

Szent István Egyetem

Enzim analízis technikák a géndózis
változtatásától a térszerkezet meghatározásig,
avagy a tioészteráz enzim Bacitracin bioszintézisben betöltött
szerepének meghatározása, illetve növényi sejtfalbontásban
résztvevő enzimek vizsgálata

Doktori értekezés tézisei

Szabó Lóránd

2006.

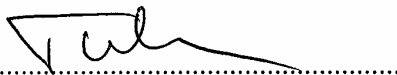
A doktori iskola

megnevezése: Biológia Tudományi Doktori Iskola
tudományága: biológia tudományok

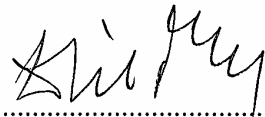
vezetője: Dr. Tuba Zoltán
tanszékvezető, egyetemi tanár
SZIE, Mezőgazdasági és Környezettudományi Kar,
Növénytani és Növényélettani Tanszék

témavezető: Dr. Sík Tibor
professzor emeritus
Szent István Egyetem
Gödöllő

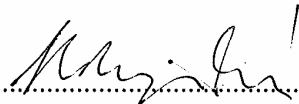
Dr. Holczinger András
egyetemi adjunktus
BME
Mezőgazdasági Kémiai Technológia Tanszék –
Fermentációs Kísérletiüzemi Laboratórium
Budapest



.....
Az iskolavezető jóváhagyása



.....
A témavezető jóváhagyása



.....
A témavezető jóváhagyása

Előszó

A dolgozat egy angliai, majdnem 2 éves tanulmányútnak köszönhetően két részből épül fel. Az első rész a bacitracin peptid-antibiotikum szintézisben esszenciális tioészteráz enzim klónozását és funkciójának azonosítását taglalja. A második rész 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-ben készült el. Hosszú időt fiókban töltött, majd néhány formai változás után 2006-ban 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. A munka előzményei, a kitűzött célok

A molekuláris módszerek robbanásszerű fejlődése átalakította a gyógyszer hatóanyag keresés menetét. A korábbi véletlenszerű próbálgatást felváltotta egy racionálisabb, a kiváltó ok megszüntetését célzó eljárás bevezetése. Először azonosítják a kórkép okának molekuláris mechanizmusát, majd keresik azokat a „molekulákat”, amelyek képesek a kiváltó ok (patogén organizmus, enzim vagy regulátor nem megfelelő, vagy túlzott expressziója) célzott megszüntetésére nagy áteresztőképességű vizsgáló rendszerekben (HTS: high throughput screening). Az igazi limitációt ebben az eljárásban a rendelkezésre álló, tesztelhető „molekulák” száma határozza meg.

Nagyon sok olyan kémiai szerkezet létezik, amelynek megfelelő, tesztelhető mennyiségben történő előállítása szintetikus úton nehézkes vagy lehetetlen (nagy molekulatömeg, sok királis centrum stb.), biológia úton azonban előállítható megfelelő baktérium vagy gomba törzs segítségével. 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 és a bioszintézisben esszenciális enzim komponenseket.

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

Munkánk során a bacitracin szintetáz kódoló DNS fragment környezetében kódolt, a nem-riboszómális peptidszintézisben fontos, de még nem jellemzett enzim lokalizálását és szerepének meghatározását tűztük ki célul.

1.2. Az irodalom áttekintése

A bacitracin peptidantibiotikumot sokáig hozamfokozó takarmány-kiegészítő komponensként használták, a hozamfokozó antibiotikumok betiltása után humán felhasználása kapott teret.

A több komponensből álló bacitracin peptidantibiotikum keveréket a *Bacillus licheniformis* sejtek a stacioner fázis kezdetén szintetizálják. 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**)

1.2.1. Peptid bioszintézis multienzim komplexen

A nem-riboszómális peptidszintézis folyamatában az adott peptid minden aminosavának beépítéséért egy-egy, 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) (**1.2.1.1. ábra**). 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/b; Stein et al. 1996; Marahiel et al. 1997; van Wageningen et al. 1998; Cane és Walsh, 1999).

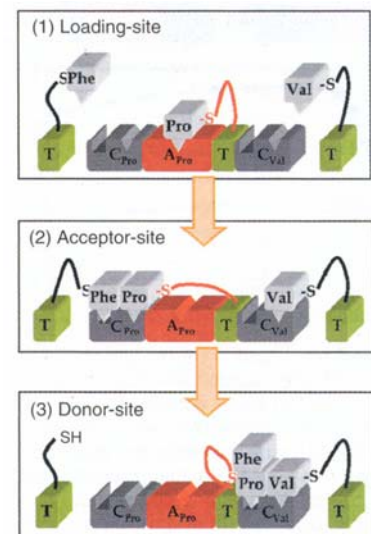
Az *adenilációs domén* a peptid termék adott pozícióba építendő aminosavának specifikus felismeréséért és ATP jelenlétében történő aciladenilát képzésért, azaz az aminosav specifikus aktiválásáért felelős. A különböző eredetű adenilációs doméneket hasonlóságuk, illetve a szubsztrát kötő zseb tulajdonsága és mérete alapján specifikussági csoportokba osztották (Stachelhaus et al. 1999; Challis et al. 2000), így az újonnan azonosított adenilációs domének szubsztrát specifikussága nagy pontossággal előre jelezhető.

Az adenilációs domén által aktivált aminosav a 60-80 aminosavból felépülő *peptid-tartó domén* 4' foszfoantotén karjához 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. A PCP domén kitüntetett szerinjéhez a 4' foszfoantotén karral a 4'PP transzferázok kapcsolják CoA-SH felszabadulása közben, ATP felhasználásával (Lambalot et al. 1996)

A *módosító domén* nem része a minimális modulnak, azaz csak azokban a modulokban van jelen, ahol az aminosav módosul, mielőtt beépülne a szintetizálódó peptidláncba. Leggyakrabban epimerizáció történik, ami az adott aminosavat az L-formából D-formába alakítja. A cisztein és szerin vagy treonin oldalláncok között kialakuló heterociklikus gyűrű szintéziséért a heterocikláz (HC) domén a felelős (Konz et al. 1997). Az eukariótákban az amino csoport metilálása a metilációs doméneken megy végbe (Zocher et al. 1986).

A *kondenzációs domén* a peptidkötés kialakításáért felelős. A peptidszintetázok legelső modulja nem tartalmaz kondenzációs domént, ezek az iniciációs modulok. Az elongációs modulok nem képesek a peptidszintézis inicializálására, és mindaddig áll a peptidszintézis, amíg a kondenzációs domén akceptor helyére nem kerül az előző modul által specifikusan aktivált aminosav (Stachelhaus et al. 1998).

Az összes bakteriális és néhány gomba eredetű peptidszintetáz utolsó aminosav beépítéséért felelős moduljának C-terminálisán egy 250 aminosavból álló, az elkészült peptidlánc 4'foszfoantotén karról történő lehasadását katalizáló *tioészteráz domén* található (Schneider és Marahiel, 1998; Shaw-Reid et al. 1999).



1.2.1.1. ábra A nem-riboszómális peptidszintézis folyamata (átvéve: Belshaw et al. 1999)

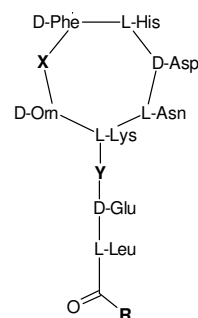
1.2.2. A bacitracin szintetáz

A *Bacillus licheniformis* sejtek a stacioner fázis kezdetén 12 aminosavból felépülő, tiazolin gyűrűt tartalmazó, elágazó, ciklikus peptideket, bacitracint, állítanak elő. A legnagyobb mennyiségben termelődő komponens a bacitracin A (1.2.2.1. ábra). (Ikai et al. 1994; Morris, 1994; Siegel et al. 1994; Epperson és Ming, 2000). A minor komponensek az 1.2.2.1. ábrán X és Y jelzett pozíciókban, illetve a tiazolin gyűrű első aminosavában térnek el egymástól. A minor komponensek közül az amino-tiazolin gyűrűt (1.2.2.1. ábra A, B) tartalmazó Bacitracin A-E szerkezetek biológiailag aktív struktúrákat takarnak, míg a keto-tiazolin gyűrűt (1.2.2.1. ábra C, D) tartalmazó komponensek biológiailag inaktívak.

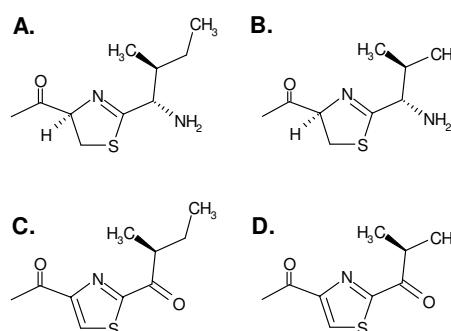
A dodekapeptidet tiotemplát mechanizmussal a 3 alegységből felépülő multienzim komplex, a bacitracin szintetáz állítja elő. Bacitracin szintézisre képtelen Tn917PF1 transzpozonos mutánsok segítségével a szintetáz részleges fizikai térképét elkészítették (Prágai et al. 1994b), az alegységeket kódoló DNS fragmentet átíró promotert izolálták, és a transzkripció iniciáció pontos helyét primer extenzióval meghatározták (Prágai, nem publikált).

