



1949

**A burgonyabogár eredetű α -amiláz aktív centrum szerkezetének és
transzfer aktivitásának tanulmányozása**

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

a szerző neve: Hámori Csaba

témavezető neve: Dr. Gyémánt Gyöngyi

DEBRECENI EGYETEM

Természettudományi és Informatikai Doktori Tanács

Kémiai Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2022

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi és Informatikai Doktori Tanács Kémiai Tudományok Doktori Iskola Szénhidrátok és heterociklusok kémiája és kémiai biológiája programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi/műszaki doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.

Nyilatkozom arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét.

Debrecen, 20.

.....

a jelölt aláírása

Tanúsítom, hogy Hámori Csaba doktorjelölt 2017- 2022 között a fent megnevezett Doktori Iskola Szénhidrátok és heterociklusok kémiája és kémiai biológiája programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Nyilatkozom továbbá arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét.

Az értekezés elfogadását javasolom.

Debrecen, 20..

.....

a témavezető aláírása

**A burgonyabogár eredetű α -amiláz aktív centrum szerkezetének és
transzfer aktivitásának tanulmányozása**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében a Kémia
tudományágban

Írta: Hámosi Csaba okleveles vegyész. Készült a Debreceni Egyetem Kémiai
Tudományok doktori iskolája (Szénhidrátok és heterociklusok kémiája és
kémiai biológiája programja) keretében

Témavezető: Dr. Gyémánt Gyöngyi

Az értekezés bírálói:

Dr.

Dr.

Dr.

A bírálóbizottság:

elnök: Dr.

tagok: Dr.

Dr.

Dr.

Dr.

Az értekezés védésének időpontja: 20... .

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani a témavezetőmnek, Dr. Gyémánt Gyöngyinek, aki szakmai tudásával és tanácsaival segített a doktori munkám folyamán. Segítségével részt vehettem számos hazai és nemzetközi konferencián, ahol bemutathattam a kutatási témámban elért eredményeimet.

Köszönettel tartozom Dr. Kandra Lilinek, aki sok időt szánt arra, hogy tanácsaival segítse a tudományos közleményeim megírását.

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Fábián Istvánnak és Dr. Gáspár Attilának a Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék előző és jelenlegi vezetőjének, amiért lehetőséget adtak a doktori értekezéssel kapcsolatos vizsgálatok elvégzéséhez.

Köszönöm Gálné Dr. Remenyik Juditnak és Szilágyi Eszternek a burgonyabogár bél extraktumok előkészítését. Köszönettel tartozom Dr. Barna Teréznek és Szabó Ernának az SDS-PAGE vizsgálat kivitelezéséért.

Köszönöm Dr. Nagy-Szabó Kármén Annamáriának a vizsgálatok kivitelezése során nyújtott segítséget. Köszönöm Dr. Kecskeméti Ádámnak és Nagy Cynthiának a transzglykozilezett termékek azonosításához szükséges ESI-TOF méréseket.

Köszönöm a GINOP-2.3.2-15-2016-00008 pályázat anyagi támogatását.

Végül szeretnék köszönetet mondani a családomnak és a barátaimnak, akik végig támogattak a tanulmányaim alatt.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	3
2. Irodalmi áttekintés.....	5
2.1. α -Amilázok	5
2.2. Rovar eredetű amilázok vizsgálata	8
2.3. Alhely térképezés.....	13
2.4. Transzglikozilezés.....	16
3. Célkitűzés.....	25
4. Saját eredmények.....	26
4.1. A burgonyabogár α -amiláz aktivitásának vizsgálata	26
4.2. A burgonyabogár középbel extraktum α -amiláz bontási képének vizsgálata.....	28
4.3. A rovarbél α -amiláz tisztítása	40
4.4. Transzglikozilezés vizsgálata.....	44
4.4.1. Megfelelő donor molekula keresése	44
4.4.2. A transzglikozilezési reakció optimalálása.....	52
4.4.3. Fémionok hatása a transzglikozilezési reakcióban	55
4.4.4. Különböző glikozidok mint potenciális akceptor molekulák	58
4.4.5. Nem redukáló végi alifás és aromás védőcsoportok hatása.....	63
4. 5. A tisztított LDAmY bontási képének meghatározása.....	71
5. Felhasznált eszközök és módszerek.....	83
5.1. Enzimaktivitás mérése spektrofotometriás módszerrel	83
5.2. Rovarbél extraktum bontási képének meghatározása HPLC módszerrel	85
5.3. Az LDAmY tisztítása.....	87
5.4. Az LDAmY szintézis irányú reakciójának vizsgálata	89
5.5. Az LDAmY bontási képének meghatározása HPLC módszerrel	95
6. Összefoglalás.....	97
7. Summary.....	102
8. Felhasznált irodalom	106

