkülöző kicsapódás összes szabad energiája nagyobb, mint a rendezett kristályos állapoté, de kialakulásához nincs szükség magasabb energiaszintű intermedierekre, ezért gyakran ez a túltelített fehérjeoldat preferált szabadenergia csökkentő útja. A túltelítés körülményei azonban beállíthatók úgy, hogy a kritikus méretű kristályosodási mag létrejöhessen, és a nukleáció után a kristály növekedni kezdjen. Mivel az optimális körülmények szűk korlátok között mozognak, létrehozásuk több különböző komponens kombinációjával állítható elő. Ezért egy átlagos kristályosítási oldat legalább három komponenst, a pH-t biztosító **puffert** és a fehérje oldhatóságát meghatározó **sót** és **kicsapó anyagot** tartalmaz. Ezen tényezők hatását módosítja a hőmérséklet, a kiinduló fehérjeoldat koncentrációja és az adalék anyagok (additives) mennyisége és minősége.



A túltelített oldat létrehozásakor az adott kristályosítási pufferrel összekevert tömény fehérjeoldatból (15-100 mg/ml) a vizet elvonjuk, így az össztérfogat csökkenésével a fehérje koncentrációja nő, az oldat telítődik, majd további vízelvonás hatására túltelítetté válik.

A gyakorlatban leggyakrabban a **vízpára diffúziós** (water wapour diffusion) módszert használják, ami alapvetően kétféle lehet: az ülő-(sitting drop) és a függő cseppes (hanging drop) technika (**2.2.5.2**. **ábra**). A függő cseppes módszer esetében egy szigetelt,

kristályosítási oldatot tartalmazó üreget a fehérje vizes oldatát és a kristályosítási oldat keverékét tartalmazó cseppet hordozó üveglemezzel fednek le. Az üveglemezen függő cseppben a víz koncentrációja nagyobb, mint az üregben lévő nagy térfogatú kristályosítási oldatban, ezért a cseppből a víz a levegőn keresztül a kristályosítási oldatba diffundál. Ennek eredményeként a csepp

térfogata csökken, azaz a benne lévő fehérjeoldat koncentrációja nő. Az ülő csepp esetében a fehérjeoldattal összekevert kristályosítási oldat egy, a kristályosítási oldatot tartalmazó üreg közepéből kiemelkedő, kis térfogatú másik üregben helyezkedik el. Előnye, hogy a cseppméret és így a használt fehérje mennyisége nagyobb, mint a függő cseppes módszer esetében.

A **dialízises** módszer esetében a fehérjeoldatot dialízis csőbe töltve, és töményebb kristályosítási oldatba helyezve a hígabb fehérjeoldatból a víz egy része a kritályosítási oldatba diffundál, és így a dialízis csőben lévő fehérjeoldat töményedik. A módszer előnye, hogy a ki nem csapódó és ki nem kristályosodó fehérjeoldatot tartalmazó dialízis cső más körülmények között újra tesztelhető.

A **szabad felületen zajló diffúziós** módszer (free interference diffusion) esetén a fehérjeoldatot kapillárisban a töményebb kristályosítási oldat felületére rétegzik, ahol a hígabb fehérjeoldatból a víz egy része a töményebb kristályosítási oldatba diffundál. Ezt a módszert a világűrben végzett kristályosításoknál használják, mivel könnyű beállítani és kis mennyiségű fehérjét igényel, de a Földön nem használható hatékonyan, mert nagy hatással van rá a gravitáció.

A régebben használt **adag** (batch) kristályosítás esetében a kristályosítási oldattal összekevert fehérjeoldatból a vizet hagyják lassan elpárologni, aminek eredményeként az töményedik, és szerencsés esetben kristályokat képez. Ezzel a módszerrel nagy méretű kristályok előállítására van lehetőség, de nagyon idő és fehérje igényes.

A kristályosodást előidéző optimális kristályosítási oldat összetételének meghatározása is



2.2.5.3. ábra. Az optimális kristályosodási oldat összetételének meghatározása. IF: nem teljes faktoriális; FP: lábnyom; G: rács

többféleképpen történhet (screening) (2.2.5.3. ábra). A random módszer a kristályosítási oldat összetevőinek random kombinálása. A nem teljes faktoriális (incomplete factorials IF) módszer esetében bizonyos kristályosítási oldat kombinációkban vizsgálják az adott fehérje kicsapódásának mértékét, és ebből statisztikai módszerekkel meghatározzák a fehérje oldhatóságát, és ezen alapulva újabb oldat-kombinációkkal próbálkoznak. A lábnyom (footprint FP) módszer esetében bizonyos pH, vagy só, vagy kicsapó anyag koncentrációt egymáshoz közel, legalább három töménységben tesztelnek, és így nemcsak a fehérje bizonyos körülmények közötti oldhatóságát, hanem oldhatóságának változását is megállapítják, és ezen alapulva keresik az optimális kristályosítási feltételt. A szórványos mátrix (sparse matrix) módszernél más fehérjék kristályosodását okozó feltételeket tesztelnek, ilyen a Hampton screen is. A rács (grid G) módszer esetében egymáshoz nagyon közeli kondíciókat módszeresen vizsgálnak. Ezt a módszert főleg akkor használják, ha már a kezdeti kristályosítási feltételek ismertek, csak a kristály minőségén vagy méretén kell változtatni (Hampton Research, 2001).

Törzs	Jellemzők	Hivatkozás
<u>Escherichia coli</u> BL21(DE3)	F'ompT, $hsdS_B(r_B-m_B-)$, gal, dcm, (DE3)	Studier et al. 1986, 1990
BL21(DE3)pLysS	F'ompT, $hsdS_B(r_B-m_B-)$, gal, dcm, (DE3), pLysS	Studier et al. 1986, 1990
BMH 71-18 mutS	thi1, supE, $\Delta(lac-proAB),[mutS::Tn10],$ [F'proAB, lacI ^q Z Δ M15]	Clontech
JM83	ara, $\Delta(lac-proAB)$, rspL, ϕ 80lacZ Δ M15	Yanisch-Perron et al. 1985
JM83(DE3)	ara, Δ (lac-proAB), rspL, ϕ 80lacZ Δ M15, (DE3)	
Tuner(DE3) TM	F , ompT, hsdS _B , (r_B m _B), gal, dcm, lacYl, (DE3)	Novagen
Oregami(DE3) TM	△ara ⁻ , leu7697, $△$ lacX74, $△$ phoAPvull, phoR, araD139 galE, galK, rspL, F'[lac ⁻ (lacl ^q)pro], gor522::Tn10 (Tc ^R) trxB::ka. (DE3)	Prinz et al. 1997
B834(DE3)	F^{-} , ompT, hsdS _B , ($r_{B}^{-}m_{B}^{-}$), gal, dcm, met , (DE3)	Wood, 1966
JM101	supE, thi-1, $\Delta(lac-proAB)$, [F'traD36, proAB, $lacl^q Z\Delta M15$]	Yanisch-Perron et al. 1985
TOP10	ø80lacZΔM15,ΔlacX74, deoR, recA1, araD139, Δ(ara-leu)7697,GalU, galK, rpsL, endA1, nupG	Invitrogen

2.3.1. Baktérium törzsek, plazmidok

Plazmidok

Plazmid	Méret (kb)	Rezisztencia	Hivatkozás	
pCR™Blunt	3.5	Kan ^r	Invitrogen	
pET16b	5.71	Amp^{r}	Novagen	
pET21a	5.44	Amp^{r}	Novagen	
pET21d	5.44	Amp^r	Novagen	
pGEX-4t-3	4.97	Amp^r , $lacI^q$	Pharmacia Biotech	

2.3.2. Táptalajok, oldatok, pufferek

Luria-Bertani Mediumn	10 g	Bacto®tryptone	
(LB)	5 g	Bacto®yeast extract	pH = 7.4 NaOH-al
	10 g	NaCl	

SelMet tápoldat 1 liter

2 ml 1 M MgSO₄ 100 ml 20xM9 (20 g NH₄Cl, 60 g KH₂PO₄, 120 g Na₂HPO₄ / liter) 2 ml 12.5 mg/ml-es FeSO₄x7H₂O 10 ml 40 %-os glükóz (w/v) 10 ml aminosav mix I (M, Y, W, F kivételével 4 mg/ml) 10 ml aminosav mix II (Y, F, W 4 mg/ml + 1 csepp conc. NaOH) 1 ml vitamin mix (riboflavin, nicotinamid, pyridoxin monohidroklorid és thiamin) 4 ml 10 mg/ml seleno-L-metionin

TSS 85 % LB 10 % PEG 8000 5 % DMSO 50mM MgCl₂x6H₂O

Tris.acetát (TAE) 1150 x:	242 g Tris 57.1 g ecetsav 100 ml 500 mM EDTA pH 8.0
Tris.borate (TBE) 1110 x:	108 g Tris 55 g bórsav 40 ml 0.5 M EDTA pH 8.0
10 x DNS futattó puffer	0.25% (w/v)Brómfenol kék0.25% (w/v)Xylene Cyanol FF0.25% (w/v)Orange G50% (v/v)glycerol10 x TBE pufferben

2.3.3. Mikrobiológiai módszerek

2.3.3.1. Kompetens E. coli transzfomáció

A kompetens *E. coli*-t a Transformer Site-Directed Mutagenesis Kit-ben megadottak szerint TSSben transzformáltuk (**Chung et al. 1989**). A 100 ml LB tartalmazó 500 ml-es lombikban $OD_{600}=0.5$ -ig szaporított sejteket 20 percre jégre raktuk, centrifugáltuk és 5 ml TSS-ben felvettük. 100 µl sejtszuszpenziót a DNS hozzáadása után 20 percig jégen inkubáltuk, 1 percig 42°C-on hősokkoltuk, majd 5 percre jégre tettük. 1 ml LB hozzáadása után 37°C-on 1 órát inkubáltuk, majd megfelelő antibiotikumot tartalmazó táptalajra szélesztettük.

2.3.3.2. Fehérje túltermeltetés E. coli-ban

Az expresszáltatni kívánt fehérjét kódoló expressziós vektorba klónozott DNS fragmentet tartalmazó *E. coli* BL21 vagy JM83(DE3) vagy Oregami vagy Tuner telepet 5 ml LB+antibiotikum oldatba oltottunk és ON szaporítottuk 37°C-on. Másnap 1 1 LB-t tartalmazó 2 1-es buffeled lombikba 100x-os hígítást készítettünk belőle és OD₆₀₀=0.6-0.8-ig 20 °C 30 °C vagy 37°C-on inkubáltuk 200 rpm-en. A megfelelő sejtsűrűség elérésekor 1 ml 1 M-os IPTG adtunk hozzá (1 mM végső IPTG koncentráció), és további 2-6 órát inkubáltuk a szaporítás körülményeivel megegyező feltételek mellett. A megfelelő idő eltelte után a sejteket 7000 rpm-en JA-10 rotorral felszerelt BECKMAN J2-21 centrifugában 10 percig ülepítettük. A sejteket 10 ml szonikáló pufferben (20 mM Tris pH=8.0 és 100 mM NaCl) újra szuszpendáltuk és –20°C-on tároltuk. A kiolvasztott sejteket LABSONIC U szonikátorral 0.5 duty cycle, middle power (low) beállításokkal 3 percig szonikáltuk, majd JA-20 rotorban 17 000 rpm-en 30 percig ülepítettük. A szupernatáns a sejtmentes kivonat (CFE) a pellet pedig az inclusion body-t és a membránfehérjéket tartalmazta.

2.3.3.3. Plazmid izolálás E. coli-ból

A plazmidizolálást a Qiagen® Spin/Mini Prep Kit leírása alapján végeztük.

2.3.4. Fizikai és kémiai módszerek

2.3.4.1. Polimeráz láncerakció (PCR)

Mullis és Faloor	na (1987) alapján. Végtérfogat 100 μl.			
0 – 4 µ	1 $MgSO_4 (100 mM)$			
1 µl	dNTP mix (100 mM)			
10 µ1	10 x Thermopol Reaction Buffer (New England BioLabs®)			
0.5 µN	oligonucleotide primers (20 – 30 bp)			
~ 60 ng	g DNA template			
1 µl	Vent _R ® DNA polymerase 2 units/ µl (New England BioLabs®)			
l ciklus	94°C 2 perc			
30 ciklus	94°C 1 perc			
	$T_m - 5^{\circ}C^{-1}$ perc $T_m = 4(G + C) + 2(A + T),$			
	72°C amplifikálandó fragment mérete/1000 perc			
l ciklus	72°C 10 perc			
	-			

N

2.3.4.2. Helyspecifikus mutagenezis

A mutánsokat a Transformer[™] Site-Directed Mutagenesis Kit (2nd version; Clontech) vagy a QuikChangeTM Site-Directed Mu Mutagenesis Kit (Stratagene) segítségével állítottuk elő a kitek leírásának megfelelően.

2.3.4.3. Periplazma izolálás

Az indukálás után a sejteket ülepítettük, és 10 ml 20 mM Tris pH=8.0 + 20 % szacharózt tartalmazó oldatban óvatosan szuszpendáltuk, majd 30 percig jégen inkubáltuk. A sejteket ez után JA-20 rotorban 10 percig 7 000 rpm-mel ülepítettük, és jéghideg ioncserélt vízben szuszpendáltuk. 30 perc jégen történt inkubálás után a sejteket JA-20 rotorban 20 percig 10 000 rpm-mel ülepítettük. A felülúszó tartalmazta a periplazmát.

2.3.4.4. His tag-es fehérje izolálás denaturáló és natív körülmények között

A pelletet 10-20 ml 20 mM Tris-t pH=8.0, 100 mM NaCl-ot és 8 M-os ureát tartalmazó oldatban feloldottuk, 0.45 µm pórusméretű membránon átszűrtük és a Talon Metal Affinity Resin (Clontech) leírásának megfelelően a His tag-et tartalmazó fehérjét denaturáló körülmények között kitisztítottuk (oszlop töltet: 10 ml rezin=> 5 ml oszloptöltet; 25 ml oszlop equilibrálás; CFE; 25 ml mosás; 25 ml mosás 10 mM imidazollal; 25 ml elució 100-250 mM imidazollal 5 ml-es frakciók gyűjtése). Ha a tisztítani kívánt fehérje a CFE-ben volt, akkor a CFE került az oszlopra, minden megegyezett a denaturáló körülményekkel, csak az oldatok nem tartalmaztak ureát.

2.3.4.5. GST tagos fehérje izolálás

A CFE-ből Glutathione-S-transferase (GST) fúziós fehérjéket a Glutathione Sepharose® 4B gravity flow column (Pharmacia Biotech) instrukcióinak megfelelően izoláltuk. (LaVallie et al. 1993)

2.3.4.6. Inclusion body-ban termelődő fehérjék refolding-ja

A kívánt fehérjét tartalmazó frakciókat összegyűjtöttük és dialízis csőbe töltöttük, és először 5 M urea + megfelelő pH-jú 50 mM puffer + (100 mM NaCl és 5 % glicerol)-lal szemben dializáltuk, majd pufferrel való többszöri hígítással ureát nem tartalmazó pufferrel szemben dializáltuk. A refoldolt és urea mentesített fehérjeoldatot szűrtük és koncentráltuk.

2.3.4.7. Fehérje izolálás ion-cserélő és gélszűrő oszlopon

Az UNO Q-12 anion cserélő oszlop a BIO-RAD BioLogic HR rendszerhez volt kapcsolva. Az A puffer általában 10 mM Tris pH=8.0, a B puffer pedig 10 mM Tris pH=8.0 + 500 mM NaCl. A grádiens hossza a fehérje igényeinek megfelelően 2 ml/min folyási sebességnél 80-180 ml volt. A gélfiltrációs oszlop HiLoad 16/60 Superdex 75 (Pharamcia). A puffer 10 mM Tris pH=8.0 + 150 mM NaCl, a folyási sebesség 1 ml/min, a loop 1 ml.

2.3.4.8. Fehérje kristályosítás

A homogenitásig tisztított fehérjeoldatot Vivaspin 20 (VS2011) koncentrátorral vízbe vagy a megfelelő pufferbe (általában 5 mM Tris pH=8.0) mostuk vissza. A fehérjeoldat koncentrációját 15 mg/ml-re állítottuk, és ebből 1 vagy 2 µl-t kevertünk össze egy szilikonozott és tisztára törölt fedőlemezen. A fedőlemezt megfordítva a FALCON 353047 MultiwellTM 24 well Tissue Culture Plate megfelelő, kristályosítási oldatot tartalmazó, előzsírozott (MERCK, DOW CORNING[®] high vacuum Grease) bemélyedése fölé helyeztük, és finoman rányomtuk. A kristályosítási oldat első lépésben a Hampton Research által forgalmazott CrystalScreen1, CrystalScreen2 és PEG/ION kit-ekből származott, amit az igényeknek megfelelőn a további lépésekben módosítottunk. A plate-eket 20°C-on inkubáltuk és 1, 2, 3, 4, 5 nap elteltével, majd hetenként Leica MZ5 sztereomikroszkóppal megvizsgáltuk.

2.3.4.9. DNS és fehérje koncentráció meghatározása

A DNS koncentrációját az UV spektrofotométerrel mért A₂₆₀ érték alapján számoltuk.

primer koncentrációpmol/µl= $A_{260}/(0.01*N)$ N=a primer hosszadsDNS koncentrációµg/µl=($A_{260}*50$)/1000ssDNS koncentrációµg/µl=($A_{260}*20$)/1000A izolált fehérje koncentrációját az az UV spektrofotométerrel mért A_{280} érték alapján számoltuk.µM= $A_{280}/\epsilon*10^6$ $\epsilon=\#Y*1300+\#W*5700$

2.3.4.10. Agaróz DNS gélelektroforézis

A horizontális géleket **Meyer et al. (1975)** alapján futtattuk. Applied Biosystems rendszerben ~80 mA (5 - 20 V/cm) (LKB Bromma 2197 Power Supply).

2.3.4.11. Automatikus DNS szekvenálás

A szekvenálást a Facility for Molecular Biology, Floor 3, Catherine Cookson Building, The Medical School, University of Newcastle Upon Tyne technikusai végezték ABI PrismTM Ready Reaction DyeDeoxyTM Terminator Cycle Sequencing Kit-tel egy Applied Biosystems 373 A Sequencing System-en.

2.3.4.12. Fehérje elválasztása (SDS) poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) Laemmli (1970).

A vertikális géleket AE-6450 ATTO (Genetics Research Instruments) berendezésen választottuk el 25 mA/gél körülmények között.

Resolving gel	10 %	12.5 %	15 %
0.75 M Tris pH=8.8 + 0.2 % SDS	9.4 ml	9.4 ml	9.4 ml
40 % Acrylamide + 3% (w/v) bisacrilamide	4.7 ml	5.8 ml	7.1 ml
ddH ₂ O	4.6 ml	3.5 ml	2.2 ml
10 % APS	90 µl	90 µl	90 µl
TEMED	30 µl	30 µl	30 µl

Stacker gel	2 gels	4 gels
0.25 M Tris pH=6.8 + 0.2 % SDS	3.75 ml	7.5 ml
40 % Acrylamide + 3% (w/v) bisacrilamide	0.75 ml	1.5 ml
ddH ₂ O	3 ml	6 ml
10 % APS	60 µl	120 µl
TEMED	20 µl	40 µl

SDS PAGE running buffer 1 liter: 30.3 g Tris; 144 g glicin; 1 % SDS pH=self pH= ~ 8.3

SDS PAGE loading buffer 10 ml: 1 g SDS; 5 ml stacker buffer; 2.5 ml 50 % glicerol; 2.5 ml 2 β -mercaptoetanol.

Minta előkészítés: 5 µl SDS loading buffer + 2 µl 0.05 %-os Bromphenol Blue sample dye + 15 µl fehérje minta. 3 perc forralás

Gél festés: Coomassie Blue festékben (0.4% Coomassie Brilliant Blue R, 10% (v/v) ecetsav, 40% (v/v) methanol).

Low molecular weight protein standards	M_r	High molecular weight protein standards	M_r
Albumin, Bovine	66000	Myosin, Rabbit Muscle	205000
Albumin, Egg	45000	β-Galactosidase, <i>E coli</i>	116000
Glyceraldehyde-3-P Dehydrogenase	36000	Phosphorylase B,	
		Rabbit Muscle	97400
Carbonic Anhydrase, Bovine	29000	Albumin, Bovine	66000
Trypsinogen, Bovine pancreas	24000	Albumin, Egg	45000
Trypsin inhibitor, Soybean	20000	Carbonic Anhydrase,	
		Bovine Erythrocytes	29000
α-Lactalbumin, Bovine milk	14200		

2.3.4.13. Natív PAGE

A vertikális natív poliakrilamid géleket AE-6450 (Genetics Research Instruments) berendezésen választottuk el 10 mA/gél körülmények között.

7.5%	PA	GE	gél:
------	----	----	------

0	
ddH ₂ O	6.03 ml
1% (w/v) ligandum	1 ml
10x running buffer	1 ml
(250 mM Tris.HCl, pH=8.3, 2.5 M glicin)	
40% (w/v) acrylamide, 3% (w/v) bisacrilamide	1.87 ml
10% (w/v) APS	100 µl
TEMED	20 µl

A minta 10 µg-nyi fehérjét tartalmazó részét 12.5 %-os glicerol és 0.25% Bromophenol Blue dye keverékével összekevertük és elválasztottuk.

2.3.4.14. Kötési affinitás kvalitatív mérése

A mérést Ferreira et al.-nak (1993) megfelelően végeztük.

