

TARTU ÜLIKOOL
BIOLOOGIA-GEOGRAAFIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
ÜLDISE- JA MIKROOBIBIOKEEMIA ÕPPETOOL

Kalle Kipper

Trichoderma reesei tsellobiohüdrolaas Cel7A
protsessiivsus tselluloosi hüdroolüüsil

Magistritöö
biokeemia erialal

Juhendaja: Priit Väljamäe

TARTU 2005

Sisukord

Sisukord.....	2
Kasutatud lühendid.....	3
Sissejuhatus.....	4
1. Kirjanduse ülevaade.....	5
1.1. Tselluloos.....	5
1.2. Tsellulaasid.....	7
1.2.1 Üldist.....	7
1.2.2. Tsellulaaside tertsiaarstruktuur.....	8
1.2.3. Ekso – ja endotsellulaasid.....	8
1.2.4. Protsessiivsus.....	10
1.2.5. Tsellulaaside protsessiivsuse määramiseks kasutatavad meetodid.....	11
1.2.6. <i>Trichoderma reesei</i> tsellobiohüdrolaas Cel7A.....	11
1.2.7. Tsellulaaside uuringutes enim kasutatud mudelsubstraadid.....	13
Töö eesmärgid.....	15
2. Materjalid ja meetodid.....	16
2.1. Materjalid.....	16
2.1.1 Reagentid.....	16
2.1.1.1. Töös kasutatud Cel7A mutandid.....	16
2.2. Meetodid.....	16
2.2.1. Ensüümide puhastamine.....	16
2.2.2. Tsellulooside valmistamine.....	17
2.2.3. Tsellobioosi derivatiseerimine antraniilhappe (AA) ja aminopüridiiniga (AP).....	17
2.2.4. Tselluloosi derivatiseerimine AA ja AP-ga.....	18
2.2.5. AP-märgistamise ajasõltuvus BC-I.....	19
2.2.6. Ensüümhüdrolüüsil vabanenud produktide kvantifitseerimine.....	19
2.2.7. <i>T.reesei</i> tsellobiohüdrolaas Cel7A vahendatud hüdrolüüsi kineetika AA- ja AP-derivatiseeritud tselluloosidel.....	20
2.2.8. Cel7A kineetika AA-EG-BC ksüloglükokaankompleksil.....	20
2.2.9. Cel7A protsessiivsuse kontsentratsioonisõltuvus.....	21
2.2.10. Cel7A adsorptsiooniisoterm AA-BC-I.....	21
2.2.11. Cel7A endoaktiivsus BC-I ja CMC-I.....	22
3. Tulemused.....	23
3.1.1. Fluorestsentsmärgistatud tselluloosil põhinev meetod redutseerivast otsast alustava tsellobiohüdrolaasi protsessiivsuse määramiseks (Lisa 1).....	23
3.2.1. AP-derivatiseeritud BC ja AP-tsellobioos konjugaadi süntees.....	24
3.2.2. <i>T.reesei</i> tsellobiohüdrolaas Cel7A protsessiivsus erineva DP-ga tselluloosidel.....	25
3.2.3 Cel7A protsessiivsus AA-EG-BC-ksüloglükokaankompleksil.....	27
3.2.4. Cel7A protsessiivsuse kontsentratsioonisõltuvus AA-BC-I.....	28
3.2.5. Cel7A adsorptsiooniisoterm AA-BC-I.....	30
3.2.6. Cel7A endoaktiivsus BC-I ja CMC-I.....	32
4. Arutelu.....	35
Kokkuvõte.....	42
Summary.....	43
Kirjanduse loetelu.....	44
Lisa 1.....	52
Lisa 2.....	53

Kasutatud lühendid

AA – antraniilhape

AA-Avicel – AA-derivatiseeritud Avicel

AA-BC – AA-derivatiseeritud bakteriaalne tselluloos

AA-BMCC - AA-derivatiseeritud bakteriaalne mikrokristalliline tselluloos

AA-CB – AA-derivatiseeritud tsellobioos

AA-EG-BC – AA-derivatiseeritud EG-BC

AP - aminopüridiin

AP-BC – AP-derivatiseeritud bakteriaalne tselluloos

AP-CB – AP-derivatiseeritud tsellobioos

BC – bakteriaalne tselluloos

BMCC – bakteriaalne mikrokristalliline tselluloos

CMC - karboksümetüültselluloos

EG-BC – endoglükanaasiga eeltöödeldud bakteriaalne tselluloos

CB – tsellobioos

DP – polümerisatsiooniate

pNPC – para-nitrofenool tsellobiosiid

T.reesei–*Trichoderma reesei*

Sissejuhatus

Tselluloosi mikroobne lagundamine on kompleksne protsess, mis nõuab erinevaid toimemehhanisme omavate tsellulolüütiliste ensüümide koosmõju. Üheks paremini iseloomustatud tsellulaasiks võib pidada pehmemädanikseenest *Trichoderma reesei* pärit tsellobiohüdrolaasi Cel7A, mille homolooge leidub ka teistes tsellulolüütilistes organismides. Tsellobiohüdrolaas Cel7A kujutab endast *T.reesei* tsellulolüütilise süsteemi võtmeensüümi ning on koostoimes teiste tsellulaasidega võimeline keemiliselt vähereaktiivset tselluloosi efektiivselt lagundama. Sarnaselt teistele lahustumatutel substraatidel töötavatele glükosüülhüdrolaasidele on tsellobiohüdrolaas Cel7A kahedomäänne valk, mis koosneb suuremast katalüütilisest domäänist ning sellega kovalentselt seotud tselluloosile seondumise domäänist. Kristallstruktuuri andmete põhjal iseloomustab tsellobiohüdrolaas Cel7A-d 50 Å pikkune suhteliselt suletud tunnelikujuline aktiivtsenter, mis on võimeline tselluloosi ahelat 10 glükoosi jäägi ulatuses siduma. Aktiivtsentri struktuur on andnud alust oletustele Cel7A ja teiste tsellobiohüdrolaaside protsessiivse toimemehhanismi kohta tselluloosil. Siiski on seni ilmunud vaid üksikuid töid, mis tsellobiohüdrolaaside protsessivsust põhjalikumalt ensüümkinetika andmetega toetavad.

Käesolevas töös võetaksegi lähema vaatluse alla kineetiline meetod Cel7A ja teiste redutseeriva otsa spetsiifiliste tsellobiohüdrolaaside protsessiivsuse määramiseks, kasutades mudelsubstraatidena redutseerivast otsast fluorestsentsmärgistatud tselluloose. Nimetatud meetodi abil määrati Cel7A protsessiivsus erineva polümerisatsiooniastmega tselluloosidel ja hinnati tema võimalikku endoaktiivsust. Samuti määrati töös Cel7A seondumisparameetrid otsmärgistatud bakteriaalsel tselluloosil.

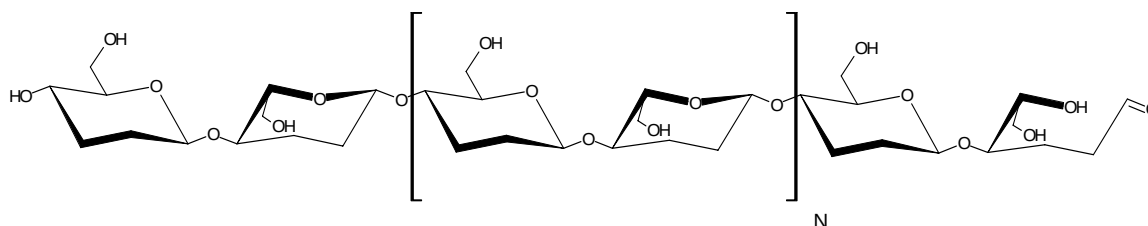
1. Kirjanduse ülevaade

1.1. Tselluloos

Tselluloos on looduses kõige laiemalt levinud biopolümeer [1]. Ühe aasta jooksul tekib teda maakeral taimede ja vetikate elutegevuse tulemusena umbes 40 miljardit tonni, lagundatakse aga aineringes erinevate tsellulolüütiliste organismide, eelkõige seente ja bakterite poolt umbes samas suurusjärgus [2,3]. Erinevalt glükogeenist ja tärklisest, mis on elusorganismidele olulised energia varuallikadena, täidab tselluloos peamiselt struktuurset rolli, andes kompleksis hemitselluloosi ja ligniiniga taimerakkudele mehhaanilise vastupidavuse. Lisaks taimedele on tselluloosi võimelised sünteesima ka mõned bakteriliigid (näiteks *Acetobacter xylinum*), kes ilmselt kasutavad moodustunud tselluloosi partikleid aeroobse elutegevuse käigus “madratsina” vedelik-õhk piirpinnal püsimiseks ja võimalik, et kaitseks ultraviolettkiirguse eest seal [4]. Erinevalt taimsest tselluloosist on bakteriaalset päritolu tselluloos vaba teistest polümeersestest komponentidest [4].

Struktuurilt kujutab tselluloos endast D-glükoosi lineaarset hargnemata polümeeri, kus kõik monomeerid on üksteisega seotud β -1,4-glükosiidse sidemega [5]. Sõltuvalt tselluloosi päritolust ja töötlemisviisist võib üks tselluloosi ahel sisaldada keskmiselt 100 - 14 000 glükoosi jääki (polümerisatsiooniate ehk DP 100 -14 000) [1,6]. Kuna tselluloosi ahelat moodustavad järjestikused glükoosi jäägid on piki β -1,4-sidet vaadates teineteise suhtes 180° võrra pööratud, pole korduvaks ühikuks ahelas mitte glükoos ise, vaid glükoosi dimeer tsellobioos [5]. Tselluloosi ahela otsmised glükoosi jäägid on struktuurilt erinevad, nn. redutseerivas otsas on tsükliline poolatsetaalne vorm tasakaalus lineaarse aldehüüdse vormiga, mitteredutseerivas otsas paiknev glükoos aga on alati tsüklilises vormis (joonis 1) [7].

Tselluloosi struktuuri stabiliseerib ulatuslik sisemolekulaarsete vesinik-sidemete võrgustik glükoosi jääkide vahel [5]. Kõige olulisemad sidemed tselluloosi ahela sees moodustuvad ühe glükopüranoosi ringi hapniku O_5 ja talle järgneva glükopüranoosi OH(3)-rühma vahel ($O_5\cdots H-O_3$), samuti OH(2) ja järgneva molekuli OH(6) vahel ($O_2\cdots H\cdots O_6$) [5]. Vesiniksides ühe ahela OH(3) ja teise ahela OH(6) vahel seob omavahel külgnevaid tselluloosi ahelaid [5].



Joonis 1. Tselluloosi (β -1,4- glükaani) ahel. Sulgudes tselluloosi väikseim korduv ühik – tsellobioos.

Looduslikes tingimustes individuaalseid tselluloosi polümeere ei esine, vaid nad on biosünteesi hetkest alates pakitud vähem või rohkem kristallilistesse struktuuridesse, mida nimetatakse mikrofibrillideks [8]. Erinevates organismides võivad mikrofibrillide mõõtmed varieeruda laias vahemikus, näiteks *Valonia* sugukonna vetikad sünteesivad mikrofibrille ristlõikega $20 \times 20 \text{ \AA}$, *Acetobacter xylinum* mikrofibrillid seevastu on suuremad ja “ribakujulised”, mõõtmetega $800 \times 40 \text{ \AA}$ [4,9]. Mikrofibrillide pikkus ulatub sadadest nanomeetritest mikromeetriteni [9]. Tulenevalt tselluloosi biosünteesi mehhanismist paiknevad tselluloosi ahelad mikrofibrillis üksteise suhtes paralleelselt, kuigi termodünaamiliselt eelistatavam on ahelate antiparalleelne paigutus [1,8]. Ahelate tugeva ja korrapärase pakkimise tagavad nii juba eelnevalt mainitud hüdroksüülrühmade vahelised vesiniksidemed kui van der Waalsi jõud püranoosi ringi hüdrofoobsete osade vahel [1,7]. Ahelate tiheda pakkumise tõttu on tselluloos oma kristallilises vormis vähereaktiivne ning vastupidav erinevate keemiliste ühendite toimele [10]. Kristallilistele osadele lisaks sisaldab looduslik tselluloos aga ka amorfseid piirkondi, kus ahelad on pakitud kas ebakorrapäraselt, on poolikud või painde all [10]. Kuna ahelatevahelised vesiniksidemed tselluloosi amorfsetes osades jäävad nõrgemaks kui kristallilistes, on amorfne tselluloos nii keemilisele kui ensümaatilisele töötlusele märgatavalt vastuvõtlikum [10].

Loodusliku tselluloosi agregaatide kõrge kristallilisus saavutatakse tselluloosi ahelate üheaegse ja koordineeritud biosünteesi tulemusena taimede, vetikate ja bakterite rakumembraanis asuva tselluloosi süntaasi kompleksi poolt [8,11]. Taimerakkudes on tselluloosi süntaas 6 rakumembraanis rosetikujuliselt paiknevast valgust (CesA1 *A. thalianas*) koosnev kompleks, mille iga subühik katalüüsib UDP- või GDP-ga aktiveeritud glükoosi molekulide polümeriseerumist tselluloosiks, kusjuures aktiveeritud glükoos liitub

ahela mitteredutseeriva otsaga [8,12]. Ahelate omavaheline agregeerumine toimub üheaegselt nende sünteesi ja rakust väljumisega [8].

Taimerakkudes esineb tselluloos koos kahe teise struktuurse polümeeri, ligniini ja hemitselluloosiga [13]. Ligniin kujutab endast kolme aromaatses alkoholi, p-kumarüülalkoholi, koniferüülalkoholi ja sinapüülalkoholi keerukat võrgutaolist polümeeri, mis on mikroorganismide poolt raskesti lagundatav ning moodustab koos hemitselluloosiga tselluloosi toetava maatriksi, kaitstes viimast mikroobse lagundamise eest ning andes samas rakuseinale suure paindlikkuse [13]. Hemitselluloos on peamiselt ksüloosist ja mannoosist koosnev hargnenud ahelatega polüsahhariid, mis erinevalt tselluloosist moodustab amorfseid agregate [13].

Loodusliku tselluloosi töötlemisel kontsentreeritud mineraalhappe, tavaliselt HCl-ga, toimub happele ligipääsetavate amorfsete tselluloosi osade eelistatud hüdroolüüs, mille tulemusena tekib väga kõrge kristallilisuse astmega (> 90 %) nn. mikrokristalliline tselluloos [14,15]. Eeltoodut nimetatakse ka heterogeenseks happeliseks hüdroolüüsiks. Osad happed (näiteks kontsentreeritud väävelhape) põhjustavad tselluloosi kristallide pundumist ja tulemuseks on tselluloosi täielik hüdroolüüs, mida nimetatakse homogeenseks happeliseks hüdroolüüsiks [16]. Heterogeense happelise hüdroolüüsiga kaasneb algselt tselluloosi polümerisatsiooniastme järsk langus, mis hiljem pidurdub ja jääb mingile konkreetsele tselluloosi preparatsioonile iseloomuliku väärtuse juurde püsima [15].

1.2. Tsellulaasid

1.2.1 Üldist

Keemiliselt vähereaktiivse tselluloosi efektiivne mikroobne lagundamine looduses nõuab erinevate, mikroorganismide poolt sekreteeritavate ensüümide üheaegset koostööd. Tihti hõlmatakse kõik need ensüümid ühtse nimetuse *tsellulaasid* alla. Sõltuvalt oma struktuurist ja toimemehhanismist jagunevad tsellulaasid kaheks suuremaks rühmaks, eksoglükanaasideks ehk 1,4-β-D-glükaan tsellobiohüdrolaasideks (EC 3.2.1.91) ja endoglükanaasideks ehk 1,4-β-D-glükaan glükanohüdrolaasideks (EC 3.2.1.4). Looduslikes tingimustes nõuab tselluloosi efektiivne ensümaatiline lagundamine peale tsellulaaside veel mitmete teiste rakuväliste ensüümide osalemist, mis katalüüsivad tselluloosiga komplekseenud ligniini ja hemitselluloosi lagundamist ja ühes sellega muudavad tselluloosi tsellulaasidele paremini ligipääsetavaks [17,18].

Tsellulaaside poolt katalüüsitavaks reaktsiooniks on β -1,4-glükosiidse sideme hüdroolüüs tselluloosi ahelas, mille lõpptulemusena laguneb tselluloos lahustuvateks tsellooligosahhariidideks, peamiselt tsellobioosiks [19]. Tsellulaaside katalüütilise aktiivsuse tagavad kaks aktiivtsentris paiknevat asparagiin- või glutamiinhappe jääki, millest üks käitub üldise happekatalüsaatorina ja protoneerib hapnikuaatomi glükosiidses sidemes, teine aga kas nukleofiilset vee molekuli deprotoneeriva üldise aluskatalüsaatorina või nukleofiilina, mis ise atakeerib tselluloosi C_1 poolatsetaalset süsinikku Sn_2 tüüpi asendusreaktsioonis [20 - 22]. Juhul, kui nukleofiiliks on vee molekul, kulgeb hüdroolüüsireaktsioon ühes etapis (nn. *single displacement*) ja C_1 süsinikuga seotud hüdroksüülrühm läheb algsest β -asendist α -asendisse ehk toimub konfiguratsiooni inversioon [23, 24]. Kui aga nukleofiiliks on üks katalüütilistest aminohapetest, moodustub reaktsiooni esimeses etapis kovalentne ensüüm-glükosüül vaheühend, mis seejärel vee molekuli poolt hüdroolüüsitakse [25]. Selline kaheetapiline nukleofiilne asendusreaktsioon (nn. *double displacement*) kulgeb vastupidiselt esimesena mainitud juhule konfiguratsiooni retentsiooniga C_1 süsiniku juures [23]. Vastavalt katalüüsitava reaktsiooni stereookeemiale jagatakse tsellulaasid seetõttu kas konfiguratsiooni inversiooni või retentsiooniga töötavateks ensüümideks [7, 23].

1.2.2. Tsellulaaside tertsiaarstruktuur

Sarnaselt teistele lahustumatutel substraatidel töötavatele glükosüülhüdrolaasidele on tsellulaasid valdavalt kahedomäänse ehitusega valgud, koosnedes suuremast katalüütilisest domäänist ja väiksemast, omamoodi iminapana toimivast tselluloosile seondumise domäänist (ingl. *cellulose binding domain* - CBD)[26, 27]. Katalüütilises domäänis (ingl. *core*) toimub glükosiidse sideme hüdroolüüs, seondumisdomääni funktsiooniks on aga tsellulaaside kinnitamine tselluloosi pinnale ja seeläbi ensüümide pindkontsentratsiooni tõstmine [28, 29]. Bakteriaalsete tsellulaaside puhul on lisaks näidatud seondumisdomääni rolli tselluloosi kristallilise struktuuri lõhkumisel [29, 30]. Katalüütilist ja seondumisdomääni ühendab mõnekümne aminohappe pikkune tugevalt O-glükosüleeritud “*linker*” peptiid, mille töötlemine proteaasiga võimaldab kummagi domääni teineteisest eraldada [31].

1.2.3. Ekso – ja endotsellulaasid

Tsellulaaside nagu ka teiste polümeersedel substraatidel töötavate hüdrolaaside (proteaasid, nukleasid, amülaasid jne.) jaotamine ekso- ja endo-ensüümideks põhineb

asjaolul, et eksoensüümid alustavad polümeerse substraadi lagundamist polümeeri ottest, endoensüümid aga juhuslikust positsioonist polümeeri keskel. Tsellulaaside endo- või eksoaktiivsuse aluseks on erinevused nende aktiivtsentri struktuuris. Eksotsellulaaside (tsellobiohüdrolaaside) aktiivtsentrile on iseloomulik pikk ja mitme linguga kaetud tunnelitaoline struktuur, kuhu tselluloosi ahel saab eelistatult siseneda otsapidi ja kus seda ahelat monomeeride kaupa otsast pidevalt lühemaks “lõigatakse” [21, 23]. Endotsellulaaside aktiivtsenter seevastu on lühem ja avatuma ehitusega, mistõttu ensüüm saab tselluloosi “lõigata” juhuslikult positsioonilt ahelas – ilmutada endoaktiivsust, mille tulemuseks on substraadi polümerisatsiooniastme kahanemine [7,32, 33].