A bacitracin szintetáz alegységeit kódoló 45 kb-os DNS fragmentet szekvenálták (Konz et al. 1997) (1.2.2.2. ábra). A szintetáz alegységeit kódoló DNS fragmenttől (*bacA*, *bacB*, *bacC*) downstream egy kétkomponensű regulátor rendszer két elemét (*bacR*, *bacS*), ezektől downstream pedig a

| Bacitracin | X | Y | 1. hely | R |
|----------------|-------|-------|---------|---|
| A | L-Ile | L-Ile | L-Ile | A |
| B ₁ | L-Ile | L-Ile | L-Val | B |
| B ₂ | L-Val | L-Ile | L-Ile | A |
| B ₃ | L-Ile | L-Val | L-Ile | A |
| D ₁ | L-Val | L-Ile | L-Val | B |
| D ₂ | L-Ile | L-Val | L-Val | B |
| D ₃ | L-Val | L-Val | L-Ile | A |
| E | L-Val | L-Val | L-Val | B |
| F | L-Ile | L-Ile | L-Ile | C |
| H ₁ | L-Ile | L-Ile | L-Val | D |
| H ₂ | L-Val | L-Ile | L-Ile | C |
| H ₃ | L-Ile | L-Val | L-Ile | C |
| I ₁ | L-Val | L-Ile | L-Val | D |
| I ₂ | L-Ile | L-Val | L-Val | D |
| I ₃ | L-Val | L-Val | L-Ile | C |



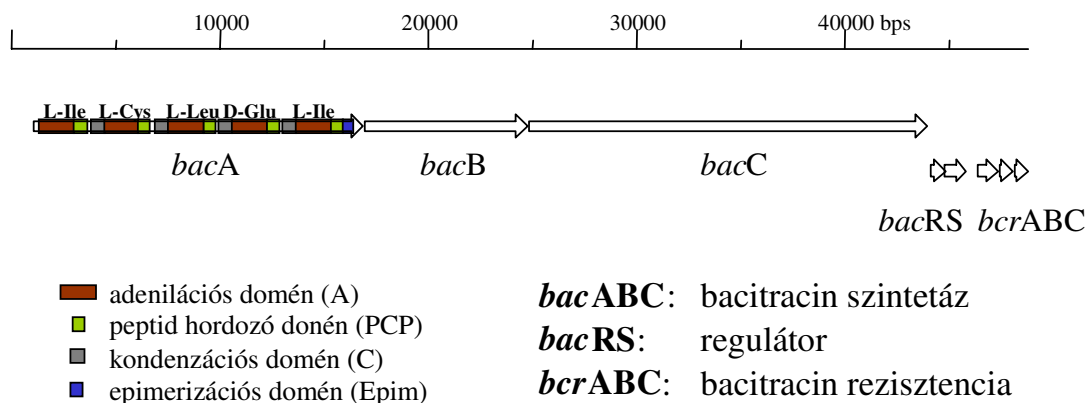
1.2.2.1. ábra A bacitracin peptid antibiotikum komplex



bacitracin rezisztencia kialakításában szerepet

játszó, eukarióta ABC transzportterekhez hasonló fehérjét kódoló DNS fragmentet azonosítottak (*bcrA*, *bcrB*, *bcrC*) (Podlasek et al. 1995). Megállapították, hogy a kétkomponensű regulátor szenzorának (*bacS*) inaktiválása nem befolyásolta a bacitracin szintetáz alegységeit kódoló DNS fragment átírását, hanem a sejtek bacitracin érzékenységét fokozta. (Neumuller et al. 2001).

A bacitracin rezisztenciát kódoló DNS fragment amplifikálása a bacitracin rezisztencia



1.2.2.2. ábra. A bacitracin szintézisben résztvevő fehérjéket kódoló DNS fragment szerkezete (AF007865)

növekedésén kívül egyes törzsek esetében a bacitracin termelés növekedését is okozta. (Podlasek et al. 1995)

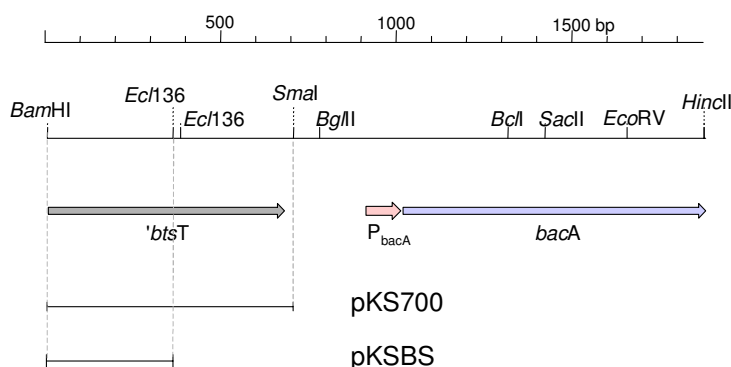
1.3. Anyag és módszer

A vizsgálatokban kereskedelmi forgalomban beszerezhető anyagokat és vegyszereket használtunk (SIGMA, Reanal). A használt *E. coli* törzsek (*E. coli* DH5 α , *E. coli* XL1-Blue) kereskedelmi forgalomban beszerezhetőek, a *Bacillus licheniformis* (*B. licheniformis* 19, *B. licheniformis* 19F4) törzsek pedig olyan, a laborban korábban azonosított és jellemzett baktérium törzsek voltak, melyek származékait a Phylaxiában bacitracin termelésre használták. A alap plazmidok irodalomban leírt (pQF50) vagy kereskedelmi forgalomban (pBlueScript II KS) beszerezhető konstrukciók voltak. A dolgozatban leírt konstrukciókat az alap plazmidokból a standard molekuláris technikák

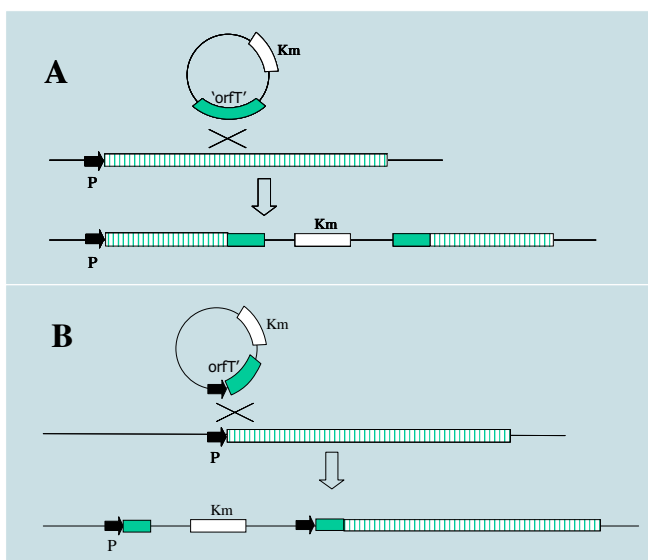
felhasználásával állítottuk elő. A *Bacillus licheniformis* törzseket Prágai et al. 1994/a szerint végeztük. A *lacZ* fúziós gének β -galaktozidáz aktivitását Nicolson és Setlow (1990) alapján mértük. A szekvencia összehasonlításokat és vizsgálatokat a Wisconsin Package, Version 8 programcsomag segítségével végeztük.

1.4. Eredmények

Rendelkezésünkre állt egy bacitracint nem termelő transzpozonos mutánsból izolált, a bacitracin szintetáz promóterét tartalmazó DNS fragment. (Prágai, nem publikált) (1.4.1. ábra). A promótertől upstream elhelyezkedő, esetleges bacitracin szintézisben szerepet játszó gén azonosításának érdekében a fragment még nem vizsgált *Bam*HI-*Sma*I részét pBlueScript II KS vektorba klónoztuk és szekvenáltuk. A 705 bp-os fragmenten egy ORF-et találtunk, melyből a származtatott fehérje jelentős



1.4.1. ábra. A bacitracin szintetáz promóterét (P_{bacA}) is tartalmazó DNS fragment szerkezete



1.4.2. ábra. Campbell típusú integráció esetei

A: belső fragment integrációja esetén a gén inaktívulódik.

B: a gén elejét vagy végét tartalmazó konstrukció integrációja esetén a gén egyik példányra nem sérül

hasonlóságot mutatott eukarióta tioészteráz II fehérjékhez és prokarióta, a peptidszintetáz alegységeket kódoló ORF-ekkel egy átírási egységben elhelyezkedő, tioészteráz-szerű fehérjékkel. A tioészterázokhoz való hasonlóság alapján az ORF-et *orfT*-nek neveztük el. Az összehasonlítások alapján az ORF eleje nem volt a klónozott fragmenten. Az *orfT* bacitracin bioszintézisben betöltött szerepének tisztázásához olyan konstrukciót hoztunk létre, amely integrációja esetén inaktívulálja az ORF-et. (1.4.2. ábra A eset). Az ORF belső fragmentjét tartalmazó konstrukcióval transzformált, eredetileg Bt szintézisre képes sejtekből képzett *B. licheniformis* protoplasztokat szelektív táptalajon regeneráltuk, és a szelektív körülmények között is osztódni képes sejtek alkotta telepek Bt termelését *Micrococcus*

flavus indikátor baktérium felhasználásával megvizsgáltuk. A plazmid konstrukciót az *orfT*-be integrálva hordozó telepek bacitracin antibiotikum termelése az eredeti szint 10 %-ára csökkent. Ez az eredmény azt mutatta, hogy az *orfT*-nek szerepe van a bacitracin szintézisben, és így *btsT*-nek neveztük el.

A *btsT* ORF inaktívulása, azaz a BtsT fehérje hiánya a bacitracin bioszintézis jelentős csökkenését eredményezte. A kérdés az volt, hogy a BtsT fehérje sejten belüli koncentrációjának növelése miként hat a bacitracin bioszintézisre. A BtsT fehérje sejten belüli koncentráció növelésének egyik módja a BtsT fehérjét expresszáló DNS fragment nagy kópiaszámú plazmidon történő sejtebe juttatása. Ehhez, a már rendelkezésre álló *Bacillus licheniformis*ban is replikálódó, nagy kópiaszámú plazmidon kívül szükség van a teljes *btsT* ORF-re és az ORF-et átíró promóterre is.

Mivel a korábban izolált DNS fragment nem tartalmazta a teljes *btsT* ORF-et, a teljes *btsT* gén klónozásához a genom-walking technikát használtuk. Az módszer segítségével izolált, teljes *btsT* ORF-et tartalmazó fragmentet szekvenáltuk. Más prokarióta, a peptidszintetáz alegységeit kódoló