2.3.4.15. HPLC elválasztás

Oszlop: Analitcal CARBOPACTM PA-100 anion exchange column (Dionex) + CARBOPACTM PA-100 guard column. A teljesen automatikus rendszerben a loop 200 µl, flow rate 1.0 ml/min, a nyomás ~2300 psi és a detektor: pulsed amperometric detection (PAD). A detektor beállításai $E_1 = +0.05$, $E_2 = +0.6$ és $E_3 = -0.6$ voltak.

Az oligoszacharidok elúciója 0-500 mM NaAcetát 100 mM NaOH-dal történt. A monoszacharidok elúciója 10-150 mM NaAcetát 100 mM NaOH-dal történt. Az oszlopot minden futás után 500 mM-os NaAcetát-tal, majd 500 mM NaOH-dal mostuk 10-10 percig, majd 15 percig 100 mM NaOH-dal equilibráltuk. Az adatgyűjtés és feldolgozás az XChrom V.2.04 Software (LabSystems) és egy VG Chromatography Server (Fisons Instruments) segítségével történt.

2.3.4.16. ITC (Isothermal Titration Calirometry)

Az ITC (Isothermal Titration Calirometry) vizsgálatokat **Charnock et al**. (**2000**) szerint végeztük, 200-300 μM fehérje és 6-40 mM ligand felhasználásával. A módszer segítségével megmérhető a különböző mennyiségű ligand kötése során felszabaduló hő mennyísége amelyből a ligand kötődési paraméterei meghatározhatóak.

2.3.4.17. CiDiSp (Circular Dichroism Spectroscopy)

A CiDi spektroszkópia vizsgálatok Newcastle upon Tyne Egyetem Cell and Molecular Biosciences tanszékén Dr Jeremy H. Lakey segítségével történtek. A CiDi spektrumot Jasco J-810 spectropolariméterrel vettük fel. A far-UV CiDi spektrumokat 0.2-mm úthosszúságú küvettákban határoztuk meg 250–190 nm közötti tartományban 1 nm lépésenként, 10 ismétléssel. Az így kapott spektrumot a puffer hasonló módon rögzített spektrumából kivontuk és az így kapott értékeket ábrázoltuk.

2.4. Eredmények és megvitatásuk

2.4.1. A *P. fluorescens* Xyn10A enzim 10-es családba tartozó cellulózkötő moduljának vizsgálata

A *P. fluorescens* xylanáz A (PfXyn10A, XylA) fehérje egy 2-es (CBM2) és egy 10-es (CBM10) családba tartozó szénhidrát kötő modulból és egy 10-es családba tartozó glikozil hidroláz (GH10)

1 26 27 CBM2 130 131 179 180 CBM10 226 227 259 260 GH10 611

2.4.1.1. ábra. A *P. fluorescens* XylA fehérje moduláris szerkezete. CBM2: 2-es családba tartozó cellulózkötő modul; CBM10: 10-es családba tartozó cellulózkötő modul; GH10: 10-es családba tartozó glikozil-hidroláz modul. A számok az adott modul kezdetét és végét jelentik a fehérjeszekvencián belül. Az 1-26 fragment a szignál peptid, a 131-179 és a 227-259 régiók pedig a linker szekvenciákat jelölik katalitikus modulból épül fel. A modulokat flexibilis linker régiók kapcsolják egymáshoz (**2.4.1.1. ábra**).

A CBM10 modul 45 aminosavból épül fel, és

képes a cellulóz oldhatatlan, kristályos formáihoz kötődni. A kötés erőssége azonban csak

hatodrésze annak, amit a CBM2a esetében kimutattak (Millward-Sadler et al. 1995; Bolam et al. 1998; Gill et al. 1999). Az átlagosan 100 aminosav méretű CBM2a család több tagjának 3D szerkezetét (Xu et al. 1996; **1999**) Simpson et al. és a kötésben szubsztrát résztvevő aminosavait már meghatározták. A CBM10 család szubsztrát megegyezik specifikussága а CBM2a szubsztrát specifikusságával, csak a szubsztrát kötés gyengébb, mégis gyakran fordul elő a két modul együtt különböző fehérjékben



2.4.1.3. ábra. A pET16'XynF plazmid szerkezete GH10: 10-es családba tartozó glikozil hidroláz domén= 'XynF; bla: Ap rezisztenciát kódoló, *lacI*: lac represszort kódoló gén. *ori*: pBR322 replikációs origó



2.4.1.2. ábra A CBM10 és a CBM2 modul viszonya PfCel5C: P. fluorescens celluláz C; PfEgl9A: P. fluorescens endoglükanáz A; PfEgl45B: P. fluorescens endoglükanáz B; PfEl45E: P. fluorescens endoglükanáz E; PfXyn10A: P. fluorescens xylanáz A szerkezete. GH: glikozil hidroláz

(**2.4.1.2. ábra**). A XylA enzim esetében a CBM10 modul eltávolítása nem eredményez kimutatható aktivitáscsökkenést oldhatatlan szubsztrátokkal szemben (**Gill et al. 1999**).

Ahhoz, hogy a két megegyező szubsztrát specifikusságú, de eltérő kötőerősségű modul együttes jelenlétének oka világossá váljon, elsőként a CBM10-es modul szubsztrát kötését kellett megvizsgálni. Ezért célunk volt a cellulóz kötésben résztvevő aminosavak azonosítása a CBM10-es családban.

A *P. fluorescens* XylanázA (XylA) CBM10 modulját és a katalitikus modult tartalmazó pET16b vektor konstrukciót (pET16'XynF) használtuk munkánk során (**2.4.1.3. ábra**). A pET16b expressziós vektor (Novagen) egy, csak a T7 polimeráz által felismert LacI represszált promótert tartalmaz, és a promóter után, egy *Nde*I hely előtt, egy 10 hisztidinből álló fúziós peptidet (His tag) kódol. Ez a peptid az *Nde*I helyre megfelelő átírási keretben klónozott, expresszálni kívánt fehérje N-terminálisát alkotja, és így lehetővé teszi poli-hisztidin kötő affinitás kromatográfiával a fúziós fehérje egyszerű tisztítását.



2.4.1.4. ábra. A 10-es családba tartozó szénhidrát kötő modulok aminosav alignment-je. A pozíciók (7, 8, 12, 22, 24) az konzerválódott aromás aminosavak helyét jelölik, a számozás az általunk vizsgált PfXyn10A alapján. Xyn: xylanáz; Cel: celluláz; Egl: endo-glükanáz



2.4.1.5. ábra. A hisCBM10-GH10 fúziós fehérje tisztítása his -affinitás kromatográfiával. CFE: sejtmentes extrakt; FT: átfolyó; W: mosás; E: 100 mM imidazollal történt eluálás után kapott fehérje; A számok a molekulatömeg marker kDaban kifejezett értékei

A szénhidrátok kötésében általában aromás aminosavak (W, Y) vesznek részt (**Din et al. 1994**; **Nagy T et al. 1998**), hiszen a cukor gyűrű és az aromás aminosav között megfelelő térbeli elrendeződés esetén erős hidrofób kölcsönhatás alakulhat ki (hidrofób stacking). Ezért elsőként a szénhidrát kötő modulok 10-es családjának konzerválódott aromás aminosavait azonosítottuk (**2.4.1.4. ábra**). A XylA (PfXyn10A) enzim CBM10 aminosav sorrendjét alapul véve a 7 és a 22 pozícióban csak Trp a 8 és a 24 pozícióban Trp vagy Tyr található. A 12. pozícióban csak a *P. fluorescens* endo-1,4-glukanáz B-ben (PfGlu45B) van Thr a Tyr helyett.

Annak eldöntésére, hogy ebből az öt aromás aminosavból ténylegesen hány vesz részt a kristályos cellulóz kötésében, helyspecifikus mutagenezissel a triptofánokat és tirozinokat alaninra cseréltük, a mutáns fehérjéket expresszáltattuk, affinitás kromatográfiával kb. 90 %-os tisztaságúra tisztítottuk (**2.4.1.5. ábra**), és a mutánsok illetve a vad típus avicel kötő képességét megvizsgáltuk (**2.4.1.6. ábra**). Az ismert koncentrációjú tisztított

fehérje különböző mennyiségét adott mennyiségű kristályos cellulózzal (avicel) összekevertük, jégen inkubáltuk, centrifugáltuk és a felülúszó 280 nm-en mért abszorbanciája alapján

meghatároztuk az avicelhez nem kötött fehérje mennyiségét. A kiindulási és a nem kötődött fehérje mennyiségének különbsége megadja a megkötött fehérje mennyiségét, amit, ha az eredeti avicel mennyiségéhez viszonyítunk, megkapjuk a modul avicel vizsgált kötő képességét. Az Y12A mutáns cellulózkötő képessége alig változott, a többi mutáns cellulóz képessége azonban jelentősen csökkent a vad típushoz (WT) képest (2.4.1.6. ábra).

Annak igazolására, hogy a többi mutáns cellulózkötő



2.4.1.6. ábra. A hisCBM10-GH10 modul WT és a mutáns fehérjéinek kötési izotermái



fehérjéinek CiDi spektruma

képességének csökkenése fehérje nem a struktúrájában végbement változásokkal magyarázható, CiDiSp segítségével összehasonlítottuk a mutáns és vad típusú fehérjék másodlagos és harmadlagos szerkezetét (2.4.1.7. ábra). A CiDiSp nem mutatott számottevő különbséget a vad és mutánsok szerkezete között. Mivel a mutánsok térszerkezete nem változott, cellulózkötő képességük azonban

kimutathatóan csökkent, feltételezhető volt, hogy a W22A, W24A az Y8A és a W7A mutációk ténylegesen a cellulózkötésben résztvevő aminosavakat érintették.

Az önmagában expresszált XylA enzim CBM10 moduljának W7A mutánsa azonban nem expresszálódott E. coli-ban, ami arra utalhat, hogy a W7-nek a modul térszerkezetének fenntartásában van/lehet szerepe. Így a W7A mutáns esetében az oldhatatlan cellulózkötő képesség elvesztése a modul térszerkezetének megváltozásával, nem pedig a cellulóz kötésben fontos aminosav elvesztésével van összefüggésben. Nem kizárt, hogy a W7A mutáció jelentős szerkezetbeli módosulást vagy nehézkes feltekeredését eredményez, így a modul szintézise után gyorsan degradálódik. Akkor azonban, ha a W7A mutációt tartalmazó CBM a katalitikus modullal együtt expresszálódik, a nagy katalitikus modul segítheti a feltekeredést, és/vagy a térszerkezet fenntartását, így megvédheti az instabil CBM-et a proteázoktól és a degradációtól és a nagy katalitikus domén elfedheti a CiDi spektrumban a kis modul szerkezetében beállt változásokat. Ahhoz, hogy eldöntsük, a W7-nek szerepe van-e a szénhidrát kötésében, vagy csak a W7A modul instabil szerkezete okozza az avicel kötő képesség csökkenését, meghatároztuk, hogy mely triptofánok találhatók a modul felszínén N-bromo-succinamide (NBS) segítségével. Elméletileg csak a molekula felszínén elhelyezkedő aromás aminosavak képesek a cukor gyűrűkhöz hidrofób kölcsönhatással kapcsolódni, és megfelelő koncentráció-tartományban alkalmazva az NBS is csak a felszínen lévő triptofánokkal képes reakcióba lépni. Ezek alapján az NBS-el reagáló felszíni

triptofánok száma megegyezik a cellulóz kötésben potenciálisan részt venni képes triptofánok számával. A triptofánok NBS-sel történő reakciója 280 nm-es hullámhosszon mért abszorbancia csökkenéssel követhető, és a kiindulási fehérjemennyiség ismeretében a fehérjemolekulánkénti reagáló triptofánok száma meghatározható. Ehhez azonban a CBM10 modult önmagában, a sok felszíni triptofánt tartalmazó CD domén nélkül kellett expresszálni.

Az expressziós vektorba klónozott, az expresszió során inclusion body-t képző vad és a mutáns CBM10 fehérjéket ureában feloldottuk, his-affinitás kromatográfiával tisztítottuk (**2.4.1.8. ábra**), és pH-4.5-ön foszfát pufferben refoldoltuk. A vad típusú és a mutáns fehérje ismert mennyiségéhez egyre növekvő mennyiségű NBS-t adtunk, és megmértük 280 nm-en a fehérjeoldat abszorbanciáját natív és denaturáló körülmények között. Denaturált állapotban minden triptofán hozzáférhető az



expresszált hisCBM10 modul tisztítása. WT: vad típus; W22A és W24A a megfelelő pontmutánsok; számok: molekulatömeg marker kDa

NBS számára, míg natív körülmények között csak a felszíni W-ok reagálnak. Megfelelő mennyiségű NBS hozzáadása után a Y-ok is reagálni kezdenek, és a 280 nm-en mért abszorbancia növekedni kezd, ezért a felszínen lévő triptofánok számának meghatározásakor az A₂₈₀ növekedése előtti utolsó értékek a mérvadóak (**2.4.1.9. ábra**).

A W22A és a W24A mutánsok esetében natív körülmények között CBM-enkén csak egy-egy, míg a vad típus esetében natív körülmények között kettő, denaturáló körülmények között pedig három triptofán reagált az NBS-el. Ezek alapján megállapítható, hogy a W7 nem elérhető az NBS számára, azaz nem a modul felszínén található, így a szénhidrát kötésben fizikailag sem képes részt venni.

A fentiek szerint az avicel kötő képesség változása alapján a Y12 nem vesz részt a szénhidrát kötésben. Az NBS titrálások alapján a W7 nem a modul felszínén van, azaz valószínűleg csak szerkezet összetartó funkciója van.



2.4.1.9. ábra. Felső panel: A hisCBM10 modul refoldolt fehérjéjéhez NBS fokozatos hozzáadása okozta A₂₈₀ érték változása. Alsó panel: az A280 érték és az abszolút mennyiségek alapján kalkulált módosított Trp száma hisCBM10 fehérje molekulánként.

WT natív: natív vad tipusú fehérje; WT denat: denaturált vad tipusú fehérje; W22A és W24A a megfelelő pontmutánsok natív körülmények között

mutáns avicel Az Y8A kötő képességének csökkenése alapján az Y8 részt vesz a szénhidrát kötésben, az NBS titrálások alapján a W22 és W24 a felszínen található, és az avicel kötő képességük csökkenése alapján részt vesznek a szénhidrát kötésben. Eredményeink tökéletes egyezést mutattak a fehérje időközben NMR-el meghatározott térszerkezete alapján várhatóakkal (2.4.1.10. ábra). A W24 a W22 a Y8 egy síkban helyezkedik el, ami lehetővé teszi a síkokba rendeződött kristályos cellulózlánchoz való hidrofób kapcsolódást. A Y12 és a W7 a modul belsejében helyezkedik el, és annak hidrofób belső részét alkotja, így a szénhidrát kötésben nincs szerepe. Az NMR szerkezet alapján az is nyilvánvalóvá vált, hogy a CBM10 modult a CBM2 és a katalitikus doménhez kapcsoló linker régió a CBM10 modul ligand kötési helyéhez viszonyított ellenkező oldalra esik.

Igy a CBM10 modul csak egy oldalán érintkezik a katalitikus domént és a CBM2 modult összekötő linker régióval. Ezek alapján feltételezhető, hogy a CBM10 modul szerepe az enzim szubsztráthoz történő kötése szempontjából "másodlagos egy horgony". А nagy affinitású CBM2 modul erősen köti az enzimet a cellulózhoz,



2.4.1.10. ábra. A modul NMR vizsgálatok alapján meghatározott 3D szerkezete. A: a vizsgált aromás aminosavak elhelyezkedése B: a felszínen egy síkban elhelyezkedő Trp22, Trp24 és Tyr8 aminosavak

míg a CBM10 gyengébb cellulózkötő affinitása a horgonypont körül szabadabb mozgást enged a xylanáz katalitikus doménnak, ami így a cellulóz régiók közötti xylán bontását nagyobb szabadsággal, de biztosan szubsztrát közelben végezheti.

Összefoglalva: A CBM10 oldhatatlan cellulózt kötő modul szubsztrát kötésben fontos aromás aminosavait azonosítottuk 5 konzerválódott aromás aminosav helyspecifikus mutagenezisével. A CBM10 család más tagjaiban is konzerválódott öt aromás aminosav alaninra cserélése a W7A, W22A, W24A és Y8A mutációk esetében jelentősen csökkentették a modul oldhatatlan cellulózkötő képességét, míg az Y2A mutáció nem befolyásolta azt. Bár a CBM-10 modult és a katalitikus domént is tartalmazó mutáns és vad típusú enzimek CiDi spektruma nem mutatott szignifikáns eltérést, a katalitikus domént nem tartalmazó CBM10-W7A mutáns nem expresszálódott E. coli-ban. Ez arra utalt, hogy a W7 a domén belsejében van, így a modul szerkezetének fenntartásában vesz részt és nem a cellulóz kötésben. Ahhoz, hogy meghatározzuk, hogy hány, a cellulóz kötésére képes triptofán van az általunk vizsgált CBM10 modul felszínén NBS (N-bromo-succinamide) segítségével meghatároztuk a reagálni képes, felületi triptofánok számát, denaturáló és natív körülmények között a vad típusú és a W22A illetve W24A mutánsok esetében. Denaturáló körülmények között a vad típusú CBM10 modul mindhárom triptofánja reagált az NBS-el, még natív körülmények között csak kettő. A W22A és a W24A mutánsok két triptonfánja közül natív körülmények között csak egy-egy triptofán reagált az NBS-sel. Ezek alapján következtetésünk az volt, hogy a Y8, W22 és W24 aromás aminosavak vesznek részt a cellulózkötésben, hiszen az Y12 alaninra cserélése nem befolyásolta a CBM10 modul cellulózkötő képességét, a W7 pedig nem a kötő domén felszínén található. Ezeket az eredményeinket a CBM10 modul időközben NMR-rel megfejtett 3D szerkezete is tökéletesen alátámasztotta. A 3D szerkezet alapján a W22, W24, Y8 aromás gyűrűi a modul felszínén, egy síkban helyezkednek el, lehetővé téve az ugyancsak síkban elhelyezkedő oldhatatlan cellulóz láncok glükóz egységeinek megkötését.

További részletek:

Ponyi T, Szabo L, Nagy T, Orosz L, Simpson PJ, Williamson MP, Gilbert HJ (2000) Trp22, Trp24, and Tyr8 play a pivotal role in the binding of the family 10 cellulose-binding module from Pseudomonas xylanase A to insoluble ligands. Biochemistry. 8;39(5):985-91.

Raghothama S, Simpson PJ, Szabo L, Nagy T, Gilbert HJ, Williamson MP. (2000) Solution structure of the CBM10 cellulose binding module from Pseudomonas xylanase A. Biochemistry.39(5):978-84.

2.4.2. A GH10-es családba tartozó xylanáz F jellemzése



2.4.2.1. ábra A XylF enzim moduláris struktúrája.
 CBM15: 15-ös családba tartozó szénhidrát kötő domén;
 GH10: 10-es családba tartozó katalitikus domén

A *Pseudomonas fluorescens* XylF enzimje egy GH-10 családba tartozó katalitikus doménből és egy CBM15 családba tartozó szénhidrát kötő doménből épül fel (**2.4.2.1. ábra**).

A rendkívül népes GH-10 katalitikus domén család több tagjának (α/β)₈ szerkezete, katalitikus aminosavai, és különböző szubsztrát jelenlétében történt kristályosítások alapján a szubsztrát, illetve inhibitorok kötésében résztvevő aminosavak pozíciója és szerepe már ismert. (Pickersgill et al. 1993; Viswamitra et al. 1993; Derewenda et al. 1994; Harris et al. 1994: Souchon et al. 1994; White et al. 1994; Dominguez et al. 1995; Jenkins et al. 1995; Notenboom et al. 1998; Schmidt et al. 1998; Kaneko et al. 1999; Lo Leggio, 1999; Natesh et al. 1999; Schmidt et al. 1999; Notenboom et al. 2000).

A CBM15 előtt egy ismeretlen funkciójú linker szerű szekvencia található, amit a szignál peptid előz meg. A CBM15 és a katalitikus domén között a fehérje elsődleges szerkezete alapján nem azonosítható olyan szerinben/treoninban gazdag linker szekvencia, ami a glikozil-hidroláz enzimek jelentős többségében a katalitikus doméneket és a szénhidrát kötő doméneket flexibilisen összekapcsolja. A flexibilis kapcsolat hiánya funkcionális kapcsolatra utalhat, hasonlóan a *Thermonospora fusca* celluláz E4 enziméhez, ahol a GH9 katalitikus domén katalitikus árkának meghosszabbítását alkotja a CBM3c szénhidráthidrát kötő árka és így a szénhidrát kötő modul a katalitikus domén szubsztráttal való ellátásában vesz részt (**Sakon et al. 1997; Irwin et al. 1998**).