Rövidítések:

BCF – kötéshasítási frekvencia

BLA – *Bacillus licheniformis* α -amiláz

BnlG_nPNP – 4,6-benzilidén-2-(4-nitrofenil)-O- β -D-maltooligoszacharid

CNPG_n – 2-klór-4-nitrofenil-O- β -D-maltooligoszacharid

CPB – burgonyabogár

EDTA – etilén-diamin-tetraecetsav

ESI – elektropray ionizáció

Et-4-G7-NP – 4,6-etilidén-4-nitrofenil-O- α -D-maltoheptaozid

GalG₂CNP – 2-klór-4-nitrofenil-4-O- β -D-galaktopiranozilmaltozid

GH – glikozid hidroláz

HPLC – nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia

HSA – humán nyál α -amiláz

LDAmy – burgonyabogár α -amiláz

MES – 2-morfolinoetánszulfonsav

MS – tömegspektrometria

PNPG_n – 4-nitrofenil-O- β -D-maltooligoszacharid

PPA – sertés pankreász α -amiláz

SDS-PAGE – nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis

SUMA – **S**ubsite **M**apping of α -**A**mylases

TLC – vékonyréteg kromatográfia

TMA – közönséges lisztbogár α -amiláz

TOF – repülési idő analízátor

1. Bevezetés

A kártevő rovarok világszerte jelentős mezőgazdasági problémát jelentenek. A lárvák és a kifejlett rovarok esszenciális energiaforrása szénhidrát. A növényevő rovarok egy része a növények termését fogyasztja, míg vannak levélkártevők, mint pl. a burgonyabogár. Ezen rovarok fő emésztőenzimeai a glikozid-hidrolázok, amelyek minőségét és arányát a rovar élőhelye és étkezési szokásai szabják meg. Az α -amiláz a fő enzim, amely szerepet játszik a poliszacharidok lebontásában, a szénhidrát metabolizmusban. Vizsgálatokat eddig főleg a gabonamagvakat fogyasztó rovarokkal végeztek. Az α -amilázok gátlásával elérhető, hogy a rovarok a felvett táplálékot ne tudják hasznosítani, így az általuk okozott mezőgazdasági problémák csökkenthetők.

A Debreceni Egyetemen már régóta foglalkoznak a glikoenzimek vizsgálatával, melybe 2017-ben csatlakoztam. A glikoenzim kutatócsoport már több különböző szervezetből származó α -amiláz alhely térképezését végezte el, mint például: a humán nyál, a sertés hasnyálmirigy, az árpa és egy baktérium α -amiláz. Egyes α -amilázok esetében vizsgálták a vad és mutáns enzimek szintézis irányú reakcióit is. A vizsgálataim célja a burgonyabogár szénhidrát emésztésének megismerése és tanulmányozása volt. A rovar világszerte jelentős károkat okoz a burgonyafélékben, rendkívül invazív, jól alkalmazkodik szélsőséges körülményekhez, a növényvédőszerrel szemben hamar kialakul a rezisztencia és kevés természetes ellensége ismeretes. A célom a burgonyabogár bél α -amiláz működésének megismerése, jellemzése, aktivitásának vizsgálata volt, mely a további kutatások során segítséget nyújt olyan természetes és szintetikus inhibitorok felkutatásában, illetve előállításában, amivel az általa okozott mezőgazdasági problémák megoldhatók lehetnek. A vizsgálatokhoz elengedhetetlen volt a rovar eredetű

α -amiláz spektrofotometriás enzimaktivitás vizsgálata, valamint a bontási képének meghatározása folyadékkromatográfiás módszerrel különböző tagszámú maltooligoszacharid szubsztrátokon.

