



**A nagyhatékonyságú-folyadékkromatográfia alkalmazása
szénhidrátkémiai és szénhidrát-biokémiai kutatásokban**

doktori (PhD) értekezés

Gyémánt Gyöngyi

**Debreceni Egyetem, TTK
Biokémiai Tanszék
Debrecen, 2001.**

Tartalom

I. Bevezetés	1
II. Irodalmi áttekintés	2
II.1. HPLC alkalmazása szénhidrátok elválasztására	2
II.1.1. Fordított fázisú kromatográfia alkalmazása szénhidrátok elválasztására	6
II.1.1.1. Állófázis	6
II.1.1.2. Mozgó fázis , alkalmazások	7
II.1.2. HILIC alkalmazása szénhidrátok elválasztására	8
II.1.2.1. Állófázisok	8
II.1.2.2. Mozgó fázis , alkalmazások	9
II.2. α-Amiláz enzimek vizsgálatának előzményei	12
II.2.1. Szerkezeti sajátosságok	14
II.2.2. Termostabilitás és pH stabilitás, pH függés	18
II.2.3. Humán nyál eredetű α -amiláz (HSA)	19
II.2.4. <i>Bacillus licheniformis</i> által termelt hőűrő α -amiláz (BLA)	21
III. Saját vizsgálatok	24
III.1. Szintetikus munkához kapcsolódó elválasztások	24
III.1.1. Preparatív elválasztások	25
III.1.1.1. Szialil LewisX analógok szintézise	26
III.1.1.2. <i>Mycobacterium avium</i> sejtfelszíni antigénjei	28
III.1.1.3. N-glikoprotein antennák törzs oligoszacharidjának szintézise	31
III.1.1.4. <i>Shistosoma mansoni</i> fertőzés kimutatása	34
III.1.1.5. Mesterséges vakcina kifejlesztése <i>Shigella sonnei</i> fertőzés ellen	36
III.1.1.6. Maltooligoszacharid szubsztrátok előállítása	41
III.1.2. Analitikai elválasztások	44
III.1.2.1. Metil glikozidok előállítása	44
III.1.2.2. Maltooligoszacharid szubsztrátok elválasztása	50
III.2. α-Amiláz enzimek vizsgálata	63
III.2.1. α-Amiláz szubsztrátok előállítása kemoenzimatis módszerrel	64
III.2.1.1. 4-6 tagszámú szubsztrátok előállítása foszforolízissel	66
III.2.1.2. 8-11 tagszámú szubsztrátok előállítása transzglikozilezéssel	71
III.2.2. Humán nyál α-amiláz aktív centrumának vizsgálata	80
III.2.3. <i>Bacillus licheniformis</i> α-amiláz szubsztrát kötőhelyének vizsgálata	88

IV. Kísérleti rész	95
IV.1. Felhasznált anyagok	95
IV.2. Általános módszerek	95
IV.3. Vizsgálatok és szintézisek leírása	96
IV.4. Kötőhely térkép (subsite map) számítása	98
V. Összefoglalás	101
VI. Irodalom	108
VII. Publikációs lista	115

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Dr. Kiss László tanszékvezetőnek, hogy a dolgozat megírását a Biokémiai Tanszéken lehetővé tette.

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Lipták András professzornak, aki annak idején a Tanszékre hívott, munkámat mindvégig figyelemmel kísérte, tanácsaival támogatta és a dolgozat megírására buzdított.

Külön köszönet illeti Dr. Kandra Lilit, témavezetőmet, közvetlen munkatársamat, aki megismertette és megszerettette velem az enzimekkel való munkát, és így a kromatográfia mellett egy másik érdekes és változatos világra nyitott kaput. Hálás vagyok a közlemények és a dolgozat megírásához nyújtott kritikai segítségéért, valamint az eredményes munkát nagyban elősegítő nyílt, baráti légkörért is.

Köszönöm valamennyi kollegámnak, hogy a szénhidrátok körében való eligazodásomat segítették és bizalmukkal, elvárásaikkal többre ösztönöztek.

Köszönöm családomnak, férjemnek és gyermekeimnek, hogy elviselték a dolgozat írásának hónapjait. Segítségük és türelmük nélkül ez a dolgozat nem készült volna el.

Rövidítések

Ac	acetyl csoport
Arg	arginin
Asp	aszparaginsav
Asn	aszparagin
BAA	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> α -amiláz
BLA	<i>Bacillus licheniformis</i> α -amiláz
Bnl	benzilidén csoport
Bzl	benzil csoport
C18	oktadecil-szilika (állófázis)
CA	klóracetyl csoport
CD	ciklodextrin
CGT-áz	ciklodextrin glikoziltranszferáz
CNP	2-klór-4-nitrofenil csoport
DAD	diódasoros detektor
DKM	diklórmétán
DP	polimerizációfok
EtOH	etanol
EtOAc	etilacetát
G	glükóz egység
Gal	galaktóz
GC	gázkromatográfia
Glc	glükóz
Glu	glutaminsav
HILIC	hidrofil kölcsönhatás kromatográfia
His	hisztidin
HPA	humán pankreász α -amiláz
HPLC	nagyhatékonyságú-folyadékkromatográfia
HSA	humán nyál α -amiláz
MALDI-TOF MS	matrix assisted laser desorption ionisation time of flight tömegspektrometria
Me	metil csoport
MeCN	acetonitril
MeOH	metanol
NH ₂	aminopropil szilika (állófázis)
NMR	mágneses magrezonancia spektroszkópia
PhCH	benzilidén csoport
PNP	4-nitrofenil csoport
PPA	sértés pankreász α -amiláz
PSD	post source decay fragmentációs módszer
RID	refraktív index detektor
RP-HPLC	fordított fázisú HPLC
SEC	méret kizárási kromatográfia
TCA	triklór-acetyl csoport
TCP	tetraklórfenil csoport
THF	tetrahidrofurán
UV	ultraibolya
VIS	látható
VRK	vékonyréteg-kromatográfia

I. Bevezetés

A szénhidrátok és glikokonjugátumok fontos biológiai szerepe régóta ismert. A sejtek felszínén található glikokonjugátumok a sejt és környezete közötti információcsere antennái. Erre alkalmassá teszi őket rendkívüli változatosságuk. Jelenleg közel 250 természetben előforduló monoszacharid ismert, melyek kombinálódásával igen nagy számú különböző oligoszacharid jöhet létre. Az oligoszacharidok biológiai jelentőségének felismerése miatt kutatásuk intenzív fejlődésnek indult az elmúlt néhány évtizedben. Az ezen a területen folyó intenzív kutatások a szénhidrátok analitikájának fejlődését is kiváltották, így az elmúlt évtizedekben a nagynyomású folyadékkromatográfia (HPLC) vált a legfontosabb módszerré a szénhidrátok kinyerésében és meghatározásában egyaránt.

1994-ben kapcsolódtam be a Biokémiai Tanszéken folyó szénhidrátkémiai-biokémiai kutatásokba. Feladatomban volt a tanszék kromatográfias laboratóriumában rendelkezésre álló folyadék- és gázkromatográfok segítségével az szintetikus kémiai és enzimológiai kutatások elválasztástechnikai hátterének biztosítása. A szintézisek követésén, termékarányok meghatározásán kívül a végtermékek félpreatatív méretű elválasztása, tisztítása is gyakran igényli a HPLC nyújtotta nagy felbontóképességet. α -Amiláz enzimek aktív centrumának tanulmányozása kromofor csoportot tartalmazó szubsztrát sorozatok segítségével régóta futó kutatási téma a tanszéken. A termékanalízis elképzelhetetlen HPLC technika nélkül, hiszen az enzim működésének eredményeként összetett termékelegyek képződnek. A termékek egymástól és a szubsztráttól való elválasztása, mennyiségi arányaik megadása csak HPLC segítségével valósítható meg.

A dolgozat fejezeteit a kutatási cél eléréséhez alkalmazott módszer, a HPLC fűzi össze. A szintetikus munkához kapcsolódó elválasztások esetén a cél a szintetikus célkitűzések elérésének elősegítése volt a preatatív vagy analitikai kromatográfia eszközeivel. A bemutatott elválasztások válogatást jelentenek a megoldott feladatok köréből, demonstrálandó a felmerülő feladatok változatosságát. Az α -amiláz enzimek vizsgálatával célunk egy humán diagnosztikai és egy ipari jelentőségű enzim (humán nyál és *Bacillus licheniformis* α -amiláz) aktív centrumának feltérképezése volt. Ehhez a különböző tagszámú maltooligoszacharid szubsztrátok hidrolízis termékeinek HPLC-vel történő termékanalízisét használtuk eszközül.

II. Irodalmi áttekintés

II. 1. HPLC alkalmazása szénhidrátok elválasztására

A kémia két fő területe a szintézis és az analízis. A két terület szorosan összefügg egymással, a szintézis nem képzelhető el analízis nélkül. A modern analitikai kémia definíciója az Európai Kémikus Egyesületek Szövetségének Analitikai Munkacsoportja (FECS/WPAC) 1993-ban elfogadott definíciója szerint: "Az analitikai kémia az a tudományág, amely módszereket, műszereket és stratégiákat dolgoz ki és alkalmaz, hogy információhoz jussunk az anyag összetételéről térben és időben." Az analitika szoros kölcsönhatásban van valamennyi természettudománnyal, valamint a műszeres analitika területén a technikai és mérnöki tudományágakkal is. A felmerülő feladatok megfelelő megoldása speciális gondolkodásmódot és a használt analitikai módszer alapos, naprakész ismeretén kívül az eredményeket felhasználó tudományterület (szerves kémia, biokémia, farmakológia stb.) megfelelő szintű ismeretét igényli¹.

Ha a rendelkezésünkre álló analitikai módszer nem specifikus és/vagy a vizsgálandó minta több komponensből áll, akkor a mérés előtt elválasztásra is szükség van. Az elválasztási eljárások összessége az elválasztástechnika, melynek egyik széles körben elterjedten használt képviselője a kromatográfia. A kromatográfiás eljárásokat is alapvetően két csoportba sorolhatjuk az elválasztás célja szerint:

- Preparatív kromatográfia: a cél az elválasztás, a detektálás ebben csak segédeszköz. Szigorúbb feltételeket támaszt az elválasztás oldaláról mint a detektálásról. Nem igényel sem specifikus, sem érzékeny detektort. Eszerint a megfogalmazás szerint ide kell sorolni a néhány mg biológiailag aktív komponens kinyerését valamilyen természetes mátrixból, a szerkezetvizsgálatra elegendő mennyiségű szintézis termék tisztítását éppúgy mint a kg méretben történő ipari alkalmazásokat.
- Analitikai kromatográfia: a detektálás, vagyis a mérés a cél, ehhez használjuk segédeszközként az elválasztást. Ebben az esetben az elválasztással szemben támasztott követelmények nem olyan szigorúak, hiszen a részlegesen (nem alapvonaltól) elválasztott komponensek mennyisége is elég pontosan meghatározható. A detektor kiválasztása viszont kritikus lehet, hiszen eldöntheti a mérés jóságát (érzékenység, szelektivitás). Ennek a csoportosításnak megfelelően a preparatív kromatográfia inkább a szintézishez tartozik, és így a dolgozatomban bemutatott félpreatatív elválasztások is a szénhidrátok szintézisének egyik lépését jelentik.

Az analitikai módszer kidolgozása minden esetben az elválasztani kívánt komponensek kémiai szerkezetének és az abból következő fizikai tulajdonságainak ismeretében kezdhető el. Szintézisek termékeinek vizsgálata esetén ez viszonylag egyszerű a biológiai mintákkal összevetve, hiszen ismert a reagensek és az előállítani kívánt termék szerkezete és az esetleges melléktermékek szerkezete is elég jól behatárolható. A megfelelő módszer kiválasztásához a következő szempontok szerint kell értékelni a mintát:

1. Kémiai szerkezet: molekulaméret, reakcióképes funkciós csoportok, ionizálható csoportok, termikus stabilitás.
2. Fizikai tulajdonságok: halmazállapot, illékonyság, oldhatóság, jellegzetes színekép (UV/VIS).

3. Az elválasztandó komponensek: szerkezeti hasonlósága/különbsége, izomerek (királis/szerkezeti) mennyiségi arányai, minta mátrixa.

Ezen szempontok szerint eldönthető alkalmas-e a folyadékkromatográfia az adott feladat elvégzésére, illetve a folyadékkromatográfia-e a legalkalmasabb ehhez a feladathoz. A folyadékkromatográfiát akkor választjuk ha:

- a minta nem illékony, nem termostabil, megfelelően detektálható,
- a VRK/oszlopkromatográfia nem elegendő szelektivitású, érzékenységu és pontosságú,
- HPLC áll rendelkezésre.

A mintakomponensek detektálására a folyadékkromatográfiában számos lehetőség van általános és szelektív detektorok segítségével. A megfelelő detektor kiválasztásához is figyelembe kell venni az elválasztás célját:

- analitikai vagy preparatív,
- el kell-e választani minden komponenst,
- fő komponenst vagy szennyezőt mérünk,
- igényelt pontosság,
- milyen detektor hozzáférhető.

A legutóbbi szempont gyakran döntő lehet a választásban, hiszen egy elválasztási feladat miatt ritkán vásárolunk új detektort. A két legáltalánosabban használt detektor a refraktív index és az UV detektor, illetve ennek legújabb generációs változata a diódasoros detektor. A refraktív index detektor a törésmutatót méri, és így valamennyi komponens megjelenik a kromatogramon. Hátránya viszont ennek a detektor típusnak, hogy csak izokratikus oldószer elegyekkel használható, alacsony az érzékenysége és pontos termosztálást igényel, mert a törésmutató erősen hőmérsékletfüggő². A diódasoros detektor az UV vagy látható tartományban elnyelő funkciós csoportot tartalmazó komponenseket képes detektálni. Előnye,

hogy több hullámhosszon lehet egyidejűleg detektálni a kromatogramot, valamint a komponensek spektruma is látható és tárolható, ami megkönnyítheti az azonosítást.

Fontos leszögezni, hogy a folyadékkromatográfiában a mozgó fázis részt vesz a szelektivitások és elválasztások kialakításában. Így nem egyszerűen az álló fázis és a minta komponensek polaritási viszonyai alakítják az elválasztást, hanem a mozgó fázis és az álló fázis, valamint a mozgó fázis és a minta egymáshoz való viszonya is. Napjainkban az álló fázisok számtalan fajtája hozzáférhető, a használható mozgó fázisok száma pedig szinte végtelen, hiszen azokat különböző oldószerek eltérő arányú elegyítésével, pufferekkel, pH és só koncentrációkkal lehet létrehozni. Ezek alapján megállapítható, hogy a folyadékkromatográfia a legvariábilisabb elválasztástechnikai módszer, ami az elválasztási mechanizmusokat illeti. Ezt a nagyfokú variálhatóságot azonban korlátozza a számunkra hozzáférhető háttér, a meglevő állófázisok, detektorok. Emiatt a megvalósuló elválasztások mindig kompromisszumot jelentenek az elméletileg legjobb megoldás és a meglevő eszközök szerinti lehetőség között.

A kromatográfiás módszereket legegyszerűbben az alkalmazott állófázis szerint csoportosíthatjuk. Történelmi okokból a poláris állófázison (szilika) apoláris oldószerkeverekkel végzett elválasztás kapta a „normál fázisú” kromatográfia elnevezését (NP-HPLC), míg az apoláris állófázis alkalmazását poláris oldószerkeverekkel a fordított polaritási viszonyok miatt „fordított fázisú” kromatográfiának (RP-HPLC, RPC) nevezték. Stabilitása, széleskörű alkalmazhatósága miatt ennek az állófázisnak a használata jobban elterjedt, másrészt a szilika fázis mellett számos egyéb poláris fázist kifejlesztettek, ezért Alpert 1990-ben a poláris állófázisokon végzett kromatográfiára a HILIC hidrofíl kölcsönhatás kromatográfia (**H**ydrophilic **I**nteraction **C**hromatography) elnevezést javasolta a normál fázisú kromatográfia (NP-HPLC) helyett³.

A kromatográfiás módszerek csoportosítása a következő:

-Fordított fázisú kromatográfia (RP-HPLC)

Az elválasztás alapja az állófázis apoláris oldalláncai és a minta hidrofób csoportjai közötti kölcsönhatás. A retenció idő csökken, ha mozgó fázis polaritását csökkentjük, vagyis a szerves oldószer tartalmát növeljük.

-Hidrofíl kölcsönhatás kromatográfia (HILIC)

Az elválasztás az állófázis és a minta poláris csoportjai közötti kölcsönhatáson alapul. A retenció idő csökken ha a mozgó fázis polaritását növeljük. Ebbe a csoportba tartozik az adszorpciós kromatográfia szilika állófázison és a különféle kémiai kötött poláris fázisokon végzett megoszlási kromatográfia.

-Ioncserélő kromatográfia

kation cserélő : az elválasztásban több kölcsönhatás játszik szerepet egyidejűleg, így az ion csere, ion kizárás, méret kizárás, ligand csere és megoszlás .

anion cserélő: (HPAEC **H**igh **p**H **A**nion-**E**xchange) magas pH értéknél a szénhidrát borát komplexe alkalmas anion cserélőn való elválasztásra. Az ionos szénhidrátok, pl. uronsavak, szulfát származékok elválasztására, mivel ezek anionok, származékképzés nélkül is alkalmas.

-Hidrofób kölcsönhatás kromatográfia: (HIC **H**ydrophobic **I**nteraction **C**hromatography)

Az állófázis kevésbé apoláris mint a fordított fázisú kromatográfiában. Általában rövid elágazó alkil vagy aril csoport hidrofíl állófázishoz kötve. Főként glikopeptidek elválasztására használják só oldatokkal történő elúcióval.

-Affinitás kromatográfia:

Az állófázishoz kötött antitestek a szénhidrátok rendkívül szelektív megkötésére és elválasztására képesek bonyolult elegyekből is. A nagy szelektivitás miatt szinte minden feladathoz másik állófázis szükséges, ezért a módszer hatékony, de drága.

-Méret kizárási kromatográfia: (SEC **S**ize **E**xclusion **C**hromatography)

Az elválasztás azon alapul, hogy az állófázis pórusaiba, amelyek mérete a keresztkötések számával jól szabályozható, a minta molekulái méretüktől függően különbözőképpen képesek behatolni. Így a kisebb molekulák hosszabb időt töltenek az oszlopon, a nagyméretű molekulák kizáródva a pórusokból az oldószerfronttal eluálódnak. Méret szerint elválasztást tesz lehetővé, az esetleges kölcsönhatások só oldatok alkalmazásával visszaszoríthatók. A módszer alkalmazását HPLC-hoz polimer állófázisok megjelenése tette lehetővé, amelyek nagy nyomáson is alkalmazhatók. Mivel ezek az állófázisok már nem gélek, ezért a gélkromatográfia helyett a méret kizárási kromatográfia (SEC) elnevezés indokolt.

Bár a szénhidrátok kromatográfiájára szinte valamennyi, a HPLC elválasztáshoz rendelkezésre álló állófázis alkalmazható, az általam is használt és legelterjedtebb RP és HILIC módszerekről írok részletesebben. Nemrég jelent meg két összefoglaló közlemény szénhidrátok fordított fázisú⁴ és poláris állófázisokon⁵ megvalósított kromatográfiás elválasztásairól amelyek 1996-ig alapos áttekintés adnak a terület irodalmáról. A szénhidrátok kromatográfiás és kapilláris elektroforézis módszerekkel történő analíziséről a közelmúltban könyv is jelent meg⁶.

II. 1. 1. Fordított fázisú kromatográfia alkalmazása szénhidrátok elválasztására

II.1. 1. 1. Állófázis

Az RP-HPLC-hez alkalmazott állófázisok erősen hidrofób karakterűek. Általában szilika hordozóhoz kovalensen kötött alkil (leggyakrabban C18) csoportot tartalmaznak a felületen. A rövidebb C4, C8 láncokat tartalmazó állófázisokat inkább a fehérjék elválasztására használják, mivel ezek kevésbé tartják vissza a bio-makromolekulákat. A fenil állófázis is inkább a protein kromatográfiában használatos, aromás karaktere miatt eltérő szelektivitást biztosít.

Eltérést okoz az állófázisok között az apoláris felület kialakításának módszere. A szerves klórszilán reagens mono-, di- és trifunkciós lehet. A monofunkciós reagens csak a szilika felület hidroxil csoportjaihoz kötődik és így monomer réteget hoz létre. A trifunkciós csoportok keresztkötéses alkil-polisziloxán réteget alkotnak a szilika felületén, ezt polimer fázisnak nevezzük. Míg a monomer állófázis nagyobb elválasztási hatékonyságot eredményez, a polimer állófázis stabilabb és jobban ellenáll a vizes közeg miatti hidrolízisnek magasabb lefedettségének köszönhetően. Mivel a felületi szilanol csoportok sosem reagálnak el teljesen, ez kevert retenciós mechanizmust eredményez⁷. Ennek elkerülésére az állófázisokat trimetil-klórszilánnal kezelik ún. végkapcsolt (endcapped) fázisokat hoznak létre⁸. A felülethez kötött alkil-láncok mennyisége, a borítottság is befolyásolja a felbontást. Szénhidrátokra pl a 12% borítottságú fázis jobb felbontást eredményez, mint az általánosan alkalmazott 17-18%. A cukrok elválasztására ajánlott Dextropack oszlop 10% borítottságú és víz eluenssel nagyon jó felbontást biztosít⁹.

Sajnos a szilika alapú állófázisok magasabb pH-n gyorsan tönkremennek, kioldódnak. Ez a legfőbb gond mindazon alkalmazásoknál, amikor fehérjét is tartalmaz a minta, pl. gyógyszergyári preparatív elválasztásoknál, vagy enzimet tartalmazó oldatok vizsgálatakor. A kötött fehérjék ugyanis nem moshatók le NaOH oldattal mielőtt újabb mintát injektálnánk, így az oszlop telítődik, leromlik a felbontása. Ezek az állófázisok csak pH=10 értékig használhatók. Folyamatosan kutatnak olyan állófázisok után, amelyek a szilika fázis mechanikai stabilitásának biztosítása mellett szélesebb pH tartományban használhatók és a nem kívánatos felületi kölcsönhatásoktól is mentesek. Polimer, alkil borítású alumínium-oxid és grafit állófázisokat fejlesztettek ki. Ezek mindegyike stabil lúgos pH-n is, de felületi kölcsönhatások ezeknél is fellépnek és jóval drágábbak, mint a szilika alapú fázisok. Grafit oszlop már kereskedelemben is kapható és szénhidrátok elválasztására is használható¹⁰. A

monoszacharidok nem választhatók el rajta, a glükózamin a fronttal eluálódik, az uronsavak pedig túl erősen kötődnek. A diszacharidok viszont jól elválaszthatók, valószínűleg adszorpciós mechanizmussal. A sík szerkezetűek jobban kötődnek mint a nem „planárisak”. Bár a retenciós idő csökken a szerves fázis koncentrációjának növelésével, mint az a RPC-ra jellemző, de a retenciós sorrend eltérő. Magasabb hőmérsékleten élesebbek a csúcsok, és ellentétben az RPC-vel a retenciós idő nő.

A részecske méret és a hordozó pórusmérete is fontos jellemző. A kisebb részecskeméret nagyobb elválasztási hatékonyságot biztosít, de magasabb nyomást igényel ezért az ilyen töltetek elsősorban analitikai elválasztásokhoz alkalmasak.

II. 1. 1. 2. Mozgó fázis, alkalmazások

A szénhidrátok elválasztására víz és vizes-szerves oldószerkeverék alkalmazható. A kiválasztásnál az oldószererősség, a viszkozitás és UV detektálás esetén az UV elnyelés fontos. Az oldószererősség fordított fázison az alábbi sorrendben változik¹⁰:

víz<metanol<acetonitril<etanol≈aceton≈dioxán<izopropanol<THF

Szabad cukrok elválasztására víz eluent használják, magasabb tagszámú oligoszacharidok elválasztásához szerves módosító is szükséges. A monoszacharidok nem választhatók el egymástól. A cukorszármazékok elválasztásához általában gradiens elúció szükséges, ha ezt az alkalmazott detektor lehetővé teszi. A redukáló cukrok fordított fázison víz eluenssel kettős csúcsként jelentkeznek, az α - és β -anomerek részleges vagy teljes elválása miatt. Ez csúcscsúszedést vagy bonyolult kromatogramot eredményez. A jelenség elkerülhető trietilamin hozzáadásával a mozgó fázishoz, de ez lúgossága miatt a kolonna élettartamát csökkenti¹¹. A másik lehetőség a hőmérséklet emelése, ami a mutarotáció gyorsításával megszünteti a dubletteket. Sajnos a hőmérséklet emelése a retenciót is csökkenti, így lerontja a szelektivitást¹². A cukor elválasztás előtti redukciója megszünteti a problémát. Az alditolok retenciós ideje rövidebb, mint a megfelelő redukáló cukoré¹³.

Fordított fázison a glikozidok elúciós térfogata nagyobb, mint a szabad cukroké. A tio-oligoszacharidok kevésbé polárisak, mint természetes -O- megfelelőik így nagyobb a retenciós idejük¹⁴.

A természetes acetilezett cukrok, mint például a kitin oligoszacharidok, az acetamido csoport apolárisága miatt jobban kötődnek a fordított fázisú töltetekhez. A homológ, lineáris felépítésű szabad oligoszacharidok növekvő molekulatömegük sorrendjében eluálódnak. Az azonos molekulatömegű izomerek közül az elágazóak retenciós ideje kisebb¹⁵. A retenció

nemcsak a molekulatömegtől, hanem a glikozidos kötés anomer konfigurációjától is függ¹⁶.

Peracetilezett cukrok esetében acetonitril:víz gradiens elúcióval elválaszthatók a lineáris oligoszacharidok 35 tagszámgig, de csak megfelelő detektor alkalmazásával. Acetonitril:víz eluenssel végzett izokratikus elúcióval lineáris összefüggést kaptak lgk' és a tagszám között. Az anomer konfiguráció csak kissé befolyásolja a retenciót¹⁷. Részlegesen metilezett cukrok is elválaszthatók fordított fázison¹⁸.

Metil glikozidoknál az aldohexózok esetén a piranozidok a furanozidok előtt eluálódnak, míg aldopentózoknál a furanozid retenciós ideje kisebb, az α -anomer a β - előtt eluálódik kivéve a fruktofuranozidokat¹⁹. Az anomer hidroxilcsoport más származékait is elválasztották. A PNP- α -glikozidok csökkenő molekulatömeg szerint DP-7-ig elválaszthatók²⁰.

Per-O-benzoilezett oligoszacharidokat is sikeresen választottak el C8 oszlopon. Ez a származék a detektálás és a szeparálás szempontjából is hasznos, növeli a retenciót és így a szelektivitást, és lehetővé teszi az UV detektálást²¹. Számos glikoprotein monoszacharid összetételét határozták meg ilyen formában. Ezen kívül sokféle származékot állítottak elő vagy a detektálás megkönnyítése, vagy az elválasztás javítása céljából. Erről a témáról átfogó összefoglalást közölt Sumihiro²². Különböző biológiai eredetű oligoszacharidokat illetve ezek hidrolízisével nyert monoszacharidokat határoztak meg UV detektálással, piridilamino-(PA)²³, p-aminobenzoil-etil-észter (ABEE)²⁴, fenil-3-metil-5-pirazolin- (PMP)²⁵, származék formájában.

II. 1. 2. HILIC alkalmazása szénhidrátok elválasztására

II. 1. 2. 1. Állófázisok

Szilika:

A szilikagél felszíne hidratált hidroxil csoportokkal borított, ami erősen poláris. Adszorpciós kromatográfiában a kölcsönhatások Lewis sav és dipol-dipol típusúak. A szilika aktivitása a hidroxil csoportok számától és elhelyezkedésétől függ. Az izomerek elválasztásában szerepet játszhat, hogy egy, vagy két hidroxil csoporttal tudnak kölcsönhatásba lépni. A felületen elhelyezkedő hidroxilcsoportok 32%-a geminális helyzetű²⁶. Az általánosan használt szemcseméret 3-5 μm , ami jelentős kromatográfiás hatékonyságot biztosít. Az ennél nagyobb szemcseméretű tölteteket főleg preparatív elválasztásokhoz alkalmazzák. A víztartalom erősen befolyásolja a szilika fázis viselkedését. A víztartalom

hőkezeléssel csökkenthető, a mozgó fázishoz adott vízzel növelhető. A szilika pH 2-7 között csak mérsékelten oldódik vízben, de pH>8 esetén oldékonysága megnövekszik. Ezért használata ennél magasabb pH-n nem ajánlott.

Kötött fázisok:

-Aminopropil szilika: A szilika fázis felületi hidroxil csoportjait aminopropil csoporttal szubsztituálják. A legáltalánosabban használt állófázis szénhidrátok elválasztására, bár néhány hátrányos tulajdonsága van, mint pl. a korlátozott élettartam, vagy a redukáló cukrokkal való glikozilamin képzés²⁷. Ezért amid fázist is kifejlesztettek karbamoil csoportot kötve a szilikához amino helyett²⁸.

Az amino állófázis többféle kromatográfiás elválasztásra használható:

- szabad cukrok elválasztása vizes-szerves elegyekkel
- szénhidrátszármazékok elválasztása apoláris oldószer elegyekkel
- gyenge anioncserélőként való alkalmazás vizes pufferekkel

-Diol fázis: A szilika felületi hidroxilcsoportjait glicidoxipropil-trimetoxiszilánal reagáltatják, az oxirán gyűrű egyidejű hidrolízisét lehetővé tevő reakciókörülmények mellett. Az így kapott diol csoportokat tartalmazó állófázis tulajdonságaiban hasonlít a szilikához, de nem érzékeny annyira az eluens víztartalmára. Főleg SEC céljára fejlesztették ki, de HILIC-re is használható cukrok és alditolok elválasztására²⁹.

II. 1. 2. 2. Mozgó fázis, alkalmazások

Az oldószererősség a következő sorrendben változik³⁰:

hexán<benzol<kloroform<DKM<EtOAc<THF≈aceton<acetonitril<metanol<<víz

Szilika állófázison:

A szilika fázis szabad cukrok elválasztására nem alkalmas, mert azok túl erősen, irreverzibilisen kötődnek. Jól alkalmazható viszont acetilezett, benzoilezett és más részlegesen, vagy teljesen szubsztituált szénhidrátok elválasztására³¹. Az elválasztás mechanizmusa megoszlás a részlegesen védett cukrokra acetonitril:víz mozgó fázissal, és adszorpció a teljesen védett szénhidrátokra hexán:etilacetát oldószer elegyekkel. A vizsgált védőcsoportok metil éter, izopropilidén vagy benzilidén acetál és acetil észter. Megoldották peracetilezett monoszacharidok (hexán:etilacetát=10:1) és diszacharidok (pentán:aceton=7:2) elválasztását³².

Szisztematikus vizsgálatokat végeztek glükóz és galaktóz különböző aril- és alkil-glikozidjaival peracetilezett és perbenzoilezett formában. Az acetilezettek

benzol:etilacetát=9:1, az alkil glikozid acetátokra hexán:etilacetát=1:1, az aril glikozid acetátokra kloroform:széntertaklorid=3:2 oldószerkeverékeket alkalmaztak alacsony áramlási sebességekkel. A vizsgálatok végkövetkeztetése az volt, hogy ilyen célra a RPC alkalmasabb³³.

Közölték a gyakoribb monoszacharidok, aminocukrok, diszacharidok, néhány metil-glikozid és alditol perbenzoilezett formájának retenciós adatait. A monoszacharidok 5 izomer formájának megjelenése bonyolítja a kromatogramot, ezért a GC-hoz hasonlóan redukciót javasoltak alditolokká a származékképzés előtt³⁴. Glükóz, glucit, szacharóz laktóz esetében 4-nitro-benzoát származékokat is elválasztottak. A magasabb hullámhosszon való detektálás kisebb zajt, stabilabb alapvonalat eredményez, de a redukáló cukrok izomerjeinek csúcsai itt is megjelennek³⁵.

Számos más, a detektálást megkönnyítő származékképzést is elvégeztek, így a fenil-dimetilszilil³⁶, 2,4-dinitrofenil-hidrazon³⁷, danzilhidrazon³⁸ származékokat is vizsgáltak. Elterjedten használják a szilika oszlopokat glükózaminoglikánok vizsgálatára is³⁹.

Amino fázist *in situ* is létre lehet hozni szilika fázison, ha a mozgó fázis polifunkciós amint tartalmaz. Több vegyületet kipróbáltak erre a célra pl. a trietilamint, tetraetilén-pentamint, pentaetilén-hexamint és a 1,4-diaminobutánt. Olcsósága és jó elválasztási tulajdonsága miatt ezt a módszert ma is alkalmazzák, de meg kell jegyezni, hogy a retenciós idő erősen függ az oszlop előéletétől és a mozgó fázis aminoskoncentrációjától, az alapvonal nem stabil az álló fázisról leoldódó aminos miatt, így ezek a módszerek nem túl jól reprodukálhatóak^{2,9,40}.

Kötött aminos fázison:

Mivel ez az állófázis a legelterjedtebb a szénhidrátok kromatográfiás elválasztására szinte lehetetlen valamennyi ilyen tárgyú közleményt áttekinteni. Ezért az elválasztások ismertetése helyett inkább néhány következtetést, törvényszerűséget sorolok fel, amelyeket ezen elválasztások alapján vontak le. Az elválasztások legnagyobb része szabad cukrokkal történt, ahol ettől eltérés van azt külön jelzem.

- Oligoszacharidok esetén a glikozidos kötés típusa befolyásolja a retenciót. k' glükó diszacharidok esetén (1→3)<(1→4)<(1→2)<(1→1) irányban nő⁴¹.
- A nem redukáló végi 4OH epimerizáció (glc-gal csere) növeli a retenciót, míg a redukáló végen a glc-fru csere csökkenti, főleg ha a fruktóz furanóz⁴¹.
- Triszacharidoknál galaktóz jelenléte növeli, xilóz, fruktóz csökkenti a retenciót⁴².
- A monoszacharid alditolok elválasztása csak részlegesen oldható meg egymástól és a megfelelő cukortól is⁴³.

- Alkil- és aril-glikozidok esetén a piranozid és a furanozid elválnak, de erre a célra a szilika fázis jobb⁴⁴.
- Az amino fázison a szabad cukrok anomer formái nem válnak el egymástól az állófázis amino csoportjainak mutarotációt katalizáló hatása miatt⁴⁵.
- A szabad cukrok glikozilamin képződése miatt megkötődhetnek az álló fázison, ami egyrészt csökkenti a mért cukor koncentrációt, másrészt inaktíválja az álló fázist. Ez a hatás víz helyett foszfát puffer (0.01 M, pH=6) alkalmazásával a mozgó fázisban lecsökkenthető²⁷.
- Az uronsavak irreverzibilisen kötődnek az álló fázishoz, ez a sav-bázis kölcsönhatás visszaszorítható foszfát pufferrel. A H_2PO_4^- ionok szerepe nemcsak a pH beállítása, hanem valószínűleg az amino csoportokkal komplexet is képeznek, vagyis az elválasztás mechanizmusában az ioncsere is szerepet játszik⁴⁶.
- Ha az oligoszacharidok tagszáma 5-nél nagyobb, elválasztásukhoz gradiens elúció szükséges, amennyiben ezt a detektálás lehetővé teszi. Használtak „post column” oszlop utáni származékképzést tertazólium késsel malto-, (1→4) xilo⁴⁷ és (1→2) frukto oligoszacharidok elválasztásakor DP 20 tagszámig⁴⁸, valamint radioaktív jelzést (1→6) glüko oligoszacharidok gradiens elválasztásánál⁴⁹. Kisebb (0,3 μm) szemcseméretű tölteteken a jobb felbontás miatt izokratikusan is elválaszthatók glüko (1→4), (1→2), (1→6) és (1→3) kötésű oligoszacharidok DP 30-ig⁵⁰.
- Ciklikus oligoszacharidok elválasztását is megoldották ciklosoforázok (β(1→2) glüko-) és ciklodextrinek (α(1→4) glüko-) valamint elágazó ciklodextrinek esetén^{28,51}.
- Kitin hidrolizátumból nyert 2-acetamido-2-dezoxi-D-glükóz oligomerek csak DP 5-ig választhatók el izokratikusan⁵². A sorozat tagjainak retenciós ideje kisebb mint a megfelelő glüko oligomeré.
- Glikoproteinek szerkezetének meghatározására ismert szerkezetű oligoszacharidok amino és C18 állófázison való kromatográfiával kapott kétdimenziós „térképet” használnak. Az így kapott retenciós idő adatbázis segítségével ismeretlen oligoszacharidok szerkezetét határozták meg redukált formában⁵³, fluoreszcens 2-aminopiridin származékként⁵⁴ és hidrazinolízissal kapott oligoszacharidokra⁵⁵.
- Oligoszacharid alditolok amino oszlopon acetonitril:víz gradienssel történő elválasztása során vizsgálták a szerkezeti paraméterek szerepét az elválasztásra. Az oligoszacharid tagszámának függvényében ábrázolt relatív retenciós idő különbségek, azonos csoport belépése esetén, közel lineáris összefüggést adtak⁵⁶.

II. 2. α -Amiláz enzimek vizsgálatának előzményei

Az amilázok $\alpha(1\rightarrow4)$ glikozidos kötéseket hidrolizálnak és így a keményítő és a hasonló szerkezetű poliszacharidok (pl. amilóz, glikogén) lebontásában játszanak szerepet. Igen elterjedtek, szinte valamennyi élő szervezetben termelődnek a baktériumoktól kezdve a növényeken át az állatokig. Vizsgálatukat egyrészt széles körű ipari alkalmazásuk, másrészt a humán eredetű enzimek diagnosztikai szerepe indokolja.

Számos keményítő hidrolizáló enzim kereskedelmi jelentőségű. Az enzimek specifikusa, termotabilitása és pH függése kritikus lehet ipari alkalmazásuk során. A természetes eredetű enzimek nem kívánatos sajátságai módosíthatók, ha ismerjük milyen összefüggések vannak a fehérje szerkezet és az enzim aktivitás között, mely szerkezeti részek határozzák meg a módosítani kívánt sajátságokat⁵⁷. Az elmúlt évtizedben számos keményítő bontó enzim 3 dimenziós szerkezetét határozták meg röntgendiffrakciós mérésekkel. Így ma már lehetőség van a különböző szerkezetek és az enzim aktivitások összevetésére és a kettő között összefüggések keresésére.

A keményítő glikozidos kötéseinek hidrolízisét és szintézisét katalizáló enzimek négy fő csoportba sorolhatók⁵⁸:

1. $\alpha(1\rightarrow4)$ glükozidos kötéseket hidrolizálnak: α -amilázok E.C.3.2.1.1., β -amilázok E.C.3.2.1.2., glükamiláz E.C.3.2.1.3.,
2. $\alpha(1\rightarrow6)$ glükozidos kötéseket hidrolizálnak: pullulanáz E.C.3.2.1.41 és izoamiláz E.C.3.2.1.68.,
3. $\alpha(1\rightarrow4)$ glükozidos kötéseket hoznak létre transzglükozilezéssel: ciklodextrin-glükoziltranszferáz E.C.2.4.1.19.,
4. $\alpha(1\rightarrow6)$ glükozidos kötéseket hoznak létre transzglükozilezéssel: 1,4- α -D-glükán: 1,4- α -D-glükán-6- α -D-(1,4- α -D-glükano)-transzferáz más néven elágazást létrehozó enzim E.C.2.4.1.18., oligo-1,6-glükozidáz E.C.3.2.1.10.

Bár a reakciókat főként a feltüntetett enzimek katalizálják, vannak köztük átfedések pl. az α -amilázok transzglükozilezésre is képesek, a CGT-áz a hidrolízist is katalizálja, egyik termofil pullulanáz, a neopullulanáz pedig azonos mechanizmussal és azonos aktív centrum részvételével mind a négy reakciót katalizálja⁵⁹.

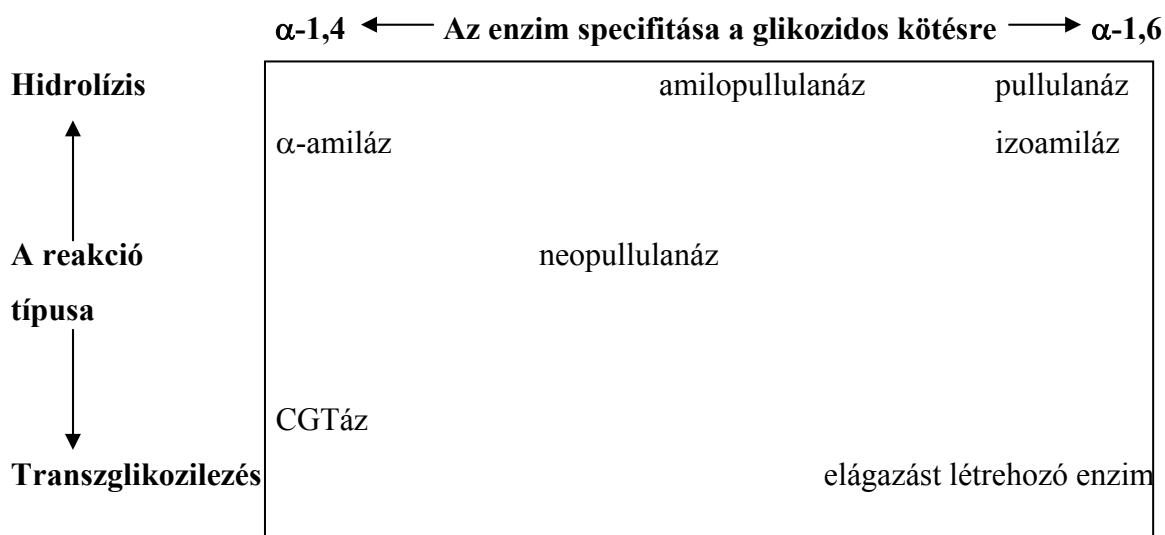
Megállapították, hogy az $\alpha(1\rightarrow4)$, vagy $\alpha(1\rightarrow6)$ kötéseket a konfiguráció megtartásával (retenciójával), illetve inverziójával hasító enzimek szerkezetileg különböznek egymástól. A retenciós enzimek közé az α -amilázok, a CGTázok és az oligo-(1 $\rightarrow$ 6)

glükózidázok tartoznak, míg a másik csoportba az inverziós enzimek közé sorolhatjuk a β -amilázokat és a glükóamilázt. A nyolcvanas évek óta számos amiláz és rokon enzim szekvenciáját közölték, így lehetővé vált ezek összehasonlítása. Ennek alapján négy erősen konzervált régiót figyeltek meg a retenciós keményítőbontó enzimek szerkezetében, amely tartalmazza az összes katalitikus helyet. A retenciós enzimek valamennyien egy szerkezeti családba tartoznak, ahol a katalitikus domén mindig $(\beta/\alpha)_8$ hordó.

Mindezek alapján az α -amiláz enzimesaládba sorolható az az enzim, amely megfelel az alábbi szempontoknak⁵⁸:

- α -glikozidos kötése hat,
- vagy α -glikozidos kötést hidrolizál miközben α -glükóz vagy oligoszacharid keletkezik, vagy α -glikozidos kötést hoz létre transzglikozilezéssel,
- 4 konzervált régiót tartalmaz az aminosav szekvenciában, amely tartalmazza az összes katalitikus és a legfontosabb szubsztrátkötő helyeket,
- Asp, Glu és Asp aminosavakat tartalmaz a katalitikus régióban a TAKA amiláz Asp206, Glu230, Asp297 aminosavainak megfelelően.

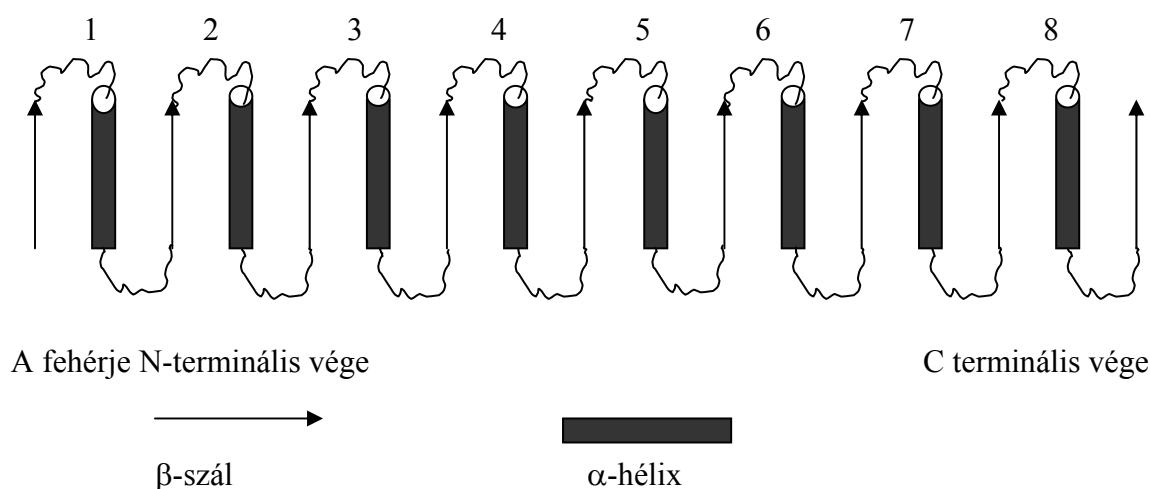
A retenciós keményítőbontó enzimek közötti kapcsolat az 1. ábrán bemutatott sémán látható.



