

Badania nad enolazą – ważnym alergenem grzybów pleśniowych. Preparacja i charakterystyka enolazy z *Alternaria alternata*

Studies on enolase – a principal allergen of moulds. Preparation and characteristics of enolase from *Alternaria alternata*

Irena Kustrzeba-Wójcicka, Wioletta Kmiecik

Katedra i Zakład Biochemii Lekarskiej AM we Wrocławiu

Streszczenie

Wprowadzenie: Enzym szlaku glikolitycznego enolaza, uznawany jest za główny alergen grzybów i pleśni. Uzyskanie wysokooczyszczonych preparatów enolazy z różnych gatunków grzybów pozwoli w przyszłości na zwiększenie specyficzności i czułości w diagnostyce alergologicznej.

Cel pracy: Celem niniejszej pracy było opracowanie metody preparacji enolazy z *Alternaria alternata* oraz zbadanie podstawowych właściwości biochemicznych oczyszczonego enzymu.

Materiał i metody: Szczep *Alternaria alternata* izolowany ze środowiska hodowano na pożywce Sabourauda z 4% glukozą. Komórki grzybów rozbijano mechanicznie w młynku Brauna. Ekstrakt uzyskany ze zdeintegrowanych komórek frakcjonowano $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, a następnie rozdzielano chromatograficznie na kolumnach, wypełnionych złożami DEAE-Sephadex A-50 i CM-Sephadex C-50.

Wyniki: Przeprowadzono badania nad wpływem czasu trwania hodowli *Alternaria alternata* na poziom aktywności enolazowej w ekstrakcie komórkowym. Wykazano, że dla celów preparatywnych najefektywniejsza jest hodowla 28-dniowa. Opracowano metodę oczyszczania enolazy z *Alternaria alternata*, pozwalającą na uzyskiwanie wysokooczyszczzonego białka. Określono właściwości molekularne i kinetyczne oczyszczonego enzymu. Wyznaczono masę cząsteczkową podjednostki enolazy $M_w=47$ kDa i optimum pH=6,8. Wykazano wysoką termostabilność enzymu, pozwalającą na zachowanie 50% aktywności po jednogodzinnej inkubacji w 50°C. Zbadano stałe kinetyczne K_m i V_{max} dla reakcji 2-PGA→PEP ($K_m=0,36$ mM; $V_{max}=4$ mmol min⁻¹ pmol⁻¹).

Wnioski: Opracowana metoda izolacji i oczyszczania enolazy z *Alternaria alternata* pozwala na uzyskiwanie wysokooczyszczzonego białka. Właściwości biochemiczne oczyszczonego enzymu wskazują na jego znaczne molekularne podobieństwo do enolazy z *Saccharomyces cerevisiae* i *Candida albicans*, co może stanowić przyczynę występowania krzyżowych reakcji między tymi gatunkami grzybów.

Słowa kluczowe: *Alternaria alternata*, enolaza, alergologia

Abstract

Introduction: Enolase, an enzyme of the glycolytic pathway, is known as a main allergen of fungi and moulds. Obtaining the highly purified preparations of enolase from various fungi species would help to increase the specificity and sensitivity of diagnostic tests in allergology.

Objective: The aim of this paper was to work out the strategy for purification of enolase from *A. alternata* and to investigate basic biochemical properties of the purified enzyme.

Material and methods: *A. alternata* strain, isolated from environment, was cultured in Sabourauds medium with 4% glucose. Fungi cells were fragmented mechanically with Braun's mill. The resulting extract, obtained from disintegrated cells, was subjected to ammonium sulphate fractionation and separated on DEAE-Sephadex A-50 and CM-Sephadex C-50 ion-exchange chromatographic columns.

Results: Studies on the influence of the incubation time of *A. alternata* culture on the enolase activity in the cell extract were conducted. It was shown that for preparatory purposes, 28-days culturing is the most effective one. The purification procedure of enolase from *A. alternata*, resulting in a highly purified protein, was devised. The molecular and kinetic properties of purified enzyme were established. The molecular weight of 47 kDa and optimal pH of 6.8 were determined. The enzyme was shown to possess high thermostability allowing to remain 50% of activity after one hour incubation at 50°C. Kinetic constants for 2-PGA→PEP reaction were estimated ($K_m=0,36$ mM; $V_{max}=4$ mmol min⁻¹ μmol⁻¹).

Conclusions: The method of isolation and purification of enolase from *A. alternata* described in this paper leads to a highly purified protein. Biochemical properties of the purified enzyme indicate high molecular similarity of this enzyme to the enolases from *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*, which can possibly be the reason why cross-reactions between this fungi species occur.