Mivel a vizsgálatok során kiderült, hogy burgonyabogár eredetű α -amiláz vad típusa transzglikozidáz aktivitással rendelkezik, tehát potenciálisan alkalmazható lehet oligoszacharidok szintetizálására, kísérleteket végeztem a transzfer aktivitás felderítésére is, melyhez különböző glikozidokat alkalmaztam szubsztrátként.

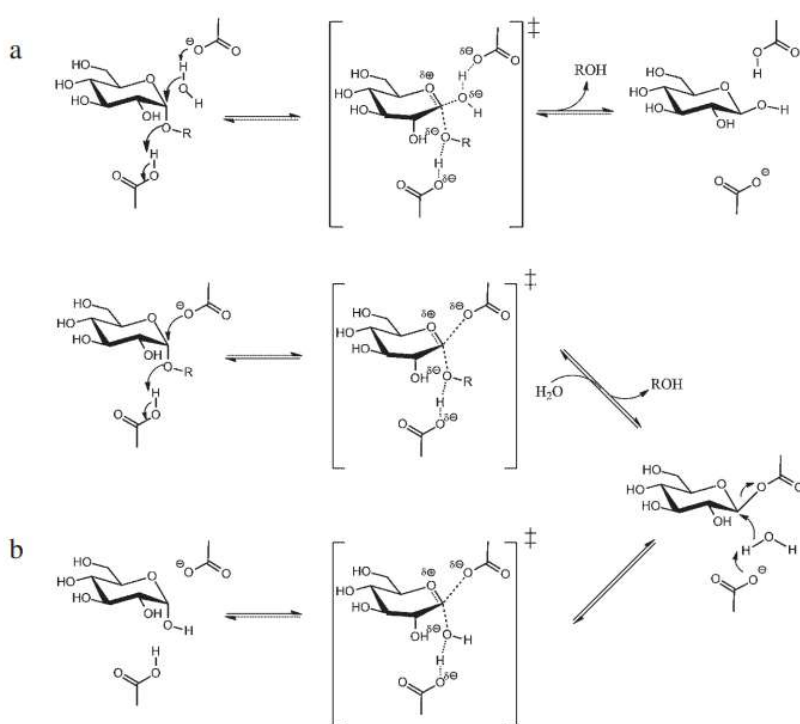
2. Irodalmi áttekintés

2.1. α -Amilázok

A legegyszerűbb módja az enzimek osztályozásának, ha a szubsztrát specificitást, valamint a katalizált reakció típusát vesszük figyelembe. Ez a módszer az *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB) ajánlásán alapszik [1]. Egy ún. EC számot kap minden enzim, ez alapján az O-glikozid-hidrolázok száma EC 3.2.1.x, ahol az első szám jelzi, hogy az enzim hidroláz, a második, hogy glikozidáz, a harmadik, hogy O-glikozidáz, az x pedig a szubsztrát specificitást jellemzi. Az α -amilázok (α -1,4-glükán 4-glükánohidroláz, EC 3.2.1.1) a keményítőben lévő amilóz és amilopektin α -1,4-glikozidos kötéseinek hidrolízisét végzik. Az amilázok körében találunk *exo*-enzimeket, melyek konszekutív módon láncvégi hasítást végeznek (β -amilázok, glükoamiláz), ill. *endo*-enzimeket, melyek véletlenszerű hidrolízist katalizálnak a poliszacharid lánc belsejében (α -amilázok) [2].