2.4.2.2. ábra. A CBM15+GH10 fúziós modulok tisztítása.
A: M: molekula tömeg marker; 1: his affinitás kromatográfia után; 2: ioncserélő kromatográfia után; 3: gélfiltráció után
B: ioncserélő kromatográfia kromatogramja; C: gélfiltráció kromatogrammja (B,C részábra: bal oldali tengelyen: eluátum A₂₈₀ elnyelés változása, jobb oldali tengelyen sókoncentráció változása)

Az egyelőre két tagot számláló CBM15 család tagjainak 3D szerkezete még nem ismert, de avicel kötő képessége alapján - korábbi publikációk _ cellulózkötő modulként azonosították (Millward-Sadler et al. 1995). A XvlF enzim CBM-15 szubsztrát modul specifikusságának részletesebb vizsgálata alapján azonban a XylF-CBM15 nem cellulóz hanem egy oldható-xylán kötő domén, mivel affinitás gél elektroforézis alapján: nem kötődik oldhatatlan xylánhoz, Avicel-hez, ASC (acid swallen cellulóz)-hez és BMCC (bacterial microcrystalline cellulose)-hoz, jól kötődik azonban xylohexózhoz, xylopentózhoz, oldható zab-arabinoxylánhoz, kevésbé xylotetrózhoz, búza-arabinoxylánhoz és rozsarabinoxylánhoz, mérsékelten β-glükánhoz és kimutathatóan HEC alig (hydroxy ethil

cellulose)-hoz. Ezen eredmények alapján valószínűsítették, hogy a XylF-CBM15 kötőhelyéhez öt cukorból felépülő, elágazást és oldalláncot nem tartalmazó xylopentóz molekula illeszkedik a legjobban, de az oldalláncokkal rendelkező xylán vázas szubsztrátokhoz történő kötődés is jelentős (**Xie, 2001**).

Célunk az volt, hogy meghatározzuk a CBM15 3D szerkezetét, és ez alapján magyarázatot keressünk a különböző szubsztrátokhoz való kötési affinitások közötti eltérésére, és ha a CD és CBM közötti kapcsolat nem flexibilis, akkor megállapítsuk a CBM15 modul katalitikus doménhez viszonyított helyzetét.

A pET21a vektor *NdeI-XhoI* helyére klónozott CBM15 és GH10 modult egyaránt kódoló DNS fragmentről a fehérjét expresszáltattuk, His affinitás kromatográfiával, anion cserélő

kromatográfiával és gélszűréssel homogenitásig tisztítottuk (**2.4.2.2. ábra**) és ddH₂O-ban 18 mg/ml koncentrációjúra töményítettük.

A fehérjét két koncentrációban Hampton Screen I és 100 mM HEPES-Na pH=7.5 puffer jelenlétében Marek Simple és Marek PEG/Salt screen-eken próbáltuk meg kristályosítani. A tesztelt



2.4.2.3. ábra. A CBM15 és GH10 fúziós fehérje kristálya

kondíciók közül egyik sem eredményezett kristályokat. Ezért a Marek screeneket 100 mM Tris puffer pH=9.0 jelenlétében megismételtük. Egy hét elteltével a Marek PEG/Salt screen 10, 11 és 17-es kondícióiban apró, lapszerű kristályok képződtek, amelyek méretük és alakjuk miatt alkalmatlanok voltak a szerkezet meghatározásra (**2.4.2.3. ábra**). A 11 kondíció apró, lapszerű kristályait használva a KSCN és KBr sók illetve PEG 4K és PEG8K+PEG10K precipitáló anyagok illetve különböző pH-jú Tris puffer (7.5-9.5) alkotta grid screen-en a seeding-et követően pár nap múlva az 50 mM Tris pH=8.0, 0.2 M KSCN és 15 % PEG 4K kondícióban egy nagy lapszerű kristály fejlődött, ami már alkalmas volt a szerkezet meghatározásra. A diffrakciós adatokat Franciaországban a grenoble-i szinkrotronban összegyűjtötték és a Yorki

Egyetem Structure Biology tanszékén feldolgoztuk. Mivel több, elsődleges szerkezet alapján hasonló (>60%) GH10 katalitikus domén szerkezete ismert, molecular replacement-tel lehetséges a katalitikus domén szerkezetének megfejtése, majd a



2.4.2.4. ábra. A hXBD kristálvosítása. A: HR6: B: HR17: C: HR22 kondíciók kristálvai

kész katalitikus domén adataiból generált fázisok felhasználásával elméletileg megfejthető az ismeretlen szerkezetű CBM15 szerkezete is. A molecular replacement kiinduló, hasonló 3D szerkezete a *Pseudomonas fluorescens* Xyn10A enzimjének katalitikus doménje volt (1CLX.pdb). A XynF katalitikus domén sikeres megépítése után azonban az N-terminálisához kapcsolódó CBM15 szerkezetének felderítése nem sikerült, mert a CBM15 pozíciója nem volt jól definiált a kristályban, így az elektrondenzitás adatok alapján a CBM15 molekula csak 1/3 részét lehetett megfelelő pontossággal összerakni. Mivel a katalitikus domén aminosavainak elektrondenzitása jól

definiált volt, és csak a CBM15 régió nem produkált jól definiált elektrondenzitás adatokat, nagyon valószínű, hogy a CBM15 flexibilisen kapcsolt a katalitikus doménhez, így annak nem alkothatja funkcionális részét. Az adatok alapján világossá vált az is, hogy a CBM15 modul ebben a kristályformában sosem lesz egy jól definiált pozícióban. Más kristályforma azonban nem állt rendelkezésre. Megpróbáltuk а CBM15-öt önmagában kristályosítani, és a CBM15-CD szerkezet meghatározása során nyert információ felhasználásával (CBM15 1/3 része) molecular replecament-tel a CBM15 teljes szerkezetét meghatározni.

Ehhez a XylF enzim CBM-15 moduljának PCR amplifikált régióját az *NdeI-Bam*HI restrikciós endonukleázokkal hasított pET16b vektorba



2.4.2.5. ábra A 15 mM xylohexóz jelenlétében kristályosított CBM15 modul szerkezete. A kötőárokban a xylotetróz (X4) és a kötésben résztvevő Trp (W86 és W91) láthatók

klónoztuk és az N-terminális His tag-gel rendelkező CBM15 fehérjéket (hXBD) expresszáltattuk és homogenitásig tisztítottuk His affinitás kromatográfiával majd gélszűréssel. Mivel a fehérje kicsapódott ddH₂O-ban, ezért a tisztítást követően 5 mM Tris pH=8.0 pufferben 15 mg/ml koncentrációra töményítettük és két koncentrációban Hampton Screen és Hampton PEG/ion screenen próbáltuk kristályosítani. A Hampton PEG/Ion screen 9-es kondíciója olyan kétdimenziós kristályokat eredményezett, amit nem tudtunk tovább optimalizálni. Mivel ilyenkor gyakran csak a körülmények drasztikus megváltoztatása hoz eredményt, az N-terminális His tag-et tartalmazó CBM15-öt 15 mM xylopentóz jelenlétében screen-eltük az összes rendelkezésre álló kondícióban. A Hampton screen 6, 17 és 22-es kondíciójában 48 óra elteltével kristályok kezdtek formálódni (**2.4.2.4. ábra**). A 6-os kondíció tűszerű és a 17-es kondíció gyorsan tönkremenő kristályai nem bizonyultak használhatónak, de a 22-es kondícióban több kristály screen-elése során találtunk egy olyan kristályt, melynek mérete és több irányból mért diffrakciója is megfelelőnek bizonyult a szerkezet meghatározáshoz. A kristály diffrakciós adatait a franciaországi Grenoble szinkrotronban összegyűjtötték, és a korábban meghatározott 1/3 CBM15 molekula ismert szerkezetét felhasználva molecular replecament-tel a teljes molekula 3D szerkezetét Dr. Davies G. J. meghatározta.

A CBM15 szerkezete (**2.4.2.5. ábra**) tipikus β -jelly-roll, tartalmaz egy Na⁺ iont és a szubsztráttal való együtt kristályosításnak köszönhetően egy xylotetróz molekulát. A xylotetróz csavarodik, minden egység ~120°-kal fordul el az előtte lévőhöz képest (**2.4.2.6. ábra**). Ez a szerkezett lényegében megegyezik a korábban feltételezett, energetikailag leginkább kedvező xylóz szerkezettel (**Atkins, 1992; Simpson et al. 1999**).



A nem redukáló vége felől számított második xylóz molekula (X2) a Trp86-tal, a negyedik xylóz molekula (X4) a Trp91-gyel alakít ki hidrofób stacking kölcsönhatást (**2.4.2.7. ábra**). H híd kötés kialakulhat az X2-C2OH és Gln81 OE1 csoportja, az X2-C1O és Gln81 NE2 csoportja, az X2-C2OH és Asn16 ND2, az X2-C3OH és Asn16 OD1 csoportja, az X2-C3OH és a Gln127 NE2 csoportja között. Az első (X1) és a harmadik (X3) molekulák nem alakítanak ki hidrofób stacking kölcsönhatást a szénhidrát kötő fehérjével, az első (X1) xylóz molekula egyáltalán nem, a harmadik xylóz

molekula (X3) pedig csak egyetlen egy közvetlen H-híd kölcsönhatással rögzített a CBM-hez. A

szerkezet alapján a legstabilabb a Trp86-tal hidrofób stacking kölcsönhatást kialakító és valószínűleg H hidakkal is rögzített X2 molekula. A xylán vázhoz esetenként α -1,2 vagy α -1,3 kötéssel akár több tagból álló arabinóz oldallánc vagy α -1,2 kötéssel glükoronsav kapcsolódhat, illetve a xylán váz acetilált lehet a C2 vagy C3 pozícióban. Az X2 cukor molekula sem C2-OH sem C3-OH – ja nem tartalmazhat nagy oldalláncot szterikus okok miatt, viszont a többi cukormolekulához kapcsolódhat nagyobb oldallánc, hiszen C2-OH és C3-OH csoportjuk a komplexben a kötő



2.4.2.7. ábra. A szubsztrát kötésében résztvevő aminosavak

doméntől elállnak. Ezek alapján arabinoxilán polimer kötése esetében az X2 pozícióban nagy oldalláncot nem tartalmazó xylóz molekulának kell kerülnie, míg a többi pozícióban a szubsztrát tartalmazhat oldalláncot. Ez megmagyarázza, hogy hogyan képes a CBM15 a különböző oldalláncot is tartalmazó xylánok megkötésére, és miért köt jobban kevés oldalláncot tartalmazó xylánt (zab-arabinoxylán) mint több oldalláncot tartalmazó rozs- és búza- arabinoxylánt.

A CBM15 családnak eddig csak két tagját azonosították (*P. fluorescens* Xyn10F és *C. mixtus* Xyn10A). Az ábrán (**2.4.2.8. ábra**) a két domén hasonlósága a kék részeken tökéletes, a zöld sárga piros irányban pedig egyre kisebb mértékű. Feltűnő, hogy a kötő árok alját képző, a lehetséges H híd kötések kialakításában résztvevő aminosavak és a W91 a két doménben konzerválódott, míg a

kötőárok oldalát alkotó aminosavak nem konzerválódtak. A W86 helyett a CmXyn10A CBM15-ben



2.4.2.8. ábra. A CBM15 család két eddig ismert tagjának homológia modellje. X4: xylotetróz molekula; ASGS: a szubsztrát kötő árok oldalát alkotó, a *C. mixtus* CBM15-ből hiányzó hurok szerkezet.

nagyobb oldallánc jelenlétét tolerálja.

a megfelelő pozícióban tirozin található, ami elvileg ugyanúgy képes a második xylóz egység kötésére, mint a triptofán. A kötő árok másik oldalát alkotó Ala17 metil csoportja, Ser18, Gly19, Ser20 aminosavak felépítette hurok (ASGS) a CmXyn10A CBM15 esetében lényegében hiányzik. Ez a hiány az X3 pozícióban lévő szubsztrát alegységnek és az arról lelógó oldalláncoknak még nagyobb szabadságot enged, így feltételezhető, hogy a CmXyn10A enzim CBM15 modulja az X3 xylóz molekulán még több. illetve

A Na⁺ pozícionálásában az Asn64 ND2 csoportja, a Val65 és az Ala102 karboxil csoportja vesz

részt (**2.4.2.9. ábra**). A Na⁺ kötődési helye a szubsztrát kötés helyétől távol helyezkedik el, és szerepe a szubsztrát kötésben, vagy a térszerkezet fenntartásában nem valószínű, nem kizárható, hogy kristályosítási műtermék.

Bár a kristályszerkezetből a katalitikus domén és a xylán kötő modul egymáshoz viszonyított helyzetét teljes bizonyossággal nem lehetett megállapítani, a rendelkezésre álló elektrondenzitás adatok alapján nagyon valószínű, hogy a CBM15 kötő árka nem képzi a katalitikus domén katalitikus árkának folytatását, és így nem a katalitikus domén szubsztráttal való táplálásában segít. A CBM15 elmosódott

V65 N64 A102 2.4.2.9. ábra. A Na⁺ pozicionálásában résztvevő aminosavak

elektrondenzitása azt sejteti, hogy a katalitikus doménhez egy rövid, de flexibilitást biztosító linker szekvenciával kapcsolódik, és így a xylán degradálására specializált katalitikus domént a növényi sejtfal xylánt tartalmazó részeihez "horgonyozza". Sok xylanázban a katalitikus domén cellulóz kötésére specializált szénhidrát kötő modulhoz (CBM1, CBM2a, CBM3, CBM12, CBM13) kapcsolódik (**2.4.2.10. ábra**), és a kapcsolat az enzimek többségében egy 20-30 aminosavból álló, többségében szerin és treonin alkotta, flexibilis linker szekvencián keresztül valósul meg. A xylanáz

<mark>xylanase XynA</mark> Caldibacillus cellulovorans	1 32 33 <u>CBM22185 101 CH10 171</u> 522 562 563 <u>CBM3712</u> 713 769 770 <u>CBM3</u> 021
<mark>xylanase XynC</mark> Bacillus sp. BP-23	120 22 CBM22137 103 CBM22369 100 GH10 110 720 CBM9599 000 CBM91086
<mark>xylanase</mark> Humicola grisea	119 01 CH10 124 245 393 294 CBM1 429
<mark>xylanase A Xyn10A</mark> Pseudomonas fluorescens	126 27 CBM2 131 179 130 CBM10 226 227 259 550 CH10 651
<mark>xylanase B</mark> Pseudomonas fluorescens	1 38 30 CBM2 134 135 137 1 58 X4 399 300 320 11 GH10 59.
<mark>sylanase F</mark> Pseudomonas fluorescens	1 20 21 23 29 CBM15 ₂₄₀ 40 GH10 40
9 <mark>-1,4-xylanase</mark> Streptomyces olivaceoviridis F-86	GH10 304313 314CBM13436

katalitikus modulok és a xylán kötő képességgel is rendelkező modulok között (2b, 9, 15, 22) ez a hosszú és szekvencia alapján nyilvánvaló linker régió gyakran hiányzik. Ennek az oka valószínűleg az, hogy a xylán kötő domén a xylanáz katalitikus domént a szubsztrátja közelébe horgonyozza le. Ezzel szemben a cellulózkötő

2.4.2.10. ábra. A GH10 családba tartozó katalitikus modult tartalmazó xylanázok moduláris szerkezete

modulokhoz kapcsolódó xylanáz katalitikus domén cellulóz szálhoz, vagy a kristályos cellulóz felszínéhez kapcsolódik, és így a cellulózhoz kötött xylanáz katalitikus doménnek meg kell keresnie saját xylán szubsztrátját, amihez nagyobb térbeli szabadság szükséges.

A *P. fluorescens* XylF GH10 (PfXyn10F) katalitikus modulja 60 %-os szekvencia hasonlóságot mutat a biokémiailag és strukturálisan is nagyon jól jellemzett *P. fluorescens* XylA GH10 (PfXyn10A) katalitikus moduljával (**Charnock et al. 1997; Charnock et al. 1998; Andrews et al. 2000**). A xylopentóz (**Lo Leggio et al. 2000**) és a katalitikus aminosavhoz kötött dezoxynojirimicin inhibitor (**Notenboom, 2000**) jelenlétében kristályosított XylA enzim szerkezeteket egymásra vetítve és az újonnan meghatározott XylF katalitikus modulhoz illesztve lehetővé vált a XylA



enzim vizsgálata során a szubsztrát kötésben és a xylán hidrolízisében esszenciálisnak talált aminosavak azonosítására a XylF enzim esetében is ábra). (2.4.2.11. А szubsztrát hasítási pontjától számított +1 +2 +3 +4 pozícióban lévő alegységek xylóz kötésében résztvevő aminosavak között nincs számottevő különbség. A +3-as pozícióban lévő xylóz alegységgel kölcsönható XylA esetében tirozin (Y255), a

2.4.2.11. ábra. A PfXyn10F katalitikus domén szubsztrátkötésben és hasításban szerepet játszó aminosavainak és a szubsztrát helyzete a XynA és XynF esetében

XylF esetében pedig hisztidin (H264) található. A hisztidin gyűrűje a tirozin aromás gyűrűjével lényegében egy síkban helyezkedik el. A XylA molekulában a tirozin szerepét vizsgálva arra a következtetésre jutottak, hogy a tirozin aromás gyűrűje hidrofób stacking kölcsönhatást alakít ki a +3-as xylóz alegységgel, mivel az -OH csoport hiánya vagy jelenléte nem befolyásolja a xylotetróz hidrolízisét, azaz nem alakít ki H híd kötést a +2-es pozícióban lévő xylóz alegységgel (**Charnock et al. 1998**). Mivel a hisztidin nem igazán alkalmas hidrofób stacking kölcsönhatás kialakítására, és a +3 xylóz alegység és a Y vagy H gyűrűk síkjai nagyjából 90°-os szöget zárnak be egymással, valószínűnek látszik, hogy a xylóz és Y vagy H között a kölcsönhatás nem hidrofób stacking. A Y illetve H a kötő árok falát alkotják térbelileg limitálva a +3 xylóz pozícióját, így a +1 és +4-es pozícióban hidrofób stacking kölcsönhatással rögzített xylóz láncot a kívánatos konformációban tartják.

A XylF fehérje Asn196 aminosava a XylA enzim Glu185 aminosavához hasonlóan a 3. xylóz alegység C2-OH-jával alakít ki H-híd kötést. A XylF Tyr192 ugyanúgy hidrofób stacking kölcsönhatást alakít ki az +1-es pozícióban lévő xylóz alegységgel, mint a XylA Phe181. A Xyl10 Glu143 és Glu255 feltételezett katalitikus aminosavainak helyzete megegyezik a XylA Glu127 acid-base és Glu246 nukleofil katalitikus aminosavak pozíciójával.

A xylobióz-szerű inhibitor jelenlétében kristályosított XylA enzim szerkezete (Notenboom, 2000)



2.4.2.12. ábra. A –1 és –2 helyen lévő aminosavak helyzete a XynA és XynF esetében.

szubsztrát kötő helyének kialakításában szembetűnő a XylA enzim hosszú oldalláncú Glu43 aminosav és a XylF enzim vele ekvivalens pozíciójában lévő oldallánc nélküli Gly53 aminosav közötti eltérés. Ha a XylA enzim Glu43 aminosavát alaninra cserélték, akkor az enzim PNPC (p-Nitrophenyl β-D-cellobiozid)-vel szembeni aktivitása jelentősen csökkent (**Charnock et al. 1997**). Ezek alapján az volt várható, hogy a XylF enzim a PNPC szubsztrátot (**2.4.2.13. ábra**) a XylA E43A mutánshoz hasonlóan csökkentett hatékonysággal képes csak bontani. Az elmélet igazolására azonos mennyiségű XylA és



és a XylA enzim különböző hosszúságú, végjelölt szubsztrátok hasítási mintázata alapján (Charnock et al. 1997; Charnock et al. 1998) a -2 és az eddig csak mérések alapián feltételezett -3-as helyen kötődő xylóz alegységeket adott pozícióban tartó Asn44 és Lys47 aminosavaknak megfelelő XylF Asn54 és Lys57 aminosavak helyzete és funkciója megegyezik (2.4.2.12. ábra). A XylA enzim Trp83 aminosavával megegyező pozícióban lévő XylF Trp94 a Glu127 1 Glu143 acid-base megfelelő aminosav pozícióban tartásáért a -1 -2 xylóz és kötőhely térbeli kialakításáért felelős. A XylA és XylF enzimek



2.4.2.13. A PNPC szerkezete

XylF enzim PNPC hidrolizáló aktivitását hasonlítottuk össze a 400 nm-en mért PNP (4nitrofenol) felszabadulás alapján. Eredményeink (2.4.2.14. ábra) azt mutatják, hogy a XylF enzim PNPC hidrolizáló aktivitása elenyésző volt a XylA enzim aktivitásához képest. **XylA** E43A А mutánsban és a XylF enzimben a PNPC aktivitás csökkenése a fehérjék Glu43 OE2 csoportja és a -2-es pozícióban kötődő xylán alegység C2-OH csoportja között kialakuló H híd

hiányával, és így a csökkent mértékű szubsztrát kötéssel magyarázható.

Összefoglalva: Epresszáltattunk és kitisztítottuk a katalitikus domént, és a xylóz kötő CBM15 modult tartalmazó *P. fluorescens* Xyn10F fehérjét. Az enzimet kristályosítottuk, és a 60 %-ban hasonló PsXyn10A már korábban ismert szerkezete alapján, molecular replacement-tel meghatároztuk a katalitikus domén szerkezetét. Mivel a CBM-15 pozíciója nem volt jól definiált a fehérje kristályban, a katalitikus modul fázisainak felhasználásával a katalitikus doménhez

kapcsolódó, xylán kötő modul szerkezetének csak 30 %-át lehetett felépíteni. Ez alapján bizonyossá vált, hogy a kimutatható linker szekvencia hiánya ellenére sem képzi a CBM-15 a katalitikus modul szerves részét. A CBM-15 meghatározott 3D szerkezete azonban elégnek bizonyult az önmagában expresszált és xylohexóz jelenlétében kristályosított CBM15 teljes szerkezetének megfejtéséhez (1GNY.pdb). A CBM15 modulban láthatóvá vált négy xylóz alegység csavarodott szerkezete, ami az első vizuális bizonyítéka a xylóz lánc eddig csak modellezésen alapuló, egységenként 180°-os elfordulást mutató, feltételezett szerkezetének. Meghatároztuk a CBM15 modul szubsztrát kötésben résztvevő aminosavakat, és magyarázatot találtunk arra, hogy miért képes a modul az oldalláncokat is tartalmazó xylánok kötésére is.