1. ábra α -Amiláz enzimesalád tagjai és az általuk katalizált reakciók⁵⁸

II.2.1. Szerkezeti sajátosságok

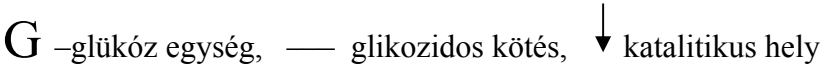
Valamennyi ide tartozó enzim multidomén fehérje, a domének egy részének szerepe ismert, másoké nem, de a katalitikus domént meghatározták és ez mindig egy $(\beta/\alpha)_8$ hordó része.



2. ábra α -amiláz enzimek $(\beta/\alpha)_8$ hordó szerkezetének sematikus képe

Ebben a szerkezetben a β -redők és az α -hélixek váltakoznak a polipeptid láncban, így 8 párhuzamos β -redő egy belső hengert képez, amit a 8 hélix vesz körül. Rendszerint egy extra hélix követi a 6. β -redőt. Az alternáló hélixeket és β -redőket hurkok kötik össze és a szubsztrátkötő és aktív helyet a β -redők és a hurkok aminosavai építik fel. A hurkok hossza és aminosav sorrendje változó és ebből származik a különböző enzimek változatossága, ami a specifitást és a sajátosságokat illeti. Általában a 3. hurok hosszú, de a többi hurok hossza nagyon változatos, és a hurkokon belül is lehetnek extra β -redők és α -hélixek.

A poliszacharidokra ható enzimek szubsztrát kötőhelye, mint egymást követő alhelyek sorozata írható le, ahol egy-egy alhely a szubsztrát egy-egy monoszacharid egységével lép kölcsönhatásba (4. ábra). Az α -amiláz családban az alhelyeket a hurkok aminosavai alkotják, így a hurkok hosszában és természetében való variációk okozzák az alhelyek számában és sajátágaiban megjelenő különbségeket.



3. ábra α -amiláz enzimek kötőhelyének és aktív centrumának sematikus ábrázolása

Az α -amilázok specifikitása függ az eredetüktől, de főleg endo- (a glükóz lánc belsejében hasító), vagy exo- (a láncvégről hasító) enzimek lehetnek és többszörös támadás (multiple attack) vagy rendszertelen támadás (random attack) végbemenetelével hathatnak a szubsztráton. Ha a képződő termékek is szubsztrátjai az enzimnek, akkor másodlagos támadás (secondary attack) is bekövetkezhet.

Különbségeket figyeltek meg a hidrolízis termékeinek eloszlásában a maltodextrinek vagy az amilóz tanulmányozása során. A sertés pankreász α -amiláz (PPA) például főként maltóz és maltotrióz képzésével, többszörös hasítási mechanizmussal bontja az amilózt⁶⁰ és a rövidebb szubsztrátokat is⁶¹. Az árpa α -amiláz maltóz, maltohexaóz és maltoheptaóz fő termékeket eredményez, és nem történik többszörös hasítás⁶². Mindkét enzim endo módon hat, vagyis a poliszacharid lánc belsejében levő kötéseket hidrolizálja, de exo bakteriális α -amilázok is ismertek, amelyek főleg a glükán lánc végéről hasítanak adott méretű oligoszacharidokat⁶³.

A termékeloszlásban megmutatkozó különbségek a szubsztrátkötő hely alhelyeinek számában levő különbségekkel és az egyes alhelyek és a glükóz egységek közötti kölcsönhatások erősségének különbségével magyarázhatóak. A PPA szubsztrátkötő helye eddigi vizsgálatok szerint 5 alhelyet tartalmaz, az árpa α -amilázé 10 alhelyet, az *Aspergillus orizae* (TAKA) α -amiláz 7 alhellyel rendelkezik. A PPA és TAKA α -amiláz szubsztrátkötő és aktív helyének röntgen diffrakciós és molekula modellezési vizsgálatait elvégezték^{64,65}. Mindkét enzimben a 2, 3, 4, 5, 7, 8 hurok aminosavai alkotják a -3 – +2 alhelyeket. Az 1. és 2. hurok hosszában és hajlékonyságában levő különbség lehetővé teszi a -4 alhely képződését a TAKA amiláznál és kizárja az emlős amilázoknál, bár újabb eredmények szerint a humán pankréász amiláz (HPA) esetén lehet -4 kötőhely⁶⁶. A 3. és 5. hurok variációi miatt lehet +3 kötőhely a TAKA amilázban és hiányzik az emlős eredetű enzimekben. Ezt Omichi a redukáló végen módosított szubsztrátokkal igazolta a humán enzimekre (HSA, HPA)⁶⁷. Az 1–8 hurokok tehát kritikusak az aktív hely képződésében és specifikálásában. Ha az 1, 2, 7, 8

hurkok valamelyike behajlik és a szubsztrátkötő hely egyik végénél akadályt képez, akkor a szubsztrátkötő hely inkább zseb mint mélyedés formájú lesz. A mélyedés forma az endo-, míg a zseb forma az exo-enzimekre jellemző⁵⁷.

Az α -amiláz enzim általi többszörös vagy ismételt hasítás akkor figyelhető meg, ha újabb hidrolízis követi az első hasítást úgy, hogy csak az egyik termék szabadul fel az enzimről⁶⁰. Ez feltételezi az eredetileg a -3 -2 -1 alhelyhez kötődő szubsztrátrész átcusúsását a -1 +1 +2 alhelyre. Qian egy mozgékony hurkot figyelt meg a PPA-ban, ami a szubsztráttal a -2 alhelynél kölcsönhatásban levő His-t tartalmaz. Lehetséges, hogy ennek a huroknak a mozgása segíti elő a szubsztrát áthelyeződését a termék felszabadulása előtt, így lehetővé téve a többszörös hasítást⁶⁴. Ennek His-nek a protonálódásában bekövetkező változás befolyásolja a szubsztrát kötődését magas pH-n, és ez összhangban van azzal az ismert mechanizmus változással, hogy míg a PPA 6.9 pH-nál többszörös hasítási mechanizmussal működik, addig pH=10-nél random/rendszertelen hasítás történik⁶⁸. Ez a hurok nincs jelen a gabona és termofil baktérium eredetű α -amilázok és a TAKA α -amiláz szerkezetében, így nem meglepő, hogy ezen enzimeknél nem figyelhető meg többszörös hasítás.

A retenciós enzimek által katalizált hidrolízis és transzglykozilezés eddigi ismereteink alapján kettős helyettesítéses (double displacement) mechanizmussal játszódik le. A katalízisben résztvevő aminosavak szerepe a következő (a számozás a TAKA amiláz szekvenciájának felel meg):

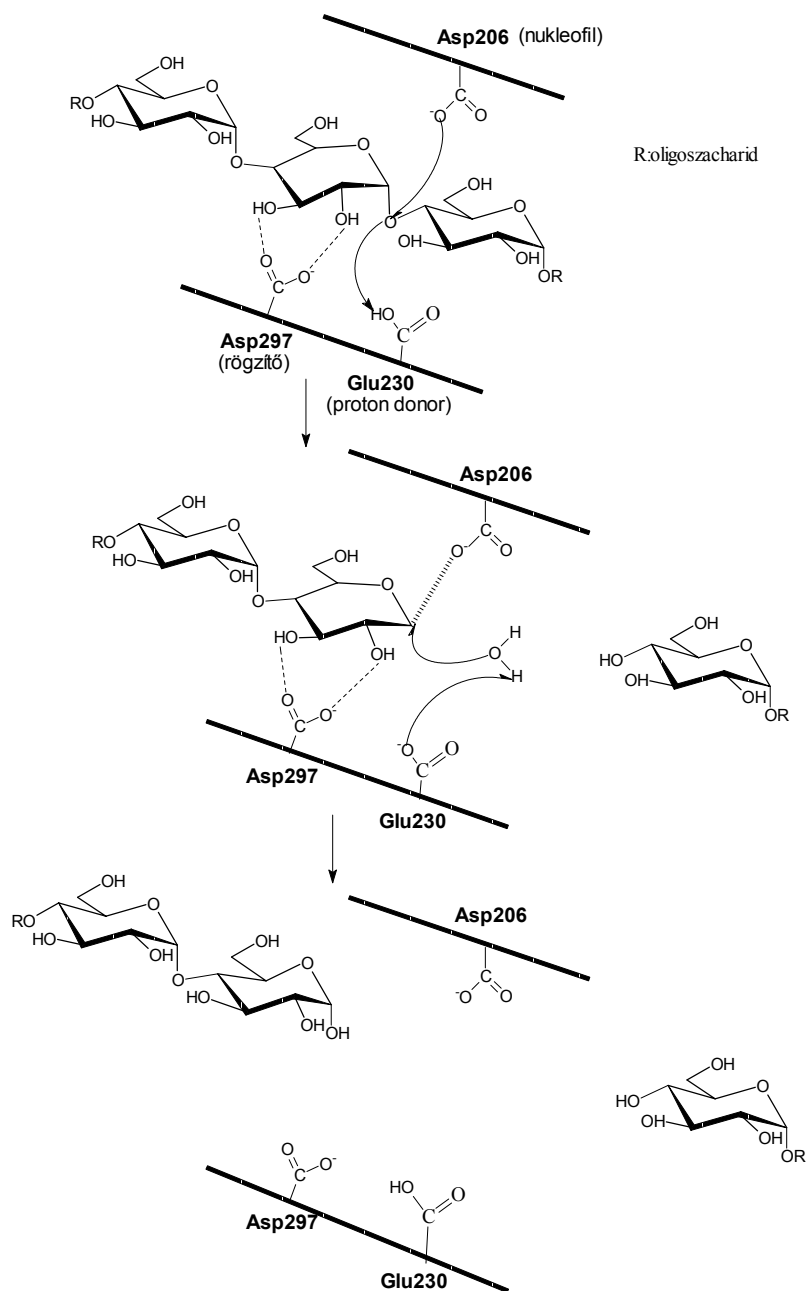
- Glu230

Ez az aminosav a 3. régióban található és teljesen konzervált a család enzimeiben, bár a környezetében nincs más hasonlóan konzervált aminosav. A karboxil csoport pK értéke az aminosav környezete miatt elég magas lehet ahhoz, hogy egy protont képes legyen átadni a glikozidos kötésre, lehetővé téve a hasítást (sav katalízis, proton donor).

- Asp206

A röntgenkristallográfiás analízis alapján az aminosav karboxil oxigénje nagyon közel van a -1 pozícióban kötődő, a hasításban részt vevő glükóz egység C1 atomjához. Ezért feltételezhető, hogy ez az aminosav részt vesz az átmeneti állapot kialakításában (bázis katalízis, nukleofil). Arról még viták folynak, hogy a valódi átmeneti komplex karbónium ion képződéssel, vagy kovalens kötés kialakulásával jár.

PPA kovalens intermediereken keresztül történő reakciójára NMR bizonyíték van⁶⁹.



4. ábra α -amiláz enzimek katalitikus mechanizmusa

Bár ez két csoport részvételét jelenti, mutációs vizsgálatok szerint 3 karboxil csoport vesz részt a katalízisben 1 Glu és 2 Asp^{59,70}. CGT-áz esetében a röntgenkristallográfiás mérések valószínűsítik a komplex kovalens karakterét, nem zárva ki, hogy a reakció során mindkét forma megjelenhet⁷¹.

- Asp297

A közelmúltban tisztázták szerepét négy mutáns G4-amiláz maltotetraózzal alkotott komplexének röntgenkristallográfiai vizsgálatával⁷². A -1 kötőhelyen bekövetkező gyűrű torzulás, ami jól megfigyelhető ha aszparaginsav van jelen az enzimben, eltűnik abban az esetben, ha aszparaginnal helyettesítjük ezt az aminosavat és a kötőerősség is lecsökken. Ebből arra következtettek, hogy az Asp297 erősíti a szubsztrát kötődést, eltorzítja a szék konformációjú piranóz gyűrűt és így elősegíti a kötés hasadást (rögzítő). Az átmeneti állapot stabilizálásában a -1 alhely és a cukorgyűrű közti kölcsönhatás is szerepet játszik, ahol a 2 His fontos résztvevő^{64,73} és ez is konzervált a legtöbb α -amiláznál.

II.2.2. Termostabilitás és pH stabilitás pH függés

Bár a termostabilitás és a pH stabilitás valamint pH függés egyaránt fontosak az ipari felhasználású enzimeknél egyelőre nincsenek ilyen céllal tervezett enzimek. A pH stabilitás illetve a pH függés a humán enzimek esetén is fontos kérdés. Azt, hogy a HSA részben átveheti a HPA szerepét, pH stabilitási vizsgálatokkal igazolták. A keményítő vagy hidrolízistermékei ugyanis megvédik a HSA enzimet a gyomor savas környezetében az inaktiválódástól⁷⁴.

A β -hordó szerkezet önmagában nem túl stabil, amint ezt az antarktiszi eredetű baktérium az *Alteromonas haloplantis* enzimének termostabilitása mutatja. Ez az enzim 45 °C hőmérsékleten is gyorsan elveszti aktivitását, de pl. a *Bacillus licheniformis* által termelt enzim 90 °C hőmérsékleten is hosszú ideig stabil marad. A szokatlanul nagyszámú rövid oldalláncú aminosav az *A. haloplantis* amilázban az enzimmolekula flexibilitását okozza, ami alacsony hőmérsékleten biztosítja az enzim aktivitását, de lecsökkenti a hőstabilitást⁷⁵. Különálló aminosav oldalláncok, só hidak, H híd kötések és hidrofób kölcsönhatások növelik a hőstabilitást. A diszulfid hidak nem szükségesek a hő általi inaktiváció elleni védelemhez. Az emlős amilázok 5 diszulfid hidat tartalmaznak, de mégis labilisabbak mint a termofil baktériumok enzimei, amelyek egyáltalán nem tartalmaznak diszulfid hidat⁷⁶. A Ca^{2+} ionokat tartalmazó enzimeknél a Ca^{2+} ionok jelenléte az oldatban stabilizálja a fehérjét.

Még kevesebbet tudunk a pH függés és a szerkezeti faktorok összefüggéséről. A alacsony vagy magas pH-val szembeni stabilitás befolyásolható egyes aminosavak eltávolításával⁷⁷. Egyes vizsgálatok szerint elsősorban a 3. hurok aminosavai felelősek a savval szembeni ellenállóképességért⁷⁸. A pH-aktivitás profilok befolyásolhatók az aktív helyhez közeli, vagy abban résztvevő aminosavak mutációjával vagy módosításával, ami arra mutat, hogy ezek

szerepet játszanak a pH függésben. A Cl^- ionok jelenléte vagy eltávolítása is befolyásolja a pH optimumot. HPA enzim esetén Ishikawa vizsgálatai szerint a His201Asn mutáció savas irányba tolta el a pH optimumot, miközben a bontási képet nem befolyásolta⁷⁹.

II. 2.3. Humán nyál eredetű α -amiláz (HSA)

A humán enzimek vizsgálata élettani szerepük, hatásmechanizmusuk felderítését célozza. Az emberben a nyál és pankréász izoenzimek (HSA, HPA) az 1. kromoszómán kódoltak egy multigén család tagjaként, ami a nyálmirigyekben és a pankréászban különböző izoenzimek kifejeződését szabályozza⁶⁶. Napjainkban fedeztek fel egy gént, amely egy harmadik, eddig ismeretlen humán amiláz (HXA) izoenzim képződéséért felelős⁸⁰. Mindkét enzimet külső elválasztású mirigyek termelik (nyálmirigyek és hasnyálmirigy), de megtalálhatók a szérumban és a vizeletben is. A pankréásznedv és a nyál amiláz koncentrációja néhány nagyságrenddel nagyobb, mint egyéb testfolyadékoké, és valószínűleg a szérumban tartalma is ebből a két szervből származik. A szérumban α -amiláz szintjének mérése fontos indikátora lehet a nyálmirigyek és/vagy a pankréász gyulladásos megbetegedésének^{81,82}. A normál szérumban amiláz aktivitását elsősorban nyál típusú amiláz okozza⁸³.

A nyál amiláznak legalább három élettani funkciója van. A szénhidráttartalmú táplálék előemésztését a szájban hidrolitikus aktivitása teszi lehetővé. Emellett az enzim felületén baktériumkötő hely található, így az enzim felszínén a szájban megtalálható *Streptococcus* baktériumok képesek megkötődni⁸⁴. Valamennyi amiláz közül a HSA mutat a legnagyobb baktériumkötő aktivitást. A baktériumkötődés ellenére hidrolitikus aktivitását is megőrzi. A keményítő hidrolízise során keletkező mono- és oligoszacharidokat a baktérium metabolizálja. Mivel az enzim a fog felszínéhez is képes kötődni, és részt vesz a plakk képződésében, a képződő savak hozzájárulnak a fogszuvasodás (caries) kialakulásához⁸⁵. A HSA tanulmányozása táplálkozás élettani fontossága mellett a fogszuvasodás kialakulásában betöltött szerepe miatt is lényeges.

A HSA kiválasztását, aktivitását a nyálban és a szérumban számos tényező befolyásolja. A nyálban mért HSA szint függ a kortól. Újszülötteknél a felnőttkori szint közel 32%-át mérték, ami 19 hónapos korra éri el a felnőttkori normál értéket⁸⁶. A HSA kiválasztása fokozódik fizikai és pszichikai stressz hatására⁸⁷. Aktivitását befolyásolja a táplálék konzisztenciája, folyadékkal történő táplálás esetén csökkent HSA termelést tapasztaltak⁸⁸.

A szérumban HSA aktivitását is befolyásolja az életkor, ezért fontos a klinikai diagnosztikában a kornak megfelelő normál tartomány megadása. Elhízott gyerekek esetében fiúknál csökkent HSA koncentrációt mértek⁸⁹, míg más vizsgálatok szerint az elhízási index 50% feletti értéke mindkét típusú amiláz aktivitás csökkenésével jár⁹⁰. Vagbélgyulladás kíséző tüneteként is leírtak HSA szint emelkedést, ami műtét után normalizálódott⁹¹. A kiválasztó szerv gyulladásoo megbetegedése (pl. fültőmirigy gyulladás) is HSA aktivitás növekedéssel jár^{81,82}. A szérumban öoszes amiláz szintje a pankreász megbetegedéseoi miatt is változhat, ezért fontosak azok a mérési módszerek amelyek segítségével a HPA és HSA szint külön is mérhető. Ezek a módszerek olyan szubsztátok hidrolízisén alapulnak, amelyeket eltérő módon bont a két enzim, így tervezésükhöz a két enzim kötőhelyének különbségeit ismerni kell. Másrészt az amilázok inhibítorai hasznosak a vér glükóz szintjének kontrolálásában, mivel lelassítják a keményítő és az oligoszacharidok lebontását⁶⁶.

A HSA 5 izoenzimből áll, melyek két családba **A** és **B** csoportosíthatók. Az **A** család tagjai (1, 3, 5) kovalensen kötött cukorrészt tartalmaznak, vagyis glikoproteinek, míg a **B** család tagjai (2, 4) nem tartalmaznak cukorrészt. Az izoenzimok mindegyike egy polipeptidláncból áll, nem különböznek aktivitásukban, hőstabilitásukban és nagy molekulasúlyú szubsztáton mért bontási képükben sem⁹².

Valamennyi izoenzim polipeptidláncát 496 aminosav alkotja, tartalmaznak Ca^{2+} és Cl^- kötőhelyet. A vizsgálatok szerint a Ca^{2+} és Cl^- kötőhely, valamint a szubsztátkötő hely His és Trp aminosavai szerepet játszhatnak a szubsztát glikon és aglikon végének megkülönböztetésében. A Cl^- ion valószínűleg szerkezeti szervező szereppel bír, lecsökkenti a nem kívánatos elektrosztatikus kölcsönhatásokat, amelyek a bázikus és savas csoportok között felléphetnek. Ezenkívül a hasításban és szubsztát kötésben szerepet játszó Glu233 pK értékét is növelheti.

A HSA-ról csak szabad formában van hozzáférhető röntgenkrisztallográfiás felvétel⁸⁵. Szerkezetében fontos szerepe van a többi emlős amilázhoz hasonlón a 304-310 aminosavak alkotta huroknak, melynek része az Asp300 is, az aktív helyet felépítő fontos aminosav. A hurok 4 glicint tartalmaz, ami nagy flexibilitást biztosít és karakterisztikus az emlős amilázokra. Szerepe a szubsztát kötés és termék felszabadítás folyamatában van. Ha nincs jelen szubsztát a hurok rendkívül mozgékony és a PPA, HPA vagy HSA enzimeknél megfigyelt valamelyik konformációt veszi fel, ezt nyitott pozíciónak nevezik. Ha a szubsztát bekötődik ez a szegmens segít a katalitikus helyen tartani, a zárt pozíció felvételével. Reakció után ismét nyitott pozícióba kerül és a termék felszabadul⁸⁵.

Korábbi vizsgálatok szerint a HSA 5 alhellyel rendelkezik, melyből 3 glikon, 2 aglikon kötő hely, a hasítás ezek között történik. A harmadik aglikon kötő hely létezését kizárták⁷².

II.2.4. *Bacillus licheniformis* által termelt hőtűrő α -amiláz (BLA)

A mikroorganizmusok széles köre termel és választ ki extracellulárisan olyan amilázokat, amelyek különböző specifitással és érdekes sajátosságokkal rendelkeznek. Gram + baktériumok és főleg a *Bacillus* család tagjai termékeny amiláz források. A bakteriális amilázok régebbi csoportosítása aszerint történt, hogy milyen végterméket szolgáltatnak a keményítő hidrolízise során. Eszerint a BLA maltopentaóz termelő enzim, a keményítőtől 33% maltopentaózt állít elő. Az úgynevezett *folyósító* enzimek közé tartozik⁹³.

A *Bacillus* családban két gén lehet felelős az amiláz termelődéséért, mert két különböző amiláz képződhet az inkubációs közeg hőmérsékletétől függően. Ezek aminosav szekvenciájukban és bontási képükben is eltérnek egymástól. Az egyik nagyfokú hőstabilitással rendelkezik, 100 °C hőmérsékleten is több mint 4 órán át megőrzi stabilitását, ezt nevezik BLA-nak. Genetikai módosítással az enzim olyan változatait is előállították, amelyeknek fő hidrolízis terméke maltohexaóz és maltoheptaóz (BLTA) illetve maltóz (BLMA). A BLMA már a *cukrosító* enzimek közé tartozik⁹⁴.

A keményítő ipari méretű hidrolíziséhez hőstabil enzimek használata kulcsfontosságú, mivel ez a poliszacharid csak 100 fok körüli hőmérsékleten oldódik. Az enzimeket felhasználó iparágak közül a mosószer és a keményítő ipar a legnagyobb volumenű, ez a kettő adja az ipari enzimfelhasználás kétharmad részét⁹⁵. Ezenkívül a BLA-t felhasználja az alkohol, cukor és söripar éppúgy, mint a textilipar a sütőipar, gyógyszeripar, valamint alkalmazzák mosószerek előállításához és a szennyvízkezelésben is. A BLA allergiás reakciót válthat ki pékeknél⁹⁶ és mosószergyári munkásoknál⁹⁷.

A BLA szerkezetvizsgálatának célja a szerkezet/funkció összefüggések keresése, a termostabilitás okának felderítése, ismeretek szerzése iparban felhasználható enzimek tervezéséhez és az allergiát okozó régiók felderítése. Röntgendiffrakciós felvételek Ca^{2+} ionok nélküli apoenzimmel⁹⁸ és Ca^{2+} ionot tartalmazó holoenzimmel⁹⁹ készültek. Megállapították, hogy bár a BLA szerkezete az amilázok általános szerkezeti elemeit tartalmazza, néhány jellegzetes eltérést is mutat, ami a hőstabilitással is összefüggésbe hozható. Az enzim 496 aminosavat és 237 víz molekulát tartalmaz, megtalálható benne a jellegzetes központi A domén és a C terminális görög kulcs motívum (C domén). A B domén, ami a katalitikus

helyet is tartalmazza, 100 aminosavból áll és bonyolult másodlagos szerkezettel rendelkezik, míg pl. TAKA amilázban csak 60 aminosavból áll és hurokszerű. A katalitikus hely aminosavai azonban a BLA-ban is 2 Asp és egy Glu. A Cl⁻ kötőhely a katalitikus hely közelében van, az Arg229, az Asn326 és víz molekulák koordinálódnak hozzá. A PPA-ban jelen levő Arg337 itt nem vesz részt a kötésben, helyette víz molekula található. A kevésbé hőstabil *Bacillus amyloliquefaciens* α -amiláz (BAA) szerkezetéhez képest néggyel több ionos kölcsönhatás található benne. Szintén növeli a stabilitást az I. régióban levő hurok a B domén felszínén, ami két aminosavval rövidebb mint a BAA-ban található, így kevésbé mozgékony.

A legjelentősebb eltérés, amit más amiláznál eddig nem írtak le a Ca²⁺-Na⁺-Ca²⁺ szerkezetű triád a szokásos Ca²⁺ kötő helyen, valamint egy további Ca²⁺ ion az A és C domén között. A Na⁺ ion aktiváló hatása régóta ismert, de kötődését az enzimhez nem figyelték meg korábban. Ez a stabilizáló hatás csak mérsékelt, az ion kötőhely flexibilitása elég nagy ahhoz, hogy a Na⁺ ion könnyen kidiffundáljon a kötő zsebből. Ca²⁺ ionok távollétében az amilázok inaktívak. Az enzim inaktív formája gyakran rendezetlen régiókat tartalmaz, amelyek kofaktorok (pl. Ca²⁺) hatására válnak rendezetté. Ez sok szekréciós enzim esetén így van, talán azért, hogy a sejten belüli nem kívánatos aktivitás elkerülhető legyen.

Kísérletek történtek a hőstabilitásért felelős génszakaszok felderítésére is. Ismert hogy a BAA termostabilitása századrésze a BLA termostabilitásának. Ezért e két faj génjeinek adott szakaszait cserélték ki egymással és vizsgálták a képződő enzim termostabilitását¹⁰⁰. Ilyen kiméra gének előállításával sikerült a vad típusúnál stabilabb enzimet létrehozni. Ebben egy negyedik Ca²⁺ kötő hely található a C doménben, ahol két β -redő között hidat alkot. Akarból komplexében dekaszacharidot figyeltek meg, ami csak kétlépéses transzglikozilezéssel képzelhető el¹⁰¹. Szerkezeti mutagenézissel is sikerül nagyobb hőstabilitású enzimet előállítani, ez Asp190 helyett fenilalanint tartalmazott, stabilitása hatszorosára nőtt¹⁰².

A vad típusú enzimmel vizsgálták a bontási képet maltooligoszacharidok (DP1-10) alkalmazásával. Az enzim csak a DP>5 szubsztrátokat bontotta. Termékarányokat nem határoztak meg, de megállapították hogy DP6-8 esetén G5, ennél hosszabb szubsztrátokból a G3 a fő termék¹⁰³. Leírták, hogy a hőmérséklet növelése befolyásolja a termékarányokat, magasabb hőmérsékleten homogénebb termékeloszlást kaptak keményítő szubsztráttal¹⁰⁴.

Mivel a BLA-t növényi sejtfalból való keményítő eltávolításra is használják, és ehhez szerves-vizes oldószerkeletet alkalmaznak, vizsgálták az amiláz aktivitást etanol jelenlétében. Az aktivitás 40% alkohol tartalomig nem változik, 80% alkohol tartalom inaktíválja az enzimet. Az amilázon mért bontási kép is megváltozik etanol hatására, a kisebb tagszámú termékek aránya növekszik az egyensúlyi elegyben¹⁰⁵.

III. Saját vizsgálatok

III.1. Szintetikus munkához kapcsolódó elválasztások

A szénhidrátok biológiai szerepének mind alaposabb megismerése intenzív kutatásokat indított a szerves szénhidrátkémia, a modern elválasztástechnikai és szerkezetvizsgáló módszerek szénhidrátkémiai alkalmazása területén egyaránt. A biológiai szempontból különösen érdekes szénhidrátok főként oligoszacharidok és poliszacharidok, valamint ezek más természetes anyagokkal képzett konjugátumai az úgynevezett glikokonjugátumok. Ezek szerepe rendkívül sokrétű, mint ahogy rendkívüli változatosságot mutatnak szerkezetük szerint is. A legizgalmasabb terület azon szénhidrátok kutatása, amelyek molekuláris jelekként felismerhetővé teszik a sejteket egymás számára és lehetővé teszik a környezethez való megfelelő orientációjukat. Az oligoszacharidok szintézise során két polifunkciós molekulát kell regio- és sztereoszelektív módon glikozidos kötéssel összekapcsolni. Ez csak megfelelő védőcsoportok, szintézisstratégiák, sztereoszelektív szintézismódszerek alkalmazásával lehetséges. A szintézistermékek tisztítása általában szilika oszlopon való kromatográfiával történik. Gyakran azonban az izomerek oszlopon elérhető elválása nem elegendő a termékek –a szerkezetvizsgáló módszerek által megkövetelt tisztaságban való– kinyeréséhez. Másrészt a többlépéses, bonyolult védőcsoportstratégiát igénylő szintézisek miatt a végtermék oligoszacharid gyakran csak igen kis mennyiségben (néhány 10 mg) áll rendelkezésre. Ilyenkor a félpreparatív HPLC jó lehetőség nagyobb felbontóképessége, érzékeny detektálási módja miatt.

A szintetikus szénhidrátkémiában számos védőcsoportot alkalmaznak, de univerzális védőcsoport nem létezik, így a védőcsoportok és glikozilezési módszerek variálása szinte minden szintézist egyedivé tesz. Ugyanígy egyedi feladat a szintézisek során a reakciók követése, vagy a termékek kinyerése elválasztástechnikai módszerekkel.

A szintézisekhez kapcsolódó HPLC elválasztásokat az alábbi csoportosításban foglaltam össze:

1. Preparatív elválasztások
2. Analitikai elválasztások
 - metil-glikozidok előállítása során
 - maltooligoszacharid szubsztrátok vizsgálatakor

III.1.1. Preparatív elválasztások

A preparatív HPLC definíció szerint olyan speciális kromatográfias eljárás, amelynek célja tiszta anyagok izolálása. Ebbe a fogalomba belefér a néhány nanogramm biológiailag aktív oligoszacharid izolálásától a néhány kilogramm szintetikus oligoszacharid származék kinyeréséig minden elválasztás¹⁰⁶. A fő, lényegi különbség a preparatív és analitikai HPLC között, hogy míg az analitikai HPLC-ben a cél az anyagok mennyiségének pontos meghatározása és ehhez eszköz a minta komponenseinek elválasztása, addig a preparatív HPLC esetén a cél az anyag izolálása megfelelő elválasztás után. Ehhez eszköz a detektálás, ami lehetővé teszi a komponensek retenciós idejének/térfogatának meghatározását végső soron a megfelelő frakciók kijelölését.

Félpreparatív célokra jól alkalmazhatóak az analitikai készülékek olyan kis változtatásokkal, mint nagyobb térfogatú injektor beszerelése, nagyobb áramlási sebesség alkalmazása és a frakciószedés lehetőségének kialakítása a detektor után.

A detektálást tekintve a preparatív HPLC céljaira jobban megfelel egy általános detektor (pl. RID), mert alkalmazásával minden komponens megjelenik a kromatogramon¹⁰⁶. A nagyobb mintamennyiségek miatt a kisebb érzékenység nem okoz gondot, hátrány viszont hogy gradiens elucióra ez a detektor nem alkalmas. Az RID másik előnye, hogy tömegszelektív detektor lévén a csúcs alatti területek alapján az anyagok relatív mennyiségi viszonyai jobban láthatók, bár ez csak rokon vegyületeknél igaz, hiszen a különböző vegyület típusok törésmutatója különbözhet. A szelektív detektorok (pl. DAD) hasznosak annak eldöntésére melyik csúcs tartozik az elválasztani kívánt komponenshez (spektrális adatok). Az UV detektálás alkalmas UV aktív védőcsoportok jelenlétében, amelyek szerencsére elég gyakoriak a szintetikus szénhidrátkémiában (benzil, fenil, tozil, p-nitro-fenil ...).

Bár a preparatív HPLC szigorú követelményeket támaszt az elválasztást illetően, a nagy mintamennyiségek és injektált térfogat miatt a csúcsok alakja nem olyan szimmetrikus mint analitikai HPLC esetén. A detektorjel nem növelhető korlátlanul, ezért a fő komponensek csúcsai többnyire „levágódnak”, az így meghatározott csúcs integrálok nem arányosak a koncentrációval.

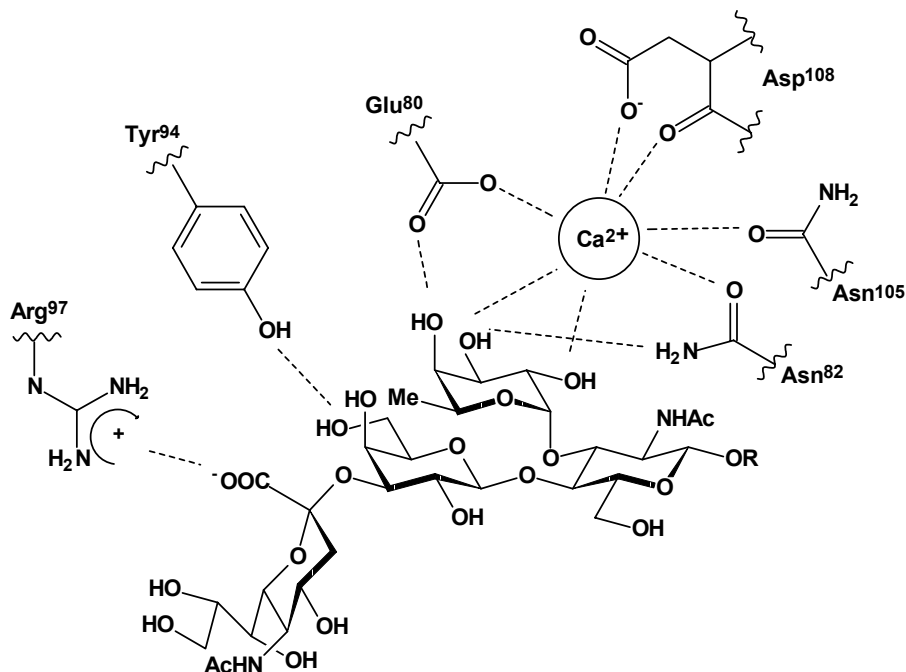
Munkámhoz a szénhidrátok elválasztására leggyakrabban használt állófázisok (szilika-, amino- és C18) álltak rendelkezésre félpreparatív méretben (10 mm * 250 mm) is. A poláros állófázisok kapacitása 20-100 mg, míg a fordított fázis kapacitása egy nagyságrenddel kisebb, 1-10 mg (természetesen elválasztástól függően). Az elválasztásokhoz jó előkísérlet a vékonyréteg-kromatográfia (VRK). Tapasztalatom szerint szilika állófázis alkalmazása esetén

gyakran alkalmazható a konvencionális Merck szilika 60 (5554) rétegen végzett VRK alapján megfelelőnek talált eluens minden módosítás nélkül. Fordított fázisú elválasztásoknál is végeztem VRK-s kísérleteket és azt tapasztaltam hogy a Merck HPTLC (5914) réteg elválasztási tulajdonságai hasonlóak a LiChrospher C18 oszlophoz de a Whatman (LKC18) réteg lényegesen eltérő elválasztást mutat. Az aminopropil-szilika állófázis VRK alkalmazása nem igazán elterjedt, ez a réteg lényegesen drágább és csak néhány cég gyártja. Az amino fázis félpreparatív alkalmazásakor a korábban analitikai HPLC módszerként már bevált rendszert alkalmaztam. A kinyert vegyületek tisztaságát VRK, HPLC, NMR vagy MALDI-TOF MS vizsgálat igazolta.

A tanszéken folyó szintetikus kémiai kutatási programok részeként megvalósított félpreparatív elválasztásokat a biológiai szerep szerint csoportosítva mutatom be.

III.1.1.1. Szialil LewisX analógok szintézise

A sejtadhéziós molekulák csoportjába tartozó szelektinek fontos szerepet játszanak a rákos sejtek metasztázisának folyamatában. A szelektinek természetes liganduma a szialil LewisX (sLe^X) elnevezésű tetraszacharid (5. ábra), amely fehérjékhez, vagy lipidekhez kötötten fordul elő a szervezetben.

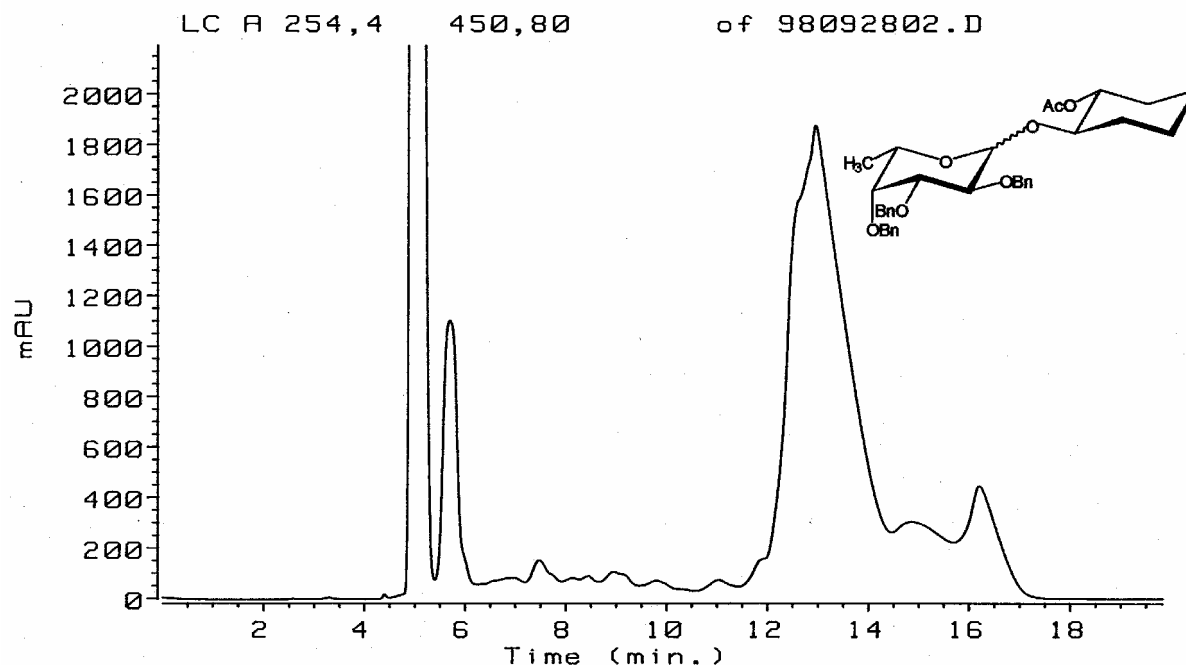


5. ábra Szialil LewisX fehérjéhez történő kötődésében résztvevő csoportok

A malignus sejtek, a felületükön megjelenő sLe^X molekulák segítségével, a keringésből a környező szövetekbe jutva áttéteket eredményeznek. A szelektinek kötőhelyének mesterséges ligandumokkal történő lefedése megakadályozhatja a transzformált sejtek kötődését, és így a keringésből történő kijutását. Ezért élénk kutatás indult a sLe^X analógok iránt, mely során kiderült, hogy a kötődéshez nem szükséges a teljes tetraszacharid, csak annak néhány csoportja játszik szerepet¹⁰⁷:

- A fukóz egység 2,3,4 helyzetű hidroxil csoportja,
- A neuraminsav karboxil csoportjának negatív töltése,
- A galaktóz egység 4,6 helyzetű hidroxil csoportja,
- A GlcNAc csak hídmolekulaként szerepel¹⁰⁸.

A szerkezetileg lényegesen egyszerűbb mimetikumok inhibíciós értéke elérheti, sőt meg is haladhatja a természetes sLe^X molekuláét. A tervezett analóg GlcNAc helyett 1,2-transz-ciklohexándiolt tartalmaz, ami biztosítja a kötődéshez megfelelő térszerkezetet. Az (1R,2R)-transz-1,2-ciklohexándiol és az etil-2,3,4-tri-O-benzil-1-tio-β-L-fukopiranozid kapcsolási reakciójában¹⁰⁹ α:β≈5:1 anomer keverék keletkezett, melynek félpreparatív elválasztása acetilezett formában, fordított fázisú kromatográfiával történt.



6. ábra Pseudo diszacharid tisztítása fordított fázisú kromatográfiával

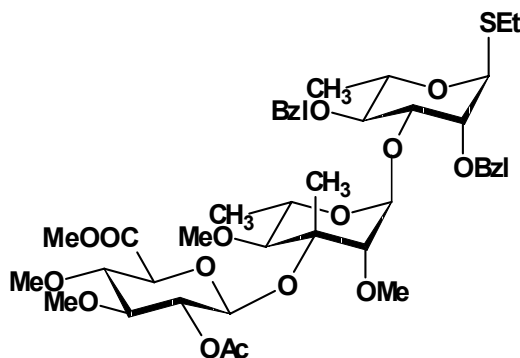
Körülmények: Kolonna: C18, 250 * 10 mm, 10 μm, eluens: MeCN:víz=9:1, 3ml/perc, detektor: DAD 254 nm

A nagyobb mennyiségben jelenlevő, 13 perc retenciós időnél eluálódó α -glikozidot 72 %-os hozammal izoláltam a 16 percnél eluálódó β -anomer mellől. A C18 fázis viszonylag kis kapacitása miatt egyszeri injektálással 2-5 mg anyagot sikerült tisztán kinyerni. Mivel ez a pszeudo-diszacharid a Sialil LewisX analóg előállítás első lépése, a drága alapanyag és a költséges termék tisztítás miatt más reakció utat kellett keresni¹⁰⁹.

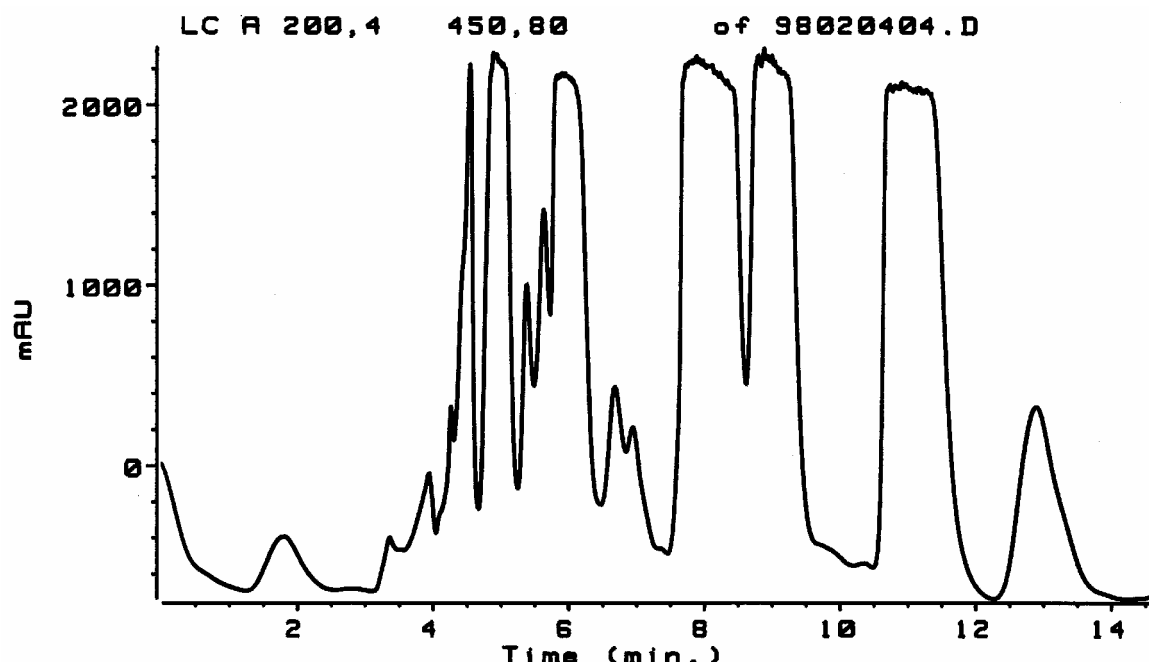
III.1.1.2. *Mycobacterium avium* sejtfelszíni antigénjei

A *Mycobacterium*ok a Gram-pozitív mikroorganizmusok közé tartoznak és részben humán patogén baktériumok. A *M. avium*-*M. intercellulare* komplex a tüdőt és más belső szerveket támadja meg. Az egészséges szervezet viszonylag könnyen kivédi ezt a fertőzést, de az immunrendszer gyengülése (szervátültetés, AIDS) esetén komoly fertőzéseket okoz. A fertőzés szerodiagnosztikájára alkalmasak a sejtfal poláros glikolipidjeinek oligoszacharid komponensei¹¹⁰. A *M. avium* 19. szerovariánssa pentaszacharid antigénjének szintézise során a védett triszacharidot C18 és Si oszlopon választottam el.