A különböző glikozid-hidrolázok osztályozása az aminosav sorrend azonosságok és a katalitikus mechanizmusuk alapján is lehetséges (GH családok) [3]. Manapság már több mint 100 GH családot különböztetünk meg, a CAZy (Carbohydrate Active enZymes) adatbázis csoportosítása alapján [4]. A különböző családok alcsaládokba oszthatók, amelyekben a szekvenciák nagyobb azonosságot mutatnak. Az összehasonlítás az enzim azon szerkezeteit mutatja meg, amelyek a polimer szubsztrát hasításáért felelősek. A glikozid-hidrolázok a katalitikus doménen kívül rendelkeznek olyan doménekkel, amelyek a szubsztrát megkötéséért felelősek. Ezek a kötő domének nagyon fontos szerepet játszanak a szubsztrát bontásában, azonban katalitikus aktivitásuk nincsen. A katalízis mechanizmusát tekintve is több csoportot különböztetünk meg a glikozid-hidrolázok között, ezek közül a

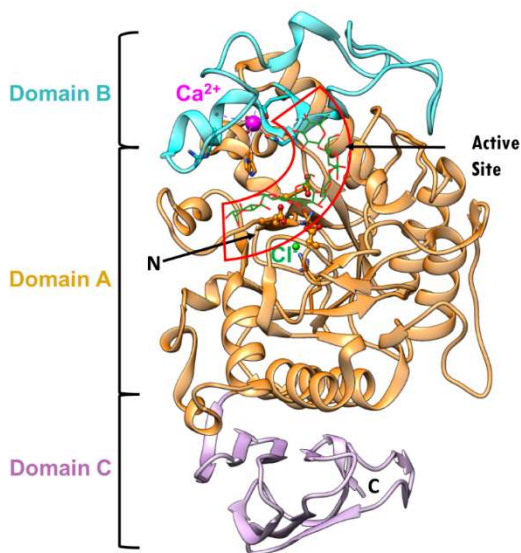
legfontosabb két nagy csoport: az invertáló, ahol a szubsztrát anomer centrum konfigurációja felcserélődik és a retenciós mechanizmus, ahol az anomer centrum konfigurációja változatlan marad. Az invertáló glikozidázok egy egyszerű egy lépéses reakcióban végzik a hasítást, ahol a víz molekula belépése direkt módon bírja távozásra a glikozidos távozó csoportot [3, 5]. A reakció egy oxo-karbóniumion-szerű állapoton keresztül halad, szemben a retenciós mechanizmussal, ahol dupla átrendeződés történik, vagyis először egy glikozil-enzim intermedier jön létre és a hidrolízis egy oxokarbóniumion-szerű állapoton keresztül megy végbe (1. ábra).



1. ábra: Az invertáló (a) és a retenciós (b) glikozidázok hidrolitikus reakciójának mechanizmusa. [3]

Az α -amilázok retenciós mechanizmusú hidrolázok, tehát az α -1,4-glikozidos kötés hasítását követően keletkező szabad glikozidos hidroxil csoportja axiális helyzetű. Az α -amilázokat a GH13 családba sorolják a

glikozid-hidrolázok csoportosítása alapján [6]. A GH13 család fő jellemzője a jellegzetes $(\beta/\alpha)_8$ katalitikus domén, különböző számú plusz doménnel az α -amiláz típusától függően. Az α -amiláz három tipikus doménnel jellemezhető. A „domén A” maga az előbb említett $(\beta/\alpha)_8$ központi hordó domén (2. ábra).