A PsXyn10F (XylF) katalitikus domén szerkezetét összehasonlítottuk a biokémiailag és struktúrálisan is jól jellemzett PsXyn10A (XylA) katalitikus domén és annak xylopentózt illetve dezoxynojirimicint tartalmazó korábban meghatározott szerkezetével. A szerkezetek egymásra illesztése után összehasonlítottuk a szubsztrát kötésben és a xylán hidrolízisében résztvevő aminosavakat. Az egyetlen jelentős eltérés az volt, hogy a XylA enzimjének Glu43 aminosavát a XylF enzimben egy kis térigényű glicin helyettesítette. Korábbi vizsgálatok alapján a XylA Glu43 alaninra cserélése jelentősen redukálta a XylA enzim aktivitását PNPC-vel szemben, így feltételezhető volt, hogy a XylF enzim PNPC hidrolizáló képessége is alacsony. A XylA és a XylF enzimek PNPC aktivitásának összehasonlítása feltételezésünket igazolta.

További részletek:

Szabo L, Jamal S, Xie H, Charnock SJ, Bolam DN, Gilbert HJ, Davies GJ. (2001) Structure of a family 15 carbohydrate-binding module in complex with xylopentaose. Evidence that xylan binds in an approximate 3-fold helical conformation. J Biol Chem. 2001 Dec 28;276(52):49061-5.

2.4.3. A CBM29 család jellemzése

A *Piromyces equi* bendő szimbionta gomba növényi sejtfal-bontásában résztvevő multienzim komplexének enzimatikus aktivitással nem rendelkező építőelemeinek izolálásakor egy különböző

								olullato	C2
	1 1	10	00	200	300	400	1 22	0	ldhatatlan
			•	•		· ·	<u> </u>	szénhie	drátokhoz
CalC		1						egyaránt	kötődni
CelC								képes	CelC
	Ι	II	III	CBM	A 29-1	CMB	29-2	fehérjét	izoláltak
2.4.	.3.1. ábra	• A CelC	fehérje m	oduláris szerke	ezete. I, II és I	I: feltehetően	dokerin	(2.4.3.1.	ábra). A
mo	odulok; Cl	BM29-1	és CBM29	-2: cellulózkö	tő domének; V	onalak: linker	régiók	fehérie	N-

terminálisán a szignál szekvenciát követően a dokerin modulokhoz hasonló, három egymással több mint 50 % hasonlóságot mutató, feltehetően a kohezinhez kötődő egység helyezkedik el (I, II, III). A dokerinek után elhelyezkedő két modul (CBM29-1, CBM29-2) egymással 37 %-ban hasonló, de semmilyen más, eddig ismert fehérje szekvenciával nem mutat számottevő hasonlóságot. A modulok funkcionális vizsgálata bebizonyította, hogy ezek az elemek felelősek a CelC fehérje szénhidrát kötéséért. Mivel a modulok semmilyen eddig ismert szénhidrát kötő modullal nem mutattak hasonlóságot, egy új szénhidrát-kötő modul családba, a CBM-29-be sorolták őket. (átmenetileg a CBM-27 családba tartoztak) A modulok egyedi vizsgálata azt mutatta, hogy mindkét modul ugyanazokhoz a szubsztrátokhoz mutat affinitást (galaktomannán, β -glükán, hidroximetilcellulóz, karboximetil-cellulóz, arabinoxylán), de a CBM29-1 modul affinitása minden szubsztrát esetében több nagyságrenddel kisebb volt mint a CBM29-2 modul esetében mért szubsztrát-kötő képesség. Kompetíciós szubsztrát kötő kísérletek bebizonyították, hogy a CMB29-2 modul egy szénhidrát kötőhelyet tartalmaz, és a szénhidrát kötés valószínűleg a modul felszínén elhelyezkedő árokban történik (**Freelove et al. 2001**).

Vizsgálatunk célja az volt, hogy meghatározzuk a CBM29-2 modul térszerkezetét és azonosítsuk a különböző szubsztrátok kötésében résztvevő aminosavakat.

A pET22b (**Novagen**) vektorba *Nde*I - *Xho*I helyre klónozott CBM29-2 modult expresszáló konstrukciót *E. coli* Jm83 (DE3) törzsben expresszáltattuk, His-affinitás kromatográfiával majd UNO-Q12 anion cserélő oszlopon (**BIO-RAD**) a fehérjét homogenitásig tisztítottuk, Tris pH=8.0 pufferrel szemben dializáltuk, és végül ddH₂O-ban 20 mg/ml végkoncentrációban töményítettük. Az így előkészített fehérjeoldatot két koncentrációban Hampton screen I, Marek Simple és Marek PEG/Salt screen-eken próbáltuk kristályosítani. Tizenkét óra eltelte után a Hampton screen 17, a



 2.4.3.2. ábra. A CBM29-2 modul 3D szerkezete.
 A kötőárok és a szénhidrát kötésben feltételezhetően résztvevő aromás aminosavak.

Marek Simple screen 18, 19, 22, 23, 24 és a Marek PEG/Salt screen 1, 4, 5, 10, 16, 19 és 22-es kondíciójában tetragonális fehérje kristályok jelentek meg. A 30 %-os izopropanolban (Marek Simple 19-es kondíció) létrejött kristály 2.3 Å diffraktált, és a tetragonális kristályok alkalmasaknak bizonyultak a szerkezet meghatározásra.

A 3D térszerkezet gyors meghatározásának egyik módja a 3 különböző hullámhosszon eltérő módon diffraktáló elemek (pl.: Se) beépítése a fehérje molekulába. Így egy kísérletben, 3 hullámhosszon összegyűjtött diffrakciós adatokból a beépített elemek pontos helye kiszámolható, amiből a kezdeti fázisok meghatározhatók, és ezen kezdeti fázisok felhasználásával a kapott elektrondenzitás adatokból az adott fehérje térszerkezete felépíthető. A S helyett Se-t tartalmazó metionint *E. coli* B834 metionin auxotróf törzs segítségével a fehérje molekulákba építettük, a korábban leírtaknak megfelelően kitisztítottuk, és a szeléniummetionint tartalmazó fehérjét a Marek Simple screen 22, 23 és 24 kondíciójában 100 mM HEPES pH=7.4 pufferben 20 %-os glicerol jelenlétében kristályosítottuk. Egy megfelelő méretű kristály három különböző hullámhosszon mért diffrakciós adatait a franciaországi Grenoble szinkrotronban összegyűjtötték, és az adatokból a Yorki Egyetem Structure Biology tanszékén a fehérje térszerkezetét Dr. Charnok, S. J. meghatározta.

A CBM29-2 modul (**2.4.3.2. ábra**) szerkezete klasszikus β-jelly roll, és az előrejelzéseknek megfelelően megtalálható benne a mindkét CBM29 modulban konzerválódott aromás aminosavakat tartalmazó árok-szerű képződmény, ami a szubsztrát kötésében játszik szerepet. Ahhoz, hogy a szubsztrát kötésben résztvevő aminosavak egyértelműen azonosíthatók legyenek, megkíséreltük a CBM29-1 modult szubsztrát jelenlétében is kikristályosítani.

Korábbi ITC vizsgálatok (**Bolam, D. N.**) azt mutatták, hogy a CBM29-2 modul a cellohexózt ($K_a \sim 10.1 \times 10^3 M^{-1}$) körülbelül négyszer olyan jól köti, mint a mannohexózt ($K_a \sim 2.5 \times 10^3 M^{-1}$). Hexóznál kisebb cukor polimerek esetében a kötés mértéke jelentősen csökken. Xylohexózhoz való kötés nem volt kimutatható. A hidroxietil cellulózhoz való affinitás ($K_a \sim 14.3 \times 10^3 M^{-1}$) megegyezett a cellohexóznál mért értékkel, azonban a CBM29-2 modulnak mind a konjac glükomannánhoz ($K_a \sim 180 \times 10^3 M^{-1}$), mind a karob-galaktomannánhoz ($K_a \sim 19.9 \times 10^3 M^{-1}$) nagyobb volt az affinitása, mint mannohexózhoz. A CBM29-2 modul a xylózhoz nem mutatott mérhető affinitást. A mérések alapján egyértelmű, hogy a mannózt és glükózt keverve tartalmazó glükomannánhoz legnagyobb a CBM29-2 affinitása.

A glükomannán váltakozva, átlagosan 3:1 arányban β -D-1,4 mannóz és β -D-1,4 glükóz alegységekből épül fel. A glükóz és mannóz alegysége között csak a pirán váz 2. szénatomjához kapcsolódó-OH csoport helyzetében van különbség (**2.4.3.3. ábra**). Ezek alapján az ideális szubsztrát a hexo-glükomannán lett volna, azonban ilyen nem állt rendelkezésre, ezért a még jól kötődő szubsztrátok közül a cellohexózt és a mannohexózt próbáltuk ki.



2.4.3.3. ábra. A glükóz és a mannóz szerkezete. Sárga nyíl a pirán váz 2. szénatomjához kapcsolódó OH csoport helyzetének eltérését mutatja.

A korábban kristályokat eredményező kondíciók egyikében sem fejlődtek kristályok 15 mM mannohexóz (M6) vagy 15 mM cellohexóz (C6) jelenlétében, a rendelkezésünkre álló kristályszerkezetben pedig lehetetlen volt a szubsztrát megkötődése a szubsztrátkötő árokban, mivel egy-egy molekula hidrofób felületei, azaz a szubsztrát kötő árkok aromás aminosavai egymással



2.4.3.4. ábra. A CBM29-2 molekula szerkezete cellohexóz jelenlétében. G6: cellohexóz molekula

alakítottak ki hidrofób kölcsönhatást. Ezért olyan kondíciót kellett keresni. ahol a fehérie molekulák egymáshoz a rendelkezésünkre viszonyított helyzete eltért álló tetragonális szerkezettől. Mivel a Tris pH=8.0 pufferben tisztított fehérje rengeteg kondícióban eredményezett kristályszerkezetet, egyforma más pufferben (foszfát pufferben pH=7.0) tisztítottuk ki a CBM29-2 fehérjét. A Hampton screen, Hampton Research PEG/ION screen, a Marek Simple és Marek PEG/SALT screen kondícióit két fehérje koncentrációban és 15 mM mannohexóz, 15 mM cellohexóz és 10 mM xylohexóz jelenlétében teszteltük. A Hampton Research PEG/ION screen-jének 3, 4, 15, 22, 23 és 24 kondíciója mannohexóz jelenlétében hexagonális, a 31-es kondíció cellohexóz jelenlétében pedig lapszerű kristályokat eredményezett. Mivel a szubsztrátot nem tartalmazó CBM29-2 modul 3D szerkezete rendelkezésre állt, az egy hullámhosszon összegyűjtött diffrakciós adatokból molecular replacement-el а fehérje molekulák szerkezete meghatározható, és a szubsztrát kötő árokban esetlegesen megjelenő cukor-multimer alakú elektrondenzitás alapján a

szubsztrát felismerhető. A 2.8 Å-mel diffraktáló hexagonális kristályok képződéséhez- bár szükség volt a M6 jelenlétére- nem tartalmazták a szubsztrátot, mivel a tetragonális kristályokhoz hasonlóan egy-egy fehérje szubsztrát kötő árkának aminosavai egymással alkottak hidrofób kölcsönhatást. A cellohexóz jelenlétében képződött lapszerű 1.8 Å-mel diffraktáló kristályokban azonban a cellohexóz molekula jelen volt (**2.4.3.4. ábra**). Egy feltehetően a foszfát pufferből származó Zn²⁺ ion négy fehérjemolekula között kapcsolatot hozott létre, és kimerevítette a 6 hisztidint tartalmazó his-tag-et, így a cellohexóz molekulán kívül a His tag is láthatóvá vált.

Mannohexóz jelenlétében, 2.7 M ammónium szulfát oldatban is sikerült a fehérjét kristályosodásra bírni és ezáltal a mannohexóz szubsztrát pozíciója is meghatározhatóvá vált, így rendelkezésre állt a natív, a mannohexózt és a cellohexózt kötött CBM29-2 fehérje molekula 3D szerkezete.

A szénhidrát és a fehérje közötti kölcsönhatás kialakításában a CBM29 családban konzerválódott, W23, W25 és Y45 aromás aminosavaknak van kitüntetett szerepe (**2.4.3.5. ábra**). A W23 a G6 vagy M6 nem redukáló vég felől számított első, a W25 a harmadik és a Y45 az ötödik



2.4.3.5. ábra. A mannohexóz és a cellohexóz lánc elhelyezkedése és a kötésében résztvevő aromás aminosavak helyzete. Lila: glükohexóz; Kék: mannohexóz, Sárga: CBM aromás aminosavai

szomszédos elemei határozzák meg. A W23-mal kapcsolódó első cukormolekula szerkezete eltér, a glükóz (G) az energetikailag kedvezőtlenebb hajó, a mannóz (M) az energetikailag kedvezőbb szék konformációban található (**2.4.3.6. ábra**). Valószínűleg ez a különbség csak az eltérő kristályforma okozta, eltérő külső környezetből fakad, de az sem kizárt, hogy a glükóz molekula ebben a konformációban nagyobb felületen "simul" a W23 hidrofób felszínéhez, és így erősebb kölcsönhatás jön létre közöttük, ami ellensúlyozza az energetikailag kedvezőtlenebb konformáció jelenlétét.

cukorkomponensével alakít ki erős hidrofób kölcsönhatást. А cukorlánc csavarodik. elhelyezkedése az első 5 cukorelem esetében mind a M6 mind a G6 molekulákban megegyezik. Az utolsó cukormolekula helyzete a két komplex esetében eltér, mivel ezek a molekulák sem hidrofób stacking, sem H híd kölcsönhatással nem kötődnek a CBM29-2 molekula felszínéhez, ezért aktuális helyzetüket a kristályban a fehérje



2.4.3.6. ábra. Az első cukormolekulák szerkezete. G1: glükóz a kád konformációban; M1: mannóz a szék konformációban

A CBM29-2 fehérje cellohexózzal alkotott komplexében H-híd kötés kialakulhat (**2.4.3.7. ábra**) a G2-C2OH és a Trp23 karbonil csoportja és G2-O, az Arg111 NH1 csoportja, a G3-C3OH és a Glu77 OE1 csoportja, a G3-C3OH, G3-C4OH és az Arg111 NH1 és NH2 csoportja, a G4-O, a G4-



2.4.3.7. ábra. A mannohexóz és a cellohexózzal kialakítható, potenciális H kötések elhelyezkedése. G:glükóz; M: mannóz
C6OH és a Gln115 amid NE2 és OE1 csoportja, a G5-C3OH és a Lys73 ε-NH (NZ) csoportja és a G6-C6OH és az Ala117 karbonil csoportja között, a molekulák között mért távolság és a donor és akceptor molekulák által bezárt szög alapján (min=2.195; max=3.30+0.050; min 90°).

A CBM29-2 fehérje mannohexózzal alkotott komplexében H-híd kötés kialakulhat a M2-C2OH és a Trp23 karbonil csoportja, az M2-C2OH és Arg111 NH2 csoportja, a M2-O és az Arg111 NH1 csoportja, a M3-C3OH és a Glu77 OE1 csoportja, a M3-C3OH, M3-C4OH és az Arg111 NH1 és



2.4.3.8. ábra. A különböző szubsztrátok kötési jellemzőinak alakulása **M6**: mannohexóz; G5: cellopentóz G6: cellohexóz; HEC: hidroxietil-cellulóz; Gal-Mannán: Carob galaktomannán; Glu-mannán: Konjac glükomannán (piros háromszög: $T\Delta S^{\circ}$; kék rombusz: ΔH° ; zöld négyzet: ΔG°

NH2 csoportja, a M4-O, a M4-C6OH, M4-C2OH és a Gln115 amid NE2, OE1, NE2 csoportja, az M5-C3OH és a Glu115 OE1 csoportja, a M5-C3OH és M5-C2OH és a Lys73 NZ csoportja között. Mivel a H híd kötés létrejöttét a donor és akceptor távolsága és az általuk bezárt szög határozza nehéz meg. megállapítani, hogy a lehetőségek közül melyik reprezentál tényleges és erős hidrogén kötést a CBM29-2 és a szubsztrát között. A mannóz és glükóz közötti C2 hidroxil csoport eltérő térbeli helyzetéből adódó potenciális Η híd kialakító képessége mannohexóznak a elméletileg jobb, mint а

cellohexóznak, hiszen a mannohexóz három, a cellohexóz pedig csak egy potenciális H híd kialakítására képes a C2-OH csoporton keresztül.

A többi csoport esetében a H híd kötés kialakításában résztvevő potenciális donor és akceptor molekulák távolsága lényegében megegyezik (±0.1 Å), kivéve az M5-C3OH és a Glu115 OE1 távolságot, ami 3.12 Å, míg a G5-C3OH és Glu115 OE1 távolsága 3.44 Å. A glükohexóz G6 molekulája elvileg képes lehet H-híd kötés kialakítására az Ala117 karboxil csoportjával, míg a mannohexóz esetében az M6 cukor helyzete ezt nem teszi lehetővé. Ezek alapján nehéz megmagyarázni, hogy miért négyszer akkora mégis a cellohexóz (K_a~10.1 x 10³ M⁻¹) affinitása a CBM29-2 fehérjéhez, mint a mannohexóz esetében mért érték (K_a~2.5 x 10³ M⁻¹). Bár a különbség nem jelentős, a szerkezet és a potenciális hidrogénhidak alapján a mannohexóz erősebb kötődését várnánk, amit hosszabb, mannóz alegységeket tartalmazó szubsztrátok esetében (karobgalaktomannán (K_a~19.9 x 10³ M⁻¹)) meg is kapunk.

A korábbi ITC vizsgálatok alapján a mannohexóz kötése során felszabaduló hő (ΔH° =-8.77 kcal/M) nagyobb, mint a cellohexoznál (ΔH° =-7.62 kcal/M) mért érték (**2.4.3.8. ábra**). A kötési izoterma kezdeti növekedését mutató K_a érték (affinitás) azonban a mannohexóz esetében 2.5 x 10³ M⁻¹, ami körülbelül négyszer kisebb mint a cellohexózé (10.1 x 10³ M⁻¹). Az RTlnK_a= ΔG° = ΔH° -T ΔS° egyenlet alapján az entrópia változás, azaz a mannohexóz molekula "szabadsága", a reakció során nagyobb mértékben csökken (T ΔS° =-4.14 kcal/M) mint a cellohexózé (T ΔS° =-2.16 kcal/M). A többi tesztelt szubsztrát (M6, G6, HEC, Gal-Mannán, Glu-mannán: Konjac glükomannán) T ΔS° és ΔH° értékei lineáris kapcsolatot mutatnak az ln(K_a), és így a ΔG° értékekkel, míg a M6 nem illik bele ebbe a lineáris kapcsolatba, azaz a mannohexóz molekula kötési affinitása valamiért jelentősen különbözik a várt értéktől (K_a=16.05 x 10³ M⁻¹). Az ITC adatok alapján ez a mannohexóz molekula "kimerevítésének" relatíve nagy energiaigénye miatt van így, amit egyenlőre nem tudunk megmagyarázni, de hosszabb mannóz polimer esetében (Glu-mannán) a lineáris trend érvényesül. A hosszabb szubsztrát kötése mindig nagyobb K_a értéket eredményez, hiszen a kötő árkot éppen megtöltő szubsztrát valószínűleg több kötés-leszakadás után találja meg az energetikailag

legstabilabb kötési pozíciót (hogy minden kötőhely ki legyen töltve), míg a hosszabb szubsztrátok esetében bárhol kezdődik meg a kötés, mindig rendelkezésre áll annyi további cukor alegység, ami a még üres kötőhelyeket kitölti. Ha a szubsztrát az adott pozícióban a kötést lehetetlenné tevő oldallánccal rendelkezik, akkor ennek a szubsztrátnak a megkötése hasonlóvá válik egy, a kötőhelyeket éppen kitöltő oligoszacharid kötéséhez, hiszen a CBM a szubsztrátot többször megkötve-elengedve "keresi meg" a kötésre alkalmas oldallánc nélküli részét a polimer láncnak. A HEC és a galaktomannán olyan oldalláncokat is tartalmaz, ami lehetetlenné teszi az adott pozíciókban a polimer molekula és a kötő fehérje közötti kötés kialakulását, így a HEC K_a értéke alig haladja meg a cellohexóz K_a értékét a cellopentózhoz viszonyítva, és ha a mannohexóz idealizált kötését vesszük figyelembe, akkor a galaktomannán alig haladja meg a CBM29-2 fehérje ideális mannohexózhoz való affinitást. Az oldallánc nélküli glükomannánhoz való, nagyságrendekkel magasabb affinitás ezért az oldalláncok hiányával, és az egyszer már kialakult részleges kötés mindenkori gyors stabilizálásával részben megmagyarázható.