Key words: *Alternaria alternata*, enolase, allergy

Wstęp

Grzyby z rodzaju *Alternaria* zaliczane są do klasy *Deuteromyces* – sztucznej jednostki taksonomicznej, obejmującej grzyby o niekompletnym cyklu rozwojowym, u których nie zaobserwowano procesów płciowych. Rozmnażają się głównie bezpłciowo za pomocą zarodników konidialnych. *Alternaria* jest rodzajem kosmopolitycznym, skupiającym zarówno gatunki saprofityczne, spotykane w glebie, powietrzu, na obumarłych szczątkach roślin, czy na produktach żywnościowych, jak i pasożyty atakujące rośliny, zwierzęta i ludzi. Są to grzyby mezohigrofilne, o optimum termicznym około 20°C (1). *Alternaria* występuje głównie w klimacie cieplejszym, przy czym ilość zarodników w powietrzu wzrasta przy suchej i wietrznej pogodzie, a najwyższe ich stężenia notuje się latem i wczesną jesienią. W przypadku grzybów domowych o całorocznym zarodnikowaniu sama konstrukcja budynków może sprzyjać rozwojowi grzybów, np. *Alternaria* występuje częściej w domach ocieplanych wełną mineralną (2). Pasożytnicze grzyby z rodzaju *Alternaria* są często izolowane ze zmian skórnych o klinicznym obrazie grzybicy, jednak tylko w nielicznych przypadkach są jedynymi grzybami stwierdzanymi w takich ogniskach. Zwykle towarzyszą one innym grzybom o uznanej patogenności. U osób z zaburzoną odpornością ogólną, czy przy sprzyjających warunkach miejscowych może dojść do rozwoju alternariozy (3). Z reguły grzyby patogenne, tzn. wywołujące grzybicę, nie są alergenami, chociaż istnieją wyjątki, które mogą w zależności od stanu immunologicznego człowieka być czynnikami inwazyjnymi lub alergizującymi. Jeśli wywołują infekcję grzybiczą o małej aktywności, szczególnie w organizmie z cechami atopii, to mogą stymulować wtórnie reakcje nadwrażliwości. Często w takich przypadkach kliniczne objawy alergii dominują nad objawami grzybicy. *Alternaria* należą do grzybów najczęściej odpowiedzialnych za alergię wziewną. Mogą być również przyczyną alergicznego zapalenia pęcherzyków płucnych – „płuco farmera”, „płuco pracownika przemysłu drzewnego” (2). Ważnym alergenem grzybów pleśniowych jest enzym szlaku glikolitycznego enolaza (4, 5). Jest to białko wysoce konserwatywne i badania porównawcze DNA wykazały 80% homologicznych sekwencji genów enolaz z *Alternaria alternata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cladosporium herbarum* i *Candida albicans* (6). Do tej pory wyizolowano i przebadano enolazę tylko z 2 gatunków grzybów – *Saccharomyces cerevisiae* (7, 8) i *Candida albicans* (9). Metodę preparacji enolazy z *Candida albicans* opracowano i opatentowano w naszym zespole badawczym (9, 10). Celem niniejszej pracy było oczyszczenie enolazy z *Alternaria alternata*, określenie jej właściwości biochemicznych oraz porównanie ich z cechami enzymów uzyskanych z innych źródeł. Sądzymy, że szczegółowe badania molekularne nad strukturą alergenów, a także zastosowanie w testach wysookooczyszczonych preparatów, zamiast będących obecnie w użyciu mieszanek, pozwoli na zwiększenie czułości i specyficzności diagnostycznej.

Materiał i metody

Warunki hodowli: Środowiskowe szczepy *Alternaria alternata* hodowano w wytrząsanej płynnej pożywce Sabourauda (4% glukoza, 1% pepton, 0,5% NaCl) w 37°C. Hodowlę przerywano po upływie 7, 14, 21 i 28 dni. Ko-

mórki odwirowywano przy 5000 obrotów/min. przez 20 min., w 4°C, po czym dwukrotnie przepłukiwano wodą, w celu usunięcia składników pożywki.

Dezintegracja komórek: Komórki rozbijano w młynku Brauna przy użyciu kulek szklanych o średnicy 0,5 mm (Merck). Zawiesina składała się z 8 g kulek szklanych, 12 ml wody i 5 g komórek *A. alternata*. Wnętrze młynka chłodzono ciekłym CO₂. Całkowity czas dezintegracji różnił się dla hodowli w różnym wieku i wynosił 24-48 min, w 6-12 seriach po 4 min. Stopień destrukcji komórek kontrolowano za pomocą mikroskopu świetlnego. Surowy ekstrakt oddzielano od pozostałości ścian komórkowych i kulek szklanych przez wirowanie przy 40 000 obrotów/min, w czasie 20 min, w 4°C.