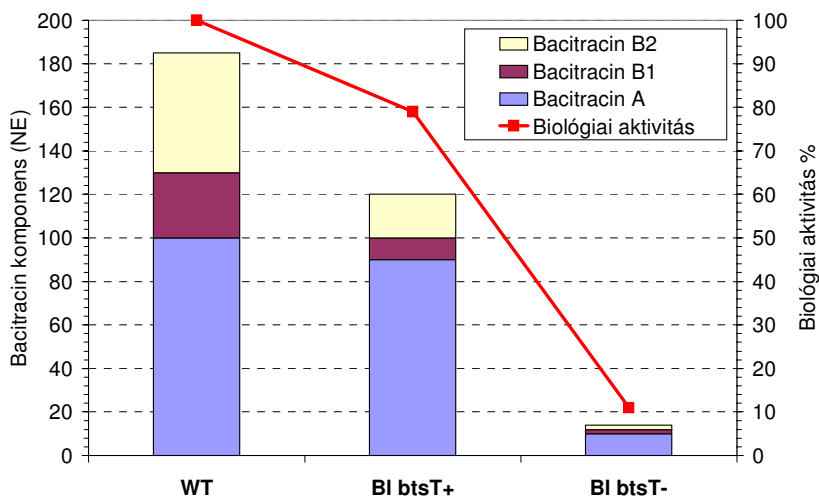
DNS fragmenttel egy átírási egységben lévő tioészterázokhoz történő hasonlítás alapján megállapítottuk az ATG start kodon és a feltételezett riboszóma kötő hely (RBS) pozícióját (1.4.3. ábra).

```

RBS
1 CGGACGGCTG ACGTATCCGT CGATTAACGG GTTATTCACC AAAAAATATC TACAACGAAA
MetLysLeu PheCysLeu ProTyrAla GlyGlySerGlu SerAlaPhe·
61 GGAATGATA GAAATGAAAT TATTTTGCCT GCCTTACGCC GCGGATCCG AATCCGCATT
·TyrSerTrp LysGlyHisMet GlnProAsp IleGluIle CysProIleGln LeuLysGly·
121 TTATTCCTGG AAAGGCCATA TGCAGCCCGA CATTGAGATT TGTCCGATTC AGCTGAAGGG
·ArgGlyArg ArgPheAsnGlu ProCysTyr GluSerLeu GluGluAlaVal GlnAspIle·
181 AAGGGGCCGG CGTTTCAACG AGCCTTGTTA CGAAAGCCTT GAAGAAGCAG TTCAAGACAT
·PheGluGln ValGlnAlaGlu ArgLysGly AspAspTyr ProLeuPheGly HisSerMet·
241 TTTTGAGCAG GTTCAAGCTG AACGAAAAGG TGACGACTAC CCTCTTTTCG GGCACAGCAT
·GlySerLeu LeuAlaTyrGlu LeuTyrTyr GlnMetSer GlyAlaGlyAla GluLysPro·
301 GGGAAACCTT TTGGCATATG AACTTTACTA TCAATGAGC GGGGCGGGAG CTGAAAACC
·ValHisIle PhePheSerGly TyrLysAla ProAsnArg IleArgLysThr GluLysLeu·
361 GGTTACATT TTTTCTCGG GCTATAAAGC GCCAACAGG ATCAGAAAGA CAGAAAAACT
·HisThrLeu ProAsnProIle PheLysLys LysIleVal GluLeuGlyGly ThrProGlu·
421 GCATACCTTG CCCAATCCTA TTTTAAAGAA AAAAATTGTC GAGCTCGGGG GAACGCCTGA
·GluLeuIle AsnHisGluGlu LeuPheGlu LeuPheIle ProIleLeuLys SerAspPhe·
481 GGAGCTCATC AATCATGAAG AGCTATTTGA ATTGTTTATC CCCATTCTCA AAAGCGACTT
·LysMetVal GluAsnTyrIle TyrGlnGlu ArgAsnSer LysIleAspCys AspIleThr·
541 TAAATGGTA GAAACTATA TCTATCAAGA AAGAAACAGC AAAATAGATT GCGACATTAC
·ValLeuAsn GlyLysGluAsp AlaMetSer LysGluHis ValSerAspTrp LysHisHis·
601 CGTTCTCAAC GGAAAAGAAG ACGCCATGAG CAAGGAACAT GTATCCGATT GGAAACATCA
·ThrSerGly HisPheThrAla TyrTyrPhe GluGlyAsn HisPhePheLeu HisHisHis·
661 TACTTCAGGA CACTTTACAG CCTATTACTT TGAGGGGAAT CATTCTTTT TGCACCATCA
·ValGluLys IleThrGluIle IleAsnHis SerLeuThr AlaSerArgThr Phe***
721 CGTTGAAAAG ATCACCGAAA TCATCAATCA TTCACTGACA GCCAGCCGGA CGTTTTAAC
781 TCGGATTTTCG GCGAGATTCA AGCCCGGG

```

1.4.3. ábra A *btsT* gén szekvenciája (AF050160)

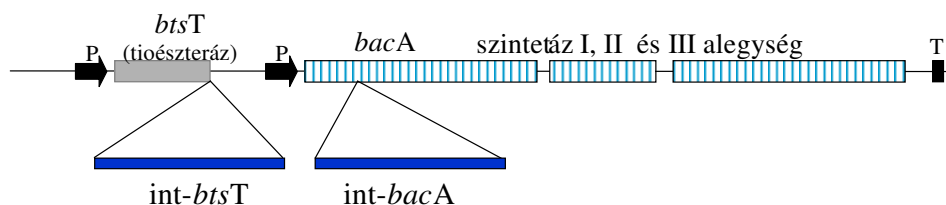


1.4.4. ábra. Az összes bacitracin és ezen belül a bacitracin komponensek mennyiségének és a keverék biológia aktivitásának alakulása a különböző törzsekben (a biológia aktivitást a vad típusú törzs termelte keverék aktivitásának %-ában ábrázoltuk)

Bebizonyítottuk, hogy a genom walking-al izolált fragment tartalmazza a *btsT* gén promóterét egy olyan konstrukció felhasználásával, amely egy integrációra képes plazmidon csak a *btsT* ORF végét tartalmazta. A konstrukció integrációja után csak akkor nem tapasztalhatunk volna bacitracin termelést, ha a klónozott fragmenten nincs jelen a *btsT* gént átíró promóter is (1.4.2. ábra A és B eset). Ahhoz, hogy megvizsgál-

hassuk, hogy a *btsT* gén amplifikációja milyen hatással van a bacitracin termelésre a teljes gént promóterrel együtt hordozó fragmentet a *Bacillus*-okban replikálódni képes pUB110 közepes kópiaszámú plazmidba építettük és a konstrukcióval *B. licheniformis* 19 protoplasztokat transzformáltunk. A plazmidot tartalmazó és így, a *btsT* ORF-et több példányban hordozó sejtek (BlbtsT+) bacitracin termelését összehasonlítottuk a *btsT* ORF-et inaktívált állapotban hordozó törzs (BlbtsT-) és a vad típusú *B. licheniformis* 19 törzs (WT) bacitracin termelésével *M. flavus* tesztbaktérium segítségével biológiai tesztben, illetve az antibiotikum komplex három legnagyobb mennyiségben termelődő komponensének HPLC-s mérése alapján (1.4.4. ábra). Az eredmények azt mutatták, hogy a *btsT* ORF amplifikációja a termelődő bacitracin komplex biológia aktivitást a vad típusú sejtek bacitracin termeléséhez képest közel 20%-kal redukálta, azonban a HPLC eredmények alapján ez az aktivitás csökkenés főleg a bacitracin B₁ és bacitracin B₂ komponensek termelődésének jelentős csökkenésére vezethető vissza, hiszen a bacitracin A főkomponens termelődése csak kis mértékben csökkent.

Annak részletes vizsgálatára, hogy a *btsT* és a szintetáz alegységeinek átírása hogyan alakul, olyan *B. licheniformis* 19F törzseket állítottunk elő, amelyek közül az egyik a *btsT* a másik törzs pedig a szintetáz első alegységét kódoló ORF-ben (*bacA*) hordoz integrálva egy promóter nélküli β -galaktozidáz riporter gént (1.4.5. ábra).

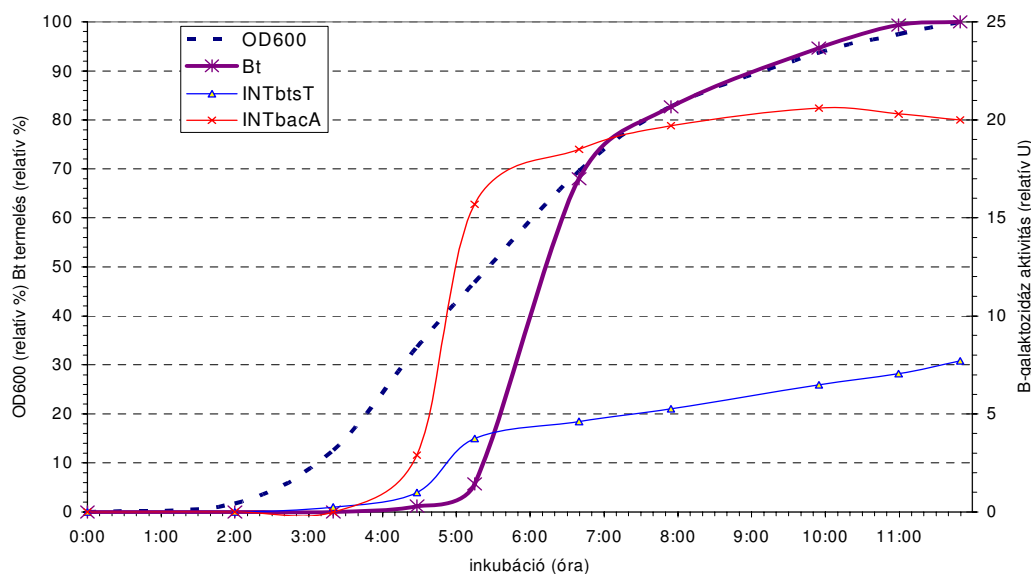


1.4.5 ábra A *btsT* illetve *bacA* ORF-ekben a β -galaktozidáz riporter gén iszerciójának helye.

P: promóter; T: terminátor;

β -galaktozidáz: ██████████

A riporter gént tartalmazó plazmidokat integrálva hordozó, és a vad típusú *B. licheniformis* 19 törzs sejtjeit szaporítottuk, óránként mintát vettünk, meghatároztuk a szaporodás mértékét, a felülúszó bacitracin antibiotikum tartalmát és a sejtek β -galaktozidáz aktivitását ONPG segítségével (1.4.6. ábra).



1.4.6. ábra. A *btsT* és *bacA* gének átírásának vizsgálata β -galaktozidáz riporter gén felhasználásával

INTbtsT: az INTbtsT plazmidot a *btsT* gében integrálva hordozó *B. licheniformis* 19F törzs β -galaktozidáz aktivitása; INTbacA: az INTbacA plazmidot a *bacA* gében integrálva hordozó *B. licheniformis* 19F törzs β -galaktozidáz aktivitása; OD₆₀₀: sejt szaporodás (az elért maximum %-ában kifejezve); Bt: bacitracin peptidantibiotikum termelés (az elért maximum %-ában kifejezve)

1.5. Megvitatás

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 gyorsan az érdeklődés központjába került, és a bacitracin szintetáz kódoló DNS régió szekvenálása is megtörtént (Koncz et al. 1997)..

Már a bacitracin szintetáz 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 (Prágai, nem publikált). Mivel az általunk is klónozni kívánt bacitracin szintetáz kódoló DNS fragment szekvenciáját publikálták, és a tőle downstream elhelyezkedő, a bacitracin rezisztencia kialakításában szerepet játszó DNS fragment szerkezete is ismert volt (Podlasek et al. 1995), figyelmünket a bacitracin szintetáz kódoló DNS fragmentet átíró promóterrel upstream elhelyezkedő régióra irányítottuk (1.4.1. ábra).