Ent tuleb lisada, et kuigi tsellulaaside sellist elegantset jaotamist ekso-ja endoensüümideks näivad toetavat tänaseni määratud tsellulaaside kristallstruktuurid, on just viimasel kümnendil nii struktuuri kui ensüümkineetika vallas ilmunud töid, mis osutavad, et seni rangelt eksotsellulaasideks peetud ensüümid omavad siiski teatud endoaktiivsust [34 - 37]. Seetõttu on oletatud, et eksotsellulaaside aktiivtsentrit “ülalt” katvad struktureeritud lingud (ingl. *loops*) võivad soojusliikumise toimele ajutiselt avaneda ning võimaldada endo-tüüpi katalüüsi toimumist [38]. Näiteks *T.reesei* tsellobiohüdrolaas Cel6A puhul on kristallstruktuuri tasemel tõepoolest täheldatud ensüümi aktiivtsentrit katvate lingude liikumist 4.5 Å oligosahhariidide seondumisel aktiivtsentrisse [38]. Ka tähelepanek, et tsellobiohüdrolaas Cel7A *Humicola insolens*ist on võimeline hüdrolüüsima glükosiidset sidet suhteliselt mahukaid asendajaid sisaldavas tetrasahhariidses substraadis, mille otsapidi ensüümi aktiivtsentrisse sisenemine on asendajate tõttu raskendatud, näib endoaktiivsuse hüpoteesi toetavat [35]. Siiski on küsimus eksotsellulaaside endoaktiivsusest ja selle ulatusest jäänud lahtiseks loodusliku tselluloosi hüdrolüüsil, kus tselluloosi polümeerid on tugevalt kristallilistesse struktuuridesse pakitud ja ensüümidele lahustuvate oligosahhariididega võrreldes raskemini kättesaadavad. Siin võivad tsellobiohüdrolaasi võimalikku endoaktiivsust mõjutada sellised tselluloosi parameetrid nagu amorfsete ja kristalliliste piirkondade osakaal või ensüümile kättesaadavate ahelaotste hulk [37].

Eksotsellulaaside puhul on käesoleva tööga seoses oluline ka nende otsa-eelistus ehk see, kas ensüüm alustab tselluloosi hüdrolüüsi ahela redutseerivast või mitteredutseerivast otsast. On näidatud, et ühe glükosüülhüdrolaaside perekonna ensüümid (näit. Cel7 perekond) omavad spetsiifikat redutseeriva, teise perekonna ensüümid (näit. Cel6 perekond) aga mitteredutseerivas otsa suhtes [36, 39 - 41]. Võimalik, et otsaeelistus on seotud katalüüsimehhanismiga, sest näiteks redutseeriva otsa suhtes spetsiifilised Cel7

perekonna tsellulaasid kasutavad üle glükosüül-ensüüm vaheühendi kulgevat *double displacement* mehhanismi, mitteredutseerivast otsast alustavad Cel6 ensüümid aga *single displacement* mehhanismi, mille korral kovalentset vaheühendit ei moodustu [41].

1.2.4. Protsessiivsus

Eksotsellulaaside aktiivtsentri ehitusega on vahetult seotud käesoleva töö keskmeks olev protsessiivsuse nähtus. Protsessiivsus, mis on polümeersel substraatidel töötavate ensüümide omadus, iseloomustab ensüümi võimet teostada mitut järjestikust katalüüsiakti ilma samal ajal substraadi küljest dissotsieerumata. Tsellulaaside puhul tähendab see, et kord ensüümi aktiivtsentrisse seondunud tselluloosi ahel ei vabane sealt peale igat glükosiidse sideme hüdrolyüsi etappi, vaid liigub aktiivtsentris edasi ja “paljastab” järgmise hüdrolyüsimist ootava sideme [21, 23, 42]. Nii võib see protsess korduda N korda, enne kui ensüüm-substraat kompleks laguneb. Teoreetiliselt võib protsessiivsus olla isegi nii suur, et ensüüm ei dissotsieeru enne, kui on kogu ahela monomeerideks lagundanud.

Eksotsellulaaside protsessiivsuse olulisus loodusliku tselluloosi hüdrolyüsil seisneb järgnevas. Glükosiidse sideme hüdrolyüsiks peab tselluloosi ahel sattuma ensüümi aktiivtsentrisse, samas kui algselt on kristallilistes piirkondades asuvad tselluloosi ahelad üksteisega vesiniksidemete ja van der Waalsi jõudude kaudu tugevasti seotud [1,7]. Tselluloos-tselluloos interaktsioonide katkestamise ja tselluloosi ahela ensüümi aktiivtsentrisse üleviimise vahel esineb seetõttu märgatav aktivatsioonibarjäär, mis hüdrolyüsi protsessi tervikuna aeglustab [43]. Protsessiivne toimetehhanism annab siin eksotsellulaasile endotsellulaasiga võrreldes eelise, sest olles tselluloosi ahela kord aktiivtsentrisse sidunud, ei lase eksoensüüm teda enam tervikuna kristalli “tagasi langeda”, vaid hoiab ahelat korduvate katalüüsiaktide jooksul mingis ulatuses kristallist väljas [44]. Iga järgneva glükosiidse sideme hüdrolyüsiga kaasneb järelikult väiksem aktivatsioonibarjäär. Distributiivselt toimiv endotsellulaas seevastu peab ühe ja sama ahela aktiivtsentrisse sidumise etappi korduvalt sooritama. Seetõttu on endoensüümidel olulisem roll tselluloosi amorfstes osades, kus nad tekitavad juurde eksoensüümidele substraadiks olevaid ahelaotsi ja põhjustavad sel teel ensüümidevahelist sünergismi [7, 45, 46].

Eeltoodud kaalutlusi kinnitavad katsetulemused *T.reesei* mutantse tsellobiohüdrolaasiga Cel7A, milles insenergeneetiliselt oli eemaldatud üks neljast aktiivtsentrit katvast lingust [44]. Aktiivtsentri avatum struktuur tõi kaasa ensüümi mutantse vormi hüdrolyütilise aktiivsuse kahekordse languse kristallilisel tselluloosil metsiktüüpi ensüümiga võrreldes ning mutandi samaaegse protsessiivsuse kahanemise [44].

Seevastu amorfse tselluloosi suhtes mutantse Cel7A aktiivsus tõusis [44]. Kaudselt annab eksotsellulaaside protsessiivsusest tunnistust ka asjaolu, et hüdroolüüsiprotsessi käigus jääb substraadi keskmine polümerisatsiooniate praktiliselt muutumatuks [32]. See on võimalik vaid juhul, kui tselluloosi ahelale seondunud ensüüm lagundab kogu ahela ega tekita poolikuid fragmente.

On siiski võimalik, et protsessiivne toimemehhanism ei piirdu üksnes eksotsellulaasidega, vaid võib esineda ka endoensüümide korral [47 - 49]. Sellisel juhul järgneb algele, tselluloosi ahela keskel sooritatud lõikele endoensüümi edasine protsessiivne liikumine mööda ahelat sarnaselt eksotsellulaasidele [49]. Endoprotsessiivse tsellulaasi näiteks võib pidada endoglükaanase CelF *Clostridium cellulolyticum*ist ja CenC *Cellulomonas fimi*st [49, 50]. *C. cellulolyticum*i CelF produtseerib tahke tselluloosi hüdroolüüsil valdavalt (95 %) lahustuvaid oligosahhariide, mis on iseloomulik eksotsellulaasidele [48, 50]. Karboksümetüültselluloosi hüdroolüüsil seevastu on CelF-i kineetika sarnane endoglükanaasidele [50].

1.2.5. Tsellulaaside protsessiivsuse määramiseks kasutatavad meetodid

Senikasutatud meetodid tsellulaaside protsessiivsuse määramiseks põhinevad valdavalt kas ensüümreaktsiooni käigus vabanenud lahustuvate sahhariidide ja tselluloosil tekkinud uute ahelaotste suhte või erinevate lahustuvate sahhariidide omavahelise suhte mõõtmisel [48, 51]. Siin on puuduseks asjaolu, et ei ole võimalik jälgida esimest hüdroolüüsiakti. Protsessiivsuse mõõtmine lahustuvate sahhariidide omavahelise suhte põhjal põhineb asjaolul, et rangelt eksoaktiivsust omav tsellobiohüdrolaas vabastab paaritud arvu monomeere sisaldavast tselluloosi ahelast esimese glükosiidse sideme hüdroolüüsi etapis tsellobioosi asemel kas glükoosi või tsellootrioosi [52]. Eeldusel, et paaris ja paaritu monomeeride arvuga ahelate jaotus tselluloosis on 1:1, võimaldab vabanenud glükoosi ja tsellobioosi suhte arvutada protsessiivsuse rangelt redutseeriva otsa spetsiifilise ensüümi jaoks [52]. Nimetatud algoritmi kohaselt Cel7A jaoks määratud protsessiivsuse väärtused tselluloosi hüdroolüüsil on jäänud vahemikku 5 – 20 tsellobioosi ühikut [44, 52].

1.2.6. *Trichoderma reesei* tsellobiohüdrolaas Cel7A

Tsellobiohüdrolaas Cel7A (vana nomenklatuuri järgi CBH 1) kujutab endast pehmemädanikseene *Trichoderma reesei* tsellulolüütilise süsteemi võtmeensüümi, moodustades ligikaudu 60 % nimetatud organismi poolt sekreteeritud valkudest [7]. Cel7A

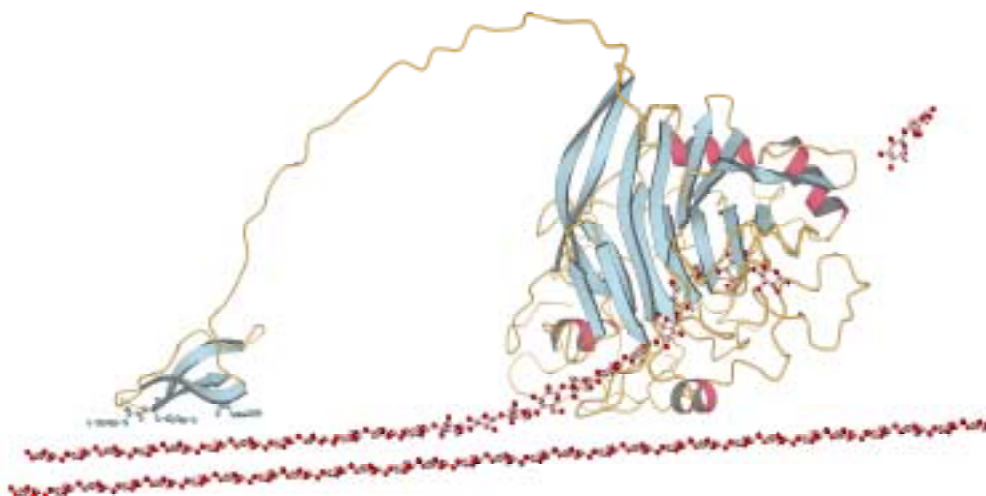
homolooge leidub ka teistes organismides, tuntumana neist võib nimetada tsellobiohüdrolaasi Cel7D valgemädanikseenest *Phaenerochaete chrysosporium* [53].

Cel7A on 497 aminohappest koosnev kahedomäänne O-glükosüleeritud (kuni 6 %) ensüüm molekulmassiga ligikaudu 64 kDa (joonis 2) [26, 54]. Teda peetakse redutseeriva otsa spetsiifiliseks eksotsellulaasiks, mis hüdroolüüsib tselluloosi ahelat protsessiivselt [9, 20, 41]. Valdavaks reaktsiooniproduktiks on Cel7A korral tsellobioos, vähemal määral ka glükoos ja tsellotrioos [52]. Glükosiidse sideme hüdroolüüs Cel7A aktiivtsentris toimub konfiguratsiooni retentsiooniga ja kulgeb läbi glükosüül-ensüüm vaheühendi [24].

Lisaks tselluloosile suudab Cel7A glükosiidset sidet hüdroolüüsida mitme-sugustes madalmolekulaarsetes sahhariidides ja nende derivaatides [35, 55], omab aga märgatavalt madalamat aktiivsust C-6 ja C-2 positsioonis karboksümetüül ja hüdroksümetüülrühmi sisaldavate lahustuvate tsellulooside suhtes [56].

Cel7A tertsiaarstruktuur koosneb kahest antiparalleelsete β -lehtede kihist, kus sisemisest kihist moodustunud 50 Å pikkust aktiivtsentrit katavad “ülalt” neli struktuuritut lingu (ingl. *loop*) [57]. Aktiivtsenter sisaldab 10 seostumiskohta glükoosi jääkidele, millest 7 jäävad katalüüsikohast mitteredutseeriva otsa poole (nn. substraadi seostumiskohad) ja 3 redutseeriva otsa poole (nn. produkti seostumiskohad) [21]. Tselluloosi ahela seondumist aktiivtsentrisse stabiliseerivad vesiniksidemed glükoosi C-2 ja C-6 hüdroksümetüülrühma ning valgu asparagiini/glutamiini amiidrühma vahel ühelt poolt, teiselt poolt aga trüptofaani indoolringi ja glükopüranoosi ringi vaheline hüdrofoobne interaktsioon [21]. Nende interaktsioonide tulemusena on tselluloosi ahel Cel7A aktiivtsentris piki β -1,4-sidet vaadates tervikuna 140⁰ ulatuses välja väänatud [21]. Katalüütilisteks aminohapeteks Cel7A aktiivtsentris on Glu212-Asp214-Glu217 triaad, kus Glu212 käitub nukleofiili ja Glu 217 üldise hape-alus katalüsaatorina, Asp 214 aga on ilmselt oluline nimetatud aminohapete ioniseeritud vormide stabiliseerimisel vesiniksidemete moodustamise kaudu [20, 21].

Põhjus, miks Cel7A ja teiste tsellobiohüdrolaaside reaktsiooniproduktiks on valdavalt tsellobioos, peitub substraadi stereokeemias. β -1,4-glükosiidne side paikneb tselluloosi polümeeris glükopüranoosi ringi tasapinnast vaheldumisi all ja üleval pool, Cel7A aga hüdroolüüsib ainult ringi taspinnast ühel poolt asetsevat sidet, mis kordub iga kahe glükoosi jäägi tagant [21, 42]. Seetõttu on valdavaks reaktsiooniproduktiks tsellobioos, kuigi paaritu monomeeride arvuga ahelast vabastab Cel7A esimese hüdroolüütilise lõike käigus ka glükoosi ja tsellotrioosi [52].



Joonis 2. *Trichoderma reesei* tsellobiohüdrolaas Cel7A tselluloosi hüdrolüüsil. Joonis saadud Dr. Jerry Ståhlberg'i käest ning kasutatud Dr. Christina Divne loal (© Christina Divne 1998).

1.2.7. Tsellulaaside uuringutes enim kasutatud mudelsubstraadid

Erinevad tsellulaasid omavad tselluloosil erinevaid toimemehhanisme (näit. endo või ekso), mille koosmõju tagab tselluloosi efektiivse lagundamise. Kindla tsellulaaside klassi iseloomustamiseks kasutatakse seetõttu mitmesuguseid defineeritud omadustega mudelsubstraate, kus ensüümi konkreetne toimemehhanism kõige paremini avaldub, võimalikud lisatoimemehhanismid on aga pärsitud [7].

Endoglükanaasse aktiivsuse määramiseks kasutatakse laialdaselt mitmesuguseid lahustuvaid tselluloosi derivaate, näiteks karboksümetüül- (CMC) või hüdroksümetüültselluloosi (HEC), kus vastavad asendajarühmad esinevad tselluloosis keskmiselt iga kahe kuni viie glükoosi jäägi järel (asendatuse aste 0.5 – 0.2) [7, 56]. Blokeerivate asendajarühmade tõttu on nimetatud tselluloosid raskesti lagundatavad ahela otsast alustavate tsellobiohüdrolaaside jaoks [42, 56]. Endoglükanaasid seevastu on võimelised neid substraate ahelasisestest asendamata piirkondadest hüdrolüüsima [7]. Hüdrolüüsi tulemusena kahanevad tselluloosi polümerisatsiooniaste ja lahuse viskoossus kiiresti [58]. Uute redutseerivate rühmade teke koos lahuse viskoossuse kiire kahanemisega on üks kindlaimaid endoglükanaasse aktiivsuse indikaatoreid [58].

Kõrge kristallilisuse astmega derivatiseerimata tsellulooside nagu filterpaber, puuvill, bakteriaalne tselluloos ja mikrokristalliline tselluloos suhtes on endoglükanaaside aktiivsus madal [56]. Seetõttu kasutatakse neid substraate valdavalt tsellobiohüdrolaaside, eelkõige nende sünergistlike segude aktiivsuse määramiseks lahustuvate reaktsiooniproduktide kvantifitseerimise põhjal [56]. Lahustuvate reaktsiooniproduktide ja tselluloosil juurde tekkinud redutseerivate rühmade suhet on rakendatud tsellulaaside ekso/endoaktiivsuse osakaalu hindamiseks [48, 50]. Eksotsellulaaside korral jääb lahustumatute redutseerivate rühmade arv madalaks (<10 %), endotsellulaaside korral aga ulatub 50 %-ni [48].

Värvainega mittekovalentselt kaetud tselluloose on kasutatud endoglükanaaside ja puhastamata ensüümsegude aktiivsuse määramiseks [56, 59]. Värvitud tselluloosid on sobivad ka produktinhibitsiooni uuringuteks, kus lisatud tsellobioosi taustal on vabanenud produkti muidu raske detekteerida [59]. Kuna värvaine molekulid seonduvad tselluloosiga polümerisatsiooniastmest sõltuvalt, põhjustab endoglükanaasest aktiivsusest tulenev polümerisatsiooniastme kahanemine värvaine järk-järgulise dissotsieerumise substraadilt lahusesse, mida on võimalik fotomeetriselt jälgida [59, 60]. Nimetatud substraadid on sobivad ka endoglükanaase aktiivsuse kvalitatiivseks "skriinimiseks" tardsöötme või natiivse elektroforeesi geelis, kus värvivaba piirkond osutab endoglükanaasi esinemisele [61].

Individuaalsete tsellobiohüdrolaaside otsaeelistuse ja ekso/endo toimemehhanismi määramiseks sobivad otsmärgistatud (pms. redutseerivast otsast) tselluloossed substraadid [62]. Otsmärkena on kasutamist leidnud H^3 ja fluorestseeruvad värvained, samuti hõbedapartiklid elektronmikroskoopia uuringutes [62 - 64].

Lisaks erinevatele polümeersetele ühenditele kasutatakse tsellulaaside puhul substraatidena kromo- või fluorogeenset, samuti radioaktiivset otsmärget sisaldavaid tsellooligosahhariide, mis on sobivad eelkõige aktiivtsentri tasemel toimuva reaktsioonimehhanismi iseloomustamiseks [65 - 67]. Mainitud substraatide eelisteks on hea lahustuvus ja defineeritud keemiline struktuur, ent samas ei kirjelda nendega saadud tulemused polümeerse substraadi hüdrolüüsi iseärasusi, kus tsellulaaside aktiivsust mõjutavateks teguriteks on ensüümide adsorptsioon tselluloosi pinnale ja individuaalsete ahelate kättesaadavus kristallist [7].