A triszacharid a megfelelő diszacharid donor és etil 2,4-di-O-benzil-1-tio- α -L-ramnopiranozid kapcsolási reakciójában képződött¹¹¹ (Tóth Anikó, Bajza István).



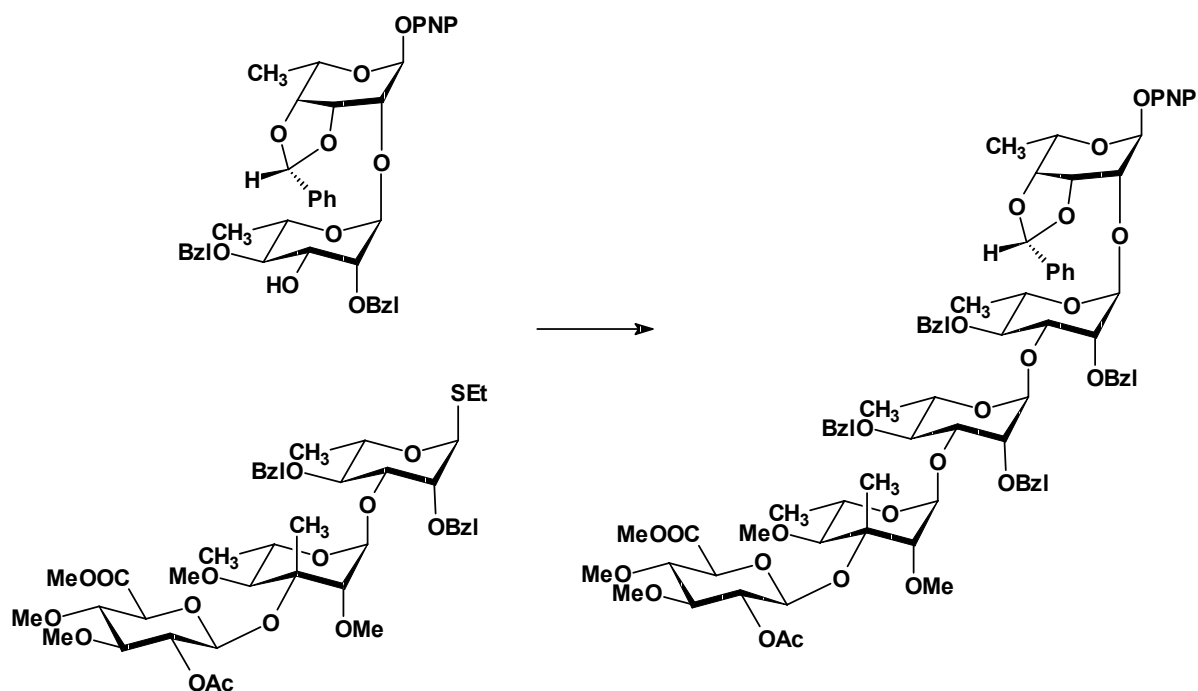
A normál fázisú elválasztás szilika állófázison nem járt sikerrel, ezért a reakcióelegy elválasztását fordított fázison is elvégeztem. Előkísérletként C18 vékonyrétegen különböző eluenseket próbáltam ki és a legjobbnak talált MeCN:víz=9:1 eleggyel végeztem el az elválasztást. A triszacharid 11 perc körüli retenciós idővel eluálódott, valamennyi reaktánstól és bomlásterméktől jól elválva. Mivel a molekula csak két benzil védőcsoportot és tioetil aglikont tartalmaz a detektálás 200 nm hullámhosszon történt.

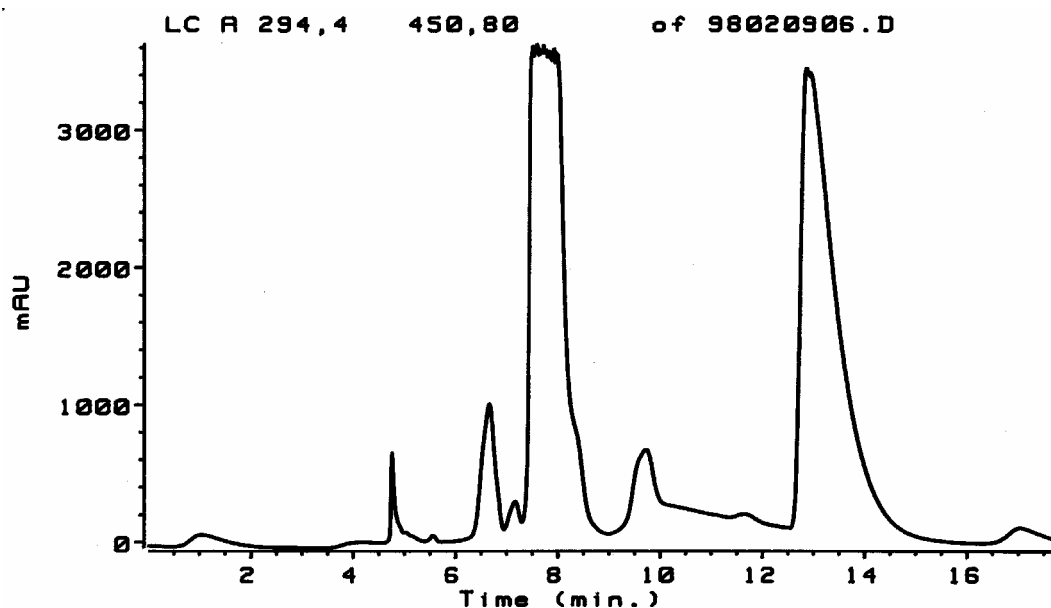


7. ábra Triszacharid elválasztása fordított fázisú kromatográfiával

Körülmények: kolonna: C18 , 250 * 10 mm, 10 μ m, eluens: MeCN:víz=9:1, 3ml/perc, detektor: DAD 200 nm

Az így tisztított triszacharidból 2+3 blokk szintézissel állítható elő pentaszacharid¹¹ (Tóth A., Bajza I.).

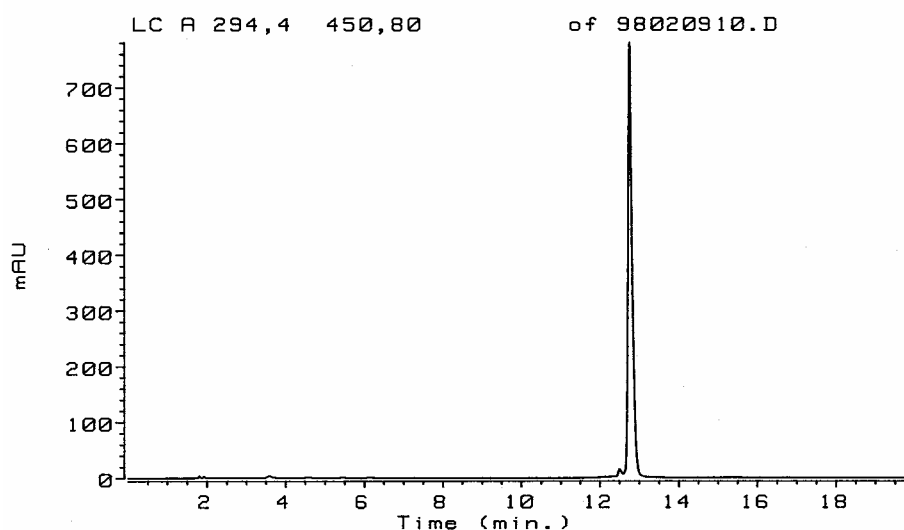




8. ábra Pentaszacharid tisztítása

Körülmények: Kolonna: Si, 250 * 10 mm, 5 μ m, eluens: Hexán:EtOAc=6:4, 3ml/perc, detektor: DAD 294 nm

A pentaszacharid 4-nitro-fenil (PNP) aglikont tartalmaz így 294 nm-en detektálható, 13 percnél eluálódik. Ugyanez az aglikon található az akceptor diszacharidon, így ez a vegyület egyszerűen azonosítható 8 perc körüli retenciós időnél. Ez a komponens is kinyerhető. A donor triszacharid, illetve a belőle képződő hidrolízis termék 9,5 perces retenciós idővel eluálódik, benzil védőcsoportjai miatt ezen a hullámhosszon csak kis intenzitással detektálható..



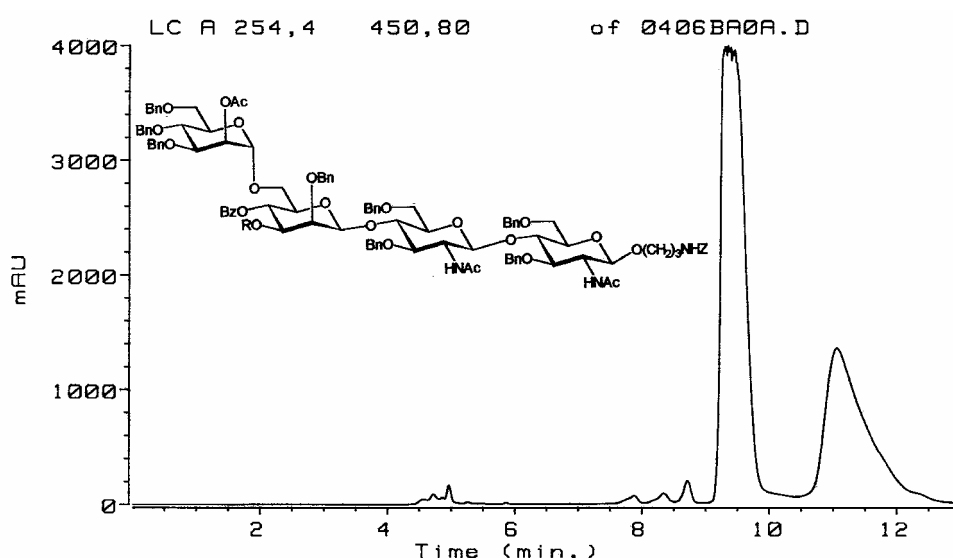
9. ábra Pentaszacharid analitikai kromatogramja tisztítás után.

A kinyert pentaszacharid 9. ábrán látható kromatogramja szemlélteti a tisztítás eredményességét.

III.1.1.3. N-glikoprotein antennák törzs oligoszacharidjának szintézise

A legtöbb N-glikoprotein oligoszacharid komponense egy pentaszacharid törzs részt tartalmaz, amelyben egy kitobióz egységhez β -mannozidos egység kapcsolódik. Az elágazást két α -mannozidos kötés jelenti 3 és 6 pozícióban. A β -mannozidos kötés kialakítása az oligoszacharid kémia egyik legnehezebb feladata¹¹². A törzs oligoszacharid elágazásait tovább építve a legváltozatosabb biológiai funkciójú glikopeptidek szintetizálhatóak. A redukáló végen található csoportnak alkalmasnak kell lennie a későbbi aminosavhoz történő kapcsolásra. A humán choriogonadotropin hormon (hCG) α -alegységében található egyik oligoszacharid előállításra irányuló kísérletekhez¹¹³ védőcsoportokat tartalmazó tetra-, penta- és egy hexaszacharid elválasztását végeztem el.

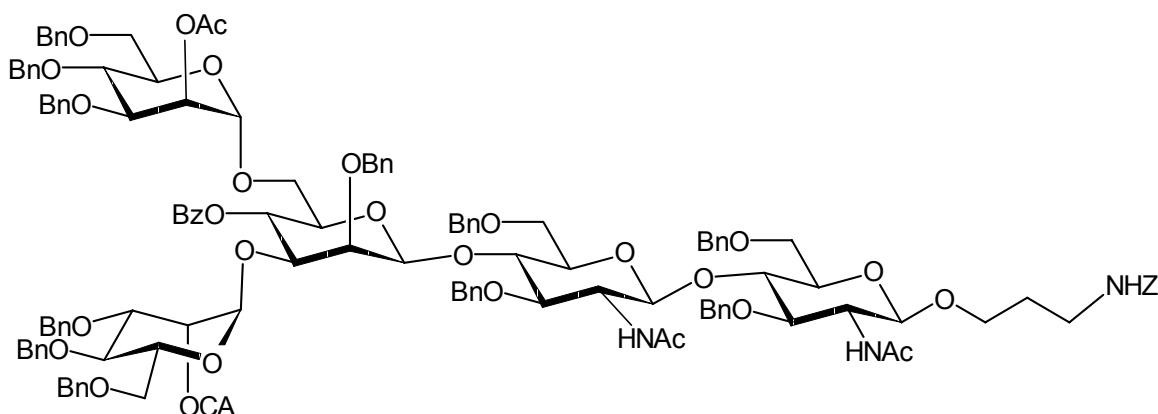
A pentaszacharid előállításához szükséges tetraszacharid akceptor a megfelelő 3-O-allil származékból az allilcsoport szelektív eltávolításával készült (Hajkó János). A kis polaritási különbség miatt az oszlopkromatográfiával történő tisztítás után relatíve nagy mennyiségű, mindkét komponenst tartalmazó frakció maradt. Ezt az elegyet tisztítottam szilika állófázison.



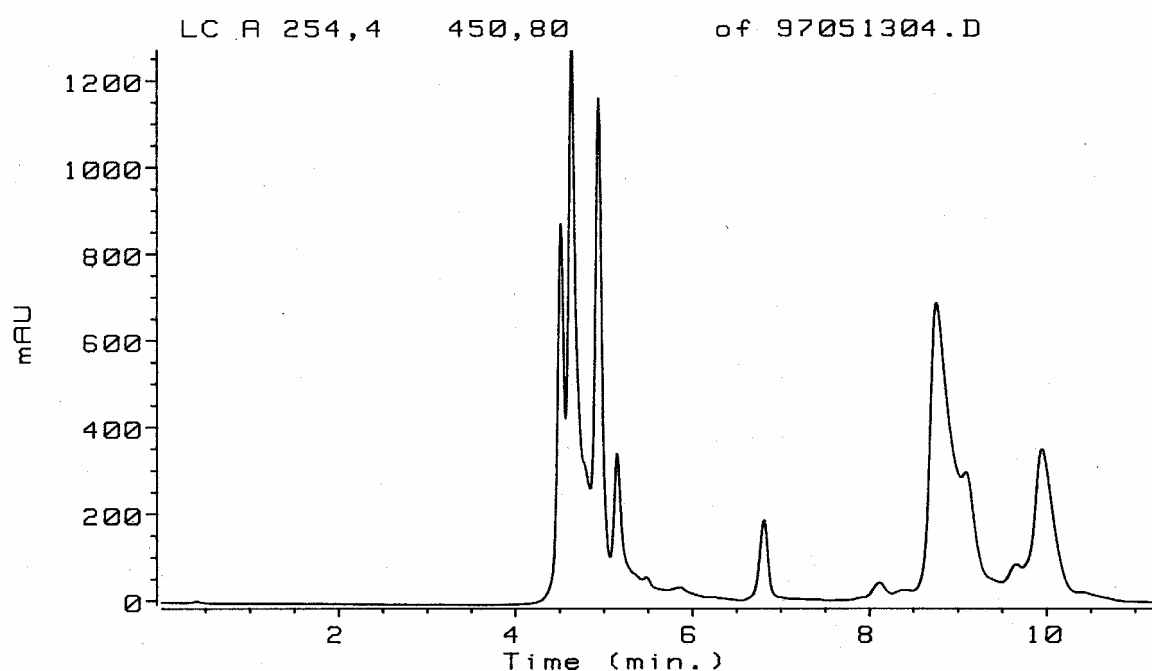
10. ábra Tetraszacharid akceptor tisztítása

Körülmények: Kolonna: Si, 250 * 10 mm, 5 μ m, eluens: DKM: MeOH=98:2, 3ml/perc, detektor: DAD 254 nm, R= allil Rt: 9,5 perc, R=H Rt: 11 perc

A szabad hidroxil csoportot tartalmazó tetraszacharid polárosabb, mint a teljesen védett, ezért jobban kötődik a szilika fázishoz, nagyobb retenciós idővel eluálódik. 11 mg tetraszacharidot sikerül kinyerni, amelyet monoszacharid donorral kapcsolva a védett törzs pentaszacharid képződött.



A penta és tetraszacharid elválasztásához az előbbi kromatográfiás rendszert alkalmaztam.

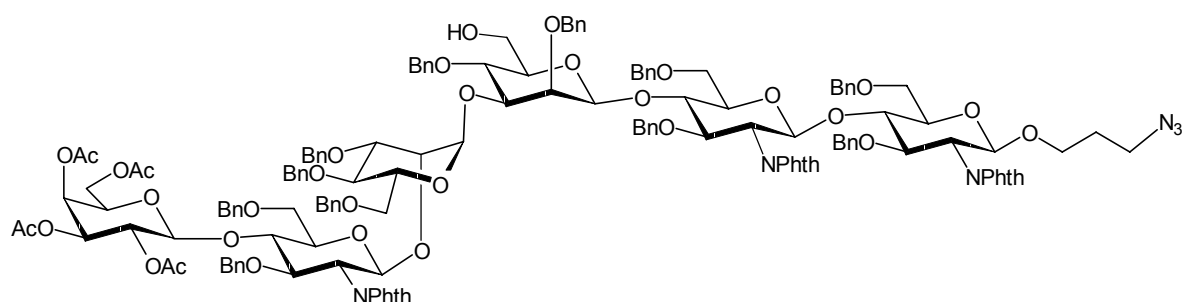


11. ábra Védett törzs pentaszacharid tisztítása

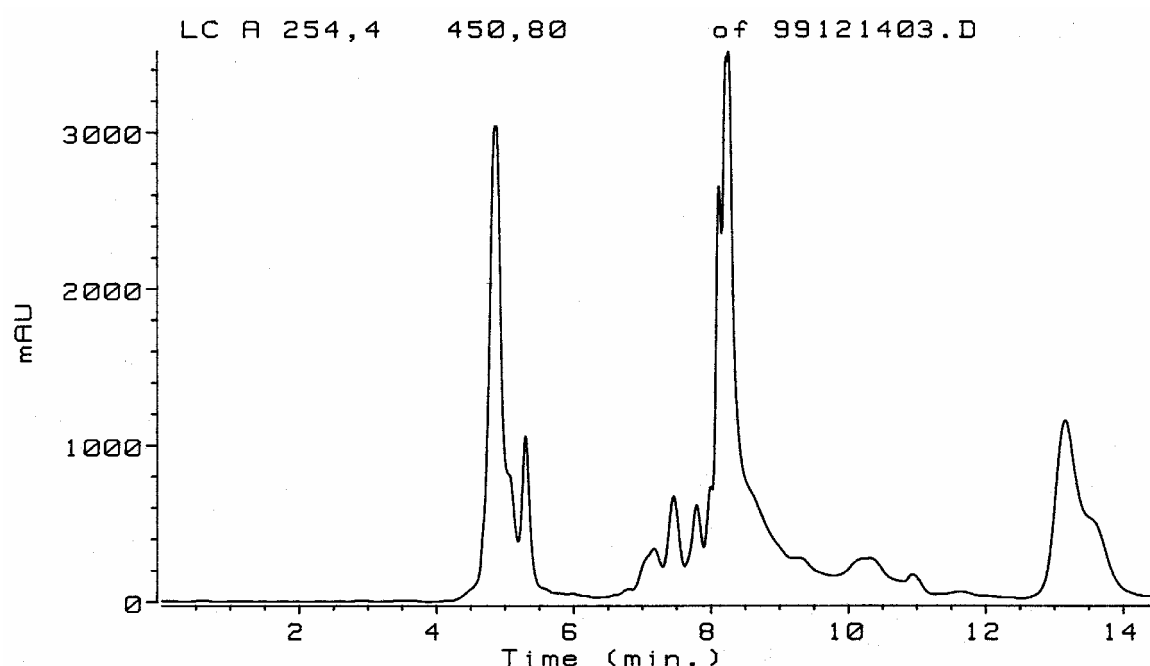
Körülmények: Kolonna:Si, 250 * 10 mm, 5 µm, eluens: DKM: MeOH=98:2, 3ml/perc, detektor: DAD 254 nm

A kromatogram elején különböző bomlástermékek csúcsai láthatók, a kinyerni kívánt pentaszacharid 9 perc körüli retenciós időnél, míg a tetraszacharid akceptor szabad hidroxil csoportja miatt később, 10 perces retenciós idővel eluálódott.

Ugyanezen témához kapcsolódóan, de más védőcsoport stratégiát követve történt a következő hexaszacharid akceptor előállítása (Hajkó János) a teljesen védett oligoszacharidból szelektív védőcsoport eltávolítással.



A szabad hidroxil csoporthoz oligoszacharid donort kapcsolva alakítható ki a törzs oligoszacharid elágazása. A védőcsoport eltávolítás sikerességének NMR vizsgálattal történő igazolásához volt szükség a kis mennyiségű hexaszacharid tisztítására.



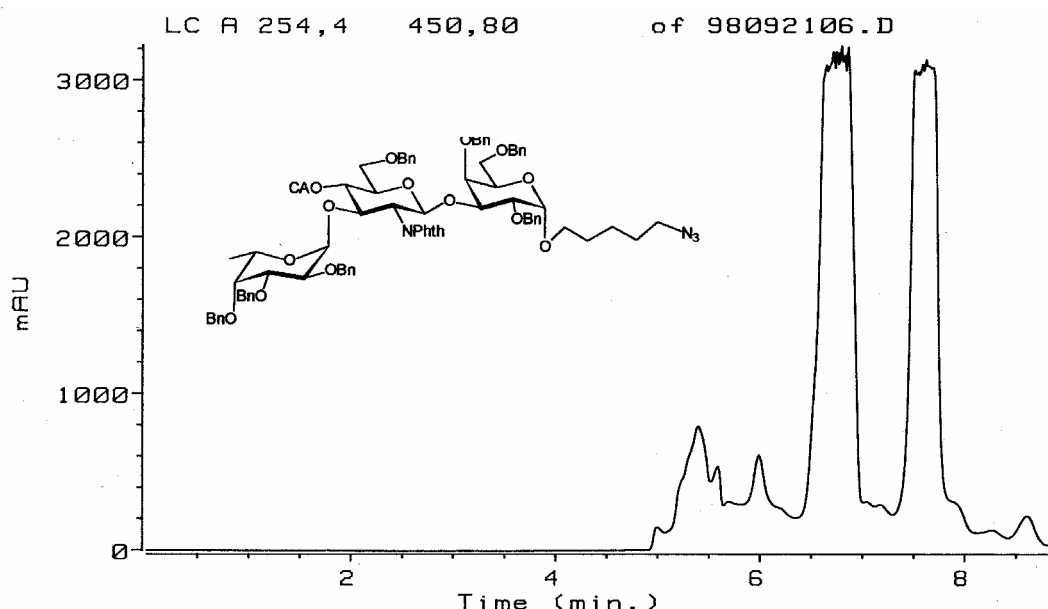
12. ábra Hexaszacharid tisztítása

Körülmények: Kolonna: Si, 250 * 10 mm, 5 µm, eluens: hexán: EtOAc=1:1, 3ml/perc, detektor: DAD 254 nm

Az elválasztást szilika állófázison, hexán:etilacetát oldószerkeleggyel valósítottam meg, a hexaszacharid 8,5 perces retenciós idővel eluálódott. A teljesen védett oligoszacharid csúcsa kisebb retenciós időnél található, míg a 13 percnél eluálódó komponens valószínűleg több szabad hidroxilt tartalmazó bomlástermék.

III.1.1.4. *Schistosoma mansoni* fertőzés kimutatása

A *Schistosoma mansoni* által okozott parazitafertőzés több mint 200 millió embert érint a trópusi és szubtrópusi országokban. A fertőző parazita állapot, a cercaria, a bőrön keresztül jut be a gazdaszervezetbe és gyulladást okoz. Ez az állapot a fertőzést követő három hétig tart, ekkor a jelen levő fiatal schistosomolum érzékeny az immunvédekezésre. A parazita életciklusának ebben a fázisában külső felületét 1 μm vastag, erősen immunogén, fukózból gazdag glikokalix (GCX) borítja¹¹⁴. Mivel a glikokalix jól definiált, tiszta oligoszacharid komponensei biológiai forrásból csak kis mennyiségben nyerhetők ki, ezért a komponensek immunológiai stimulációban játszott pontos szerepének felderítéséhez és diagnosztikai célokra ezek szintézisét végezték el¹¹⁵. A szintézisekhez kapcsolódóan egy triszacharid és egy tetraszacharid félpreparatív elválasztására került sor.

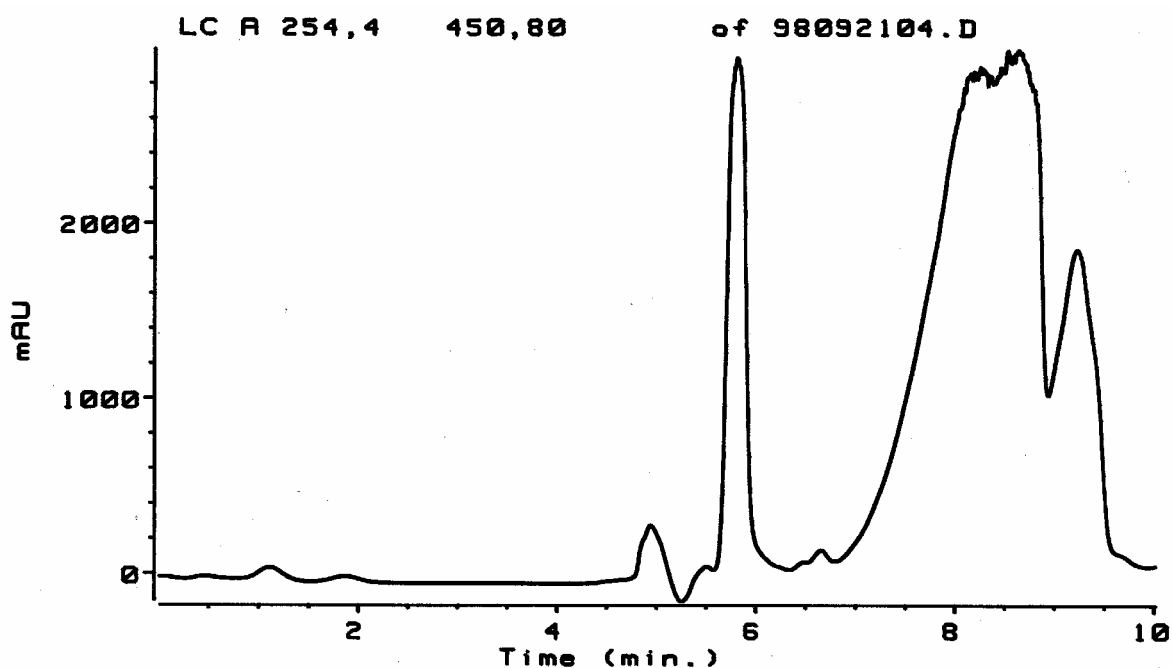
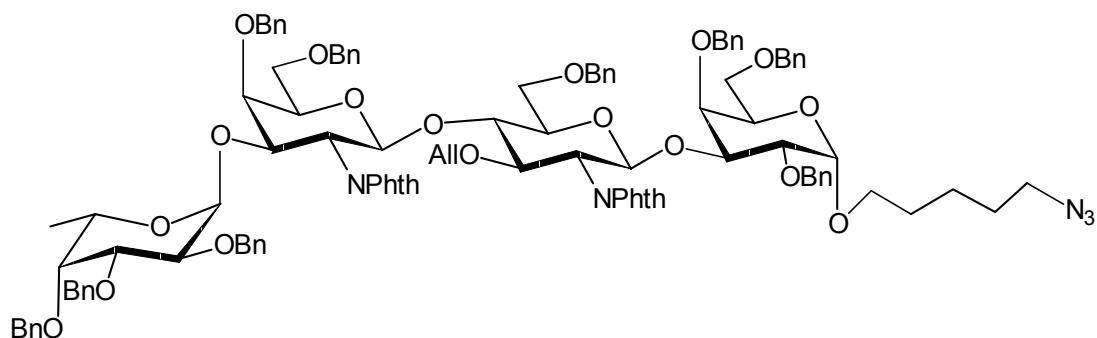


13. ábra Triszacharid elválasztása

Körülmények: Kolonna: Si 250 * 10 mm, 10 μm , eluens: hexán:EtOAc=7:3, 3 ml/perc, detektor: DAD 254 nm

A triszacharid elválasztásához szilika oszlopot és hexán: etilacetát oldószerkeletet használtam. A benzil és ftaloil védőcsoportok miatt a detektálás 254 nm-en történt. A 6,5 perc retenciós időnél jelentkező szennyező valószínűleg a diszacharid donorból keletkező bomlástermék, vagy a maradék monoszacharid akceptor.

A tetraszacharid előállítása 2+2 blokk szintézissel történt¹¹⁶.



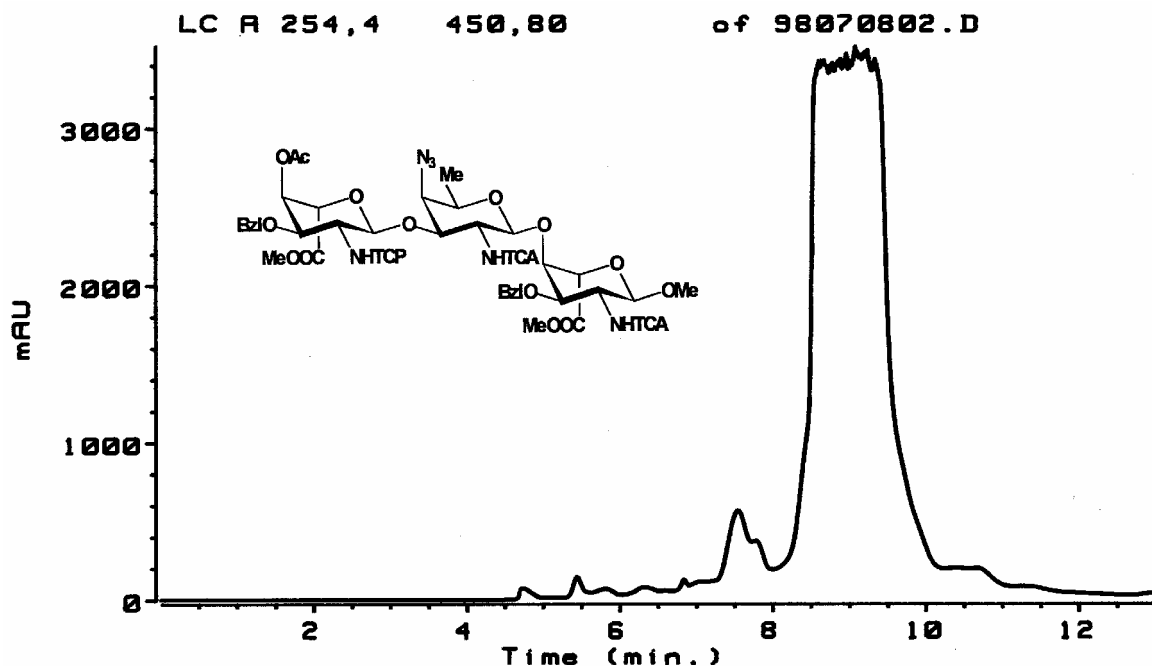
14. ábra Tetraszacharid tisztítása

Körülmények: Kolonna: Si 250 * 10 mm, 10µm, eluens: Hexán: EtOAc=7:3, 3 ml/perc, detektor. DAD 254 nm

A félpreparatív elválasztást szintén szilika oszlopon, hexán:etilacetát eluenssel, végeztem. A fő komponens nem vált el teljesen a szennyezőtől, de megfelelő frakciószedéssel sikerült a tetraszacharidot megtisztítani. Az eluens polaritásának csökkentésével növelhető az elválás, de ez a retenciós idő növekedésével is jár, ami megnöveli az elválasztás időszükségletét. Ez

III.1.1.5. Mesterséges vakcina kifejlesztése *Shigella sonnei* fertőzés ellen

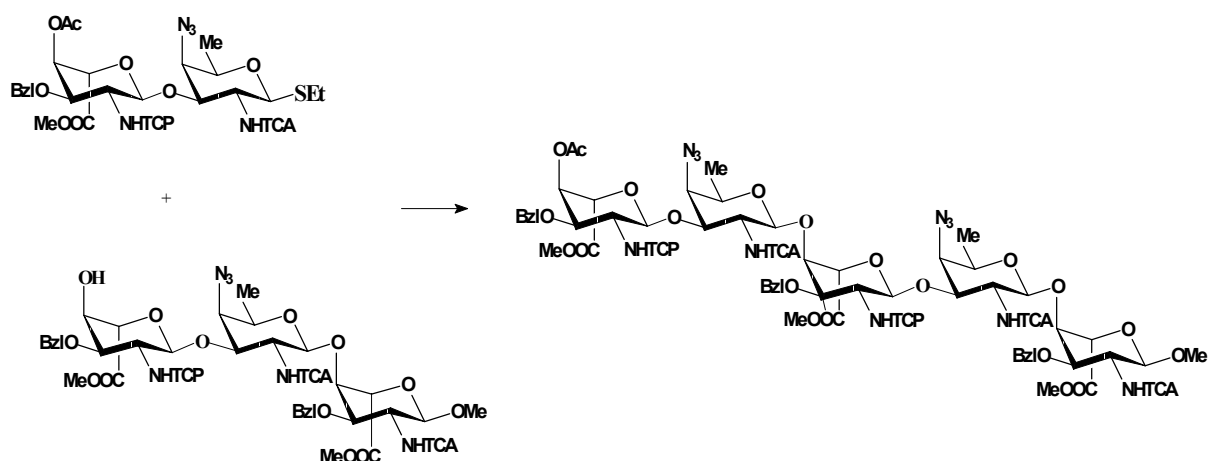
39



15. ábra Védett triszacharid tisztítása

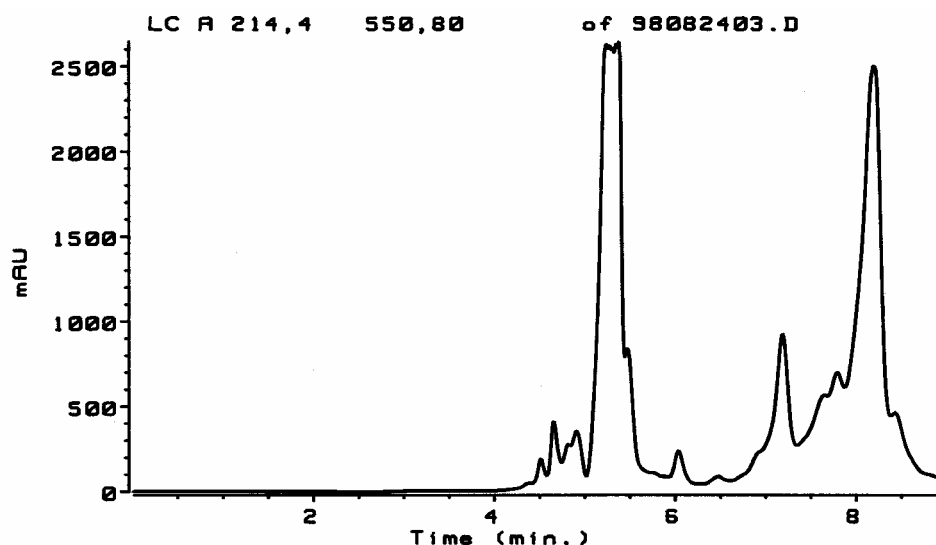
Körülmények: Kolonna:Si, 250 * 10 mm, 5 μ m, eluens: hexán:EtOAc=1:1, 3ml/perc, detektor: DAD 254 nm

A triszacharidból az acetyl csoport eltávolításával előállított akceptor és tioglikozid diszacharid donor kapcsolásával képződött a pentaszacharid¹¹⁹.



Tisztításához szilika állófázist és hexán:aceton=6:4 eluent használtam. A tetraklór fenil (TCP) és benzil védőcsoportok lehetővé tették az UV detektálást, de az aceton miatt, amelynek elnyelési maximuma van 270 nm hullámhossznál 230 -310 nm között, 214 nm-nél az aceton elnyelési minimumán detektáltam a komponenseket. A pentaszacharid 8 percnél

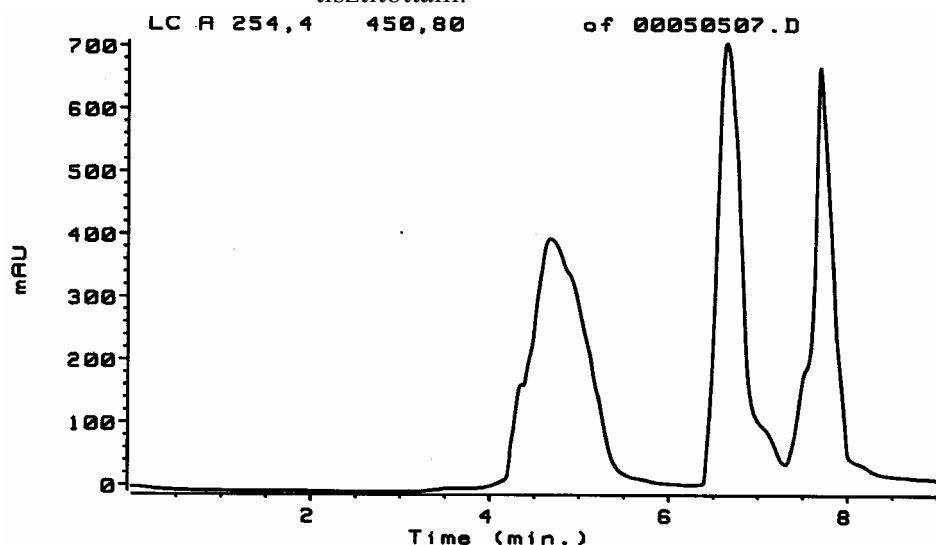
eluálódott.



16. ábra Védett pentaszacharid tisztítása

Körülmények: Kolonna:Si, 250 * 10 mm, 5 μ m, eluens: hexán: aceton=6:4, 3ml/perc, detektor: DAD 214 nm

Egy más úton előállított tetraszacharidot a védőcsoportok részleges eltávolítása után tisztítottam.



18. ábra Tetraszacharid komponensek elválasztása

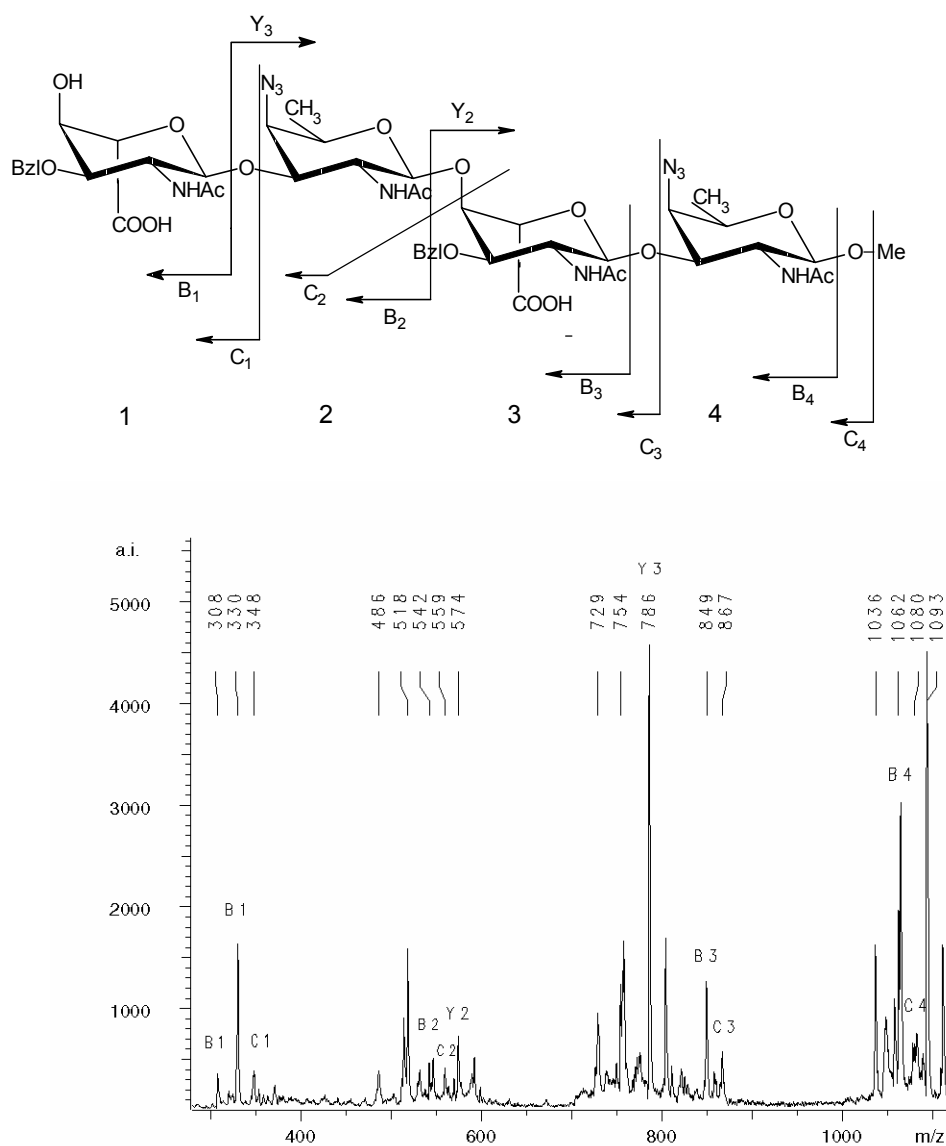
Körülmények: Kolonna:C18, 250 * 10 mm, 10 μ m, eluens: MeCN:víz=9:1, 3ml/perc, detektor: DAD 254 nm

A VRK alapján egységesnek tűnő termék NMR vizsgálat alapján több komponensből állt. A fordított fázisú HPLC ezt igazolta, három komponenst sikerült elválasztani. Az így kinyert komponensek MALDI TOF tömegspektrometriás elemzése azonos molekulatömeget

mutatott, ami valószínűsíti konformációs izomerek jelenlétét. Egyik komponens PSD analízise igazolta a szekvenciát is, amint azt az 19. ábra és I. táblázat mutatja.

Az ábra és táblázat adataiból látható, hogy valamennyi glikozidos kötés hasadásához tartozó fragmentum megjelenik a spektrumon, ami a feltételezett szerkezetet igazolja. A legintenzívebb az Y_3 fragmentum, a nem redukáló végi monoszacharid egységen található szabad hidroxil csoport ugyanis kedvezővé teszi ennek a glikozidos kötésnek a hasadását.

A *Shigella sonnei* oligoszacharidok szintéziséhez kapcsolódó MALDI vizsgálatok közlésre kerültek¹²⁰.