Wyznaczanie profilu wysalania (NH₄)₂SO₄: Surowy ekstrakt wysalano nasyconym roztworem (NH₄)₂SO₄ o pH 7,0, doprowadzając kolejno do 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% wysycenia. Osady odwirowywano przy 40 000 obrotów/min przez 20 min, w 4°C. Do supernatantów dodawano nasyconego roztworu (NH₄)₂SO₄, do uzyskania kolejnego stopnia wysycenia. Osady białek rozpuszczano w 5 mM buforze Tris/HCl o pH 7,0 i dializowano przez noc do tego samego buforu, w 4°C. W odsolonych próbach badano stężenie białka i aktywność enolazową.

Frakcjonowanie (NH₄)₂SO₄ i chromatografia: Surowy ekstrakt doprowadzano do 40% wysolenia nasyconym roztworem (NH₄)₂SO₄ o pH 7,0. Po odwirowaniu przy 40 000 g, przez 20 min, w 4°C, supernatant doprowadzano do 60% wysycenia (NH₄)₂SO₄, po czym ponownie odwirowywano przy 40 000 g, przez 20 min, w 4°C i powstały supernatant odrzucano. Osad białek rozpuszczano w 10 mM buforze Tris/HCl o pH 9,0, zawierającym 5 mM MgSO₄, 1 mM EDTA (wersenian dwusodowy), 1 mM 2-mercaptoetanolu i dializowano przez noc do tego samego buforu, w 4°C. Dializat наносzono na kolumnę o średnicy 1 cm, długości 15 cm (Pharmacia), wypełnioną żelą DEAE-Sephadex A-50, zrównoważonym 10 mM buforem Tris/HCl o pH 9,0, zawierającym 5 mM MgSO₄, 1 mM EDTA, 1 mM 2-mercaptoetanol. Białka eluowano liniowym gradientem stężenia NaCl (0-0,5 M). Prędkość przepływu wynosiła 8 ml/godz. Frakcje o aktywności enolazowej zbierano, zagęszczano przez odparowanie wody w warunkach obniżonego ciśnienia, po czym dializowano przez noc do 15 mM buforu NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ o pH 6,2, zawierającego 3 mM MgSO₄. Dializat наносzono na kolumnę o średnicy 1 cm, długości 15 cm (Pharmacia), wypełnioną żelą CM-Sephadex C-50, zrównoważonym 15 mM buforem NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ o pH 6,2, zawierającym 3 mM MgSO₄. Białka eluowano z kolumny tym samym buforem. Prędkość przepływu wynosiła 8 ml/godz. Frakcje o aktywności enolazowej zbierano, zagęszczano przez odparowanie wody w warunkach obniżonego ciśnienia, po czym dializowano przez noc do 0,05% wodnego roztworu MgSO₄. Do zagęszczonego roztworu enolazy dodawano NaN₃ w ilości nieprzekraczającej 0,002% stężenia końcowego. Preparat był przechowywany w 4°C przez wiele tygodni bez zauważalnej utraty aktywności.

Elektroforeza: Elektroforezę prowadzono w układzie Laemmli'ego (11), stosując 4% żel zagęszczający oraz 10% żel rozdzielający w 0,2 M buforze Tris/glicyna o pH 8,3 z 0,1 % SDS (siarczan dodecylu sodu). Dysocjację i redukcję białek przeprowadzano w buforze do denaturacji (50 mM Tris/HCl o pH 6,8, zawierającym 12,5% SDS, 25% 2-merkaptoeta-

nol, 20% glicerol) przez 10 min w temp. 100°C. Na żel nanoszono próbki, zawierające 10-40 µg białka.

Wybarwianie żeli: Żele utrwalano w roztworze 10% $\text{CH}_3\text{COOH}/30\% \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, przez 30 min, po czym umieszczano je na 30 min w 0,1 M buforze octanowym o pH 6,0, zawierającym 0,1% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ i 30% metanol. Następnie żele przepłukiwano kilkakrotnie wodą dejonizowaną i inkubowano przez 25 min w roztworze 0,1% AgNO_3 z 0,4% formaldehydem. Barwę wywoływano w roztworze 2,5% Na_2CO_3 z 0,2% formaldehydem. Reakcję przerywano stężonym kwasem octowym.