Töö eesmärgid

Käesoleva töö eesmärgiks oli välja töötada kineetiline meetod tselluloosi redutseeriva otsa spetsiifiliste tsellobiohüdrolaaside protsessiivsuse määramiseks ning hinnata nimetatud meetodi abil *Trichoderma reesei* tsellobiohüdrolaasi Cel7A protsessiivsust erinevatel tselluloossetel substraatidel.

2. Materjalid ja meetodid

2.1. Materjalid

2.1.1 Reagendid

Antraniilhape (AA), aminopüridiin (AP), naatriumtsüaanoboorhüdriid (NaCNBH_3), tsellobioos ja 3-metüül-2-bensotiasooloonhüdrasoon (MBTH) olid pärit Sigmast, 2,2'-azino-bis(3-etüülbenstiasoliin-6-sulfoonhape) (ABTS) ja karboksümetüülselluloos (CMC Na-sool, keskmine viskoossus) Flukast. Kõik ülejäänud reagendid olid kõrgeimas saadavas puhtusastmes.

2.1.1.1. Töös kasutatud Cel7A mutandid

T. reesei tsellobiohüdrolaasi Cel7A mutandid E212Q ja D214N olid saadud Dr. Jerry Ståhlberg'i käest (Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituut, BMC, Uppsala). Mutandis E212Q on aktiivtsentris nukleofiilina toimiv glutamaat 212 asendatud glutamiiniga, mutandis D214N aga aspartaat 214 asparagiiniga [20].

2.2. Meetodid

2.2.1. Ensüümide puhastamine

Metsiktüüpi tsellobiohüdrolaas Cel7A puhastati *T. reesei* tüve QM 9414 kultuurfiltraadist standardmetoodika kohaselt [54]. Cel7A mutandid E212Q ja D214N olid puhastatud *T. reesei* tüve VTT-D-93201 kultuurfiltraadist vastavalt avaldatud meetoodikale [20]. D214N puhastati analoogiliselt endoglükanaasiga Cel5A täiendavalt Superose[®] -12 (Pharmacia) kolonnil [68]. Kolonn koguruumalaga 104 mL oli eelnevalt tasakaalustatud 0.5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ lahusega 0.1 M NaAc-puhvril, pH = 5.0. Kolonnile kanti 0.7 mL valgu proovi ning voolutati seda isokraatiliselt 200 mL 0.5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ lahusega eelnimetatud puhvril. Järgnes voolutamine 0.1 M NaAc-puhvriga, pH = 5.0, voolutuskiirusel 1 mL/min ilma $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -ta.

Cel7A katalüütilise domääni (core) saamine toimus eelnevalt puhastatud Cel7A papaiiniga töötamise ja saadud proteolüüsiproductide geelfiltratsiooniga eraldamise teel vastavalt varasemale meetoodikale [31].

Valkude puhtust kontrolliti 10 % SDS-PAGE elektroforeesil ning kontsentratsioon määrati optilise tiheduse põhjal lainepikkusel 280 nm. Kontsentratsiooni määramisel kasutati teadaolevaid ekstinkstioonikoefitsientide väärtusi 78 800 ja 74 000 $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ vastavalt Cel7A (metsiktüüp ja mutandid) ning Cel7A katalüütilise domääni jaoks [34].

2.2.2. Tsellulooside valmistamine

Bakteriaalne tselluloos (BC) ja bakteriaalne mikrokristalliline tselluloos (BMCC) valmistati kaubanduslikult kättesaadavast *Acetobacter xylinum* tselluloosist ('CHAOKOH® coconut gel in syrup' from Thep. Padung Porn Coconut Co. Ltd., Bangkok, Thailand) vastavalt varemkirjeldatud meetodikale [15]. Amorfse tselluloosi (N,N-dimetüülatsetamiid/LiCl-regenereeritud BC) ja endoglükanaasiga Cel5A eeltöödeldud BC (EG-BC) valmistamine toimus samuti varemkirjeldatud meetodika kohaselt [63, 69].

Tselluloos/ksüloglükään kompleksi valmistamiseks vastavalt varemkirjeldatud meetodikale [70]. AA-derivatiseeritud EG-BC (AA-EG-BC) suspendeeriti ksüloglükääni lahuses (2.2 g/L) 0.05 M NaAc-puhvril, pH 5.0, ning inkubeeriti toatemperatuuril vähemalt ööpäeva jooksul. AA-EG-BC kontsentratsioon suspensioonis oli 3.0 g/L. Vahetult enne kasutamist pesti lahustumatu AA-EG-BC ksüloglükäänsüsteemi kolmekordse tsentrifuugimise (5 min, 50 · g) ja resuspendeerimise teel 0.05 M NaAc-puhvriga, pH 5.0, mitteseondunud ksüloglükäänist puhtaks ja suspendeeriti seejärel eelnimetatud puhvril.

Tselluloosi kontsentratsioon määrati kõigil juhtudel antroon/väävelhappe meetodil, kasutades standardina tsellobioosi ning mõõtes optilist tihedust spektrofotomeetriselt 585 nm juures [71].

2.2.3. Tsellobioosi derivatiseerimine antraniilhappe (AA) ja aminopüridiiniga (AP)

Tsellobioos-antraniilhappe aminoalditooli (AA-CB) süntees ja fluorestsentsparameetrite määramine on kirjeldatud Lisas 1. Lühidalt, 1.1 mmol (0.38 g) D-tsellobioosi lahusele 22 mL vees lisati 4.4 mmol (0.60 g) antraniilhapet (AA) ja 22 mmol (1.38 g) naatriumtsüaanoborohüdriidi (NaCNBH_3) ning inkubeeriti 3 h 70 °C juures. Reaktsioonisegu jahutati järgnevalt toatemperatuurini ja produkt AA-CB eraldati sadestamise teel atseetonitriiliga lõppkontsentratsioonis 95 % (v/v). Tekkinud geelisarnast sadet pesti korduvate (5 – 7 korda) tsentrifuugimise (5 min, 8000 · g) ja resuspendeerimise etappide kaudu 98 % (v/v) atseetonitriiliga ning eemaldati pesemissolvent seejärel *in vacuo*. Produkt säilitati valguse eest kaitstult – 20 °C juures.

Tsellobioos-aminopüridiin aminoalditool derivaadi (AP-CB) süntees toimus mõningate muudatustega vastavalt varemkirjeldatud metoodikale [72]. Märgistamisreagenti valmistamiseks lahustati 59 mmol (5.6 g) 2-aminopüridiini (AP) 5.5 mL vees, tiitriti lahuse pH jää-äädikhappega 7.0 juurde ning lisati 1.8 mmol (0.11 g) NaCNBH_3 . Tekkinud lahuse ruumala oli 10 mL. Saadud lahusele lisati seejärel 0.3 mmol (0.11 g) D-tsellobioosi ja inkubeeriti üleöö 70°C juures. Reaktsiooniprodukti AP-CB järgnev eraldamine toimus kõigis punktides analoogiliselt AA-CB-le.

AP-CB fluorestsentsparameetrid määrati firma Hitachi F – 4500 fluorimeetril 25°C juures 0.05 M NaAc-puhvril, pH 5.0. AP-CB fluorestsentsi pH-sõltuvust mõõdeti erineva pH väärtusega puhverlahustes (pH 5 – 12), kasutades eelnevalt määratud ergastus- ja emissioonlainepikkuste kombinatsioone 310/390 nm.

2.2.4. Tselluloosi derivatiseerimine AA ja AP-ga

AA-märgistatud tsellulooside sünteesimetoodika on esitatud Lisas 1. Lühidalt, tselluloosi suspensioonile vees kontsentratsiooniga 4 – 10 g/L lisati AA ja NaCNBH_3 lõppkontsentratsioonist vastavalt 0.2 M ja 1.0 M, inkubeeriti intensiivse segamisega 70°C juures üleöö ning pesti derivatiseeritud tselluloos ohtra vee ja 0.05 M NaAc-puhvriga, pH 5.0, klaasfiltril märgistamisreagentidest puhtaks. Kõik tselluloosid suspendeeriti pärast pesemise etappi nimetatud puhvril ja säilitati valguse eest kaitstult 4°C juures.

Derivatiseerimise korral AP-ga lisati 0.1 g BC suspensioonile 10 mL vees 20 mL vesilahust (märgistamisreagenti), milles oli eelnevalt lahustatud 106 mmol (10.0 g) AP ja 8 mmol (0.5 g) NaCNBH_3 ning mille pH oli jää-äädikhappega tiitritud 7 juurde. Märgistamisreagentide AP ja NaCNBH_3 lõppkontsentratsioonid reaktsioonisegus olid vastavalt 3.5 M ja 0.3 M. Reaktsioonisegu inkubeeriti ööpäeva jooksul 70°C juures ühes intensiivse segamisega. Seejärel lahjendati reaktsioonisegu veega 100 mL-ni ja AP-derivatiseeritud BC (AP-BC) eraldamiseks märgistamisreagentidest pesti tselluloosimassi klaasfiltril ohtra vee ning 0.05 M NaAc-puhvriga, pH 5.0. Peale pesemist suspendeeriti AP-BC 20 mL eelmainitud puhvril ja säilitati valguse eest kaitstult 4°C juures.

Tselluloosi külge jäänud märke hulk mõõdeti fluoromeetriselt 0.05 M NaAc-puhvril, pH = 5.0, kasutades standardina vastavaid tsellobioosi derivaate AA-CB ja AP-CB. Eelnevalt oli AA- ja AP-märgistatud tselluloos *T.reesei* osaliselt puhastatud tsellulaaside seguga täielikult lahustuvateks sahhariidideks lagundatud. Märke hulk väljendati μmol tselluloosi algse massiühiku kohta g. AP-märke stabiilsuse hindamiseks

BC-I mõõdeti AP kogust tselluloosil vastavalt 1 päev ja 12 päeva peale märgistamisreaktsiooni lõpetamist.

2.2.5. AP-märgistamise ajasõltuvus BC-I

0.2 mL BC suspensioone vees (10 g/L) inkubeeriti erinevate ajavahemike jooksul 70 °C juures AP ja NaCNBH₃-ga lõppkontsentratsioonid 3.5 M ja 0.3 M. Kõik ajapunktid olid kolmes korduses. Reaktsiooni peatamiseks eraldati tselluloos proovidest tsentrifuugimisega (3 min, 8000 · g) ning pesti 0.05 M NaAc-puhvriga, pH 5.0, korduvate tsentrifuugimise (3 min, 8000 · g) ja resuspendeerimise etappide teel. Pesemise efektiivuse kontrolliks mõõdeti supernatandist iga pesemise etapi järel AP-le vastavat fluorestsentsi eelnevalt kindlaks määratud lainepikkustel 300/370 nm. Pestud AP-BC (2 mg) suspendeeriti 1.0 mL 0.05 M NaAc-puhvrisk, pH 5.0 ning määrati tselluloosi külge jäänud AP kogus nagu kirjeldatud eelnevalt. AP-BC täpne kontsentratsioon proovides määrati antroon/väävelhappe meetodil mõõdetud üldsuhkru põhjal ja märke hulk väljendati µmol tselluloosi algse massiühiku kohta g.

2.2.6. Ensüümhüdrolüüsil vabanenud produktide kvantifitseerimine

AA-CB ja AP-CB kontsentratsioon proovides määrati fluoromeetriliselt. AA-CB kvantifitseerimine toimus aluselises keskkonnas (pH 11.6) ergastus- ja emissioonilainepikkuste kombinatsioonil 330/425 nm. AP-CB korral viidi proovide pH eelnevalt 1.0 M äädikhappega 5.0 juurde ning mõõdeti fluorestsentsi lainepikkuste 310/390 nm juures. Vastavate kalibrimisstandarditena kasutati eelnevalt sünteesitud AA-CB-d ja AP-CB-d. Ergastus- ja emissioonipilu laius oli mõlemal juhul 5/5 nm.

Tsellobioosi kvantifitseeriti kolmel erineval meetodil. Ensümaatilise määramise korral kasutati abiensüümidenä β-glükosidaasi, glükoosi oksüdaasi, peroksüdaasi ning elektronide doonorina 2,2'-azino-bis(3-etüülbenstiasoliin-)-6-sulfoonhapet (ABTS) [69]. Standardina kasutati tsellobioosi ning proovide optilist tihedust mõõdeti 420 nm juures. Enne ensüümreagendi lisamist viidi proovide pH 1.0 M äädikhappe lahusega 5.0 juurde.

Tsellobioosi mitteensümaatiliseks määramiseks kasutati MBTH-I (3-metüül-2-bensotiasolinoonhüdrasoon) põhinevat redutseerivate sahhariidide spetsiifilist meetodit [73] või üldsuhkrul põhinevat antroon/väävelhappe meetodit [71]. Kalibrina kasutati mõlemal juhul tsellobioosi ning proovide optilist tihedust mõõdeti vastavalt 620 nm ja 585 nm juures.

2.2.7. *T.reesei* tsellobiohüdrolaas Cel7A vahendatud hüdrolyüsi kineetika AA- ja AP-derivatiseeritud tselluloosidel

Fluorestsentsmärgistatud tsellulooside (AA-BMCC, AA-BC, AA-EG-BC, amorfne AA-BC ja AP-BC) suspensioone (2.0 g/L) inkubeeriti 25 °C juures 0.05 M NaAc-puhvril, pH = 5.0, *T.reesei* tsellobiohüdrolaasiga Cel7A (0.1 – 0.25 µM) ja 0.25 µM Cel7A katalüütilise domääniga. Reaktsioon käivitati ensüümi lisamisega intensiivselt segatavasse tselluloosi suspensiooni. Kindlate ajavahemike järel eemaldati reaktsioonikeskkonnast 1.0 mL proovi ning lisati proov kas 50 µL 1.0 M CH₃NH₂ või 55 µL 0.5 M NaOH lahusele, viies keskkonna pH väärtuse mõlemal juhul 11.6 juurde. Peale 2 – 3 h toatemperatuuril seismist eemaldati tselluloos proovidest tsentrifuugimise teel (3 min, 8000 · g). Vabanenud AA-CB ja AP-CB kvantifitseeriti fluoromeetriliselt, tsellobioosi määramine toimus ensümaatilisel. Ensüümi protsessiivsus väljendati tsellobioosi ja otsmärke AA-CB tekkekiiruste suhtena.

2.2.8. Cel7A kineetika AA-EG-BC ksüloglükokaankompleksil

AA-EG-BC ja AA-EG-BC ksüloglükokaankompleksi suspensioone (1.0 g/L) 0.05 M NaAc-puhvril, pH 5.0, inkubeeriti intensiivse segamisega 25 °C juures 0.25 µM intaktse Cel7A ja 0.25 µM Cel7A katalüütilise domääniga 5 – 10 min. Reaktsiooni peatamiseks eemaldati segust kindlate ajavahemike järel 0.7 mL proovi ning pipeteeriti proov 32 µL 0.5 M NaOH lahusele, viies proovi pH 11.6 juurde. Pärast 1 h toatemperatuuril seismist eraldati tselluloos proovidest tsentrifuugimisega (3 min, 8000 · g) ning määrati supernatandis vabanenud tsellobioosi ja otsmärke AA-CB kontsentratsioon. Tsellobioosi määramine toimus ensümaatilisel. Ensüümi protsessiivsus väljendati antud ajahetkeks vabanenud tsellobioosi ja AA-CB otsmärke kontsentratsiooni suhtena.

Cel7A võimaliku ksülanolüütilise aktiivsuse määramiseks inkubeeriti ksüloglükokaani lahust (2.2 g/L) 0.05 M NaAc-puhvril, pH 5.0, 25 °C juures 10 min 0.25 µM Cel7A-ga. Reaktsiooni peatamiseks eemaldati reaktsioonisegust 0.5 mL proovi ning viidi proovi pH 26 µL 0.5 M NaOH lahusega 11.7 juurde. Tekkinud redutseerivate rühmade määramine toimus ensümaatilisel ABTS-meetodil. Kontrollpunktides lisati 0.5 M NaOH lahus ksüloglükokaani lahusele enne ensüümi, kontrollpunktide edasine töötlus oli kõigis punktides analoogiline ülejäänud ajapunktidega.

2.2.9. Cel7A protsessiivsuse kontsentratsioonisõltuvus

AA-BC suspensiooni (2 g/L) 0.05 M NaAc-puhvris, pH 5.0, inkubeeriti 25 °C juures 0.5 – 360 min erinevas kontsentratsioonis tsellobiohüdrolaas Cel7A ja Cel7A katalüütilise domääniga. Kasutatud kontsentratsioonivahemik oli 0.1 – 15 µM intaktse Cel7A ning 0.1 – 1.0 µM Cel7A katalüütilise domääni korral. Reaktsiooni peatamiseks eemaldati reaktsioonisegust kindlate ajavahemike järel 0.6 mL proovi ja pipeteeriti proov 40 µL 0.5 M NaOH lahusele, viies proovi pH 11.6 juurde. Tselluloos eemaldati proovidest tsentrifuugimisega (3 min, 8000 · g) ning supernatandis määrati AA-CB ja tsellobioosi kontsentratsioon. Tsellobioosi määramine toimus MBTH või antroon/väävelhappe meetodil. Ensüümi protsessiivsus väljendati antud ajahetkeks vabanenud tsellobioosi ja otsmärke AA-CB kontsentratsiooni suhtena.

2.2.10. Cel7A adsorptsiooniisoterm AA-BC-I

AA-BC-d (2 g/L) inkubeeriti 0.05 M NaAc puhvris, pH 5.0, 25 °C juures 40 min Cel7A-ga (0.1 – 15 µM). Vältimaks valgu mittespetsiifilist seondumist viidi reaktsioon läbi klaastuubides. Reaktsiooni peatamiseks eemaldati AA-BC proovidest tsentrifuugimise teel (3 min, 8000 · g) ning määrati supernatandist mitteseondunud valgu kontsentratsioon spektrofotomeetriliselt 280 nm juures [34]. Madalamate ensüümi kontsentratsiooni korral toimus mitteseondunud valgu kvantifitseerimine fluoromeetriliselt emissiooni- ja ekstinktsioonilainepikkusel 280/340 nm, kasutades kaliibrimisstandardina teadaoleva kontsentratsiooniga Cel7A lahuseid. Kõigist seondumisproovidest kvantifitseeriti lisaks vabanenud otsmärke AA-CB. Seondunud ensüümi hulk leiti Cel7A algkontsentratsiooni ja mitteseondunud ensüümi kontsentratsiooni vahest ning väljendati µmol valku g⁻¹ (tselluloos). Tulemuste analüüsil lähtuti kahe erineva afiinsusega seondumiskoha mudelist, mida kirjeldab kahe Langmuiri adsorptsiooniisotermi summa :

$$B = A_1 \cdot F / (K_{d1} + F) + A_2 \cdot F / (K_{d2} + F) \quad (1)$$

kus A_1 ja A_2 on ensüümi piiriline adsorptsioon (µmol g⁻¹) esimeses ja teises seondumiskohas, B seondunud ensüümi kontsentratsioon (µmol g⁻¹), F vaba ensüümi kontsentratsioon (µM), K_{d1} ja K_{d2} ensüümi dissotsiatsioonikonstandid vastavatest seondumiskohtadest (µM). Leitud seondumisparameetrite põhjal arvutati Cel7A kontsentratsioon kõrgema afiinsusega seondumiskohas (B_1 , µmol g⁻¹).