A potenciális H híd képző képesség alapján a második, a negyedik és az ötödik pozícióban a mannóz (m) a preferált, az első és a harmadik pozícióban a H híd kialakulási lehetősége alapján nincs különbség a mannóz/glükóz preferenciában, a hatodik pozíció pedig a glükóz (G) számára nyújt egy lehetséges H híd kötést. Az első pozícióban a Trp23 alakít ki hidrofób stacking kölcsönhatást az adott cukormolekulával, ami a glükóz esetében egy energetikailag kedvezőtlenebb kád, mannóz esetében pedig egy kedvezőbb szék konformációjú cukormolekula megkötését jelenti. Ez alapján feltételezhető, hogy az első pozícióban is a mannóz a preferált cukor. Ez alapján a M M mindegy M M G cukorsorrend lenne az ideális, ami elég jól illeszkedik a konjac-glükomannán átlagos, M:G 60%:40%, szerkezetéhez (**MEGAZYME**). A CBM29-2 által kötött G6 molekulában a G3-G4, a G4-G5 és a G5-G6 glükózmolekulák között lehet intermolekuláris H kötés. Ez azt jelentheti, hogy az M1-M2-mindegy-M/G4-M/G5-M/G6 az ideális szubsztrát molekula, ami tovább magyarázhatja a glükózt és mannózt egyaránt tartalmazó konjac-glükomannán magasabb affinitását a CBM29-2 fehérjéhez. Így az inter- és intramolekuláris H hidak alapján az ideális szubsztrát: MMXMMG.

A CelC fehérje két szénhidrát kötő moduljában a Lys73 (VKI/V), az Arg111 (FDRI) a Gln115 $(\mathbf{O}DA/\mathbf{G}PA/\mathbf{G})$ és Ala117 (QDA/GPA) az aminosavak környezetükkel együtt konzerválódott, hidrofób stacking hasonlóan a kölcsönhatás kialakításában szerepet játszó Trp23, Trp25 és Tyr45 aminosavakhoz (2.4.3.9. ábra). A szubsztrát kötésben résztvevő aminosavak mindkét modulbeli konzervált jelenléte tovább erősíti az adott aminosavak szerepét a kölcsönhatásban, hiszen mindkét modul (CBM29-1, CBM29-2) szubsztrátspecifikussággal hasonló rendelkezik, csak a kötési affinitások térnek el egymástól. A modellel nem tudjuk megmagyarázni az eltérő affinitást, hiszen a szubsztrát kötéséért felelős aminosavak a Glu77 kivételével mind jelen vannak. A



2.4.3.9. ábra. A CelC fehérje két moduljának (CBM29-1/CBM29-2) szerkezeti eltérése homológia modell alapján. lila: CBM29-1; cián: CBM29-2

szubsztrát kötő zseb kialakításban a CBM29-2 fehérje Ser79 aminosav helyett a CBM29-1 molekulában a nagyobb Tyr83, és a H hidak kialakításában is feltehetően résztvevő CBM29-2 Glu77 helyett a jóval hosszabb oldalláncú Arg81 található. Ezek a nagyobb térkitöltésű aminosavak nehezíthetik a szubsztrát kötését, és ezért csökkenthetik a CBM29-1 molekula affinitását az adott szubsztrátokhoz.

Összefoglalva: A többféle oldható szubsztrát kötésére képes CBM29-2 modult kristályosítottuk és térszerkezetét meghatároztuk. A szerkezetükben különböző szubsztrátok kötésben résztvevő aminosavak egyértelmű azonosításához a CBM29-2 modult mannohexóz és cellohexóz jelenlétében

is kristályosítottuk. A glükóz és a mannóz alegységek és a szubsztrát kötésben résztvevő aminosavak közötti kapcsolat alapján meghatároztuk az elméletileg ideális szubsztrát szerkezetét, amely lényegében megegyezett az ITC vizsgálatok alapján a CBM29-2 modulhoz legerősebben kötődő konjack glükomannán szerkezetével. A homogén egységekből felépülő vizsgált cukor polimerek közül a CBM-29-2 szubsztrát kötő modulhoz a mannohexóz kötődött a leggyengébben, a cellopentóz, cellohexóz és a HEC a polimer tagszámától függően egyre nagyobb affinitást mutatott. A mannohexóz alacsony kötési affinitását nem tudtuk megindokolni, mivel a nagyobb tagszámú carob-galaktomannán a szubsztrát kötő régió térszerkezetéből következően erősebben kötődött mint a glükóz elegységekből felépülő HEC. A 37 %-ban hasonló, de oldható szubsztrátokkal szemben kisebb kötési affinitást mutató CBM29-1 molekula szubsztrát kötő árka néhány fontosnak látszó pozícióban nagyobb térkitöltésű aminosavakat tartalmaz. Feltételezésünk szerint ez a CBM 29-2 és CBM29-1 modulok eltérő szubsztrát kötő képességének az oka.

További részletek:

Szabo L, Charnock SJ, Freelove A, Bolam DN, Davies G, Hilbert HJ (2001) Structure of a Novel Carbohydrate Binding Module from Piromyces equi, 4th Carbohydrate bioengineering meeting, Stockholm 10-13 June, Poster No105

2.4.4. Az X4 modul kristályosítása (esettanulmány)

A P. fluorescens mannanáz X enzimje egy 5-ös és egy 10-es családba tartozó szénhidrát kötő



doménből, egy X-es családba tartozó mannanáz katalitikus doménből, és egy ismeretlen funkciójú (X4) doménből épül fel (**2.4.4.1. ábra**) (**Hogg et al. 2001**).

A katalitikus domént illetve az 5-ös és 10-es

családba tartozó szénhidrát kötő modulokat más enzimek esetében már részletesen vizsgálták. Ezért célunk az volt, hogy jellemezzük az ismeretlen funkciójú X4 domént.

Különböző szubsztrátok jelenlétében végzett affinitás PAGE vizsgálatok azt mutatták, hogy az X4 domén mannánt illetve több mannóz egységet tartalmazó szénhidrátok megkötésére képes (**Hogg et al. 2001**). ITC vizsgálatok alapján megállapították, hogy a mannóz polimer tagszámának 6 fölé növelése nem okoz kötési affinitás növekedést, míg 6 alá csökkentése kimutathatóan mérsékli a szubsztrát kötés erősségét (**Pell, nem publikált**). Ezek alapján az X4 modul egy oligo-mannóz kötő modul, melynek szubsztrát kötő helye maximum 6 mannóz egység megkötésére képes. Mivel az X4 modul nem mutat jelentős szekvencia hasonlóságot ismert térszerkezetű modulokkal, és egyetlen mannóz kötő modul 3D szerkezete sem áll rendelkezésre, megkíséreltük a domén 3D térszerkezetét röntgen diffrakciós módszer segítségével meghatározni és a mannóz polimer kötésében résztvevő aminosavakat azonosítani. A térszerkezet meghatározáshoz a fehérjét nagy mennyiségben kellett



expresszálni, majd tisztítani és kristályosítani. A katalitikus és az X4 modul között nem volt egyértelmű linker szekvencia, így elsőként az X4 modul C-terminálisát azonosítottuk más linker szekvenciákkal elválasztott X4 modulokkal történő összehasonlítások alapján. Az így behatárolt X4 modult pET21a vektor NdeI-

helvére

XhoI

2.4.4.2. ábra. Az X4 modul tisztítása CFE-ből. A: M: SDS-PAGE marker; 1: CFE; 2: TALON his affinitás kromatográfia után; 3: ion-cserés kromatográfia után; 4: gél filtráció után. B: ion-cserélő kromatogram; C: gél filtráció kromatogram. (B,C részábra: bal oldali tengely: eluátum A₂₈₀ elnyelés változása, jobb oldali tengely: sókoncentráció változása)

klónoztuk, és az így kapott C-terminális His tag fúziós fehérjét (X4h) *E. coli* Jm83(DE3) törzsben expresszáltattuk, his-affinitás kromatográfiával, ion-cserélő kromatográfiával majd gélszűréssel homogenitásig tisztítottuk. Bár a denaturáló körülmények között végzett fehérje gélelektroforézis (**2.4.4.2. ábra**) már az ion-cserélő kromatográfia után homogén fehérjét mutatott, a gélszűrés kromatogramja alapján a minta nem volt teljesen homogén. A gélszűrés során összegyűjtött, megfelelő frakciókat betöményítettük, és megkíséreltük kikristályosítani. A Marek's simple screenjének 10-es (1 M KH₂PO₄) majd pár nap elteltével 4-es (0,5 M KH₂PO₄) körülményei között, a fényt kristályszerűen polarizáló képződmények jelentek meg (**2.4.4.3. ábra/1 kép**). Azonban sem a KH₂PO₄ koncentrációjának megváltoztatása, sem más foszfátokra való cserélése nem

eredményezett röntgendiffrakcióhoz használható kristályokat, csak fonalszerű, néhány molekula vastag és széles, de hosszú, kristályszerűen fénytörő formátumot. Feltételeztük, hogy az X4 domén C-terminálisának meghatározása nem volt megfelelő, így egy olyan flexibilis régió maradt itt, ami a His tag-gel kiegészülve megakadályozza a fehérjék kristályrácsba rendeződését. Ezért az X4 modult úgy klónoztuk, hogy az N-terminálisára kerüljön a His tag, illetve előállítottunk egy olyan verziót is ahol a korábbiakhoz képest az utolsó 8 aminosav hiányzott. A rövidített verzió azonban inclusionbody-ban expresszálódott, ami alapján feltételeztük, hogy az X4 modul folding-ja szempontjából valószínűleg szükség van erre az utolsó 8 vagy ennél kevesebb aminosavra is. Az N-terminális His tag fúziós X4 modult (hX4) expresszáltattuk, kitisztítottuk és megkíséreltük kristályosítani. A fehérje a Hampton Research PEG-ion screen-jének 45 (0,2 M litium-citrát, 20 % w/v PEG3350) és 46-os (0,2 M nátrium-citrát, 20 % w/v PEG3350) kondíciójában vékony, hosszú tűszerű kristályokat eredményezett (2.4.4.3. ábra/2. és 3. kép). Bár az előrelépés látványos volt, a vékony, tűszerű kristályok röntgendiffrakciós szerkezet meghatározásra alkalmatlanok. A 46-os kondíció körüli grid-screen nem hozott előrelépést, bár a NaCitrát koncentrációjának 0,3 M-ra emelése (2.4.4.3. ábra/6. kép) rövidebb, de vastagabb tűszerű képződményeket eredményezett. A tű kristályszerkezeti szempontból egydimenziós, hiszen csak egy irányban van jelentős kiterjedése. Ez azt jelenti, hogy a fehérjemolekulák csak egyik oldalukkal kapcsolódnak optimálisan. Egyik lehetőség ahhoz, hogy a kapcsolódás a tér mindhárom irányába ismételhetően jó legyen, a flexibilis fehérjemolekula kimerevítése lehet. A szénhidrát kötő domének esetében ennek a legegyszerűbb módja a szubsztrát jelenlétében történő kristályosítás. A Hampton-Reserach PEG-ion screenjének 46-os kondíciójában megpróbáltuk a fehérje kristályosítást mannohexóz (M6) és mannopentóz (M5) jelenlétében is (2.4.4.3. ábra/4. és 5. kép). A kristályok vastagabbak lettek, de még mindig túl vékonyak a röntgendiffrakciós szerkezet meghatározáshoz. A teljes Hampton screen-t és a Hampton-research PEG-ion screen-t megismételtük 10 mM mannohexóz illetve 10 mM mannopentóz jelenlétében. 10 mM mannohexóz jelenlétében a PEG-ion screen 31-es (0,2 M Litium szulfát monohidrát, 20 % v/w PEG3350) a 32-es (magnéziumszulfát heptahidrát, 20 % v/w PEG3350), a 43-as (0,2 M amónium dihidrogén foszfát, 20 % v/w PEG3350), és a Hampton screen 36 (0.1 M TrisHCl és 8 % v/w PEG8k) kondíciók (2.4.4.3. ábra/7., 8., 9. és 10. kép) eredményeztek kristály-szerű képződményeket. A PEG-ion 31-es és a 32-es kondícióban kapott kristályok tűszerűek voltak, és nem jobbak, mint az eddigiek, a PEG-ion 43-as és a Hampton screen 36-os kondícióban pedig tollszerű kristályok képződtek. Ez az elágazó forma általában a kristályosítás zsákutcáját jelenti, optimalizálására az esetek döntő többségében nincs mód. Mannopentóz jelenlétében az előbb felsoroltakhoz hasonlatos, térszerkezet meghatározásra ugyancsak alkalmatlan kristályok képződtek. Ezek alapján úgy tűnt, hogy a szubsztrát jelenlétében történő kristályosítás okoz változást, de nem vezet eredményre. A szubsztrát nélküli kristályosítások ellenőrzései során kb. 1-1.5 hónap alatt a Hampton screen 36-os (0.1 M TrisHCl és 8 % v/w PEG8k) kondíciójában minden eddiginél vastagabb, bár még mindig tűszerű kristályok képződését figyeltük meg (2.4.4.3. ábra/11. kép és kinagyítva 12. kép). A kristályok méretüknél fogya nem voltak optimálisak a szerkezet meghatározáshoz, és nagyon körülményes volt a röntgendiffrakciós berendezésre való felhelyezésük is, gyengén ugyan, de már 2.5 Å-mel diffraktáltak. A kiindulási kondíció változtatása nem hozott áttörő, látványos eredményt, így tovább próbálkoztunk. A Hampton screen 24-es (0.2 M CaCl₂x2H₂O és 0.1 M Na-acetát pH=4,6 és 20 % izo-propanol) kondíciójában apró, de a tűtől eltérő kristályok jelentek meg, amit azonban ilyen feltételek mellett nem tudtunk többet reprodukálni. A kondíció köré szervezett grid-screen-ben csak akkor láttunk újra kristályokat, ha nem volt benne izo-propanol, és a CaCl₂ koncentrációja 0,6 M-nál nagyobb volt (2.4.4.3. ábra/13. kép). Ezek a kristályok igazi, a tér minden irányába kiterjedő paraméterekkel rendelkeztek, de nem voltak szingulárisak, azaz szinte lehetetlen volt az összetapadt kristályokat egymástól izolálni. Annak bizonyítására, hogy nem egyszerűen CaCl₂ kristályokról van szó, egy nagyon apró darabot izoláltunk, ami méretéhez képest jól kb. 2 Å-mel diffraktált. A röntgendiffrakciós szerkezet meghatározáshoz azonban az az előnyös, ha a kristály nagy, így erősen diffraktál, azaz a diffrakciós mintázat pontjai rövid expozíciós idő után is egyértelműen azonosíthatók. Ezért megpróbáltunk még vastagabb kristályokat előállítani. Mivel a tér minden

irányába használható kiterjedéssel rendelkező kristályok csak Ca^{2+} koncentráció jelenlétében képződtek, és több enzim csak Ca^{2+} jelenlétében stabil, illetve rendelkezik aktív, jól meghatározott szerkezettel (**Johnson et al. 1998; Charnock et al. 1999; Shimon et al. 2000; Hachem et al. 2000**), megkíséreltük a kristályosítást minden rendelkezésünkre álló kondícióban, 10 mM Ca^{2+} jelenlétében megismételni. Ez a próbálkozás azonban csak a korábbiakhoz hasonló vékony, tűszerű, használhatatlan kristályokat eredményezett.

Időközben kiderült, hogy az X4 modul -annak ellenére, hogy nincs rajta egyértelműen azonosítható periplazmás szignál szekvencia- 95 %-ban a periplazmában található az *E. coli* JM83(DE3) sejtekben. Ez azért előnyös, mert a periplazma fehérjetartalma jóval kisebb, mint a CFE



fehérjetartalma, így akár a his-tag nélküli fehérje is már néhány tisztítási lépés után is kristályosításra alkalmasan, tisztán izolálható. Mivel az X4 modulhoz mesterségesen hozzáadott 7 hisztidinből álló fúziós peptid jelenléte fragment periplazmából történő tisztításnál

2.4.4. ábra. A his-tag nélküli X4 modul tisztítása a periplazmából. A: M: SDS-PAGE marker; 1: periplazma; 2-6 ioncserélő kromatográfia frakciók 7: gélfiltráció után;. B: ion-cserélő kromatogram; C: gél filtráció kromatogram. (B,C részábra: bal oldali tengely: eluátum A₂₈₀ elnyelés változása, jobb oldali tengely: sókoncentráció változása)

kiküszöbölhető (hiszen a periplazma már eleve kisebb mennyiségben tartalmaz szennyező fehérjéket), feltételeztük, hogy egy kevésbé flexibilis fehérjét kapunk, ami szerencsés esetben nagyobb hajlandóságot mutat majd a kristályosodáshoz. Ezért az X4 modult His tag nélkül pET21a vektorba klónoztuk és expresszáltattuk, majd a periplazmából ion-cserélő kromatográfiával és gélszűréssel kitisztítottuk (**2.4.4.4 ábra**). Az immáron minden mesterséges peptidrésztől mentes X4 modul kristályosítása sem Ca²⁺ jelenlétében, sem Ca²⁺ hiányában, egyik tesztelt kristályosítási körülmény között sem hozott a használhatatlan tűszerű kristályoktól eltérő formát. A 0,6 M-os CaCl₂ jelenlétében ugyanúgy viselkedett mint az N-terminális his-tag-et tartalmazó X4 modul. Ezek alapján valószínűsíthető, hogy az X4 modul önmagában is nagyon mozgékony, és csak a C-terminális his-tag jelenléte okoz további flexibilitás növekedést, azaz a his-tag eliminálása ennél a fehérjénél nem befolyásolta a fehérje kristályosíthatóságát.

A 0,6 M os CaCl₂ jelenlétében képződött, összetapadó (**2.4.4.3. ábra/13 kép**) kristályok nem optimálisak a röntgen diffrakciós szerkezet-meghatározásra. Ehhez nagy és egyedülálló kristályra van szükség. Mivel a His tag eliminálása nem okozott változást, ezért a könnyebben izolálható N-terminális His tag-et tartalmazó hX4 modullal dolgoztunk tovább. Az 1 M-os CaCl₂ és különböző koncentrációjú etilénglikol illetve DMF, vagy DMSO jelenlétében megismételtük a kristályosítást. Az 1 M CaCl₂-ot és 10% DMF-et tartalmazó kondíció nagy és szépen formálódott kristályokat (**2.4.4.3 ábra/14. kép**) eredményezett, melyek kb. 2 Å-mel diffraktáltak. A kristályok szerkezet meghatározása elkezdődött.

Összefoglalva: A PfMan10 enzim mannóz kötő X4 modul térszerkezetének meghatározásához próbáltunk a fehérjéből szerkezet meghatározásra alkalmas kristályt előállítani. Az önállóan expresszált X4 modult N- és C-terminális His taggal, His tag nélkül periplazmából izolálva, többféle szubsztrát jelenlétében és hiányában többféle screen-en megpróbáltuk kristályosítani. Hosszas próbálkozás és optimalizálások sora után a az 1 M CaCl₂-ot, 10 % DMF-et tartalmazó

kondíció eredményezett röntgendiffrakciós szerkezet meghatározásra alkalmasnak tűnő fehérje kristályt, melynek szerkezet meghatározása elkezdődött.



2.4.4.3. kép. A ManXX4 domén kristályosítása. 1: Marek's simple screen 4; 2: Hamton Research PEG/Ion 45; 3: Hamton Research PEG/Ion 46; 4: Hamton Research PEG/Ion 46+M6; 5: Hamton Research PEG/Ion 46+M5; 6: Hamton Research PEG/Ion 46+0.1 M NaCitrát; 7: Hamton Research PEG/Ion 31; 8: Hamton Research PEG/Ion 32; 9: Hamton Research PEG/Ion 43; 10: Hamton Screen 36+M6; 11: Hamton Screen 36 5x; 12: Hamton Screen 36 10x; 13: 1 M CaCl₂; 14: 1 M CaCl₂+10% DMF

2.5. Új eredmények összefoglalása

- Azonosítotuk a *Pseudomonas fluorscens* Xyn10A fehérje CBM10 oldhatatlan cellulóz kötő moduljának szubsztrát kötésben fontos aminosavait helyspecifikus mutagenezis és a felszíni triptofánok NBS-el történő reakciója alapján;
- Meghatároztuk a *Pseudomonas fluorscens* XylF fehérje CBM15 xylóz kötő doménjének xylohexózzal alkotott komplexének térszerkezetét;
- Meghatároztuk a *Piromyces equi* CelC fehérje CBM29-2 cellulóz kötő doménjének a mannohexózzal és cellohexózzal létesített komplexének a térszerkezetét, és ez alapján leírtuk az ideális szubsztrát szerkezetét.

2.6. Összefoglalás

A növényi sejtfalbontásban résztvevő enzimek gyakran tartalmaznak olyan modult is, mely főként oldhatatlan szubsztrátokkal szemben jelentősen fokozzák az enzimek hatékonyságát. A szubsztrát kötő modulok működési mechanizmusának megértése elengedhetetlen a növényi eredetű szerves hulladékok bio-üzemanyaggá történő átalakításának hatékonyabbá tételéhez.

Célunk volt különböző kötő domének szubsztrát kötésében résztvevő aminosavainak azonosítása és a domén működési mechanizmusának feltárása.