Wyznaczanie masy cząsteczkowej: Masę cząsteczkową wyznaczano elektroforetycznie w układzie Laemmli'ego. Używano następujących markerów wagowych (Serva): cytochrom C (12,3 kDa), mioglobina (17,8 kDa), chymotrypsynogen A (25,0 kDa), albumina z jaja kurzego (45,5 kDa), albumina wołowa (67,0 kDa), aldolaza z mięśni królika (160,0 kDa). Na żele nanoszono próbki, zawierające po 10 µg białka.

Oznaczanie stężenia białka: Stężenie białka oznaczano spektrofotometrycznie mierząc absorpcję przy długości fali 280 nm. Stężenie enzymu obliczano korzystając ze współczynnika 0,9 - wyznaczonego dla roztworu enolazy z mięśni królika o stężeniu 1 mg/ml.

Pomiar aktywności enzymatycznej enolazy: Aktywność enzymatyczną wyznaczano spektrofotometrycznie mierząc absorpcję powstałego produktu reakcji, którym jest fosfoenolopirogronian (PEP). Mieszanina reakcyjna zawierała substrat - 1 mM kwas 2-fosfoglicerynowy (2-PGA) w 0,05 M buforze imidazolowym o pH 6,8 z 0,4 M KCl i 3 mM MgSO_4 . Przebieg reakcji obserwowano mierząc zmiany ekstynkcji przy długości fali 240 nm w czasie 1 min od dodania enzymu, w temp. 30°C. Wzrost ekstynkcji w tych warunkach o 0,2 jednostki odpowiada przemianie 0,226 µmol substratu. Za jednostkę aktywności enzymatycznej enolazy przyjęto taką aktywność, która pozwalała na przereagowanie 1 µmol substratu w czasie 1 minuty.

Oznaczanie termostabilności enzymu: Próbkę enolazy o stężeniu 1 mg/ml w 0,05% MgSO_4 inkubowano w 50°C. Po upływie określonego czasu pobierano po 0,5 nmol białka do oznaczenia aktywności enzymatycznej. Kontrolę stanowiła próba o takim samym stężeniu inkubowana w temperaturze pokojowej.

Wyniki

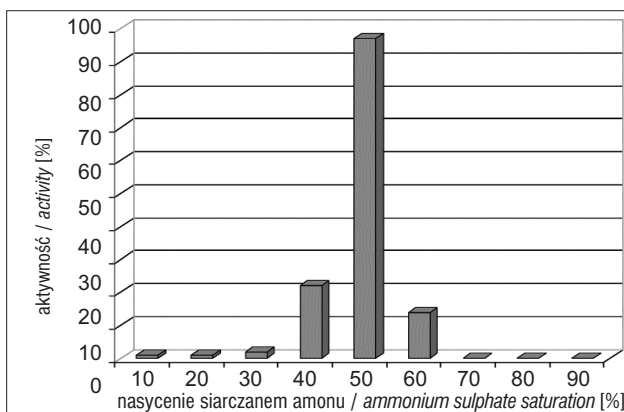
Opracowanie warunków hodowli: Badano wpływ czasu trwania hodowli na aktywność enolazy w wyciągu z rozbitych komórek grzybów. Szczepy *Alternaria alternata* hodowano w pożywce Sabourauda przez 7, 14, 21 lub 28 dni. Komórki oczyszczone od składników pożywki rozbijano mechanicznie w młynku Brauna, po czym izolowano z nich ekstrakt przez odwirowanie. W surowych ekstraktach badano stężenie białka i aktywność enzymatyczną enolazy. Porównanie uzyskanych wyników wykazało, że najwyższą aktywność właściwą enolazy zachowywał wyciąg z hodowli 28-dniowej (tabela I) i preparat ten wykorzystywano do dalszych badań.

Wyznaczanie profilu wysalania $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: Surowy ekstrakt z *A. alternata* wysalano nasyconym roztworem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ o pH 7,0, doprowadzając kolejno do 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 i 90% wysycenia. Osady białek odwirowywano, rozpuszczano w 5 mM buforze Tris/HCl o pH 7,0 i odsalano przez dializę. W otrzymanych próbkach

Tabela I: Aktywność właściwa enolazy w ekstraktach z hodowli *Alternaria alternata*

Table I: Specific activity of enolase in the crude extracts from *Alternaria alternata* cultures

Czas prowadzenia hodowli <i>Alternaria alternata</i> Culturing time	Aktywność właściwa enolazy w surowym ekstrakcie Specific enolase activity in a crude extract
7 dni / days	0 j.a. / mg
14 dni / days	0,026 j.a. / mg
21 dni / days	0,0342 j.a. / mg
28 dni / days	1,03 j.a. / mg



Ryc. 1. Profil wysalania nasyconym roztworem siarczanu amonu enolazy z *Alternaria alternata*