19. ábra A tetraszacharid pozitív MALDI-TOF PSD spektruma és a fragment ionok azonosítása. Parent ion $[M+Na]^+$ m/z 1093.3

1. Táblázat

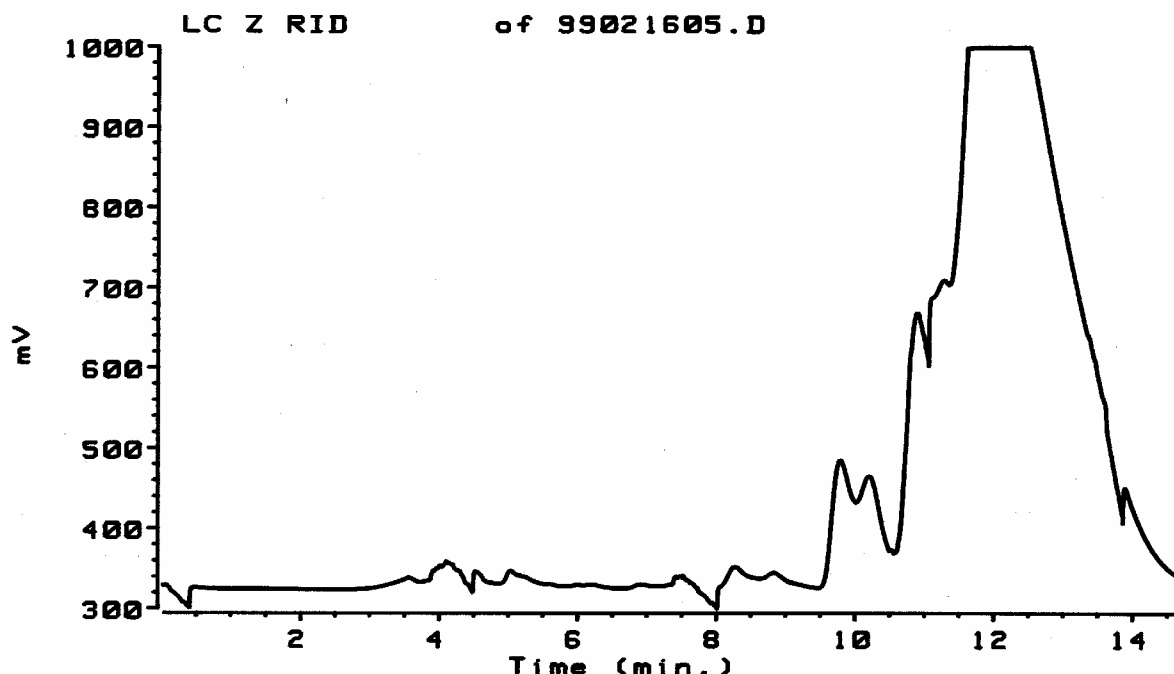
A tetraszacharid PSD fragmentációs analízisének eredményei

m/z		Hozzárendelt ion		Fragment ion típusa
mért	számított			
1093	1093.4	C ₄₇ H ₆₂ O ₁₉ N ₁₀ Na	M+Na ⁺	parent ion
1062	1062.4	C ₄₆ H ₅₉ O ₁₈ N ₁₀ Na	M+Na ⁺ -OMe	B ₄
849	850.3	C ₃₈ H ₄₇ O ₁₅ N ₆ Na	M+Na ⁺ -4	B ₃
542	542.2	C ₂₃ H ₃₀ O ₉ N ₅ Na	M+Na ⁺ -3-4	B ₂
308	308.0	C ₁₅ H ₁₈ O ₆ N	M+H ⁺ -2-3-4	B ₁
330	330.1	C ₁₅ H ₁₇ O ₆ NNa	M+Na ⁺ -2-3-4	B ₁
1080	1080.4	B ₄ +H ₂ O	M+Na ⁺ -OMe	C ₄
867	868.3	B ₃ +H ₂ O	M+Na ⁺ -1	C ₃
559	561.2	B ₂ +H ₂ O	M+Na ⁺ -1-2	C ₂
348	348.1	B ₁ +H ₂ O	M+Na ⁺ -1-2-3	C ₁
786	785.3	C ₃₂ H ₄₄ O ₁₃ N ₉ Na	M+Na ⁺ -1	Y ₃
574	573.2	C ₂₄ H ₃₂ O ₁₀ N ₅ Na	M+Na ⁺ -1-2	Y ₂
518	520.2	C ₂₃ H ₃₀ O ₉ N ₅	M+H ⁺ -1-4	
754	754.	C ₃₁ H ₄₁ O ₁₂ N ₉ Na	M+Na ⁺ -OMe-1	
486	485.2	B ₂ -NAc	M+Na ⁺ -3-4-NAc	
729	728.3	Y ₃ -NAc	M+Na ⁺ -1-NAc	
1036	1036.3	C ₄₅ H ₅₉ O ₁₈ N ₉ Na	M+Na ⁺ -NAc	

III.1.1. 6. Maltooligoszacharid szubsztrátok előállítása

A maltooligoszacharidok szerepével az amiláz enzimek vizsgálatában az enzimológiai vizsgálatok című részben részletesen foglalkozom. Itt csak a γ -ciklodextrinből acetolízissel előállított maltooktaóz (G8), a 4,6-benzilidén-4-nitrofenil-maltotetraozid (4,6-Bnl-PNP-G4) és a kemoenzimatiszvan előállított 2-klór-4-nitrofenil-maltooligoszacharid elegy (CNP-G8–CNP-G11) félpreparatív elválasztását mutatom be.

A γ -ciklodextrin gyűrűnyitásával előállított maltooktaóz- α -peracetát¹²¹ kinyerése acetilezett formában oszlopkromatográfiával történt. A dezacetilezés után kapott szubsztrát kis mennyiségű G5, G6, G7 szennyezőt tartalmazott.



20. ábra Maltooktaóz tisztítása fordított fázisú kromatográfiával

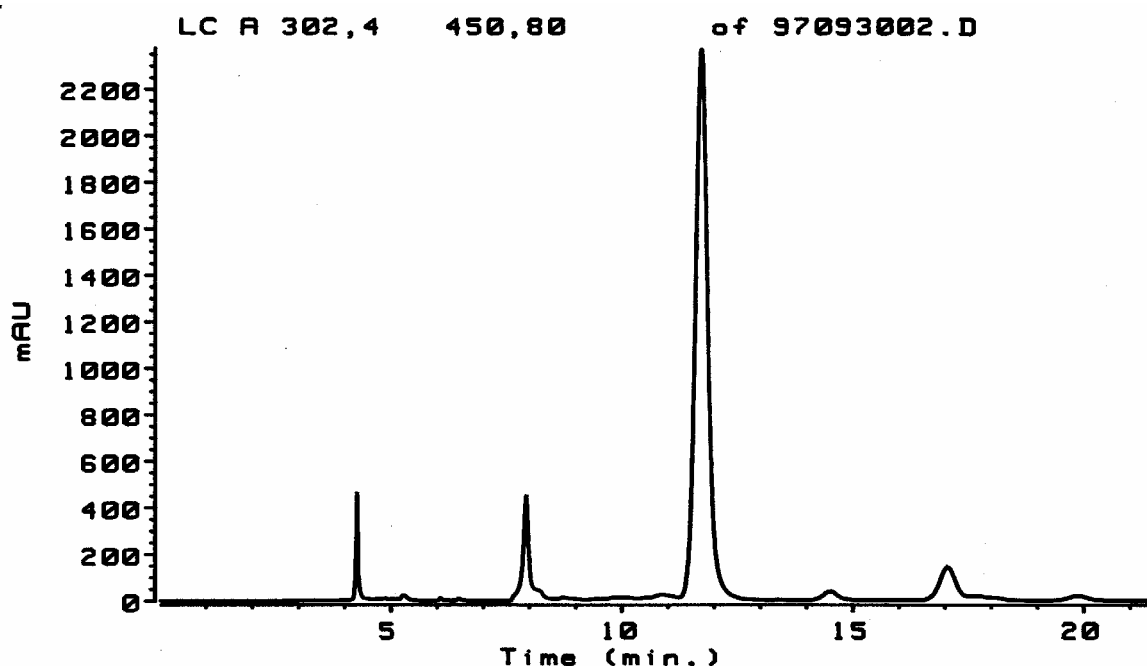
Körülmények: Kolonna: C18, 250 * 10 mm, 10 μ m, eluens: víz, 3ml/perc, detektor: RID

A *Bacillus licheniformis* α -amiláz bontási képének vizsgálatához és kinetikai mérésekhez ezért további tisztításra volt szükség. A maltooligoszacharidok fordított fázison víz eluenssel, RI detektálással elválaszthatók egymástól¹¹.

A kromatogramon látható, hogy a vizes oldatban jelenlevő α - és β -anomerek a G6 szennyező 10 perc körüli, és a G7 11 percnél látható csúcsai esetén részlegesen elválnak egymástól. Bármilyen szerves módosító (MeCN, MeOH) hozzáadása az eluenshez retenció

csökkenést okoz, ezért az elválasztás felbontása nem növelhető. Megfelelő frakciószedéssel és ismételt injektálással az enzimes mérésekhez elegendő (50 mg) szubsztrátot tisztítottam. Bár amino fázison sokkal jobb elválás érhető el maltooligoszacharidokra, preparatív kromatográfiájukhoz ez az állófázis nem alkalmazható. Az amino csoportok és a szabad cukrok aldehid csoportja közötti glikozilamin képződés miatt ugyanis az amino fázis megköti a redukáló cukrokat és ez alacsony kinyerést tesz lehetővé miközben az állófázis hatékonysága is leromlik¹²².

A szintén kémiai szintézissel előállított 4,6-Bnl-PNP-G4¹²¹ tisztítását is fordított fázisú kromatográfiával, C18 oszlopon, MeCN-víz=14:86 eluenssel valósítottam meg. A PNP aglikon jelenléte miatt a detektálás 302 nm hullámhosszon történt. Az oldatban szennyezőként G4, PNPG4 és Bnl-PNP-G5, -G6 és -G7 található.

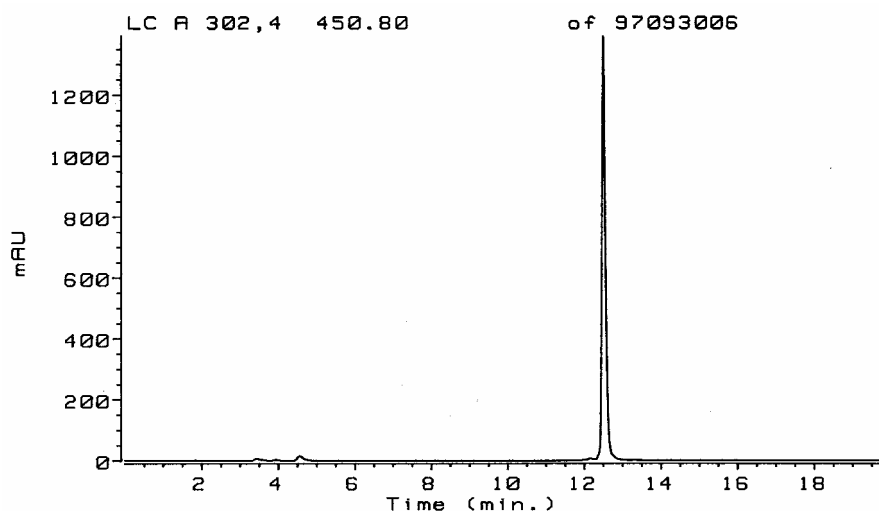


21. ábra 4,6-Benzilidén-4-nitro-fenil-β-maltotetraozid tisztítása fordított fázisú kromatográfiával

Körülmények: Kolonna: C18, 250 * 10 mm, 10 μm, eluens: MeCN:víz=14:86, 3ml/perc, detektor: DAD 302 nm

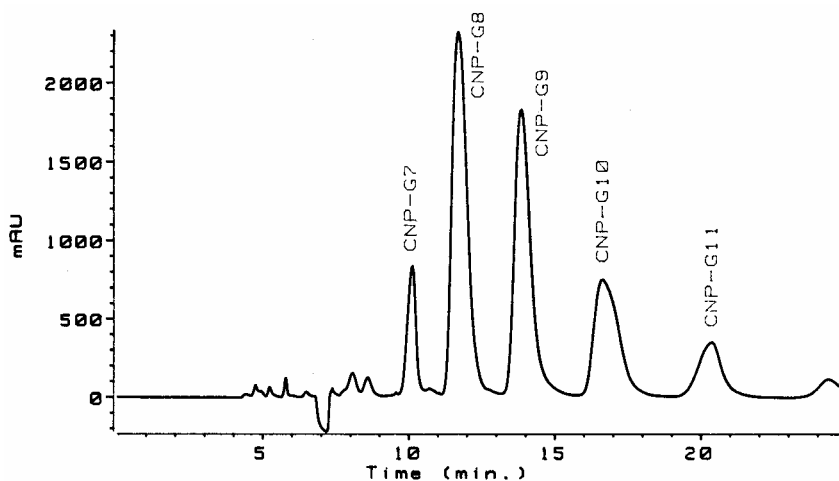
A szabad G4 a fronttal eluálódik, de csak RID-del detektálható, a PNP-G4 8 perc retenciós idővel, a hosszabb, benzilidén csoportot tartalmazó oligoszacharidok a fő komponensnél nagyobb retenciós időnél láthatók. Az így tisztított szubsztrátot humán nyál

amiláz bontási kép vizsgálatához használtuk. A szubsztrát kromatogramja a 22. ábrán látható, és demonstrálja a tisztítás hatékonyságát.



22. ábra 4,6-Bnl-4-nitro-fenil-maltotetraozid szubsztrát oldat (1,7 mM) kromatogramja
Körülmények: Kolonna: C18, 250 * 4 mm, 5 μ m, eluens: MeCN:víz=13:87, 1ml/perc, detektor: DAD 302 nm

A CNP-G7 primerből enzimés szintézissel előállított hosszabb oligomerek (DP 8-11) félépreparatív elválasztásához az analitikai módszerként bevált kromatográfiás rendszert alkalmaztam, amino oszlopon, acetonitril:víz eluenssel (23. ábra).



23. ábra Enzimés szintézissel előállított oligomerek tisztítása. Körülmények: Kolonna: NH₂ 250 * 10 mm, 5 μ m, eluens: MeCN:víz=7:3, 3 ml/perc, detektor: DAD 302 nm

A termékek azonosságát MALDI TOF MS igazolta. Az így kapott szubsztrátokat *Bacillus licheniformis* α -amiláz enzim bontási képének meghatározásához használtuk.

III. 1. 2. Analitikai elválasztások

III. 1.2.1. Metil-glikozidok előállítása

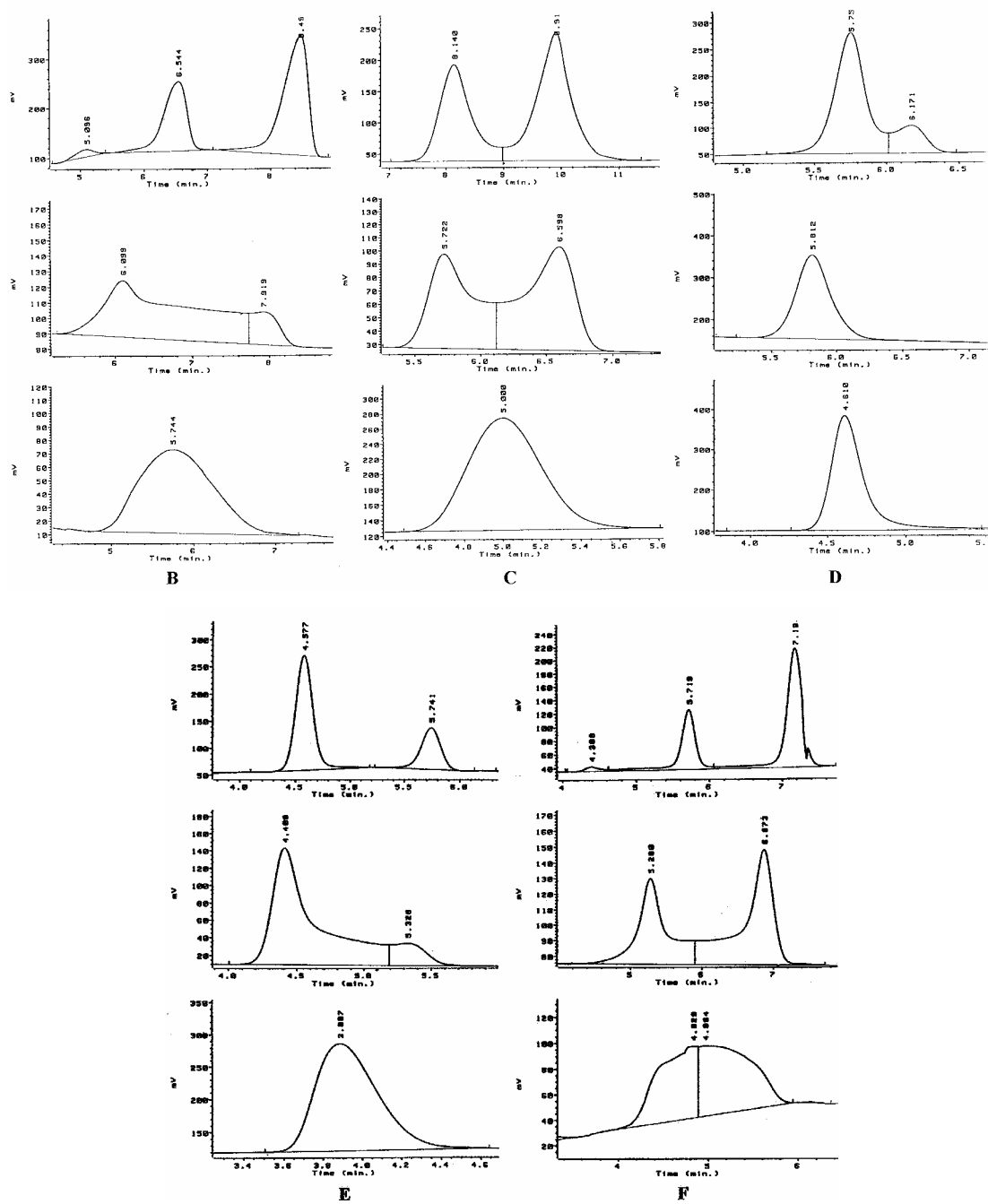
A közelmúltban egy új glikozid előállítási módot dolgoztak ki¹²³, melyben az egyensúlyi elegyből döntően anomer furanozidok mutathatók ki. Az eljárás röviden: a cukrot jódkatalizátort tartalmazó vízmentes alkohollal (metanol, etanol, propanol, butanol, oktanol) forralják. A reakció kinetikusan kontrolált, és az alkalmazott körülmények között a furanozid-piranozid átalakulás lassú. Mivel a pentofuranozidok értékes intermedierek lehetnek különböző nukleozidok szintéziséhez, vizsgáltam a módszer alkalmazhatóságát metil-pentofuranozidok előállítására. Tanulmányoztam a reakció során keletkező termékeket és azok arányának változását az idő függvényében.

Az összetett reakcióelegy komponenseinek azonosítására és mennyiségük időbeli változásának követésére elválasztástechnikai módszerre volt szükség. A kiindulási anyagokat és a reakciótermékeket HPLC módszerrel választottam el egymástól. A rendelkezésemre álló állófázisok/oszlopok egyikén sem sikerült a képződő metil-furanozidokat elválasztani egymástól. Végül egy irodalomban leírt módosított amino fázis bizonyult alkalmasnak erre a feladatra¹²⁴. Közismert, hogy a szénhidrátok elválasztására széleskörben alkalmazott amino fázison a redukáló cukrok egy csúcsot adnak annak ellenére, hogy vizes oldatukban a mutarotáció miatt α -, β -anomer keverékként vannak jelen. Az állófázis amino csoportjai viszont katalizálják a mutarotációt, ennek eredményeként kapunk egy csúcsot. Az amino fázist szilika állófázisból állítják elő, aminopropil módosító csoportoknak a felületen található hidroxil csoportokhoz való kötésével. Az így létrejövő állófázis 3 módon használható:

- normál fázisként, mint poláros állófázis apoláros oldószerkelegyekkel,
- fordított fázisként, vizes-poláros oldószerkelegyekkel,
- amino csoportjai miatt mint gyenge ioncserélő fázist pufferelegyekkel.

Ioncserélő sajátosságát kihasználva állítottak elő Kahle és munkatársai olyan módosított állófázist, amelyen a protonált amino csoportokhoz HSO_4^- ionok kapcsolódnak, úgynevezett szulfát formára hozott amino fázist. Adataik szerint ez az állófázis alkalmas metil furanozidok elválasztására¹²⁴. Mivel a módosítás az amino fázis híg kénsav oldattal való mosásával könnyen elvégezhető, kipróbáltam ezt az állófázist és 0 °C hőmérsékleten megfelelőnek találtam az elválást. Ez az állófázis viszont már nem katalizálja a mutarotációt, ezért a reakció eredményeként bonyolult kromatogramot kaptam, amely a kiindulási monoszacharid alfa- és

béta-piranoz, esetleg furanoz formája mellett tartalmazta a keletkező metil-glikozid alfa- és beta-furanozid és piranozid formáit.



24. ábra Szabad cukrok elválasztása szulfát formájú amino oszlopon, MeCN:víz=9:1 eluensel. B: D-arabinóz, C: D-xilóz, D: D-lixóz, E: L-ramnóz, F: D-fukóz

A csúcsok beazonosításához először a monoszacharidok egyensúlyi vizes oldatait vizsgáltam. A 0°C, 30 °C és 50 °C hőmérsékleten felvett kromatogramok az 24. ábrán láthatóak.

A monoszacharidok esetében mutarotáció történik a kromatográfiás oszlopon, és az izomerizáció sebessége függ a hőmérséklettől. Az izomerek (furanóz/piranóz) és anomerek (α/β) csak alacsony hőmérsékleten válnak el egymástól. Az izomerizáció valamennyi vizsgált monoszacharidnál megfigyelhető volt, kivéve a ribózt, amely a hőmérséklettől függetlenül egy csúcsként eluálódott. Ismert, hogy a ribóz vizes oldatában mind a négy lehetséges izomer megtalálható¹²⁵, így ez csak a ribóz gyors mutarotációjával magyarázható.

Az egyensúlyi vizes oldatok anomer aránya korábbi NMR és HPLC mérések alapján ismert. Eredményeimet ezen adatokkal összevetve beazonosítottam a szabad monoszacharidok kromatográfiás csúcsait. A mért és irodalmi eredmények összevetése az 2. Táblázatban látható.

2. Táblázat

α -Piranóz tartalom egyensúlyi vizes oldatban

Cukrok	α -Piranóz (%)		
	Saját mérés	HPLC ¹²⁴	NMR ¹²⁵
D-ribóz	1 csúcs	nincs adat	21,5
D-arabinóz	63,7	61 ^a	60
D-xilóz	38,9	36	36,5
D-lixóz	81,2	79	70
L-ramnóz	67,9	66	60
D-fukóz	31,0	30	28

^a az adat L-arabinózza vonatkozik

A kromatogramok és az 2. Táblázat adatainak összevetéséből látható, hogy az α -piranóz forma mindig a β -piranóz előtt eluálódik, kivéve az arabinózt. Jäger és munkatársai írták le papírkromatográfiás elválasztásokra, hogy a molekulán található ekvatoriális hidroxil csoportok számának növekedése a retenció megnövekedésével jár¹²⁶. A vizsgált monoszacharidok az arabinóz kivételével 4C_1 konformációban vannak, tehát a β helyzetű anomer hidroxil ekvatoriális helyzetű. Az α -D-arabinóz 1C_4 konformációban van, tehát 3

ekvatoriális helyzetű hidroxil csoportja van. A β -D-arabinóznak két ekvatoriális hidroxil csoportja van akár a 4C_1 akár az 1C_4 konformációt foglalja el.

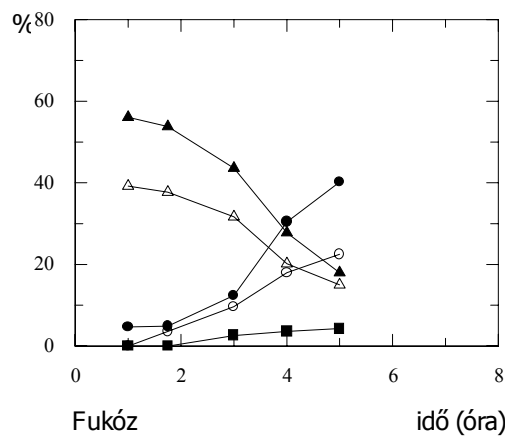
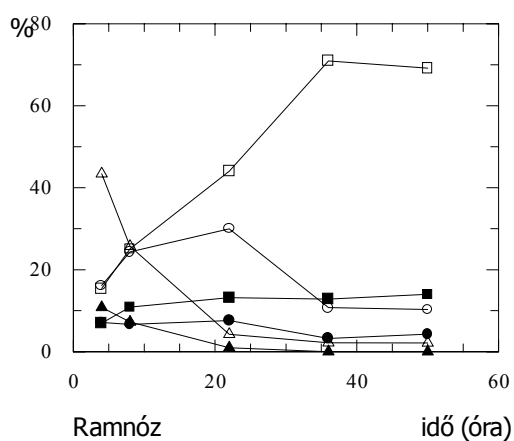
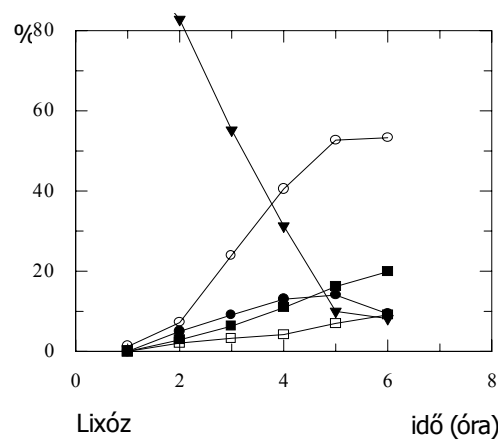
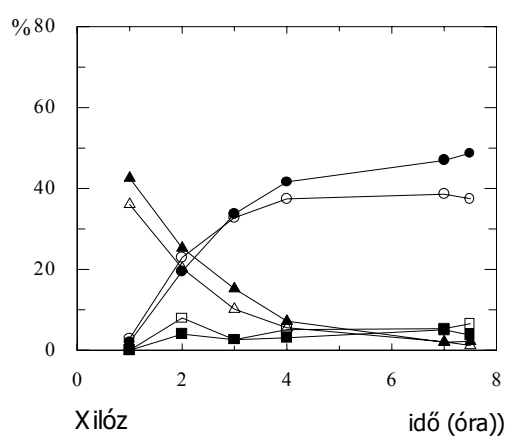
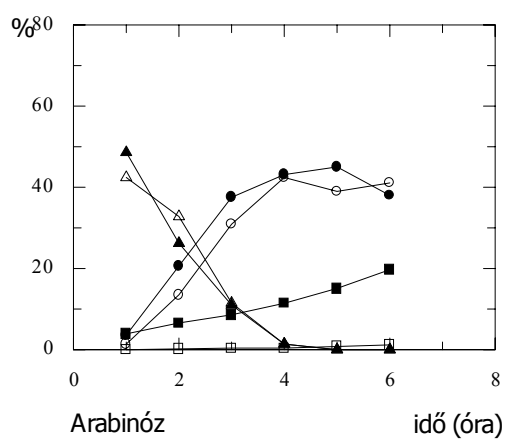
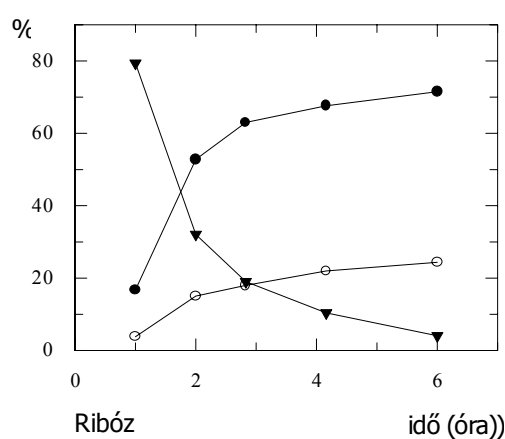
A reakciótermékek azonosítása összehasonlító anyagok hiányában az összegyűjtött frakciók optikai forgatóképességének mérésével történt. A mért retenciós idők és forgatás iránya a 3. táblázatban láthatók. A táblázat adataiból látható, hogy valamennyi metil furanozid esetében az 1,2-*transz* anomer eluálódik korábban.

3. Táblázat

Glikozid	Furanozidok		Piranozidok		Aldóz	Furanózok	Piranózok	
	Rt/forgatás		Rt/forgatás			Rt/x	Rt/x	
	előjele		előjele					
Metil-D-ribozid	3,3/-	3,6/+	4,7/+	5,1/-	D-ribóz	-	5,5/ α + β	
Metil-D-arabinozid	3,0/+	3,4/-	4,0/-	4,9/+	D-arabinóz	5,6/ α + β	6,1/ β	7,5/ α
Metil-D-xilozid	3,4/-	3,6/+	4,0/-	4,6/+	D-xilóz	-	5,9/ α	6,6/ β
Metil-D-lixozid	3,1/+	3,9/-	4,5/-	5,4/+	D-lixóz	-	6,5/ α	7,4/ β
Metil-D-fukozid	3,1/-	3,6/+	4,4/+		D-fukóz	5,9 α + β	7,9/ α	10,6/ β
Metil-L-ramnozid	2,7/-	3,1/+	3,3/-	4,2/+	L-ramnóz	-	5,2/ α	6,0/ β

Az elválasztás körülményeinek kidolgozása és a csúcsok beazonosítása után lehetővé vált a jódt katalizálta metil-glikozid képződés időbeni lefutásának tanulmányozása. A mérési eredményeket a 25. ábrán foglaltam össze

Jelentős különbség figyelhető meg az anomer szelektivitást illetően. Az arabinóz és xilóz esetén a reakció kezdeti stádiumától kezdődően az α -, β -anomerek közel azonos mennyiségben képződnek. A ribóz metilezési reakciójában a β -, a lixóz esetében az α -furanozid képződik nagyobb mennyiségben. Ez a tapasztalat egyszerű szterikus okokkal magyarázható. Ugyanez lehet az oka a ramnóz esetén tapasztalt α -szelektivitásnak. A ramnóz esetén a piranozid forma rögtön a reakció kezdetén megjelenik és a 8. órától kezdődően fő terméké válik. D-Fukózból a metil- β -D-fukofuranozid képződik nagyobb mennyiségben, de az anomer szelektivitás alacsony. Összefoglalva tehát pentózok esetén 4-5 óra szükséges a cukor $\rightarrow$ metil-glikozid átalakuláshoz, a fő -néhány esetben kizárólagos- termékek furanozidok, az anomer szelektivitás alacsony.



25. ábra A reakcióelegyek összetételének változása az idő függvényében

Jelölések: $\circ$ α -furanozid, $\bullet$ β -furanozid, $\square$ α -piranozid, $\blacksquare$ β -piranozid, Δ α -piranoz, $\blacktriangle$ β -piranoz, $\blacktriangledown$ α - és β -piranoz együtt

A furanozidok, kinetikus termékek lévén, a reakció első 4-6 órájában keletkeznek, majd furanóz-piranoz gyűrű tágulással átalakulnak a termodinamikailag stabilabb piranozidokká. A 4. táblázatban a vizsgált reakcióelegyek összetételét adtam meg 4 óra reakcióidő után.

4. Táblázat

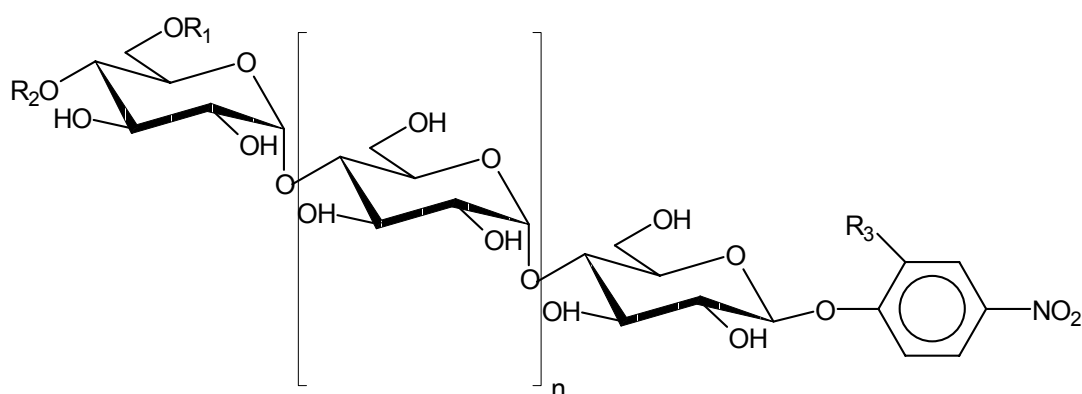
A reakcióelegy összetétele 4 óra reakcióidő után

Cukor	Metil-glikozidok %				Aldóz %
	α -furanozid	β -furanozid	α -piranozid	β -piranozid	
D-ribóz	22,0	67,6	-	-	10,4
D-arabinóz	42,4	43,1	11,4	0,4	2,8
D-xilóz	41,2	37,5	4,1	5,2	12,0
D-lixóz	40,5	13,0	10,3	4,2	31,3
L-ramnóz	16,2	7,2	15,4	7,0	54,2
D-fukóz	18,0	30,4	3,6	-	48,0

Számos közlemény jelent meg cukrok metil-glikozid képzéséről metanolos sósav^{127,128,129} illetve kationcserélő gyanta¹³⁰ jelenlétében. Pentózok közül a xilózra találtunk adatokat¹²⁷, mely szerint metanolos sósavval reagáltatva 25°C hőmérsékleten 48 órás reakcióidő után az α/β xilofuranozidok aránya 1/1,7. Hasonló reakciókörülmények között Ferrier és munkatársai 1/1,2 arányt figyeltek meg¹²⁸. A jód katalizálta metil-glikozid képződés során általunk kapott 1/1,29 arány ehhez hasonló, ami a két reakció hasonló mechanizmusát jelzi. Méréseim szerint az 1,2-*transz* termékek képződése kedvezményezett a ribóz, lixóz és ramnóz esetén, míg a többi vizsgált esetben nincs ilyen szelektivitás.

III. 1. 2. 2. Maltooligoszacharid szubsztrátok elválasztása

A tanszékünkön előállított maltooligoszacharid sorozatok^{121,131,132} kromatográfias elválasztására a kapott termékek tisztaságának ellenőrzése mellett az α -amiláz enzimmel való reakciójuk követése miatt volt szükség^{61,,133}. Ezen munka során a α -, β - és γ -ciklodextrinből való előállítás folyamán keletkező, 1-8 glükóz egységből felépülő maltooligoszacharid peracetát és maltooligoszacharid sorozatokat választottam el. Az α -amiláz enzimek kötőhelyének és kötési mechanizmusának tanulmányozására 1-10 glükóz egységből álló kémiai és enzimatisz szintézissel előállított 2-klór-4-nitro-fenil- β -maltoligomer-glikozidokat (1. sorozat), kémiai szintézissel előállított 1-8 tagszámú 4-nitro-fenil-glikozidokat (2. sorozat), valamint 4-8 glükóz egységből felépülő, a nem redukáló végen 4,6-benzilidén csoporttal védett 4-nitro-fenil-glikozid sorozatokat (3. sorozat) vizsgáltam. Ezen sorozatok HPLC-s elválasztását oldottam meg.



	R ₁	R ₂	R ₃	n
1. sorozat:	H	H	Cl	2-8
2. sorozat:	H	H	H	2-6
3. sorozat:	PhCH		H	2-6

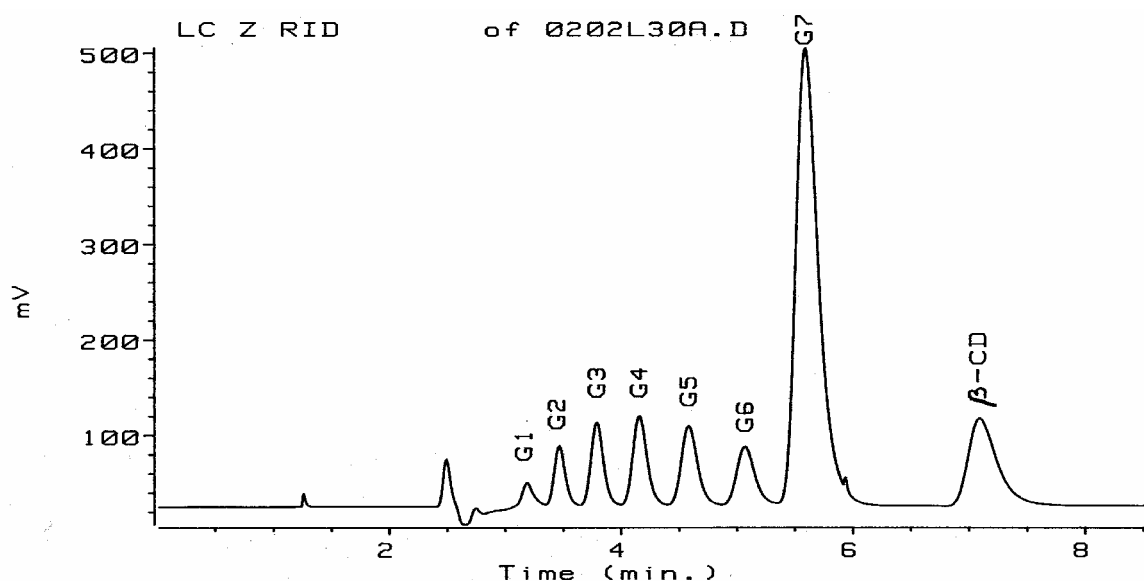
26. ábra Vizsgált oligoszacharid sorozatok szerkezete

Maltooligoszacharidok elválasztására van példa az irodalomban, Niemann és munkatársai megoldották PNP- α -maltooligoszacharidok elválasztását C18 és amino kolonnán az alacsony molekulású amilóz hidrolízisének vizsgálatához²⁰. Koizumi és munkatársai szabad D-glüko-oligoszacharidokat választottak el amino kolonnán⁵⁰. Lineáris összefüggést találtak a lg k' és a polimerizációs fok (DP) között, valamennyi vizsgált kötéstípus esetén. Peracetilezett cukrok esetében fordított fázison acetonitril:víz izokratikus elúcióval elválaszthatók a lineáris oligoszacharidok¹⁷. Lineáris összefüggést kaptak lgk' és a tagszám között. Az anomer konfiguráció kissé befolyásolja a retenciót.

Vizsgáltuk ezen törvényszerűség fennállását diol, amino és C18 kolonnán a felsorolt oligomer sorozatok esetén.

Különböző maltooligomer sorozatok elválasztása

A β -ciklodextrin acetolízise során keletkező maltooligomer-peracetátokat diol kolonnán, hexán:etilacetát oldószer eleggyel választottam el. A kapott kromatogramot a 27. ábrán mutatom be.

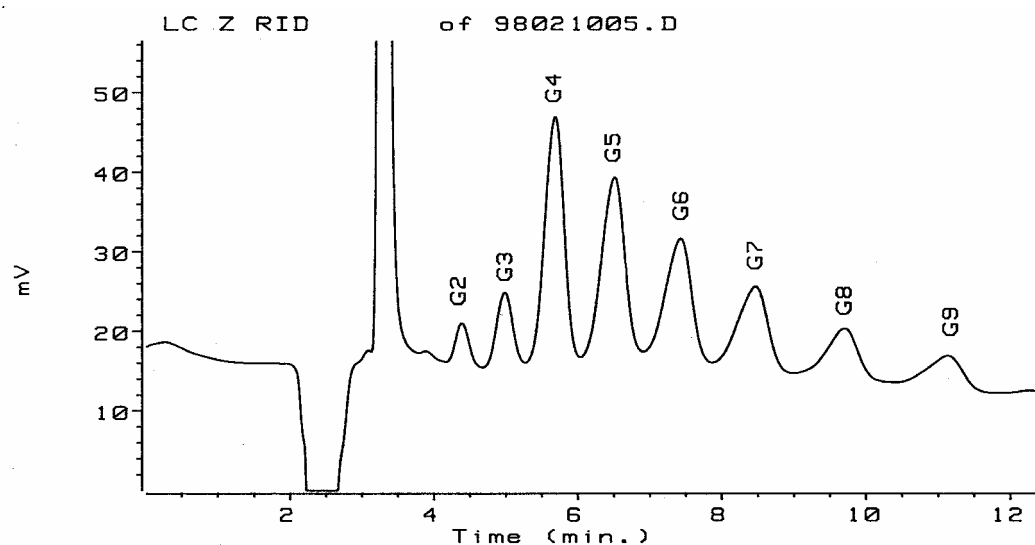


27. ábra Acetolízissel előállított maltooligoszacharid α -peracetátok elválasztása

Körülmények: kolonna: Diol 250 * 4,6 mm, 5 μ m eluens: hexán: EtOAc=4:6,
1 ml/perc detektor: RID

Az acetolízis fő terméke a maltoheptaóz- α -peracetát, amint az a kromatogramon is jól megfigyelhető. Megjelenik a β -ciklodextrin-peracetát csúcsa is. A dezacetilezés után kapott,

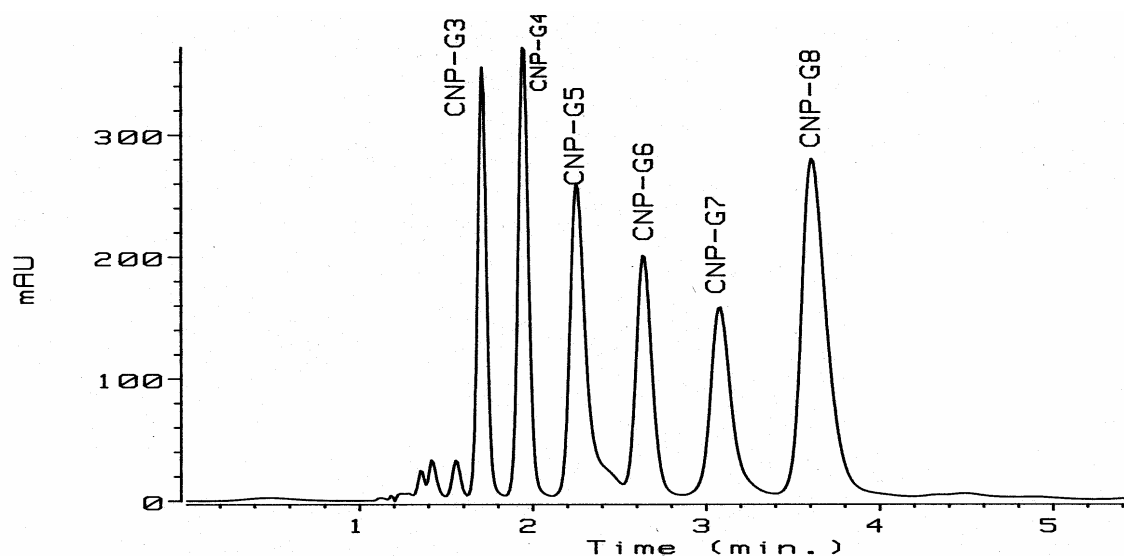
valamint foszforolízissal előállított szabad oligoszacharidok NH_2 kolonnán elválaszthatók acetonitril-víz oldószerkeleggyel. Az így kapott kromatogram a 28. ábrán látható.



28. ábra Maltooligoszacharidok elválasztása

Körülmények: kolonna: APS 250 * 4,6 mm, 5 μm eluens: MeCN:víz=6:4,
1 ml/perc detektor: RID

A maltooligomer glikozid peracetátok elválasztása diol és NH_2 kolonnán egyaránt megoldható.

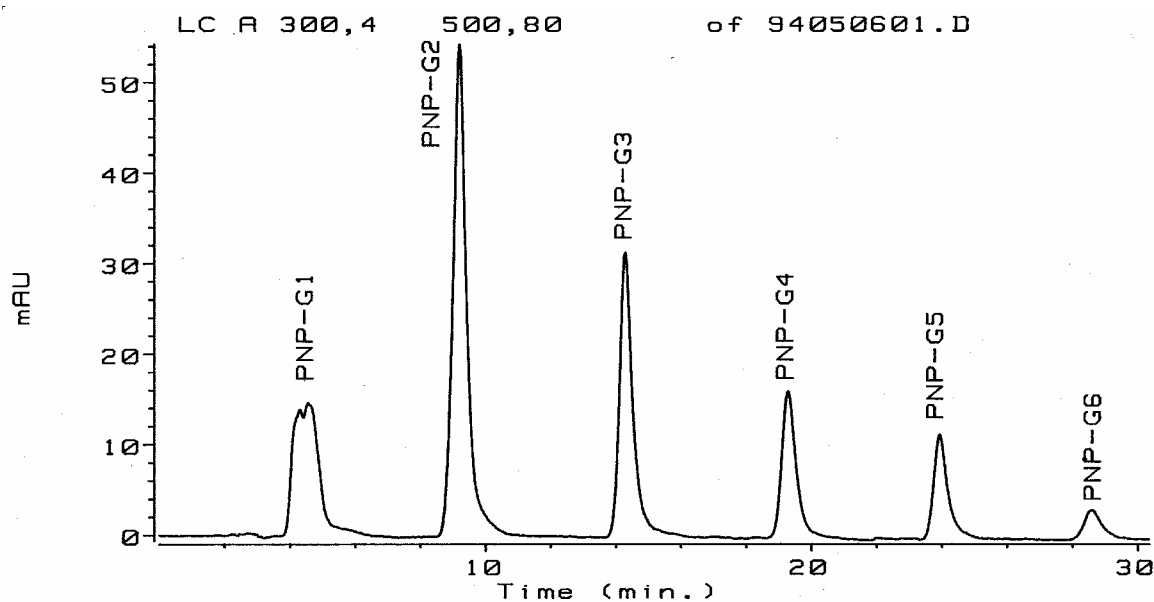


29. ábra CNP maltooligoszacharid glikozid peracetátok elválasztása

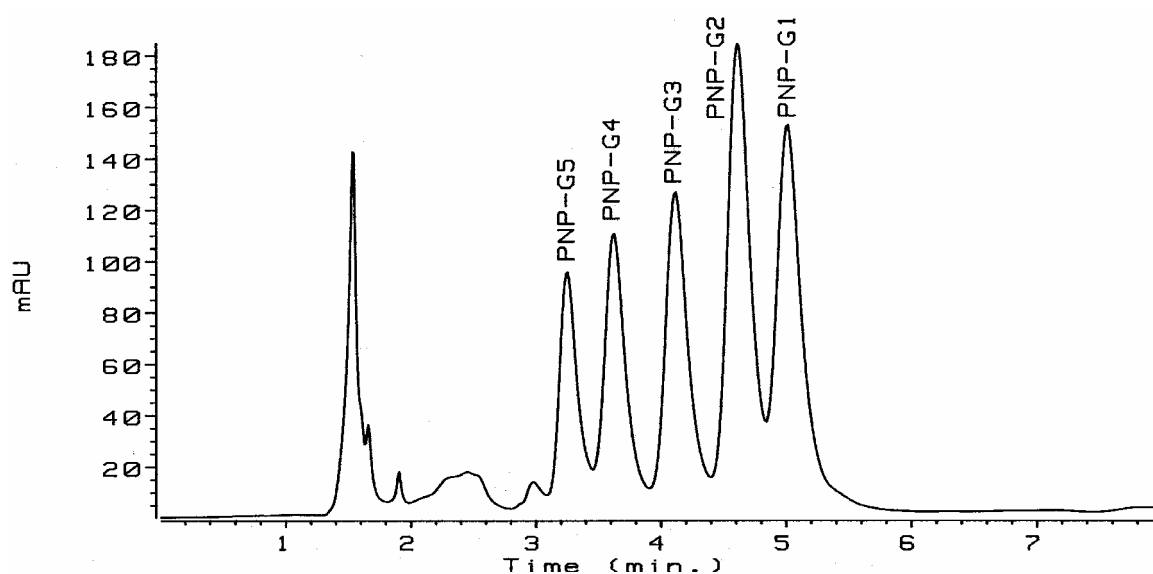
Körülmények: kolonna: amino 250 * 4,6 mm, 5 μm eluens: hexán: EtOAc=4:6,
1 ml/perc detektor: DAD 302 nm

A 29. ábrán CNP-glikozidok acetátjainak elválasztását mutatom be amino kolonnán hexán: etilacetát eluenssel. Hasonló módon elválaszthatók a PNP glikozidok acetátjai is.