2.2.11. Cel7A endoaktiivsus BC-I ja CMC-I

BC suspensiooni (2.0 g/L) inkubeeriti intensiivse segamisega 0.05 M NaAc-puhvris, pH 5.0, 25 °C juures 10 µM metsiktüüpi Cel7A ja 10 µM Cel7A mutantidega E212Q ja D214N. Kindlate ajavahemike järel eemaldati reaktsioonisegust 1.0 mL proovi ja pipeteeriti proov reaktsiooni peatamiseks 0.15 mL 0.5 M NaOH lahusele. BC eemaldati proovidest tsentrifuugimise teel (3 min, 8000 · g) ja saadud supernatandist määrati vabanenud tsellobioos antroon/väävelhappe meetodil. Tselluloosi massi pesti järgnevalt tsentrifuugimise ja resuspendeerimise teel (3 min, 8000 · g) 2 korda 1 mL 0,1 M NaOH lahusega ning seejärel 1 kord 1 mL destilleeritud veega. Pestud tselluloos derivatiseeriti AA-ga ja redutseerivate rühmade arvu tselluloosil hinnati külge jäänud AA hulga põhjal (µmol g⁻¹) vahetult AA-BC suspensioonist. Kontrollpunktides lisati 0.5 M NaOH lahus BC suspensioonile enne ensüümi lisamist, kontrollpunktide edasine töötlus oli kõigis üksikasjades analoogiline ülejäänud ajapunktidega. Metsiktüüpi Cel7A korral olid kõik ajapunktid kolmes korduses, mutantide E212Q ja D214N korral ühes korduses. Metsiktüüpi Cel7A ja Cel7A mutantide endoaktiivsus defineeriti 30 min ensüümtöötuse järel BC-le lisandunud ja algselt BC-I olnud redutseerivate rühmade arvu vahena.

Cel7A endoaktiivuse mõõtmiseks CMC-I inkubeeriti 0.9 % (w/v) keskmise viskoossusega CMC lahust 0.05 M NaAc-puhvris, pH 5.0, 25 °C juures metsiktüüpi Cel7A ning vastavate mutantidega E212Q ja D214N 1.5 - 28 h. Ensüümi kontsentratsioon kõigis proovides oli 1.0 µM. Reaktsiooni peatamiseks eemaldati kindlate ajavahemike järel reaktsioonisegust 0.3 mL proovi ning pipeteeriti proov 20 µL 0.5 M NaOH lahusele. Reaktsiooni käigus lahusesse juurde tekkinud redutseerivad rühmad kvantifitseeriti MBTH meetodi abil, kasutades kaliibrina tsellobioosi ning mõõtes lahuse optilist tihedust 620 nm juures. Enne optilise tiheduse mõõtmist oli proovidesse tekkinud sade tsentrifuugimise teel eemaldatud (3 min, 8000 · g). Kontrollpunktides lisati 0.5 M NaOH lahus CMC lahusele enne ensüümi, kontrollpunktide edasine töötlus järgis kõigis üksikasjades ülejäänud ajapunkte. Ensüümpreparatsiooni CMCaasne aktiivsus defineeriti ööpäevase ensüümtöötuse tulemusena lahusesse lisandunud ja CMC algses 0.9 % (w/v) preparatsioonis sisaldunud redutseerivate rühmade arvu vahena.

Cel7A üldaktiivsuse mõõtmiseks inkubeeriti BC-d kontsentratsioonivahemikus 0.03 – 1.4 g/L 0.05 M NaAc-puhvris, pH 5.0, 25 °C juures 30 min jooksul 1.0 µM metsiktüüpi Cel7A-ga. Reaktsioon peatati 40 µL 0.5 M NaOH lahuse lisamisega 0.6 mL proovile ning eemaldati tselluloos proovidest tsentrifuugimisega (3 min, 8000 · g). Vabanenud tsellobioos määrati supernatandist antroon/väävelhappe meetodil.

3. Tulemused

3.1.1. Fluorestsentsmärgistatud tselluloosil põhinev meetod redutseerivast otsast alustava tsellobiohüdrolaasi protsessiivsuse määramiseks (Lisa 1)

Redutseeriva otsa spetsiifiliste tsellobiohüdrolaaside protsessiivsuse määramine põhines käesolevas töös fluorestsentsmärgistatud tselluloosidelt hüdrolüüsi käigus vabaneva tsellobioosi ja fluorestseeruva otsmärke suhte määramisel.

Fluorestsentsmärgistatud tsellulooside süntees toimus reduktiivse amineerimise teel AA-ga vesikeskkonnas 70 °C juures. Otsmärgistatud tselluloosilt ensüümhüdrolüüsi käigus vabaneva fluorestsentsmärgistatud tsellobioosi kvantifitseerimiseks sünteesiti lisaks vastav tsellobioosi konjugaat AA-CB. Kokkulangevus AA-märgistamise ja redutseerivate sahhariidide määramiseks tavapäraselt kasutatava Somogyi-Nelsoni meetodi abil hinnatud redutseerivate rühmade arvus tselluloosil kinnitas fluorestsentsmärgistamise kvantitatiivsust (Lisa 1, tabel 1). Samuti oli AA-märke ensüümuuringuteks piisavalt stabiilne (ligikaudne poolestusaeg tselluloosil 200 päeva) (Lisa 1).

Kõigil uuritud AA-tselluloosidel iseloomustas *T.reesei* tsellobiohüdrolaas Cel7A vahendatud otsmärke AA-CB vabanemist ajas kahefaasiline kineetika, kus kiirele eksponentsiaalsele faasile järgnes aeglasem lineaarne faas, seejuures oli ajahetkele $t = 0$ tagasiekstrapoleeritud AA-CB kontsentratsioon π (ingl. “burst”) võrdeline kasutatud ensüümi kontsentratsiooniga ja lähenes sellele küllastavatel substraadi kontsentratsioonidel (Lisa 1, joonis 4). $\pi^{1/2}$ sõltuvus substraadi kontsentratsioonist oli hüperboolne nagu ennustab aktiivtsentrite tiitrimise mehhanism (Lisa 1, joonis 5). Madalmolekulaarse substraadi pNPC hüdrolüüsil Cel7A poolt oli aglükoonse p-nitro-fenoolrühma vabanemine ajas lineaarne ja nn. “burst” nähtust ei esinenud ($\pi = 0$) (Lisa 1, joonis 4).

Cel7A protsessiivsus AA-tselluloosidel oli defineeritud tsellobioosi ja AA-CB tekkekiiruste suhtena V_{CB}/V_{AA-CB} ajavahemikus, kus mõlema produkti vabanemist võis lugeda ajas lineaarseks. Nimetatud algoritmi kasutades olid AA-BMCC-l ja AA-BC-l Cel7A jaoks küllastaval substraadi kontsentratsioonil mõõdetud protsessiivsuse väärtused vastavalt 42 ± 10 ja 88 ± 10 tsellobioosi ühikut (Lisa 1, tabel 1). Cel7A jaoks leitud protsessiivsuse väärtus oli vea piires sõltumatu kasutatud ensüüm-substraat suhtest AA-EG-BC-l (Lisa 1, joonis 7).

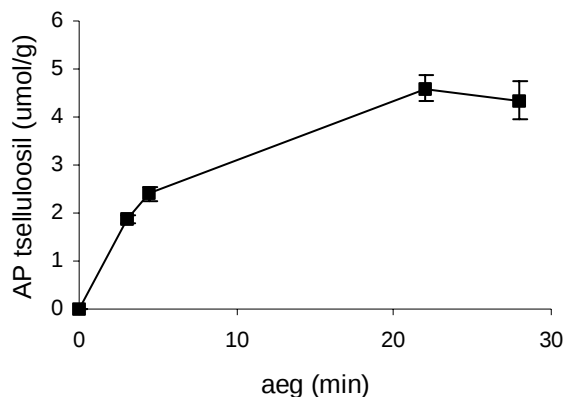
3.2.1. AP-derivatiseeritud BC ja AP-tsellobioos konjugaadi süntees

Tselluloosi derivatiseerimine AP-ga põhineb analoogiliselt AA-le reaktsioonil fluorestsentsmärke eksoaminorühma ja tselluloosi redutseeriva otsa aldehüüdrühma vahel. Reaktsiooni käigus tekkinud imiinne vaheühend redutseeritakse stabiilsemaks sekundaarseks amiiniks NaCNBH₃ poolt, mis reaktsioonikeskkonnas valitseva pH väärtuse 6 – 7 juures on redutseerijana imiinide suhtes aldehüüdidega võrreldes selektiivsem [74].

AP-märgistamise korral töödeldi BC-d vesikeskkonnas 70 °C juures AP ja NaCNBH₃-ga lõppkontsentratsioonides vastavalt 3.5 ja 0.3 M. Analoogiliselt AA-le eraldati AP-märgistamise korral ülehulgas märgistamisreagendid tselluloosist filtreerimise või korduvate tsentrifuugimise ja resuspendeerimise etappide kaudu.

AP-märgistamise ajasõltuvuse katse tulemuste kohaselt kulges BC derivatiseerimisreaktsioon AP-ga AA-ga võrreldes märgatavalt aeglasemalt (joonis 1; Lisa 1, joonis 1). BC-l inkorporeerunud AP-märke kogus saavutas maksimaalse väärtuse 22 h järel, hakates pikemate reaktsiooniaegade korral vähenema (joonis 3). AP-märgistamise põhjal määratud redutseerivate rühmade arv BC-l $4.3 \pm 0.4 \mu\text{mol g}^{-1}$ oli heas kooskõlas sama BC preparatsiooni jaoks AA abil leitud redutseerivate rühmade arvuga $4.5 \pm 0.3 \mu\text{mol g}^{-1}$. AP-märke stabiilsuse esialgse mõõtmise tulemuste kohaselt vähenes märke kogus BC-l AP-BC valmistamisele järgneva 12 päeva jooksul ligikaudu 13 %, mis lubab AP-märke poolestusaega BC-l hinnata 80 päevale.

Ensüümhüdrolüüsi käigus vabaneva AP-märgistatud tsellobioosi kvantifitseerimiseks sünteesiti lisaks vastav AP-CB konjugaat. AP-CB eraldamine ja fluorestsentsparameetrite määramine toimus sarnaselt AA-CB-le. AP-CB fluorestsentsi maksimum pH 5.0 juures esines lainepikkuste kombinatsioonil 310/390 nm. Erinevalt AA-CB-st oli AP-CB korral täheldatav tema fluorestsentsi sõltuvus pH-st, kusjuures pH vahemikus 5 – 12 kahanes AP-CB fluorestsents 2 korda (andmed pole näidatud).



Joonis 3. BC AP-ga derivatiseerimise ajasõltuvus. BC-d (10 g/L) inkubeeriti AP-ga (3.5 M) vesikeskkonnas NaCNBH_3 (0.3 M) juuresolekul 70°C juures. BC-le inkorporeerunud AP-märke kogus väljendati $\mu\text{mol g}^{-1}$ (tselluloos). Iga ajapunkt on esitatud kolme korduskatse keskmisena.

3.2.2. *T.reesei* tsellobiohüdrolaas Cel7A protsessiivsus erineva DP-ga tselluloosidel

Kuna käesolevas töös kasutatud tsellulooside polümerisatsiooniate varieerub laias vahemikus, on võimalik, et Cel7A protsessiivsus on mõnede substraatide korral polümerisatsioonistme poolt limiteeritud ning võib polümerisatsioonistme tõustes kasvada kuni ensüümi tõelise protsessiivsuse väärtuse saavutamiseni. Mainitud oletuse kontrollimiseks inkubeeriti erineva DP-ga AA-märgistatud tselluloose Cel7A ja Cel7A katalüütilise domääniga küllastavale lähedasel substraadi kontsentratsioonil ajavahemikus 4 – 10 min ning määrati igas ajapunktis vabanenud tsellobioosi ja AA-CB otsmärke kontsentratsioon. Nimetatud ajavahemikus ei ületanud kõrvalekalle lineaarsusest mõlema reaktsiooniprodukti tekkel 5 % (joonis 4). Ensüümi protsessiivsus arvutati tsellobioosi ja AA-CB tekkekiiruste suhtena $V_{\text{CB}}/V_{\text{AA-CB}}$. Nii intaktse Cel7A kui Cel7A katalüütilise domääni korral oli täheldatav protsessiivsuse “küllastuv” sõltuvus substraadi polümerisatsioonistmest (tabel 1). Kõigil töös kasutatud tselluloosidel langesid Cel7A ja tema katalüütilise domääni protsessiivsused vea piires kokku (tabel 1).

Nii intaktse Cel7A kui Cel7A katalüütilise domääni fluorestsentsmärget vabastav aktiivsus oli heas korrelatsioonis kasutatud substraadi polümerisatsioonistmega, kahanedes intaktse ensüümi korral väärtuselt $0.24 \pm 0.036 \text{ min}^{-1}$ AA-Avicelil 6 korda madalamale väärtusele AA-BC-l DP-ga 3300 (tabel 2). Tsellobioosi puhul korrelatsioon Cel7A aktiivsuse ja substraadi polümerisatsioonistme vahel puudus, nii intaktse ensüümi kui katalüütilise domääni aktiivsused olid kõrgeimad AA-BC ja AA-EG-BC hüdrolüüsil (tabel 2).

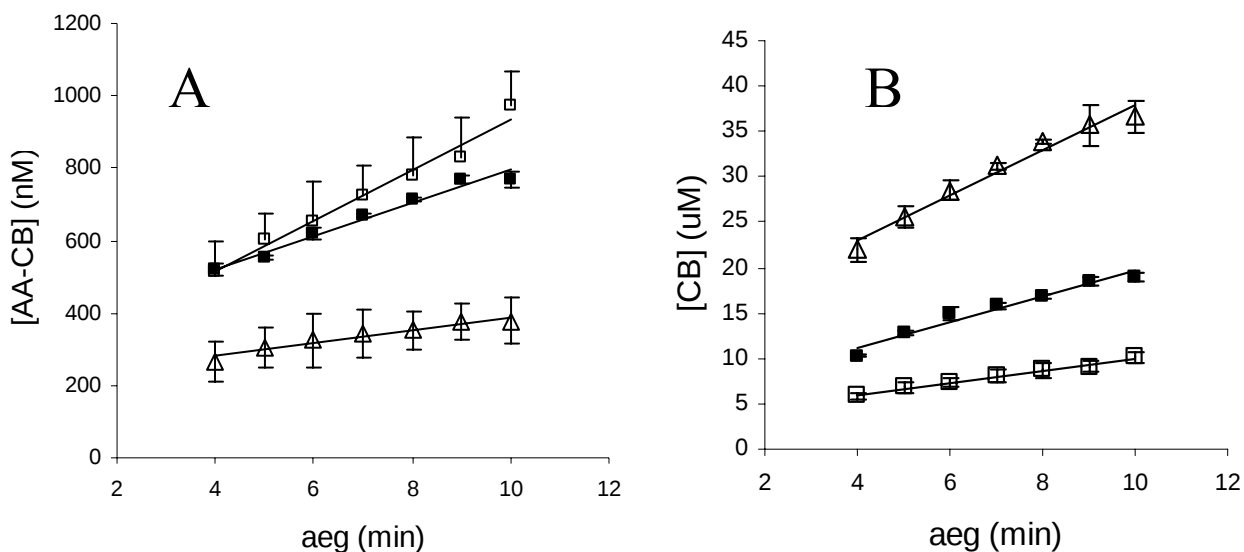
AP-BC-I (DP = 1430) intaktse Cel7A jaoks määratud protsessiivsuse väärtus 69 tsellobioosi ühikut oli samas suurusjärgus lähedase DP-ga (DP = 1840) AA-BC-I Cel7A jaoks määratud protsessiivsusega 89 tsellobioosi ühikut (tabel 1).

Tabel 1. Protsessiivsuse sõltuvus DP-st. Cel7A ja Cel7A katalüütilise domääni protsessiivsus AA- ja AP-märgistatud tselluloosidel on arvatud tsellobioosi ja AA-CB (*resp.* AP-CB) otsmärke tekkekiiruste suhtena 10 min ajavahemikus ning väljendatud tsellobioosi ühikutes. p.m. – pole määratud.

Substraat	DP (glükoosi ühikut)	Protsessiivsus (tsellobioosi ühikut)	
		Cel7A	Cel7A core
AA-Avicel	90 ± 3	10.4 ± 2.5	10.2 ± 1
AA-BMCC	150 ± 2	18 ± 5.2	p.m.
AA-EG-BC	350 ± 12	30 ± 2.9	28 ± 1.6
AA-EG-BC	630 ± p.m.	34 ± 4.0	p.m.
Amorfne AA-BC	805 ± 12	58 ± 5.6	58 ± 13.5
AP-BC	1430 ± 120	69	p.m.
AA-BC	1840 ± 30	89 ± 18	66 ± 7.8
AA-BC	3300 ± 1000	86 ± 2	84 ± 7.3

Tabel 2. Cel7A ja Cel7A katalüütilise domääni aktiivsus AA- ja AP-märgistatud tselluloosidel. Vastavad AA-CB (*resp.* AP-CB) otsmärke ja tsellobioosi väljatoovad aktiivsused on arvatud küllastavale lähedase substraadi kontsentratsiooni (1.0 – 2.0 g/L) juures kummagi produkti jaoks ajavahemikus 4 – 10 min määratud kiiruste põhjal. p.m. – pole määratud

Substraat	DP (glükoosi ühikut)	Cel7A		Cel7A core	
		V_{AA}/E_0 (min^{-1})	V_{CB}/E_0 (min^{-1})	V_{AA}/E_0 (min^{-1})	V_{CB}/E_0 (min^{-1})
AA-Avicel	90 ± 3	0,24 ± 0,036	2,5 ± 0,40	0,14 ± 0,008	1,4 ± 0,10
AA-BMCC	150 ± 2	0,18 ± 0,028	3,2 ± 0,50	p.m.	p.m.
AA-EG-BC	350 ± 12	0,19 ± 0,012	5,6 ± 0,40	0,12 ± 0,007	3,5 ± 0,40
AA-EG-BC/ksüloglükanaan	350 ± 12	0,078 ± 0,007	2,1 ± 0,60	0,04 ± 0,002	1,1 ± 0,08
AA-EG-BC	630 ± p.m.	0,14 ± 0,005	5,0 ± 0,74	p.m.	p.m.
amorfne AA-BC	805 ± 12	0,05 ± 0,001	3,9 ± 0,09	0,07 ± 0,01	3,9 ± 0,01
AP-BC	1430 ± 120	0,056 ± 0,004	3,9 ±	p.m.	p.m.
AA-BC	1840 ± 30	0,073 ± 0,013	6,4 ± 1,10	0,071 ± 0,008	4,6 ± 0,30
AA-BC	3300 ± 1000	0,042 ± 0,005	3,7 ± 0,40	0,036 ± 0,008	3,0 ± 0,40



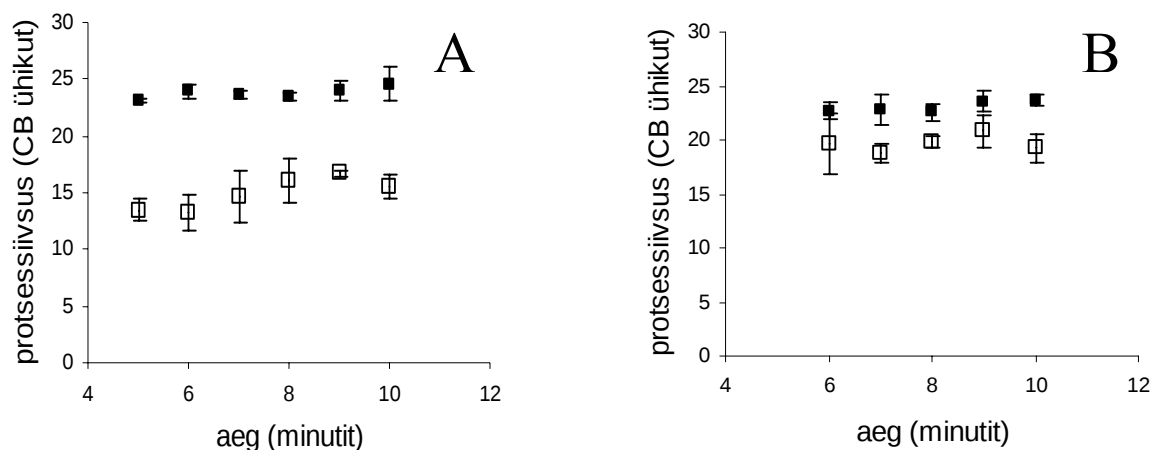
Joonis 4. AA-tsellulooside hüdrolüüs Cel7A poolt. AA-Aviceli (■ ; 2.0 g/L) ja AA-EG-BC-d (□; 1.0 g/L) inkubeeriti 0.25 μ M Cel7A, AA-BC-d (Δ; 1.0 g/L) 1.0 μ M Cel7A-ga 0.05 M NaAc-puhvril, pH 5.0, 25 °C juures. A) AA-CB otsmärke vabanemine. B) tsellobioosi vabanemine. Iga ajapunkt on esitatud kolme korduskatse keskmisena. CB – tsellobioos.