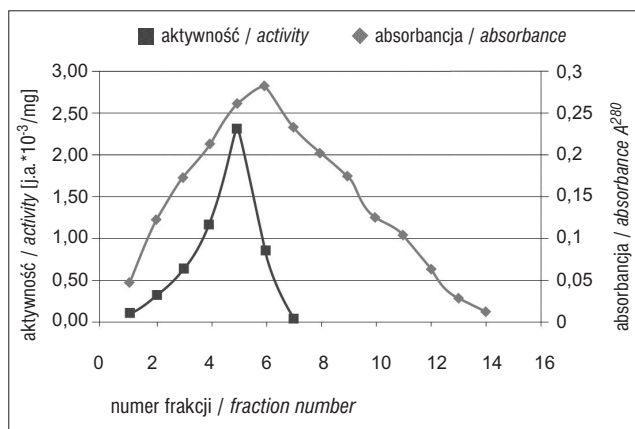
Fig. 1. Ammonium sulphate fractionation profile of enolase from *Alternaria alternata*

badano stężenie białka i aktywność enolazową. Sporządzono profil wysalania przedstawiający aktywność właściwą enolazy we frakcjach o różnym stopniu wysycenia siarczanem amonu (ryc. 1). Najwyższą aktywność enolazową zachowywał preparat o 40-60% wysycenia siarczanem amonu i był on użyty do dalszych badań.

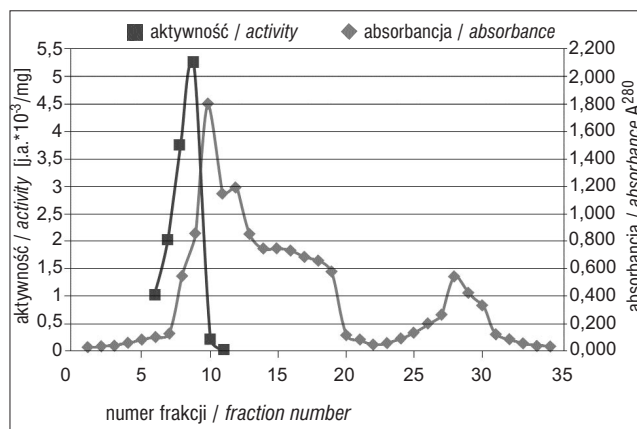
Preparacja enolazy z *Alternaria alternata*: Ekstrakt komórkowy z *Alternaria alternata* poddawano procedurze opisanej w rozdziale „Materiał i metody”. Złóże DEAE-Sephadex A-50 adsorbowało enolazę, którą następnie eluowano z kolumny liniowym gradientem NaCl. Frakcje o aktywności enolazowej, tworzące wyraźny, ostry szczyt zbierano poza głównym szczytem białkowym (ryc. 2). Frakcje o wysokiej aktywności łączono, zagęszczano, dializowano i nanoszono na złóże CM-Sephadex C-50 o pH 6,2. Część białek została zaadsorbowana przez wypełnienie kolumny, jednak enolaza nie wiązała się z wymienniczym i wymywano ją buforem równoważącym (ryc. 3). Frakcje o aktywności enolazowej zebrane poza głównym szczytem białkowym były czyste elektroforetycznie (ryc. 4) i zawierały w nich białko było przedmiotem dalszych badań.

Wyznaczanie ciężaru podjednostkowego enolazy: Masę podjednostkową enolazy wyznaczono metodą elektroforetyczną zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale Materiał i metody i wynosiła ona 45 kDa (ryc. 5).

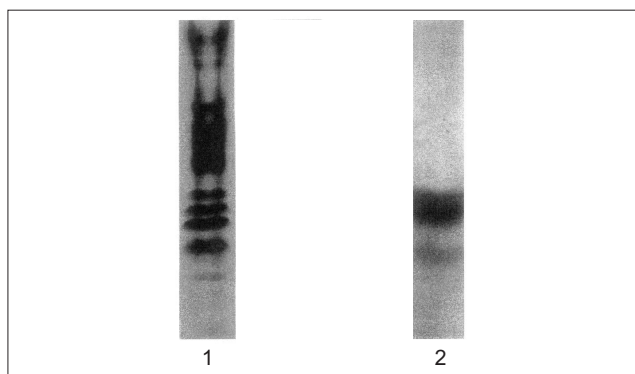
Termostabilność enzymu: Enolaza wykazuje wysoką termostabilność. Po 20 min. inkubacji w temperaturze 50°C enzym traci 30% aktywności początkowej. Jednogodzinna inkubacja w 50°C przyczynia się do spadku aktywności o 50%, natomiast po dwugodzinnej inkubacji enzym wykazuje 30% aktywności początkowej. Dalsza inkubacja nie wpływa w znaczącym stopniu na spadek aktywności (ryc. 6).