2. ábra: A humán pankreász α -amiláz szerkezete [7]

Ezt szakítja meg egy rendezetlen β -domén, a „domén B”, amely a TIM (triózfoszfát-izomeráz) hordó harmadik β -redője és a harmadik α -hélice közé van beékelődve. Emellett tartalmaz egy harmadik „domén C” szerkezetet, amely egy görög kulcs motívum a hurok másik oldalán. Az α -amilázok legalább egy kalcium(II) kötőhelyet tartalmaznak, mely a „B domén” és a központi hordó között helyezkedik el. [8] Az α -amiláz család tagjai szigorúan három savas oldalláncú aminosavat tartalmaznak a katalitikus hely részeként: egy proton donor glutaminsavat, egy katalitikusan nukleofil aszparaginsavat és még egy szubsztrátkötő aszparaginsav oldalláncot [9]. Az α -amilázok szubsztrátkötő régiója az alhelyek tandem tömbjéből áll, ahol minden alhely

kölcsönhatásba lép egy glükózzal, a keményítő szubsztrát monomer egységével az alhely modell szerint [10].

2.2. Rovar eredetű amilázok vizsgálata

A növényevő lárvák és kifejlett rovarok világszerte jelentős mezőgazdasági károkat okoznak. Oerke kutatómunkája során megállapította, hogy globális szinten évente a termés 50-80 %-a vész el. [11] Ennek egy jelentős részét a kártevő rovarok okozzák, aminek a 26-29% -a szójabab, búza és gyapot, a 31-40%-a kukorica, rizs és burgonyafélék. A kártevő rovarok elleni küzdelemhez több stratégiai módszert is kidolgoztak. Ezek fizikai, biológiai vagy kémiai módszerek. A vegyszerrel történő védekezésnek számos hátránya van. A használt kemikália szennyezheti a talajt és a vizeket, nem elég szelektív és előfordulhat a rovarfaj rezisztenciája az adott vegyületre [12-15]. Ezért szükségessé válnak a biztonságos, az adott rovarfajra szelektív, környezetbarát és alacsony költségvetésű védekezési módszerek kidolgozása [15]. Ennek egyik lehetősége a természetben található különböző növények extraktumának vizsgálata, mivel a növények egyes hatóanyagai gátolják a kártevő fejlődését és mivel természetes anyagok, nem károsak a környezetre [15-17]. A növényi hatóanyagok vizsgálata mellett folyamatosan történnek fejlesztések a szintetikus gátlószerek területén is, melyek szintén ígéretes eredményeket mutatnak [18, 19]. Az utóbbi időben jelentős fejlődés következett be a rovarok enzimológiájában [20], amely segítséget ad a célrovarok emésztőenzimeinek vizsgálatához és olyan inhibitorok felderítéséhez, melyek ötvözik a biológiai és kémiai növényvédelmi stratégia módszereit. A növényevő rovarok esetén a szénhidrát esszenciális energiaforrás mind a lárvák megfelelő fejlődése, mind az imágó fennmaradása szempontjából. Ezek a rovarok közvetlenül a növények szöveteivel táplálkoznak, legtöbb esetben a növény keményítőben gazdag terméseivel

vagy magvaival. Ezen rovarok fő emésztőenzime a különböző glikozil-hidrolázok, melyek minőségét és arányát a rovar élőhelye, valamint táplálkozási szokásai szabják meg. A rovarokban a keményítő bontása az α -glikozidázoktól és az α -amilázoktól függ [20]. Az amilázok a fő enzimek, melyek szerepet játszanak a poliszacharidok lebontásában, a szénhidrátmetabolizmusban [21]. Annak ellenére, hogy több tanulmány is született a növényevő rovarok szénhidrátemésztéséről, hiányos információk állnak rendelkezésre a különböző enzimekről és bontási képükről. Ezen információk hiányában nem lehetséges leírni, milyen molekuláris folyamatok játszódnak le a keményítő bontása során. Néhány korábbi tanulmány az *exo/endo* amilázok jellemzését célozta. Ebből a szempontból a különböző zsiszika (*Sitophilus*) fajok enzimeit azonosnak tekinthetők a sertés pankréasz eredetű α -amilázzal (PPA) és különböznek a burgonyabogár eredetű β -amiláztól, mely amilázokat *endo* és *exo* amiláz modellként választották [22].