3.2.3 Cel7A protsessiivsus AA-EG-BC-ksüloglükaankompleksil

Tselluloosiga komplekseerunud ksüloglükaani võimaliku mõju hindamiseks Cel7A protsessiivsele toimemehhanismile ja üldaktiivsusele teostati ensüümikineetika kunstlikult valmistatud AA-EG-BC ksüloglükaankompleksil. Võrdluseks viidi sama kineetika läbi ksüloglükaani mittesisaldaval AA-EG-BC-l. Mõlemaid substraate inkubeeriti küllastavale lähedase kontsentratsiooni (2.0 g/L) juures 0.25 μ M Cel7A ja 0.25 μ M Cel7A katalüütilise domääniga ajavahemikus 5 – 10 min ning määrati reaktsioonisegust eemaldatud proovides tsellobioosi ja AA-CB kontsentratsioon. Protsessiivsus väljendati antud ajahetkeks vabanenud tsellobioosi ja otsmärke kontsentratsioonide suhtena. Saadud tulemused näitasid ksüloglükaani negatiivset mõju Cel7A protsessiivsusele ensüümi mõlema vormi puhul (joonis 5). Eriti märgatav oli ksüloglükaani mõju intaktse Cel7A korral, mille jaoks AA-EG-BC ksüloglükaankompleksil määratud protsessiivsuse väärtused jäid kõigis ajapunktides ligikaudu 40 % võrra madalamaks vastavatest väärtustest ksüloglükaani mittesisaldaval substraadil (joonis 5). Ksüloglükaani toime jäi nõrgemaks Cel7A katalüütilise domääni korral, kus AA-EG-BC ksüloglükaankompleksil mõõdetud protsessiivsus vähenes komplekseerumata AA-EG-BC-ga võrreldes keskmiselt 15 % (joonis 5). Lisaks protsessiivsusele mõjutas ksüloglükaan negatiivselt ka Cel7A üldaktiivust

tselluloosil, mida kinnitab intaktse Cel7A ja tema katalüütilise domääni üldaktiivsuste 60 – 70 %-line langus vastaval ksüloglükokaankompleksil (tabel 2).

Kontrollkatses, kus ksüloglükokaani inkubeeriti eelnevaga samades tingimustes 0.25 μ M Cel7A-ga, ensüümi võimalikust ksülanolüütilisest aktiivsusest tingitud redutseerivate rühmade juurdetekkimist ei täheldatud (andmed pole näidatud).

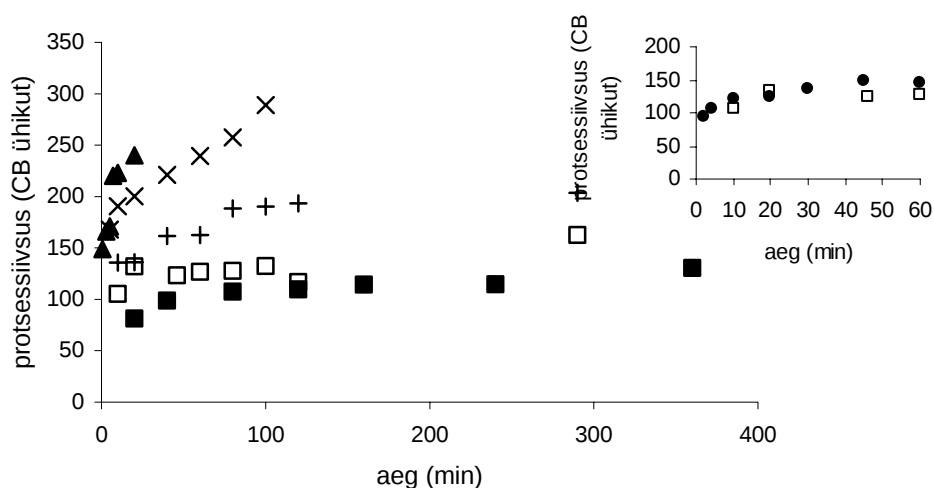


Joonis 5. Ksüloglükokaani mõju Cel7A protsessiivsusele. AA-EG-BC-d (■; 1.0 g/L) ja AA-EG-BC ksüloglükokaankompleksi (□; 1.0 g/L) inkubeeriti 0.25 μ M Cel7A (A) ja 0.25 μ M Cel7A katalüütilise domääniga (B) 0.05 M NaAc-puhvris, pH 5.0, 25 °C juures. Protsessiivsus väljendati igas ajapunktis vabanenud tsellobioosi ja AA-CB kontsentratsiooni suhtena. Iga ajapunkt on esitatud kolme korduskatse keskmisena.

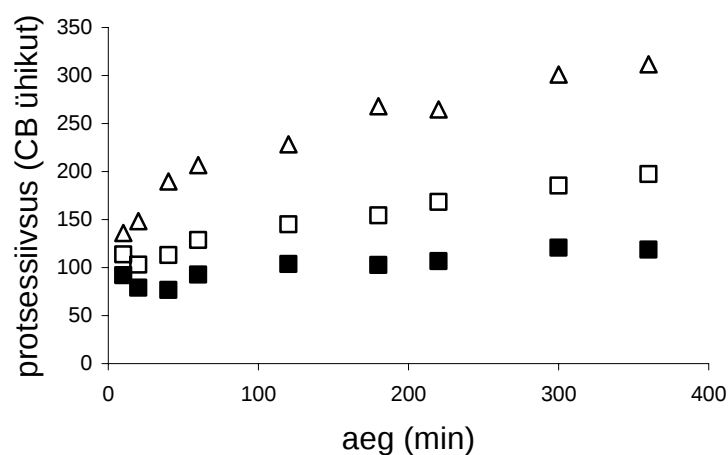
3.2.4. Cel7A protsessiivsuse kontsentratsioonisõltuvus AA-BC-I

Määramaks tsellobiohüdrolaas Cel7A protsessiivsuse sõltuvust ensüüm-substraat vahekorrast, inkubeeriti küllastavale lähedases kontsentratsioonis (2.0 g/L) AA-BC-d Cel7A (0.1 – 15 μ M) ja Cel7A katalüütilise domääniga (0.1 – 1.0 μ M) kuni 6 h. Protsessiivsus väljendati vastavaks ajahetkeks vabanenud tsellobioosi ja AA-märke kontsentratsioonide suhtena. Saadud tulemused näitasid nii Cel7A kui Cel7A katalüütilise domääni korral protsessiivsuse märgatavat kasvu ensüümi kontsentratsiooni kasvades, kusjuures erinevatel ensüümi kontsentratsioonidel määratud protsessiivsused platoostusid erinevate väärtuste juures (joonis 6, 7). Protsessiivsuse oodatav käitumine on esitatud joonisel 8. Erinevalt AA-EG-BC-I saadud tulemustest toimus AA-BC korral protsessiivsuse märgatav kasv reaktsiooni esimese 30 – 40 min jooksul (joonis 6, 7). Protsessiivsuse platoostumine oli lisaks sõltuv E/S suhtest ning oli kiirem madalamatel E/S väärtustel (joonis 6, 7). Protsessiivsuse väärtused ja ajasõltuvus AA-BC-I olid saransed

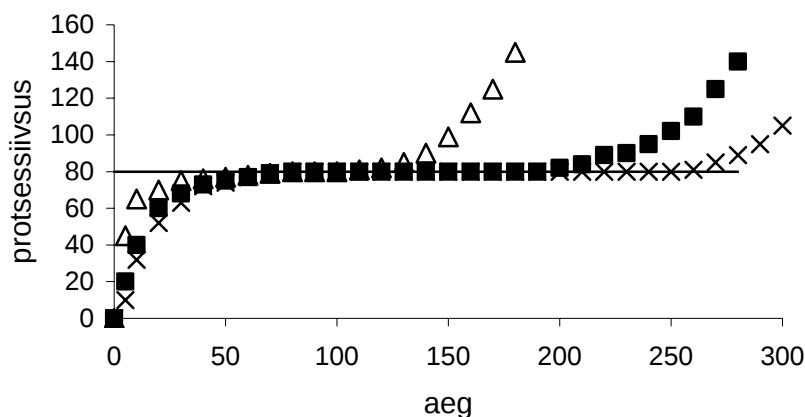
diaminopüridiiniga (DAP) märgistatud BC-l saadud tulemustele (joonis 6).



Joonis 6. Protsessiivsuse kontsentratsioonisõltuvus Cel7A korral. AA-BC-d (2.0 g/L) inkubeeriti 0.1 μM (■), 0.25 μM (□), 1.0 μM (+), 5.0 μM (×) ja 15 μM (▲) Cel7A-ga 0.05 M NaAc-puhvril, pH 5.0, 25 °C juures. Protsessiivsus on väljendatud vabanenud tsellobioosi ja AA-CB kontsentratsiooni suhtena. Sisemisel joonisel Cel7A (0.25 μM) protsessiivsus AA-BC-l (□; 2.0 g/L) ja diaminopüridiiniga (DAP) märgistatud BC-l (●; 1.0 g/L) 0.05 M NaAc-puhvril, pH 5.0, 25 °C juures (DAP-BC; Priit Väljamäe, avaldamata tulemused).



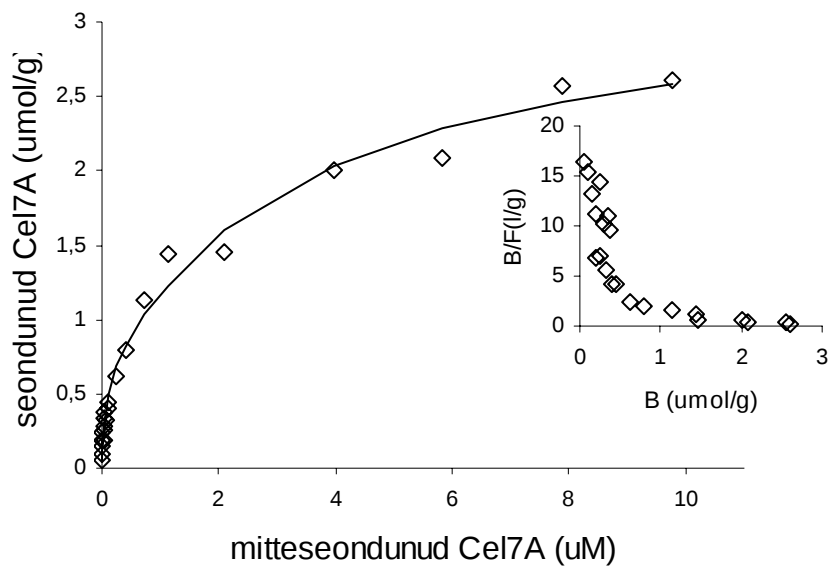
Joonis 7. Protsessiivsuse kontsentratsioonisõltuvus Cel7A katalüütilise domääni korral. AA-BC-d (2.0 g/L) inkubeeriti 0.1 μM (■), 0.25 μM (□) ja 1.0 μM (Δ) Cel7A katalüütilise domääniga 0.05 M NaAc-puhvril, pH 5.0, 25 °C juures. Protsessiivsus on väljendatud vabanenud tsellobioosi ja AA-CB kontsentratsiooni suhtena.



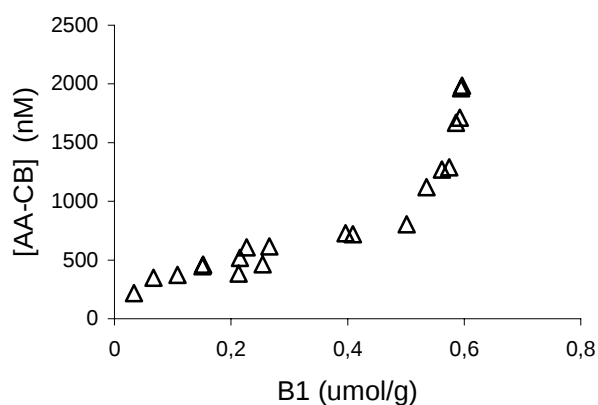
Joonis 8. Protsessiivsuse oodatav kontsentratsioonisõltuvus. Protsessiivsus on määratud kolmel erineval ensüümi kontsentratsioonil ($\times < \blacksquare < \Delta$). Protsessiivsuse kasv lühemas ajavahemikus on tingitud ensüümi esimese protsessiivse tsükli mittelõpetatusest, pikemas ajavahemikus substraadi äratarbimisest. Pidev joon vastab ensüümi tegelikule protsessiivsusele. Aeg ja protsessiivsus on esitatud suvalistes ühikutes.

3.2.5. Cel7A adsorptsiooniisoterm AA-BC-I

T.reesei Cel7A seondumine AA-BC-le toimus 0.05 M NaAc-puhvris, pH 5.0, 25 °C juures 40 min jooksul. AA-BC kontsentratsioon (2.0 g/L) hoiti kõigis katse-punktides konstantne, Cel7A kontsentratsioon varieerus vahemikus 0.1 – 15 μM . Tselluloosile seondunud Cel7A kogus ($\mu\text{mol g}^{-1}$) arvutati algselt lisatud ja supernatandist kvantifitseeritud ensüümi kontsentratsioonide vahena. Kõigist seondumisproovidest mõõdeti lisaks ensümaatilisel vabanenud otsmärke AA-CB kogus. Varasemate tulemuste kohaselt Cel7A hüdrolyütiline aktiivsus vaadeldud ajavahemikus ensüümi seondumist BC-le ei mõjuta (andmed pole esitatud). Kuna seondumisandmete esialgne analüüs teljestikus *seondunud/mitteseondunud* vs. *seondunud* (nn. Scatchardi teljestik) näitas tulemuste märgatavat kõrvalekallet lineaarsusest, analüüsiti Cel7A seondumist lähtudes kahe erineva afiinsusega seondumiskoha mudelist kahe Langmuiri isotermi summa abil vastavalt valemile 1. (joonis 9) [75]. Analüüsi tulemusena Cel7A jaoks leitud dissotsiatsioonikonstantide väärtused AA-BC-I olid 0.05 μM ja 3.5 μM vastavalt kõrgema ja madalama afiinsusega seondumiskoha suhtes, piirilise adsorptsiooni väärtused nimetatud seondumiskohtades olid vastavalt 0.6 $\mu\text{mol g}^{-1}$ ja 2.7 $\mu\text{mol g}^{-1}$. Tulemused, kus analüüsiti otsmärke AA-CB vabanemise sõltuvust Cel7A kontsentratsioonist kõrgema afiinsusega seondumiskohas, korrelatsiooni seondunud ensüümi hulga ja AA-CB tekkekiiruse vahel ei näidanud (joonis 10).



Joonis 9. Cel7A adsorptsiooniisoterm AA-BC-I. AA-BC-d (2.0 g/L) inkubeeriti 0.05 M NaAc-puhvril, pH 5.0, 25 °C juures 40 min Cel7A-ga (0.1 – 15 μM). Tselluloos eemaldati proovidest tsentrifuugimisega ja mitteseondunud ensüüm kvantifitseeriti spektrofotomeetriliselt või fluoromeetriliselt. Seondunud Cel7A hulk arvutati algselt lisatud ja mitteseondunud ensüümi kontsentratsiooni vahena ning väljendati $\mu\text{mol g}^{-1}$ (tselluloos). Sisemine joonis kujutab seondumisanndmete analüüsi teljestikus B/F vs. B, kus B on seondunud ($\mu\text{mol g}^{-1}$) ja F vaba ensüüm (μM).



Joonis 10. AA-CB vabanemise sõltuvus Cel7A kontsentratsioonist kõrgema afiinsusega seostumiskohas. Cel7A kontsentratsioon kõrgema afiinsusega seostumiskohas (B_1 , $\mu\text{mol g}^{-1}$) arvutati adsorptsiooniisotermist (joonis 9) määratud parameetrite põhjal. Seondumiskatses vabanenud AA-CB määrati paralleelselt mitteseondunud valguga.

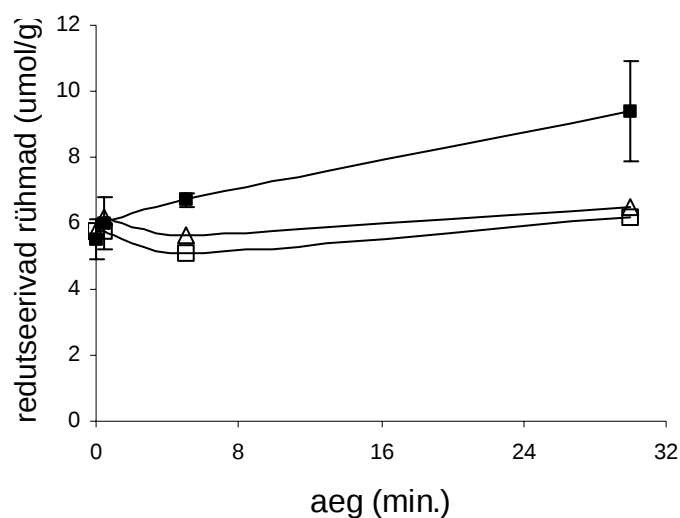
3.2.6. Cel7A endoaktiivsus BC-I ja CMC-I

T.reesei tsellobiohüdrolaas Cel7A preparatsiooni endoaktiivsuse määramiseks inkubeeriti BC-d 30 min jooksul metsiktüüpi Cel7A ja Cel7A mutantidega E212Q ja D214N. Järgnevalt määrati ensüümist puhtaks pestud BC-I juurde tekkinud redutseerivate otste hulk AA-märgistamist teel. Kontrollina kasutati ensüümiga mittetöödeldud BC-d, kus AA-märgistamine andis redutseerivate rühmade arvaks $5.5 \pm 0.6 \mu\text{mol g}^{-1}$. Võrreldes kontrolliga kahekordistus redutseerivate otste arv BC-I 30 min eeltötluse järel metsiktüüpi Cel7A-ga (joonis 11). Cel7A poolt samas ajavahemikus vabastatud tsellobioosi kogus oli 0.5 mM, mis ületas BC-le lisandunud redutseerivate rühmade arvu 60 kordselt. Kumbki Cel7A mutantidest metsiktüüpi ensüümiga võrreldavas koguses redutseerivaid otsi BC-I ei tekitanud (joonis 11).