Ryc. 2. Chromatografia na DEAE-Sephadex A-50. Profil elucji enolazy z kolumny
Fig. 2. DEAE-Sephadex A-50 chromatography. Enolase elution profile

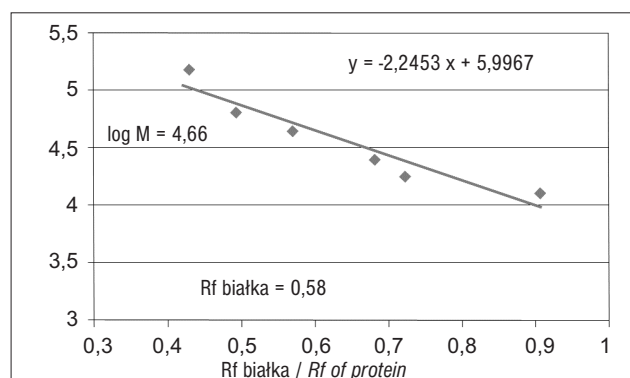


Ryc. 3. Chromatografia na CM-Sephadex C-50. Profil elucji enolazy z kolumny
Fig. 3. CM-Sephadex C-50 chromatography. Enolase elution profile



Ryc. 4. Elektroforogram oczyszczonej enolazy z *Alternaria alternata*. [1] surowy ekstrakt (40 µg), [2] oczyszczona enolaza (20 µg)

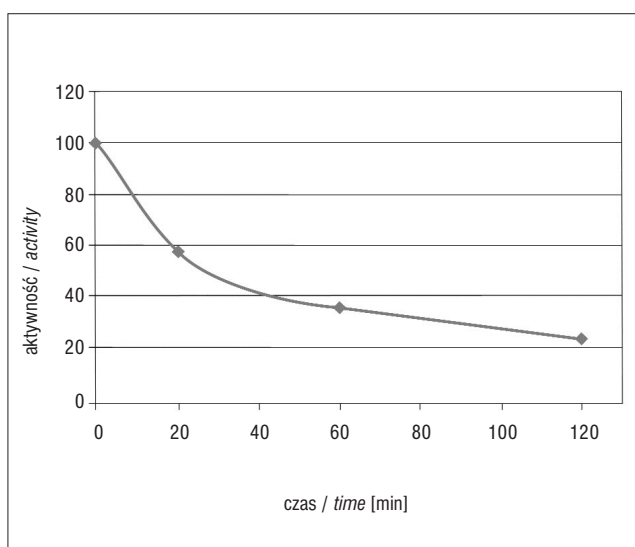
Fig. 4. SDS-PAGE pattern of purified enolase from *Alternaria alternata*. [1] crude extract (40 µg), [2] purified enolase (20 µg)



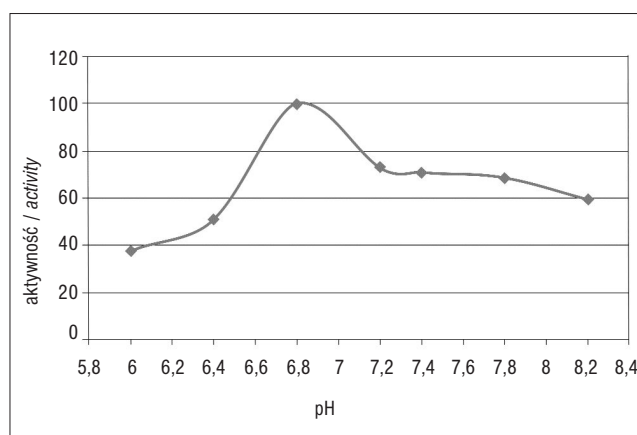
Standardy mas cząsteczkowych (Da): cytochrom C (12,300), mioglobina (17,800), chymotrypsynogen A (25,000), albumina z jaja kurzego (45,000), albumina wołowa (67,000), aldolaza z mięśni królika (160,000)
Molecular weight standards (Da): cytochrome C (12.300), myoglobin (17.800), chymotrypsinogen A (25.000), albumin-egg (45.000), bovine albumin (67.000), rabbit muscle aldolase (160.000)

Ryc. 5. Wyznaczanie masy cząsteczkowej monomeru enolazy metodą elektroforetyczną

Fig. 5. Molecular weight estimation of enolase monomer by electrophoretic method



Ryc. 6. Termostabilność enolazy inkubowanej w temp. 50° C
Fig. 6. Thermostability of enolase incubated at 50° C



Ryc. 7. Profil aktywności enolazy w zależności od pH
Fig. 7. pH profile of enolase activity

Wyznaczanie optimum pH enolazy z *Alternaria alternata*: Zależność aktywności enolazy od pH środowiska reakcji enzymatycznej badano w zakresie pH od 6,0 do 8,4; w 0,05 mM buforze zawierającym 0,4 M KCl, 3

mM $MgSO_4$ oraz 1 mM 2-PGA. Reakcję rozpoczynano dodając 0,05 nmol enzymu do 1,5 ml buforu. Optimum pH enolazy z *Alternaria alternata* wynosi 6,8. Profil zależności aktywności enzymu od pH nie jest symetryczny.