A CBM10 oldhatatlan cellulózt kötő modul szubsztrát kötésben fontos aromás aminosavait helyspecifikus mutagenezissel azonosítottuk. A CBM10 család más tagjaiban is konzerválódott aromás aminosavak alaninra cserélése a W7A, W22A, W24A és Y8A mutációk esetében jelentősen csökkentették a katalitikus doménnel együtt expresszált modul cellulózkötő képességét, míg az Y2A mutáció nem befolyásolta azt. A katalitikus domént nem tartalmazó W7A mutáns azonban nem expresszálódott *E. coli*-ban ami arra utal, hogy a W7 a domén belsejében van, így a modul szerkezetének fenntartásában vesz részt. NBS (N-bromo-succinamide) segítségével meghatároztuk, hogy hány cellulóz kötésére képes triptofán van a CBM10 modul felszínén denaturáló és natív körülmények között. Denaturáló körülmények között a vad típusú CBM10 modul mindhárom, még natív körülmények között csak két triptofánja, a W22A és a W24A mutánsok két triptonfánja közül natív körülmények között pedig csak egy-egy triptofán reagált az NBS-sel. Ezek alapján az 5 konzerválódott aromás oldalláncú aminosav közül csak az Y8, W22 és W24 aminosavak vesznek részt a cellulózkötésben. Ezt az következtetést a CBM10 modul időközben NMR-rel megfejtett 3D szerkezete is alátámasztotta.

A kötésben résztvevő aminosavak feltérképezésének másik módja a domének térszerkezetének meghatározása. Ehhez azonban vagy olyan fehérje kristályra van szükség amely tartalmaz olyan ionokat, melyek segítségével a szerkezet megfejtéséhez szükséges kezdeti diffrakciós fázisok meghatározhatók vagy olyan ismert szerkezetű fúziós fehérjével együtt kell az adott domént kristályosítani amiből a szükséges fázis információ kinyerhető. A *P. fluorescens* Xyn10F enzim ismeretlen szerkezetű xylóz kötő CBM15 modulját ismert szerkezethez 60%-os hasonlóságot mutató katalitikus doménjével együtt expresszáltattuk, kitisztítottuk, kristályosítottuk. A hasonló PsXyn10A ismert szerkezete alapján először a katalitikus domén szerkezet azonosítása történt meg. A katalitikus modul fázisainak felhasználásával azonban a katalitikus doménhez kapcsolódó, xylán kötő modul szerkezetének csak 30 %-át lehetett felépíteni. A CBM-15 meghatározott 3D szerkezete azonban elégnek bizonyult az önmagában expresszált és xylohexóz jelenlétében kristályosított CBM15 teljes szerkezetének megfejtéséhez. A szubsztrátot is tartalmazó CBM15 modulban először vált láthatóvá négy xylóz alegység eddig csak modellekből ismert csavarodott szerkezete. Meghatároztuk a CBM15 modul szubsztrát kötésben résztvevő aminosavakat, és magyarázatot találtunk arra, hogy miért képes a modul az oldalláncokat is tartalmazó xylánok kötésére is.

Előfordul, hogy a vizsgálat tárgyát képző fehérje nem mutat szignifikáns hasonlóságot semmilyen más korábban leírt fehérjével. Ilyenkor a szerkezet és funkció megértésének leggyorsabb és legegyszerűbb módja a vizsgált fehérje szubsztrát jelenlétében való kristályosítása és térszerkezetének meghatározása. A többféle oldható szubsztrát kötésére képes CBM29-2 modul térszerkezetét mannohexóz és cellohexóz jelenlétében is meghatároztuk. A glükóz és a mannóz alegységek és a szubsztrát kötésben résztvevő aminosavak közötti kapcsolat alapján meghatároztuk az elméletileg ideális szubsztrát szerkezetét, amely lényegében megegyezett az ITC vizsgálatok alapján a CBM29-2 modulhoz legerősebben kötődő konjack glükomannán szerkezetével. A 37 %-ban hasonló, de oldható szubsztrátokkal szemben kisebb kötési affinitást mutató CBM29-1 molekula szubsztrát kötő árka néhány fontosnak látszó pozícióban nagyobb térkitöltésű aminosavakat tartalmaz. Feltételezésünk szerint ez a CBM 29-2 és CBM29-1 modulok eltérő szubsztrát kötő képességének az oka.

2.6.1. Summary

Plant cell wall degrading enzymes often contains modules which greatly enhances the enzyme activity on insoluble substrates. The understanding of the mechanism of these substrate binding modules is preliminary requirement for efficient plant wall degradation for cost effective bio fuel production.

The main aim of this work was to determine the amino acids participating in the substrate binding and understand how modules can bind different substrates.

Aromatic amino acids involved in the insoluble cellulose binding were identified by site specific mutagenesis in the case of CBM10. Conserved amino acids of the CBM10 family were replaced with alanine one by one. While mutations W7A, W22A, W24A and Y8A abolished, the Y2A mutation did not influence the cellulose binding ability of the catalytic module fused family 10 CBD. In contrary the standalone W7A CBM could not be expressed in *E. coli* which suggested that the W7 is required for maintaining the correct 3D structure of the module. NBS (N-bromosuccinamide) was used to determine the number of surface tryptophans potentially participating in the substrate binding. Under denaturing conditions three, under native conditions only two tryptophans reacted with NBS of the wild type CBM10 module. In the case of W22A and W24A mutants under native conditions only one tryptophan showed reaction with NBS. Based on these results out of the 5 conserved aromatic amino acids of the CBM10 family only Y8, W22 and W24 participates in the substrate binding. These results were confirmed by NMR structure of the wild type CBM10.

The other way to identify amino acids participating in ligand binding is to determine the 3D structure of the binding module. Unfortunately this requires either protein crystals with heavy metal ion or co-crystallization with known structure protein for the initial phase determination.

The PsXyn10F catalytic module with its fused CBM-15 module was expressed, purified and crystallized. First, the structure of the catalytic module was determined using the already available 3D structure of the 60 % homologous PsXyn10A. Although determination of the whole 3D structure of the CBM-15 module failed, one third of its structure could be built up using the phases of the catalytic module. Nevertheless this piece of 3D structure proved to be enough to determine the whole structure of the standalone crystallized CBM-15 in the presence of xylohexose. This was the first time when the forecasted turning structure of xylose become visible. Amino acids important in the substrate binding were determined which offered explanation also for the substituted xylane binding ability of the CBM-15 module.

When the investigated module does not show any homology with earlier characterized modules the easiest way of information collection is to determine the 3D structure of the module in the presence of its substrates. The structure of the multi-substrate binding CBM-29-2 module was determined in the presence of mannohexose and cellohexose respectively. Based on the "style" of glucose and mannose binding the optimal substrate composition was determined and was found to be very close to the most optimal substrate structure (konjack glucomannan) based on the ITC results. The 37% homology CBM29-1 module is less effective against soluble substrates. Based on homology modeling it was found that in the substrate binding grove it contains more space filling amino acids which could be the reason of the different substrate binding ability of the CBM-29-1 and CBM-29-s modules.

M1. Irodalomjegyzék

- Aharonowitz, Y., Bergmeyer, J., Cantoral, J. M., Cohen, G., Demain, A. L., Fink, U., Kinghorn, J., Kleinkauf, H., Mac-Cabe, A., Palissa, H. (1993) Delta-(L-alpha-aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase, the multienzyme integrating the four primary reactions in beta-lactam biosynthesis, as a model peptide synthetase. *BioTechnology* 11, 807-810. p.
- Albersheim, P., An, J., Freshour, G., Fuller, M.S., Guillen, R., Ham, K.S., Hahn, M.G., Huang, J., O'Neill, M., Whitcombe, A., Williams, M.V., York, W.S. and Darvill, A. (1994). Structure and function studies of plant cell wall polysaccharides. *Biochem. Soc. Trans.* 22: 374-378. p.
- 3. Aleshin, A., Golubev, A., Firsov, L. M. and B., H. R. (1992). Crystal structure of glucoamylase fron Aspergillus awamori var. X100 to 2.2 A resolution. *J Biol Che*. 267: 19291-19298. p.
- 4. Ali, B.R.S, Zhou, L., Graves, F.M. Freedman, R.B. and Black G.W. (1995). Cellulases and hemicellulases of the anaerobic fungus Pyromices constitute a multiprotein complex and are encode by multigene families. *FEMS Microbiol. Lett.* 125: 15-22. p.
- Andrews SR, Charnock SJ, Lakey JH, Davies GJ, Claeyssens M, Nerinckx W, Underwood M, Sinnott ML, Warren RA, Gilbert HJ. (2000) Substrate specificity in glycoside hydrolase family 10. Tyrosine 87 and leucine 314 play a pivotal role in discriminating between glucose and xylose binding in the proximal active site of Pseudomonas cellulosa xylanase 10A. J Biol Chem 275(30):23027-33. p.
- 6. Arnez, J.G., and Moras, D. (1997). Structural and functional considerations of the aminoacylation reaction. *Trends Biochem. Sci.* 22, 211–216. p.
- 7. Atkins, E. D. T. (1992) in Xylan and xylanases: Progress in biotechnology (Visser, J., Beldman, G., van Kusters, S., and Voragen, A. G. L., Eds.) Vol. 7, pp 39-50, Elsevier, Amsterdam.
- 8. Bacic, A. Harris, P.J. and Stone, B.A. (1988), Structure and function of plant cell walls. in The Biochemistry of Plants, Vol 14. J. Preiss (ed.) Academic Press, NewYork pp. 297-371.
- 9. Baumann, J. W. (1981). Enzymes and food processing. G.G. Birch, N. Blakebrough and K.J. Parker. London, Applied Sciemce Publisher: 129
- Bayer, E.A., Morag, E., Lamed, R., Yaron, S. and Shoham, Y. (1988). Cellulosome structure: four-pronged attack using biochemistry, molecular biology, crystallography and bioinformatics. In: Carbohydrates from Trychoderma reesei and other microorgaism: structures, biocehmistry, genetics and applcations, 39-65. M. Claessens, W. Nerinckx and Piens (eds). The royal Society of Chemistry.
- 11. Bayer, E. A., Morag, E. and Lamed, R. (1994). "The cellulosome a treasure trove for biotechnology." *Trends Biotech* 12: 379-386.
- 12. Béguin, P. and Aubert, J.P. (1994). The biological degradation of cellulose. FEMS Microbiol. Rev. 13: 25-58.
- Beguin P és Alzari PM. (1998) The cellulosome of Clostridium thermocellum. *Biochem Soc Trans*. 1998;26(2):178-85.
- 14. Belshaw, P.J., Walsh, C.T. & Stachelhaus, T. (1999). Aminoacyl-CoA's as probes of condensation domain selectivity in nonribosomal peptide synthesis. *Science* 284, 486-489.
- 15. Biely P, Mislovicova D, Toman R. (1985) Soluble chromogenic substrates for the assay of endo-1,4-beta-xylanases and endo-1,4-beta-glucanases. *Anal Biochem*. 144(1):142-6.
- Biely, P. (1991) Biotechnological potential and production of xylanotic systems free of cellulases. ACS Symposium Series 460: 408-416.
- 17. Black, GW., Hazlewwod, G.P., Millward-Sadler, S.J., Laurie, J.I. and Gilbert, H.J. (1995). A modular xylanase containing a novel non-catalytic xylan-specific bindong domain. *Biochem. J.* 307: 191-195
- 18. Blakk, H. és Schrempf, H. (1995). Binding and substrate specificities of a Streptomyces olivaceoviridis chitinase in comparison with its proteolytically processed form. *Eur. J. Biochem.* 229: 132-139.
- Bolam DN, Ciruela A, McQueen-Mason S, Simpson P, Williamson MP, Rixon JE, Boraston A, Hazlewood GP, Gilbert HJ. (1998) Pseudomonas cellulose-binding domains mediate their effects by increasing enzyme substrate proximity. *Biochem J.* 1;331 (Pt 3):775-81.
- Boraston, A.B., Mclean, B.W, Kormos, J.M., Alam, M., Gilkes, N.R., Haynes, C.A., Tomme, P., Kilburn, D.G. and Warren, R.A.J. (1999). Carbohydrate binding m odules: diversity of structure and function. 202-211. in Gilbert, H.J., Davies, G.J., Henrissat, B. and Svensson, B. (eds.), Recent Advances in Carbohydrate Bioengineeriong. The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Boraston, A.B, Amandoron, E.A. Kilburn, D.G. (2000). A novel mechanism of xylan binding lectin-like module from Streptomyces lividans xylanase 10A. *Biochem. J.* 350: 933-941.
- 22. Braddock, R.J. és Kesterson, J.W. (1979). Use of enzymes in citrus processing. Food Technol. 31: 78.
- Braun, E., Moriaud, F., Gans, P., Blackledge, N.J., Barras, F. and Marion, D. (1997). Solution structure of the cellulose-binding domain of the endoglucanase Z secreted by Erwinia chrysantheni. *Biochemistry* 36: 16074-16086.
- Brett, C. T. és Waldren, K. (1990). Physiology and biochemistry of plant cell walls. Topics in plant physiology: 2. M. Black and J. Chapman (eds.). London, Unwin Hyman.
- 25. Brett, C.T. és Waldren, K. (1996). Phisiology and Biochemsitry of Plant cell walls. Topics in plant functional biology: 1. M. Black and B. Charlewood (eds). Chapman és Hall.

- 26. Butler, A.R., Bate, N., Cundliffe, E. (1999) Impact of thioesterase activity on tylosin biosynthesis in Streptomyces fradiae, *Chem. Biol.* 6 287-292.
- 27. Cane, D.E and Walsh, C.T. (1999). The parallel and convergent universes of poliketyde synthases and nonribosomal peptide synthetases. *Chem. Biol.* 6: R319-R325
- Carrard, G., Koivula, A., Soderlund, H. and Béguin, P. (2000). Cellulose-binding domains promote hydrolysis of different sites on crystalline cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 12 97:10342-7.
- 29. Carreras, C.W. and Santi, D.V. (1998) Engineering of modular polyketide synthases to produce novel polyketides *Current Opinion in Biotechnology* 9:403–411
- 30. Challis G.L., Ravel J. and Townsend C.A. (2000) Predictive, structure-based model of amino acid recognition by nonribosomal peptide synthetase adenylation domains. *Biol.* 7 211- 224
- 31. Charnock SJ, Lakey JH, Virden R, Hughes N, Sinnott ML, Hazlewood GP, Pickersgill R, Gilbert HJ. (1997) Key residues in subsite F play a critical role in the activity of Pseudomonas fluorescens subspecies cellulosa xylanase A against xylooligosaccharides but not against highly polymeric substrates such as xylan. J Biol Chem 272(5):2942-51
- Charnock SJ, Spurway TD, Xie H, Beylot MH, Virden R, Warren RA, Hazlewood GP, Gilbert HJ. (1998) The topology of the substrate binding clefts of glycosyl hydrolase family 10 xylanases are not conserved. J Biol Chem: 273(48):32187-99
- Charnock, S. J., Bolam, D. N., Turkenburg, J. P., Gilbert, H. J., Ferreira, L. M. A., Davies, G. J., and Fontes, C. M. G. A. (2000) The X6 "thermostabilizing" domains of xylanases are carbohydrate-binding modules: structure and biochemistry of the Clostridium thermocellum X6b domain. *Biochemistry* 39, 5013-5021
- 34. Chung, C. T., Niemela, S. L. and Miller, R. H. (1989). One-step preparation of competent Escherichia coli transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci* U.S.A. 86: 2172-2175.
- 35. Conti, E., Franks, N.P., and Brick, P. (1996). Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylateforming enzymes. *Structure* 4, 287–298.
- 36. Conti, E., Stachelhaus, T., Marahiel, M.A., and Brick, P. (1997). Structural basis for the activation of phenylalanine in the nonribosomal biosynthesis of gramicidin S. *EMBO J.* 16, 4174–4183.
- Cosmina, P., Rodriguez, F., de Ferra, F., Perego, M., Venema, G., and van Sinderen, D. (1993) Mol. Microbiol. 8, 821-831.
- 38. Coughlan, M.P. (1985). Enzymic hydrolysis of cellulose: an overview. Biores. Technol. 39:107-115.
- 39. Coughlan, M.P. (1985). The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. In: Biotechnology and Genetic Engeneering Reviews, Vol 3, 39-109, G. E. Russel (ed.) Intercept.
- Coughlan, M.P. and Hazlewood, G.P. (1993). β-1,4-xylan degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology applications. *Biotechnol. Appl. Biochem*. 17:259-289.
- 41. Coutinho, J.B. and Reilly P. (1993). Structure-function relationship in the catalityc and starch binding domains of glycoamylase. *Prot Eng.* 7: 393-400.
- 42. Craig, L.C., Weisiger, J.R., Hausmann, W. és Harfenist, E.J. (1952) The separation and characterisation of bacitracin polypetides. *J. Biol. Chem.* 199: 259-266
- 43. Craig, L.C. és Konigsberg, W. (1957) Further studies with the bacitracin polypetides J. Org. Chem. 22: 1345-1353
- 44. Darvill, A.G., McNeil, M., Alberseim, P and Delmer, D.P. (1980). The primary cell wall of flowring plants. The biochemistry of Plants, 91-162, N.E. Tolbert, Academic Press.
- 45. Davies, G. and Henrissat, B. (1995). "Structure and mechanism of glycosyl hydrolases." *Structure* 3: 853-859.
- 46. Davies, G.J. (1998). Structuiral studies on cellulases. Biochem. Soc. Trans. 26: 167-172.
- 47. Dekker R.F.H. and Richards, D.N. (1976). Hemicellulases: their occurrence, purification, properties and mode of action. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 32: 261-264
- 48. Derewenda U, Swenson L, Green R, Wei Y, Morosoli R, Shareck F, Kluepfel D, Derewenda ZS. (1994). Crystal structure, at 2.6-A resolution, of the Streptomyces lividans xylanase A, a member of the F family of beta-1,4-D-glycanases. *J Biol Chem.* 269(33):20811-4
- 49. Dey, P.M. and Brinson, K. (1984). Plant cell walls. Adv. Carb. Chem. Biochem. 42: 265-382.
- 50. Din, N., Gilkes, N.R., Tekant, B., Jr Miller, R.C., Warren, R.A.J. and Kilburn, D.G. (1991). Non-hydrolytic disruption of cellulose fibres by the binding domain of a bacterial cellulase. *Bio. Technol.* 9: 1096-1099.
- Din N, Forsythe IJ, Burtnick LD, Gilkes NR, Miller RC Jr, Warren RA, Kilburn DG. (1994) The cellulose-binding domain of endoglucanase A (CenA) from Cellulomonas fimi: evidence for the involvement of tryptophan residues in binding. *Mol Microbiol*. 11:747-55.
- 52. Divne, C., Stahlberg, J., Reinikainen, T., Ruohoen, L., Petterson, G., Knowles, J. K. C., Teeri, T. T. and Jones, T. A. (1994). The three dimensional crystal structure of the catalytic core of cellobiohydrolase I from Trichoderma reesei. *Science* 265: 524-528.
- 53. Doekel, S. and Marahiel, M.A. (2000). Dipeptide formation on engineered hybrid peptide synthetases. *Chemistry & Biology*, 7:373–384
- 54. Doi-Katayama, Y., Yoon, Y.J, Choi, C.Y., Yu, T.W., Floss, H.G, Hutchinson, C.R. (2000) Thioesterases and the premature termination of polyketide chain elongation in rifamycin B biosynthesis by Amycolatopsis mediterranei S699, *J. Antibiot*. (Tokyo) 53: 484-495.
- 55. Dominguez R, Souchon H, Spinelli S, Dauter Z, Wilson KS, Chauvaux S, Beguin P, Alzari PM. (1995) A common protein fold and similar active site in two distinct families of beta-glycanases. *Nat Struct Biol* 2(7):569-76