Néhány rovar amiláz szekvenciáját felderítették, azonban mostanáig főként csak gabonafélék magvaival táplálkozó rovarok α -amilázait vizsgálták, mint a mexikói babzsiszika (*Zabrotes subfasciatus*) [23], amerikai kukoricabogár (*Diabrotica virgifera*) [24], a közönséges lisztbogár (*Tenebrio molitor*) és a lárvája [25]. A későbbiekben Nahoum és munkatársai meghatározták a *Tenebrio molitor* α -amiláz 3D szerkezetét röntgenkristallográfiás módszerrel [26]. A *Tenebrio molitor* eredetű α -amiláz az egyetlen rovar eredetű amiláz, melynek ismert a teljes 3D szerkezete. Az enzim szekvenciája 50% egyezést mutat az emlős eredetű α -amilázokéval, mint például a sertés pankréasz vagy a humán nyál α -amilázzal. Emellett ismert az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) [27], a homoklepke (*Lutzomyia longipalpis*) [28], a háziméh (*Apis mellifera* L.) [29] és két mezei poloska faj (*Lygus hesperus* és *L. lineolaris*) [30] eredetű α -amiláz szekvenciája is. Ezen fajok az erjedő növényekben található gombákkal,

vérrel, nektárral és virággporral, ill. gyümölcsökkel táplálkoznak. Channele és munkatársai adzuki babzsizsik (tehénborsó zsizsik, *Callosobruchus chinensis*) és piros lisztbogár (*Tribolium castaneum*) eredetű α -amiláz működését vizsgálták [31]. A két rovarnak eltérő a táplálkozása, míg a piros lisztbogár főként a betakarított gabonamagok kártevője, addig az adzuki babzsizsik a babfélék termését fogyasztja. A két enzim aktivitásvizsgálatát a keletkező redukáló cukor dinitroszalicilsav módszerrel történő meghatározásával hajtották végre, majd HPLC módszer segítségével vizsgálták milyen termékek keletkeznek keményítő hidrolízise során. Az adzuki babzsizsik amiláz esetében keletkező két fő termék a maltotrióz és a maltóz volt, emellett megjelent glükóz is termékként, míg a piros lisztbogár eredetű amiláz termékei maltóz, maltotrióz és maltotetraóz voltak. Ez az eredmény is alátámasztja, hogy a növényevő rovarok emésztőenzimeik a táplálékforrástól és az élőhelytől függően változnak. Ezek a különbségek az enzim kötőhelyeinek és az aktív centrum szerkezetének eltéréseiből származnak. Applebaum és munkatársai a *Tenebrio molitor* amilázként azonosított középbeli enzimének bontási vizsgálatát hajtották végre [32]. Szubsztrátként amilopektint, glikogént és β -ciklodextrint alkalmaztak. A pentamer maltooligoszacharidtól a glükózig terjedő termékeket vékonyréteg kromatográfiás (TLC) módszerrel választották el és azonosították. Hosszabb inkubációs idő után a penta- és tetraszacharidok mennyiségének csökkenését és a tri- és diszacharidok mennyiségének növekedését tapasztalták. Nagaraju and Abraham tisztított tamar selyemhernyó (*Antheraea mylitta*) α -amiláz bontását vizsgálták keményítő szubsztráton és főtermékként maltóz, illetve maltotrióz és maltotetraóz keletkezését tapasztalták [33]. Az ausztráliai katicabogár (*Cryptolaemus montrouzieri*) pajzstetvekkel táplálkozik, azonban az amilázok mégis fontos szerepet töltenek be a metabolizmusában [34]. Ahmadi és munkatársai a rovar fej-mirigy és bél eredetű α -amilázainak