A 2. sorozat tagjainak elválasztását amino és C18 állófázison mutatja az 30. ábra.



A

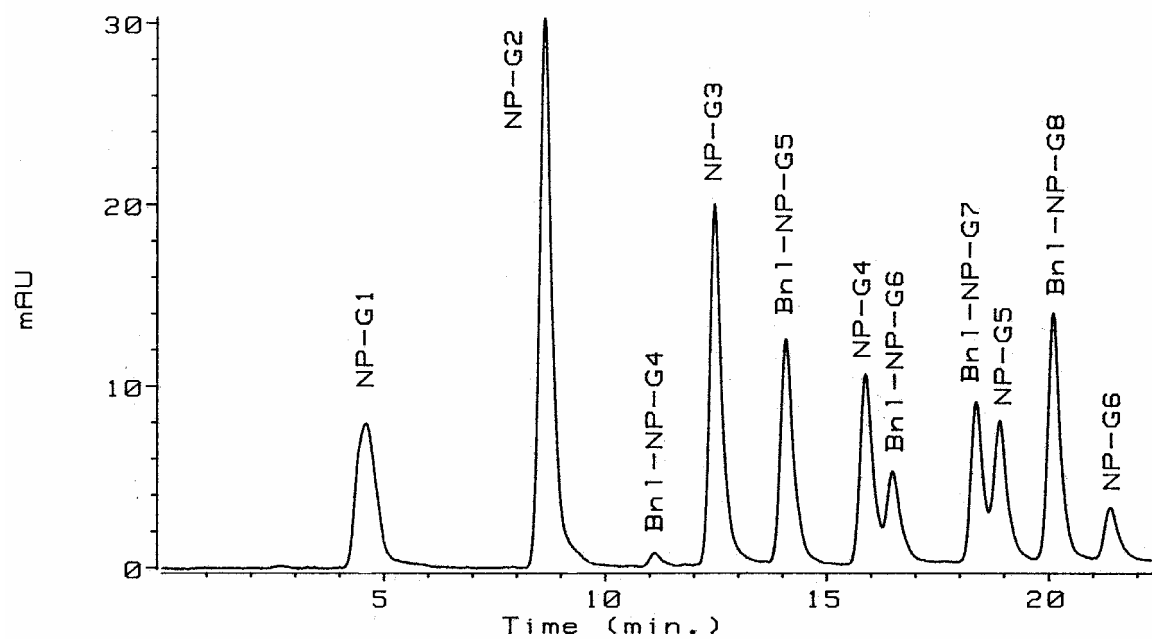


B

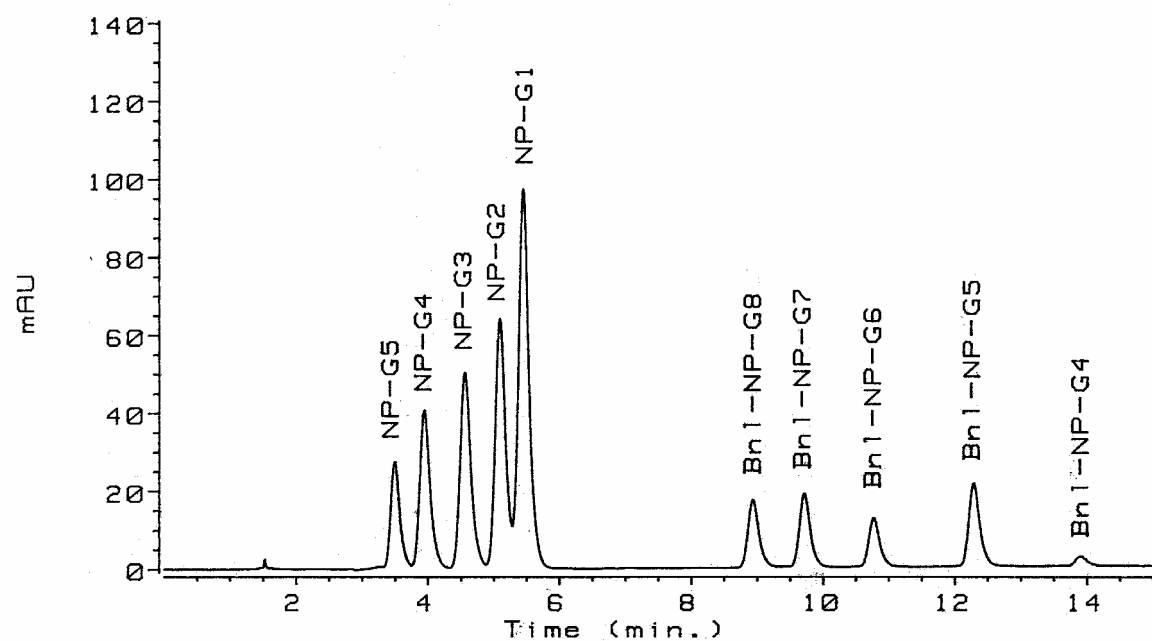
30. ábra 2. sorozat tagjainak elválasztása

Körülmények: A: Kolonna: APS 250 * 4,6 mm, 5 µm, gradiens elúció: 88% MeCN 20 perc alatt 70%, 1 ml/perc, detektor: DAD 302 nm

B: Kolonna: C18 2500*04,6 mm, 5 µm, eluens: MeCN:víz=13:87, 1 ml/perc, detektor: DAD 302 nm



A



B

31. ábra 1. és 3. sorozat tagjainak elválasztása

Körülmények: A: Kolonna:APS 250 * 4,6 mm, 5 µm, gradiens elúció: 88%MeCN 20 perc alatt 70%, 1 ml/perc, detektor: DAD 302 nm

B: Kolonna: C18 2500*04,6 mm, 5 µm, gradiens elúció 13% MeCN 10 perc alatt 30%, 1 ml/perc, detektor: DAD 302 nm

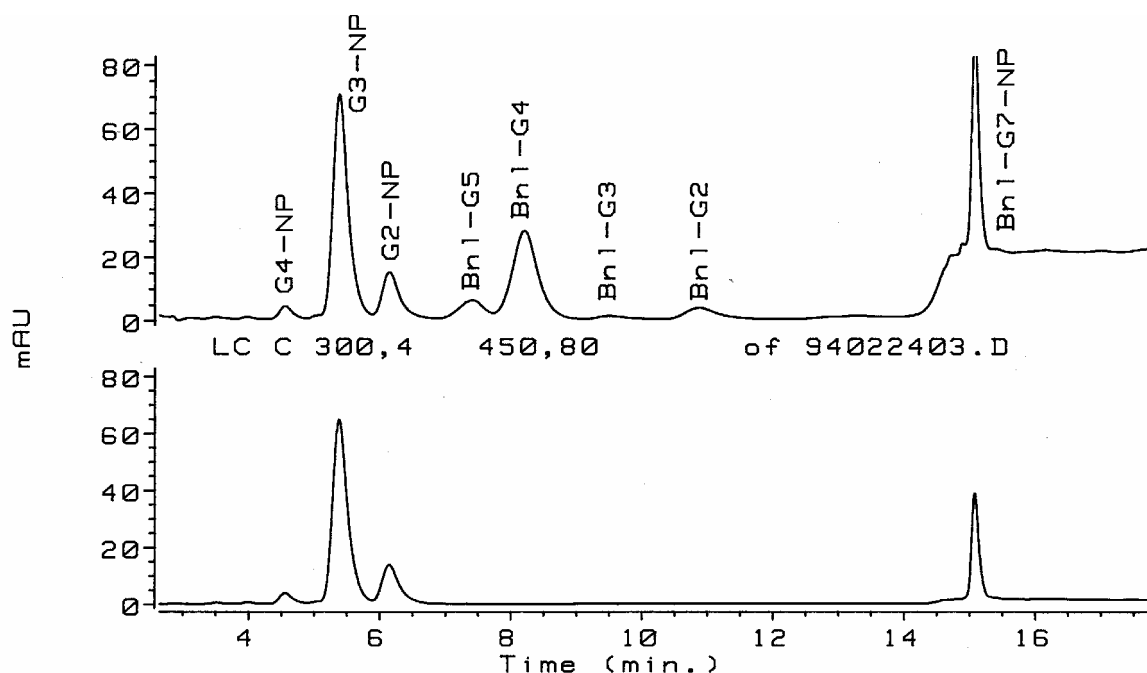
Látható, hogy a retenciós sorrend megfordul a C18 fázison, tehát a nagyobb tagszámú komponensek előbb eluálódnak. Ezt a jelenséget Niemann és munkatársai is említik közleményükben²⁰. Az amino kolonnán az elúciós idő lerövidítése miatt gradiens elúciót alkalmaztunk, de az elúció időigénye így is közel háromszoros a C18 kolonnához képest. Az amino kolonna előnye viszont, hogy gradiens elúcióval akár harmincas tagszámú oligomerek is elválaszthatók, míg a C18 fázison a hosszabb oligomerek (DP>7) nem válnak el. A CNP maltooligozidok a PNP sorozattal azonos módon eluálódnak a klór belépése az aglikonra nem befolyásolja lényegesen a kromatográfiás viselkedést.

Jelentős különbség figyelhető meg a PNP-4,6-Bnl-maltooligoszacharidok elválasztásánál, melyet a 31. ábrán mutatok be.

Egyrészt ezen sorozat tagjai csak több acetonitrilt tartalmazó eluens alkalmazásakor eluálódnak, másrészt ebben az esetben a PNP-4,6-Bnl-maltooligoszacharidok és az α -amiláz enzim reakciója során PNP-maltooligoszacharidok keletkeznek. A reakció követéséhez tehát mindkét sorozat tagjait el kell választanunk egymástól. Ezt mindkét típusú kolonnán csak gradiens elúció alkalmazásával sikerült elérni. C18 kolonnán a két sorozat tagjai teljesen elkülönülnek egymástól, míg az amino kolonnán nem. Az amino kolonnán nem sikerült teljes elválást elérni. Ennél a sorozatnál a biztonságos azonosításhoz mindkét rendszerben kromatografáltuk a reakcióelegyet.

A fordított fázisú elválasztással lehetőség van a nem redukáló vég felőli hidrolízistermékek, a 4,6-benzilidén csoportot tartalmazó maltooligoszacharidok (Bnl-G_n), elválasztására a PNP glikozidoktól és a kiindulási (Bnl-G7-PNP) szubsztráttól. A DAD lehetőséget biztosít a kromatogram egyidejűleg több hullámhosszon történő detektálására. A Bnl-G_n vegyületek 200 nm, a PNP glikozidok és a Bnl-G7-PNP 200 nm és 300 nm hullámhosszon detektálhatók. A maltooligoszacharidok benzilidén származékai nem álltak rendelkezésünkre tiszta formában, de egyszerű logikai úton a bontási képek ismeretében beazonosíthatók a csúcsok. Az elválasztást a Bnl-G7-PNP sertés pankreász amiláz (PPA) enzimmel katalizált hidrolízisekor keletkező termékelegy analízisével mutatom be.

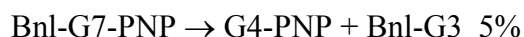
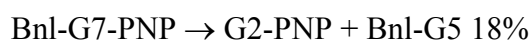
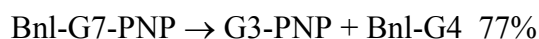
A 32. ábrán a Bnl-G7-PNP 2 perces enzimes hidrolízisekor keletkező termékelegy kromatogramja látható. A 300 nm hullámhosszon detektált kromatogramon csak a PNP-glikozid hidrolízistermékek és a kiindulási szubsztrát csúcsa látható. 200 nm-en detektálva újabb csúcsok jelennek meg, amelyek csak a Bnl csoportot hordozó hidrolízis termékekhez tartozhatnak.



32. ábra Bnl-G7-PNP PPA-val történő 2 perces hidrolízis elegyének elválasztása

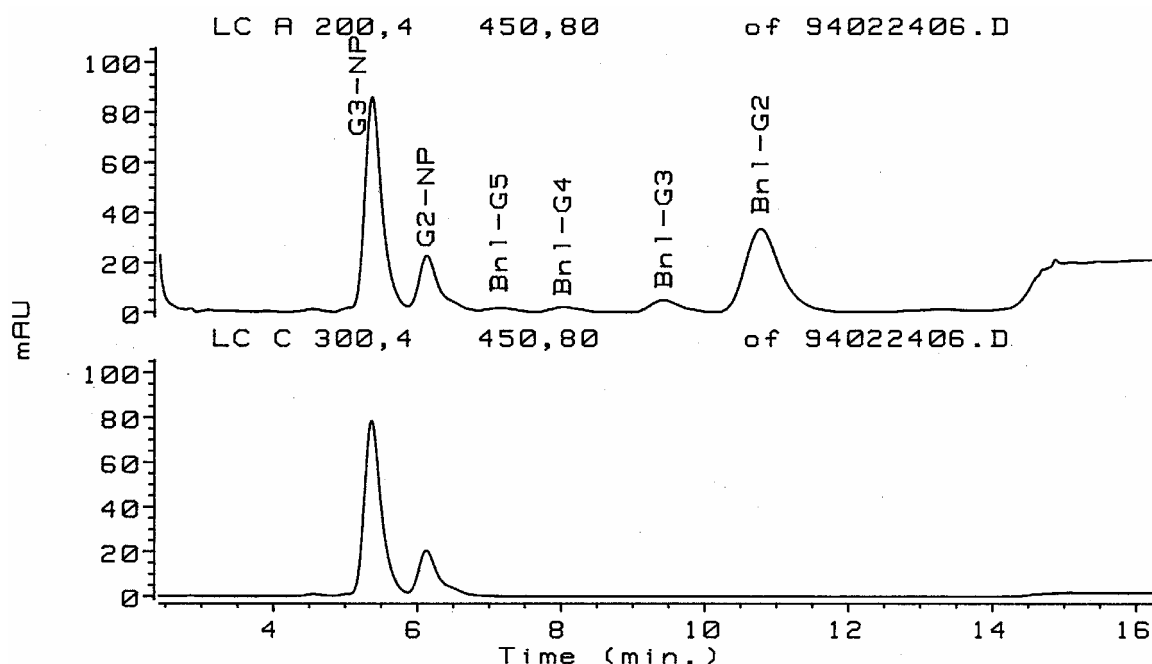
Körülmények: Kolonna: C18 250*4,6 mm, 5 μ m, gradiens elúció 13% MeCN 10 perig 10,5 percnél 30%, 1 ml/perc, detektor: DAD 200 nm és 300 nm

A hidrolízis során a következő kötésehasítások mennek végbe:



A területarányok alapján tehát a csak 200 nm hullámhosszon detektálható csúcsok közül valószínűleg a legintenzívebb a Bnl-G4 a következő intenzitású csúcs a Bnl-G5 és még kisebb intenzitással jelentkezik a Bnl-G3. Valószínűsíthető, hogy ha a PNP glikozidok és a Bnl-PNP glikozidok is csökkenő molekulatömegek szerint eluálódnak, akkor a Bnl-G_n sorozat tagjainak is ilyen az elúciós sorrendje. A 33. ábrán a 8 perces hidrolízis reakcióelegye látható. A szubsztrát elfogyott és a G4-PNP is elbomlott (termékei G2 és G2-PNP). A Bnl termékek arányai is megváltoztak, a Bnl-G5 és Bnl-G4 területe lecsökkent, valószínűsíthetően a következő folyamatok miatt:





33. ábra Bnl-G7-PPA-val történő 8 perces hidrolízis elegyének elválasztása

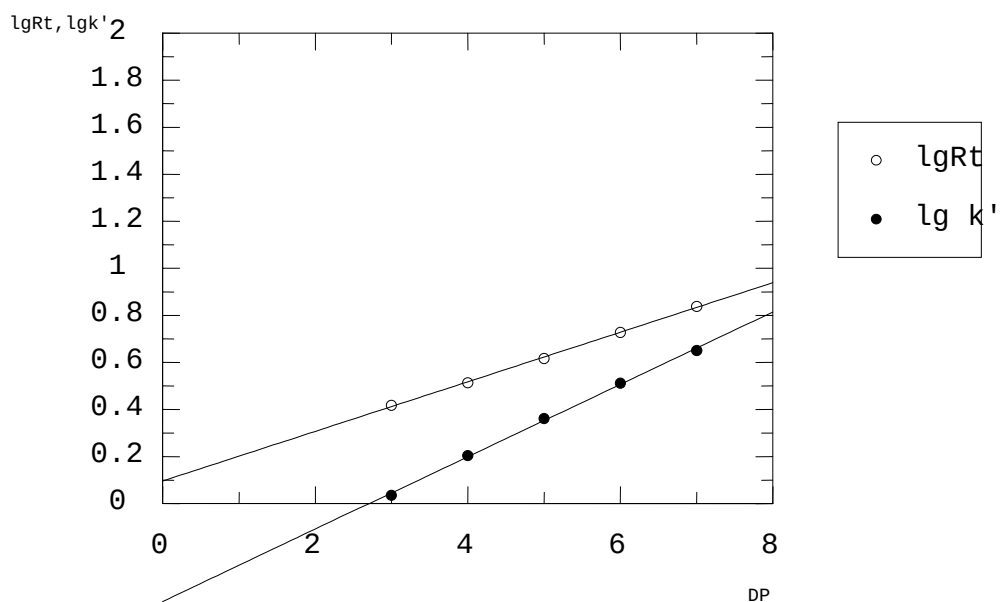
Körülmények: Kolonna: C18 250*4,6 mm, 5 μ m, gradiens elúció 13% MeCN 10 perig 10,5 percnél 30%, 1 ml/perc, detektor: DAD 200 nm és 300 nm

Valóban a Bnl-G3-ként azonosított csúcs intenzitása megnőtt és még jelentősebb növekedés látható a nagyobb retenciós időnél jelentkező csúcsonál, ami tehát a Bnl-G2 lehet. A csúcsok beazonosításával lehetővé vált a PPA többszörös hasítási mechanizmusának tanulmányozása. Az eredmények Farkas Erzsébet Ph. D. dolgozatában szerepelnek¹³⁴

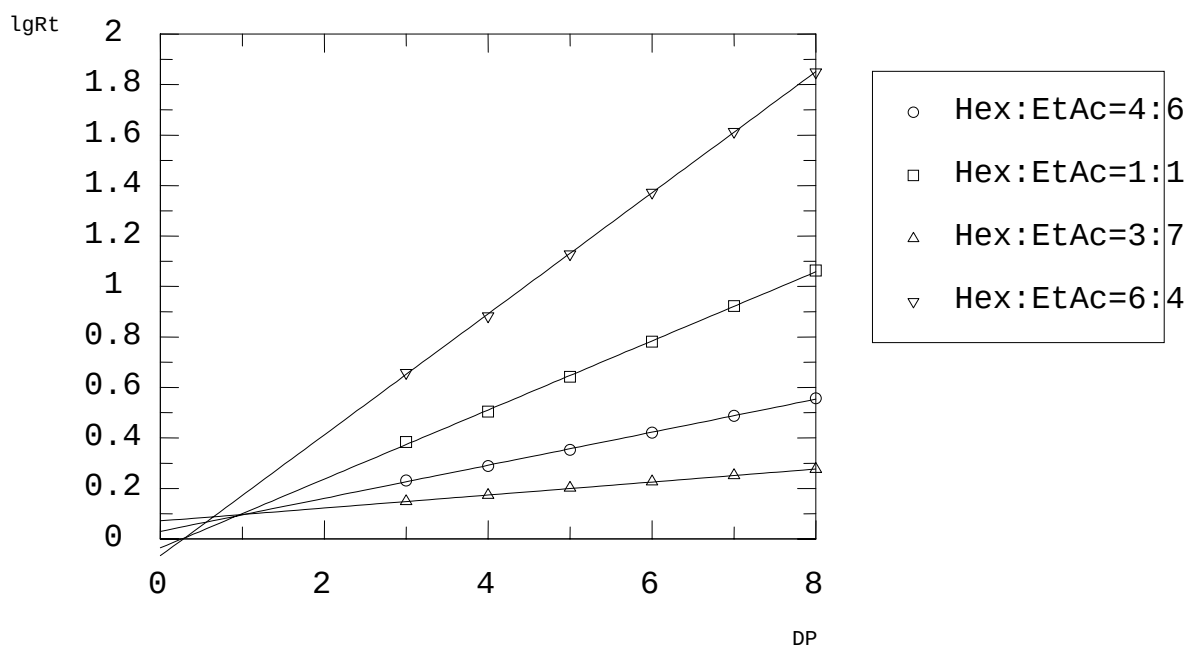
Összefüggés a $\lg R_t$ ill. $\lg k'$ és az oligomerek monomer tagszáma (DP) között

A kromatográfiás munka során összegyűlt nagyszámú kromatogram elemzésekor a következő összefüggéseket állapítottuk meg.

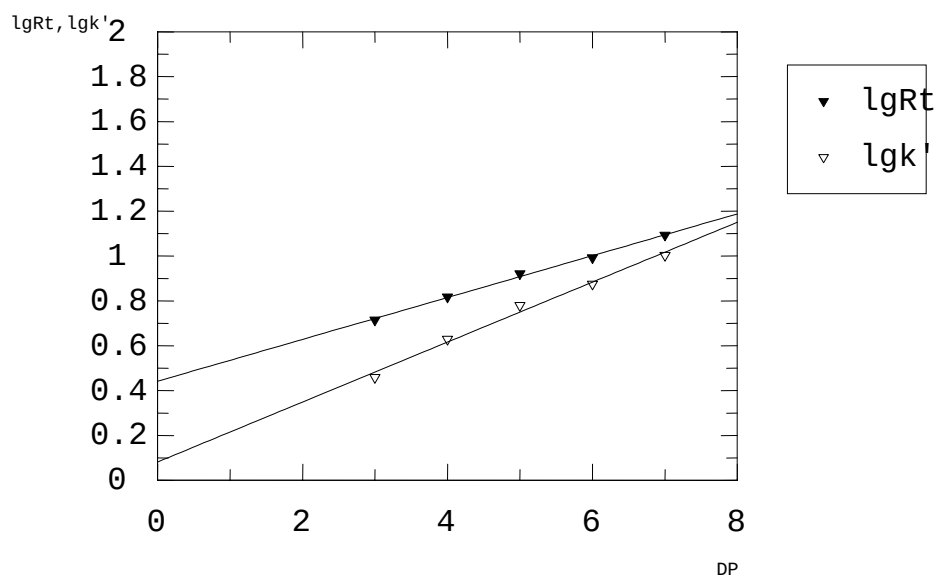
- 1.) A maltooligomer-peracetátok diol kolonnán történő elválasztása során mért retenciós idők illetve k' értékek logaritmus a lineáris függvénye a vegyületet felépítő glükóz egységek számának (34. ábra).
- 2.) Ugyanezt a jelenség figyelhető meg CNP-maltooligomer-peracetátok amino kolonnán történő elválasztásakor. A különböző oldószerarányoknál mért egyenesek közel egy pontban metszik egymást. Ezt a 35 ábrán mutatom be.



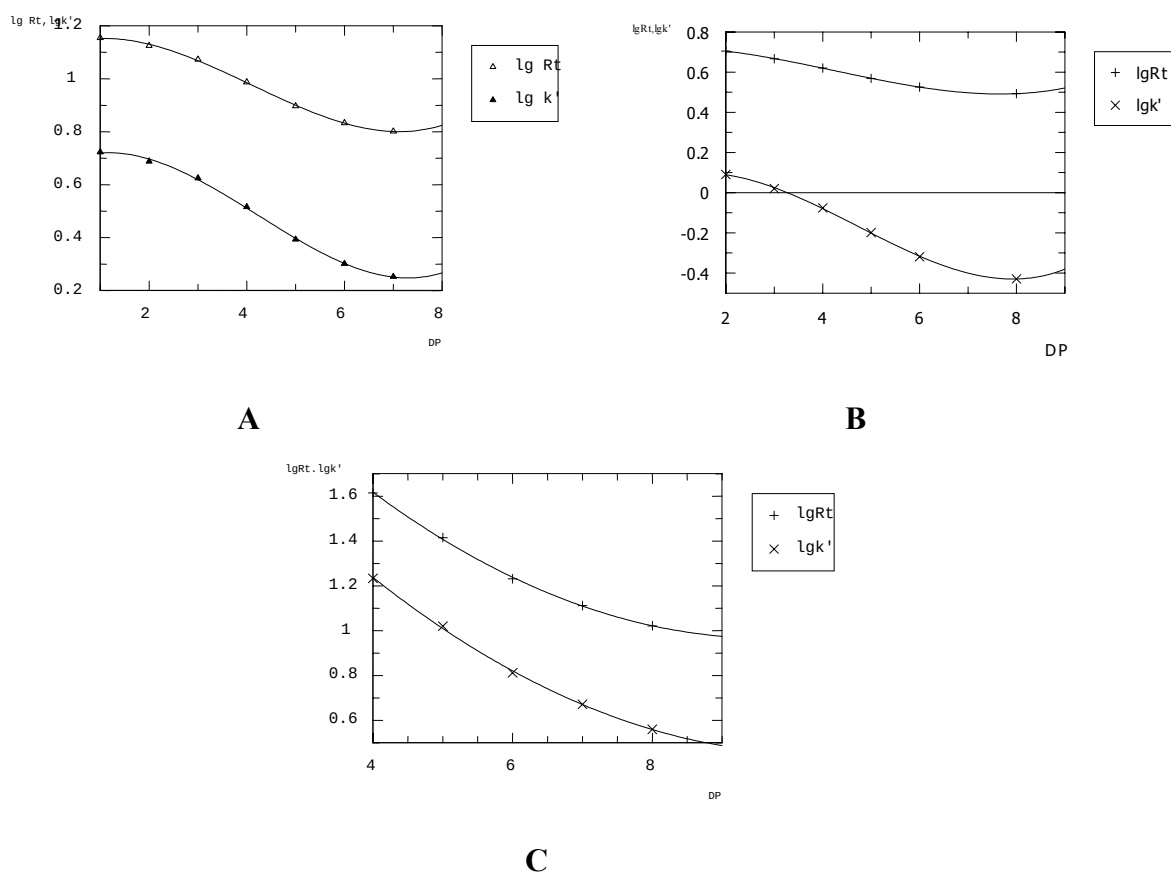
34. ábra A retenciós idő és k' logaritmusa a tagszám függvényében maltooligomer peracetátok elválasztásakor. Körülmények: Kolonna: Diol 250 * 4.6 mm, 5 μ m, Eluens: hexán:EtOAc=1:1, detektor: RID



35. ábra A retenciós idő és k' logaritmusa a tagszám függvényében CNP-maltooligomer glikozid peracetátok elválasztásakor. Körülmények: Kolonna: Amino 250 * 4.6 mm, 5 μ m, Eluens: hexán:EtOAc különböző arányú elegyei, detektor: DAD 302 nm



36. ábra A retenciós idő és k' logaritmusa a tagszám függvényében maltooligomerek elválasztásakor. Körülmények: Kolonna: Amino 250 * 4.6 mm, 5 μ m, Eluens: MeCN:víz=7:3, detektor: RID



37. ábra A retenciós idő és k' logaritmusa a tagszám függvényében a három vizsgált maltooligomer glikozid sorozat elválasztásakor. **A** 1. **B** 2. **C** 3. sorozat Körülmények: Kolonna: C18 250 * 4.6 mm, 5 μ m, Eluens: MeCN:víz=13:87, detektor: DAD 302 nm

3.) A dezacetilezés után kapott sorozatok (maltooligoszacharidok, 1., 2., 3. sorozat) amino kolonnán acetonitril:víz elegyekkel történő elemzésekor is igaz a lineáris összefüggés a $\lg k'$ és a glükóz egységek száma között. 36. ábra.

5.) Nem tapasztaltunk viszont lineáris összefüggést a C18 kolonnán történő elemzések során egyik sorozat esetén sem. A C18 kolonnán mért adatokból kapott grafikonok a 37. ábrán láthatóak. A görbék meredeksége negatív a fordított retenciós sorrend miatt.

A vizsgált hat vegyületcsoport esetén mért egyenesek paramétereit a 5. Táblázatban foglaltuk össze.

Mindezek alapján megállapíthatjuk, hogy a Koizumi és munkatársai által glükóz egységekből felépülő oligoszacharidok amino kolonnán történő elválasztására leírt összefüggés oligoszacharid-peracetátok diol és amino kolonnán történő elválasztásakor és a különböző oligoszacharid-glikozidok amino kolonnán történő elválasztásakor is érvényes.

Az elválasztásban mind a négy esetben hidrofíli kölcsönhatások játszanak szerepet. A mechanizmus valószínűleg adszorpció a két poláris kötött fázison (szilika, amino) kevésbé poláros eluensekkel végzett elválasztásoknál, vagyis az acetilezett oligoszacharidok és glikozidok hexán:etilacetát elegyekkel végzett kromatográfiája esetén. Nyilvánvalóan más mechanizmusú a szabad maltooligoszacharidok és a glikozidok amino fázison acetonitril:víz elegyekkel végzett elválasztása. Ez is hidrofíli kölcsönhatás, valószínűleg megoszlás a mozgó fázis és az álló fázis pórusaiban kötött oldószer között⁴³. Az állófázis pórusaiban mindig nagyobb a víz koncentrációja, mint a mozgó fázisban. A különbség mértéke az állófázis felületi amino csoportjainak koncentrációjától és a mozgó fázis szerves komponensének polaritásától függ. A nagyobb tagszámú oligomerek hidratáltsága nagyobb, ezért azok jobban kötődnek ahhoz a vízben gazdagabb réteghez, ami az állófázis felületén, pórusaiban található. Ez magyarázhatja nagyobb retenciójukat. Hasonló eredményre jutunk, ha az elválasztás mechanizmusaként a kötött fázis amino csoportjai és a cukor hidroxil csoportjai közötti lehetséges H híd kötések vesztük számításba⁴⁵.

A tapasztalt lineáris összefüggés segítséget adhat oligoszacharid sorozatok tagjainak azonosításához ha nem rendelkezünk a sorozat minden tagjával tiszta állapotban is, illetve az oligoszacharid kötéstípusának megállapításához..

Peracetilezett cukrok esetében lineáris összefüggést találtak a tagszám és $\lg k'$ között, és az oligoszacharidok növekvő tagszám szerint eluálódtak¹⁷. A fordított fázisú elválasztások retenciós mechanizmusa az álló fázis és a minta komponensek apoláris csoportjai közötti kölcsönhatáson alapul.

Peracilezett homológ oligoszacharidok esetében, egy újabb monoszacharid egység belépésével mindig azonos számú apoláris (Ac) csoport kerül a molekulára. A PNP és CNP glikozidok esetében a molekula annál polárisabb, minél nagyobb tagszámú, hiszen minden oligoszacharidon csak egy apoláris csoport, az aglikon található, aminek hatása annál kifejezettebb, minél kisebb a molekula. Tehát a molekula egészét tekintve a legapolárisabb a monoszacharid, ennek a retenciója a legnagyobb. Ez magyarázza a fordított retenciós sorrendet és a $\lg k'$ -tagszám összefüggés lineáristól való eltérését is. A benzilidén csoport bevitele a molekulára nyilvánvalóan apolárisabbá teszi azt, egyrészt két szabad hidroxil csoporttal kevesebb lesz, másrészt a benzolgyűrű miatt. Ez magyarázza a benzilidén csoportot tartalmazó sorozat nagyobb retencióját. A sorozat tagjai közötti polaritási viszonyok viszont hasonlóak a PNP és CNP glikozid sorozathoz, így itt is csökkenő tagszám szerint eluálódnak az oligomerek és nem kapunk lineáris összefüggést $\lg k'$ és a tagszám között, de itt a legkisebb a lineáristól való eltérés.

III. 2. α -Amiláz enzimek vizsgálata

α -Amiláz enzim szinte valamennyi élő szervezetben termelődik, és a keményítő lebontásában játszik szerepet. A humán enzimek vizsgálatát az orvos-diagnosztikában és egyes betegségek gyógyításában betöltött szerepük indokolja. A *Bacillus* család által termelt enzimek ipari felhasználása jelentős, vizsgálatuk ezért biotechnológiai szempontból fontos. Az amiláz enzimek kutatása hosszú időre nyúlik vissza, és a kilencvenes években új lendületet kapott. Ezt igazolja, hogy 2001 őszén megrendezték az első amiláz szimpóziumot, amely az amiláz kutatások jelenlegi állását és irányait mutatta be¹³⁵. Az α -amiláz enzim család katalitikus mechanizmusa alaposan tanulmányozott, és a vizsgálatok szerint erősen konzervált a család enzimeiben⁵⁸. Ez a hidrolízis mechanizmus azonban csak a -1 , $+1$ alhely szerepére ad magyarázatot, amelynek felépítése azonos az α -amilázoknál. Nem ad információt arról, hány glükóz egység kötődik a szubsztrátkötő helyhez, a többi alhelynek milyen szerepe van a kötéshasításban, milyen polaritásúak az alhelyek.

Az enzimek működési mechanizmusának, kötőhelyének tanulmányozására számos módszert alkalmaznak.

1. Röntgendiffrakciós felvétel az enzim egykristályról és annak szubsztráttal vagy inhibítorral alkotott komplexéről. Ez a módszer az aminosav szekvencia ismeretében pontos képet ad a kötésben résztvevő aminosavakról és a szubsztrát/inhibítor elhelyezkedéséről. Hátránya, hogy mivel a felvétel szilárd fázisban készül, nem tükrözi a pontos oldatbeli konformációs viszonyokat és nem ad információt a mechanizmusról, mivel statikus képet vizsgál.
2. Az enzim aminosavainak módosítása kovalens módosítókkal, vagy mutációval. A módosítás utáni aktivitásmérés és kinetikai vizsgálatok a szubsztrát kötődésben és a katalízisben szerepet játszó aminosavakról adnak információt. A kovalens módosítás esetén az aminosavak helyének meghatározása a módosítást követő szekvenálással lehetséges.
3. Különböző típusú inhibítorokkal történő kinetikai mérések és különböző szubsztrátokkal végzett kinetikai mérések és bontási képek vizsgálata. Mindkét esetben az inhibítoron illetve a szubsztráton elvégzett módosítások, új funkciós csoportok, lánchosszúság, kötéstípus hatását vizsgálják a kinetikai paraméterekre és a bontási képre.

A különböző eredetű enzimek bontási képének eltérései az alhelyek számában és felépítésében való eltéréseket jelzik. Ugyanazon enzim különböző hosszúságú

szubsztrátokon mutatott bontási képnek elemzése információt ad a szubsztrátkötő hely méretéről, polaritási viszonyairól, a szubsztrát kötődésben résztvevő és részt nem vevő csoportjairól. Ezen vizsgálatok előnye, hogy a kisebb molekulákon a módosítások egyszerűbben, biztosabban végezhetőek el, mint a nagy érzékeny enzim molekulán. Másrészt ezek a vizsgálatok egyszerű enzim kinetikai és elválasztástechnikai módszerekkel kivitelezhetőek.

Az α -amiláz enzimek vizsgálatához hasznosak a jól definiált maltooligoszacharid sorozatok, melyek a detektálás megkönnyítésére, érzékenységének növelésére β -kötésű kromofor aglikont tartalmaznak. A β -kötés lényeges, mivel ezt nem hasíthatja a amiláz enzim, így garantált hogy kromofor tartalmú hasítási termékeket kapunk.

Az analitikához szükséges HPLC elválasztásokat a III. 1. 2. 2. fejezetben mutattam be, ebben a részben ezen analitikai módszerek alkalmazásával megvalósított enzim vizsgálatokat ismertetem. Vizsgálataim három részre oszthatóak:

- kemoenzimatis módszer optimalizálása CNP-G4 – CNP-G11 szubsztrátok szintézisére,
- humán nyál α -amiláz (HSA) bontási képének tanulmányozása CNP-G4 - CNP-G9 és 4,6-benzilidén PNP-G4 - PNP-G8 szubsztrátokon,
- *Bacillus licheniformis* eredetű hőstűrő α -amiláz (BLA) bontási képének meghatározása CNP-G5 - CNP-G10 szubsztrátok felhasználásával.

III. 2. 1. Amiláz szubsztrátok előállítása kemoenzimatis módszerrel

A jól definiált, szintetikus maltooligoszacharid glikozidok lehetővé teszik a szénhidrátok depolimerizációját katalizáló enzimek bontási képének tanulmányozását, vagyis az aktív centrum feltérképezését. Tanszékünkön ciklodextrinekből kiindulva kidolgozták a 4-8 tagszámú maltooligoszacharidok, majd a 2-klór-4-nitrofenil (CNP) illetve 4-nitrofenil (PNP) maltooligoszacharid glikozidok szintézisét, valamint a nem redukáló végen 4,6-benzilidén csoporttal módosított PNP-glikozidok szintézisét¹²¹. Az így kapott szubsztrátok felhasználásával sikeresen tanulmányoztuk a sertés pankreász amiláz bontási képét⁶¹.

A soklépéses kémiai szintézis kiváltására kemoenzimatis szintézis utat választottam, melynek több előnye van a klasszikus kémiai szintézishez képest. Az enzimek legtöbb esetben enyhébb reakciókörülmények között működnek (vizes oldat, pH 6-8, szobahőmérséklet), és specifikitásuknak köszönhetően jól definiált terméket hoznak létre. A kémiai szintézissel β -ciklodextrinből kiindulva előállított 2-klór-4-nitrofenil maltoheptaoidot (G7-CNP) kiindulási

vegyületként, primerként alkalmazva megoldottam a rövidebb és hosszabb szubsztrátok enzimatisz szintézisét. Korábbi eredmények szerint a humán α -amilázok legjobb szubsztrátjai a 4-6 glükóz egységből felépülő maltooligoszacharidok¹³⁶, míg a bakteriális eredetű amilázok vizsgálatához ennél hosszabb 5-11 tagszámú szubsztrátok szükségesek. Olyan módszerre volt tehát szükség, melynek segítségével a láncrövidítés és hosszabbítás is megoldható. A maltoligoszacharidok glikozidos kötéseinek enzimatisz hasítására két lehetőség van:

- hidrolízis α -glükozidázokkal vagy α -amilázokkal
- foszforolízis foszforilázokkal.

Bár ezen enzimek szerepe a glikozidos kötések hasítása, megfelelő reakciókörülmények között glikozidos kötések sztereospecifikus létrehozására is képesek. Meg kell azonban jegyezni, hogy az amilázok és a glükozidázok transzglykozilezésre csak igen kis hatásfokkal használhatók. Ezzel szemben a glikogén foszforiláz, a legintenzívebben tanulmányozott α -glükán foszforiláz, szervesetlen foszfát jelenlétében megfordítható reakcióban katalizálja a glikogén lebontását, a fordított reakcióban α -D-glükopiranozil-1-foszfát (Glc-1-P), mint donor jelenlétében viszont képes a lánchosszabbításra. Ezért ezt az enzimet választottam a szintézishez.

Foszforiláz enzimeket elterjedten alkalmaznak oligoszacharidok szintézisére, például megvalósították a szaharóz szintézisét szaharóz foszforiláz és a trehalóz szintézisét trehalóz foszforiláz alkalmazásával¹³⁷. Burgonya foszforiláz enzim segítségével állítottak elő maltóz oligomereket¹³⁸⁻¹⁴⁰, lineáris valamint csillag- és fésű alakú polimereket¹⁴¹. Foszforiláz enzim katalizálta reakcióval megvalósítható a trehalóz szintézise keményítőből¹⁴², és celloextrinek szintézise is¹⁴³.

Az enzim a glikolízis első lépését katalizálja az alábbi egyenlet szerint



ahol a $(\text{Glc})_n$ n tagszámú, α -(1-4) kötésű glükóz polimer, a Glc-1-P α -D-glükóz-1-foszfát és P_i szervesetlen foszfát.

A glikogén foszforiláz enzim két formában van jelen az izomban. Az inaktív foszforiláz b, amely főleg a nyugalomban levő izomban található, az AMP szint növelésével, vagy foszforiláz a-vá történő foszforilációval aktiválható. Kísérleteimben az AMP-vel, mint allosztérikus aktivátorral való aktiválást alkalmaztam. Az enzim kristályszerkezetét¹⁴⁴ és

kötőhelyét¹⁴⁵ meghatározták, valamint megállapították, hogy a glikogénen kívül az α -(1-4) kötésű oligoszacharidok is erősen kötődnek a glikogénkötő helyhez¹⁴⁶. Eredményeim szerint a glikogén foszforiláz b a CNP maltooligoszacharid glikozidok hasítását és építését is katalizálja, és alkalmas a reakciókörülmények megfelelő megválasztása esetén G₇-CNP-ből kiindulva rövidebb és hosszabb szubsztrátok előállítására is.

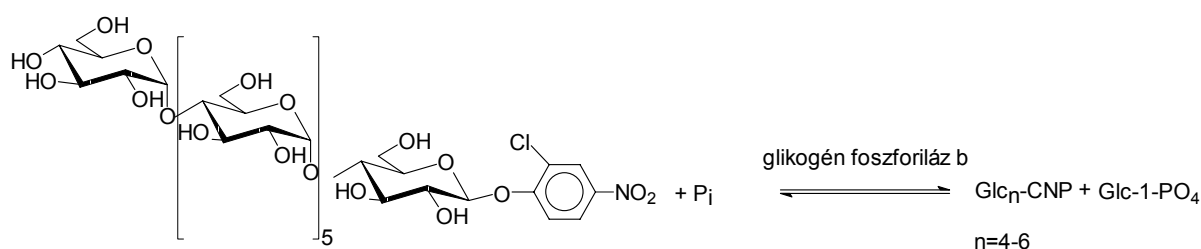
Az enzimek által katalizált reakciók hatékonysága a következő kísérleti körülményektől függ:

- olyan enzim preparátum szükséges amely kellően nagy foszforolitikus aktivitással rendelkezik, de hidrolitikus aktivitása nincs
- megfelelő reakciókörülmények választása, hogy a kívánt oligoszacharidok képződjenek
- a reakciótermékek elválasztása és analízise
- a reakciótermékek preparatív méretben történő izolálása

Az első követelménynek megfelelt a Debreceni Egyetem Orvosi Vegytani Intézetében nyúl vázizomból kivont enzim, hiszen méréseim szerint szervesen foszfát nélkül kötés hasítás nem történt. A reakciókörülményeket az idő, hőmérséklet és szervesen foszfát illetve glükóz-1-foszfát koncentráció optimalizálásával a céljainknak megfelelően állítottam be. A reakciótermékek arányát HPLC technikával állapítottam meg, a III.1.2.2. Maltooligoszacharid szubsztrátok elválasztása című részben leírt módszerrel, amino oszlopon, gradiens elúcióval, acetonitril: víz oldószerkeverégek alkalmazásával. A preparatív elválasztást a rövid 3-6 tagszámú termékek esetén méret kizárási kromatográfiával (SEC), a hosszabb 8-11 tagszámú termékek esetén a III. 1. 1. Preparatív elválasztások című fejezetben ismertetett félpreparatív HPLC módszerrel oldottam meg.

III.2.1.1. 4-6 tagszámú szubsztrátok előállítása foszforolízissel

A rövid szubsztrátok előállítására a G₇-CNP primer enzimátikus foszforolízist használtam. 38. ábra.



38. ábra CNP-G7 glikogén foszforiláz b enzim által katalizált foszforolízise

Vizsgáltam a reakció termékeloszlását az idő függvényében 30 °C hőmérsékleten, szervesetlen foszfát nagy feleslegét alkalmazva (5 mM primer, 1 M foszfát, pH 6,8), hogy az egyensúly a foszforolízis irányába tolódjon el. Az 6. táblázat a mérési eredményeket mutatja.

