

## BEVEZETÉS

### A PAPAINE KONFORMÁCIÓSTABILITÁSA, STABILIZÁLÁSA ÉS ALKALMAZÁSA SZERVES OLDÓSZERES KÖZEGBEN

Ph.D. Tézisek

**Szabó András**

Témavezető: Lehoczkiné Dr. Simon Mária

Szegedi Tudományegyetem

Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék

Szeged

2009

Napjainkban az enzimek felhasználási köre egyre bővül az ipar számos területén, a nem hagyományos közegű szerves kémiai szintéziseknél (gyógyszerek, detergensek, aroma- és ízfokozó anyagok, optikai izomerek, stb. előállítására), a klinikai laboratóriumi diagnosztikában és az élelmiszer analitikában. Az enzimek alkalmazásának előnyei a nagyfokú specificitás (molekula, régió, sztereo, reakció), az enyhe reakció körülmények (pH, nyomás, hőmérséklet), az, hogy nem toxikusak; biodegradábilis mind a termék, mind az enzim, így környezetszennyezéssel nem kell számolni. A szerves oldószeres közegben történő alkalmazás további előnyökkel jár: szemben a kémiai szintézisekkel itt nem kell melléktermékekkel számolni, nincs szükség védőcsoportokra, illetve azok eltávolítására. Nőhet a szubsztrát vagy a termék oldékonysága, fokozódhat az enzim hőstabilitása, szabályozható a régió- és enantioszelektivitása, és a katalizált reakció egyensúlya is változhat. Szerves oldószeres közegben hidroláz enzimekkel szintéziseket lehet megvalósítani. Ennek ellenére az eddig ismert mintegy ötezer enzimből mindössze száz körüli az iparban és a mindennapi gyakorlatban felhasználtak száma, mivel az alkalmazás körülményei általában nem kedveznek az enzimek katalitikus aktivitásának és stabilitásának.

A szerves oldószerek többféleképpen csökkenthetik az enzimek aktivitását és stabilitását. Vizes oldatban a fehérjéket hidrátburok veszi körül, szerves oldószer jelenlétében azonban az oldószer-molekulák helyettesíthetik a vízmolekulákat a hidrátburokban és a fehérje szerkezetében. A szervesoldószer-molekulák bejutva az enzim szerkezetébe, megbonthatják a szerkezetet stabilizáló másodlagos kötések, helyettesíthetik a szerkezeti vízmolekulákat, az enzim aktív centrumához is kapcsolódhatnak, lokális

konformációváltozást idézhetnek elő, és ezáltal inaktíválhatják az enzimet. Az enzimek stabilitása, stabilizálása jelenti az egyik legbonyolultabb problémát a fehérjekémiában, mivel azt sok tényező befolyásolhatja. Szerves oldószeres közegben a stabilitás növelhető a biokatalizátor rögzítésével (Akrilex, Sorsilen, stb. hordozók), adalékanyagok segítségével (ionok, polihidroxi-molekulák), kémiai és genetikai módosítással.

Szerves oldószeres közegben hidroláz enzimekkel számos kémiai reakciót (peptid-, észterszintézist, átészteresítést, izomerizációt, aminolízist, stb.) lehet megvalósítani. Proteázokkal peptidek és aminosav-észterek szintetizálhatók, amelyeket az orvostudomány, a biokémia és szerkezetbiológia számos területén felhasználhatnak.

Kísérleteinkhez a papain cisztein proteázt választottuk, melynek szerves oldószeres közegű katalitikus aktivitása, stabilitása és szerkezete korábbról nem volt ismert, annak ellenére, hogy az enzimet széles szubsztrát-specifitásának köszönhetően gyakran használják szerves kémiai szintézisben.

## CÉLKITŰZÉS

Munkánk során célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk számos, szerves kémiai szintézisben gyakran használt, eltérő kémiai sajátságokkal rendelkező, vízzel elegyedő és nem elegyedő szerves oldószer hatását a papain katalitikus aktivitására és stabilitására.

Választ kerestünk arra a kérdésre is, hogy a szerves oldószeres jelenléte idéz-e elő változásokat az enzim másod- és harmadlagos szerkezetében.