aktivitását vizsgálták, valamint az aktivitás pH és hőmérsékletfüggését. A két enzim pH optimuma eltér egymástól, a fej-mirigyből származó amiláznak pH4, míg a bél eredetűnek pH6 értéken maximális a működése. További kísérleteket folytattak azzal kapcsolatban, hogy a különböző fémionok, ill. EDTA jelenléte miképp változtatja az enzimek aktivitását. A kísérletekben nátrium, kálium, magnézium, kobalt(II), bárium, cink(II), kalcium, vas(II), higany(I), higany(II) és mangán(II) ionok hatását vizsgálták. Az eredmények alapján a nátrium, kalcium, magnézium és vas(II) ionok jelenléte mindkét enzim esetében aktivitás csökkenést okoztak, addig a bárium ionok az enzimek hozzávetőlegesen kétszeres aktivitás növekedését, a higany(I) esetében pedig a bél enzim aktivitásának jelentős növekedését, míg a fej-mirigy amiláz aktivitásának jelentős csökkenését okozták. Az EDTA jelenléte jelentősen csökkentette az enzimek aktivitását.

A burgonyabogarat a világ leginvazívabb rovarjaként tartják számon és az ellene való védekezés évente világ szinten monumentális összeget igényel [35]. A burgonyabogár rendszertani besorolását 1. táblázatban tüntettem fel.

Ország	Állatok (<i>Animalia</i>)
Törzs	Ízeltlábúak (<i>Arthropoda</i>)
Osztály	Rovarak (<i>Insecta</i>)
Rend	Bogarak (<i>Coleoptera</i>)
Alrend	Mindenevő bogarak (<i>Polyphaga</i>)
Alrendág	<i>Cucujiformia</i>
Öregcsalád	Levélbogárszerűek (<i>Chrysomeloidea</i>)
Család	Levélbogárfélék (<i>Chrysomelidae</i>)
Nem	<i>Leptinotarsa</i>
Faj	<i>L.decemlineata</i>

1. táblázat: A burgonyabogár rendszertani besorolása [36]

A burgonyabogár első pár kitin szárnya sárga színű, melyen tíz fekete csík található. A bogár ovális alakú, szélessége 6,1-6,2 milliméter, míg hosszúsága 11,1-11,2 milliméter lehet [37]. A burgonyabogár imágó korának elérése után 6 héttel ivaréretté válik és egy nőstény példány egy levélen 20-30 petét helyez el. A vele szembeni védekezés igen nehéz, mert képes a széles körben alkalmazott inszekticidekkel szembeni gyors rezisztencia elérésére, valamint könnyen alkalmazkodik a szélsőségesebb abiotikus és biotikus tényezőkhez is [35]. A burgonyabogár fő táplálékforrása a burgonyafélék (*Solanaceae*) levelei. Ebbe a családba tartozik például a burgonya (*Solanum tuberosum*), a padlizsán (*S. melongena*) és a paradicsom (*S. lycopersicum*). A burgonyafélék levelei a növénynek azon szervei, melyek fotoszintézissel a szénhidrátok – glükóz, szacharóz és keményítő – termeléséért felelősek. A burgonyalevelek keményítőtartalma igen magas, a kapott fénytől függően 2,9% és 12,9% között változik [38]. Harcourt több éven át tanulmányozta a Kelet-Ontarióban élő burgonyabogarak populációinak változását [39-41].

Vizsgálta a rovar pete, lárva, báb és imágó korú állapotát is. Tanulmányából kiderül, hogy a rovar halálozási aránya szélsőséges időjárási körülmények között is kicsi, nincsenek természetes ellenségei és miután felfedezték az élelmiszerforrást, gyorsan felélik, elpusztítják, majd továbbállnak új táplálékforrást keresve. A burgonyabogár lárva formájában hozzátvetőlegesen 40 cm² levelet, míg imágó korában naponta 10 cm² levelet fogyaszt, ezáltal drasztikus kárt okozva a növényekben [42].