A fragmentet (pKS700) klónoztuk és szekvenáltuk. A DNS szakaszon egy csonka ORF-et találtunk, melyből származtatott fehérje teljes hosszában hasonlóságot mutatott a II. csoportba tartozó, eukarióta eredetű tioészterázokkal (TEII), poliketid szintézisben résztvevő fehérjékkel és más peptidszintetáz alegységeket kódoló ORF-ekkel egy átírási egységben lévő fehérjékkel. A tioészterázokhoz való hasonlóság alapján az ORF-et *orfT*-nek neveztük el.

Eukariótákban a II csoportba tartozó tioészterázok (TEII) csak bizonyos szövettípusokban expresszálódnak (nem-kérdődzök emlőmirigye; viziszármazékok faggyúmirigye), és ott a készülő zsírsavláncot C8-C12-es hosszúságánál a zsírsavszintázról lehasítják, így lehetővé teszik az adott szövettípusban 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 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. 1989; Pazirandeh et al. 1989; Pazirandeh et al. 1991).

A patkány TEII tioészteráz kódoló génjét klónozták, biokémiaiailag jellemezték, és helyspecifikus mutagenézissel a hidrolízisben résztvevő aminosavakat azonosították. (Tai et al. 1993). A TEII katalizálta folyamat hasonlít a szerin proteázok katalitikus triádjá által katalizálta reakcióhoz.

A többi, peptidszintetázokat kódoló DNS régiók környezetében található TEII szerű fehérjék funkcióját ekkor még nem vizsgálták, így ezeknek a TEII homológ fehérjéknek nem-riboszómális peptidszintézisben betöltött szerepéről nem állt rendelkezésünkre információ.

Az *orfT* inszerció inaktiválása a bacitracin szintézis jelentős csökkenéséhez vezetett. Mivel a bacitracin szintetáz alegységeit kódoló DNS fragment átírásáért egy, az ORF-től downstream elhelyezkedő erős promóter a felelős, és az ORF TAA stop kodonja és a bacitracin szintetáz promóterének -35-ös régiója között hairpin szerkezet képzésére alkalmas transzkripció terminátor szerű szekvencia 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. Hasonló eredményt kaptak a surfactin 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 tioészterázokhoz való hasonlóság és a bacitracin szintézisben betöltött szerepe miatt *btsT*-nek kereszteltük át.

Megvizsgáltuk a teljes *btsT* ORF géndózisának a bacitracin peptidantibiotikum szintézisére gyakorolt hatását úgy, hogy összehasonlítottuk az eredeti (WT), a *btsT* inaktivált (BlbtsT) és a *btsT*

gént nagy kópiaszámú plazmidon hordozó (BlbtsT⁺) *Bacillus licheniformis* törzsek bacitracin termelő képességét, és megvizsgáltuk a képződő bacitracin peptidantibiotikum összetételét (**1.4.4. ábra**).

Vizsgálataink azt mutatták, hogy biológia teszt alapján a *btsT* gént egy példányban hordozó törzs bacitracin termeléséhez képest az inaktivált *btsT* gént hordozó törzs (BlbtsT⁻) esetében a bacitracin termelés jelentősen, a *btsT* gént nagy kópiaszámú plazmidon hordozó törzs (BlbtsT⁺) esetében pedig kisebb mértékben ugyan, de csökkent. A keletkező bacitracin peptid keverék HPLC vizsgálata azt mutatta, hogy az inaktív *btsT* gént hordozó törzseknel a bacitracin peptidantibiotikum minden formájának mennyisége csökkent, míg a BlbtsT⁺ törzs esetében az összes bacitracin mennyiségének csökkenése lényegében a bacitracin B₁ és B₂ komponensek csökkenésére vezethető vissza.

A bacitracin A és B₁ illetve B₂ formája között egyetlen egy aminosavban van eltérés. A B₁ forma az első helyen (a tiazolin gyűrűben) a B₂ forma pedig a 8. pozícióban tartalmaz valint (L-Val) az izoleucin (L-Ile) helyett. A két aminosav (L-Val, L-Ile) szerkezete, csak az oldallánc méretében tér el egymástól, az izoleucin oldallánca hosszabb, mint a valin oldallánca.

A bacitracin első és nyolcadik aminosavát aktiváló adenilációs domének szubsztrátkötő zsebének specifikusságot meghatározó aminosavai megegyeznek a bizonyítottan L-Val aktiválására is képes FenB és LicC adenilációs domének specifikusságot meghatározó aminosavaival. Ez alapján a bacitracin B₁ és B₂ forma képződése az L-Ile-t aktiváló domének kisebb százalékban előforduló L-Val aktiválására vezethető vissza. Nagyon sok eddig vizsgált, izolált adenilációs domén képes az aminosavak széles skálájának aktiválására *in vitro* (Doekel és Marahiel, 2000).

Az adenilációs domén által „tévesen” aktivált - a legnagyobb gyakorisággal aktivált szubsztráttól eltérő szerkezetű - aminosavak azonban az esetek döntő többségében nem jelennek meg a végtermékekben. Ennek oka az, hogy aminosavak összekapcsolásáért felelős kondenzációs domének szubsztrátspecifikussága nagy, azaz nem képesek bármilyen aminosav beépítésére a növekvő peptidlánca. Így 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 az adenilációs domén által hibásan felismert és aktivált aminosav a peptidszintézist „megakasztja”.

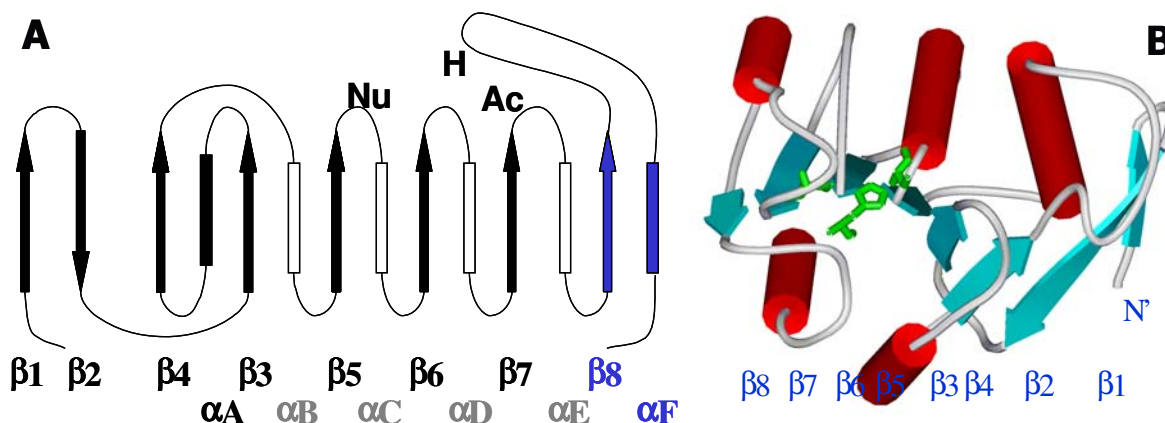
A *btsT* géndózisának fokozása (BlbtsT⁺) a fő komponensként szintetizálódó bacitracin A-tól egy-egy aminosavban eltérő B₁ és B₂ minor komponensek mennyiségének jelentős csökkenését okozta (**1.4.4. ábra**). Ezek alapján a *btsT* ORF terméke felelős a PCP foszfoantotén karjához tioészter kötéssel kapcsolt aminosavak lehasításáért, azaz a bacitracin szintetázról a peptidszintézis folyamatosságát akadályozó („megakasztó”), tévesen aktivált aminosavak eltávolításáért.

A *btsT* hiányának illetve fokozott jelenlétének hatása tehát a következő képen 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-foszfoantotén karjához kapcsolódik. Bár a sejtben sok peptidszintetáz képződik, mindig csak az újonnan képződött 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** (BlbtsT⁺)- a kondenzációs domén akceptor oldal számára nehezen vagy egyáltalán nem elfogadható, és ezért az adenilációs domén és a kondenzációs domén között sokáig „lebegő”, tévesen aktivált aminosavak nagyobb valószínűséggel hasadnak le. Ezért a végtermékben a leggyakrabban aktivált és a kondenzációs domén akceptor helyére legpontosabban illeszkedő, azaz a leggyorsabban beépített aminosavak lesznek csak jelen, de még ezek is gyakran lehasadhatnak.

Ezek alapján a prokarióta peptidszintetázok környezetében kódolt tioészteráz II enzim felelős a nem-riboszómális peptidszintézist „elakasztó” (azaz a kondenzációs domén által be nem építhető) aminosavak eltávolításáért.

A tioészter II csoportba tartozó fehérjék közül még egyiknek sem ismert a 3D szerkezete, de az ismert tioészter II 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, és így 3D szerkezete előre jelezhető. A SAM (Sequence Alignment and Modeling Software System) (Hughes és Krogh, 1996; Karplus et al. 1999; Krogh et al. 1994) alapján a BtsT fehérje foldja másodlagos szerkezeti elemeinek sorrendje alapján az α/β -hidroláz fold-nak felel meg (1.5.1. ábra). Az α/β hidroláz fold-dal rendelkező fehérjék szerkezetük kanonikus szerkezettől való eltérése alapján további családokba sorolhatók (Heikinhemino et al. 1999). A



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

BtsT fehérje másodlagos szerkezeti elemeinek sorrendje legjobban a HAL (haloperoxidáz) család másodlagos szerkezetéhez hasonlít eltekintve attól, hogy a $\beta 1$ és $\beta 2$ β -redők hiányoznak, és az aktív centrum fölé boruló, $\beta 6$ redő és αD hélix között található flexibilis régió szerkezete más. A haloperoxidáz és a BtsT fehérjék között a szekvencia hasonlóság az aktív centrumot kivéve elhanyagolható.

A patkány TEII fehérjéjét helyspecifikus mutagenézissel 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 katalizált reakcióban.

A BtsT fehérje feltételezett foldja, az α - β hidroláz fold konzerválódott katalitikus aminosavai és a TEII csoportban konzerválódott aminosavak helyzete alapján a BtsT fehérje katalitikus 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 hisztidin (H) és a $\beta 7$ és αE közötti hurkon elhelyezkedő Asp181 a hidrolízis során pozitívan töltött hisztidint stabilizáló sav (Ac) komponens. A patkány TEII fehérjéje BtsT fehérjével történő illesztése alapján a patkány tioészteráz II fehérjében a katalitikus triád savkomponenseként vizsgált Asp236 (Tai et al. 1993) nem része a katalitikus 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 a Ser101, az Asp185 és a His237 aminosavakból épül fel.