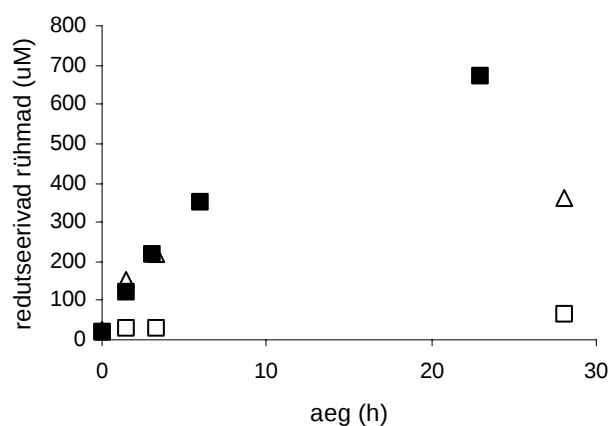
Varasemate tulemuste kohaselt, kus BC-d inkubeeriti ülaltooduga samades tingimustes, kuid tunduvalt madalamas kontsentratsioonis (0.25 μM) Cel7A-ga, jäi kasutatud ensüümipreparatsioonis sisalduv võimalik endoaktiivsus allapoole AA-märgistamismeetodi tundlikkust ning seda tulemust tõlgendati Cel7A endoaktiivsuse puudumisena (Lisa 1).

Võimaliku endoaktiivsuse esinemist metsiktüüpi Cel7A ja Cel7A mutantide preparatsioonides kontrolliti lisaks karboksümetüülselluloosil (CMC) kui tavapärasel endotsellulaaside substraadil [56]. Ööpäevase inkubeerimise järel 1.0 μM metsiktüüpi Cel7A-ga kasvas redutseerivate rühmade arv CMC lahuses algsega võrreldes 30 korda (joonis 12). Mutantide E212Q ja D214N preparatsiooni CMCaane aktiivsus samades tingimustes moodustas vastavalt 10 % ja 45 % metsiktüübi aktiivsusest (tabel 3).

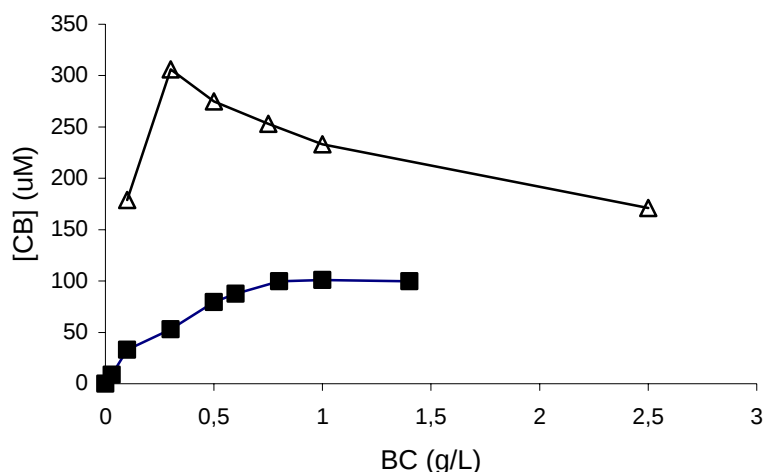
Lisakontroll endosaastuse määramiseks metsiktüüpi Cel7A preparatsioonis teostati BC-I nn. “substraat-inhibitsiooni” tingimustes. Nimetatud tingimustes põhjustab endokomponendi aktiivsusest tulenev ahelaotste pindkontsentratsiooni tõus madalamatel substraadi kontsentratsioonidel tsellobiohüdrolaasi aktiivsuse märgatava sünergistliku kasvu. Kõrgematel substraadi kontsentratsioonidel (madalam E/S suhe) ahelaotste pindkontsentratsioon ja sellest tulenevalt tsellobiohüdrolaasi aktiivsus langevad [46]. Laias tselluloosi kontsentratsiooni vahemikus esineb seetõttu substraat-inhibitsioon, mis on täheldatav juba 0.5 % endokomponendi korral segus [46]. BC kontsentratsiooni vahemikus 0.03 – 1.4 g/L 1.0 μM Cel7A-ga teostatud katses jäi ensüümi aktiivsus 70 % võrra madalamaks 0.5 % endoglükanaasi Cel5A sisaldava Cel7A preparatsiooni aktiivsusest sarnastes tingimustes (joonis 13).



Joonis 11. Cel7A endoaktiivsus BC-I. BC-d (2.0 g/L) inkubeeriti 0.05 M NaAc-puhvrts, pH 5.0, 25 °C juures metsiktüüpi Cel7A (■; 10 μM) ning Cel7A mutantidega E212Q (□; 10 μM) ja D214N (Δ; 10μM). Redutseerivate rühmade arv tselluloosil määrati AA-märgistamise teel ja väljendati μmol g⁻¹ (tselluloos). Metsiktüüpi Cel7A korral olid kõik punktid kolmes korduses, mutantide korral ühes korduses.



Joonis 12. Cel7A CMCaasne aktiivsus. 0.9 % (w/v) CMC lahust 0.05 M NaAc-puhvrts, pH 5.0, inkubeeriti 25 °C juures metsiktüüpi Cel7A (■; 1.0 μM) ning Cel7A mutantidega E212Q (□; 1.0 μM) ja D214N (Δ; 1.0μM). Redutseerivate rühmade arv proovides määrati MBTH-meetodil.



Joonis 13. BC hüdrolüüs Cel7A poolt. BC-d inkubeeriti 0.05 M NaAc-puhvrts, pH 5.0, 25 °C juures 1.0 μM Cel7A (■; 30 min) ja 1.0 μM Cel7A preparatsiooniga, mis sisaldas 0.005 μM *T.reesei* endoglükanaasi Cel5A (Δ; 60 min). Tulemused (Δ) on pärit tööst [46].

Tabel 3. Cel7A endoaktiivsus BC-I ja CMC-I

Ensüüm	aktiivsus BC-I ^(†)	aktiivsus CMC-I ^(‡)
Cel7A (metsiktüüp)	3.9 ± 2.1	650 ± 10
Cel7A (E212Q)	0.4	66
Cel7A (D214N)	0.7	360

†- aktiivsus defineeritud BC-le 30 min ensüümtöötuse järel lisandunud ja BC-I algselt sisaldunud redutseerivate rühmade arvu (μmol g⁻¹) vahena. Mutantide E212Q ja D214N korral olid ajapunktid ühes korduses ja standarhälvet pole arvutatud.

‡- aktiivsus defineeritud 0.9 % (w/v) CMC lahusesse ööpäevase (23 – 28 h) ensüümtöötuse järel lisandunud ja lahuses algselt sisaldunud redutseerivate rühmade arvu (μmol l⁻¹) vahena. Mutantide E212Q ja D214N korral olid ajapunktid ühes korduses ja standarhälvet pole arvutatud.

4. Arutelu

Käesoleva töö eesmärgiks oli välja töötada kineetiline meetod redutseeriva otsa spetsiifiliste tsellobiohüdrolaaside protsessiivsuse määramiseks, kusjuures mudelsubstraatidena kasutati fluorestsentsmärgistatud tselluloose ning ensüümina struktuuri ja kineetika tasemel hästi iseloomustatud tsellobiohüdrolaasi Cel7A pehmemädanikseenest *Trichoderma reesei*. Teadaolevalt redutseeriva otsa spetsiifilise eksoensüümina on tsellobiohüdrolaas Cel7A sobiv nimetatud meetodi valideerimiseks [41, 62]

Protsessiivsus on oluline tsellobiohüdrolaaside kineetiline parameeter, mis on eelkõige vajalik tselluloosi kristalliliste osade efektiivseks hüdroolüüsiks sünergistlikus koostoimes endoglükanaasidega [7]. *T.reesei* tsellobiohüdrolaasi Cel7A ja mitmete teiste tsellobiohüdrolaaside jaoks määratud kristallstruktuurid, mis näitavad pika (kuni 50 Å) ja suletud aktiivtsentri esinemist neis ensüümides, võimaldavad tsellobiohüdrolaaside, *k.a.* Cel7A protsessiivsust struktuuri tasemel hästi põhjendada [21, 42, 76]. Samas ei ole üksnes struktuuriandmete põhjal võimalik hinnata või omavahel võrrelda erinevate tsellobiohüdrolaaside protsessiivsust ega hinnata substraadi omaduste nagu polümerisatsiooniate või kristallilisus mõju protsessiivsusele. Selline info on aga oluline näiteks kõrgema tsellulolüütilise aktiivsusega ensüümide insenergeneetilisel disainimisel biotehnoloogias.

Redutseerivast otsast fluorestsentsmärgistatud tselluloosse substraadi kasutamine võimaldab redutseeriva otsa spetsiifilise ning rangelt eksoaktiivsust omava tsellobiohüdrolaasi korral jälgida mitmeastmelise ensüümreaktsiooni esimest etappi – fluorestsentsmärget kandva terminaalse tsellobioosi jäägi vabastamist tselluloosi ahelast. Protsessiivselt töötava ensüümi korral järgneb fluorestsentsmärke vabastamisele polümeeri edasine degradatsioon tsellobioosiks, mille teke on jälgitav eraldi fluorestsentsmärkest (Lisa 1, skeem 3).

Käesolevas töös Cel7A korral täheldatud nn. “aktiivtsentrite tiitrimise” kineetika, mis esines ainult polümeersetil substraatidel, on protsessiivse toimemehhanismiga kooskõlas (Lisa 1, joonis 4). Kuna Cel7A protsessiivne liikumine tselluloosi ahelal aeglustab ensüümi vabanemist substraadilt ning ühes sellega uue otsmärke vabastamist ensüümi poolt, järgib otsmärke teke ajas “aktiivtsentrite tiitrimise” kineetikat (Lisa 1, skeem 3). Et protsessiivsus avaldub ainult polümeersetil substraatidel, seletab see

“aktiivtsentrite tiitrimise” kineetika puudumist madalmolekulaarsete, head lahkuvat rühma sisaldavate mudelsubstraatide hüdroolüüsil Cel7A poolt (Lisa 1, joonis 4) [77].

Ensüümi protsessiivsuse on otsmärgistatud tselluloosse substraadi kasutamise korral väljendatav kas reaktsiooniproduktiks olevate otsmärke AA-CB (*resp.* AP-CB) ja tsellobioosi (CB) tekkekiiruste suhtena reaktsiooni lineaarses faasis

$$V_{CB}/V_{AA-CB} \quad (2)$$

või antud ajahetkeks vabanenud produktide kontsentratsioonide suhtena

$$C_{CB}/C_{AA-CB} \quad (3)$$

(Lisa 2).

Et valemis 3 läheb C_{AA-CB} avaldisse ka otsmärke vabanemisel esinev nn. “hüpe” (ingl. “burst”), jääb valemi 3 põhjal arvutatud protsessiivsuse väärtus reeglina madalamaks valemiga 2 leitud väärtusest (tabel 1, joonis 5).

Kuna tselluloosi ensüümhüdroolüüsil on reaktsiooniproduktide vabanemine pikemas ajavahemikus reeglina mittelineaarne [78] ning mittelineaarsus raskendab protsessiivsuse määramist valemi 2 järgi, mõõdeti kummagi produkti teket ensüümreaktsiooni esimese 10 minuti jooksul, mil kõrvalekalle lineaarsusest ei ületa kummagi reaktsiooniprodukti korral 5 % (joonis 4). Protsessiivsuse määramisel on samas oluline, et keskmiselt oleks ensüüm vaadeldud ajavahemikus sooritanud vähemalt ühe protsessiivse tsükli. Et varem välja pakutud skeemi kohaselt piirab fluorestsentsmärke vabanemist substraadilt Cel7A protsessiivne liikumine mööda tselluloosi ahelat, on ühe protsessiivse tsükli sooritamiseks kuluv aeg pöördvõrdeline otsmärke vabanemise katalüütilise konstandi väärtusega (Lisa 1). Cel7A jaoks erinevatel fluorestsentsmärgistatud tselluloosidel määratud vastava katalüütilise konstandi väärtused (defineeritud kui V_{AA-CB}/E_0) kinnitavad, et madalama DP-ga substraatidel on 10 minutit protsessiivse tsükli sooritamiseks piisav ajavahemik (tabel 2). Kuna AA-BC-I jäi tsükli sooritamiseks kuluv ajavahemik 10 minutist pikemaks, on protsessiivsuse väärtused nimetatud substraadil ilmselt alla hinnatud (tabel 2). Madalama DP-ga substraatidel oli erinevates ajapunktides vabanenud tsellobioosi ja otsmärke kontsentratsiooni suhe C_{CB}/C_{AA-CB} vea piires sama, mis täiendavalt kinnitab oletust, et madalama DP-ga tsellulooside korral on 10 minutine ajavahemik ühe protsessiivse tsükli sooritamiseks piisav (joonis 5).

Leitud protsessiivsuse väärtused kinnitavad oletusi Cel7A protsessiivse toimemehhanismi kohta [9], kuid on samas märgatavalt suuremad seni avaldatud väärtustest (tabel 1) [44, 52]. Erinevuse üheks põhjuseks võib olla asjaolu, et lahustuvate sahhariidide suhtel põhinev protsessiivsuse määramine eeldab paaris- ja paaritu

monomeeride arvuga ahelate 1 : 1 jaotust, mis ei ole aga teada [52]. Lisaks mõjutab glükoosi ja tsellootrioosi vahetada tselluloosi ahela täpsest paigutusest ensüümi aktiivtsentris esimese löike hetkel, mida eelmainitud meetod ei arvesta [79].

Töös täheldatud Cel7A protsessiivsuse sõltuvus substraadi polümerisatsiooniastmest osutab asjaolule, et ensüümi protsessiivsus võib madalama polümerisatsiooniastmega substraatidel olla limiteeritud tselluloosi pindmistes kihtides asuvate ahelate keskmise pikkuse poolt. DP kasvades viimane protsessiivsust enam ei limiteeri ja protsessiivsuse väärtus platoostub ensüümi tõelise protsessiivsuse juures (tabel 1).

Kuigi töös ei jõutud süstemaatiliselt uurida otsmärke võimalikku mõju protsessiivsusele, oli Cel7A jaoks AP-BC-I (DP = 1430) määratud protsessiivsus 69 tsellobioosi ühikut samas suurusjärgus lähedase DP-ga AA-BC-I (DP = 1850) määratud väärtusega 89 ühikut (tabel 1). Erinevate otsmärgete sarnast mõju kinnitab ka diaminopüridiini (DAP) märgistatud BC-I ja AA-BC-I määratud Cel7A protsessiivsuste kokkulangevus (joonis 6).

Antud töö üheks olulisemaks tulemuseks on avastus, et nii seondumisdomääni (CBD) sisaldav Cel7A tervikensüüm kui temast proteolüütilise töötuse teel saadud eraldine katalüütiline domään omavad olenemata substraadist vea piires kokkulangevat protsessiivsust (tabel 1). Kuna CBD suudab katalüütilisest domäänist sõltumatult tselluloosiga seonduda, on põhimõtteliselt võimalikud kaks vastandlikku mehhanismi, millest mõlema korral CBD olemasolu või puudumine avaldaks mõju tervikensüümi protsessiivsusele [28, 80]. Esimesel juhul takistaks tugevalt tselluloosi pinnale adsorbeerunud ja seal aeglaselt difundeeruv CBD katalüütilise domääni protsessiivset liikumist. Individuaalse, CBD-d mittesisaldava katalüütilise domääni protsessiivsus peaks sellisel juhul blokeeriva CBD puudumise tõttu märgatavalt ületama tervikensüümi oma. Samas võib CBD tugev seondumine ja aeglane pinnadifusioon ka takistada tselluloosi ahelalt dissotsieerumist Cel7A aktiivtsentrist. Sellise mehhanismi kohaselt peaks katalüütilise domääni protsessiivsus intaktse ensüümiga võrreldes hoopis langema. Piisavalt kiire pinnadifusiooni korral seevastu CBD blokeeriv või n.ö. "kinnihoidev" toime katalüütilise domääni liikumisele puudub ja mõlemad ensüümi vormid omavad ühesugust protsessiivsust. Antud töös intaktse Cel7A ja katalüütilise domääni jaoks määratud protsessiivsuste kokkulangevus seega toetab varasemaid oletusi CBD kiire pinnadifusiooni ja pöörduva seondumise kohta tselluloosil [80, 81]. Näiteks *Cellulomonas fimi* eksoglükanaasi Cex seondumisdomääni jaoks *Valonia* tselluloosil määratud

pinnadifusiooni erikiirus $3 \cdot 10^{-11} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ja sellele vastav ühe tsellobioosi jäägi pikkuse vahemaa 1.04 nm läbimiseks kuluv aeg 10^{-4} s on kolme suurusjärgu võrra madalam käesolevas töös AA-tselluloosidel mõõdetud ühe tsellobioosi vabastamiseks kuluvast ajast (tabel 2), mistõttu sellise liikuvusega CBD ei piiraks Cel7A protsessiivset toimemehhanismi [81]. Ilmselt on *T.reesei* Cel7A evolutsiooni käigus saavutatud tingimused, kus CBD seondumine substraadiga on ühelt poolt piisavalt tugev, et ensüüm püsiks hüdroolüüsi käigus tselluloosi pinnal, samas aga jääb CBD pinnadifusioon piisavalt kiireks, et mitte takistada tervikensüümi protsessiivset liikumist [80]. Selline olukord võib olla saavutatud läbi arvukate interaktsioonide CBD ja tselluloosi vahel, kusjuures ükski interaktsioon eraldivõetuna ei ole tugev [82].

Käesolevas töös kasutati valdavalt bakteriaalsel tselluloosil põhinevaid lisakomponentidest vabu substraate. Taimset päritolu tselluloos (nn. lignotselluloos) seevastu sisaldab ligniini ja hemitselluloosi kujul tsellulaaside jaoks mittehüdroolüüsitavaid polümeerseid komponente, mis võivad ensüümide toimet blokeerida [83]. Tselluloosi pinnal olevate takistuste pärssivat mõju tsellobiohüdrolaaside aktiivsusele on peetud üheks lignotselluloosi hüdroolüüsi piiravaks teguriks ning nende takistuste eemaldamist teiste ensüümide (endoglükanaaside) poolt võimalikuks endo-ekso sünergismi mehhanismiks [84]. Käesolevas töös püüti selliste polümeerse komponentide mõju Cel7A protsessiivsusele hinnata ksüloglükanaani näitel kunstlikult valmistatud tselluloos-ksüloglükanaan kompleksil [70]. Tulemused, kus intaktse Cel7A protsessiivsus AA-EG-BC-ksüloglükanaan kompleksil jäi 40 % võrra madalamaks protsessiivsusest mittekomplekseeritud substraadil, toetavad hüpoteesi tselluloosiga seondunud polümeerse komponentide steeriliselt takistavast mõjust Cel7A protsessiivsele toimemehhanismile (joonis 5) [84]. Ksüloglükanaani pärssiv mõju tselluloosi ensüümhüdroolüüsile ilmnes Cel7A ja tema katalüütilise domääni üldaktiivsuse 70 %-lises languses AA-EG-BC-ksüloglükanaan kompleksil (tabel 2).

Protsessiivsuse oodatav käitumine ajas peaks olema kolmefaasiline : i) protsessiivsuse kasv esimese tsükli läbimiseks kuluv ajavahemikus, ii) platoostumine ensüümi tõelise protsessiivsuse väärtuse juures peale esimeste tsüklite läbimist ning iii) kasv pikemate ajavahemike korral tulenevalt otsmärke äratarbimisest ensüümi poolt. (joonis 8). Esimese etapi kestuse määrab protsessiivse tsükli läbimiseks kuluva aeg, mis ei sõltu ensüümi ega substraadi kontsentratsioonist (Lisa 2). Vastupidiselt sellele oli AA-BC-I intaktse Cel7A ja katalüütilise domääni korral täheldatav protsessiivsuse märgatav sõltuvus ensüümi kontsentratsioonist, seejuures platoostusid erinevate ensüümi

kontsentratsioonide juures määratud protsessiivsused erinevatele väärtustele (joonis 6, 7). Näiteks Cel7A puhul oli erinevus protsessiivsuse väärtustes kuni kolmekordne juba esimese 20 minuti jooksul, mis hinnanguliselt kulub ühe protsessiivse tsükli sooritamiseks AA-BC-I (tabel 2, joonis 6). Üheks seletuseks protsessiivsuse kasvule on AA-otsmärke äratarbimine kõrgemal ensüümi kontsentratsioonil koos sellest tuleneva otsmärke tekkekiiruse langusega. See ei seleta siiski protsessiivsuse märgatavat sõltuvust ensüümi kontsentratsioonist esimese protsessiivse tsükli sooritamiseks kuluvas ajavahemikus (joonis 6, 7). Nimetatud ajavahemikus ei ole ensüüm tselluloosi ahelalt vabanenud ega saa seetõttu alustada uut tsükli määrgat mittesisaldavast otsast.