- 56. Donadio, S., Staver, M.J., McAlpine, J.B. Swarson, S.J. & Katz, L. (1991) Modular orgainsation of genes required for complex polyketide biosynthesis. *Science*, 252: 675-679
- 57. van Dören, H. (1993) in Industrial Microbiology, Whilley, New York
- Dupont, C., Roberge, M., Shareck, F., Morosoli, R. and Kluepfel, D. (1998). Substrate-binding domains of glycanases from Streptomyces lividans: characterization of a new family of xylan-binding domains. *Biochem. J.* 330 41-45.
- 59. Ehmann, D.E., Trauger W. J., Stachelhaus, T. and Walsh C.T. (2000) Aminoacyl-SNACs as small-molecule substrates for the condensation domains of nonribosomal peptide synthetases *Chemistry & Biology*, 7:765-772
- 60. Elsner A, Engert H, Saenger W, Hamoen L, Venema G, Bernhard F. (1997). Substrate specificity of hybrid modules from peptide synthetases. J. Biol. Chem. 272, 4814-4819.
- 61. Epperson J.D. and Ming L.J.(2000) Proton NMR Studies of Co(II) Complexes of the Peptide Antibiotic Bacitracin and Analogues: Insight into Structure-Activity Relationship *Biochemistry*, 39, 4037-4045
- 62. de Ferra, F., Rodriguez, F., Tortora, O., Tosi, C., and Grandi, G. (1997) Engineering of peptide synthetases. Key role of the thioesterase-like domain for efficient production of recombinant peptides. *J. Biol. Chem.* 272, 25304-25309
- Ferreira, L. M. A., Wood, T. M., Williamson, G., Faulds, C., Hazlewood, G. P., Black, G. W. and Gilbert, H. J. (1993). A modular esterase from Pseudomonas fluorescens subsp. cellulosa contains a non-catalytic cellulosebinding domain. *Biochem. J.* 294 349-355.
- 64. Fogarty, W. M. and Kelly, C.T. (1983). Pectic enzymes. Microbial Enzymes and Biotechnology. W.M. Fogarty and C.T. kelly. London, Elsevier Applied Science: 131-182
- 65. Froyshov, O. és Mathiesen, A. (1979). Triptic clevage of enzyme A in bacitracin synthetase. *FEBS Lett.* 106: 275-278
- Fujikawa, K., Sakamoto, Y., Suzuki, T. & Kurahashi, K. (1968). Biosynthesis of tyrocidine by a cell-free enzyme system of Bacillus brevis ATCC 8185. II. Amino acid substitution in tyrocidine. *Biochim. Biophys. Acta* 169, 520-533.
- 67. Fujino, T., Béguin, P. and Aubert, J. P. (1992). Cloning of a Clostridium thermocellum DNA fragment encoding polypeptides that bind the catalytic components of the cellulosome. *FEMS Microbiol Lett.* 94: 165-170.
- 68. Fujino, T., Beguin, P. and Aubert, J. P. (1993). Organization of a Clostridium thermocellum gene cluster encoding the cellulosomal scaffolding protein CipA and a protein possibly involved in attachment of the cellulosome to the cell surface. *J Bacteriol*.175: 1891-1899.
- 69. Galli, G. és Grandi, G. (1994). Characterization of the surfactin synthetase multi-enzyme complex. *Biochim. Biophys. Acta* 1205, 19-28.
- 70. Gilbert, H.J. és Hazlewood, G.P. (1991) Genetic modification of fibre digestion. Proc. Nutrit. Soc. 50: 173-186.
- 71. Gilbert, H.J. és Hazelwood, G.P. (1993). Bacterial cellulases and xylanases. J. Gen. Microbiol. 139: 187-194.
- 72. Gilkes, N. R., Kilburn, D. G., Miller, R. C. and Warren, R. A. J. (1988). Cellulases of Cellulomonas fimi the enzymes and their interaction with substrate. *Abst Papers Am Chem Soc* 195: 123.
- 73. Gilkes NR, Jervis E, Henrissat B, Tekant B, Miller RC Jr, Warren RA, Kilburn DG (1992) The adsorption of a bacterial cellulase and its two isolated domains to crystalline cellulose. *J Biol Chem.* 5;267(10):6743-9.
- 74. Gill J, Rixon JE, Bolam DN, McQueen-Mason S, Simpson PJ, Williamson MP, Hazlewood GP, Gilbert HJ. (1999) The type II and X cellulose-binding domains of Pseudomonas xylanase A potentiate catalytic activity against complex substrates by a common mechanism. *Biochem J*. 342 (Pt 2):473-80.
- 75. Gokhale, R.S., Tsuji, S.Y., Cane, D.E. and Khosla, C. (1999) Dissecting and exploiting intrermodular communication in polyketide synthases. *Science* 284: 482-485
- 76. Guenzi, E., Galli, G., Grgurina, I., Pace, E., Ferranti, P. & Grandi, G. (1998). Coordinate transcription and physical linkage of domains in surfactin synthetase are not essential for proper assembly and activity of the multienzyme complex. *J. Biol. Chem.* 273, 14403-14410.
- 77. Haavik HI. (1975) Bacitracin production by the neotype; bacillus licheniformis ATCC 14580. Acta Pathol Microbiol Scand Suppl. 83(6):534-40.
- Hachem AM, Nordberg Karlsson E, Bartonek-Roxa E, Raghothama S, Simpson PJ, Gilbert HJ, Williamson MP, Holst O. (2000). Carbohydrate-binding modules from a thermostable Rhodothermus marinus xylanase: cloning, expression and binding studies. *Biochem J*. 345 Pt 1:53-60
- 79. Hahn, I. és Dubnau, D. (1991). Growth stage signal transduction and the requirements for srfA induction indevelopment of competence. J. Bacteriol. 173, 7275-7287.
- Hall, J.G., Black, G., Ferreira, L.M., Millward-Sadler, S.J., Ali, B.R., Hazlewood, G.P., Gilbert, H.J. (1995). The non-catalytic cellulose binding domain of a novel cellulase from Pseudomonas fluorescens subsp. cellulose is importan for the efficient hydrolysis of Avicel. *Biochem. J.* 309: 749-756
- 81. Hampton Research (2001). http://www.hamptonresearch.com
- 82. Hanlon GW, Hodges NA. (1981) Bacitracin and protease production in relation to sporulation during exponential growth of Bacillus licheniformis on poorly utilized carbon and nitrogen sources. *J Bacteriol*. 147(2):427-31.
- 83. Hansen, C. K. (1992). Fibronectin type III-like sequences and a new domain type in prokaryotic depolymerases with insoluble substrates. *FEBS Lett.* 305: 91-96.

- Harris GW, Jenkins JA, Connerton I, Cummings N, Lo Leggio L, Scott M, Hazlewood GP (1994) Structure of the catalytic core of the family F xylanase from Pseudomonas fluorescens and identification of the xylopentaosebinding sites. *Structure* 2(11):1107-16
- 85. Harwood, C. R. (1992). Bacillus subtilis and its relatives: molecular biological and industrial workhorses *TIBTECH* 10, 2283-2287
- 86. Hazlewood, G. P. és Gilbert, H. J. (1998a). Structure and function analysis of Pseudomonas plant cell wall hydrolases. *Biochem. Soc. Trans.* 26, 185-190.
- 87. Hazlewood GP és Gilbert HJ. (1998b) Pseudomonas cellulose-binding domains mediate their effects by increasing enzyme substrate proximity. *Biochem J*: 331 (Pt 3):775-81.
- 88. Heathcote ML, Staunton J, Leadlay PF.(2001) Role of type II thioesterases: evidence for removal of short acyl chains produced by aberrant decarboxylation of chain extender units. *Chem Biol.* 8(2):207-20.
- Heikinhemino, P., Goldman, A., Jeffris, C. and Ollis, D.L. (1999). Of barn owls and bankers: a lush variety of α/β hydrolases. *Structure* 7: R141-R146
- 90. Henrissat, B. (1994). Cellulases and their interaction with cellulose. *Cellulose*. 1, 169-196.
- 91. Henrissat, B. és Davies, G, (1997). Structural and sequence based classification of glycoside hydrolases. *Curr. Op. Struct. Biol.* 7: 637-644.
- 92. Henrissat, B., Teeri, T. T. and Warren, R. A. J. (1998). A scheme for designating enzymes that hydrolyse the polysaccharides in the cell walls of plants. *FEBS Lett.* 425 352-354.
- 93. Henrissat, B. and Coutinho, P. (2000). CAZy website: http://afmb.cnrs-mrs./fr/~pedro/CAZY/db.html.
- 94. Hickey, R.J. (1964). Bacitracin, its manufacture and uses Progr. Industr. Microbiol. 5, 93-96.
- Hogg D, Woo EJ, Bolam DN, McKie VA, Gilbert HJ, Pickersgill RW. (2001) Crystal structure of mannanase 26A from Pseudomonas cellulosa and analysis of residues involved in substrate binding. *J Biol Chem.* 276(33):31186-92.
- 96. Hopwood, D.A. és Sherman, D.H. (1990). Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. *Annu. Rev. Genet.* 24, 37–66.
- 97. Hopwood, D.A. (1997). Genetic contributions to understanding polyketide synthases. Chem. Rev. 97, 2465–2497.
- 98. Horinouchi, S. és Beppu, T. (1990) Autoregulatory factors of secondary metabolism and morphogenesis in actinomycetes. *Crit Rev Biotechnol* 10, 191-204
- 99. Hughey, R., A. Krogh, (1996) Hidden Markov models for sequence analysis: Extension and analysis of the basic method, *CABIOS* 12:95-107.
- 100. Hwang, Y., Pyun, Y. R. and Kokini, J. L. (1993). Sidechains of pectins: some thoughts on their role in plant cell walls and foods. *Food Hydrocolloids*. 7, 39-53.
- 101. Ikai, Y., Oka, H., Hayakawa, J., Matsumoto, M., Saito, M., Harada, K., Mayumi, T. and Suzuki, M. (1994). Total structures and antimicrobial activity of bacitracin minor components. *J. Antibiot*. 48 (3) 233-242.
- 102. Irwin D, Shin DH, Zhang S, Barr BK, Sakon J, Karplus PA, Wilson DB.(1998). Roles of the catalytic domain and two cellulose binding domains of Thermomonospora fusca E4 in cellulose hydrolysis. *J Bacteriol*. 180(7):1709-14
- 103. Ishihara, H., Hara, N., Iwabuchi, T. (1989). Molecular cloning in E. coli of teh Bacillus licheniformis bacitracin sythetase 2 gene. J. bacteriol. 171: 1705-1711
- 104. Jawetz, E. (1956) Polimixin, Neomycin, Bacitracin Medical Encyclopedia, New York
- 105. Jenkins J, Lo Leggio L, Harris G, Pickersgill R. (1995) Beta-glucosidase, beta-galactosidase, family A cellulases, family F xylanases and two barley glycanases form a superfamily of enzymes with 8-fold beta/alpha architecture and with two conserved glutamates near the carboxy-terminal ends of beta-strands four and seven. *FEBS Lett.* 362(3):281-5
- 106. Jesperson, H.M., MacGregor, E.A., Sierks, M.R. and Svenson, B. (1991). Comaprison of domain level orgaization of starch hydrolases and related enzymes. *Biochem. J.* 280: 51-55.
- 107. Johnson PE, Creagh AL, Brun E, Joe K, Tomme P, Haynes CA, McIntosh LP. (1998). Calcium binding by the N-terminal cellulose-binding domain from Cellulomonas fimi beta-1,4-glucanase CenC. *Biochemistry* 37(37):12772-81
- 108. Joseleau, J.P., Comtat, J. and Ruel, K. (1992). Chemical structure of xylans and their interactions in the plant cell walls. In: progress in Biotechnology, Vol 7: Xylans and Xylanases, 1-15, J. Visser, G. Beldman, M.A.K.-v. Someren and A.G.J. Voragen (eds.). Elesevier, Amsterdam.
- 109. Kaneko S, Kuno A, Fujimoto Z, Shimizu D, Machida S, Sato Y, Yura K, Go M, Mizuno H, Taira K, Kusakabe I, Hayashi K.(1999) An investigation of the nature and function of module 10 in a family F/10 xylanase FXYN of Streptomyces olivaceoviridis E-86 by module shuffling with the Cex of Cellulomonas fimi and by site-directed mutagenesis. *FEBS Lett.* 22;460(1):61-6.
- 110. Karplus, K., C. Barrett, R. Hughey (1999) Hidden Markov models for detecting remote protein homologies, Bioinformatics 14(10):846-856
- 111. Kealey, J.T., Liu, L., Santi, D.V., Betlach, M.C., and Barr, P.J. (1998). Production of a polyketide natural product in nonpoly-ketide-producing prokaryotic and eukaryotic hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 95, 505–509.
- 112. Kellet, L. E., Poole, D. M., Ferreira, L. M. A., Durrant, A. J., Hazlewood, G. P. and Gilbert, H. J. (1990). Xylanase B and an arabinofuranosidase from Pseudomonas fluorescens subsp. cellulosa contain identical cellulose-binding domains and are encoded by adjacent genes. *Biochem J*. 272: 369-376.
- 113. Kleinkauf, H. és von Döhren H. (1987). Biosynthesis of peptide antibiotics Annu. Rev. Microbiol. 41, 259-289

- 114. Knox, J.P., Linstead, P.J., King, J., Cooper, C. and Roberts, K. (1990). Pectin esterification is spatially regulated both within cell walls and between developping tissues of root apices. *Planta* 181: 512-521
- 115. Kohli, R.M., Trauger, J.W., Schwarzer, D., Marahiel, M.A., Walsh, C.T. (2001). Generality of Peptide Cyclization Catalyzed by Isolated Thioesterase Domains of Nonribosomal Peptide Synthetases. *Biochemistry* 40, 7099-7108
- 116. Konz D, Klens A., Schorgendorfer K. and Marahiel M.A. (1997) The bacitracin biosynthesis operon of Bacillus licheniformis ATCC 10716: molecular characterization of three multi-modular peptide synthetases *Chem. Biol.* 4 (12), 927-937 (1997)
- 117. Konz, D. és Marahiel, M.A. (1999). How do peptide synthetases generate structural diversity? Chem. Biol. 6, 39-48.
- 118. Konz D, Doekel S. és Marahiel M.A. (1999). Molecular and biochemical characterization of the protein template controlling biosynthesis of the lipopeptide lichenysin. J. Bacteriol. 181, 133-140.
- 119. Kormelink, F. J. M., Gruppen, H. and Voragen, A. G. J. (1993). Mode of action of (1,4)-β-D-arabinoxylan arabinofuranohydrolase(AXH) and α-L-arabinofuranosidases on alkali-extractable Wheat-flour arabinoxylan. *Carbohydr Res* 249: 345-353.
- 120. Korsnes, L., Gulliksen, O.M., Sundan A., Nerland, A. (1986). Cloning of genes from Bacillus licheniformis involved in synthesis of the peptide antibiotic bacitracin in Bacillus molecular genetics and biotechnology applications. Academic Press, New York. pp 283-293
- 121. Koshland, D.E. (1953). Stereochemistry and mechanism of enzymatic reactions. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 28: 419-436.
- 122. Krätzschmar, J., Krause, M. és Marahiel, A.m. (1989). Gramicidin S biosynthesis operin containing the structural genes grsA and grsB has an open reading frame encoding a protein homologues to fatty acid thioesterase. *J. bacteriol.* 171: 5422-5429
- 123. Krogh A, Brown M, Mian IS, Sjolander K, Haussler D. (1994) Hidden Markov models in computational biology: Applications to protein modeling, *JMB* 235:1501-1531.
- 124. Kuno, A., Kaneko, S., Ohtsuki, H., Ito, S., Fujimoto, Z., Mizuno, H., Hasegawa, T., Taira, K., Kusukabe, I. and Hayashi, K. (2000). Novel sugar-binding specificity of the type XIII xylan-binding domain of a family F/10 xylanase from Streptomyces olivaceoviridis E-86. *FEBS Lett.* 482 231-236.
- 125. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- 126. Laland, S.G. és Zimmer, T. (1973). The protein template mechanism of synthesis for the peptide antibiotics produced by Bacillus licheniformis. *Essays Biochem*. 9. 31-35
- 127. Lambalot RH, Gehring AM, Flugel RS, Zuber P, LaCelle M, Marahiel MA, Reid R, Khosla C, Walsh CT. (1996). A new enzyme superfamily the phosphopantetheinyl transferases. *Chem.Biol.* 3, 923–936.
- 128. Lau J., Fu, H., Cane, D.E. and Khosla, C. (1999). Dissecting the role of acyltransferase domains of modular polyketide synthases in the choice and stereochemical fate of extender units. *Biocehmistry* 38: 1643-1651
- LaVallie, E. R., DiBlasio, E. A., Kovacic, S., Grant, K. L., Schendel, P. F. and McCoy, J. M. (1993). A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the Escherichia coli cytoplasm. *Bio/Technology* 11: 187-193.
- 130. Lawson, D. M., Derewenda, U., Serre, L., Ferri, S., Szittner, R., Wei, Y., Meighen, E. A., and Derewenda, Z. S. (1994) Structure of a myristoyl-ACP-specific thioesterase from Vibrio harveyi. *Biochemistry* 33, 9382-9388.
- 131. Lo Leggio LL, Jenkins J, Harris GW, Pickersgill RW. (2000) X-ray crystallographic study of xylopentaose binding to Pseudomonas fluorescens xylanase A. *Proteins* 41(3):362-73.
- Leslie, A. G. W. (1990) Refined crystal structure of type III chloramphenicol acetyltransferase at 1.75 A resolution. J. Mol. Biol. 213, 167–186
- Lewendon, A., and Shaw, W. V. (1993) Transition state stabilization by chloramphenicol acetyltransferase. Role of a water molecule bound to threonine 174. J. Biol. Chem. 268, 20997–21001
- 134. Li, J., Szittner, R., Derewenda, Z. S., and Meighen, E. A. (1996) Conversion of serine-114 to cysteine-114 and the role of the active site nucleophile in acyl transfer by myristoyl-ACP thioesterase from Vibrio harveyi. *Biochemistry* 35, 9967-9973.
- 135. Libertini, L. J. és Smith, S. (1978) Purification and properties of a thioesterase from lactating rat mammary gland which modifies the product specificity of fatty acid synthetase. *J. Biol. Chem.* 253: 1393-1401
- 136. Lin, G.H., et al., & Liu, S. T. (1998). Molecular cloning and characterization of fengycin synthetase gene fenB from Bacillus subtilis. *J. Bacteriol.* 180, 1338-1341.
- 137. Linder, M. és Teeri, T. T. (1997). The roles and function of cellulose-binding domains. J. Biotechnol. 57 15-28.
- 138. Linne, U., és Marahiel, M.A. (2000). Control of directionality in nonribosomal peptide synthesis: role of the condensation domain in preventing misinitiation and timing of epimerization. *Biochemistry* 39, 10439–10447.
- 139. Little, E., Bork, P. and Doolittle, R. F. (1994). Tracing the spread of fibronectin type III domains in bacterial glycohydrolases. *J Mol Evol.* 39: 631-643.
- 140. Lo Leggio L, Kalogiannis S, Bhat MK, Pickersgill RW. (1999). High resolution structure and sequence of T. aurantiacus xylanase I: implications for the evolution of thermostability in family 10 xylanases and enzymes with (beta)alpha-barrel architecture. *Proteins* 36(3):295-306
- 141. Maat, J., Roza, M., Verbakel, J., Stam, H., Santos da Silva, M.J., Bosse, M., Egmond, M.R., Hagemans, M.L.D., van Gorcom, R.F.M., Hessing, J.G.M., van den Hondel, C.A.M.J.J. and van Rotterdam, C. (1992). Xylanases and their

application in bakery. Progress in Biotechnology, Vol 7: Xylans and Xylanases, 349-360, J. Visser, G. Beldman, M.A.K.-v.Someren and A.G.J. Voragen (eds.) Elsevier, Amsterdam.

- 142. Marahiel, M.A., Zuber, P., Czekay, G. és Losick, R. (1987). Identification of promoter for a peptid antibiotic biosythesis gene from *Bacillus brevis* and its regulation in *Bacillus subtilis*. J. bacteriol. 169: 2215-2222
- 143. Marahiel, M.A., Nakano, M.M. és Zuber, P. (1993) Regulation of peptid antibiotic production in Bacillus. *Mol. Microbiol.* 7:631-636.
- 144. Marahiel, M.A., Stachelhaus, T. és Mootz, H.D. (1997). Modular peptide synthetases involved in non-ribosomal peptide synthesis. *Chem. Rev.*97, 2651-2673.
- 145. Mattevi, A., Obmolova, G., Schulze, E., Kalk, K. H., Westphal, A. H., de Kok, A., and Hol, W. G. J. (1992) *Science* 255, 1544–1550
- 146. Mayer, F., Coughlan, M. P., Mori, Y. and Ljungdahl, L. G. (1983). Macromolecular organisation of the cellulolytic enzyme complex of Clostridium thermocellum as revealed by electron microscopy. *Appl Environ Microbiol.* 53: 2785-2792.
- 147. McCann, M. C., Wells, B. and Roberts, K. (1990). Direct visualisation of cross-links in the primary plant cell wall. *J. Cell Sci.* 96, 323-334.
- 148. McCarter, J.D. és Withers, S.G. (1994). Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Curr. Op. Struct. Biol.* 4: 885-892.
- 149. McCleary, B. V. (1988). Carob and guar galactomannans. Meth. Enzymol. 160, 523-527.
- 150. Mchenney, M. A., Hosted, T. J., Dehoff, B. S., Rosteck, P.R., Jr., and Baltz, R. H. (1998) Molecular cloning and physical mapping of the daptomycin gene cluster from Streptomyces roseosporus. *J. Bacteriol.* 180, 143-151.
- 151. Millward-Sadler SJ, Davidson K, Hazlewood GP, Black GW, Gilbert HJ, Clarke JH (1995) Novel cellulose-binding domains, NodB homologues and conserved modular architecture in xylanases from the aerobic soil bacteria Pseudomonas fluorescens subsp. cellulosa and Cellvibrio mixtus. *Biochem J*. 312:39-48
- 152. Ming-Hong, T., Subrahmanyan, S. and Wakil, S.J. (1993). Roles of Ser101, Asp 236, and His237 in catalysis of thioesterase II and of the C terminal region of the enzyme in its interaction with fatty acid synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 1852-1856
- 153. Modest, B., Marahiel, M. A., Pschorn, W. és Ristow H. (1984). Peptide antibiotics and sporulation: induction of sporulation in asporogenous and peptide-negative mutants of Bacillus brevis. J. Gen. Microbiol. 130, 747-755
- 154. Mootz, H.D. és Marahiel, M.A. (1997). The tyrocidine biosynthesis operon of Bacillus brevis: complete nucleotide sequence and biochemical characterization of functional internal adenylation domains. *J. Bacteriol.* 179, 6843-6850.
- 155. Morris, M. (1994) Primary structural confirmation of components of the bacitracin complex *Biol. Mass Spectrosc*. 23, 61-70.
- 156. Mullis, K. B. and Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chainreaction. *Methods Enzymol.* 155: 335-350.
- 157. Nagy T, Simpson P, Williamson MP, Hazlewood GP, Gilbert HJ, Orosz L (1998) All three surface tryptophans in Type IIa cellulose binding domains play a pivotal role in binding both soluble and insoluble ligands. *FEBS Lett.* 16; 429(3):312-6.
- 158. Nakano MM, Magnuson R, Myers A, Curry J, Grossman AD, Zuber P. (1991) srfA is an operon required for surfactin production, competence development, and efficient sporulation in Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 173 (5), 1770-1778
- 159. Natesh R, Bhanumoorthy P, Vithayathil PJ, Sekar K, Ramakumar S, Viswamitra MA. (1999). Crystal structure at 1.8 A resolution and proposed amino acid sequence of a thermostable xylanase from Thermoascus aurantiacus. J Mol Biol. 288(5):999-1012
- 160. Neumuller AM, Konz D, Marahiel MA. (2001) The two-component regulatory system BacRS is associated with bacitracin 'self-resistance' of Bacillus licheniformis ATCC 10716. *Eur J Biochem*. 268(11):3180-9
- 161. Newton, G.G. és Abraham, E.P. (1953) Some peptides of bacitracin polypetides. Biochem. J. 53: 597-604.
- 162. Nicholson WL, Setlow P. (1990) Dramatic increase in negative superhelicity of plasmid DNA in the forespore compartment of sporulating cells of Bacillus subtilis. *J. Bacteriol*. 1990 Jan;172(1):7-14.
- 163. Nissen, A.M., Anker, L., Munk, N. and Krebs Lange, N. (1992) Xylanases for the pulp and paper industry. Amsterdam, Elesevier.
- 164. Notenboom V, Birsan C, Nitz M, Rose DR, Warren RA, Withers SG. (1998). Insights into transition state stabilization of the beta-1,4-glycosidase Cex by covalent intermediate accumulation in active site mutants. *Nat Struct Biol.* 5(9):812-8
- 165. Notenboom V, Williams SJ, Hoos R, Withers SG, Rose DR. (2000) Detailed structural analysis of glycosidase/inhibitor interactions: complexes of Cex from Cellulomonas fimi with xylobiose-derived aza-sugars. *Biochemistry* 39(38):11553-63.
- 166. Nunberg J.H., Meade J.H., Cole G., Lawyer F.C., McCabe P., Schweickart V., Tal R., Wittman V.P., Flatgaard J.E., Innis M.A. (1984) Molecular cloning and characterization of the glucoamylase gene of Aspergillus awamori. *Mol. Cell. Biol.* 4:2306-2315.
- 167. Pauly, M., Albersheim, P., Darvill, A. and York, W. S. (1999). Molecular domains of the cellulose/xyloglucan network in the cell walls of higher plants. *Plant J.* 20, 629-39.