Endogén β -galaktozidáz aktivitással nem rendelkező *B. licheniformis* F törzsben a pQFBR plazmid származékainak felhasználásával előállított β -galaktozidáz riporter génes konstrukciók lehetővé tették a bacitracin szintetáz gén (*bacA*) és a tioészteráz gén expressziójának egymástól független

meghatározását és a sejtszaporodáshoz (OD_{600}) illetve a bacitracin termeléshez történő viszonyítását. Az eredmények alapján (**1.4.6. ábra**) a *bacA* expressziója már az exponenciális fázisban, korán elkezdődik majd 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

Az ipari fermentációkban a mikroorganizmusok által előállított nem-riboszómális peptid illetve poliketid célmolekulák mellett gyakran szintetizálódnak a célmolekulától szerkezetileg alig különböző termékek is, melyek a fő terméktől - a nagy szerkezeti hasonlóság miatt - a termék kinyerés 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. Sajnos a szennyező csökkentés gyakran csak a fő termék kihozatalának csökkenése mellett érhető el. Mivel a bacitracin bioszintézis vizsgálata során előállított, TEII enzimet kódoló DNS fragmentet nagy kópiában hordozó törzs bacitracin szennyező (*BacitracinB₁* és *B₂*) termelése jelentősen csökkent, a TEII enzim egy potenciális szennyező csökkentő eszköz lehet szennyező szint csökkenését igénylő törzsfeljesztési munkákban.

2. A növényi sejtfal bontásában résztvevő enzimek vizsgálata

2.1. A munka előzményei, a kitűzött célok

2.1.1. A növényi sejtfal szerepe

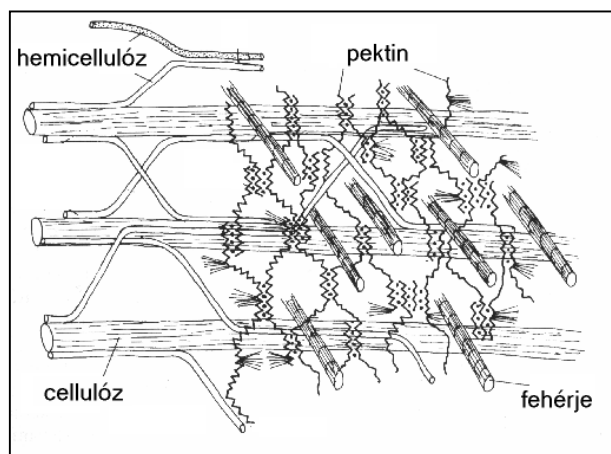
A növényi sejtfal azon túl, hogy a Földön képződő biomassza jelentős része és az étkezési rost egyetlen forrása, alapvetően egy megújuló energiaforrás. Évente a növények, csak a növényi sejtfal anyagainak átlagosan 20-30 %-át kitevő cellulózból, 4×10^{10} tonnát szintetizálnak (**Coughlan, 1985**). Az átlagos növényi sejtfal a cellulózon kívül tartalmaz még 50-60 %-ban nem cellulóz poliszacharidokat: pektineket, hemicellulózatokat és glikoproteineket (**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 akumulálódik, 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, számos egyéb alkalmazás mellett, az élelmiszer- ruha és a papíripar is használja.

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

2.1.2. A növényi sejtfal felépítése

A növényi sejtfal komplex struktúra, amelyet a cellulóz mikrofibrillumokból felépülő váz és a mikrofibrillumok közötti teret kitöltő amorf mátrix alkot (**2.1.2.1. ábra**). A mátrix több komponens bonyolult szövődéke, melyek növényi sejtfalból való kinyerhetőségük alapján csoportosíthatók. Híg, forró savas kezelés hatására a galakturon savban, ramnózbán,



2.1.2.1. ábra. A növényi sejtfal felépítése

arabinózban és galaktózban gazdag poliszacharidok a *pektinek* 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 a sejtalba komplex polimer, a *lignin* épül, amely a sejtfa szilárdságát biztosítja (**Varner és Lin, 1989**).

2.1.2.1. A cellulóz szerkezete

A cellulóz β -1,4 kötéssel kapcsolt glükóz alegységekből felépülő, kémiaiilag egyszerű, homopolimer. Minden cukor egység az előzőhöz képest 180° -kal elfordulva helyezkedik el, így az ismétlődő egység egy diszacharid, a cellobióz. A cellulóz láncot felépítő összes cukorgyűrű egy síkban helyezkedik el. A mikrofibrillumokban a cellulóz láncok egymással párhuzamosan találhatóak, számos inter- és intra-molekuláris hidrogén híd és apoláros kötéssel kapcsolódva egymáshoz (**Coughlan, 1985**).

2.1.2.2. A mátrix

A vasbetonhoz hasonló szerkezetű növényi sejtfaiban a vasakat jelentő cellulóz mikrofibrillumok közötti teret az amorf mátrix tölti ki, ami a hemicellulózok, pektinek, glikoproteinek és egyes esetekben lignin bonyolult és kusza szövődéke (**Albersheim et al. 1994**).

A **hemicellulóz** a növényi sejtfa 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 kémiaiilag 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**).

A **xylán** β -1,4 kötéssel összekapcsolódó xylóz egységekből felépülő polimer, amely a növények száraz tömegének kb. 30%-át alkotja (**Joseleau et al. 1992**). A xylánok a xylóz alapláncon kívül glükoronsav, acetyl és arabinóz oldalláncokat is tartalmazhatnak (**Dekker és Richards, 1976; Biely et al. 1985; Poutanen, 1988; Kormelink et al. 1993**).

A **mannán** β -1,4 kötéssel összekapcsolódó mannóz egységek építik fel. A galaktomannánban a mannán vázhoz α -1,6 kötéssel galaktóz egységek is kapcsolódnak. Az oldalláncot nem tartalmazó mannán szerkezete akár kristályos is lehet, így egyes zöldalgák sejtfaiban 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 magoc csírázásakor lehet fontos (**Brett és Waldren, 1990**).

A **glükomannán** β -1,4 kötéssel összekapcsolt glükóz és mannóz egységek építik fel. A nyitvatermők esetében a glükóz vagy mannóz egységekhez α -1,6 kötéssel galaktóz kapcsolódhat. Ez a glükogalaktomannán vízben jobban oldódik, mint a glükomannán. A mannán váz a C2 vagy C3 helyen acetyl csoportot is tartalmazhat (**Hazlewood és Gilbert, 1998a és 1998b**).

A **xyloglükán** esetében a β -1,4 kötéssel összekapcsolódó glükóz vázhoz gyakran xylóz kapcsolódik α -1,6 kötéssel. Ezek a xylóz oldalláncok gyakran további α -1,2 kötéssel kapcsolt fukóz, galaktóz, arabinóz oldalláncokat tartalmaznak (**Brett és Waldren, 1996**).

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

Az **arabinogalaktán** β -1,3 és β 1,6 kötéssel kapcsolódó galaktóz egységekből épül fel.

A **pektinek** galakturonsavban, ramnózban, arabinózban és galaktózban gazdag komplex savas poliszacharidok. Ide tartozik a ramnogalacturonan, az arabán a galaktán és az arabinogalaktán. A pektinek saját szövődéket alkotnak, amely kovalensen vagy másodlagos kötésekkal a cellulóz mikrofibrillumokkal és a hemicellulózokkal is kapcsolódik. A pektint rövid oldalláncokat vagy

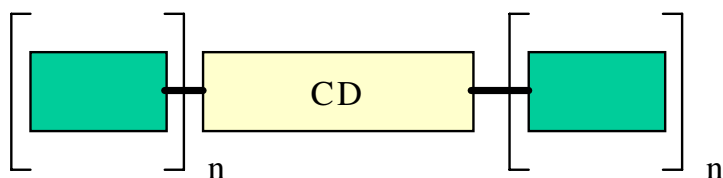
oldalláncokat egyáltalán nem tartalmazó “sima” és hosszú oldalláncokban gazdag “szőrös” régiók építik fel.

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 glikoproteineknek (HRGPs) nevezik őket. A növényi sejtfal tartalmaz még peroxidázt, invertázt, cellulázt, foszfátázt, pektinázt, pektin metilészterázt, malát dehidrogenázt, exoglikozidázokat, endoglikanázt és endotranszglykozilázt. Ezeknek az enzimeknek a növényi sejtfal fenntartásában illetve szükség szerinti módosításában lehet szerepe (**Brett és Waldren, 1990**).

A **lignin** különböző alkoholok kovalens kötésekkel összekapcsolt, teljesen szabálytalan, hidrofób, rendkívül sűrű szövetke, melyet egyes sejtek növekedésük befejezte után építenek sejtfalukba. Mivel a polimerizáció nem enzimatis, 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 behatolása lehetetlenné válik, azaz a lignifikálódott sejtfalú sejt mindig halott, de tartást és védelmet nyújt a többi sejt számára (**Brett és Waldren, 1990**).

2.1.3. A glikozil hidrolázok általános felépítése

A glikozil hidrolázok döntő többsége moduláris szerkezetű (**2.1.3.1. ábra**), azaz a katalitikus doménen (CD) kívül, flexibilis kapcsoló (linker) régiókkal összekötött, több, különböző funkciójú modulból állnak (**Tomme et al. 1995; Warren, 1996**).



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

modulból állnak (**Tomme et al. 1995; Warren, 1996**). Mivel a flexibilis linker régiók a proteázok számára könnyen hozzáférhetőek, limitált proteolízissal a modulok egymástól elválaszthatóak és független egységekként vizsgálhatóak (**Gilkes et al. 1988; Tomme et al. 1988**). A glikozil hidroláz katalitikus doménhez

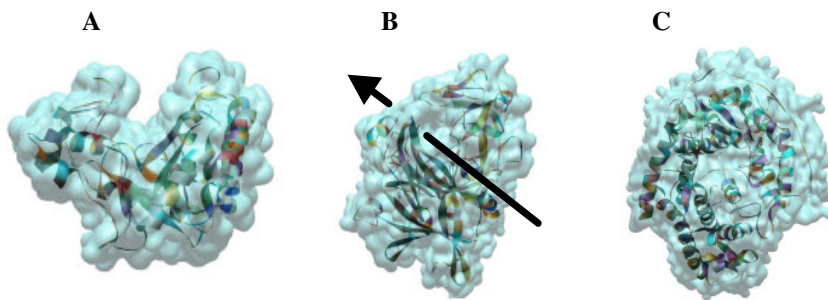
kapcsolódó modulok leggyakrabban szénhidrát kötő modulok (Carbohydrate Binding Module; CBM), de előfordulnak észteráz, termotabilizáló, baktérium sejtfalhoz kötő, linker szerepet betöltő, scaffolding fehérjével kapcsolódó dokerin és eddig még ismeretlen funkcióval rendelkező, hasonlóság alapján számos családba sorolt „X” modulok is. (**Henrissat és Coutinho, 2000**)

2.1.3.1. A glikozil hidrolázok katalitikus doménje

A glikozilos 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 információval szolgál (**Henrissat és Davies, 1997; Davies, 1998**).