Saadud tulemused osutavad võimalusele, et lisaks redutseeriva otsa spetsiifilisele eksoaktiivsusele omab Cel7A teisi toimemehhanisme, mille puhul ei vabane otsmärke, küll aga tsellobioos. Sellisteks otsmäärgat mitte vabastavateks toimemehhanismideks võivad olla endoaktiivsus ja mitteredutseeriva otsa spetsiifiline eksoaktiivsus. Võimalikku sisemist endoaktiivsust on Cel7A puhul varem välja pakutud [34, 35]. Protsessiivsuse kontsentratsioonisõltuvus on seletatav juhul, kui substraat sisaldab ensüümi suhtes erineva afiinsusega seostumiskohti, kusjuures lisatoimemehhanismid avalduvad madala afiinsusega seostumiskohas, otsmäärgat aga vabastab ensüüm kõrge afiinsusega seostumiskohas. Cel7A suhtes erineva afiinsusega seostumiskohtade esinemist tselluloosil on näidatud mitmetes varasemates töödes [52, 75].

Ensüümi seondumine kahte erineva afiinsusega seostumiskohta sisaldaval substraadil on tsellulaaside puhul hästi kirjeldatav kahe Langmuiri isotermi summa abil vastavalt valemile 1 [75]. Analüüs valemil 1 järgi näitab, et ensüüm/substraat suhte kasvades küllastatakse esmalt kõrge afiinsusega seondumiskohad, ensüümi kontsentratsiooni kasvades tõuseb aga ka madala afiinsusega kohtadesse seondunud ensüümi osakaal. Väga madala ensüüm/substraat suhte korral on ensüümi osakaal kõrgema ja madalama afiinsusega seondumiskohtades määratud vastavate jaotuskoefitsientide $K_{p1} = A_1/K_{d1}$ ja $K_{p2} = A_2/K_{d2}$ suhtega K_{p1}/K_{p2} . Seetõttu esineb seondumine madalama afiinsusega kohta ja seal avalduv lisatoimemehhanism mingis ulatuses ka lõpmatult madalal ensüümi kontsentratsioonil.

Kuigi Cel7A adsorptsiooniisoterm näitas kahe erineva afiinsusega seondumiskoha esinemist AA-BC-I, puudus saadud tulemuste kohaselt korrelatsioon otsmäärgat vabanemise ja kõrgema afiinsusega seondumiskohas oleva ensüümi hulga vahel (joonis 9, 10). Et tsellulaaside puhul esinevad komplitseerivate teguritena mitteproduktiivne seondumine ja ensüümimolekulide omavaheline mõju kõrgema pinnatäituvuse korral, jätab

adsorptsiooniisotermist saadud negatiivne tulemus Cel7A lisatoimemehhanismide küsimuse lahtiseks [34, 85].

Kuna üheks lisatoimemehhanismiks võib Cel7A puhul olla endoaktiivsus, määrati BC-I peale eeltötlust Cel7A-ga juurde tekkinud redutseerivate rühmade arv. Redutseerivate otste arvu kasv ensüümtötluse järel kinnitaks endoaktiivsust Cel7A preparatsioonis. Kuigi Lisas 1 toodud tulemuste kohaselt Cel7A BC-I endoaktiivsust ei oma, võis endoaktiivsus nimetatud katses tulenevalt Cel7A madalast kontsentratsioonist (0.25 μM) jääda allapoole kasutatud AA-märgistamise meetodi tundlikkust (Lisa 1).

Redutseerivate otste arvu kahekordistumise BC-I 30 min eeltötluse järel 10 μM Cel7A-ga kinnitab endoaktiivsuse olemasolu Cel7A preparatsioonides (joonis 11). Vaadeldud endoaktiivsus võib põhimõtteliselt olla tingitud : i) tselluloosi kristalli alumistes kihtides asuvate ahelaotste paljastumisest pinnakihi osalise hüdrolyüsi tagajärjel Cel7A poolt, ii) Cel7A endotoimemehhanismist või iii) Cel7A preparatsiooni saastusest endoglükanaasiga. Kuigi pinnaerosiooni ja sellega kaasnevat alumiste tselluloosi kihtide paljastumist on varem välja pakutud, ei seleta see mehhanism redutseerivate otste arvu kahekordistumist BC-I, sest tselluloosi sisemuses paiknevate ahelaotste hulk moodustab ainult väikese osa algselt pinnal olevatest otstest [15]. Lisaks peaks redutseerivate otste arv tselluloosi pinnakihi täieliku hüdrolyüsi järel langema esialgse või isegi madalama väärtuseni, kuna ahelate DP kristalli alumistes kihtides on tõenäoliselt kõrgem DP-st kristalli pinnal [15]. BC 30 min ensüümtötluse järel vabanenud tsellobioosi kogus 0.5 mM vastab ligikaudu tselluloosi ahelate arvule pinnakihis (eeldades ahelate arvuks mikrofibrillis 12 x 18 ühikut) [86]. Et redutseerivate rühmade arv BC-I sama aja jooksul kasvas, räägib see täiendavalt vastu oletusele i.

BC eeltötluse katse tulemused üksinda ei võimalda eristada mehhanisme ii ja iii, s.t. otsustada, kas endoaktiivsus on seletatav kui Cel7A lisatoimemehhanism või on tegemist saastusega endoglükanaasi poolt, sest võimalikku endokontaminatsiooni on peetud arvestatavaks probleemiks ka mitmekordse puhastamisprotseduuri läbinud tsellobiohüdrolaaside puhul [87]. Endosaastuse hindamiseks viidi BC eeltötluse katse lisaks läbi *T.reesei* Cel7A mutantidega E212Q ja D214N, mis on puhastatud metsiktüüpi ensüümiga sarnase skeemi järgi [20, 54]. Mainitud mutantides on katalüütiliselt olulised aminohappejäägid Glu212 või Asp214 asendatud vastavate amiididega, mille tõttu mutandi aktiivsus kristallilise tselluloosi hüdrolyüsil kas sisuliselt puudub (E212Q) või on metsiktüüpi Cel7A-ga võrreldes madalam (D214N) [20]. Metsiktüüpi Cel7A preparatsiooniga võrreldav endoaktiivsus peaks osutama, et Cel7A puhastamisel kasutatud

metoodika ei võimalda endosaastusest täielikult vabaneda ja toetaks oletust iii. Saadud tulemuste kohaselt jäi E212Q ja D214N endoaktiivsus BC-l metsiktüüpi Cel7A-ga võrreldes vastavalt 90 % ja 82 % madalamaks (tabel 3, joonis 11). See osutab, et sarnase metoodika abil puhastatud ensüümpreparatsioonide korral ei ole kogu vaadeldav endoaktiivsus seletatav saastusega endoglükanaasi(de) poolt. BC-ga sarnane olukord esines E212Q puhul ka CMC hüdrolüüsil, kus mutandi CMCaasne aktiivsus moodustas 10 % metsiktüüpi Cel7A omast (tabel 3, joonis 12). D214N suhteliselt kõrge CMCaasne aktiivsus (45 % metsiktüübi omast) on kooskõlas tema märgatava jääkaktiivsusega kristallilisel tselluloosil ja madalmolekulaarsetel substraatidel (tabel 3, joonis 12) [20].

Endo-ekso sünergismiga kaasneva substraat-inhibitsiooni puudumine BC hüdrolüüsil metsiktüüpi Cel7A-ga kinnitab samuti märgatava endosaastuse puudumist (joonis 13) [46]. Kuna juba 0.5 % endoglükanaasi lisand põhjustab antud tingimustes Cel7A korral märgatava kõrvalekalde tavapärasest küllastuskineetikast, on selline katsesüsteem üks tundlikumaid endosaastuse detekteerimise võimalusi [46].

Kokkuvõtvalt võib öelda, et kuigi fluorstsentsmärgistatud tselluloosidel põhinev meetod võimaldab tundlikult määrata redutseerivast otsast toimuvate katalüüsiaktide arvu paralleelselt tsellobioosi vabastava üldaktiivsusega, on meetodi rakendatavus piiratud rangelt redutseeriva otsa spetsiifiliste tsellobiohüdrolaasidega. Meetodi edasiarendusena tuleks kasutada substraate, mis võimaldaksid redutseerivast otsast toimuva hüdrolüüsi selektiivset blokeerimist. Blokeeritud ja blokeerimata redutseeriva otsaga substraatidel saadud tulemuste kõrvutamine võimaldaks hinnata redutseeriva otsa spetsiifilistest erinevate toimemehhanismide osakaalu Cel7A ja teiste tsellobiohüdrolaaside korral. Üheks selliseks mudelsubstraadiks võiks olla diaminopüridiini (DAP) või diaminookridiiniiga (DAMAC) derivatiseeritud tselluloos, kus märke vabaks jääv aminorühm võimaldab mitmesuguste, võimaluse korral mahukate, asendajate sisseviimist.

Kokkuvõte

Käesolevas töös töötati välja kineetiline meetod redutseeriva otsa spetsiifiliste tsellobiohüdrolaaside protsessiivsuse määramiseks ning iseloomustati kvantitatiivselt *T.reesei* tsellobiohüdrolaas Cel7A protsessiivsust erinevatel tselluloosidel. Mudelsubstraadina kasutati redutseerivast otsast antraniilhappe ja aminopüridiiniga fluorestsentsmärgistatud tselluloose. Töös ilmnes tsellobiohüdrolaas Cel7A ja tema katalüütilise domääni protsessiivsuste sõltuvus tselluloosi polümerisatsiooniastmest ühes platoostumisega kõrgema DP-ga substraatide korral. Üheks olulisemaks tulemuseks oli avastus, et Cel7A koosseisu kuuluv seondumisdomään ei mõjuta ensüümi protsessiivsust lisakomponentidest vabal tselluloosil. See kinnitab kaudselt varasemaid andmeid seondumisdomääni kiire pinnadiffusiooni kohta tselluloosil. Katsetes ksüloglükanaiga komplekseeritud tselluloosil ilmnes tselluloosiga seondunud polümeersete lisakomponentide negatiivne mõju nii Cel7A protsessiivsusele kui üldaktiivsusele. Töös tuli välja ka Cel7A võimalike lisatoimemehhanismide olemasolu tselluloosil. Saadud tulemused lubavad kõige tõenäolisema lisatoimemehhanismina välja pakkuda endoaktiivsuse, mille esinemist on näidatud ka mõnedes varasemates töödes. Lisatoimemehhanismide esinemine Cel7A korral piirab töös välja töötatud protsessiivsuse määramise metoodika rakendamist.

Summary

A kinetic method for the quantification of the processivity of reducing end acting cellobiohydrolases was developed and used to quantitatively estimate the processivity of *T.reesei* cellobiohydrolase Cel7A on different cellulosic substrates. The method involves the use of reducing end fluorescence labelled celluloses as model substrates. The processivity of Cel7A and its separate catalytic domain showed a marked dependence on the substrate degree of polymerisation (DP) with a levelling off at higher DP celluloses. One of the most important results was the finding that the processivity of Cel7A is not affected by the presence/absence of the binding domain on noncomposite cellulosic substrates. This result indirectly supports earlier information about the sufficiently rapid lateral diffusion rates of the binding domain and the reversibility of its binding on cellulose. In experiments where cellulose/xyloglucan composites were used as substrates for Cel7A, a notable negative impact of xyloglucan on both the processivity and activity of the enzyme was detected. The experiments also revealed the concentration dependence of the processivity. The concentration dependence is in accordance with the existence of additional modes of action of Cel7A besides strict reducing end specific exoactivity. In the results indicate that an intrinsic endoactivity of Cel7A might be the most probable additional mode of action. The additional modes of action can be further investigated on substrates where reducing ends are blocked with bulky substituents and reducing end specific exoactivity of a cellobiohydrolase can not occur.

Kirjanduse loetelu

1. Richmond, P. A. (1991). Occurrence and functions of native cellulose. *In* : Biosynthesis and Biodegradation of Cellulose. (Eds. Haigler, C. H. and Weimer, P. J.), Marcel Dekker, New York, 5 – 23.
2. Coughlan, M. P. (1985). Cellulose hydrolysis : the potential, the problems and relevant research at Galway. *Biochem. Soc. Trans.* **13**, 405 – 407.
3. Beguin, P. and Aubert, J-P. (1994). The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol. Rev.* **13**, 25 – 58.
4. Iguchi, M., Yamanaka, S. and Budhiono, A. (2000). Bacterial cellulose – a masterpiece of nature's arts. *J. Mater. Sci.* **35**, 261 – 270.
5. Gardner, K. H. and Blackwell, J. (1974). The Structure of Native Cellulose. *Biopolymers* **13**, 1975 – 2001.
6. Fan, L. T., Lee, Y-H. and Beardmore, D. H. (1980). Major chemical and physical features of cellulosic materials as substrates for enzymatic hydrolysis. *Adv. Biochem. Eng.* **14**, 101 – 117.
7. Teeri, T. T. (1997). Crystalline cellulose degradation : new insight into the function of cellobiohydrolases. *Tibtech.* **15**, 160 – 167.
8. Delmer, D.P. and Amor, Y. (1995). Cellulose Biosynthesis. *Plant Cell* **7**, 987 – 1000.
9. Imai, T., Boisset, C., Sameijma, M., Igarashi, K. and Sugiyama, J. (1998). Unidirectional processive action of cellobiohydrolase Cel7A on Valonia cellulose microcrystals. *FEBS Lett.* **432**, 113 – 116.
10. Fleming, K., Gray, D. G, and Matthews, S. (2001). Cellulose Crystallites. *Chem. Eur. J.* **9**, 1831 – 1835.
11. Delmer, D. P. (1999). Cellulose biosynthesis : exciting times for a difficult field of study. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, 245 – 276.
12. Koyama, M., Helbert, W., Imai, T., Sugiyama, J. and Henrissat, B. (1997). Parallel-up structure evidences the molecular directionality during biosynthesis of bacterial cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 9091 – 9095.
13. Sjöström, E. (1993). Wood Chemistry : Fundamentals and Applications. Academic Press, San Diego.
14. Gilkes, N. R., Jervis, E., Henrissat, B., Tekant, B., Miller, R. C., Warren, R. A. J. and Kilburn, D. (1992). The adsorption of a Bacterial Cellulase and Its Two

- Isolated Domains to Crystalline Cellulose. *J. Biol. Chem.* **267**, 6743 – 6749.
15. Våljamäe, P., Sild, V., Nutt, A., Pettersson, G. and Johansson, G. (1999). Acid hydrolysis of bacterial cellulose reveals different modes of synergistic action between cellobiohydrolase I and endoglucanase I. *Eur. J. Biochem.* **266**, 327 – 334.
 16. Selvendran, R. R., March, J. F. and Ring, S. G. (1979). Determination of aldoses and uronic acid content of vegetable fiber. *Anal. Biochem.* **96**, 282 – 292.
 17. Bao, W. and Renganathan, V. (1992). Cellobiose oxidase of *Phaenerochaete chrysosporium* enhances crystalline cellulose degradation by cellulases. *FEBS Lett.* **302**, 77 – 80.
 18. Henriksson, G., Zhang, J., Li, J., Ljungquist, P., Reitberger, T., Pettersson, G. and Johansson, G. (2000). Is cellobiose dehydrogenase from *Phaenerochaete chrysosporium* a lignin degrading enzyme ? *Biochim. Biophys. Acta* **1480**, 83 – 91.
 19. Goyal, A., Ghosh, B. and Eveleigh, D. (1991). Characteristics of Fungal Cellulases. *Biores. Technol.* **36**, 37 – 50.
 20. Ståhlberg, J., Divne, C., Koivula, A., Piens, K., Claeyssens, M., Teeri, T.T. and Jones, A. T. (1996). Activity Studies and Crystal Structures of Catalytically Deficient Mutants of Cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. *J. Mol. Biol.* **264**, 337 – 349.
 21. Divne, C., Ståhlberg, J., Teeri, T. T. and Jones, T. A. (1998). High-resolution Crystal Structures Reveal How a Cellulose Chain is Bound in the 50 Å Long Tunnel of Cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. *J. Mol. Biol.* **275**, 309 – 325.
 22. Koivula, A., Ruohonen, L., Wohlfahrt, G., Reinikainen, T., Teeri, T. T., Piens, K., Claeyssens, M., Weber, M., Vasella, A., Becker, D., Sinnott, M. L., Zou, J-y., Kleywegt, G. J., Szardenings, M., Ståhlberg, J. and Jones, A. (2002). The Active Site of Cellobiohydrolase Cel6A from *Trichoderma reesei* : the Roles of Aspartic Acids D221 and D175. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 10015 – 10024.
 23. Davies, G. and Henrissat, B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* **3**, 853 – 859.
 24. Claeyssens, M., Tomme, P., Brewer, C., F. and Hehre, E. J. (1990). Stereochemical course of hydrolysis and hydration reactions catalysed by cellobiohydrolases I and II from *Trichoderma reesei*. *FEBS. Lett.* **263**, 89 – 92.

