

Биофизична характеристика на гъбна фитаза (мио-инозитол хексакисфосфат фосфохидролаза) молекулни размери, гликозилиране и създаване на протеолитична резистентност

Фитази(мио-инозитол хексакисфосфат фосфохидролаза) бяха открити натурално в растения и микроорганизми, и особено в гъби. Интересът към този ензим се увеличава и поради факта, че фитазните добавки увеличават наличието на фосфор в храната за прасета и домашни птици и освен това намалява фосфатното замърсяване в райони с интензивно животновъдство. “Диви” видове фитази от 6 различни гъби: *Aspergillus niger*

,  
*Aspergillus*  
*terreus*

,  
*Aspergillus*  
*fumigatus*

,  
*Emericella*  
*nidulans*

,  
*Myceliophthora*  
*thermophila*

и  
*Talaromyces*  
*thermophilus*

са свръх продуцирани от всички филаментозни гъби или (мая) дрожди и пречистени и техните биофизични качества бяха сравнени с тези на фитаза от

*Escherichia*  
*coli*

. Всички изследвани фитази са мономерни протеини. Фитазата на

*Escherichia*  
*coli*

е негликозилиран ензим, а плесенните фитази са различно гликозилирани, което зависи от вида на фитазата, от дадената фитаза продуцирана в отделни изразени системи и от индивидуалните партиди от дадената фитаза продуцирана в тези системи. Освен това степента на гликозилираност на фитазата се моделира при излъчването и от филаментозни гъби, при което се изразходва енергия. Освен това степента на гликозилираност не оказва ефект върху специфичната активност, термостабилността или върху възстановителните възможности на различни фитази. Излъчваните от

*Aspergillus*  
*niger*

различни фитази са податливи на действието на протеази, представени в културалната супернатанта. N-терминалното секвениране на фрагментите показва, че разцепването

неизменно настъпва на свободни (отворени) участъци(примки) на повърхността на молекулата. Место-насочената мутагенеза на фитази от

A

.  
*fumigatus*

и

E

.  
*nidulans*

в мястото на разцепване създава мутантни фитази, които са значително по-резистентни към протеолитична атака. Обработването на отворени (непокрити) повърхностни примки може да се окаже добра стратегия за подобряване на фитазната стабилност по време на хранителният процес в храносмилателният тракт.

Фитиновата киселина (мио-инозитол хексакис фосфат) е основна запасна форма на фосфор в растенията. Във връзка с човешкото и животинското хранене, следните два факта относно фитиновата киселина са изключително важни: 1-моногастричните животни имат ниски стойности на фитат разграждащи ензими в техния храносмилателен тракт и т.к. самата фитинова киселина не може да се резорбира, храната на прасетата и домашните птици обикновено се обогатява с неорганични фосфати във връзка със задоволяване на нуждите от фосфор на тези животни, и 2-фитиновата киселина е анти-хранителен фактор, т.к. образува комплекси с протеини и различни метални йони и така намалява хранителната стойност на храната.

Поради тези проблеми съществува значителен интерес към фитат разграждащите ензими. Фитазите (мио-инозитол хексакис фосфат 3- и 6-фосфохидролази; EC 3.1.3.8 и EC 3.1.3.26) са подсемейство на киселите хистидин фосфатази(14) и са открити в растения, микроорганизми, както и в гъби. Като клас фосфатазите доскоро бяха не добре биохимически характеризирани. С цел да се даде по-ясна дефиниция на този клас ензими, няколко фитази с плесенен произход бяха клонирани и свръх експресирани от работници в нашата компания(14-16). В тази статия ще опишем пречистването на плесенни фитази, структурните и биофизичните особености на тези ензими и резултатите от сравнението им с прокариотна фитаза от *E.coli*.

Материали и методи

Експресия при *Aspergillus niger*. DNA-фрагментите, кодиращи *A.niger* CB (30), *Aspergillus terreus*

9A1

(GenBank accession no. U59805),

*Aspergillus*

*fumigatus*

(GenBank accession no. U59804),

*Emericella*

*nidulans*

(GenBank accession no. U59803) и

*Myceliophthora*

*thermophila*

(GenBank accession no. U59806) фитазите бяха ligated като 5'NcoI или BspHI (въвеждащи места ATG за стартов кодон) 3'blunt-крайни фрагменти надолу през glaA промотора към NcoI-EcoRV мястото на вектора на експресия, както са описани от Mitchell et al. (14) и Pasamontes et al. (15). Трансформацията на

A

.