A családok hasonló szerkezetük alapján további nagyobb csoportokba, klánokba sorolhatóak. Az egy klánba tartozó családok mindegyik tagjának 3D szerkezete hasonló, így a katalitikus aminosavak helyzete és katalitikus mechanizmusuk is megegyezik. A családon belül is lehet a szubsztrátspecifikusság eltérő, illetve a különböző klánokba tartozó enzimek szubsztrátspecifikussága is lehet megegyező.

A meglévő 3D szerkezetek azt mutatják, hogy az enzim működési mechanizmusát (endo/exo/diszacharid bontás) a szubsztrát kötő zseb térbeli kialakulása határozza meg (**2.1.3.1.1. ábra**). Az endo enzimek katalitikus aminosavai árokban (cleft), az exo enzimek katalitikus aminosavai alagútban (tunnel) és a diszacharidok bontására specializált enzimek katalitikus



2.1.3.1.1. ábra. Szubsztrát kötő zseb lehetséges térbeli szerkezetei. A: árok; B: alagút; C: zseb

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 glikozil

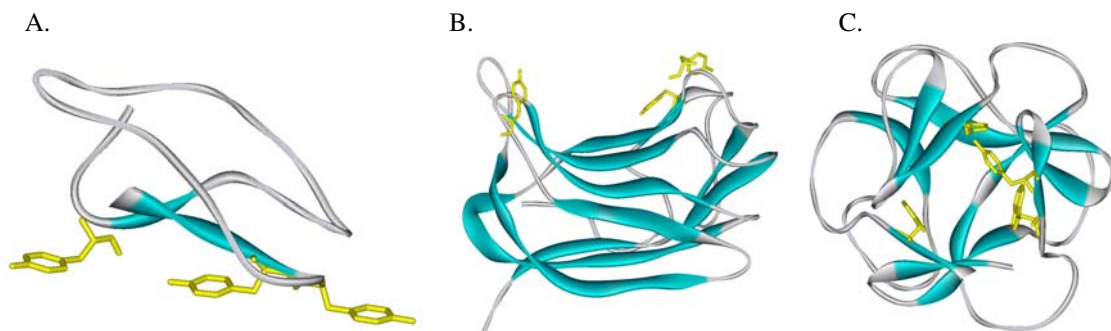
hidroláz család számát, ahová hasonlóság alapján tartozik (10) és a felfedezés sorrendjétől függő betűt. PfXyn10A = *Pseudomonas fluorescens* az elsőként felfedezett 10-es családba tartozó xylanáz. (Henrissat et al. 1998)

2.1.3.2. Szénhidrát-kötő modulok (CBM)

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

A cellulózt specifikusan kötő CBM-eket cellulóz kötő doménnek nevezik. A xylánt specifikusan kötő CBM-ek a xylán kötő domének (XBD) (Black et al. 1995). A keményítőt kötő modul pedig az SBM (Nunberg et al. 1984).

A szénhidrát-fehérje kölcsönhatás kialakításában az aromás aminosavak kiemelt szerepet játszanak. A tirozin (Y) és triptofán (W), esetenként a fenilalanin (F) gyűrűje erős hidrofób kölcsönhatást (hydrophobe stacking) alakít ki a cukorgyűrűvel, amit a cukor-OH csoportjainak más aminosavakkal



2.1.3.2.1. ábra. A cellulózkötő modulok szubsztrát kötésében 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)

kialakított hidrogénhidjai tovább erősíthetnek (Vyas, 1991).

A szerkezet, funkció és ligand kötő képesség alapján a CBM-ek három osztályba sorolhatók (2.1.3.2.1. ábra). Az A osztályba tartozó CBM-ek vízben nem oldható szubsztrátok felszínéhez kötnek, a B osztályba tartozók 3 cukor egységnél hosszabb oligoszacharidokat kötnek meg, és a C osztályba tartozók mono- és diszacharidok kötésére képesek (Boraston et al. 1999).

2.1.4. Fehérje kristályosítás

Egy fehérje kristályosítása során az a cél, hogy egy olyan túltelített fehérje oldatot állítsunk elő, ami a túltelítettségéből eredő szabad energia többlettől a fehérje kristályosodásával és nem annak amorf

kicsapódásával szabadul meg.

A tökéletesen rendezett kristályos állapot az anyag legalacsonyabb szintű szabad energia állapota, azonban kialakulásához elengedhetetlen egy magasabb energiaszintű intermedier: a kritikus méretű kristályosodási mag létrejötte. A rendezettséget nélkülöző kicsapódás összes szabad energiája nagyobb, mint a rendezett kristályos állapoté, azonban kialakulásához nincs szükség magasabb energiaszintű intermedierekre, ezért gyakran ez a túltelített fehérje oldat 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 fehérje oldat koncentrációja és az **adalék anyagok** (additives) mennyisége és minősége.

2.2. Anyagok és módszerek

Baktérium törzsek

E. coli BL21(DE3), BL21(DE3)*pLysS*, (DE3), *pLysS*, BMH 71-18 *mutS*, JM83, JM83(DE3), Tuner(DE3)TM, Oregami(DE3)TM, B834(DE3), JM101, TOP10

Plazmidok

pCRTMBlunt, pET16b, pET21a, pET21d, pGEX-4t-3

Módszerek

Kompetens *E. coli* transzfomáció; Fehérje túltermeltetés *E. coli*-ban; Plazmid izolálás *E. coli*-ból; Plimeráz láncrakció (PCR); Helyspecifikus mutagenézis; Periplazma izolálás; His tag-es fehérje izolálás denaturáló és natív körülmények között; GST tagos fehérje izolálás; Inclusion body-ban termelődő fehérjék refolding-ja; Fehérje izolálás ion-cserélő és gélszűrő oszlopon; Fehérje kristályosítás; DNS és fehérje koncentráció meghatározása; DNS szekvenálás; SDS-PAGE; Natív PAGE; Kvalitatív avicel kötés mérése; HPLC; ITC; CiDiSp.

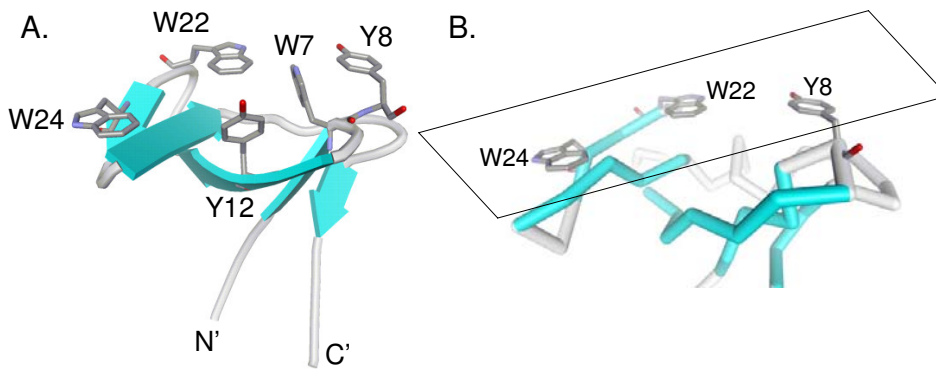
2.3. Eredmények és megvitatásuk

Az elmúlt évtizedben a növényi sejttal bontásában résztvevő enzimek felhasználása (az élelmiszer ipartól kezdve, a mosóporokon és környezetkímélő eljárásokon keresztül a bioetanol növényi hulladékokból történő előállításáig) a mindennapi élet számos területen terjedt el. Így, e fontos kémia reakciókat specifikusan katalizáló enzimek működési mechanizmusának megismerése és megértése elengedhetetlen az emberiség növekvő igényeinek kielégítéséhez, amely egyrészt az enzim aktivitásának, másrészt specifikusságának, harmadrészt „környezet tűrő képességének” a felhasználás igényeinek megfelelő módosítását jelenti.

A növényi sejtfalbontásban résztvevő, moduláris felépítésű enzimek gyakran tartalmaznak olyan modul is, mely főként oldhatatlan szubsztrátokkal szemben jelentősen fokozzák az enzim hatékonyságát. Ezen szubsztrát kötő modulok működési mechanizmusának megértése sok hasznos információt adhat a növényi eredetű szerves hulladékok bioüzemanyaggá történő átalakításához szükséges enzimek hatékonyságának fokozásához.

A kötő domének szubsztrát kötése általában a domén felszínén lévő aromás aminosavak és a szubsztrát cukormolekulái között kialakuló erős hidrofób kölcsönhatás eredménye.

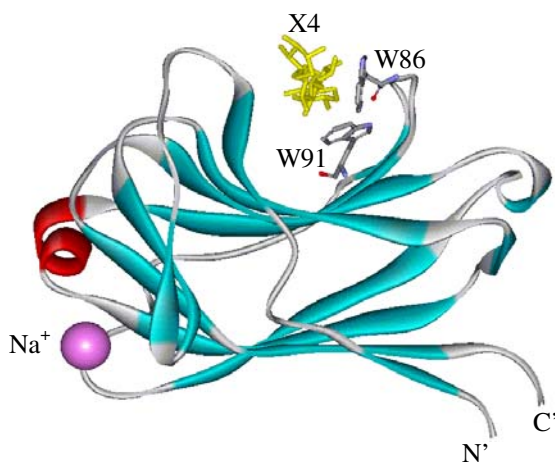
A CBM10 oldhatatlan cellulózt kötő modul szubsztrát kötésben fontos aromás aminosavait a család konzerválódott aromás aminosavainak keresésével és helyspecifikus mutagenézissel azonosítottuk. A CBM10 család más tagjaiban is konzerválódott öt aromás aminosav alaninra cserélése a W7A, W22A, W24A és Y8A mutációk esetében jelentősen csökkentették a modul cellulózkötő képességét, míg az Y2A mutáció nem befolyásolta azt. Bár a CBM-10 modul és a katalitikus domént is tartalmazó, mutáns és a vad típusú enzimek CD spektruma nem mutatott szignifikáns eltérést, a katalitikus domént nem tartalmazó CBM10-W7A mutáns nem expresszáldott *E. coli*-ban. Ez arra utalt, hogy a W7 a domén belsejében van, így a modul szerkezetének fenntartásában



2.3.1. ábra. A CBM10 modul NMR vizsgálatok alapján meghatározott 3D szerkezete. A: a vizsgált aromás aminosavak elhelyezkedése B: a felszínen egy síkban elhelyezkedő Trp22, Trp24 és Tyr8 aminosavak

körülmények között a katalitikus domént nem tartalmazó 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 triptofánja közül natív körülmények között csak egy-egy triptofán reagált az NBS-sel. Ezek alapján az 5 konzerválódott aromás oldalláncú aminosav közül az Y8, W22 és W24 aminosavak vesznek részt a cellulózkötésben, hiszen az Y12 alaninra cserélése nem befolyásolta a CBM10 modul cellulóz kötő képességét, a W7 pedig nem a kötő domén felszínén található. Ezeket az eredményeinket a CBM10 modul időközben NMR-rel megfejtett 3D szerkezete is alátámasztotta. A 3D szerkezet alapján (**2.3.1. ábra**) a W22, W24, Y8 aromás gyűrűi a modul felszínén egy síkban helyezkednek el, lehetővé téve az ugyancsak egy síkban elhelyezkedő cellulóz láncok glükóz egységeinek megkötését.