- 168. Pazirandeh, M., Chirala, S.S. és Wakil, S.J. (1991) Site-directed mutagenesis studies on the recombinant thioesterase domain of chicken fatty acid synthase expressed in Escherichia coli *J. Biol. Chem.* 266: 20946-20952.
- 169. Pickersgill RW, Jenkins JA, Scott M, Connerton I, Hazlewood GP, Gilbert HJ. (1993). Crystallization and preliminary X-ray analysis of the catalytic domain of xylanase a from Pseudomonas fluorescens subspecies cellulosa. J Mol Biol 229(1):246-8
- 170. Podlesek Z, Comino, A., Herzog-Velikonja, B., Zgur-Bertok, D., Komel, R. and Grabnar, M. (1995) Bacillus licheniformis bacitracin-resistance ABC transporter: relationship to mammalian multidrug resistance. *Mol. Microbiol.* 16 (5), 969-976
- 171. Poutanen, K. (1988). An α-L-arabinofuranosidase of T. reesei. J. Biotechn. 17: 271-282
- Prágai Z., Holczinger, A. és Sík, T. (1994/a) Transformation of Bacillus licheniformis protoplasts by plasmid DNA. *Microbiology* 140: 305-310
- 173. Prágai, Z., Tran, S.L.P., Nagy, T. Fülöp, L., Holczinger, A. és Sík, T. (1994/b). Transposon Tn917PF1 mutagenesis in Bacillus licheniformis. *Microbiology* 140, 3091-3097
- 174. Prinz WA, Aslund F, Holmgren A, Beckwith J.(1997). The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the Escherichia coli cytoplasm. *J. Biol. Chem.* 272(25):15661-15667.
- 175. Puls, J. and Schuseil, J. (1993). Chemistry of hemicelluloses: relationship between hemicellulose structure and enzymes required for hydrolysis. In: Hemicellulose and Hemicellulases, pp1-27. M. P. Coughlan and G. P. Hazlewood (eds.). London, Portland Press Ltd.
- 176. Quicho, F.A. (1986). Carbohydrate-binding proteins: tertiary structures and protein-sugar interactions. *Annu. Rev. Biochem.* 55: 287-315.
- 177. Ragauskas, A.J., Poll, K.M. and Cesternino, A.J. (1994). Effects of xylanase pretreatment procedures on nonchlorine bleaching. *Enzyme Microbiol Technol.* 16: 492-495.
- 178. Ranganathan A, Timoney M, Bycroft M, Cortes J, Thomas IP, Wilkinson B, Kellenberger L, Hanefeld U, Galloway IS, Staunton J, Leadlay PF. (1999). Knowladge-based design of bimodular and trimodular polyketide synthases based on domain and module swaps: route to simple stain analogues. *Chem. Biol.* 6: 731-741
- 179. Reuter, K., Mofid, M.R., Marahiel, M.A., and Ficner, R. (1999). Crystal structure of the surfactin synthetaseactivating enzyme Sfp: a prototype of the 49-phosphopantetheinyl transferase superfamily. *EMBO J.* 18, 6823– 6831.
- Russell, G. C., Machado, R. S., and Guest, J. R. (1992) Overproduction of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex of Escherichia coli and site-directed substitutions in the E1p and E2p subunits. *Biochem. J.* 287, 611–619
- 181. Ruttenberg, M.A., and Mach, B. (1966). Studies on amino acid substitution in the biosynthesis of the antibiotic polypeptide tyrocidine. *Biochemistry* 5, 2864–2869.
- 182. Sakamoto, T., Yamada, M., Kawasaki, H. and Sakai, T. (1997). Molecular cloning and nucleotide sequence of an endo-1,5-α-arabinase gene from Bacillus subtilis. *Euro J Biochem*. 245: 708-714.
- 183. Sakka, K., Takada, G., Karita, S. and Ohmiya, K. (1996). Identification and characterization of cellulose-binding domains in xylanases A of Clostridium stercorarium. *Methods. Enzymol.* 278: 151-190.
- 184. Sakon J, Irwin D, Wilson DB, Karplus PA. (1997). Structure and mechanism of endo/exocellulase E4 from Thermomonospora fusca. *Nat. Struct. Biol.* 4(10):810-8
- 185. Sambrook J és Russel DW The condensed Protocols From Molecular Cloning: A laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York, 1989
- 186. Schmidt A, Schlacher A, Steiner W, Schwab H, Kratky C (1998) Structure of the xylanase from Penicillium simplicissium. *Protein Sci*, 7: 2081
- 187. Schmidt A, Gubitz G, Kratky C (1999) Xylan binding subsite mapping int he xylanase from Penicillium simplicissimum using xylooligosaccharides as cryo protectant. *Biochemistry* 38: 2403
- 188. Schneider, A and Marahiel, M. A. (1998) Genetic evidence for a role of thioesterase domains, integrated in or associated with peptide synthetases, in non-ribosomal peptide biosynthesis in Bacillus subtilis. Arch. Microbiol.169, 404-410.
- Shaw, W. V. (1983) Chloramphenicol acetyltransferase: enzymology and molecular biology. Crit. Rev. Biochem. 14, 1–46
- 190. Shaw, W. V. (1994) Chemical anatomy of antibiotic resistance: chloramphenicol acetyltransferase. Sci. Prog. Oxford 76, 565–580
- 191. Shaw-Reid, C. A., Kelleher, N. L., Losey, H. C., Gehring, A M., Berg, C., and Walsh, C. T. (1999) Assembly line enzymology by multimodular nonribosomal peptide synthetases: the thioesterase domain of E. coli EntF catalyzes both elongation and cyclolactonization. *Chem. Biol.* 6, 385-400.
- 192. Shimon LJW, Pages S, Belaich A, Belaich JP, Bayer EA, Lamed R, Shoham Y, Frolow, F (2000) Structure of a family IIIa scaffold CBD from the cellulosome of clostridium cellullilyticum at 2.2 A resultion. Acta crystallogr. SectD V. 56. 1560
- 193. Siegel, M. M., Huang, J., Lin, B., and Tsao, R. (1994) Structures of bacitracin A and isolated congeners: sequencing of cyclic peptides with blocked linear side chains by electrospray ionization mass spectrometry. *Biol. Mass Spectrosc.* 23, 196-204.
- 194. Silvian, L.F., Wang, J., and Steitz, T.A. (1999). Insights into editing from an Ile-tRNA synthetase structure with tRNAIle and mupirocin. *Science* 285, 1074–1077.

- 195. Simpson, P. J., Bolam, D. N., Cooper, A., Ciruela, A., Hazlewood, G. P., Gilbert, H. J. and Williamson, M. P. (1999). A family IIb xylan binding domain has a similar secondary structure to a homologous family IIa cellulose binding domain but different ligand specificity. *Structure* 7: 853-864.
- 196. Simpson, P. J., Hefang, X, Bolam, D.N., Gilbert, H.J. and Williamson, M.P. (2000). The structural basis for the ligand specificity of Family 2 carbohydrate binding modules. *J. Biol. Chem.* 275(52):41137-42.
- 197. Smith, S. (1994). The animal fatty acid synthase: one gene, one polypeptide, seven enzymes. *FASEB J.* 8, 1248–1259.
- 198. Souchon H, Spinelli S, Beguin P, Alzari PM. (1994) Crystallization and preliminary diffraction analysis of the catalytic domain of xylanase Z from Clostridium thermocellum. *J Mol Biol.* 235(4):1348-50.
- 199. Spezio, M., Wilson, D. B. and Karplus, P. A. (1993). Crystal structure of the catalytic domain of a thermophilic endocellulase. *Biochem.* 32: 9906-9916.
- 200. Stachelhaus, T. és Marahiel, M.A. (1995/a). Modular structure of genes encoding multifunctional peptide synthetases required for non-ribosomal peptide synthesis *FEMS Microbiol. Lett.* 125, 3-14
- 201. Stachelhaus, T. és Marahiel, M.A. (1995/b). Modular structure of peptide synthetase revealed by dissection of the multifunctional enzyme GrsA. J. Biol. Chem. 270: 6163-6169
- 202. Stachelhaus, T., Mootz, H.D., Bergendahl, V. és Marahiel, M.A. (1998). Peptide bond formation in nonribosomal peptide biosynthesis. Catalytic role of the condensation domain. *J. Biol. Chem.* 273, 22773-22781.
- 203. Stachelhaus, T., Mootz, H.D. és Marahiel, M.A. (1999) The specificity-conferring code of adenylation domains in nonüribosomal peptide synthetases. *Chem. Biol.* 6(8) 493- 505
- 204. Stein, T., Kluge, B., Vater, J., Franke, P., Otto, A., and Wittmann-Liebold, B. (1995) Gramicidin S synthetase 1 (phenylalanine racemase), a prototype of amino acid racemases containing the cofactor 4'-phosphopantetheine. *Biochemistry* 34, 4633-4642.
- 205. Stein, T., Vater, J., Kruft, V., Otto, A., Wittmann-Liebold, B., Franke, P., Panico, M., McDowell, R., and Morris, H. R. (1996). The multiple carrier model of nonribosomal peptide biosynthesis at modular multienzymatic templates. *J. Biol. Chem.* 271, 15428-15435.
- 206. Steller, S., et al., & Vater, J. (1999). Structural and functional organization of the fengycin synthetase multienzyme system from Bacillus subtilis b213 and A1/3. *Chem. Biol.* 6, 31-41.
- 207. Studier, F. W. és Moffat, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct the selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189 113-130.
- 208. Studier, F. W., Rosenberg, H., Dunn, J. J. and Dubendorff, J. W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Meth. Enzymol.* 185 60-89.
- 209. Sunna, A., Gibbs, M. D. and Bergquist, P. L. (2000). The thermostabilizing domain, XynA, of Caldibacillus cellulovorans xylanase is a xylan binding domain. *Biochem. J.* 346 583-586.
- 210. Tai, M.H., Subrahmanyam, S.C., és Wakil, S.J. (1993). Roles of Ser101, Asp236 and His237 in catalysis of thioesterase II and the C terminal reegion of the enzyme in its inetraction with fatty acid synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 90: 1852-1856.
- 211. Terri, T.T. (1997). Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. *TIBTECH*. 15: 160-167.
- 212. Tomme, P. Van Tilbeurgh, H., Petterson, G., Van Damme, J., Vandekerckhove, J., Knowles, J., Teeri, T. and Claeyssens, M. (1988). Studies of the cellulolytic system of Trichoderma reesei QM9414. Analysis of domain function in two cellobiohydrolases by limited proteolysis. *Eur. J. Biochem.* 170: 575-581
- 213. Tomme, P., Warren, R. A. J. and Gilkes, N. R. (1995). Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. Adv Micro Physiol. 37: 1-81.
- 214. Traber, R., ed. (1997). Biosynthesis of Cyclosporins (New York:Marcel Decker, Inc.).
- 215. Tran PLS, Szabó L, Orosz L, Sík T, Holczinger A. (1998) Construction of a single-copy integration vector and its use to study gene expression in Bacillus licheniformis. *Microbiology*, 144 (Pt 9):2573-8.
- 216. Turgay, K., Krause, M., and Marahiel, M.A. (1992). Four homologous domains in the primary structure of GrsB are related to domains in a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Mol. Microbiol.* 6, 2743–2744.
- 217. Varner, J. E. and Lin, L. S. (1989). Plant cell wall architecture. Cell 56: 231-239.
- 218. Vater, J. és Kleinkauf, H. (1975). Substrate specificity of the amino acyl adenylate activation sites of gramicidin Ssynthetase (GSS). *Acta. Microbiol. Acad. Sci. Hung.* 22, 419-425.
- 219. Viswamitra MA, Bhanumoorthy P, Ramakumar S, Manjula MV, Vithayathil PJ, Murthy SK, Naren AP. (1993) Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of crystals of Thermoascus aurantiacus xylanase. J Mol Biol. 232(3):987-8
- 220. Voragen, A.G.J. Geerst, F. and Pilnik, W. (1982). Use of enzymes in Food technology. Paris, Lavoisier.
- 221. Vranska, M. and Beily, P. (1992) The cellobiohydrolase I from Trichoderma reesei QM 9414: action on cellooligosacharides. *Carbohydrate Res.* 227: 19-27.
- 222. Vyas, N.K. (1991). Atomic features of protein carbohidrate interactions. Curr. Opin. Struct. Biol. 1:732-740.
- 223. van Wageningen A.M., Kirkpatrick, P., Williams, D., Harris, B., Kershaw, J., Lennard, N., Jones, M., Jones, S., and Solenberg, P. (1998) Sequencing and analysis of genes involved in the biosynthesis of a vancomycin group antibiotic. *Chem. Biol.* 5, 155-162.
- 224. Wakil, S.J., Joshi, V.C. és Stoops, J.K. (1983). Fatty acid synthesis and its regulation. Annu. Rev. Biochem. 52: 537-539

- 225. Wakil, S.J. (1989). Fatty acid synthase, a proficient multifunctional enzyme. Biochemistry 28, 4523-4530.
- 226. Warren, R.A.J. (1996). Microbial hydrolysis of polysaccharides. Ann. Rev. Microbiol. 50: 183-212.
- 227. Weber T. és Marahiel M.A. (2001) Exploring the Domain Structure of Modular Nonribosomal Peptide Synthetases. *Structure*, 9(1) R3-R9
- 228. Weinreb, P.H., Quadri, L.E., Walsh, C.T. és Zuber, P. (1998). Stoichiometry and specificity of in vitro phosphopantetheinylation and aminoacylation of the valine-activating module of surfactin synthetase. *Biochemistry* 37, 1575-1584.
- 229. White A, Withers SG, Gilkes NR, Rose DR (1994) Crystal structure of the catalytic domain of the beta-1,4glycanase cex from Cellulomonas fimi. *Biochemistry* 33(42):12546-52
- 230. Willey, J., Santamaria, R., Guijarro, J., Geistlich, M. és Losick R. (1991) Extracellular complementation of a developmental mutation implicates a small sporulation protein in aerial mycelium formation by S. coelicolor. *Cell* 65, 641-650
- 231. Wilson, C. and Wood, T.M. (1992) The anaerobic fungus Neocallimastrix frontalis: isolation and properties of a cellulosome-type enzyme fraction with the capacity of solubize hydrogen-bond-ordered cellulose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37: 125-129.
- 232. Winterhalter, C, Heinrich, P., Candussio, A, Wich, G. and Liebl, W. (1995). Identification of a novell cellulose binding domain within the multidomain 120 kDa xylanase XynA of the hyperthermophylic bacterium Thermotoga maritima. *Mol. Microbiol.* 15: 431-444.
- 233. Withers SG és Aebersold R. (1995) Approaches to labeling and identification of active site residues in glycosidases. *Protein Sci.* 4(3):361-72.
- 234. Wong K.K.Y., Tan, L.U.L. and Saddler, J.N. (1988). Multiplicity of β-1,4-xylanases in microorganism: function and applications. *Microbiol. Rev.* 52: 305-317.
- 235. Wood W.B.(1966). Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*: bacterial mutations affecting the restriction and modification of DNA. *J. Mol. Biol.* 16(1):118-33.
- 236. Wood, T. M., Wilson, C.A. and Stewart, C.S. (1992). Preparation of cellulase from the cellulolytic anaerobic rumen bacterium Ruminococcus albus and its release from the bacterial cell wall. *Biochem. J.* 205: 129-137.
- 237. Xie, H (2000). Understanding the interaction between xylan-binding domains and their target ligands. PhD Thesis.
- 238. Xu, G. Y., Ong, E., Gilkes, N. R., Kilburn, D. G., Muhandiram, D. R., Harris-Brandts, M., Carver, J. P., Kay, L. E., Harvey, T. S. (1996) Solution structure of a cellulose-binding domain from by chemical modification. *Protein Sci.* 5(11):2311-8.
- 239. Xue, Y., Zhao, L. Liu, H.-W., Sherman. D.H. (1998) A gene cluster for macrolide antibiotic biosynthesis in Streptomyces venezuelae: architecture of metabolic diversity, *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 95 12111-12116.
- 240. Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33 103-119.
- 241. Yui, T., Miyawaki, K., Yada, M. and Ogawa, K. (1997). An evaluation of crystal structure of mannan I by X-ray powder diffraction and molecular mechanics studies. Internat. J. Biol. Macromol. 21, 243-250.
- 242. Zocher, R., Nihira, T., Paul, E., Madry, N., Peeters, H.,Kleinkauf, H., and Keller, U. (1986) Biosynthesis of cyclosporin A: partial purification and properties of a multifunctional enzyme from Tolypocladium inflatum. *Biochemistry* 25, 550-553.

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm feleségemnek Gyöngyinek és a gyerekeknek Bencének és Tominak a dolgozat befejezéséhez nyújtott támogatást, segítséget és türelmüket amivel a "nehéz napok" előtt és alatt irányomban viseltettek. Köszönöm szüleimnek, hogy mindig hittek abban, hogy ez a dolgozat egyszer még elkészül és minden lehetséges módon támogatták és segítették is ezt.

Köszönöm Dr. Holczinger András Tanár Úrnak és Dr. Sík Tibor Professzor Úrnak a segítőkész témavezetést, a dolgozat megírásában nyújtott segítséget és mindazt a sok mindent amit tőlük a szakmáról és az életről tanultam. Köszönöm szépen Dr. Orosz László Akadémikus Úrnak, hogy lehetőséget biztosított tanszékén a kísérleti munka elvégzéséhez és köszönöm aktív részvételét a házi védés és a szigorlati vizsga emberközeli lebonyolításában. Köszönöm Dr. Prágai Zoltánnak azt a tudást és gyakorlati tapasztalatot és életfelfogást amit az együttmunkálkodásunk során átadott. Köszönöm Arnoldnak, Barbinak, Tominak, Attilának, Balázsnak, Zsuszkának és Dettinek azt a baráti és inspiratív környezetet amiben a doktori évek elteltek. Köszönöm Dr. Semsey Szabolcsnak a műhelyvitában való értékes közreműködését.

Köszönöm Dr. Harry J. Gilbert Professzor Úrnak, hogy lehetővé tette és segítette a növényi sejtfal bontással kapcsolatos kísérletek elvégzését és a megfelelő következtetések levonását. Köszönöm Dr. Ponyi Tamásnak a lehetőséget, hogy Angliába kijussak, és köszönöm neki a dolgozat befejezése során végzett gondos kritika munkásságot és a házi védés és a szigorlat megrendezésében és sikeres lebonyolításában nyújtott segítséget. Köszönöm Dr. Dave M. Bolam-nak, Dr. Simon J. Charnock-nak és Dr. Nagy Tibornak az angliai tevékenységemben nyújtott segítséget és a kellemes társaságot. Köszönöm Dr. Gideon J. Davies Professzor Úrnak és csapatának a kellemes légkört és a lehetőséget, hogy a fehérje kristályosítás rejtelmeiben elmerülhettem.

Köszön Dr. Ronen Tchelet-nek a támogatást és ösztönzést amivel jelentősen hozzájárult a dolgozat befejezéséhez.