25. White, A and Rose, D. R. (1997). Mechanism of catalysis by retaining β -glycosyl hydrolases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, 645 – 651.
26. Rabinovich, M., L., Melnick, M., S. and Bolobova, A. V. (2002). The Structure and Mechanism of Action of Cellulolytic Enzymes. *Biochemistry* (transl. *Biokhimiya*) **67**, 850 – 871.
27. Bayer, E., A. Chanzy, H., Lamed, R. and Shoham, Y. (1998). Cellulose, cellulases and cellosomes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 548 – 557.
28. Ståhlberg, J., Johansson, G. and Pettersson, G. (1991). A New Model For Enzymatic Hydrolysis of Cellulose Based on the Two-Domain Structure of Cellobiohydrolase I. *Bio/Technology* **1**, 691 – 696.
29. Linder, M. and Teeri, T. T. (1997). The roles and function of cellulose-binding domain. *J. Biotechnol.* **57**, 15 – 28.
30. Din, N., Damude, H.G., Gilkes, N. R., Miller, R. C., Warren, R. A. J. and Kilburn, D. G. (1994). C₁- C_x revisited : Intramolecular synergism in a cellulase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 11 383 – 11 387.
31. van Tilbeurgh, H., Tomme, P., Claeyssens, M., Bhikhabai, R. and Pettersson, G. (1986). Limited proteolysis of the cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. Separation of functional domains. *FEBS Lett.* **204**, 223 – 227.
32. Kleman-Leyer, K. M., Siika-Aho, M., Teeri, T. T. and Kirk, K. T. (1997). The Cellulases Endoglucanase I and Cellobiohydrolase II of *Trichoderma reesei* Act Synergistically To Solubilise Native Cotton Cellulose But Not To Decrease its Molecular Size. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 2883 – 2887.
33. Kleman-Leyer, K. M., Gilkes, N. R., Miller, R. C. Jr. And Kirk, K. T. (1994). Changes in the molecular-size distribution of insoluble celluloses by the action of recombinant *Cellulomonas fimi* cellulases. *Biochem. J.* **302**, 463 – 469.
34. Ståhlberg, J., Johansson, G. and Pettersson, G. (1993). *Trichoderma reesei* has no true exo-cellulase : all intact and truncated cellulases produce new reducing end groups on cellulose. *Biochim. Biophys. Acta* **1157**, 107 – 113.
35. Armand, S., Drouillard, S., Schülein, M., Henrissat, B. and Driguez, H. (1997). A Bifunctionalized Fluorogenic Tetrasaccharide as a Substrate to Study Cellulases. *J. Biol. Chem.* **272**, 2709 – 2713.
36. Boisset, C., Fraschini, C., Schülein, M., Henrissat, B. and Chanzy, H. (2000). Imaging the Enzymatic Digestion of Bacterial Cellulose Ribbons Reveals the Endo Character of the Cellobiohydrolase Cel6A from *Humicola insolens* and Its

- Mode of Synergy with Cellobiohydrolase Cel7A. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1444 – 1452.
37. Henrissat, B. (1998). Enzymatic cellulose degradation. *Cellulose Commun.* **5**, 84 - 89.
 38. Varrot, A., Schülein, M. and Davies, G. J. (1999). Structural Changes of the Active Site Tunnel of *Humicola Insolens* Cellobiohydrolase, Cel6A, upon Oligosaccharide Binding. *Biochemistry* **38**, 8884 – 8891.
 39. Vršanska, M. and Biley, P. (1992). The cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei* QM 9414 : action on cello-oligosaccharides. *Carbohydr. Res.* **227**, 19 – 27.
 40. Biley, P., Vršanska, M and Claeysens, M. (1993). Mode of action of *Trichoderma reesei* β -1,4- Glucanases on Cellooligosaccharides. *TRICEL93 Symposium on Trichoderma reesei Cellulases and Other Hydrolases* (Suominen, P. and Reinikainen, T., Eds.), 99 – 108.
 41. Barr, B. K., Hsieh, Y-L., Ganem, B. and Wilson, D. B. (1996). Identification of Two Functionally Different Classes of Exocellulases. *Biochemistry* **35**, 586 – 592.
 42. Rouvinen, J. Bergfors, T., Teeri, T. T., Knowles, J. K. C. and Jones, T. A. (1990). Three-Dimensional Structure of Cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. *Science* **249**, 380 – 386.
 43. Skopec, C. E., Himmel, M. E., Matthews, J. F. and Brady, J. W. (2003). Energetics for displacing a single chain from the surface of microcrystalline cellulose into the active site of *Acidothermus cellulolyticus* Cel5A. *Protein Eng.* **16**, 1005 – 1015.
 44. von Ossowski, I., Ståhlberg, J., Koivula, A., Piens, K., Becker, D., Boer, H., Harle, R., Harris, M., Divne, C., Mahdi, S., Zhao, Y., Driguez, H., Claeysens, M., Sinnot, M. L. and Teeri, T. T. (2003) Engineering the exo-loop of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase, Cel7A. A comparison with *Phanerochaete chrysosporium* Cel7D. *J. Mol. Biol.* **333**, 817–829
 45. Woodward, J. (1991). Synergism in Cellulase Systems. *Biores. Technol.* **36**, 67 – 75.
 46. Våljamäe, P., Pettersson, G. and Johansson, G. (2001). Mechanism of substrate inhibition in cellulose synergistic degradation. *Eur. J. Biochem.* **268**, 4520 – 4526.
 47. Zhou, W., Irwin, D. C., Escovar-Kousen, J. and Wilson, D. B. (2004). Kinetic studies of *Thermobifida fusca* Cel9A Active Site Mutant Enzymes. *Biochemistry*

- 43**, 9655 – 9663.
48. Irwin, D.C., Spezio, M., Walker, L. P. And Wilson, D. B. (1993). Activity Studies of Eight Purified Cellulases : Specificity, Synergism, and Binding Domain Effects. *Biotechnol.Bioeng.* **42**, 1002 – 1013.
 49. Tomme, P., Kwan, E., Gilkes, N. R., Kilburn, D. G. and Warren, A. J. (1996). Characterisation of CenC, an Enzyme from *Cellulomonas fimi* with Both Endo- and Exoglucanase activities. *J. Bacteriol.* **178**, 4216 – 4223.
 50. Reverbel-Leroy, C., Pages, S., Belaich, A., Belaich, J.-P. and Tardif, C. (1997). The processive endocellulase CelF, a Major Component of the *Clostridium cellulolyticum* Cellulosome : Purification and Characterisation of the Recombinant Form. *J. Bacteriol.* **179**, 46 – 52.
 51. Zhang, S., Irwin, D. C. and Wilson, D. B. (2000). Site-directed mutation of noncatalytic residues of *Thermobifida fusca* exocellulase Cel6B. *Eur. J. Biochem.* **267**, 3101 – 3115.
 52. Medve, J., Karlsson, J., Lee, D. and Tjerneld, F. (1998). Hydrolysis of Microcrystalline Cellulose by Cellobiohydrolase I and Endoglucanase II from *Trichoderma reesei* : Adsorption, Sugar Production Pattern and Synergism of the Enzymes. *Biotechnol. Bioeng.* **59**, 621 – 634.
 53. Uzcategui, E., Raices, M., Montesino, R., Johansson, G., Pettersson, G. and Eriksson, K-E. (1991). Pilot-scale production and purification of the cellulolytic enzyme system from the white-rot fungus *Phaenerocheate chrysosporium*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **13**, 323 – 334.
 54. Bhikhabai, R., Johansson.G and Pettersson.G (1984) Isolation of Cellulolytic Enzymes from *Trichoderma Reesei* QM 9414. *J. Appl. Biochem.* **6**, 336-345
 55. van Tilbeurgh, H., Loontjens, F. G., De Bruyne, C. K. and Claeysens, M. (1987). Fluorogenic and Chromogenic Glycosides as Substrates and Ligands of Carbohydrates. *Methods. Enzymol.* **160**, 45 – 59.
 56. Wood, T. M. and Bhat, K. M. (1988). Methods for Measuring Cellulase Activities. *Methods. Enzymol.* **160**, 87 – 112.
 57. Divne, C., Ståhlberg, J., Reinikainen, T., Ruohonen, L., Pettersson, G., Knowles, J. K. C., Teeri, T. T. and Jones, T. A. (1994). The Three-Dimensional Structure of the Catalytic Core of Cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. *Science* **265**, 524 – 528.
 58. Gilkes, N. R., Kwan, E., Kilburn, D. G., Miller, R. C. and Warren, R. A. J. (1997).

- Attack of carboxymethylcellulose at opposite ends by two cellobiohydrolases from *Cellulomonas fimi*. *J. Biotechnol.* **57**, 83 – 90.
59. Wood, T. M. (1988). Preparation of Crystalline, Amorphous and Dyed Cellulase Substrates. *Methods. Enzymol.* **160**, 19 – 25.
 60. Leisola, M. and Linko, M. (1976). Determination of the Solubilizing Activity of a Cellulase Complex with Dyed Substrates. *Anal. Biochem.* **70**, 592 – 599.
 61. Wood, P. J., Erfle, J. D. and Teather, R. M. (1988). Use of Complex Formation between Congo Red and Polysaccharides in Detection and Assay of Polysaccharide Hydrolases. *Methods. Enzymol.* **160**, 59 – 74.
 62. Nutt, A., Sild, V., Pettersson, G. and Johansson, G. (1998). Progress curves. A mean for functional classification of cellulases. *Eur. J. Biochem.* **258**, 200 – 206.
 63. Kipper, K., Våljamäe, P. and Johansson, G. (2005). Processive action of cellobiohydrolase Cel7A from *Trichoderma reesei* is revealed as “burst” kinetics on fluorescent polymeric model substrates. *Biochem. J.* **385**, 527 – 535.
 64. Kuga, S. and Brown, M. (1988). Silver labeling of the reducing ends of bacterial cellulose. *Carbohydr. Res.* **180**, 345 – 350.
 65. van Tilbeurgh, H., Loontjens, F. G., De Bruyne, C. K. and Claeyssens, M. (1987). Fluorogenic and Chromogenic Glycosides as Substrates and Ligands of Carbohydrates. *Methods. Enzymol.* **160**, 45 – 59.
 66. Tilbeurgh, H. and Claeyssens, M. (1985). Detection and differentiation of cellulase components using low molecular mass fluorogenic substrates. *FEBS. Lett.* **187**, 283 – 287.
 67. Bhat, K. M., Hay, A. J., Claeyssens, M. and Wood, T. M. (1990). Study of the mode of action of the endo-(1-4)- β -D-glucanases of the fungus *Penicillium pinophilum* with normal, 1-³H-labelled, reduced and chromogenic cello-oligosaccharides. *Biochem. J.* **266**, 371 – 378.
 68. Golovchenko, N. P., Kataeva, I. A. and Akimenko, V. K. (1992). Elucidation of the role of hydrophobic interactions in the adsorption of endo-1,4- β -glucanases on polysaccharides. *Enzyme Microb. Technol.* **14**, 327 – 331.
 69. Gruno, M., Våljamäe, P., Pettersson, G. and Johansson, G. (2004). Inhibition of the *Trichoderma reesei* Cellulases is Strongly Dependent on the Nature of the Substrate. *Biotechnol. Bioeng.* **86**, 503 – 511.
 70. Pauly, M., Albersheim, P., Darvill, A. and York, W. S. (1999). Molecular domains of the cellulose/xyloglucan network in the cell walls of higher plants. *Plant J.* **20**

- (6), 629 – 639.
71. Hörmann, H. und Gollwitzer, R. (1962). Bestimmung von Hexosen in tryptophan-haltigen eiweisskörpern. *Ann. Chem.* **655**, 178 – 188.
 72. Maness, N. O., Miranda, E. T. and Mort, A. J. (1991). Recovery of sugar derivatives from 2-aminopyridine labeling mixtures for high-performance liquid chromatography using UV or fluorescence detection. *J. Chromatogr.* **587**, 177 – 183.
 73. Anthon, G. E. and Barrett, D. M. Determination of Reducing Sugars with 3-Methyl-2-benzothiazolinonehydrazide. *Anal. Biochem.* **305**, 287 – 289.
 74. Lane, C. F. (1975). Sodium Cyanoborohydride – A Highly Selective Reducing Agent for Organic Functional Groups. *Synthesis*, 135 – 146.
 75. Medve, J., Ståhlberg, J. and Tjerneld, F. (1997). Isotherms for adsorption of cellobiohydrolase I and II from *Trichoderma reesei* on microcrystalline cellulose. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **66**, 39 – 56.
 76. Munoz, I. G., Ubhayasekera, W., Henriksson, H., Szabo, I., Pettersson, G., Johansson, G., Mowbray, S. L., Stahlberg J. (2001). Family 7 cellobiohydrolases from *Phanerochaete chrysosporium*: crystal structure of the catalytic module of Cel7D (CBH58) at 1.32 Å resolution and homology models of the isozymes. *J. Mol. Biol.* **314**, 1097 – 1111.
 77. Becker, D., Braet, C., Brumer, H., Claeysens, M., Divne, C., Fagerström, B. R., Harris, M., Jones, T. A., Kleywegt, G. J., Koivula, A., Mahdi, S., Piens, K., Sinnot, M. L., Ståhlberg, J., Teeri, T. T., Underwood, M. and Wohlfahrt, G. (2001). Engineering of a glycosidase Family 7 cellobiohydrolase to more alkaline pH optimum: the pH behaviour of *Trichoderma reesei* Cel7A and its E223S/A224H/L225V/T226A/D262G mutant. *Biochem. J.* **356**, 19–30.
 78. Våljamäe, P., Sild, V., Pettersson, G. and Johansson, G. (1998). The initial kinetics of hydrolysis by cellobiohydrolases I and II is consistent with a cellulose surface-erosion model. *Eur. J. Biochem.* **253**, 469 – 475.
 79. Sørbotten, A., Horn, S. J., Eijsink, V. G. H. and Vårum, K. M. (2005). Degradation of chitosans with chitinase B from *Serratia marcescens*. Production of chito-oligosaccharides and insight into enzyme processivity. *FEBS Journal* **272**, 538 – 549.
 80. Linder, M. and Teeri, T. T. (1996). The cellulose binding domain of the major cellobiohydrolase of *Trichoderma reesei* exhibits true reversibility and a high exchange rate on crystalline cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 12251-

12255.

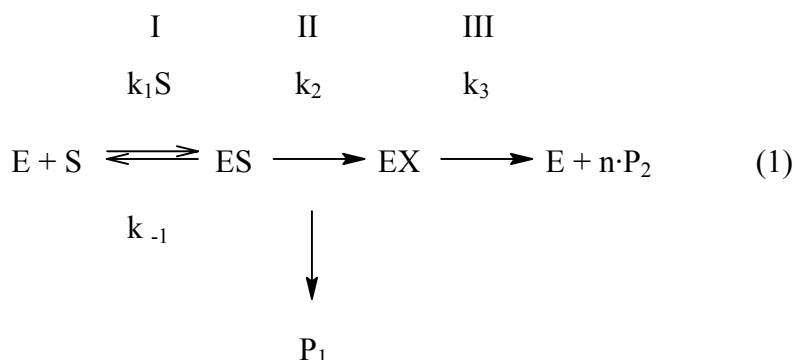
81. Jervis, E. J., Haynes, C. A. and Kilburn, D. G. (1997). Surface Diffusion of Cellulases and Their Isolated Binding Domains on Cellulose. *J. Biol. Chem.* **272**, 24016 – 24023.
82. Katchalski-Katzir, E., Rishpon, J., Sahar, E., Lamed, R. and Henis, Y. I (1985). Enzyme Diffusion and Action on Soluble and Insoluble Substrate Biopolymers. *Biopolymers*, **24**, 257 – 277.
83. Grethelein, H. E. (1985). The effect of pore size distribution on the rate of enzymatic hydrolysis of cellulosic substrates. *Bio. Technol.* **2**, 155 – 160.
84. Eriksson, T., Karlsson, J. and Tjerneld, F. (2002). A model explaining declining rate in hydrolysis of lignocellulose substrates with cellobiohydrolase I (Cel7A) and endoglucanase I (Cel7B) of *Trichoderma reesei*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **101**, 41 – 60.
85. Sild, V, Ståhlberg, J., Pettersson, G. and Johansson, G. (1996). Effect of potential binding site overlap to binding of cellulase to cellulose : a two-dimensional simulation. *FEBS Lett.* **378**, 51 – 56.
86. Haigler, H. C., Brown, M. R. Jr., and Benziman, M. (1980). Calcofluor White ST alters *in vivo* assembly of cellulose microfibrils. *Science* **210**, 903 – 906.
87. Reinikainen, T., Henriksson, K., Siika-Aho, M., Teleman, O. and Poutanen, K. (1995). Low-level endoglucanase contamination in a *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase II preparation affects its enzymatic activity on β -glucan. *Enzyme Microb. Technol.* **17**, 888 – 892.

Lisa 1

Lisa 2.

Kineetiline skeem tsellobiohüdrolaasi protsessiivsuse kohta otsmärgistatud tselluloosil

Otsmärke ja tsellobioosi järjestikune vabanemine tselluloosi protsessiivsel hüdrolüüsil märgistatud otsa spetsiifilise tsellobiohüdrolaasi poolt on kirjeldatav järgneva reaktsiooniskeemiga :



kus $k_1 S$ ja k_{-1} on vastvalt 1. ensüüm-substraat kompleksi (nn. Michaelise kompleksi) moodustumise ja dissotsiatsioonireaktsiooni 1. järku kiiruskonstandid, k_2 ja k_3 1. järku kiiruskonstandid produktide P_1 (otsmärke) ja P_2 (tsellobioos) tekkele viiva reaktsiooni jaoks. Etapp III võtab kokku kõik P_2 tekkele viivad n alaetappi. P_1 ja P_2 tekkekiiruste avaldised on järgnevad :

$$V_{P_1} = \frac{dP_1}{dt} = k_2 \cdot [ES] \quad (2)$$

$$V_{P_2} = \frac{dP_2}{dt} = n \cdot k_3 \cdot [EX] \quad (3)$$

Massibilanss ensüümi jaoks on :

$$E_0 = [E] + [ES] + [EX]$$

Statsionaarse faasi eeldusel saame järgneva võrrandisüsteemi ES ja EX jaoks :

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{d[ES]}{dt} = k_1 S \cdot [E] - (k_{-1} + k_2) \cdot [ES] = 0 \\ \frac{d[EX]}{dt} = k_2 [ES] - k_3 [EX] = 0 \end{array} \right. \quad (4)$$

$$(5)$$

Lähtudes massibilansist ja eeldades S konstantsust ($S \gg E_0$), on mõlema kompleksi kontsentratsioon võrrandite 4 ja 5 põhjal avaldatav järgmiselt :

$$[ES] = \frac{\frac{k_3}{k_2 + k_3} \cdot E_0 \cdot S}{S + \frac{k_3}{k_2 + k_3} \cdot \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}} \quad (6)$$

$$[EX] = \frac{\frac{k_2}{k_2 + k_3} \cdot E_0 \cdot S}{S + \frac{k_3}{k_2 + k_3} \cdot \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}} \quad (7)$$

Pannes saadud [ES] ja [EX] avaldised võrranditesse 2 ja 3, saame produktide P_1 ja P_2 tekkekiirused :

$$V_{P_1} = \frac{\frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3} \cdot E_0 \cdot S}{S + \frac{k_3}{k_2 + k_3} \cdot \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}} \quad (8)$$

$$V_{P_2} = n \cdot \frac{\frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3} \cdot E_0 \cdot S}{S + \frac{k_3}{k_2 + k_3} \cdot \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}} \quad (9)$$

Kiiruste suhe

$$\frac{V_{P_2}}{V_{P_1}} = n \quad (10)$$

annab ühe P_1 molekuli kohta vabanenud P_2 molekulide arvu ehk ensüümi protsessiivsuse statsionaarses faasis. Saadud suhe ei sõltu ensüümi ega substraadi kontsentratsioonist. Tähistades võrrandi 6 ja 7 parema poole vastavalt α ja β , võib kiiruste avaldised 2 ja 3 kirjutada järgnevalt :

$$\frac{dP_1}{dt} = \alpha \cdot k_2$$

$$\frac{dP_2}{dt} = \beta \cdot n \cdot k_3$$

Integreerides saadud avaldise produktide vahemikus π kuni P_1 (esimene produkt) ja 0 kuni P_2 (teine produkt) ajavahemikus 0 kuni t , saame ajahetkeks t tekkinud produktide kontsentratsiooniks :

$$P_1 = \alpha \cdot k_2 \cdot t + \pi$$

$$P_2 = \beta \cdot n \cdot k_3 \cdot t$$

kus π on P_1 tekkel esinev nn. “hüpe” (ingl. “burst”) (Lisa 1). Kui $P_1 \gg \pi$, kehtib ligikaudne võrdus

$$P_1 = \alpha \cdot k_2 \cdot t$$

ja produktide P_2 ning P_1 suhe on :

$$\frac{P_2}{P_1} = n \cdot \frac{\beta \cdot k_3}{\alpha \cdot k_2}$$

Kuna võrrandite 6 ja 7 põhjal

$$\frac{\alpha}{\beta} = \frac{k_3}{k_2}$$

saame

$$\frac{P_2}{P_1} = n \quad (11)$$

Seega tingimusel $P_1 \gg \pi$ on ensüümi protsessiivsus arvutatav ka antud ajahetkeks vabanenud produktide kontsentratsiooni suhtena.

Kasutades tähistusi $V_{P1} = V_{AA-CB}$, $V_{P2} = V_{CB}$, $P_1 = AA-CB$ (resp. AP-CB) ja $P_2 = CB$ on protsessiivsuse avaldis vastavalt võrranditele 10 ja 11 järgnev :

$$n = \frac{V_{CB}}{V_{AA-CB}} = \frac{CB}{AA_CB}$$