A kötő domén működési mechanizmusának és a szubsztrát specifikusság elemzésének másik módja a domének térszerkezetének meghatározása. A térszerkezet meghatározásához azonban olyan fehérje kristályra van szükség, amely tartalmaz olyan, általában nehézfémmel ionokat, melyek segítségével a szerkezet megfejtéséhez szükséges kezdeti diffrakciós fázisok meghatározhatók. Ezek a szerkezet meghatározáshoz elengedhetetlen kezdeti diffrakciós fázisok egyes esetekben nehézfémmel ionok nélkül is meghatározhatóak. Ennek egyik lehetősége, amikor a fehérjében a kén atomokat szelén atomokkal helyettesítik és három különböző hullámhosszon gyűjtik össze a diffrakciós adatokat.



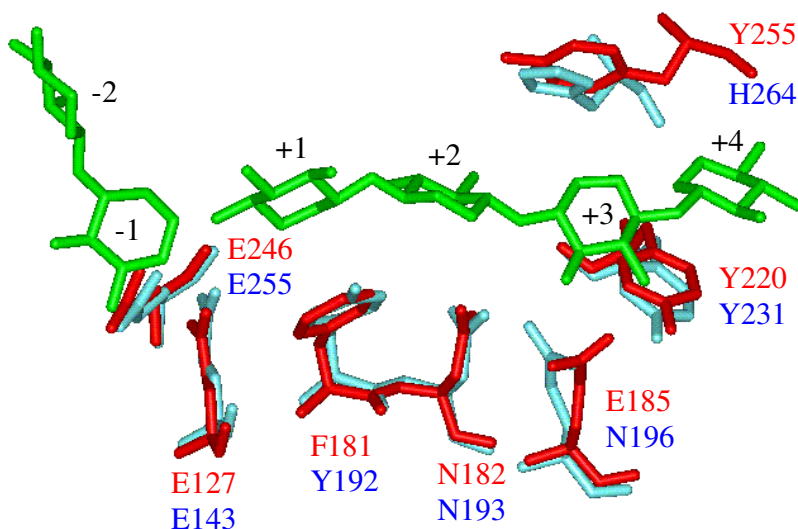
2.3.2. ábra A 15 mM xylohexóz jelenlétében kristályosított CBM15 modul szerkezete. A kötőárokban a xylozotetróz (X4) és a kötésben résztvevő Trp (W86 és W91) láthatók

(A nagyobb térkitöltésű szelén azonban esetenként a fehérje kristályosítását gátja is lehet.) A másik lehetőség pedig az, hogy ismert szerkezetű fúziós fehérjével együtt történik a kristályosítás, ami azonban csak akkor hasznos, ha a fehérje kristályban mindkét fehérje rész pozíciója jól meghatározott, azaz a két rész közötti kapcsolat nem flexibilis. Ez az együtt kristályosítási módszer elvileg használható ismert szerkezethez nagy hasonlóságot mutató fehérjéhez nem flexibilisen kapcsolódó ismeretlen szerkezetű domén szerkezetének együttes meghatározására is.

A már ismert térszerkezetű PsXyn10A katalitikus doménjével 60 %-os hasonlóságot mutató katalitikus domént tartalmazó *P. fluorescens* Xyn10F enzimje esetében a CBM15 xylán kötő

vesz részt és nem a cellulóz kötésében. 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 triptofánok számát, denaturáló és natív

domén és a katalitikus domén között linker szekvencia nem azonosítható. Lehetséges, hogy a CBM „folytatása” a katalitikus domén szubsztrát kötő árkanak, azaz közöttük a kapcsolat nem flexibilis, így a CBM térszerkezete az ismert szerkezetű katalitikus domén felhasználásával elvileg meghatározható. Ezért a *P. fluorescens* Xyn10F enzim ismeretlen szerkezetű xylóz kötő CBM15 modulját ismert szerkezethez 60%-os hasonlóságot mutató katalitikus doménjével együtt expresszáztattuk. Az aktív centrumot és a CBM-et tartalmazó fehérjét kristályosítottuk, és homológ PsXyn10A ismert szerkezete alapján, molecular replacement-tel először a katalitikus domén szerkezetét határoztuk meg. Sajnos a CBM15 pozíciója nem volt jól definiált a fehérje kristályban, így a katalitikus modul fázisainak felhasználásával a katalitikus doménhez kapcsolódó, xylán kötő modul szerkezetének csak 30 %-át lehetett felépíteni. Ez alapján bizonyossá vált, hogy 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 (2.3.2. ábra). 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.



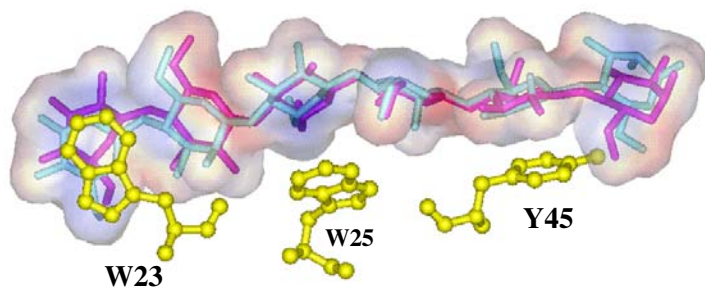
2.3.3. ábra. A XynA és XynF katalitikus doménjeinek szubsztrát kötésben és szubsztrát hasításban szerepet játszó aminosavai és a szubsztrát helyzete

enzimjének Glu43 aminosavát a XylF enzimben egy kis tégigényű glicin helyettesítette. Korábbi vizsgálatok alapján (Charnock et al. 1997) a XylA Glu43 alaninra cserélése jelentősen redukálta a XylA enzim aktivitását p-Nytrófenil-β-D-cellobiózzal (PNPC) szemben, így feltételezhető volt, hogy a XylF enzim PNPC hidrolizáló képessége is alacsony. A XylA és a XylF enzimek PNPC aktivitásának összehasonlítása feltételezésünket igazolta.

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 munka során „melléktermékként” megfejtett PsXyn10F (XylF) katalitikus domén szerkezetét összehasonlítottuk a biokémiailag és strukturálisan is jól jellemzett PsXyn10A (XylA) katalitikus domén és annak xylopentózt illetve más szubsztrátot tartalmazó, korábban meghatározott szerkezetével. A szerkezetek egymásra illesztése után megvizsgáltuk a szubsztrát kötésben és a xylán hidrolízisében résztvevő aminosavakat (2.3.3. ábra). Az egyetlen jelentős eltérés az volt, hogy a XylA

A többféle oldható szubsztrát kötésére képes CBM29-2 modul térszerkezetét mannohexóz és



2.3.4. ábra. A mannohexóz és a cellohexóz lánc elhelyezkedése és a kötésében résztvevő aromás aminosavak helyzete CBM-29-2 modul esetében. Lila: cellohexóz; Kék: mannohexóz, Sárga: CBM-29-2 szubsztrát kötésében résztvevő aromás aminosavai

cellohexóz jelenlétében is meghatároztuk (**2.3.4. ábra**). A glükóz és a mannóz alegységek és a szubsztrát kötésben résztvevő aminosavak közötti kapcsolat alapján megállapítottuk az elméletileg ideális szubsztrát szerkezetét, amely lényegében megegyezett az ITC vizsgálatok alapján a CBM29-2 modulhoz legerősebben kötődő konjack glükomannán szerkezetével. A vizsgált, homogén egységekből

felépülő cukor polimerek közül a CBM-29-2 szubsztrát kötő modulhoz, a mannohexóz kötődött a leggyengébben, míg a cellopentóz, cellohexóz és a hidroxetil cellulóz a polimer tagszámától függően egyre nagyobb affinitást mutatott.

A 37 %-ban homológ, de oldható szubsztrátokkal szemben kisebb kötési affinitást mutató CBM29-1 modul szubsztrát kötő árka - modellezés alapján - néhány fontosnak látszó pozícióban nagyobb térkitöltésű aminosavakat tartalmaz, mint a CBM29-2. Feltételezésünk szerint ez a CBM 29-2 és CBM29-1 modulok eltérő szubsztrát kötő képességének az oka.

A röntgen diffrakciós szerkezet meghatározás egyik szűk keresztmetszete a vizsgálni kívánt fehérje kristályosítása. Gyakran csak hosszan és kitartó próbálkozás után lehet azokat a feltételeket megtalálni, ahol a fehérjemolekulák „hajlandóak” kristályrácsba rendeződni, és sokáig tart, amíg az expresszálas, tisztítás és a különböző kristályosítási körülmények röntgendiffrakcióra alkalmas fehérje kristályt eredményeznek.

A PfMan10 enzim mannóz kötő X4 modul térszerkezetének meghatározásához megpróbáltunk 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 az 1 M CaCl₂-ot, 10 % DMF-et tartalmazó kondíció eredményezett röntgendiffrakciós szerkezet meghatározásra alkalmasnak tűnő fehérje kristályt.

Új tudományos eredmények összefoglalása

- azonosítottunk egy, a bacitracin bioszintézisben szerepet játszó fehérjét kódoló ORF-et, amit a származtatott fehérje tioészteráz II-höz való hasonlósága alapján *btsT*-nek neveztünk el;
 - bebizonyítottuk, hogy a *btsT* gén inaktiválása csökkenti a mutáns sejtek bacitracin termelő képességét;
 - bebizonyítottuk, hogy a *btsT* gén nagy kópiaszámú plazmidon történő bevitele a termelő mikroorganizmusba kismértékben csökkenti a bacitracin A főkomponens nagymértékben, pedig a bacitracin B₁ és a bacitracin B₂ alkotókomponens termelését, így mint potenciális szennyező csökkentő faktor használható ipari fermentációkban, nem-riboszómális úton készülő peptid illetve poliketid szintetázok által előállított termékek esetében szennyező csökkentésre;
 - az újonnan azonosított és más, nem-riboszómális 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 BtsT fehérje katalitikus triádjának tagjait;
 - létrehoztunk egy, a bacitracin szintetáz és a tioészteráz gén expressziójának mérésére alkalmas riporter génes biológia rendszert, amit felhasználtunk a két gén expressziójának és a bacitracin termelés időbeni lefutásának vizsgálatára;
 - A mérési eredmények alapján megállapítottuk, hogy a bacitracin szintetáz 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.
-
- Azonosítottuk a *Pseudomonas fluorescens* Xyn10A fehérje CBM10 oldhatatlan cellulóz kötő moduljának szubsztrát kötésben fontos aminosavait helyspecifikus mutagenézis és a felszíni triptofánok NBS-el történő reakciója alapján;
 - meghatároztuk a *Pseudomonas fluorescens* XylF fehérje CBM15 xylóz kötő doménjének xylohexózzal alkotott komplexének térszerkezetét;
 - meghatároztuk a *Piromyces equi* CelC fehérje CBM29-2 cellulóz kötő domén mannohexózzal és cellohexózzal létesített komplexének térszerkezetét, és ez alapján leírtuk az ideális szubsztrát szerkezetét.