*niger*

NW205 (ura

-

arg

-

nic

-

; любезно предоставени от F. Vuxton) и скрийнинга за трансформация на фитазната продуктивност бяха извършени по направени вече описания.

Фитазата на *A.niger* (Natuphos; GenBank accession no. Z16414) беше получена като комерсиален продукт от BASF (Ludwigshafen, Germany) и беше пречистена до хомогенна чрез анион-обменна хроматография.

Експресия при *Saccharomyces cerevisiae*. Фитазните гени бяха клонирани в pScCr-Ro11, 2μ-основен вектор harboring скъсената версия на gap(FL) промотора и rho 5 терминатора, толкова добре като ura 3 гена като селекционен маркер. Интронните фитазни гени на *Aspergillus fumigatus*, *A.niger*

CB и

A

.

*terreus*

CBS бяха клонирани като EcoRI-EcoRV фрагменти продължаващи от gap(FL) промотора в EcoRI-BamHI blunt-завършваща експресията cassette. Гена за фитазата на

E

.

*nidulans*

беше клониран като EcoRI до кореспондиращото място от pScrr-Ro11.

S

.  
*cerevisiae*

YMR4 (ura

-  
his

-  
leu

-  
pho3

-  
pho5

любезно предоставен от M. Riederer) беше използван за трансформация.

Индивидуалните трансформанти бяха оставени първоначално да прорастнат за 1-2 дни на минимална среда. Фитазната активност беше тествана след субсеквентна култура за 2 до 3 дни в YPD среда.

Експресия при *Hansenula polymorpha*. Фитазните гени (интрони) на *A. terreus* CBS (GenBank accession no. U60412),

A

.  
*fumigatus*

и

*Talaromyces thermophilus*

(GenBank accession no. U59802) бяха клонирани като EcoRI фрагменти в кореспонденция с

*Hansenula  
polymorpha*

експресорен вектор rFP(4) надолу по формиат дехидрогеназния (FMD) промотор (9).

Произлезлите плазмиди бяха трансформирани в

*Hansenula  
polymorpha*

RB11 (ura

-). Около 300 до 400 трансформанта от всяка конструкция бяха инокулирани на минимална среда (YNB съдържаща 2% глюкоза). След няколко преминавания през селективно налягане за засилване на мултиплетната интеграция на експресионните плазмиди в генома на

*Hansenula  
polymorpha*

, отделни стабилни клонинги се тестват за фитазна активност.

Във връзка с получените приемливи експресионни нива, първите 35 N-терминални аминокиселини от *T. thermophilus* фитаза бяха реплицирани по аминокиселинната секвенция: MGV FVLLSIATLFGSTSGTALGPRGNHSKS

CDTA

<sup>35</sup>

(подчертаните аминокиселини произлизат от

*A*

.

*terreus*

CBS фитаза и завършват терминалната секвенция). Аминокиселините K30SCDTA35 бяха unrelated остатъци произлизащи от клонинг стратегията използвана за заместване на N терминалите. Компютърното моделиране на виртуална фитаза от

*T*

.

*thermophilus*

предполага, че модификацията на първите 16 аминокиселини на зрелия протеин не е вероятно да има ефект върху биохимичните свойства на ензима.

Протеиново пречистване. Независимо от използваната експресионна система, културалните бульони (обикновено 500 до 1,000 ml) бяха центрофугирани за отстраняване на клетките и бяха концентрирани чрез ултрафилтрация с Amicon 8400 клетки (PM30 мембрани; Grace AG, Wallisellen, Switzerland) ултрафри-15 центрофужен филтърен способ (Biomax 30K; Millipore, Bedford, Mass.). Концентратите (обикновено 1,5 до 5 ml) бяха изсолени чрез Fast Desalting HR 10/10 или сефадекс G-25 супер фини колони (Pharmacia Biotech, Dubendorf, Switzerland); 10 mM натриев ацетат (pH 5,0) беше използван като елюиращ буфер. Изсолените проби от *A. fumigatus* бяха директно пуснати на 1,7 ml Poros HS/M катион-обменна хроматографска колона (Per Septive Biosystems, Framingham, Mass.). Когато други фитази бяха експресирани в

*A*

.