Általában a nem hagyományos közeg, szerves oldószeres jelenléte aktivitáscsökkenést eredményez, ezért feladatul tűztük ki a papain

inaktíválódásának kivédését szénhidrátokkal (D-ribóz, D-fruktóz, D-glükóz, D-szacharóz, D-raffinóz).

Kísérleteink célját képezte annak vizsgálata is, hogy a szénhidrátok jelenléte okoz-e szerkezetváltozást a papainban, és hogy kialakulhat-e kovalens kötés a szénhidrát- és a fehérjemolekulák között.

Feladatul tűztük ki a papain szerves oldószeres közegű aktivitásának növelését az enzim primer aminocsoportjainak kémiai módosításával, szerves savanhidridekkel (citrakonsav-, borostyánkősav-, maleinsav-, ecetsav-, propionsav-anhidrid).

Célunk volt annak felderítése is, hogy a kémiai módosítások során milyen mértékű az aminocsoportok módosulása, és történnek-e változások a papain katalitikus aktivitásában, hatékonyságában, kinetikai paramétereiben ( $K_M$ ,  $V_{max}$ ) és szerkezetében.

Arra is választ kerestünk, hogy a módosított enzimformák szintézisben hatékonyabbak-e a nem módosított papainnál, amelyhez modellreakcióként az *N*-acetyl-L-tirozil-etilészter szintézist választottuk.

## MÓDSZEREK

### Aktivitésmérések

Az aktivitásmérésekhez szubsztrátként kazein fehérjét és fluorogén Z-Arg-7-amido-4-metil-kumarint használtunk. A méréseket 25 °C-on végeztük.

### Stabilitásvizsgálat

A papain stabilitását 0–90 tf% közötti szervesoldószer-koncentrációnál vizsgáltuk. A megfelelő koncentrációjú víz/szerves oldószer elegyhez enzimoldatot adtunk, melyet ezt követően szobahőmérsékleten 0–120 percig

## EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

inkubáltunk, majd meghatározott időközönként megmértük az inkubálási elegyek aktivitását.

### A papain kémiai módosítása

A kémiai módosításokat ecetsav-, propionsav-, borostyánkősav-, citrakonsav-, maleinsav-anhidriddel végeztük 0,1 M foszfát pufferben (pH 8,0).

### Szabad aminocsoportszám meghatározása

A papain szabad aminocsoport-tartalmát szénhidrátok jelenlétében és az anhidrides módosításokat követően 2,4,6-trinitrobenzolszulfonsav segítségével határoztuk meg. A keletkező fehérje-trinitrofenil-származék spektrofotometriásan 420 nm-en detektálható.

### Natív poliakrilamid gélelektroforézis

A natív és a módosított enzimformák homogenitását natív poliakrilamid gélelektroforézissel vizsgáltuk. Az elektroforézist 12%-os poliakrilamid elválasztógélben végeztük, mely fölé 4%-os koncentrálogélt polimerizáltunk.

### N-acetil-L-tirozil-etilészter szintézise

A módosított enzimformák hatékonyságát *N*-acetil-L-tirozil-etilészter szintézisében hasonlítottuk össze etanolos közegben, a víztartalom 4 tf% volt.

### Belső fluoreszcencia mérése

Az inkubálási elegyeket a stabilitásmérések alapján állítottuk össze. A fluoreszcencia emissziós spektrumokat 0–90 tf% oldószer koncentráció között vettük fel 30–120 perces 25 °C-os inkubálást követően. A papain belső (triptofán-) fluoreszcenciájának vizsgálatakor 295 nm-es gerjesztési hullámhossznál detektáltuk az emissziós spektrumokat.

### Cirkuláris dikroizmus mérése

A méréseket a távoli-UV-tartományban 190–250 nm között, valamint a közeli-UV-tartományban 250–300 nm között végeztük. Az inkubálási elegyet a stabilitásméréseknek megfelelően állítottuk össze.