W zakresie niższych wartości pH (poniżej 6,2) aktywność katalityczna wynosi około 30% aktywności maksymalnej, podczas gdy dla wyższych wartości pH (powyżej 7,2) aktywność enzymu spada do 60% aktywności maksymalnej i w przybliżeniu pozostaje stała (ryc. 7).

Stałe Michaelisa-Menten dla kwasu 2-fosfoglicerynowego: Stałe K_m i V_{max} dla kwasu 2-fosfoglicerynowego wyznaczono metodą Lineweavera-Burka na podstawie wyników pomiaru początkowej szybkości reakcji katalizowanej przez enolazę. W mieszaninie reakcyjnej zawierającej 0,05 mM bufor imidazolowy o pH 6,8 z 0,4 M KCl i 3 mM $MgSO_4$, zmieniano stężenie kwasu 2-fosfoglicerynowego w zakresie $0,3^{-1}$ mM. Każdorazowo do roztworu dodawano po 0,05 nmol enzymu. Parametry kinetyczne enolazy z *Alternaria alternata* dla substratu - kwasu 2-fosfoglicerynowego - wynoszą: $K_m=0,36$ mM i $V_{max}=4$ mmol substratu $min^{-1} \times \mu mol$ enzymu $^{-1}$.

Omówienie

Porównanie właściwości enolaz uzyskanych z różnych gatunków grzybów potwierdza wysoki konserwatyzm ewolucyjny tego białka. Masa podjednostkowa enolazy z *Alternaria alternata* wynosi 45 kDa, podczas gdy dla enzymu z *Saccharomyces cerevisiae* $M_w=46,691$ kDa, a z *Candida albicans* $M_w=46$ kDa (8, 9). Enolaza jest białkiem szoku termicznego, co tłumaczy jej znaczną termostabilność, obserwowaną w przypadku enzymów izolowanych ze wszystkich źródeł. Dla enolazy z *Alternaria alternata* optimum pH wynosi 6,8 i jest identyczne jak dla enzymu z *Candida albicans*. Wszystkie enolazy wykazują podobny, asymetryczny przebieg wykresu zależności aktywności enzymatycznej od pH, aktywność rośnie szybciej w wartościach pH poniżej optimum, a maleje łagodniej powyżej optimum (12). Stałe kinetyczne K_m i V_{max} są dla grzybowych enolaz również zbliżone. Dla enzymu z *Alternaria alternata* $K_m=0,36$ mM, a $V_{max}=4$ mmol substratu $min^{-1} \mu mol$ enzymu $^{-1}$. Enolaza z *Candida albicans* posiada $K_m=0,38$ mM, a $V_{max}=4,2$ mmol substratu $min^{-1} \mu mol$ enzymu $^{-1}$. Enzym z *Saccharomyces cerevisiae* ma $K_m=0,12$ mM (13). Podobieństwo strukturalne i funkcjonalne enolaz leży być może u podstawy zjawiska występowania krzyżowych reakcji między badanymi gatunkami grzybów. Ostatnie doniesienia Wagnera i wsp. rozszerzają opisane prawidłowości na enolazę z żywicy drzewa lateksowego *Hevea latex*, z czego autorzy wyciągają wniosek, że enolazy są kolejną poznaną klasą wysoce konserwatywnych enzymów o aktywności alergenowej (14, 15).

Wnioski

1. Stwierdzono, że najwyższą aktywność enzymatyczną enolazy wykazuje wyciąg z 28-dniowej hodowli *Alternaria alternata*.

2. Sporządzono profil wysalania $(NH_4)_2SO_4$ i wykazano, że najwyższą aktywność enolazową zachowywał preparat o 40-60% wysycenia siarczanem amonu.