*niger*

или

*H*

.

*olyomorpha*

, те бяха пуснати на 1,7 ml Poros HQ/M анион-обменна хроматографска колона. По време на двете анион-обменна и катион-обменна хроматографии, фитазата беше елюирана в чиста форма чрез използване на оптимизиран NaCl-градиент.

Всички фитази експресирани в *S. cerevisiae* (включително *A. fumigatus* фитаза) бяха

внесени в 2 M (NH

4  
)

2  
SO

4  
след изсолването и бяха пуснати на 1- ml Butyl Sepharose 4 Fast Flow хидрофобно реагираща хроматографска колона (Pharmacia Biotech). Ензимите бяха елюирани с линеен 2 до 0 M (NH

4  
)

2  
SO

4  
градиент в 10 mM натриев ацетат (pH 5,0). Фитазите елюирани по този начин бяха концентрирани и пуснати на 120-ml Sephacryl S-300 гел просмукваща хроматографска колона (Pharmacia Biotech). Те елюират като симетрични пикове и беше установено, че са чисти чрез натриев додецилсулфат (SDS)-полиакриламидна гел електрофореза (PAGE).

Фитаза от *E.coli*. В сравнение с клонирането на *appA* гена от *E.coli*, от тоталната ДНК от *E.coli* M15 (25) беше изготвен препарат както е описано от Davis et al. (2). (GenBank accession no. M58708): *appA* I (5'-AAACATATTCATGAAAGCGATCTTAATCCCA-3'), включително *Rca* I сайта (подчертаната секвенция); *appA* II(5'-ATATA

GGATCC

CAAAGTGGAGCCGGTTATGCG-3'), включително и *Bam*HI сайта (подчертаната секвенция). PCR беше представена както се описва от производителя (Expand High Fidelity PCR kit; Boehringer, Mannheim, Germany) чрез използването на хибридизационна температура от 55°C. Полученият PCR продукт беше сепариран from the primers чрез използване на PCR пречистване kit получен от Qiagen (Hilden, Germany) и беше разтворен с *Bam*HI и *Rca*I, и беше пречистен чрез агарозна гел електрофореза и последваща гел елюираща стъпка (*QiacxII*; Qiagen). *appA* гена беше вмъкнат между *Bam*HI и *Nco*I сайтове на *pBluescript II SK* вектор (Stratagene, La Jolla, Calif.). Анализиранията ДНК секвенция на гена показва две различия при сравняване със секвенцията обявена от Dassa et al. (2). Една от тези разлики е промяната на А в G на позиция 620. Тази разлика освен това оказва ефект върху аминокиселинната секвенция на продукта кодиран в *appA* гена; глицина на позиция 207 беше заменен от аспарат. Втората секвенционна разлика беше на позиция 984 (смяна на G в A) и се проявява като скрита мутация. *appA* гена беше прехвърлен в *pQE60* експресорен вектор (Qiagen) съдържащ C-терминалния 6xHis свободен край на късата свързваща секвенция (Gly-Ser-Arg-Ser-His-His-His-His-His) и беше трансформиран в *E.coli* BL21(Stratagene).

500 ml порция от средата на Luria-Bertani съдържаща 200 µg ампицилин за ml и 30 µg канамицин за ml беше инокулирана с 8 ml от пренощувала култура от щам BL21 съдържащ *arrA* експресорния плазмид. Когато културата достигна оптимална плътност при 600 nm на 1,0, клетките бяха индуцирани с 1 mM IPTG (изопропил-β-D-тиогалактопиранозид) и инкубирана за допълнителни 5 h при 37°C при енергично разбъркване. Клетките бяха събрани чрез центрофугиране при 4000 x g за 20 min, респендирани в 30 ml ултразвуков буфер (50 mM натриев фосфат [pH 8,0], 300 mM NaCl, 1 mM фенилметилсулфонил флуорид, 20 mM имидазол, 1 mg лизозим за ml). Суспензията беше инкубирана в лед за 15 min преди клетките да бъдат разрушени чрез ултразвук (Vibra Cell 72408; Bioblock Scientific, Illkirch, France) със 60% сила с използване на 2,5-s интервал, 2,5-s периоди на охлаждане и време за разрушаване 3 min. Супернатантата беше избистрена чрез центрофугиране при 10,000 x g за 15 min, смесена с 8 ml от Ni<sup>2+</sup>-агароза (50% смолиста суспензия) калибрирана с ултразвуков буфер и инкубирана за 1 h в лед. После сместа беше излята в колона и измита с 85 ml ултразвуков буфер. Фитазата беше елюирана с 40 ml от 20 mM натриев ацетат буфер (pH 4,5) съдържащ 300 mM NaCl.