1. Kísérleteink során kimutattuk, hogy a vízzel elegyedő szerves oldószerek többsége [etanol, metanol, acetone, acetonitril (ACN)] nem csökkenti jelentősen a papain aktivitását, az apolárosabb tetrahidrofurán (THF) viszont már kis koncentrációban drasztikus aktivitásvesztést okoz. Eredményeink azt is mutatták, hogy a vízzel nem elegyedő szerves oldószerek közül az *n*-hexán csak a nagy szervesoldószer-koncentrációknál csökkenti az enzimaktivitást, a toluol és az etilacetát pedig jelentős inaktiválódást eredményez. Igazoltuk, hogy a közeg hidrofóbicitásának csökkenésével az enzimaktivitás egyre inkább megőrződik.

2. A vízzel elegyedő szerves oldószerekben tanulmányoztuk a papain másod- és harmadlagos szerkezetét, melyeket a papain triptofán fluoreszcenciájának vizsgálatával, valamint közeli- és távoli-UV-CD-spektroszkópiai mérésekkel követtünk. Kimutattuk, hogy etanol és ACN hatására az enzim helikális szerkezeti elemeinek mennyisége nőtt, ugyanakkor nagymértékű konformációváltozást ezek a szerves oldószerek nem okoztak. Jelentősebb szerkezetváltozást a THF eredményezett, ami végül a harmadlagos szerkezet teljes felbomlásához vezetett.

3. A vízzel elegyedő THF inaktiváló hatását szénhidrátok segítségével sikerült csökkentenünk. Eredményeink azt mutatták, hogy a szénhidrátok lúgos kémhatáson fejtik ki stabilizáló hatásukat, mely maximális stabilizálási szénhidrát-koncentrációknál a következő sorrendben alakult: D-ribóz > D-fruktóz > D-glükóz > D-szacharóz > D-raffinóz. Kimutattuk, hogy

a szacharidok stabilizáló hatása a kis koncentrációknál jól korrelál hidroxilcsoport-számukkal.

4. A fluoreszcencia és a közeli-UV-CD spektrális változások azt mutatták, hogy a szénhidrátok stabilizálni képesek az enzim harmadlagos szerkezetét, melyben lokális és specifikus változások történnek. A CD sávokban tapasztalt változásokért redukáló cukrok jelenlétében a papain primer aminocsoportjai, és a szénhidrát-molekulák között kialakuló Schiff-bázisok tehetők felelőssé.
5. Kémiai módosításokkal is növeltük a papain aktivitását és stabilitását. Kimutattuk, hogy az acilálások során a papain primer aminocsoportjainak többsége módosul. A monokarbonsav-anhidrides módosítások (ecetsav és propionsav) csökkentették a papain pozitivitását, a dikarbonsav-anhidrides módosítások (citrakonsav, maleinsav, borostyánkősav) pedig negatív töltéseket vittek be az enzim szerkezetébe. A kémiailag módosított papain elektroforetikus mintázata minden esetben 2–3 enzimforma egyidejű jelenlétét mutatta.
6. Kísérleti eredményeink arra is rámutattak, hogy a kémiai módosítások stabilizáló hatása nagymértékben függ az oldószer karakterétől. Kimutattuk, hogy a módosított enzimformák a vizes közeg mellett etanolos közegben is jelentősen aktívabbak a kontroll enzimnél. Igazoltuk azt is, hogy a kémiai módosításokkal együtt jár a papain katalitikus hatékonyságának növekedése.
7. A triptofánfluoreszcencia-paraméterek arra utaltak, hogy etanol hatására a módosított papain szerkezetében valamelyest kisebb változás történik, mint a kontroll enzimében. Közeli-UV-CD-mérésekkel kimutattuk azt is, hogy az

enzim konformációjában nem okozott jelentős változást az anhidrides módosítás sem vizes, sem etanolos közegben.

8. Meghatároztuk a módosított enzimformák szintetikus aktivitását is etanolos közegben, szubsztrátként *N*-acetyl-L-Tyr-t használtunk. Kimutattuk, hogy a módosítások minden esetben szignifikánsan növelik az észterszintézis konverzióját. A monokarbonsav-anhidriddel módosított papain jóval hatékonyabbnak bizonyult a dikarbonsav-anhidriddel módosítottnál. Megállapítottuk, hogy a papain pozitív töltéseinek semlegesítése egy hatékonyabb enzimformát eredményezett a pozitív töltések negatívra cserélésénél.