6. Táblázat

Termékeloszlás a reakcióidő függvényében 30 °C hőmérsékleten^a

Reakció idő (perc)	G7-CNP foszforolízis termékei (%) ^b					Konverzió (%)
	G ₃ -CNP	G ₄ -CNP	G ₅ -CNP	G ₆ -CNP	G ₇ -CNP	
5	1,3	73,7	15	10	0	100
10	2	77	12	9	0	100
60	14	66,2	11,5	8,2	0	100
180	33,8	48,9	11,2	6,0	0	100
300	51,3	41,4	4,4	2,9	0	100

^a Reakciókörülmények: 5 mM G₇-CNP, 1 M foszfát puffer pH 6,8, 10 E/ml enzim

^b HPLC-vel meghatározott terület% értékek

30 °C hőmérsékleten 10 perc reakcióidő után a kiindulási anyag teljesen átalakult, a fő termék (77%) a tetramer glikozid. Hosszabb reakcióidőt alkalmazva trimer és tetramer glikozid képződik 51,3 és 41,4 %-ban. A tetramer glikozid kedvezményezett képződése egybeesik azzal a korábbi megfigyeléssel, mely szerint a glikogén foszforiláz a glikogén láncokat az elágazás előtti negyedik glükóz egységig bontja¹⁴⁷. A képződött trimer glikozid megjelenése azt mutatja, hogy a CNP csoport helyettesíthető egy glükóz egységgel, hasonlóan ahhoz amit a sertés pankréász enzim vizsgálatoknál leírtunk⁶¹. A kiindulási anyagnál hosszabb termék képződését nem tapasztaltuk.

A reakciósebesség csökkentése a hosszabb oligomerek képződésének kedvez, ezért hogy az előállítani kívánt penta- és hexamer mennyiségét növeljem a reakcióelegyen

vizsgáltam a reakciót alacsonyabb hőmérsékleten. A 0 °C hőmérsékleten végzett kísérlet eredményeit a 7. táblázatban foglaltam össze.

7. Táblázat

Termékeloszlás a reakcióidő függvényében 0 °C hőmérsékleten^a

Reakció idő (perc)	G7-CNP foszforolízis termékei (%) ^b					Konverzió (%)
	G ₃ -CNP	G ₄ -CNP	G ₅ -CNP	G ₆ -CNP	G ₇ -CNP	
10	0	3	8	45	44	56
15	0	9	16	49	25	75
28	0	23	24	39	14	86
42	0	42	23	28	7	93
55	0	48,5	23	22	6	93,5

^a Reakciókörülmények: 5 mM G₇-CNP, 1 M foszfát puffer pH 6,8, 10 E/ml enzim

^b HPLC-vel meghatározott terület% értékek

A táblázat adataiból látható, hogy a konverzió lényegesen kisebb, 28 perces inkubációs idő után az előállítani kívánt reakciótermékek G₄-CNP, G₅-CNP, G₆-CNP 23:24:39 %-os arányban képződnek. 55 perces reakcióidő alatt fő terméként a G₄-CNP képződik.

Vizsgáltam a reakció hőmérsékletfüggését 0-34 °C hőmérséklet tartományban. A kapott termékeloszlásokat 10 perc inkubációs idő után a 8. táblázat mutatja.

A reakciósebesség nő a hőmérséklet növelésével. Átlagosan 5 fok hőmérséklet csökkenés a konverziófok 7-9 %-os csökkenését okozza. 0 és 5 fok között ennél jóval nagyobb mértékű (26,2%) csökkenést tapasztaltam. Ennek magyarázata az enzim inaktív tetramer formájának képződése lehet¹⁴⁸. Hogy elkerüljem a foszforiláz enzim alacsony hőfokon való oligomerizációját 10 °C alatti hőmérsékletet nem alkalmaztam maltooligomerek előállítására.

Öszefoglalva tehát a G₇-CNP-t primerből (5mM) glikogén foszforiláz b enzim segítségével 1 M foszfát pufferben (pH 6,8) 10 °C-on 10 perces inkubálási idő alatt a rövidebb (G₄-CNP, G₅-CNP, G₆-CNP) termékek közel azonos molarányban (29:26,1:33,7) képződnek.

8. Táblázat

Hőmérsékletfüggés vizsgálata^a

Hőmérséklet (°C)	G7-CNP foszforolízis termékei (%) ^b					Konverzió (%)
	G ₃ -CNP	G ₄ -CNP	G ₅ -CNP	G ₆ -CNP	G ₇ -CNP	
0	0	3	7,6	44,9	44,5	55,5
5	0	12	22,4	46,8	18,3	81,7
10	0	29	26,1	33,7	11,1	88,9
15	0	68	19,3	11	2,2	97,3
20	0	76	14	10	0	100
30	2	77	12	9	0	100
34	2	89	7	2	0	100

^a Reakciókörülmények: 5 mM G₇-CNP, 1 M foszfát puffer pH 6,8, 10 E/ml enzim, 10 perc

^b HPLC-vel meghatározott terület% értékek

A felhasznált enzimrendszer érdekessége, hogy a foszforiláz enzim által felszabadított Glc-1-P felhasználódhat a megfordított lánchosszabbítási reakcióban, ha a szerves foszfát koncentráció lecsökken. Ezért alkalmaztam a foszfát nagy feleslegét (1M) a felszabaduló Glc-1-P -hoz képest (max. 20 mM) az eddigi kísérletekben. Másrészt viszont a magas só koncentráció megnehezíti a termékek kinyerését, ezért vizsgáltam a foszfát koncentráció hatását a termékeloszlásra. Eredményeimet a 9. Táblázatban összegeztem.

9. Táblázat

Termékeloszlás 10 °C hőmérsékleten, a foszfát koncentráció függvényében^a

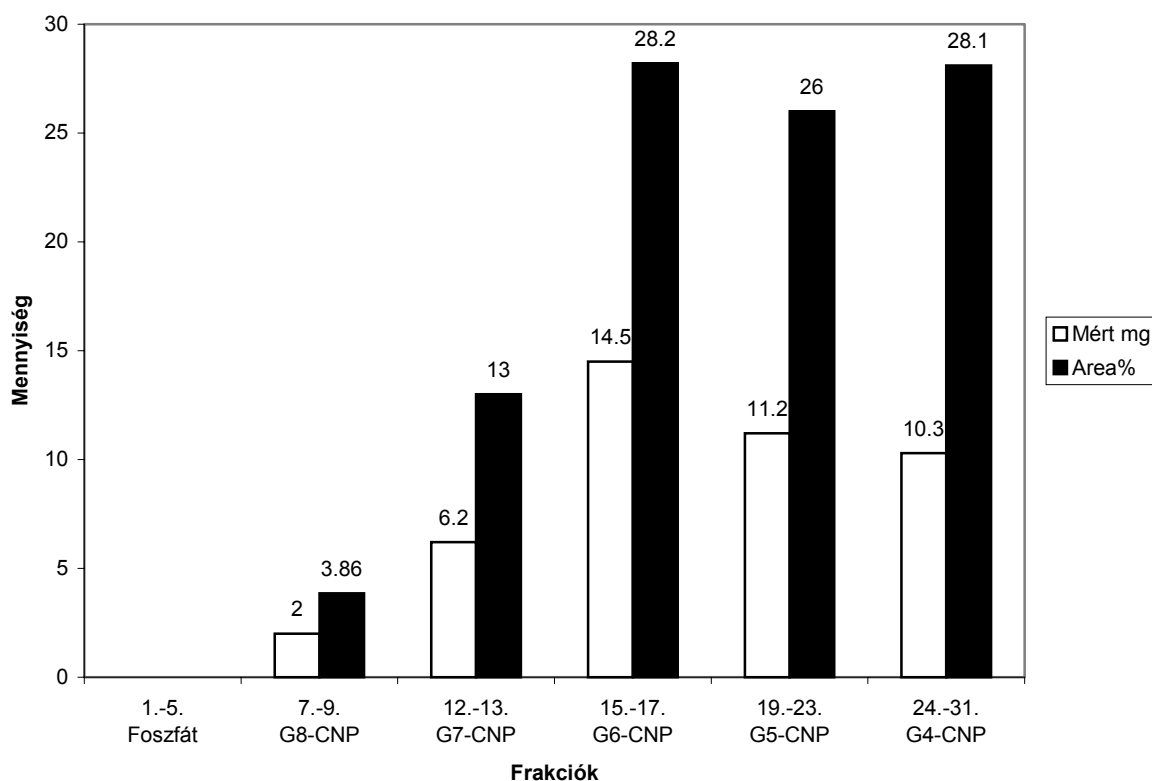
Foszfát konc. (mM)	G7-CNP foszforolízis termékei (%) ^b					Konverzió (%)
	G ₄ -CNP	G ₅ -CNP	G ₆ -CNP	G ₇ -CNP	G ₈ -CNP	
5	0	0	12,5	76,9	10,6	23,1
40	6,2	15,5	39,6	32,0	6,7	68
100	30,9	26,2	28,8	11,5	2,6	88,5
500	28	26,6	33,5	10,2	1,7	89,8
1000	29	26,1	33,7	11,1	0	88,9

^a Reakciókörülmények: 5 mM G₇-CNP, pH 6,8, 10 E/ml enzim, 10 perc

^b HPLC-vel meghatározott terület% értékek

Az eredmények azt mutatják, hogy 100, 500 és 1000 mM foszfát koncentráció alkalmazásával szinte azonos termékeloszlás érhető el, miközben a lánc hosszabbítás elhanyagolható. Ennek megfelelően a rövidebb termékek előállítására 100 mM foszfát koncentrációjú puffert használtam.

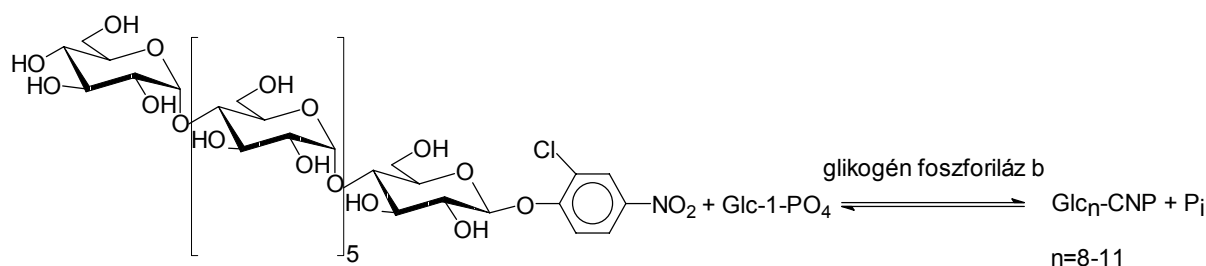
A termékek preparatív méretben történő elválasztására méret kizárási kromatográfiás elválasztást alkalmaztam Toyopearl HW-40F oszloptölteteten. Bár ennek a töltet típusnak az elválasztási tartománya 10^2 - 10^4 közé esik fehérjék elválasztásakor, azt tapasztaltam, hogy maltooligoszacharidok esetén 1-7 közötti polimerizációfok tartományban megfelelő az elválás, az ennél hosszabb oligomerek nem válnak el. A homológok csökkenő molekulatömeg szerint eluálódnak. A kromatográfiás mátrix másik nagy előnye, hogy mivel a foszfát ionok a holttérfogat után rögtön megjelennek az eluátumban, az elválasztás és a sómentesítés egy elválasztással megoldható, (39. ábra).



39. ábra A foszforolízis reakciótermékeinek SEC (Mért mg) és HPLC (Area%) elválasztása
Körülmények: SEC: oszlop: ToyopearlHW-40F, 180 * 15 mm, 30-60 μ m, eluens: víz, 1,5 ml/perc, HPLC: kolonna: Amino 250 * 4 mm, 5 μ m, gradiens elúció: MeCN 70% -ról 20 perc alatt 50%, detektor: DAD 302 nm.

III.2.1.2. 8-11 tagszámú szubsztrátok előállítása transzglykozilezéssel

Az 1. egyenlet megfordíthatóságát felhasználva G₇-CNP mint akceptor és Glc-1-P mint donor kiindulási anyagokból foszforiláz enzimmel magasabb tagszámú oligomerek is előállíthatók. 40. ábra



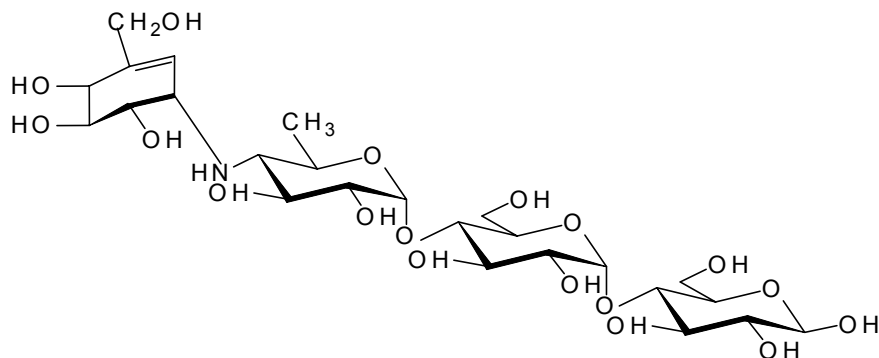
40. ábra Szubsztrátok előállítása glikogén foszforiláz b enzim transzglykozilezési reakciójával

A lánchosszabbítási reakcióra hasonló megfontolások érvényesek mint a láncrövidítésre, így a reakciókörülményeket a Glc-1-P koncentráció, a hőmérséklet és az enzimkoncentráció változtatásával optimalizáltam. Mivel foszfát jelenléte a reakciót a foszforolízis irányába tolná el, ezért ezeket a kísérleteket 50 mM koncentrációjú glicerofoszfát pufferben végeztem.

Akarbóz hatása a termékeloszlásra

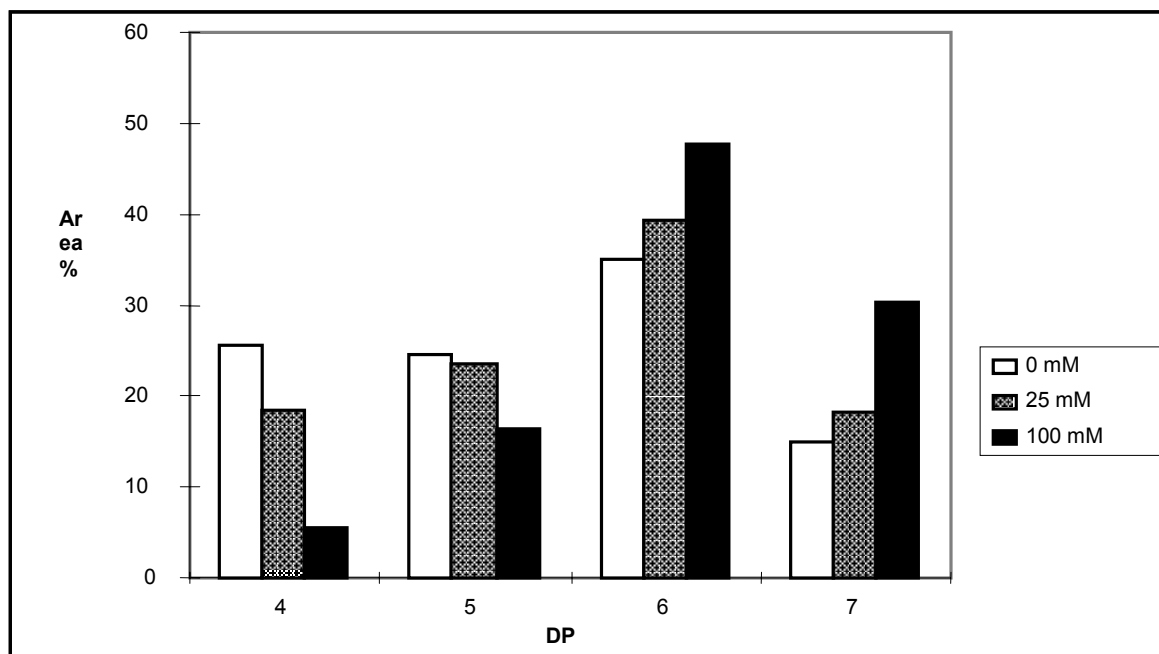
A foszforiláz enzim érdekes tulajdonsága, hogy a G-1-P-ből felszabaduló szervesetlen foszfát az ellentétes irányú reakcióban felhasználódhat. Ezért egy olyan reagens, ami a foszfát eltávolítását kontrolálni képes az oligoszacharidok képződésének kedvez. Az akarbóz (41. ábra) hatásos átmeneti állapot analóg inhibitor az amilázok katalizálta keményítő hidrolízisben¹⁴⁹. Mivel a maltooligoszacharidok az α-amilázoknak és a glikogén foszforiláznak is szubsztrátjai, megvizsgáltam az akarbóz hatását a glikogén foszforiláz katalizálta transzglykozilezési reakcióban.

Vizsgáltam, hogy az akarbózt szubsztrátja-e a glikogén foszforiláz enzimnek, de se a lánchosszabbítás, se a lebontás irányában nem detektáltam új terméket.



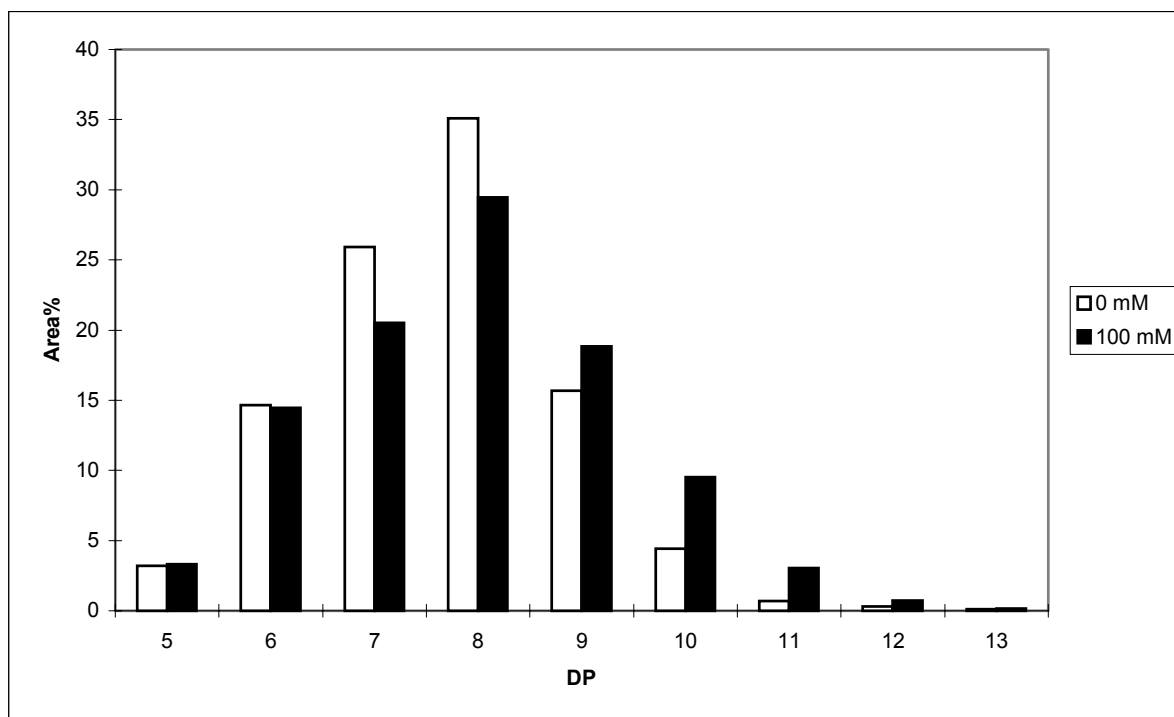
41. ábra Az akarbóz képlete

Az első kísérletsorozatban a G7-CNP foszforolitikus lebontása során vizsgáltam az akarbóz hatását. Mint a 42. ábrán látható az akarbóz megváltoztatja a termékeloszlást a bontási reakcióban, gátolja a foszforolízist. Meg kell említeni, hogy a foszforolízis többlépéses reakció, a képződő termékek szubsztrátjai az enzimnek, így további reakcióban vesznek részt. Ez nehezíti az eredmények értelmezését.



42. ábra Termékeloszlás a foszforolízis reakcióban különböző akarbóz koncentrációk mellett
Reakciókörülmények: 5 mM G7-CNP, 100 mM foszfát puffer pH=7,0, 37°C, 10 perc

Az akarbóz növekvő koncentrációja (25 mM, 100 mM) csökkentette a rövid termékek (CNP-G4, CNP-G5) mennyiségét és növelte a maradék kiindulási anyag és a hosszabb termék (CNP-G6) arányát. A következő kísérletben 100 mM akarbóz hatását vizsgáltam azonos, 5 mM donor és akceptor koncentráció mellett. A 43. ábrán látható, hogy az akarbóz elősegíti az oligoszacharid szintézist.



43. ábra Termékeloszlás G7-CNP és G-1-P foszforiláz b enzim katalizálta reakciójában akarbóz jelenlétében és anélkül

Reakciókörülmények: G7-CNP 5 mM, G-1-P 5 mM, glicerofoszfát puffer pH=7,0,

Ez eddig nem volt ismert. A reakció a hosszabb oligomerek képződésének irányába tolódik el, míg a CNP-G7-nél rövidebb reakciótermékek aránya gyakorlatilag nem változik. Az inhibíció hiánya a szintézis irányában azzal lehet összefüggésben, hogy az inhibítor hatás kifejtéséhez terner komplexre van szükség az enzim-akarbóz-foszfát egyidejű részvételével. A tapasztalt aktiváló hatás felveti azt a kérdést, hogy vajon a foszfát eltávolításával, vagy a az enzim foszfátkötő helyéhez való kötődéssel fejt ki hatását az akarbóz. Az akarbóz itt leírt hatása enzimológiai szempontból érdekes lehet, de mivel gyenge inhibítor, a megfelelő hatás eléréséhez olyan magas akarbóz koncentrációt kellene alkalmazni, ami a termékek elválasztásánál problémát jelenthet. Ezért a termékeloszlást a többi kísérleti körülmény változtatásával optimalizáltam.

A következő kísérletben 37 °C-on 0,1 E/ml aktivitású enzimmel, 50 mM Glc-1-P és 5 mM CNP-G₇ koncentráció alkalmazásával vizsgáltam a termékeloszlást. Az eredményeket a 10. táblázatban foglaltam össze.

10. Táblázat

Termékeloszlás 37 °C hőmérsékleten, a reakcióidő függvényében^a

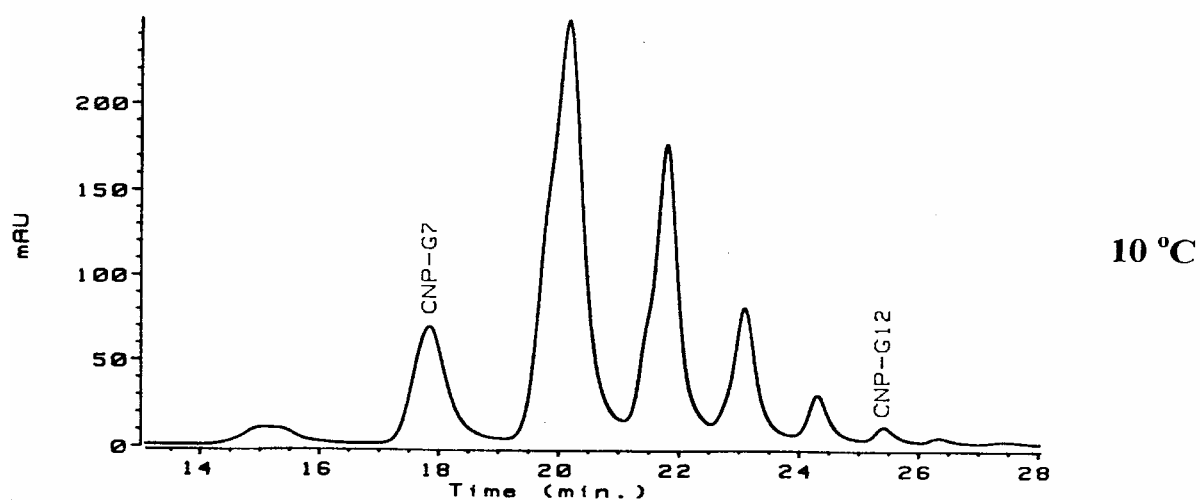
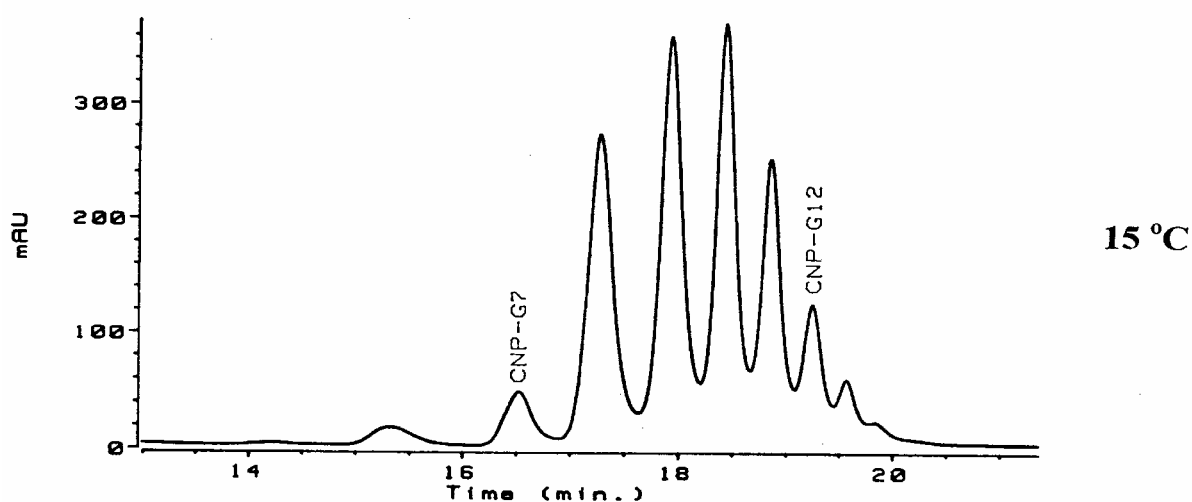
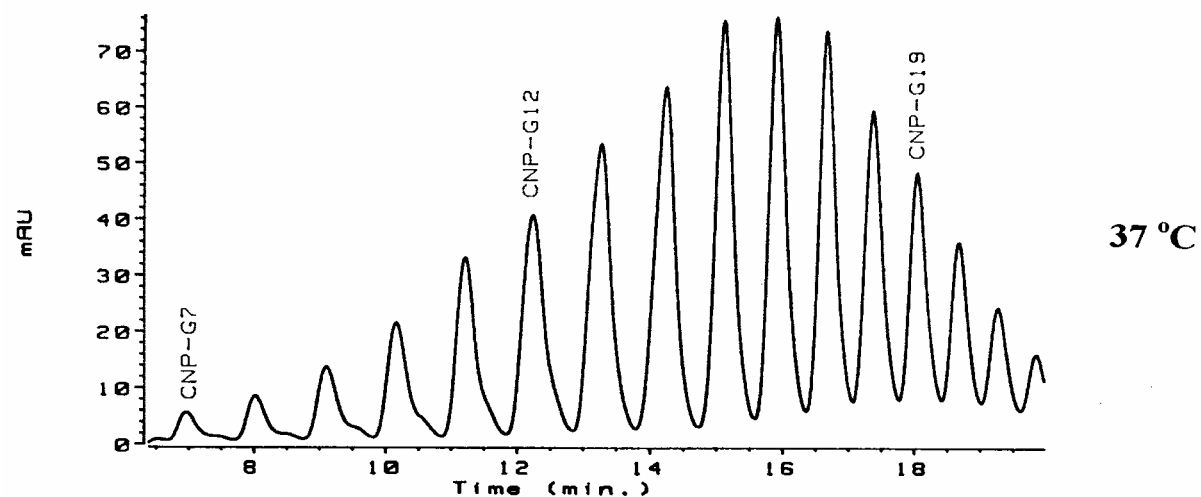
Idő (perc)	G7-CNP lánchosszabbítás termékei (%) ^b					Konverzió (%)
	G7-CNP	G8-CNP	G9-CNP	G10-CNP	G11-CNP	
5	94	6	-	-	-	6
20,5	76	22,2	0,01	-	-	24
38	62,8	33,6	3,5	-	-	37,2
55,5	51,7	41,9	5,9	0,5	-	48,3
74	44,5	46	8,3	1	0,08	55,5

^a Reakciókörülmények: 5 mM G7-CNP, 50 mM Glc-1-P, glicerofoszfát puffer pH 6,8, 0,1 E/ml enzim,

^b HPLC-vel meghatározott terület% értékek

A táblázat adataiból látható, hogy több mint egy órás reakcióidő után is a kiindulási anyag csaknem fele változatlan maradt. Az enzim 40 °C-nál magasabb hőmérsékleten nem stabil, ezért nagyobb mennyiségű enzim alkalmazásával (az enzimaktivitás növelésével) próbáltam gyorsítani a reakciót.

37 fokon olyan mértékű reakciósebesség növelést sikerült elérni, hogy húsznál nagyobb tagszámú termékek is képződtek. Mivel a *Bacillus licheniformis* α -amiláz vizsgálatához 9-10 tagszámú szubsztrátra volt szükség, az ennél nagyobb termékek veszteséget jelentenek. Ezért a láncrövidítésnél tapasztaltaknak megfelelően a reakciósebességet alacsonyabb hőmérséklet alkalmazásával csökkentettem. Korábbi eredményeim szerint a 10 fok alatti hőmérséklet a foszforiláz enzim oligomerizációját, inaktiválódását okozza, ezért azonos reakciókörülmények mellett, de 10 fokon megismételtem a reakciót. A reakciósebesség lecsökkent, a G8-CNP vált fő terméké és a célvegyületek (G9-CNP, G10-CNP, G11-CNP) kis mennyiségben képződtek. A hőmérséklet öt fokkal történő emelése céljaimnak megfelelő termékeket eredményezett. A különböző hőmérsékleteken, azonos inkubációs idő után kapott termékelegyek amino kolonnán acetonitril-víz különböző gradienseivel készült HPLC kromatogramjai az 44. ábrán láthatóak. A kromatogramokon jól látható a fenn leírt termékeloszlás változás.



44. ábra Termékeloszlások különböző hőmérsékleten a G7-CNP és G-1-P foszforiláz b enzim katalizálta reakciójában. Reakcióköörülmények: 10 μ l 10 E/ml aktivitású enzim, Glc-1-P koncentráció 50 mM, a CNP-G₇ koncentráció 5 mM, 37 °C 30 perc inkubálási idő..

Az enzimkoncentráció csökkentése is a reakciósebesség csökkenésével jár. 1 E/ml enzimkoncentráció mellett, 37 °C hőmérsékleten vizsgáltam a Glc-1-P koncentráció hatását a termékeloszlásra. Az eredményeket a 11. táblázat mutatja.

11. Táblázat

Termékeloszlás a Glc-1-P koncentráció függvényében^a

Glc-1-P (mM)	G7-CNP lánchosszabbítás termékei (%) ^b								
	G ₆ -CNP	G ₇ -CNP	G ₈ -CNP	G ₉ -CNP	G ₁₀ -CNP	G ₁₁ -CNP	G ₁₂ -CNP	G ₁₃ -CNP	G ₁₄ -CNP
50	-	4,5	21,8	26,7	22,3	14,5	6,8	2,4	0,7
25	-	12	35,2	28,4	15,5	6,4	1,9	0,46	0,2
10	1,2	9	27,2	43	15	3,5	0,6	-	-

^a Reakciókörülmények: 5 mM G₇-CNP, glicerofoszfát puffer pH 6,8, 1 U/ml enzim,

^b HPLC-vel meghatározott terület% értékek

10 mM Glc-1-P koncentráció nem elegendő annak biztosítására, hogy láncrövidítés ne történjen. Az 50 mM Glc-1-P koncentráció esetén kapott termék-eloszlás pontosan megfelel céljainkra, a kiindulási anyag nagyrészt átalakult, fő termékek a 8,9,10 tagszámú oligomerek közel azonos molarányban képződtek, a G₁₁-CNP is kinyerhető mennyiségben keletkezik. A hosszabb termékek miatti veszteség 10 % körüli.

A 12. táblázatban foglaltam össze a két - szinte azonos termékelegyet adó - kísérlet körülményeit, termékösszetételét.

12. Táblázat

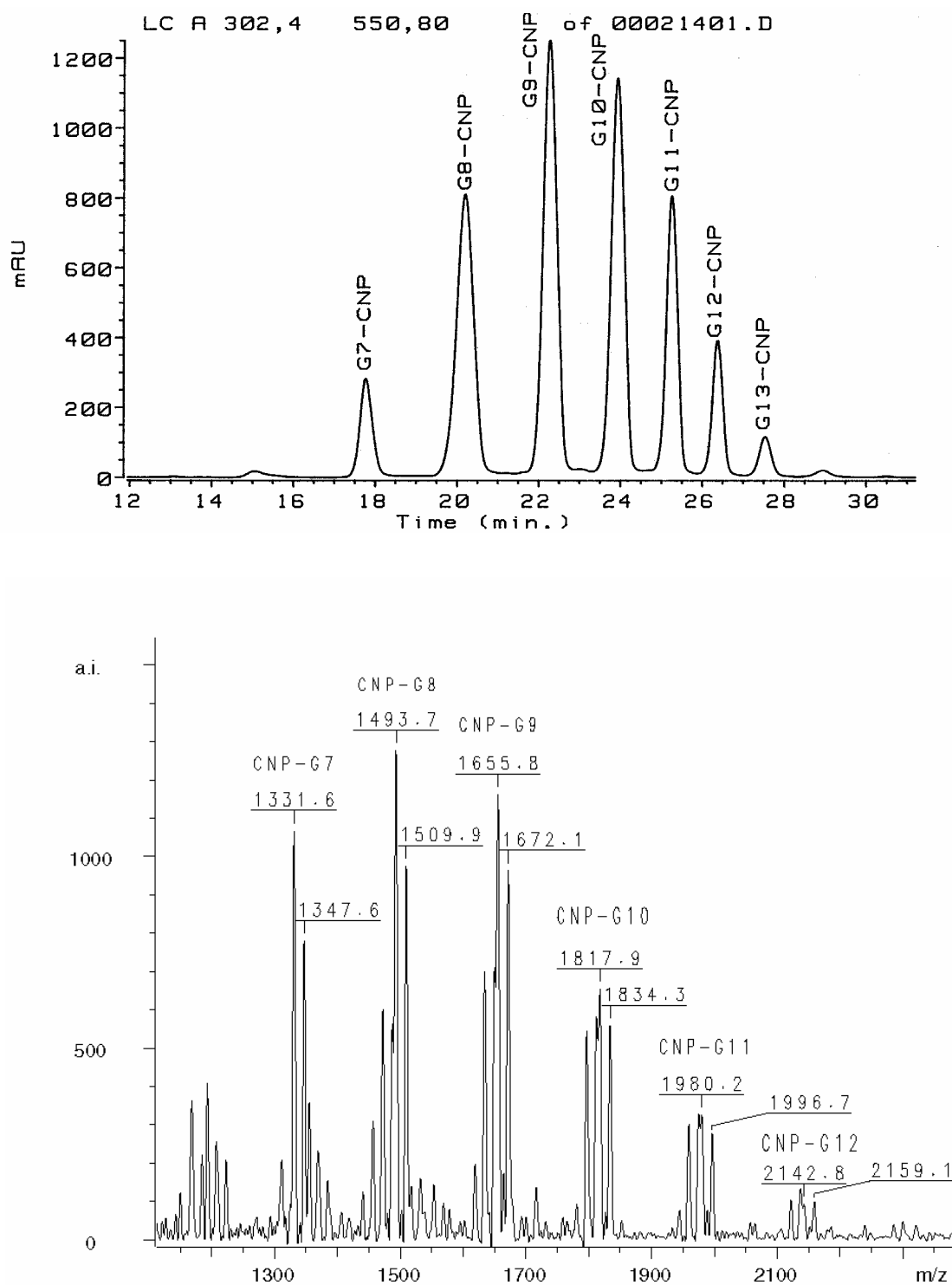
Termékeloszlás különböző hőmérsékleten és enzimkoncentrációnál^a

Enzim konc., hőmérséklet	G7-CNP lánchosszabbítás termékei (%) ^b								
	G ₇ -CNP	G ₈ -CNP	G ₉ -CNP	G ₁₀ -CNP	G ₁₁ -CNP	G ₁₂ -CNP	G ₁₃ -CNP	G ₁₄ -CNP	G ₁₅ -CNP
1 E/ml, 37 °C	4,5	21,8	26,6	22,2	14,5	6,8	2,4	0,7	0,2
10 E/ml, 15 °C	3,9	22,3	26,0	23,8	15,4	6,6	2,0	-	-

^a Reakciókörülmények: 5 mM G₇-CNP, 50 mM G-1-P, glicerofoszfát puffer pH 6,8, 30 perc

^b HPLC-vel meghatározott terület% értékek

A termékek azonosítására MALDI-TOF tömegspektrometriát alkalmaztam. A 45. ábrán a termékelegy kromatogramját és MS spektrumát mutatom be.



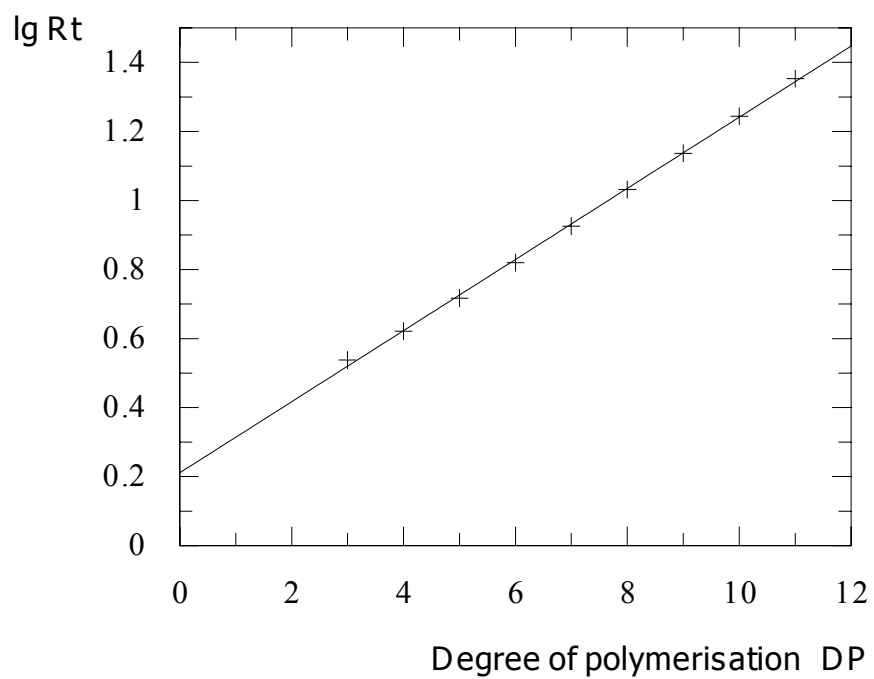
45. ábra Enzimes szintézissel előállított CNP maltooligomer glikozid elegy HPLC kromatogramja és MALDI-TOF MS spektruma

A MALDI –TOF MS különösen alkalmas elegyek komponenseinek azonosítására, mivel a kíméletes ionizációs módszerrel a fragmentáció elhanyagolható, főként molekulaionok keletkeznek. Oligoszacharidok spektrumában főként az $(M+Na)^+$ és $(M+K)^+$ ionok jelennek meg, amint az a spektrumon is látható $\delta m/z=16$ különbséggel. A maltooligoszacharidok tagjai közötti egy glükóz egység különbség $m/z=162$ Da különbséget jelent. A spektrumon a CNP aglikon fragmentációjával képződő komponensek csúcsai is megjelennek. A fragmentáció valószínűleg azért következik be, mert az UV lézer hullámhossza igen közel van a a CNP-glikozid 302 nm hullámhossznál levő elnyelési maximumához.

A preparatív mennyiségben előállított termékek elválasztása félpreatatív HPLC segítségével történt, az analitikai elválasztásokhoz használt kromatográfiás körülmények mellett, de félpreatatív oszlop és nagyobb áramlási sebesség alkalmazásával.

A termékek kötéstípusának igazolására a HPLC retenciós idők analizését alkalmaztam. A primernél hosszabb termékek közül csak CNP-G₈ állt rendelkezésemre, ezért a termékek kötéstípusát egy -az oligoszacharid sorozatokra már korábban leírt, maltooligoszacharid glikozidokra általam is tanulmányozott- összefüggés alapján azonosítottam. Az összefüggés szerint, a homológ oligoszacharid sorozatok tagjainak izokratikus körülmények között meghatározott retenciós ideje (R_t) vagy retenciós faktora (k') logaritmikus összefüggésben van az oligoszacharid tagszámával. Vagyis ha az oligoszacharid tagszámának függvényében ábrázoljuk a retenciós ideje, vagy kapacitási faktora logaritmusát, egyenest kapunk. Vizsgálataim szerint az összefüggés diol és amino oszlopon igaz maltooligoszacharid peracetátokra, amino oszlopon maltooligoszacharid glikozidokra (CNP,PNP).

A 46. ábrán CNP–G7 foszforiláz enzimmal katalizált reakciójában képződött CNP–G3–CNP–G12 termékek retenciós idejének logaritmusát ábrázoltam az oligomer tagszámának függvényében. A 7 tagszámúnál rövidebb termékek kötéstípusa szükségszerűen $\alpha(1\rightarrow4)$, hiszen ciklodextrinből előállított szubsztrát hasításával képződtek. Mivel a hosszabb termékek $\lg R_t$ értéke ugyanarra az egyenesre esik, ez valószínűsíti, hogy a képződött termékek is $\alpha(1\rightarrow4)$ kötésűek.



46. ábra G7-CNP primerből glikogén foszforiláz b enzim segítségével előállított oligomerek HPLC retenció idejének logaritmus a tagszám (DP) függvényében.

III. 2. 2. Humán nyál α -amiláz aktív centrumának vizsgálata

A humán (nyál és pankreász eredetű) α -amilázok klinikai kémiai szempontból alaposan tanulmányozott enzimek. Aktivitásuk mérése kiválasztó szervük megbetegedésének (akut pankreatitisz, parotitisz) fontos indikátora^{81,82}. A klinikai diagnosztikában számos módszert alkalmaznak az amiláz aktivitás mérésére, ezekben a szubsztrátum többnyire valamilyen kromofor aglikont hordozó maltooligoszacharid¹⁵⁰⁻¹⁵⁶. A nem redukáló végen levő védőcsoportok, mint az etilidén¹⁵⁷, 3-oxo-butilidén¹⁵⁸, benzilidén¹⁵⁹, galaktopiranozil¹⁶⁰, megvédik a szubsztátot az amiláz kitékben segédenzimként alkalmazott exo-glikozidázok katalizálta hidrolízistől. Az aktivitás mérésére használt legújabb, 3. generációs szubsztrátot, a 2-klór-4-nitrofenil- α -D-maltotriozidot, közvetlenül a kromofor felszabadításával hasítja az enzim, ami segédenzim nélküli aktivitásmérést tesz lehetővé¹⁶¹.

Az amilázok fontos szerepet játszanak a szénhidrát anyagcserében, így aktivitásuk csökkentése inhibitorokkal anyagcsere betegségek (diabetes, elhízás) gyógyításában játszhat szerepet. A legújabb vizsgálatok szerint a nyál amiláznak szerepe lehet a fogszuvasodás kialakulásában is, hiszen kötődni képes a fogzománchoz és felületén Streptococcus baktériumok megkötésére alkalmas kötőhely található⁸⁵.

A HSA szubsztrátkötő helyének vizsgálata segítheti új diagnosztikumok és gyógyszerként alkalmazható inhibitorok tervezését.

Kísérleteim 2-klór-4-nitrofenil- β -D-maltooligoszacharid (CNP), valamint a nem redukáló végen 4,6-benzilidén csoportot hordozó 4-nitrofenil-maltooligoszacharid (Bnl-NP) glikozidok humán nyál α -amiláz aktív centrumhoz való kötődésének meghatározására irányultak. HPLC termékanalízissel vizsgáltam a bontási képet, a kromofor csoportot tartalmazó termékeket 302 nm hullámhosszon detektáltam, azonosítottam és arányukat határoztam meg. A termékek koncentrációja lineárisan változik a reakcióidő függvényében, a termékarányokat a hidrolízis korai szakaszában, 4 különböző inkubációs időnél mért érték átlagaként adtam meg. Tanulmányoztam a szubsztrát méretének, az aglikonnak, valamint a nem redukáló végen levő benzilidén csoportnak a kötés-hasítások gyakoriságára kifejtett hatását. Az eredményeket Phillips és munkatársai által bevezetett kötőhely elmélet alapján értelmeztem¹⁶².

Az α -amiláz enzimesalád tagjainak szubsztrát kötőhelyét, mint egymást követő alhelyeket írhatjuk le, melyek geometriája komplementer néhány glükóz egységgel. Az enzim aktív helyének tanulmányozására hatásos módszer az enzim és szubsztrátja vagy inhibitora által létrehozott komplex röntgenkristallográfiai vizsgálata. A sertés pankreász amiláz (PPA)

esetében számos felvétel készült a szabad enzimről és az enzim oligoszacharid komplexéről¹⁶³. Ezen kívül közöltek a HPA szubsztrátanalóg inhibitorokkal alkotott komplexeinek röntgenkristallogramját is⁶⁶. A HSA-ról azonban csak szabad formában hozzáférhető röntgenkristallográfiás felvétel⁸⁵. Így az általunk használt alacsony molekulatömegű szubsztrát sorozatok bontási képének meghatározása hasznos információkat szolgáltathat az enzim aktív helyéről. Korábbi vizsgálatok szerint a HSA 5 alhellyel rendelkezik, melyből 3 glikon, 2 aglikon kötő hely, a hasítás ezek között történik. A harmadik aglikon kötő hely létezését kizárták⁶⁷.