Irodalomjegyzék

1. Aharonowitz, Y., Bergmeyer, J., Cantoral, J. M., Cohen, G., Demain, A. L., Fink, U., Kinghorn, J., Kleinkauf, H., Mac-Cabe, A., Palissa, H., et al. (1993) *BioTechnology* 11, 807-810.
2. 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
3. Aleshin, A., Golubev, A., Firsov, L. M. and B., H. R. (1992). Crystal structure of glucoamylase from *Aspergillus awamori* var. X100 to 2.2 Å resolution. *J Biol Chem* 267: 19291-19298.
4. 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.
5. Black, G.W., Hazlewood, G.P., Millward-Sadler, S.J., Laurie, J.I. and Gilbert, H.J. (1995). A modular xylanase containing a novel non-catalytic xylan-specific binding domain. *Biochem. J.* 307: 191-195
6. 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 modules: diversity of structure and function. 202-211. in Gilbert, H.J., Davies, G.J., Henrissat, B. and Svensson, B. (eds.), *Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
7. Brett, C. és Waldren, K. (1996). Physiology and Biochemistry of Plant cell walls. *Topics in plant functional biology: 1.* M. Black and B. Charlewood (eds). Chapman és Hall.
8. 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.
9. Cane, D.E and Walsh, C.T. (1999). The parallel and convergent universes of polypeptide synthetases and nonribosomal peptide synthetases. *Chem. Biol.* 6: R319-R325
10. Challis G.L., Ravel J. and Townsend C.A. (2000) Predictive, structure-based model of amino acid recognition by nonribosomal peptide synthetase adenylation domains. *Chem. Biol.* 7 211- 224
11. 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
12. Coughlan, M.P. (1985). Enzymic hydrolysis of cellulose: an overview. *Biores. Technol.* 39:107- 3: 853-859.
13. Davies, G.J. (1998). Structural studies on cellulases. *Biochem. Soc. Trans.* 26: 167-172.
14. Dekker R.F.H. and Richards, D.N. (1976). Hemicellulases: their occurrence, purification, properties and mode of action. *Adv. Carb. Chem. Biochem.* 32: 261-264
15. Dey, P.M. and Brinson, K. (1984). Plant cell walls. *Adv. Carb. Chem. Biochem.* 42: 265-382.
16. Divne, C., Stahlberg, J., Reinikainen, T., Ruohonen, 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.
17. reesei. *Science* 265: 524-528.
18. Doekel, S. and Marahiel, M.A. (2000). Dipeptide formation on engineered hybrid peptide synthetases. *Chemistry & Biology*, 7:373-384
19. 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
20. 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.
21. 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.
22. Hazlewood, G. P. és Gilbert, H. J. (1998a). Structure and function analysis of *Pseudomonas* plant cell wall hydrolases. *Biochem. Soc. Trans.* 26, 185-190.
23. Heikinheimo, 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
24. Henrissat, B. and Coutinho, P. (2000). CAZy website: <http://afmb.cnrs-mrs.fr/~pedro/CAZY/db.html>.
25. Henrissat, B. és Davies, G. (1997). Structural and sequence based classification of glycoside hydrolases. *Curr. Op. Struct. Biol.* 7: 637-644.
26. 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.
27. Hughey, R., A. Krogh, (1996) Hidden Markov models for sequence analysis: Extension and analysis of the basic method, *CABIOS* 12:95-107.
28. 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.
29. 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.). Elsevier, Amsterdam.

30. Karplus, K., C. Barrett, R. Hughey (1999) Hidden Markov models for detecting remote protein homologies, *Bioinformatics* 14(10):846-856
31. 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 developing tissues of root apices. *Planta* 181: 512-521
32. 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
33. 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.
34. 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.
35. 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
36. 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.
37. 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
38. 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.
39. Marahiel, M.A., Stachelhaus, T. és Mootz, H.D. (1997). Modular peptide synthetases involved in non-ribosomal peptide synthesis. *Chem. Rev.* 97, 2651-2673.
40. Morris, M. (1994) Primary structural confirmation of components of the bacitracin complex *Biol. Mass Spectrosc.* 23, 61-70.
41. 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
42. 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.* 172 (1): 7-14.
43. 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.
44. 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.
45. Pazirandeh, M., Chirala, S.S., Huang, W.Y. és Wakil, S.J. (1989) Characterization of recombinant thioesterase and acyl carrier protein domains of chicken fatty acid synthase expressed in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 264: 18195-18201.
46. Podlasek 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
47. Poutanen, K. (1988). An α -L-arabinofuranosidase of *T. reesei*. *J. Biotechnol.* 7: 271-282
48. Prágai Z., Holczinger, A. és Sík, T. (1994/a) Transformation of *Bacillus licheniformis* protoplasts by plasmid DNA *Microbiology*, 140: 305-310
49. 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
50. 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.
51. Shaw-Reid, C. A., Kelleher, N. L., Losey, H. C., Gehring, A M., Berg, C., and Walsh, C. T. (1999) *Chem. Biol.* 6, 385-400.
52. 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.
53. Spezio, M., Wilson, D. B. and Karplus, P. A. (1993). Crystal structure of the catalytic domain of a thermophilic endocellulase. *Biochem.* 32: 9906-9916.
54. 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
55. Stachelhaus, T. és Marahiel, M. A. (1995/b). Modular structure of peptide synthetase revealed by dissection of the multifunctional enzyme GrsA. *Journal of Biological Chemistry* 270: 6163-6169
56. 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.

57. Stachelhaus, T., Mootz, H.D., Marahiel, M.A. (1999) The specificity-conferring code of adenylation domains in non-ribosomal peptide synthetases. *Chem. Biol.* 6(8) 493- 505
 58. Stein, T., Vater, J., Kruff, 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.
 59. 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.
 60. Tomme, P. Van Tilbeurgh, H., Petterson, G., Van Damme, J., Vandekerckhove, J., Knowles, J., Teeri, T. and Claeysens, M. (1988). Studies of the cellulolytic system of *Trichoderma reesei* QM9414. Analysis of domain finction in two cellobiohydrolases by limited proteolysis. *Eur. J. Biochem.* 170: 575-581
 61. Tomme, P., Warren, R. A. J. and Gilkes, N. R. (1995). Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Adv. Micro. Physiol.* 37: 1-81.
 62. 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.
 63. Varner, J. E. and Lin, L. S. (1989). Plant cell wall architecture. *Cell* 56: 231-239.
 64. Vyas, N.K. (1991). Atomic features of protein carbohydrate interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1: 732-740.
 65. Wakil, S.J. (1989). Fatty acid synthase, a proficient multifunctional enzyme. *Biochemistry* 28, 4523-4530.
 66. Warren, R.A.J. (1996). Microbial hydrolysis of polysaccharides. *Ann. Rev. Microbiol.* 50: 183-212.
 67. 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.
 68. 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.
-

Az értekezés témaköréhez közvetlenül kapcsolódó saját publikációk

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.* 276(52):49061-5. (IF: 7,258)

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.* 39(5):985-91. (IF: 4,221)

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. (IF: 4,221)

Charnock SJ, Bolam DN, Nurizzo D, **Szabo L**, McKie VA, Gilbert HJ, Davies GJ. (2002) Promiscuity in ligand-binding: The three-dimensional structure of a *Piromyces* carbohydrate-binding module, CBM29-2, in complex with cello- and mannohexaose. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99(22):14077-82. (IF: 10,896)

Pell G, **Szabo L**, Charnock SJ, Xie H, Gloster TM, Davies GJ, Gilbert HJ. (2004) Structural and biochemical analysis of *Cellvibrio japonicus* xylanase 10C: how variation in substrate-binding cleft influences the catalytic profile of family GH-10 xylanases. *J Biol Chem.* 279 (12): 11777-88. (IF: 6,335)

Az értekezés témaköréhez részben kapcsolódó saját publikációk

Jahn M, Stoll D, Warren RA, **Szabo L**, Singh P, Gilbert HJ, Ducros VM, Davies GJ, Withers SG. (2003) Expansion of the glycosynthase repertoire to produce defined manno-oligosaccharides. *Chem Commun (Camb).* (12): 1327-9. (IF: 4,031)

Ducros VM, Zechel DL, Murshudov GN, Gilbert HJ, **Szabo L**, Stoll D, Withers SG, Davies GJ. (2002) Substrate distortion by a beta-mannanase: snapshots of the Michaelis and covalent-intermediate complexes suggest a B(2,5) conformation for the transition state. *Angew Chem Int Ed Engl.* 41 (15): 2824-7. (IF: 8,255)

Xie H, Bolam DN, Nagy T, **Szabo L**, Cooper A, Simpson PJ, Lakey JH, Williamson MP, Gilbert HJ. (2001) Role of hydrogen bonding in the interaction between a xylan binding module and xylan. *Biochemistry.* 40 (19): 5700-7. (IF: 4,114)

Tran LS, **Szabo L**, Ponyi T, Orosz L, Sik T, Holczinger A. (1999) Phage abortive infection of *Bacillus licheniformis* ATCC 9800; identification of the abiBL11 gene and localisation and sequencing of its promoter region. *Appl Microbiol Biotechnol.* 52 (6): 845-52. (IF: 1,641)

Tran LS, **Szabo L**, Orosz L, Sik 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. (IF: 2,564)

Tran LS, **Szabo L**, Fulop L, Orosz L, Sik T, Holczinger A. (1998) Isolation of a beta-galactosidase-encoding gene from *Bacillus licheniformis*: purification and characterization of the recombinant enzyme expressed in *Escherichia coli*. *Curr Microbiol.* 37 (1): 39-43. (IF: 1,094)

Szabo L and Tchelet R. (2006) Process for constructing strain having compactin hydroxylation ability United States Patent Application 20060172383 (Filed: December 5, 2005)