SDS-PAGE и IEF. SDS-PAGE беше извършена на 8 до 16% трис-глицин градиентни гелове, а изоелектричното фокусиране (IEF) беше извършено на IEF pH 3 до 7 или pH 3 до 10 гелове (Novex, San Diego, Calif.). Геловите бяха оцветени с колоиден комаси блу (Novex) или полу-точно-оцветени на Immobilon P<sup>SQ</sup> (поливинилиден дифлуорид) мембрани (Millipore) и после оцветени с аминок черно (нафтол синьо-черно).

Гел инфилтрационна хроматография. Молекулните размери на пречистеният протеин бяха установени при стайна температура чрез гел филтрация проведена с калибрирана супердекс 200 колона (бърза протеинова течна хроматография; Pharmacia Biotech). Елюиращият буфер нормално съдържа 50 mM натриев фосфат; 150 mM NaCl, 0,2 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 2 mM 2-меркаптоетанол и 1 mM натриев азид (pH 7,2). Във връзка с детерминиране на ефекта на фосфата върху молекулните размери на фитаза от *A. fumigatus*

, гел инфилтрационната хроматография беше проведена също с елюиращ буфер съдържащ 100 mM натриев ацетат (pH 5,0). Гел филтрационната колона беше калибрирана за двата елюиращи буфера с високо- и ниско-молекулно теглови kits предоставени от Pharmacia Biotech, които съдържат тироглобулин (Mr 749,000; Stokes radius, 85,0 Å), феритин (Mr 421,000; Stokes radius, 61,0 Å), каталаза (Mr 211,000; Stokes radius, 52,2 Å), алдолаза (Mr 163,000; Stokes radius, 48,1 Å), бавен серумен албумин (Mr 71,700; Stokes radius, 35,5 Å), овалбумин (Mr 45,700; Stokes radius, 30,5 Å), химотрипсиноген A (Mr 20,200; Stokes radius, 20,9 Å), и RNase A (Mr 15,700; Stokes radius, 16,4 Å).

Аналитично ултрацентрифугиране. Аналитично ултрацентрифугиране беше проведено в 10 mM натриев ацетат (pH 5,0) чрез използване на модел Optima XL-A ултрацентрифуга (Beckman, Palo Alto, Calif.) снабдена с тип An-60 ротор и клетки имащи стандартни двойно-секторни Ерон изпълнени с алуминий централни гнезда. Стойностите бяха анализирани с програма DISCREED по Schuck (2), която е базирана на една интеративна Marquardt процедура. Специфичният обем на протеина зависи не само от аминокиселинната секвенция, но и от степента и типа на гликозилираност. Тъй като гликозилирането на гъбните фитази най-много прилича на високо-манозният тип на гликозилиране, всички захари бяха приети за маноза. Това допускане беше прието за улеснение, но предизвиква само малка грешка при изчисляването на Mr.

Мас спектрометрия. Пептидите представени от трипсиновото разграждане на фитаза от *A. niger* (фиг.1) бяха анализирани чрез електроспрей мас спектрометрия. Всички анализи бяха проведени по йон позитивния метод с троен четириполусен инструмент (model API III; SCIEX, Concord, Ontario, Canada). Излъчванията между m/z 400 и m/z 1600 бяха записани с 0,2-average-mass-unit стъпки. Фитазата на *A. fumigatus* беше анализирана с PerSeptive Biosystems Voyager Elite мас спектрометър, снабден с рефлектрон и забавена екстракция. Йонният ускорителен волтаж беше 20 kV и резултатите от 100 до 200 излъчвания бяха осреднени.