Eredményeim szerint a HSA valamennyi vizsgált szubsztrátot több helyen képes hasítani, a 4, 5, 6, 7 tagszámúakat 3, a hosszabbakat még több helyen. A produktív komplexeket a szubsztrát kötőhely sematikus ábrázolásával a 47. ábra mutatja.

A bontási kép alapján, a rövid szubsztrátok esetén a CNP elfoglalhatja a glükóz helyét a kötődés során, kölcsönhatásba lépve a +2 alhellyel, de ez kevésbé kedvezményezett mint a glükóz +2 hely kapcsolat. Ideális esetben a +2 alhelyen is glükóz egység kötődik és így a hidrolízis fő terméke CNP-G2 lesz, amint ez a 4, 5, 6 tagszámú szubsztrátok bontási képén megfigyelhető. A hexamer szubsztrát esetén ez maltotetraóz felszabadulását eredményezi a nem redukáló vég felől. A hosszabb szubsztrátok (DP 7, 8, 9) hasításakor is a tetramer termék képződése a legkedvezőbb a nem redukáló vég felől. Méréseink szerint tehát kedvezményezett, ha 6 kötőhely van betöltve glükóz egységgel. Ha mind a hat kötőhely betöltésére több kötőmódban is lehetőség van, az így létrejövő produktív komplexekből képződő termékek eloszlása egyre inkább kiegyenlítődik. A nem redukáló végről a tetramer hasítása DP 7 esetében domináns, de még a 9 tagszámú szubsztrát hasításakor is a maltotetraóz képződik legnagyobb százalékban.

A tetramernél hosszabb termékeket a nyál amiláz tovább tudja hidrolizálni, így ezeknél a vizsgálatoknál a hidrolízis kezdeti stádiumában kell elvégezni a méréseket, hogy az úgynevezett másodlagos hasítás (secondary attack) elhanyagolható legyen. A hidrolízis reakciósebessége nő a szubsztrát lánchosszának növekedésével, ez a növekedés a legnagyobb mértékű a tertamer/pentamer esetében. Ha a bontási képet a kiindulási szubsztrát koncentráció 80%-ánál nagyobb szubsztrát koncentráció mellett határozzuk meg, a szubsztrát felesleg biztosítja, hogy másodlagos hasítás ne történjen.

csoport nem helyettesítheti a glükóz egységet, de azt tapasztaltuk, hogy a –3 és –4 alhelyet elfoglalhatja. A hasítási gyakoriság alapján a –3 alhellyel kedvező kölcsönhatást alakíthat ki, amit a 4, 5 és 6 tagszámú szubsztrátokból 100% 83% és 25%-ban képződő Bnl-G2 termék mutat, a másik sorozatnál mért 85%, 12% és 5% G2 termékek helyett.

	-4	-3	-2	-1	+1	+2	HSA %				
											
	□	G	G	G	G	NP	0				
		□	G	G	G	G	NP	100			
	□	G	G	G	G	NP	0				
		□	G	G	G	G	NP	17			
			□	G	G	G	G	NP	83		
	□	G	G	G	G	G	NP	62			
		□	G	G	G	G	G	NP	13		
			□	G	G	G	G	G	NP	25	
	□	G	G	G	G	G	NP	67			
		□	G	G	G	G	G	NP	12		
			□	G	G	G	G	G	NP	11	
				□	G	G	G	G	G	NP	10
□	G	G	G	G	G	G	G	NP	32		
	□	G	G	G	G	G	G	G	NP	27	
		□	G	G	G	G	G	G	NP	22	
			□	G	G	G	G	G	G	NP	19
											
	-4	-3	-2	-1	+1	+2					

48. ábra A nem redukáló végen 4,6-benzilidén csoporttal módosított szubsztrátok

illeszkedése a HSA szubsztrátkötő helyéhez. G: glükóz egység, □: 4,6-benzilidén csoport, NP: 4-nitrofenil csoport, —:kötés

Hasonló eredményt kaptak Nagamine és munkatársai, akik fenil- α -maltooligoszacharidok a nem redukáló végen jó d és piridilamino csoporttal módosított

származékait vizsgálták^{164,165}. Ezek az eredmények apoláros csoportok jelenlétét valószínűsítik a -3 alhely környezetében.

Ezzel ellentétben a benzilidén csoport kölcsönhatása kedvezőtlennek látszik a -4 alhellyel, amit az alacsony hasítási gyakoriság mutat 0%, 17%, 23%, 11%, a 4, 5, 6, 7, tagszámú szubsztrátok esetén. A másik sorozatnál rendre 10%, 86%, 44%, 32% a képződő azonos tagszámú maltooligomerek aránya. A G2-NP hasítása a redukáló vég felől kedvező, amit a magas hasítási frekvenciák jeleznek, 100%, 17%, 62%, 67%, 32% a 4, 5, 6, 7, 8 tagszámú szubsztrátok esetén. Ez analóg a CNP glikozidokkal kapott eredményekkel. A kiugróan alacsony 17% hasítás a pentamer esetén a benzilidén csoport és a -4 kötőhely kedvezőtlen kölcsönhatását mutatja.

Ha megvizsgáljuk a valamennyi alhely betöltésével létrejövő kötőmódhoz tartozó hasítási gyakoriságokat a G6-CNP és Bnl-G5-NP esetében látható, hogy az 51%-ról 17%-ra csökken a G→Bnl csere hatására. Hasonló módon a G7-CNP és Bnl-G6-NP azonos kötő módjaiban 50%→13%, a G8-CNP és Bnl-G7-NP esetében 41%→11%, a G9-CNP és Bnl-G8-NP esetében 30%→19% a hasítási gyakoriság változása. Ez a -4 kötőhely létezését igazolja, hiszen egyértelműen mutatja, hogy a -4 helyen glükóz egység kötődése Bnl helyett többszörösére növeli a hasítás valószínűségét. A -4 kötőhely létezését igazoló hasítási gyakoriságokat a 13. táblázatban foglaltam össze.

13. táblázat

-4 alhely vizsgálata a többi alhely betöltésével létrejövő kötőmódokban

Szubsztrátok			Hasítási gyakoriság %		
1	2	3	1	2	3
G6-CNP	Bnl-G6-NP	G7-CNP	44	13	50+18
G7-CNP	Bnl-G7-NP	G8-CNP	32	11	41+27+16
G8-CNP	Bnl-G8-NP	G9-CNP	16	19	30+26+19+17

1. A -4 alhely nincs betöltve
2. A -4 alhely benzilidén csoporttal van betöltve
3. A -4 alhely glükóz egységgel van betöltve

A táblázat adatainak összevetése mutatja, hogy a benzilidén csoport jelenléte a -4 kötőhelyen kedvezőtlenebb, mint akár annak üresen maradása, akár glükóz egységgel történő betöltése. A glükóz egység bekötődése kedvezőbb a betöltetlenséghez és a benzilidén bekötődéshez képest is.

+1, +2 aglikon kötőhely vizsgálata

A benzilidén csoporttal módosított szubsztrátok bontási képének vizsgálata a glikon kötőhely méretéről, polaritási viszonyairól adott információt. Az aglikon kötőhely alaposabb megismeréséhez szabad maltopentaóz (G5), G4-CNP, G5-CNP és a redukáló végi glükóz egység redukciójával előállított maltopentaitol (G4-GOH) bontási képét hasonlítottuk össze. Vizsgáltuk két trióz bontási képét is, melyben a CNP aglikon α -glikozidos kötéssel kapcsolódott a glükózhoz. A produktív komplexeket a 49. ábrán mutatom be.

Szubsztrát	-4 -3 -2 -1 +1 +2	%
G5	G—G—G—G—G	100
G4-GOH	G—G—G—G—C G—G—G—G—C	40 60
G4-CNP	G—G—G—G—∇ G—G—G—G—∇ G—G—G—G—∇	10 85 5
G5-CNP	G—G—G—G—G—∇ G—G—G—G—G—∇ G—G—G—G—G—∇	2 86 12
G3-CNP ¹⁶⁸	G—G—G—∇ G—G—G—∇ G—G—G—∇	77 15 8
Gal-G2-CNP	⊕—G—G—∇	100

49. ábra Az aglikon kötőhely vizsgálata különböző szubsztrátokkal. G: glükóz egység, ⊕: galaktóz egység, C: szorbit egység, ∇: CNP csoport, — :glikozidos kötés

A HSA csak egy helyen hasítja a maltopentaózt. A glükóz redukciójával képződő maltopentaitól az utolsó gyűrűs glükóz egység helyett nyílt láncú szorbitot tartalmaz. A HSA ezt az oligoszacharidot is képes hasítani, de a bontás terméke 40% maltitol és 60% maltotriitol.

Ez azt mutatja hogy a szorbit képes bekötődni a +2 kötőhelyre, de a glükóz kötődése erősebb, kedvezményezettebb, tehát a kötődésben nemcsak a hidroxil csoportok, hanem azok térbeli helyzete is fontos szerepet játszik. Ha a redukáló végi glükózt CNP-re cseréljük (G4-CNP), a bontási képből kitűnik, hogy a +2 kötőhelyre bekötődhet a CNP egység, de jóval kedvezőbb, ha ezt a helyet glükóz foglalja el, még annak árán is, hogy a -3 kötőhely üresen marad. A CNP-G5 szubsztrát bontásakor már csak egészen kis mértékű (2%) az olyan hasadás amikor a +2 kötőhelyen nem glükóz kötődik.

Érdekes bontási képet mutat az α helyzetű CNP aglikont tartalmazó trióz szubsztrátok hidrolízise. Ezeket α -amiláz enzim szérumból és vizeletből való klinikai meghatározásához fejlesztették ki, mivel segédenzimek nélkül, a felszabaduló kromofor fotometriás mérésével gyors, egyszerű aktivitás mérést tesznek lehetővé^{161,166}.

A maltotrióz a humán α -amiláz enzimeknek "rossz szubsztrátja", hasításának reakciósebessége lényegesen alacsonyabb a többi vizsgált szubsztráton mérthez képest. Azid vagy tiocianát ionok jelenlétében jelentős reakciósebesség növekedés figyelhető meg, így az aktivitásméréshez olyan puffert alkalmaznak, amely ezen ionok valamelyikét magas koncentrációban tartalmazza. A tiocianát a bontási képet is befolyásolja¹⁶⁷, így méréseinknél nem alkalmaztuk ezt az aktiválást.

A G3-CNP bontási képe szerint a CNP csoport a +1 kötőhelyre is képes bekötődni, sőt ez a kötőmód kedvezőbb, mint ha a -3 hely üresen marad, a +1 helyre glükóz kötődik és a +2 helyen CNP található. Tiocianát jelenlétében a kromofor hasítása kizárólagossá válik¹⁶⁷.

A nem redukáló végen β kötésű galaktózt tartalmazó szubsztrát csak egy helyen, a kromofor csoport hidrolízisével hasad. Mivel a 4OH csoport nem játszhat szerepet az enzimhez való kötődésben (hiszen a természetes szubsztrát keményítőben ezek glikozidos kötésben vannak), ezért a galaktóz -2 helyről való kizáródásának csak a galaktóz β -glikozidos kötése lehet az oka.

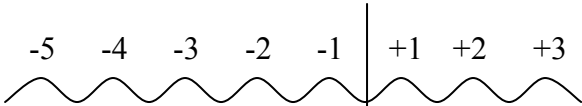
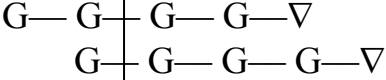
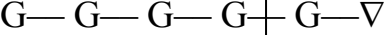
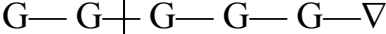
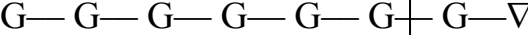
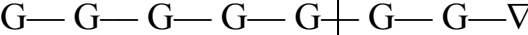
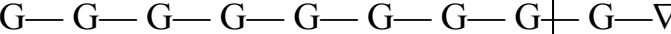
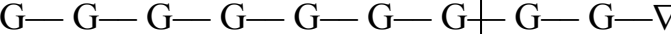
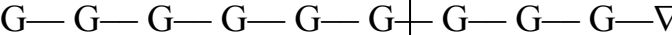
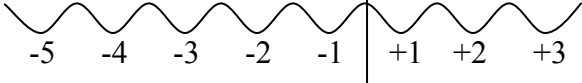
Összefoglalva: A HSA enzimnek méréseim szerint 6 alhelye van, 4 glikon és 2 aglikon kötőhely. A legkedvezőbb a hasítás szempontjából, ha valamennyi kötőhelyen glükóz egység kötődik. A +2 kötőhelyre szorbit vagy CNP (NP) bekötődhet, a +1 kötőhely a CNP csoportot képes megkötni. A -3 glikon kötőhely kedvező kölcsönhatást tud kialakítani az apoláros benzilidén csoporttal, míg a -4 kötőhellyel kedvezőtlen a benzilidén csoport kölcsönhatása. A kötőhelynél hosszabb szubsztrátok esetén a termékeloszlás fokozatosan kiegyenlítődik.

III. 2. 3. *Bacillus licheniformis* α -amiláz szubsztrát kötő helyének vizsgálata

A *Bacillus licheniformis* által termelt hőstabil α -amiláz (BLA) egyike az iparban legelterjedtebben alkalmazott keményítőbontó enzimeknek. Bár a baktérium maga mezofil, magasabb hőmérsékleten hőstabil α -amilázt termel¹⁰². Az enzim eddigi vizsgálatai főként kiemelkedő hőstabilitásának szerkezeti okait igyekeztek felderíteni. Röntgendiffrakciós felvételét eddig csak szubsztrát és/vagy inhibitor nélkül közölték^{98,99}, így a szubsztrátkötő helyről csak analógiák alapján vonhatunk le következtetéseket. Bontási képét radioaktív jelzett 1-10 tagszámú maltooligoszacharidokkal, papírkromatográfiás módszerrel vizsgálták¹⁰³. A módszer korlátai miatt pontos termékarányokat nem közöltek. Újabb eredmények szerint a BLA katalizálta keményítő hidrolízis termékeloszlása függ a hőmérséklettől¹⁰⁴ és az inkubációs közeghez adott etanol is megváltoztatja a termékek arányát¹⁰⁵. Mivel az alhelyek számáról és természetéről nem voltak adatok, ezeket az eredményeket nem tudták értelmezni.

Célul tűztem ki a *Bacillus licheniformis* által termelt hőtűrő α -amiláz (BLA) bontási képének, a CNP- és Bnl-NP glikozidok aktív centrumhoz való kötődésének meghatározását. HPLC termékanalízissel vizsgáltam a bontási képet, valamint a szubsztrát tagszámának és a nem redukáló végén levő benzilidén csoportnak a kötőhasítások gyakoriságára gyakorolt hatását. A hasítási frekvenciák alapján lehetőség van az alhelyekre jellemző látszólagos kötési energiák számítására, amelyek az alhely és a szubsztrát monomer egysége közötti kötés erősségét jellemzik.

A bontási képek alapján feltételezett produktív komplexeket az 50. ábrán mutatom be. A nem redukáló vég felől a pentamer hasítása kedvezményezett a 6, 7, 8 tagszámú szubsztrátok esetén, míg a redukáló vég felől a G3-CNP hasadása domináns az 5, 8, 9, 10 tagszámú szubsztrátok bontásakor. Ezek az eredmények megegyeznek azzal a kvalitatív képpel, amit a papírkromatográfiás vizsgálat mutatott¹⁰³. Ennek alapján 8 alhelyet tartalmazó kötőhelyet valószínűsítettem, 5 glikon és 3 aglikon kötőhellyel. Eredményeim szerint, ellentétben a korábbi vizsgálatokkal, a BLA a pentamer, sőt a tetramer szubsztrátot is hidrolizálja, bár a reakció sebessége lényegesen kisebb. A G5-CNP fő hidrolízisterméke G3-CNP, de G2-CNP és G1-CNP is jelentős mennyiségben keletkezik. Látható, hogy ha a szubsztrát hosszúsága lehetővé teszi mind a 8 kötőhely betöltését, akkor a redukáló vég felőli trimer hasítása a legvalószínűbb.

		%	DP
			
	87	4	
	13		
	18		
	34	5	
	48		
	68		
	7	6	
	25		
	5		
	84	7	
	11		
	2		
	13	8	
	85		
	3		
	10		
	83	9	
	4		
	6		
	83	10	
	6		
	5		
			

50. ábra Produktív komplexek és hasítási frekvenciák a CNP-glikozidok BLA enzim katalizálta hidrolízisében

G: glükóz egység, ∇: 2-klór-4-nitrofenil csoport, —: glikozidos kötés

Nyolcnál rövidebb szubsztrátok bontásakor a fő hidrolízistermék a nem redukáló vég

felől a pentamer, kivéve a G5-CNP szubsztrátot, ami a kromofor β -glikozidos kötése miatt nem képezhet olyan produktív komplexet, amelyben mind az 5 glikon kötőhely be van töltve, és a G4-CNP szubsztrátot amely semmiképpen nem tudja betölteni mind az öt alhelyet.

Az eredményeket a humán amilázok bontási képével összevetve a legfeltűnőbb, hogy az ott megfigyelt termékeloszlás kiegyenlítődés a BLA esetében nem következik be a kötőhelynél hosszabb szubsztrátok esetében sem. Ha az enzim és a szubsztrát több olyan kötőmódot tud létrehozni, amiben mind a 8 kötőhely glükóz egységgel betöltött, mindig a G3-CNP felszabadulás a domináns, sőt a kötéshasítás gyakorisága is állandó (83%). Ez a jelenség felveti valamilyen energetikai, vagy szterikus gát jelenlétének lehetőségét a +3 kötőhely környezetében.

Maltooligoszacharid szubsztrátokon meghatároztam a BLA kinetikai paramétereit.

14. Táblázat

A BLA kinetikai paramétereai maltooligoszacharid szubsztrátokon

Szubsztrát	K_M (mM)	v_{max} (mM/perc)
Maltopentaóz G5	2,5	0,0045
Maltohexaóz G6	3,3	0,14
Maltoheptaóz G7	4,0	0,33
Maltooktaóz G8	5,0	0,5

A 14. táblázat adatai mutatják, hogy a K_M és v_{max} egyaránt nő a lánchosszúság növekedésével. A v_{max} értékében legjelentősebb a növekedés a maltohexaóz esetében, ami több mint harmincszoros a maltopentaózhhoz képest. A maltopentaóz az egyetlen olyan szubsztrát a vizsgáltak közül, amely egyik produktív kötőmódban sem képes betölteni a –5 alhelyet. Ez is ennek az alhelynek a kiemelt fontosságát igazolja. A kinetikai paraméterek és a hasítási frekvencia ismeretében lehetőség van kötőhely térkép (subsite map) készítésére.

Egyetlen példát találtam, ahol szabad maltoheptaóz hasítási frekvenciáit közölték¹⁰⁴. A grafikonról visszszámolt értékek jó egyezést mutatnak a G7-CNP szubsztráton mért értékekkel, így feltételeztem, hogy a CNP csoport jelenléte nem befolyásolja a bontási képet. A következő táblázatban feltüntettem a *Bacillus licheniformis* α -amiláz általam számított látszólagos kötési energia értékeit, valamint összehasonlításképpen az Allen és Thoma által számított *Bacillus amiloliquefaciens* α -amiláz alhely kötési energiákat.

15. Táblázat Számított látszólagos kötési energiák

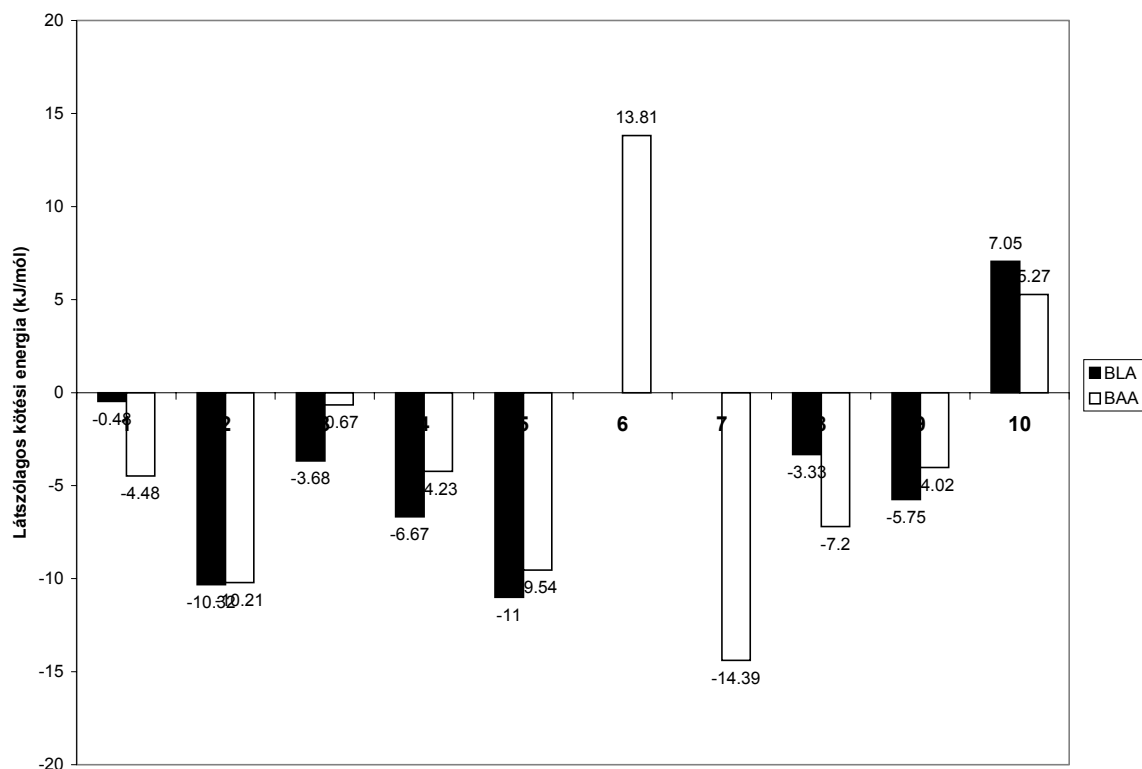
Alhely száma	Látszólagos alhely kötési energia $\Delta\tilde{G}$ (kJ/mól)	
	BLA	BAA ^a
-6	- 0,48	-4,48
-5	-10,32	-10,21
-4	-3,68	-0,67
-3	-6,67	-4,23
-2	-11,0	-9,54
-1	-	+13,81
+1	-	-14,39
+2	-3,33	-7,2
+3	-5,75	-4,02
+4	+7,05	+5,27

^a Allen és Thoma szerint¹⁶⁸

A táblázatba húzott szaggatott vonal a hasítási helyet jelöli. A számított energiák igazolják feltételezésünket miszerint a BLA 8 alhelyből álló kötőhellyel rendelkezik. A kísérleti hibák miatt az alhely energiákat $\pm 0,6$ kJ/mól pontossággal tudjuk meghatározni, ezért az ennél kisebb értékek nullának tekinthetők, vagyis nem valódi az ilyen energiával rendelkező kötőhely.

A BLA és BAA közeli rokonságát mutatja a kötési energiák hasonlósága. A legszembetűnőbb a +4 alhely esetén mért pozitív kötési energia, ami a glükóz egység és az alhely kedvezőtlen kölcsönhatását mutatja. Ezt az alhelyet gát alhelynek (barrier subsite) nevezik. Ez az energia gát az oka, hogy a kötőhelynél hosszabb ($n > 8$ BLA és $n > 9$ BAA) szubsztrátok esetén a fő termék G3 a redukáló vég felől mindkét enzim esetében. A –4 alhely energiája mindkét esetben kisebb mint a többi alhelyé. A BLA maltopentaóz termelő, a BAA pedig maltohexaóz termelő enzim, ami a keményítő hidrolízisekor döntően keletkező oligoszacharidot illeti. A glikon kötő hely ezzel összhangban 5 alhelyből áll a BLA és 6 alhelyből a BAA esetében.

Gát alhely hiányában a hosszú szubsztrátok esetében a kötés-hasítás gyakorisága egyre jobban kiegyenlítődik (ld. HSA). Az alhely térkép grafikus képét az 51. ábra mutatja, amelyen jól látható a két enzim szubsztrátkötő helyének nagyfokú hasonlósága.

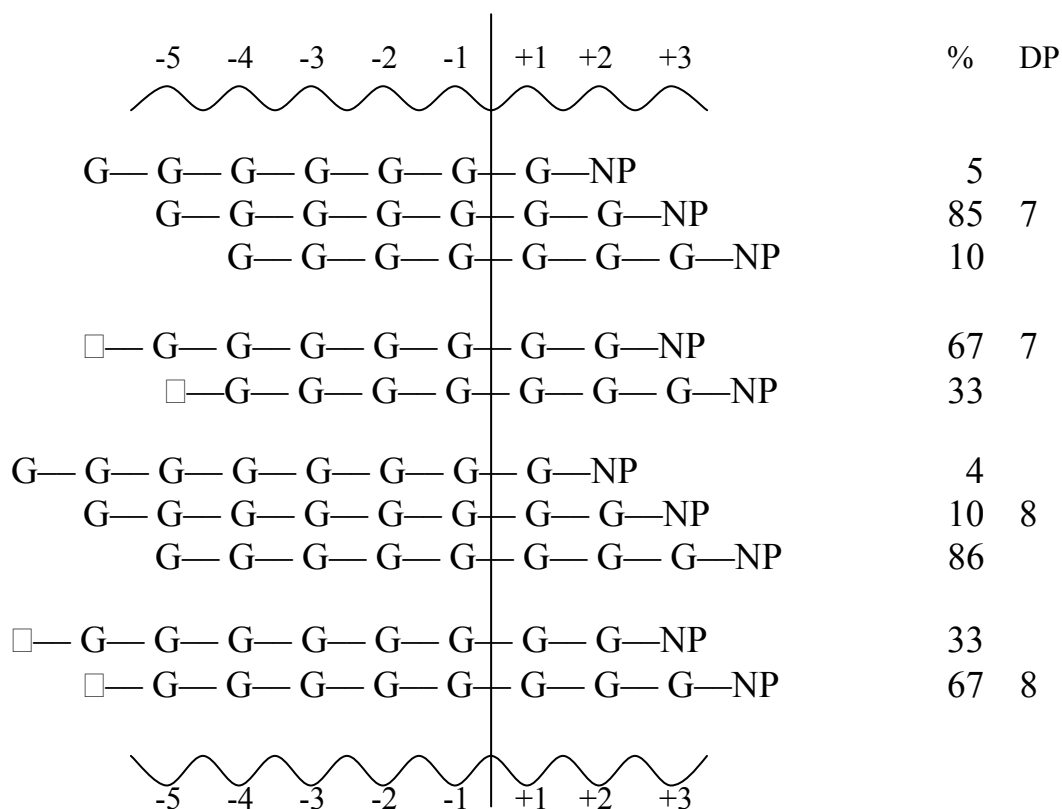


51. ábra BLA és BAA alhely térképe

Vizsgáltuk a bontási képet két, a nem redukáló végen benzilidén csoporttal módosított szubsztráttal (52. ábra).

Azt tapasztaltam, hogy a hasítási gyakoriság kismértékben megváltozott a megfelelő nem módosított szusztráthoz képest. A fő termék a nem redukáló vég felől a pentamer marad a heptaozid szubsztrátból és a redukáló vég felől a G3-NP az oktamerből, de a hasítás gyakorisága mindkét esetben lecsökkent. A benzilidén csoport pozícióját tekintve ez azt mutatja, hogy a -6 pozícióban nem kedvező az apoláros benzilidén csoport jelenléte. Kedvezőbb, ha az akár a -5 alhelyet, akár egy az aktív centrumtól még távolabbi -7 pozíciót foglalja el. Hangsúlyozni kell, hogy ezek a pozíciók nem alhelyek, a számozást csak az egyszerűbb érthetőség kedvéért alkalmaztam.

Ezek az eredmények is igazolják a -5 kötőhely létezését, és valószínűsítik a -6 pozícióban, vagyis a -5 alhely környezetében poláris aminosavak jelenlétét.



51. ábra A nem redukáló végen 4,6-benzilidén csoporttal módosított szubsztrátok illeszkedése a BLA szubsztrátkötő helyéhez. G: glükóz egység, □: 4,6-benzilidén csoport, NP: 4-nitrofenil csoport, —:kötés

A – 5 kötőhely létezését igazoló hasítási gyakoriságokat a 15. táblázatban foglaltam össze.

16. Táblázat

-5 alhely vizsgálata a többi alhely betöltésével létrejövő kötőmódokban

Szubsztrátok			Hasítási gyakoriság %		
1	2	3	1	2	3
G7-CNP	Bnl-G7-NP	G8-CNP	11	33	85
G8-CNP	Bnl-G8-NP	G9-CNP	-	-	4+83

4. A -5 alhely nincs betöltve
5. A -5 alhely Bnl csoporttal van betöltve
6. A -5 alhely glükóz egységgel van betöltve
- nincs ilyen produktív komplex

A benzilidén csoport jelenléte-5 kötőhelyen kedvezőbb, mint ha üresen marad, de kevésbé kedvező, mint ha glükóz egység tölti be. Ha a szubsztrát mérete lehetővé teszi a -5 hely betöltődését, akkor nincs olyan produktív komplex, amiben ez a kötőhely akár üresen maradna akár benzilidénnel töltődne be.

Összefoglalva: a BLA enzim aktív centruma méréseim szerint 9 alhelyből épül fel, 5 glikon kötő és 3 aglikon kötő helyből és tartalmaz egy gát alhelyet. A legkedvezőbb a hasítás szempontjából, ha a kötő helyekhez glükóz egység kötődik, a gát alhelyen pedig nem található glükóz egység. A CNP (NP) csoport a +2, +3 alhelyet elfoglalhatja, a -5 alhelyen benzilidén csoport kötődhet. A -6 pozícióban nem kedvező az apoláris benzilidén csoport jelenléte.

IV. Kísérleti rész

IV. 1. Felhasznált anyagok:

A kísérletekhez használt vegyszerek analitikai tisztaságúak, a HPLC elválasztásokhoz használt oldószerek HPLC gradiens tisztaságúak voltak.

Enzimek:

- Glikogén foszforiláz b (EC. 2.4.1.1): Aktivitása 1000 U/ml, fehérje tartalma 62 mg/ml.

A nyúl vázizomból izolált kristályos enzim glicerines szuszpenzióját a DE OVI -ben preparálták és Prof. Dr. Dombrádi Viktor bocsátotta rendelkezésünkre.

- Humán nyál α -amiláz (EC. 3.2.1.1.): HSA Type IX.A. Sigma (Chem. Co. Ltd.) az izoenzimek tisztítása nélkül használtuk.

- Bacillus licheniformis α -amiláz (EC. 3.2.1.1.): BLA Type XII-A Sigma további tisztítás nélkül használtuk.

Szubsztrátok:

- Maltooligoszacharidok: ciklodextrinből készültek acetolízissel, majd dezacetilezéssel¹²¹.

- PNP glikozidok, CNP glikozidok, Bnl-PNP glikozidok: kémiai és kemoenzimatiszintézissel készültek^{122,131,132}

-GalG2- α -CNP: TOYOBO Co. Ltd. , további tisztítás nélkül használtuk.

IV.2. Általános módszerek

A HPLC elválasztásokat Hewlett-Packard 1090 SeriesII folyadékkromatográf segítségével végeztem. A készülék számítógép vezérelt (ChemStation) diódasoros (DAD) és refraktív index (RID) detektorral felszerelt. Folyadékszállító rendszere lineáris gradiens képzésre alkalmas, az injektálás változtatható térfogatú (1-25 μ l és 10-250 μ l) automata injektorral történik. Az elválasztásokhoz a következő kolonnákat használtam:

Fordított fázis:

- analitikai: Spherisorb ODS2 5 μ m, 250 * 4 mm
- preparatív: LiChrosorb C18 7 μ m, 250 * 10 mm

HILIC:

Szilika:

- analitikai: LiChrospher Si 60 5 μ m, 250 * 4 mm
- preparatív: Supelcosil SPLC-Si 5 μ m, 250 * 10 mm

Amino:

- analitikai: LiChrospher 100 NH₂ 5 μ m, 205 * 4 mm
- preparatív: Hypersil NH₂ (APS) 5 μ m, 250 * 10 mm

Módosított amino:

- analitikai: APS Hypersil 5 μ m, 100 * 4,6 mm

Diol:

- analitikai: LiChrospher 100 DIOL 5 μ m, 250 * 4 mm

A MALDI-TOF MS spektrumokat Bruker Biflex III tömegspektrométerrel készítettem 2,5-dihidroxi-benzoészav, vagy 2,3,6-trihidroxi-acetofenon mátrix alkalmazásával. A minta molekulák gáz fázisba juttatása és ionizálása nitrogén lézer, 3 ns impulzusidő alkalmazásával történt. Többszöri, általában 100 impulzust alkalmaztam 19 kV gyorsító és 20 kV reflektoron feszültség mellett. A készüléket maltooligoszacharidok (DP 3-7) M+Na⁺ ionjainak m/z értékére kalibráltam külső kalibrációt alkalmazva. A DHB mátrixot száraz rácsoptentéssel (dry droplet) a THAP-t a mintával felcseppentés előtt összekeverve (mixed droplet) használtam. A vegyületek azonosítása az M+Na⁺ ionok csúcsai alapján történt. A PSD spektrum analízisekor Domon és Costello által oligoszacharidok fragmentációjára javasolt nomenklatúrát alkalmaztam¹⁶⁹.

A forgatókéesség meghatározása Perkin- Elmer 241 polariméterrel történt, szobahőmérsékleten nm hullámhosszon.

A grafikonok ábrázolásához és görbe illesztéshez a Grafit enzimkinetikai programot használtam¹⁷⁰.

IV.3. Vizsgálatok és szintézisek leírása

Metil glikozidok előállítása: A megfelelő cukor (1 g) kevert metanolos oldatához (50 ml) szilárd jódot (70 mg) adtam. Az elegyet reflux hőmérsékleten kevertem 6-8 órán keresztül, óránként mintát véve az elegyből. A reakciót a minta lehűtése után telített vizes nátrium-tiosulfát oldattal állítottam le, ami eltávolította katalizátorként használt jódot. Az analízishez 15 µl-t injektáltam a minta oldatból szulfát formára hozott amino oszlopra (APS 125 * 4,6 mm, 5 µm). Eluensként aacetonitril: víz=9:1 elegyet alkalmaztam 0,7 ml/perc áramlási sebességgel 0°C hőmérsékleten, melyet a kolonna jeges vízzel történő hűtésével biztosítottam.

G4-CNP-G6-CNP oligomerek előállítása : G7-CNP (6,5 mg, 5 mM) foszfát pufferrel (1 ml 1 M, pH 6,8 , 10 mM β-merkaptotanol, 2 mM EDTA, 4 mM AMP) készült oldatához 10 µl 1000 U/ml glikogén foszforiláz b enzimet adtam. Az elegyet a megfelelő hőfokon adott ideig inkubáltam, majd az enzim reakciót az elegy 1 perces forralásával állítottam le, Hűtés után a kicsapódott enzimet 0,2 µm-es pórusméretű Millipore fecskendőszűrővel kiszűrtem és 20 µl-t injektáltam a HPLC oszlopra.

A preparatív méretű szintézis a következő körülmények között történt. 65 mg G7-CNP primert 10 ml pufferben oldottam, 100 µl enzimet adtam hozzá és 10 °C hőmérsékleten 10 percig inkubáltam, majd felforraltam. Hűtés után a kicsapódott enzimet kiszűrtem, az oldatot liofilizáltam, majd 1ml vízben való oldás után Toyopearl HW-40F (30-60 µm, 180 * 15 mm) oszlopon víz eluenssel (1,5 ml/perc) elválasztottam. A frakciók összetételét VRK-val ellenőriztem Kieselgel 60 F₂₅₄ rétegen, aceton:víz=9:1 eluenssel, UV detektálással. A megfelelő frakciókat egyesítve liofileztem és az így kapott termékek azonosságát és tisztaságát HPLC-vel és ¹H NMR vizsgálattal ellenőriztem.

G8-CNP-G11-CNP oligomerek előállítása: G7-CNP (6,5 mg, 5 mM) és G-1-P (16,8 mg, 50 mM) glicerofoszfát pufferrel (1 ml 25 mM, pH 7,0 , 10 mM β-merkaptotanol, 2 mM EDTA, 4 mM AMP) készült oldatához 10 µl 1000 U/ml glikogén foszforiláz b enzimet adtam. Az elegyet a megfelelő hőfokon adott ideig inkubáltam, majd az enzim reakciót az elegy 1 perces

forralásával állítottam le, Hűtés után a kicsapódott enzimet 0,2 µm-es pórusméretű Millipore fecskendőszűrővel kiszűrtem és 20 µl-t injektáltam a HPLC oszlopra.

A preparatív méretű szintézis a következő körülmények között történt. 65 mg G7-CNP primert és 168 mg G-1-P 10 ml pufferben oldottam, 100 µl, 1000 E/ml aktivitású enzimet adtam hozzá és 15 °C hőmérsékleten 30 percig inkubáltam, majd felforraltam. Hűtés után a kicsapódott enzimet kiszűrtem, az oldatot liofilizáltam, majd 1 ml vízben való oldás után félpreparatív HPLC-vel tisztítottam. Az elválasztáshoz amino oszlopot (250*10 mm, 5 µm) és acetonitril:víz=7:3 eluenst alkalmaztam 3 ml/perc áramlási sebességgel. A detektálás diódasoros detektorral 302 nm hullámhosszon történt. A megfelelő frakciókat egyesítve liofileztem és az így kapott termékek azonosságát és tisztaságát HPLC-vel és MALDI –TOF MS vizsgálattal ellenőriztem.

Maltooligoszacharidok hidrolízise HSA enzimmel: 1,7 mM szubsztrátot és 10 µM enzimet glicerofoszfát pufferben (25 mM pH 7,0 CaCl₂ 5 mM, NaCl 50 mM) inkubáltam 37 °C hőmérsékleten 2, 5, 7, 10 percig. A reakciót az enzim hozzáadásával indítottam. A megadott időpontokban a minta HPLC oszlopra történő injektálásával állítottam le a reakciót. A termékelegyet amino és C18 oszlopon választottam el acetonitril:víz gradiens elúcióval. A bontási képet a kromatogramon megjelenő csúcsok standard anyagok segítségével történő beazonosítása után, a számított területarányok alapján adtam meg. Az UV detektálás mól szelektív, tehát az így kapott arányok megegyeznek a mól arányokkal. A maltóz és maltopentaol bontási képének meghatározásakor RI detektort kellett alkalmazni. Ez a detektortípus nem teszi lehetővé a gradiens elúciót, másrészt tömegszelektív detektor lévén a csúcs alatti területek az anyag tömegével arányosak. A terület % értékeket a móltömeg ismeretében számítottam át mól arányokká. A maltopentaol elválasztása a hidrolízis termékeitől acetilezés után (piridin/ecetsavanhidrid) diol oszlopon (250 * 4 mm, 5 µm) hexán:etilacetát=1:1 oldószerkeleggyel történt. A komponensek maltitol, maltotriitol, maltóz, maltotrióz, maltopentaóz sorrendben eluálódtak.

Maltooligoszacharidok hidrolízise BLA enzimmel: : 1,7 mM szubsztrátot és 10 µM enzimet glicerofoszfát pufferben (25 mM pH 7,0 CaCl₂ 5 mM, NaCl 50 mM) inkubáltam 50 °C hőmérsékleten 2, 5, 7, 10 percig. A reakciót az enzim hozzáadásával indítottam. A megadott időpontokban a minta HPLC oszlopra történő injektálásával állítottam le a reakciót. A termékelegyet amino és C18 oszlopon választottam el acetonitril:víz gradiens elúcióval. A bontási képet a kromatogramon megjelenő csúcsok standard anyagok segítségével történő beazonosítása után, a számított területarányok alapján adtam meg.

IV. 4. Kötőhely térkép (subsite map) számítása

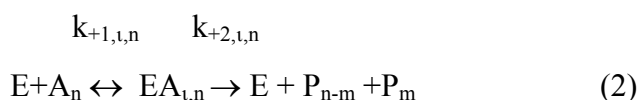
Maltooligoszacharid szubsztrát sorozatok bontási képének meghatározása után, a különböző lánchosszúságú szubsztrátok hasítási frekvenciáinak ismeretében lehetőség van az alhelyek és a szubsztrát monomer egysége közötti kötési energiák számítására. Ehhez Allen és Thoma szerint a következő összefüggések és feltevések szükségesek¹⁶⁸:

1. A bontási kép meghatározásához olyan szubsztrátokra van szükség, amelyek redukáló és nem redukáló vége megkülönböztethető.
2. A bontási képet olyan körülmények között kell meghatározni, hogy a másodlagos folyamatok (transzglykozilezés, másodlagos hasítás) elhanyagolhatóak legyenek.
3. A szubsztrát oligomer produktív (hasítási terméket adó) és nem produktív (a hasítási helyet át nem fedő) enzim-szubsztrát komplexet hoz létre.
4. Ha szubsztrát produktív módon kötődik a hidrolízis sebessége a hidrolitikus sebességi koefficienstől függ. Első közelítésben a különböző produktív helyzeti izomerek hidrolitikus sebességi koefficiense egyenlő, így a hidrolízis sebessége csak a produktív komplexek előfordulási gyakoriságától függ.
5. Valójában a K_M és v_{max} értékének a szubsztrát tagszámától való függése azt mutatja, hogy ez a hidrolitikus koefficiens nem állandó, hanem a betöltött alhelyek számától függ.
6. Az enzim alhelyei a szubsztrát monomer egységének kötődési szabad energiájával (ΔG) jellemezhetőek, és ez független a többi alhely betöltöttségétől.
7. Az alhely kötési energiák a következő összefüggés szerint határozzák meg az adott módban kötődő n tagszámú szubsztrát asszociációs állandóját:

$$\sum \Delta G_i + 10 = -RT \ln K_{i,n} \quad (1)$$

ahol ΔG_i az i alhelyre történő kötődés szabad energiája, 10 kJ/mol a keveredés szabad energiája, $K_{i,n}$ az n tagszámú szubsztrát i kötő módban való kötődésének asszociációs állandója.

8. A polimer szubsztrát kötődése és hidrolízise a Michaelis séma szerint



$$k_{1-,i,n}$$

Ahol E az enzim, A_n az n tagszámú szubsztrát, $k_{+2,i,n}$ a mikroszkopikus hidrolitikus koeficiens az $EA_{i,n}$ produktív komplexre, és P_{n-m} és P_m a hidrolízis termékei a szubsztrát nem redukáló és redukáló vége felől $n-m$ és m tagszámmal. A mikroszkopikus Michaelis konstans erre a produktív komplexre:

$$K_{i,n} = (k_{-1,i,n} + k_{+2,i,n}) / k_{+1,i,n} \quad (3)$$

Ha $k_{+2,i,n} \ll k_{-1,i,n}$ a Michaelis konstans reciproka egy asszociációs konstans és a mért Michaelis állandó reciproka ezen mikroszkopikus asszociációs állandók összegével egyenlő.

9. Ugyanazon szubsztrát két különböző kötő módjából képződő termékek képződési sebességének aránya felírható

$$(d[P_{i,m}]/dt)/(d[P_{i+1,m+1}]/dt) = (k_{+2,i,n}/K_{i,n}) / (k_{+2,i+1,n}/K_{i+1,n}) \quad (4)$$

10. Az (1) és (4) egyenletek összevonásából következik

$$RT \ln(F_{i,m} / F_{i+1,m+1}) = \Delta G_{i+1} - \Delta G_{i-n+1} + RT \ln(k_{+2,i+1,n} / k_{+2,i,n}) \quad (5)$$

ahol $F_{i,m}$ a redukáló végi glükóz egységével i pozícióban kötődő m tagszámú terméket adó hidrolízis kötéshasítási gyakorisága.

Az egyenlet leegyszerűsödik, ha olyan produktív komplexre írjuk fel amelynek redukáló (vagy nem redukáló) vége nem valós kötő helyre kötődik, mivel ekkor ΔG_{i-n+1} (vagy ΔG_{i+1}) nullával egyenlő.

11. Ha definiáljuk a látszólagos kötési energiát $\Delta \check{G}_{i+1}$ amely az alhely kötési energia mellett a hidrolitikus koeficienseket is tartalmazza, ez a kötéshasítási gyakoriságokból meghatározható. Thoma és mtsai azt találták, hogy egy újabb monomer egység kötődése az aktiválási energiát mindig azonos értékkel csökkenti, vagyis $\Delta G_{i+1} = \Delta \check{G}_{i+1} + \Delta G_{a,i}$ ahol $\Delta G_{a,i}$ az ún. akkcelerációs energia és értéke számításaik szerint BAA-ra 1,55 kJ/mól.
12. A hasítási frekvenciákból a hasítási hely melletti két kötőhely kötési energiája nem határozható meg, mivel ezek a produktív komplexekben mindig be vannak töltve.