3. Opracowano metodę preparacji enolazy z *Alternaria alternata*, obejmującą następujące etapy:

- hodowla *Alternaria alternata* w płynnej pożywce Sabourauda (4% glukoza, 1% pepton, 0,5% NaCl), w 37°C, przez 28 dni,

- dezintegracja komórek grzybów w młynku Brauna przy użyciu kulek szklanych,

- frakcjonowanie surowego wyciągu z rozbitych komórek w zakresie 40-60% $(NH_4)_2SO_4$,

- chromatografia jonowymienna na kolumnie, wypełnionej DEAE-Sephadex A-50,

- rechromatografia jonowymienna na kolumnie, wypełnionej CM-Sephadex C-50.

4. Wyznaczono masę podjednostkową oczyszczonego enzymu, $M_w=45$ kDa.

5. Wykazano wysoką termostabilność enolazy, która po jednogodzinnej inkubacji w temperaturze 50°C zachowuje 50% aktywności początkowej.

6. Określono optimum pH enolazy = 6,8.

7. Zbadano dla reakcji 2-PGA→PEP stałe kinetyczne: $K_m=0,36$ mM i $V_{max}=4$ mmol substratu $min^{-1} \mu mol$ enzymu $^{-1}$.

Podziękowania

Dziękujemy serdecznie pani dr Urszuli Nawrot z Katedry i Zakładu Mikrobiologii Akademii Medycznej we Wrocławiu, która udostępniła nam hodowle *Alternaria alternata*.

Piśmiennictwo

1. Podbielkowski Z., Rejment-Grochowska L., Skirgiełło A.: *Rośliny zarodnikowe*. PWN, Warszawa, 1979, 491-495.
2. Bogacka E.: *Grzyby jako alergeny*. [w:] *Zarys Mikologii Lekarskiej*. red. E. Baran, Volumed, Wrocław, 1998, 505-529.
3. Baran E.: *Drożdźce skóry i błon śluzowych*. [w:] *Zarys Mikologii Lekarskiej*. red. E. Baran, Volumed, Wrocław, 1998, 329-350.
4. Baldo B.A.: *Allergenic crossreactivity of fungi with emphasis on yeast strategies for further study*. Clin. Exp. Allergy, 1995, 25, 488-492.
5. Nittner-Marszalska M., Kustrzeba-Wójcicka L., Bogacka E., Patkowski J., Dobek R.: *Skin prick test response to enzyme enolase of baker's yeast (Saccharomyces cerevisiae) in diagnosis of respiratory allergy*. Med. Sci. Monit., 2001, 7, 121-124.
6. Breitenbach M., Simon B., Probst G., Oberkofler H., Ferreira F., Briza P., Achatz G., Unger A., Ebner C., Kraft D., Hirschwehr R.: *Enolase are highly conserved fungal allergens*. Int. Arch. Allergy Immunol., 1997, 113, 114-117.
7. Lee B.H., Nowak T.: *Influence of pH on the Mn^{2+} activation of the binding to yeast enolase: a functional study*. Biochemistry., 1992, 31, 2165-2171.
8. Lee M.E., Nowak T.: *Metal ion specificity at the catalytic site of yeast enolase*. Biochemistry. 1992, 31, 2172-2180.
9. Kustrzeba-Wójcicka L., Golczak M.: *Enolase from Candida albicans - purification and characterization*. Comp. Biochem. Physiol., 2000, 126 (B), 109-120.
10. Kustrzeba-Wójcicka L.: *Sposób otrzymywania enolazy z Candida albicans*. Biuletyn Urzędu Patentowego RP, Nr 3/2001, P-334596.
11. Laemmli U.K.: *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970, 227, 680-685.
12. Vinarov D.A., Nowak T.: *pH dependence of the reaction catalysed by yeast Mg - enolase*. Biochemistry, 1998, 37, 15238-15246.
13. Wold F.: *Enolase*. [w:] *The Enzymes*. red. P.D. Boyer, Academic Press, New York, 1971, 5, 499-538.
14. Wagner S., Breiteneder H., Simon-Nobbe B., Susani M., Krebitz M., Niggemann B., Brehler R., Scheiner O., Hoffmann-Sommergruber K.: *Hev b 9, an enolase and a new cross-reactive allergen from hevea latex and molds purification, characterization, cloning and expression*. Eur. J. Biochem., 2000, 267, 7006-70014.
15. Tracy M.R., Hedges S.B.: *Evolutionary history of the enolase gene family*. Gene, 2000, 259, 129-138.

Adres do korespondencji:

Dr Irena Kustrzeba-Wójcicka
Katedra i Zakład Biochemii Lekarskiej AM
ul. Chałubińskiego 10
50-368 Wrocław
tel. (071) 784 13 84
fax (071) 784 01 17

Praca wpłynęła do Redakcji: 15 maja 2001 r.
Zaakceptowano do druku: 29 lipca 2001 r.