Kísérleteink során kimutattuk, hogy a papain stabilitása függ az oldószer tulajdonságaitól. Eredményeink azt is igazolták, hogy szerves oldószer hatására a papain másod- és harmadlagos szerkezetében jelentős változások történhetnek. A papain szerves oldószerek okozta inaktiválódását szénhidrátok alkalmazásával és anhidrides kémiai módosításokkal sikerült csökkenteni. A szénhidrátok közül a ribóz, az anhidridek közül a monokarbonsav-anhidridek voltak igazán alkalmasak az enzim stabilitásának növelésére. Kimutattuk, hogy a szénhidrátok stabilizálni képesek az enzim harmadlagos szerkezetét; a szerves savanhidrides kémiai módosítások viszont nem okoznak jelentős szerkezetváltozást, a papain aktivitás- és stabilitásnövekedése inkább töltésállapotbeli változással magyarázható.

## PUBLIKÁCIÓK

### a) A dolgozat alapjául szolgáló közlemények:

1. **Szabó A.**, Kotormán M., Laczkó I., Simon L.M. (2006) Spectroscopic studies of stability of papain in aqueous organic solvents, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 41, 43–48 (IF: 2,149)
2. **Szabó A.**, Kotormán M., Laczkó I., Simon L.M. (2009) Influence of carbohydrates on the stability of papain in aqueous tetrahydrofuran mixture, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 84, 133–138 (IF: 1,426)
3. **Szabó A.**, Kotormán M., Laczkó I., Simon L.M. (2009) Improved stability and catalytic activity of chemically modified papain in aqueous organic solvents, *Process Biochem.*, 44, 199–204 (IF: 2,336)

### b) A dolgozathoz kapcsolódó konferencia kiadványok:

1. **Szabó A.**, Kotormán M., Laczkó I., Nemcsók J., Simon L.M. (2005) 30<sup>th</sup> FEBS Congress and 9<sup>th</sup> IUBMB Conference, The FEBS Journal, 272, Supplement 1, Abstr. G2-117P, Budapest, Magyarország
2. **Szabó A.**, Kotormán M., Simon L.M. (2007) 7<sup>th</sup> International Conference on Protein Stabilization, Abstr. 41, Exeter, Egyesült Királyság
3. **Szabó A.**, Kotormán M., Laczkó I., Simon L.M. (2008) MBKE 2008. évi vándorgyűlése, Abstr. P-62, Szeged, Magyarország

### c) Egyéb közlemények:

1. Kotormán M., Laczkó I., **Szabó A.**, Simon L.M. (2003) Effects of Ca<sup>2+</sup> on catalytic activity and conformation of trypsin and  $\alpha$ -chymotrypsin in aqueous ethanol, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 304, 18–21 (IF: 2,836)
2. Simon L.M., Kotormán M., **Szabó A.**, Garab G., Laczkó I. (2004) Effects of polyethylene glycol on stability of  $\alpha$ -chymotrypsin in aqueous ethanol solvent, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 317, 610–613 (IF: 2,904)
3. Simon L.M., Kotormán M., **Szabó A.**, Nemcsók J., Laczkó I. (2007) The effects of organic solvent/water mixtures on the structure and catalytic activity of porcine pepsin, *Process Biochem.*, 42, 909–912 (IF: 2,336)

### d) Egyéb konferencia kiadványok:

1. Simon L.M., Kotormán M., **Szabó A.**, Laczkó I. (2004) 6<sup>th</sup> International Conference on Protein Stabilization, Abstr. 54, Pozsony, Szlovákia
2. Kotormán M., Terbe Z., **Szabó A.**, Garab G., Simon L.M. (2005) 30<sup>th</sup> FEBS Congress and 9<sup>th</sup> IUBMB Conference, The FEBS Journal, 272, Supplement 1, Abstr. G2-111P, Budapest, Magyarország