V. Irodalom

1. Görög. S., *Magyar Kémikusok Lapja*, **53** (1998) 369.
2. L. A.Th. Verhaar, B. F. M. Kuster, *J. Chromatogr.*, **220** (1981) 313.
3. A. J. Alpert, *J. Chromatogr.*, **499** (1990) 177.
4. Z. E. Rassi, *J. Chromatogr.*, **720** (1996) 93.
5. S. C. Chrums, *J. Chromatogr.*, **720** (1996) 75.
6. Carbohydrate Analysis, *Journal of Chromatography Library* Vol. 58, Ed. Ziad El Rassi, Elsevier, 1995
7. A. Nahum, Cs. Horváth, *J. Chromatogr.*, **20** (1981) 53
8. Cs. Horváth, *Techniques in Liquid Chromatography*, Heyden, London, 1982 229.
9. M. Werzekle, G. Simoens, F. Van Damme, *Chromatographia*, **23** (1987) 292.
10. L. R. Snyder, J. W. Dolan, J. R. Gant, *J. Chromatogr.*, **165** (1979) 3.
11. L. A. Verhar, B. F. M. Kuster, H.A. Claessens, *J. Chromatogr.*, **284** (1984) 1.
12. P. Vrátný, J. Coupek, S. Vozka, Z. Hustomská, *J. Chromatogr.*, **254** (1983) 143.
13. N. W. H. Cheetham, P. Sirimane, W. R. Day, *J. Chromatogr.*, **207** (1981) 439.
14. A. Heyraud, M. Rinaud, *J. Liq. Chromatogr.*, **3** (1980) 721.
15. N. W. H. Cheetham, V. E. Dube, *J. Chromatogr.*, **262** (1983) 426.
16. G. D. McGinnis, S. Prince, J. Lowrimore, *J. Carbohydr. Chem.*, **5** (1986) 83.
17. G. B. Wells, R. L. Lester, *Anal. Biochem.*, **97** (1979) 184.
G. B. Wells, V. Kontoyiannidu, S. J. Turco, R. L. Lester, *Methods. Enzimmol.*, **83** (1982) 132.
18. N. W. H. Cheetham, P. Sirimane, *J. Chromatogr.*, **196** (1980) 171.
19. N. W. H. Cheetham, P. Sirimane, *J. Chromatogr.*, **208** (1981) 100.
N. W. H. Cheetham, P. Sirimane, *Carbohydr. Res.*, **96** (1981) 126.
20. C. Niemann, W. Saenger, R. Nuck, B. Pfannemüller, *Carbohydr. Res.*, **215** (1991) 15.
21. P. F. Daniel, D. F. DeFeudis, I. T. Lott, L. H. McLuer, *Carbohydr. Res.*, **97** (1981) 161.
P. F. Daniel, *Methods. Enzimmol.*, **138** (1987) 94.
22. H. Sumihiro, Chapter 15, *Carbohydrate Analysis*, Ed. Z. E. Rassi Elsevier 1995
23. M. Suzuki, A. Suzuki, *Biol. Chem.*, **382** (2001) 251.
24. S. Yasuno, K. Kokubo, M. Kamei, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63** (1999) 1353.
25. J. A. Saba, X.D. Shen, J. C. Jamieson, H. Pereault, *J. Mass Spectrom.*, **36** (2001) 563.
26. C. F. Poole, S. K. Poole, *Chromatography Today*, Elsevier, Amsterdam, 1991, 311.

27. B. Porsch, *J. Chromatogr.*, **253** (1982) 49.
28. K. Koizumi, T. Utamura, Y. Kubota, S. Hizukuri, *J. Chromatogr.*, **409** (1987) 396.
29. C. Brons, C. Olieman, *J. Chromatogr.*, **259** (1983) 79.
30. C. F. Poole, S. K. Poole, *Chromatography Today*, Elsevier, Amsterdam, 1991, 383.
31. G. D. McGinnis, P. Fang, *J. Chromatogr.*, **153** (1978) 107.
32. J. Thiem, J. Schwenter, H. Karl, A. Sievers, J. Reimer, **208** (1981) 107.
33. K. Yoshida, K. Kotsubo, H. Shigematsu, *J. Chromatogr.*, **208** (1981) 104.
34. C. A. White, J. F. Kennedy, B. T. Golding, *Carbohydr. Res.*, **76** (1979) 1.
35. F. Nachtmann, K. W. Budna, *J. Chromatogr.*, **136** (1977) 279.
36. C. A. White, S. W. Vass, J. F. Kennedy, D. G. Large, *J. Chromatogr.*, **264** (1983) 99.
37. N. K. Karamanos, T. Tsegenidis, C. A. Antonopoulos, *J. Chromatogr.*, **405** (1987) 221.
38. M. Takeda, M. Maeda, A. Tsuji, *J. Chromatogr.*, **244** (1982) 347.
39. G. J. L. Lee, J. E. Evans, H. Tieckelmann, *J. Chromatogr.*, **146** (1978) 439.
40. J. G. Baust, R. E. Lee, R. R. Rojas, D. L. Hendrix, D. Friday, H. James, *J. Chromatogr.*, **261** (1983) 65.
41. Z. L. Nikolov, M. M. Meagher, P. J. Rely, *J. Chromatogr.*, **319** (1985) 51.
42. Z. L. Nikolov, M. M. Meagher, P. J. Rely, *J. Chromatogr.*, **321** (1985) 393.
43. E. C. Conrad, J. K. Palmer, R. Schwarzenbach, *J. Chromatogr.*, **140** (1977) 279.
44. Yoshida, K. Kotsubo, H. Shigematsu, *J. Chromatogr.*, **208** (1981) 104.
45. L. A. Th. Verhaar, B. F. M. Kuster, *J. Chromatogr.*, **234** (1982) 57.
46. Y. A. Wei, J.-N. Fang, *J. Chromatogr.*, **513** (1990) 227.
47. D. Noel, T. Hanai, M. D. Amboise, *J. Liq. Chromatogr.*, **2** (1979) 1325.
48. M. D. Amboise, D. Noel, T. Hanai, *Carbohydr. Res.*, **79** (1980) 1.
49. S. J. Mellis, J. U. Baenzinger, *Anal. Biochem.*, **114** (1981) 276.
50. K. Koizumi, T. Utamura, Y. Okada, *J. Chromatogr.*, **321** (1985) 145.
51. K. Koizumi, T. Utamura, T. Kuroyanagi, S. Hizukuri, J.-I. Abe, *J. Chromatogr.*, **299** (1984) 215.
- K. Koizumi, T. Tanimoto, Y. Okada, N. Nakinishi, N. Kato, Y. Takagi, H. Hashimoto, *Carbohydr. Res.*, **215** (1991) 127.
52. P. van Eikeren, H. McLaughlin, *Anal. Biochem.*, **77** (1977) 513.
53. N. P. Arbatsky, M. D. Martynova, A. O. Zheltova, V. A. Derevitskaya, N. K. Kochetkov, *Carbohydr. Res.*, **187** (1989) 165.
54. E. Coles, V. N. Reinhold, S. A. Carr, *Carbohydr. Res.*, **139** (1985) 1.
55. S. Hase, K. Ikenaka, K. Mikoshiba, T. Ikenaka, *J. Chromatogr.*, **434** (1988) 51.

56. A. Klein, C. Carnoy, J.-M. Llo-Guidice, G. Lamblin, P. Roussel, *Carbohydr. Res.*, **236** (1992) 9.
57. E. A. MacGregor Enzymes for Carbohydrate Engineering Proceedings of 94 Agricultural Biotechnology Symposium, Korea 1994
58. T. Kuriki, T. Imanaka, *J. Biosci. Bioeng.*, **87**, (1999) 557.
59. T. Kuriki, H. Takata, S. Okada, T. Imanaka, *J. Bacteriol.*, **173** (1991) 6147.
T. Kuriki, H. Kaneko, M. Yanase, T. Takata, J. Shimada, S. Hanada, T. Takada, H. Umeyama, S. Okada, *J. Biol. Chem.*, **271** (1996) 17321.
60. J. F. Robyt and D. French, *Arch. Biochem. Biophys.*, **122** (1967) 8.
61. L. Kandra, G. Gyémánt, E. Farkas and A. Lipták, *Carbohydr. Res.*, **298** (1997) 237.
62. E. A. MacGregor A. W. MacGregor, *Carbohydr. Res.*, **142** (1985) 223.
63. H. Outrup and B. E. Norman, *Starke*, **36** (1984) 405.
Candussio, G. Schmidt and A. Bock, *Eur. J. Biochem.*, **203** (1990) 225.
Spreinat and G. Antranikian, *Starke*, **44** (1992) 305.
64. M. Qian, R. Haser, G. Buisson, E. Duée, F. Payan, *Biochemistry*, **33**, (1994) 6284.
65. A. M. Brozowski. G. J. Davies, *Biochemistry*, **36** (1997) 10837.
66. D. Brayer, G. Sidhu, R. Maurus, E.H. Rydberg, C. Braun, Y. Wang, N.T. Nguyen, C.M. Overall, S.G. Withers, *Biochemistry*, **39** (2000) 4778.
67. K Omichi, S. Hase, T. Ikenaka, *J. Biochem.* **111** (1992) 4.
68. J. F. Robyt and D. French, *Arch. Biochem. Biophys.*, **138**, (1970) 662.
69. B. Y. Tao, P. J. Reilly and J. F. Robyt, *Biochim. Biophys. Acta*, **995**. (1989) 214.
70. L. Holm, A. K. Koivula, P. M. Lehtovaara, A. Hemminki, J. K. C. Knowles, *Protein Eng.*, **3** (1990) 181.
T. Nagashima, S. Tada, K. Kitomoto, K. Gomi, C. Kumagi, H. Toda, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **56** (1992) 207.
Nakamura, K. Haga, S. Ogawa, K. Kuwano, K. Kimura, K. Yamane, *FEBS Lett.*, **296** (1992) 37.
71. J. C. Uitdehaag, R. Mosi, K. H. Kalk, B. A. van der Veen, L. Dijkhuizen, S. G. Withers, B. W. Dijkstra, *Nat. Struct. Biol.*, **6** (1999) 432.
72. K. Hasegawa, M. Kubota, Y. Matsuura, *Protein Eng.*, **12** (1999) 819.
73. A. Nakamura, K. Haga and H. Yamane, *Biochemistry*, **32**, (1993) 6624.
74. J. L. Rosenblum, C. L. Irwin, D.H. Alpers, *Am. J. Physiol.*, **254** (1988) 775.
75. G. Feller, D. d'Amico, C. Gerday, *Biochemistry*, **38** (1999) 4613.
76. S. B. Larson, A. Greenwood, D. Cascio, J. Day, *J. Mol. Biol.*, **235** (1994) 1560.

77. A. Condussio, G. Schmid, A. Bock, *Eur. J. Biochem.*, **199** (1991) 637.
78. K. W. Rodenberg, N. Juge, X.-J. Guo, M. Sogard, J.-C. Chaix, B. Swensson, *Eur. J. Biochem.*, **221** (1994) 277.
79. K. Ishikawa, I. Matsui, S. Kobayashi, H. Nakatani, K. Honda, *Biochemistry*, **32** (1993) 6259.
80. K. Omichi, K. Shiosaki, K. Matsubara, T. Ikenaka, *J. Biochem (Tokyo)* **107** (1990) 546.
81. N. J. Greenberger, P.P. Toskes Harrison's Principles of international medicine Vol.2, 12th ed. McGraw-Hill, New York, 1991, 1369.
82. W.B.Salt, S. Shenker, *Medicine*, **55** (1976) 269.
83. I. L. MacGregor, D. Zakim, *Aust.N.Z.J. Med.*, **6** (1976) 551.
84. J.P.Gwym, C.W. Douglas, *FEMS Microbiol. Lett.*, **124** (1994) 373.
85. N. Ramasubbu, V. Paloth, Y. Luo, G. D. Brayer, M. J. Levine, *Acta Cryst.*, **D52** (1996) 435.
86. B.K. Gillard, J.A. Simbala, L. Goodglick, *Clin. Chem.*, **29** (1983) 1119.
87. J. A. Bosch, H. S. Brand, A. J. M. Ligtenberg, B. Bermond, J. Hoogstraten, A. V. N. Amerongen, *Psychosom. Med.*, **58** (1996) 374. Chatterton 1996
88. M. Kurahashi, K. Inamata, *Archives of Oral Biology*, **44** (1999) 1013.
89. C. G. Olivera ,E. F. Collares, M. A. Barbian, M. Fernandez, *Arg. Gastroenterol...*, **34** (1997) 105.
90. H. Mizuuchi, K.Taketa, *Acta Med. Okayama*, **53** (1999) 119.
91. J.W. Um, K. H. Kim, M. S. Kang, J. H. Choe, J. W. Bae, Y. S. Hong, S. O. Suh, Y. C. Kim, C. W. Whang, S. M. Kim, *J. Korean Medicinal Science*, **14** (1991) 678.
92. P.J. Keller, D. L. Kauffman, B. J. Allan, B. L. Williams, *Biochemistry*, **10** (1971) 4867.
93. W. M. Fogarty, C. T. Kelly, *Microbial Enzymes and Biotechnology*, Elsevier 1990. 90.
94. I. C. Kim, J. H. Cha, J. R. Kim, S. Y. Jang, B. C. Seo, T. K. Cheong, D. S. Lee, Y. D. Choi, K. H. Park, *J. Biol Chem.*, **267** (1992) 22108.
95. W. Hartmeier *Immobilized Biocatalysis*, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York 1988, 20. o
96. M. A. Morren, V. Jansens, A. Doods-Gossens, E. Van Hoeyveld, A. Cornelis, C. De Wolf-Peeters, A. Heremans, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **29** (1993) 723.
97. A.M. Hole, A. Draper, G. Joliffe, P. Cullinan, M. Jones, A. J. N. Taylor, *Occupational and environmental medicine*, **57** (2000) 840.
98. M. Machius, G. Wiegand R. Huber, *J. Mol. Biol.*, **246** (1995) 545.
99. M. Machius, N. Declerck, K. Huber, G. Wiegand, *Structure*, **6** (1998) 281.

100. Y. Suzuki, N. Ito, T. Yuuki, H. Yamagada, S. Udaka, *J. Biol. Chem.*, **264** (1989) 18933.
101. A.M. Brzozowsky, *Biochemistry*, **39** (2000) 9099.
102. N. Declerck, M. Machius, G. Wiegand, R. Huber, C. Gaillardin, *J. Mol. Biol.*, **301** (2000) 1041.
103. T. Nakakuki, K. Azuma, K. Kainuma, *Carbohydr. Res.*, **128** (1984) 297.
104. L.M. Marchal, A. M. J. van de Laar, E. Goether, E. B. Shimmelpennik, J. Bergsma, H. H. Beeftink, J. Tramper, *Biotechnology and Bioengineering*, **63** (1999) 344.
105. A. B. Blakeney, B.A. Stone, *FEBS Letters*, **186** (1985) 229.
106. K. B. Hicks, *Carbohydrate Analysis*, Ed. Z. E. Rassi, Elsevier, 1995. 361. o
107. B. K. Brandely, M. Kiso, S. Abbas, P. Nikrad, O. Skrivastada, C. Foxall, Y. Oda ., A. Hasegawa, *Glycobiology*, **3** (1993) 633.
108. T. P. Kogan, B. M. Revelle, S. Trap, P. J. Beck, *J. Biol. Chem.*, **270** (1995) 14047.
109. Antal Zs., Ph. D. dolgozat, Debreceni Egyetem, TTK, Biokémiai Tanszék 2000 53. o.
110. A. Lipták, A. Borbás, I. Bajza, *Med. Res. Rev.*, **14** (1994) 307.
111. Lipták. A. Fehérje és szénhidrát kölcsönhatások , Székfoglalók a Magyar Tudományos Akadémián ,1999
112. J. G. Pierce, T. F. Parsons, *Am. Rev. Biochem.*, **50** (1981) 465.
- R. A. Dwerk, *Chem. Rev.*, **96** (1996) 683.
113. J. Hajkó, A. Lipták, D. J. Lefeber, Gy. Batta, J. P. Kamerling, J. F. G. Vliegenthart közlésre beküldve
114. P. Jordan, G. Webbe, R. F. Sturrock, *Human Schistosomiasis*, University Press, Cambridge, 1993.
115. Ágoston K., Ph. D. dolgozat, Debreceni Egyetem, TTK, Biokémiai Tanszék, 2000, 48.
116. Ágoston K. Ph. D. dolgozat, Debreceni Egyetem, TTK, Biokémiai Tanszék, 2000,
117. T. Kontrohr, *Carbohydr. Res.*, **58** (1977) 498.
118. Gy. Batta, A. Lipták, R. Schneerson, V. Pozsgay, *Carbohydr. Res.*, **305** (1998) 93.
119. Lipták. A. Fehérje és szénhidrát kölcsönhatások , Székfoglalók a Magyar Tudományos Akadémián ,1999.
120. G. Gyémánt, A. Tóth, I. Bajza, L. Kandra, A. Lipták, *Carbohydr. Res.*, **334** (2001) 315.
121. E. Farkas, L. Jánossy, J. Harangi, L. Kandra, and A. Lipták, *Carbohydr. Res.*, **303** (1997) 407.
122. S. Yamauchi, N. Nnimura, T. Kinoshita, *Analyst*, **118** (1993) 161.
123. C. G. J. Verhart, C. T. M. Fransen, B. Zwanenburg and G. J. F. Chittenden, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, **115**, (1996) 133.

124. V. Kahle and K. Tesařík, *J. Chromatogr.*, **191**, (1980) 121.
125. S. J. Angyal, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **42**, (1984) 63.
126. H. Jäger, A. Ramel and O. Schindler, *Helv. Chim. Acta*, **40**, (1957) 1310.
127. C. T. Bishop and F. P. Cooper, *Can. J. Chem.*, **40**, 224 (1962).
128. R. J. Ferrier and L. R. Hatton, *Carbohydr. Res.*, **6**, (1968) 75.
129. N.W. H. Cheetham and P. Sirimane, *Carbohydr. Res.*, **112**, (1983) 1.
130. J. E. Cadott, F. Smith and D. Spriestersbach, *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, (1952) 1501.
131. L. Kandra, G. Gyémánt, A. Lipták, *Carbohydr. Res.*, **315**, (1999) 180.
132. L. Kandra, G. Gyémánt, J. Remenyik, M. Pál, M. Petró, *Carbohydr. Res.*, **333** (2001) 129.
133. L. Kandra, G. Gyémánt, *Carbohydr. Res.*, **329** (2000) 579.
134. Farkas Erzsébet, Ph. D. dolgozat, Kossuth Lajos Tudományegyetem, Biokémiai Tanszék, Debrecen, 1998
135. 1st Symposium on the alpha-Amylase Family, Smolenice, 2001. 09.30.-10.04.
136. N. Saito, *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **29** (1982) 153.
137. S. L. Haynie and G. M. Whitesides, *Appl. Biochem. Biotech.*, **23** (1990) 155.
138. B. Pfannemüller, *Stärke*, **11** (1968) 341.
139. C. Niemann, R. Nuck, B. Pfannemüller, and W. Saenger, *Carbohydr. Res.*, **197** (1990) 187.
140. H. Waldmann, D. Gygax M. D. Bednarski, W. R. Shangraw, and G. M. Whitesides, *Carbohydr. Res.*, **157** (1986) C4.
141. G. Ziegast and B. Pfannemüller, *Carbohydr. Res.*, **160** (1987) 185.
142. M. Yoshida, N. Nakamura, and K. Horikoshi, *Starch*, **49** (1997) 21.
143. E. Samain, C. Lancelon-Pin, F. Férido, V. Moreau, H. Chanzy, A. Heyraud, and H. Driguez, *Carbohydr. Res.*, **271** (1995) 217.
144. K. Titani, A. Koide, J. Hermann, L. H. Ericsson, S. Kumar, R. D. Wade, K. A. Walsh, H. Neurath, and E. H. Fischer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74** (1977) 4762.
145. J. Hajdu, K. R. Acharya, D. J. Stuart, P. J. McLaughlin, D. Barford, N. G. O. Oikonomakos, H. Klein, and L. N. Johnson, *The EMBO Journal*, **6** (1987) 539.
146. L. N. Johnson, E. A. Stura, M. S. P. Sansom, and Y. S. Babu, *Biochem. Soc. Trans.*, **11** (1983) 142.
147. D. H. Brown, C. F. Cori, *The Enzymes*, Vol 5. Academic Press, London, 1961, 207. o.
148. V. Dombradi, *Int. J. Biochem.*, **13** (1980) 125.
149. E. R. Wilcox, J. R. Whitaker, *Biochemistry*, **23** (1984) 1783.

150. R.A. Kaufman, L.J. Dunka, L.M. Hall, *Clin. Chem.*, **26** (1980) 1018.
151. R. McCroskey, T. Chang, H. David, E. Winn, *Clin. Chem.*, **28** (1982) 1787.
152. E.O. Haegele, E. Schaich, E. Rauscher, P. Lehmann, H. Bürk, A.W. Wahlefeld, *Clin. Chem.*, **28** (1982) 2201.
153. A.W. MacGregor, J.E. Morgan, E.A. MacGregor, *Carbohydr. Res.*, **227** (1992) 301.
154. E. Henkel, S. Morich, R. Henkel, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **22** (1984) 489.
155. J.C.M. Hafkenscheid M. Hessels, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **23** (1985) 529.
156. S. Teshima, N. Mitsuhide, M. Ando, *Clin. Chim. Acta*, **150** (1985) 165.
157. E.O. Haegele, M. Kratzer, E. Schaich, E. Rauscher, *Clin. Chem.*, **35** (1989) 188.
158. S. Teshima, Y. Hayashi, S. Emi, K. Ishimaru, *Clin. Chim. Acta*, **199** (1991) 23.
159. G. Dupuy, G. Hilaire, C. Aubry, *Clin. Chem.*, **33** (1987) 524.
160. S. Satomura, Y. Sakata, K. Omichi, T. Ikenaka, *Clin. Chim. Acta*, **174** (1988) 315.
161. E. S. Winn-Deen, H. David, G. Singler, R. Chavez, *Clin. Chem.*, **34** (1988) 2005.
162. D.C. Phillips, *Sci. Am.*, **215** (1966) 78;
I. Schechter, A. Berger, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **27** (1967) 157.
163. C. Gilles, J.P. Astier, G. Marchis-Mouren, C. Cambillau, F. Payan, *Eur. J. Biochem.*, **238** (1996) 561.
164. Y. Nagamine, K. Omichi, T. Ikenaka, *J. Biochem.*, **104** (1988) 667.
165. K. Omichi, T. Ikenaka, *J. Biochem.*, **99** (1986) 1245.
166. Y. Morishita, Y. Iinuma, N. Nakashima, K. Majima, K. Mizuguchi, Y. Kawamura, *Clin Chem.*, **46** (2000) 928.
167. T. Sukanuma, Y. Maeda, K. Kitahara, T. Nagahama, *Carbohydr. Res.*, **303** (1997) 219.
168. J.D. Allen, J.A. Thoma, *Biochem. J.*, **159** (1976) 105.
J.D. Allen, J.A. Thoma, *Biochem. J.*, **159** (1976) 121.
169. B. Domon, C. E. Costello, *Glycoconjugate J.*, **5** (1988) 397.
170. R. J. Leatherbarrow, Erithacus Software Ltd. Staines, U.K. (1990)

VI. Összefoglalás

Dolgozatomban összefoglaltam a Biokémiai Tanszéken folyó szénhidrátkémiai és szénhidrát- biokémiai kutatásokhoz kapcsolódó folyadékkromatográfiás eredményeket az alábbi csoportosításban:

-Szintetikus munkához kapcsolódó elválasztások:

- Preparatív elválasztások
- Analitikai elválasztások

– α -Amiláz enzimek vizsgálata

- Amiláz szubsztrátok előállítása kemoenzimatis módszerrel
- Humán nyál α -amiláz aktív centrumának vizsgálata
- *Bacillus licheniformis* α -amiláz szubsztrát kötőhelyének vizsgálata

A preparatív elválasztások az oligoszacharidok szintézisére irányuló kutatások részét képezték, lehetővé tették a reakciótermék szerkezetvizsgáló módszerek (NMR, MS) által megkövetelt tisztaságban való kinyerését, így a termékek szerkezetének igazolását, néhány esetben a további szintézist. Az elválasztások bemutatásával a céltom a felmerülő feladatok és az azok megoldására alkalmazott HPLC módszerek változatosságának demonstrálása volt.

Pentózok és két 6-dezoxi-hexóz jódm katalizálta metil-glikozid képződését tanulmányoztam HPLC termékanalízissel szulfát formájú amino állófázison. A következő törvényszerűségeket figyeltem meg:

- A szabad cukrok esetében mindig az α -piranóz eluálódik korábban, kivéve az arabinózt. Ez a megfigyelés alátámasztja Jäger és munkatársai megfigyelését, miszerint az ekvatoriális hidroxil csoportok számának növekedése retenciós idő növekedést okoz.
- Metil-furanozidok esetében az 1,2-*transz* izomer retenciós ideje a kisebb.
- A metil-glikozidok képződéséhez 4-5 óra szükséges, a fő termékek furanozidok, melyek a reakció későbbi stádiumában a termodinamikailag stabilabb piranozidokká alakulnak.
- Az anomer szelektivitás alacsony, 1,2-*transz* termékek képződése kedvezményezett a ribóz, lixóz és ramnóz esetében.

Szubsztrátok kémiai és kemoenzimatis szintézisének követésére és enzim-szubsztrát reakciók termékanalíziséhez dolgoztam ki HPLC elválasztásokat. Különböző maltooligoszacharid sorozatok tagjait választottam el szilika, diol, amino és C18 állófázison. A normál fázisú elválasztások esetében lineáris összefüggést találtam a retenciós idő és/vagy a kapacitási faktor logaritmus és az oligoszacharid tagszáma között. Fordított fázison egyetlen vizsgált esetben sem lineáris az összefüggés. A tapasztalt törvényszerűségeket az elválasztási mechanizmusok segítségével értelmeztem.

Korábbi eredmények szerint a humán α -amilázok legjobb szubsztrátjai a 4-8 glükóz egységből felépülő maltooligoszacharidok, míg a bakteriális eredetű amilázok vizsgálatához ennél hosszabb 5-11 tagszámú szubsztrátok szükségesek. A rendelkezésünkre álló G7-CNP

enzimatis lánchrövidítése és hosszabbítása számos előnnyel bír a kémiai szintézishez képest. A glikogén foszforiláz szervesen foszfát jelenlétében megfordítható reakcióban katalizálja a glikogén lebontását, a fordított reakcióban α -D-glükopiranozil-1-foszfát (Glc-1-P), mint donor jelenlétében viszont képes a lánchosszabításra. Ezért ezt az enzimet választottam a szintézishez. 4-6 tagszámú szubsztrátok előállításához a reakciókörülmények optimalizálását az enzim és foszfát koncentráció, valamint a reakcióidő és a hőmérséklet a termékeloszlásra gyakorolt hatásának vizsgálatával végeztem el. A végtermékeket méret kizárási kromatográfiás (SEC) módszerrel választottam el egymástól. A lánchosszabbítási reakcióra hasonló megfontolások érvényesek, mint a lánchrövidítésre, így a reakciókörülményeket a Glc-1-P koncentráció, a hőmérséklet és az enzimkoncentráció változtatásával optimalizáltam. Vizsgáltam egy ismert amiláz és glükozidáz inhibitor, az akarbóz hatását a foszforolízis és transzglikozilezési reakció termékeloszlására. Megállapítottam, hogy az akarbóz gátolja a foszforolízist, és elősegíti a transzglikozilezést. A végtermékeket félpreparatív HPLC alkalmazásával tisztítottam.

Vizsgáltam humán nyál amiláz bontási képét CNP, Bnl-NP glikozidok aktív centrumhoz való kötődésének meghatározásával, HPLC termékanalízis segítségével. Tanulmányoztam a szubsztrát méretének, az aglikonnak, valamint a nem redukáló végen levő benzilidén csoportnak a kötőhasítások gyakoriságára kifejtett hatását. A bontási kép alapján a korábban javasolt 5 kötőhelyes modell helyett a HSA aktív centrumában hat alhelyre tettem javaslatot, 4 glikon és 2 aglikon kötőhelyre. A -4 kötőhely létezését a nem redukáló végen benzilidén csoporttal védett oligoszaccharidok bontási képe alapján igazoltam. Az aglikon kötőhelyet rövid, a redukáló végen módosított szubsztrátokkal vizsgáltam. Megállapítottam, hogy a +2 kötőhelyre szorbit és CNP csoport bekötődhet.

Célul tűztem ki a *Bacillus licheniformis* által termelt hőűző α -amiláz (BLA) bontási képének, a CNP- és Bnl-NP glikozidok aktív centrumhoz való kötődésének meghatározását. HPLC termékanalízissel vizsgáltam a bontási képet, valamint a szubsztrát tagszáma és a nem redukáló végen levő benzilidén csoport hatását a kötőhasítások gyakoriságára. A bontási képek alapján 8 kötőhelyet tételeztem fel, 5 glikon és 3 aglikon kötőhelyet. A BLA érdekes kettős termék specifikitást mutat, a rövid DP<8 szubsztrátok esetén a fő hidrolízis termék a maltopentaóz. A hosszú szubsztrátok DP>8 esetén a fő termék G3-CNP. A kettős termék specifikitás a nem redukáló végen benzilidén csoportot hordozó szubsztrátoknál is megfigyelhető. A -5 kötőhely kiemelt szerepet játszik a hasításban, ezt a kinetikai mérések is igazolják, melyek szerint a maltopentaóz BLA katalizálta hidrolízisének sebessége nagyságrendekkel kisebb, mint a maltohexaózé. A maltopentaóz ugyanis nem képezhet olyan produktív komplexet, amelyben a -5 alhely is betöltött. A meghatározott hasítási frekvenciák alapján kiszámítottam a BLA szubsztrátkötő alhelyeinek látszólagos kötési energiáit, elkészítettem az alhely térképet. A számítások igazolták a feltételezett 8 kötőhely létezését és egy ún. gát alhely jelenlétét a +3 alhely mellett. Ez az energia gát okozza a kötőhelynél hosszabb szubsztrátok hasításakor keletkező 3 tagszámú termékek dominanciáját.

The application of HPLC to carbohydrate chemistry and biochemistry

Summary

Introduction

Carbohydrates and glycoconjugates are very important biological species involved in many life processes. Because of the structural diversities and the multilateral importance of carbohydrates, the analytical methodologies used to analyse them continue to evolve. Over the last two decades, high performance liquid chromatography (HPLC) has been extensively used in the separation and isolation of carbohydrates. The objective of this work is to demonstrate the use of HPLC in synthetic and enzymatic research of carbohydrates. The results are classified to the next chapters:

Separations in connection with the synthetic work

- Preparative separations
- Analytical separations
 - Synthesis of methyl glycosides
 - Separation of maltooligosaccharides

Study of α -amylase enzymes

- Chemoenzymatic synthesis of substrates
- Examination of the active sites of Human Salivary α -Amylase
- Subsite mapping of *Bacillus licheniformis* α -Amylase

Preparative separations

The aim of preparative HPLC was to promote the goal of synthetic project with the means of chromatography. A few mg oligosaccharide for NMR structural investigation or higher amount for further synthesis were separated. The semi-preparative isolations of synthetic oligosaccharides were carried out on silica, amino and C18 stationary phase. The separations were presented in accordance with biological role of synthesised oligosaccharides:

- Synthesis of Sialil LewisX analogue
- *Mycobacterium avium* antigen
- Synthesis of core oligosaccharide of N-glycoproteins

- Diagnosis of *Shistosoma mansoni* infection
- Preparation of vaccine against *Shigella sonnei* infection
- Synthesis of maltooligosaccharide substrates

These separations demonstrate the wide variety of the chromatographic problems in connection with carbohydrate syntheses.

Synthesis of methyl glycosides

The product distribution of the iodine-catalysed methyl glycosidation of four pentoses (D-ribose, D-arabinose, D-xylose, and D-lyxose) and two 6-deoxyhexoses (L-rhamnose, and D-fucose) was studied by HPLC in an APS column (sulphate form) with different acetonitrile–water mobile phases. In general, pentoses require 4–5 h to reach a nearly complete conversion into glycosides, the major (and in some cases the exclusive) products are furanosides, and the anomer-selectivity is rather low. In agreement with earlier results, a temperature dependent on–column isomerization was observed for all the investigated aldoses, except for ribose.

Separation of maltooligosaccharides

HPLC separation of maltooligosaccharide series synthesised in our department was evaluated to check the purity of the compounds and to follow the enzyme-substrate reaction between oligosaccharide glycosides and α -amylase. A linear relationship was found between the logarithm of the retention time and number of monosaccharide unit on an APS and Diol column when the elution mode was isocratic. The results were explained by means of separation mechanism.

Study of α -amylase enzymes

α -Amylase (α -1,4-glucan-4-glucanohydrolase, EC 3.2.1.1) is a classical calcium-containing enzyme, which constitutes a family of endo-amylases catalyzing the cleavage of α -(1,4) glycosidic bonds in starch and related carbohydrates with retention of the α -anomeric configuration in the products. α -Amylase is one of the major secretory products of the pancreas and salivary glands in humans, playing a role in digestion of starch and glycogen.

Human α -amylases, both salivary and pancreatic (HSA and HPA, respectively) have been extensively studied enzymes from the view point of clinical chemistry because they are important as indicators of dysfunction tissue from which they originate. *Bacillus licheniformis* produces a highly thermostable α -amylase. Therefore, it is among the most important enzymes and is of great significance in the present-day biotechnology. It is widely used in alcohol, sugar and brewing industries for the initial hydrolysis of starch to dextrin, which are then converted to glucose by glucoamylases. Enzymic hydrolysis of starch has now replaced acid hydrolysis in over 75% of starch hydrolysing processes, due to the many advantages, not least its higher yields. The homologous maltooligosaccharide substrates are indispensable tools in the investigation of the binding site and the action of different depolymerising enzymes. In these studies well defined, high purity, low-molecular weight substrates are preferred because the purity of these substances and their reaction patterns can be exactly determined.

Chemoenzymatic synthesis of substrates

In the course of our studies of convenient substrates for alpha-amylases, 2-chloro-4-nitrophenyl (CNP) and 4,6-O-benzylidene modified 4-nitrophenyl (Bnl-NP) β -maltooligosaccharides, dp 4 to 10 and dp 4 to 8, respectively were synthesised and used for the study of the active centre amylases. Unfortunately, there is no efficient chemical method for carbohydrate chemists to form glycosidic linkages stereospecifically, or to generate higher-molecular-weight oligosaccharide glycosides with chromogenic aglycons. Therefore, we developed a chemoenzymatic procedure for the synthesis of CNP- β -maltooligosaccharide glycosides.

Shorter chain length CNP-maltooligosaccharides in the range of dp 4 to 6 were prepared using rabbit skeletal muscle glycogen phosphorylase b (EC 2.4.1.1). Detailed enzymological investigations revealed that the conversion of G₇-CNP was highly dependent on the conditions of phosphorolysis. A 100 % conversion of G₇-CNP was achieved during 10 minutes in 1 M phosphate buffer (pH 6.8) at 30 °C with the tetramer glycoside (77 %) as the main product. Phosphorolysis at 10 °C for 10 minutes resulted in 89 % conversion and the formation of G₄-, G₅-, G₆-CNP oligomers were detected with the ratio of 29, 26, 34 %, respectively.

respectively. The reaction pattern was investigated using an HPLC system. The preparative scale isolation of $G_{3\rightarrow6}$ -CNP glycosides was achieved by size exclusion column chromatography on Toyopearl HW-40 matrix. The productivity of the synthesis was improved in yields up to 70–75 %.

CNP-maltooligosaccharides of longer chain length, in the range of dp 8-11, were obtained by a transglycosylation reaction using α -D-glucopyranosyl-phosphate (G-1-P) as donor. Detailed enzymological studies revealed that the conversion of G_7 -CNP catalysed by rabbit skeletal muscle glycogen phosphorylase b could be controlled by acarbose and was highly dependent on the conditions of transglycosylation. The reaction pattern was investigated using an HPLC system. The preparative scale isolation of $G_{8\rightarrow12}$ -CNP glycosides was achieved on a semi-preparative HPLC column. The productivity of the synthesis was improved by yields up to 70-75%. The structures of the oligomers were confirmed by their chromatographic behaviours and MALDI-TOF MS data.

Examination of the active sites of Human Salivary α -Amylase

The action pattern of human salivary amylase (HSA) was examined by utilising as model substrates 2-chloro-4-nitrophenyl (CNP) β -glycosides of maltooligosaccharides of dp 4-8 and some 4-nitrophenyl (NP) derivatives modified at the non-reducing end with a 4,6-*O*-benzylidene (Bnl) group. The product pattern and cleavage frequency were investigated by the method of product analysis, using HPLC. The results revealed that the binding region in HSA is longer than five subsites usually considered in the literature and suggested the presence of at least six subsites; four glycone-binding sites (-4, -3, -2, -1) and two aglycone-binding sites (+1, +2). The existence of -4 subsite was confirmed by the comparison of cleavage frequencies of PNP- and benzylidene modified PNP -glycosides, in that binding mode, which all subsite were occupied.

Subsite mapping of Bacillus licheniformis α -Amylase

The action pattern and product specificity of the amylase from *Bacillus licheniformis* (BLA) was examined by utilising as model substrates the 2-chloro-4-nitrophenyl (CNP) β -glycosides of maltooligosaccharides of dp 5-10 and two 4-nitrophenyl (NP) derivatives

modified at the nonreducing end with a 4,6-O-benzylidene (Bnl) group. The product pattern and cleavage frequency were investigated by product analysis using HPLC. The results revealed that the binding region of BLA is longer than that of human α -amylases and suggested the presence of at least eight subsites; five glycone (-5, -4, -3, -2, -1) and three aglycone binding sites (+1, +2, +3). In the ideal arrangement, the eight subsites are filled by a glucopyranosyl unit. The release of maltopentaose (G_5) from the nonreducing end is dominant in the shorter substrates ($G_8 \rightarrow G_6$), and in the case of the longer substrates ($G_8 \rightarrow G_{10}$), the cleavage of CNP/NP- G_3 from the reducing end becomes preferred. The binding modes of the benzylidene derivatives indicated an unfavourable interaction between the Bnl group and subsite (-6). The calculated subsite map energies confirm the eight subsite model of BLA. There are a barrier subsite at the end of aglycon binding site. This barrier subsite causes the interesting dual product specificity of BLA.

A dolgozat témájához kapcsolódó publikációk:

1. Lili Kandra, Gyöngyi Gyémánt, Erzsébet Farkas, András Lipták
Action pattern of porcine pancreatic alpha-amylase on three different series of β -maltooligosaccharide glycosides
Carbohydr. Res. **298**. 237-242 (1997)
2. Gyöngyi Gyémánt and András Lipták
HPLC analysis of the product distribution in the iodine-catalysed methyl-glycosidation of pentoses and two 6-deoxyhexoses
J. Carbohydr. Chem. **17**(3), 359-368 (1998)
3. Lili Kandra, Gyöngyi Gyémánt, András Lipták
Chemoenzymatic preparation of 2-chlor-4-nitrophenyl- β -maltooligosaccharides glycosides using glycogen phosphorylase b.
Carbohydr. Res. **315**. 180-186 (1999)
4. Lili Kandra, Gyöngyi Gyémánt
Examination of the active sites of Human Salivary α -Amylase (HSA)
Carbohydr. Res., **329**. 579-585 (2000)
5. Lili Kandra, Gyöngyi Gyémánt, Magda Pál, Mariann Petró, Judit Remenyik, András Lipták
Chemoenzymatic synthesis of 2-chloro-4-nitrophenyl β -maltoheptaoside acceptor products using glycogen phosphorylase b
Carbohydr. Res., **333**, 129-136 (2001)
6. Gyöngyi Gyémánt, Anikó Tóth, István Bajza, Lili Kandra, András Lipták,
Identification and structural analysis of synthetic oligosaccharides of *Shigella sonnei* using MALDI-TOF MS
Carbohydr. Res., **334** (2001) 315-322.

Egyéb közlemények

1. István Bányai, László Dózsa, Mihály T. Beck and Gyöngyi Gyémánt
Kinetics and Mechanism of the Reaction between Pentacyanonitrosylferrate (II) and Hydroxylamine
J. Coord. Chem. **37**. 257-270 (1996)

2. Horváth Zsolt, Gyémánt Gyöngyi, Dános Béla, Nánási Pál
Echinops fajok poliszacharidjainak tanulmányozása
 Gyógynövény poliszacharidok I.
 Acta Pharmaceutica Hungarica **68**. 214-219. (1998)
3. Kiss Tünde, Gyémánt Gyöngyi, Dános Béla és Nánási Pál
A Glycyrrhiza glabra L. és a *Glycyrrhiza echinata* L. poliszacharidjainak tanulmányozása
 Gyógynövény poliszacharidok II.
 Acta Pharmaceutica Hungarica **68**. 263-268. (1998)
4. János Kerékgyártó János Rákó, Károly Ágoston, Gyöngyi Gyémánt, and Zoltán Szurmai
 New factors governing stereoselectivity in borohydride reductions of β -D-glycoside-2-
 uloses. The peculiar effect of "activated" DMSO.
 Eur. J. Org. Chem., 2000. 3931-3935
5. Leiter, Éva, Emri, Tamás, Gyémánt, Gyöngyi, Nagy, István, Pócsi, Imre, Winkelmann,
 Günther and Pócsi, István
 Penicillin V production by *Penicillium chrysogenum* in the presence of Fe(III) and in low-
 iron culture medium
 Folia Microbiol., **46**, 127-132 (2001)
6. Gyémánt Gyöngyi, Lenkey Béla és Nánási Pál
 Különböző eredetű *Glycyrrhiza glabra* L. és *Glycyrrhiza echinata* L. fajok összehasonlító
 vizsgálata. Gyógynövény poliszacharidok III.
 Acta Pharmaceutica Hungarica, közlésre elfogadva

Előadások, poszterek

1. Gyémánt Gyöngyi
 Lidokain és pantenol tartalom meghatározás kúpokból HPLC-vel
 I. Hungarian-Dutch Symposium on Chromatography, 1986. Kecskemét (poszter)
2. Gyémánt Gyöngyi, Szamosújváriné Jávor Judit
 Természetes eredetű anyagok komponenseinek HS-GC és HS-GC-MS vizsgálata
 XV. Kromatográfias Vándorgyűlés, 1990. Bükkfürdő (poszter)
3. Gyémánt Gyöngyi
 Trehalóz tartalom meghatározás biológiai mintákból
 MTA Szénhidrátkémiai Munkabizottság Előadójelentése 1995. Debrecen (előadás)
4. Kandra Lili, Gyémánt Gyöngyi, Farkas Erzsébet, Lipták András

Alfa-amiláz szubsztrátok előállítása és vizsgálata

Magyar Kémikusok Egyesülete 1995 évi Vegyészkonferenciája, Debrecen (poszter)

5. Gyöngyi Gyémánt, András Lipták

Evaluation of the product distribution of the iodine-catalysed methanolysis of pentoses and two 6-deoxyhexoses

MTA Szénhidrátkémiai Munkabizottság Előadójelölése 1997. Mátrafüred (előadás)

6. Erzsébet Farkas, Lili Kandra, Gyöngyi Gyémánt and András Lipták

Synthesis of chromogenic maltooligosaccharide series and their use as substrates of α -amylase

9th European Carbohydrate Symposium, 1997. Utrecht (poszter)

7. Gyöngyi Gyémánt and András Lipták

Separation of different oligosaccharide series by HPLC

9th European Carbohydrate Symposium, 1997. Utrecht (poszter)

8. Lili Kandra, Gyöngyi Gyémánt, Lóránt Jánossy and András Lipták

Chemoenzymatic preparation of 2-chloro-4--nitrophenyl β -maltooligosaccharides

MTA Szénhidrátkémiai Munkabizottság Előadójelölése 1999. Mátrafüred (előadás)

8. Gyöngyi Gyémánt, Anikó Tóth, Károly Ágoston, István Bajza, Zoltán Szurmai, Lili Kandra and András Lipták

MALDI-TOF , new instrument, new opportunity for carbohydrate chemists

MTA Szénhidrátkémiai Munkabizottság Előadójelölése 2000. Mátrafüred (előadás)

9. János Rákó, Károly Ágoston, Gyöngyi Gyémánt, Zoltán Szurmai and János Kerékgyártó

New factors governing stereoselectivity in borohydride reductions of β -D-glycoside-2-uloses. The peculiar effect of "activated" DMSO.

European Training Course on Carbohydrates, Debrecen, 2000. 07.8-14. (poszter)

10. Gyémánt Gyöngyi, Kandra Lili, Lipták András

A MALDI-TOF tömegspektrometria alkalmazása biokémiai kutatásokban

Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológia Szakosztálya 6. Munkaértekezlete

Sárospatak 2001. május 14-17.

11. Gyémánt Gyöngyi, Lipták András

MALDI-TOF MS a szintetikus szerves kémia szolgálatában

Vegyészkonferencia, Hajdúszoboszló 2001. június 27-29.