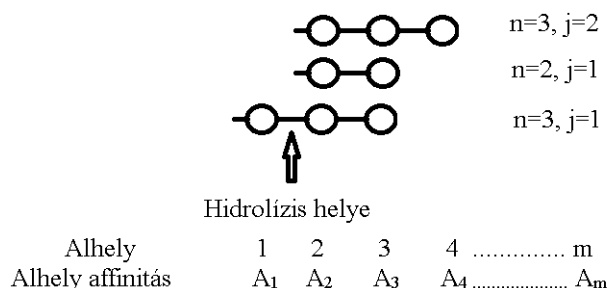
A burgonyabogár eredetű α -amilázzal (LDAm_y) már néhány adat rendelkezésre áll, azonban az enzim működésének mechanizmusa még nem volt ismert. Khorram és munkatársai az LDAm_y aktivitását vizsgálták a pH és a hőmérséklet függvényében [43]. Az eredményeik alapján az LDAm_y működése pH6,4 értéken és 37 °C hőmérsékleten maximális. A burgonyabogár genomját 2018-ban publikálták és felismerték a néhány GH13 családba tartozó fehérje C- és N-terminálisát a 182 GH fehérje között, azonban az α -amilázának szekvenciáját nem azonosították [35].

2.3. Alhely térképezés

A szénhidrátok változatos szerepeket töltenek be az élő szervezetben, mint például energiatárolás, jelátvitel, sejtfal növekedés és sejtciklus, valamint virális felismerés [44]. Ezen meglehetősen változatos felépítésű és szerkezetű szénhidrátok átalakítását a glikoenzimek végzik. A glikozid-hidrolázok a di-, oligo- és poliszacharidokban a glikozidos kötések hidrolízisét katalizáló enzimek, melyek minden élő szervezetben megtalálhatók. Mivel a szervezetbe jutó, ill. a szervezetben lévő szénhidrátok igen változatosak, így ezen enzimek szerkezete és működése is eltérő. A glikozid-hidrolázok teljes szerkezetének feltérképezése röntgenkristallográfiával lehetséges. Néhány glikozid-hidroláz teljes 3D szerkezete ismert, mint például a papaja (*Carica papaya*) eredetű kitináz [45, 46], a mezei katáng (*Cichorium intybus*) eredetű fruktán-

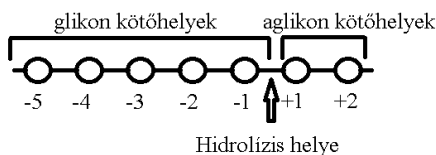
1-*exo*-hidroláz [47], a *Bacillus stearothermophilus* eredetű α -L-arabino-furanozidáz [48], a *Bacillus licheniformis* eredetű 6-foszfo- β -glükózidáz [49] és α -amiláz [50], valamint a *Bacillus subtilis* [51], az *Aspergillus oryzae* [52], az *Aspergillus niger* [53], az árpa [54], a humán pankreász [55], a sertés pankreász [56, 57] és a *Tenebrio molitor* α -amiláz [32]. A röntgenkristallográfiás módszer hátránya, hogy az aktív hely feltérképezése során kapott eredmények eltérhetnek egymástól attól függően, hogy a vizsgált enzim szabad állapotban, vagy komplexben szubsztráttal vagy inhibitorral van jelen [58].

Az utóbbi időben a glikozid-hidrolázok működését az alhely modellezéssel definiálják [59-66]. Ez a módszer, megfelelő szubsztrátok használatával alkalmas az alhelyek számának és az energiáinak meghatározására [58]. Az első lépés az enzimatis reakció során a szubsztrát kötődése az enzim kötőhelyeihez specifikus kölcsönhatásokkal [59]. A specifitást és a bontási képet a kötőhely és az aktív centrum jellege határozza meg. Ahhoz, hogy ezeket a tulajdonságokat jellemezni tudjuk, szükség van egy nomenklatúrára, mellyel a szénhidrát kötőhelyeket jelölhetjük [44]. A glikozid-hidrolázokban az alhely rendszerek eltérnek egymástól, ezért a kötőhelyek számát, a kölcsönhatások energiáit és a hidrolízis sebességi állandóját kísérletesen kell meghatározni [67]. Az *exo*-glikozidázok esetében használható a Hiromi által kidolgozott nomenklatúra, melyben a kötőhelyeket és az aktív helyet pozitív egész számokkal jelöli [68]. Az egyes kötőhelyek és a szubsztrátok monomer egységei között kölcsönhatások jönnek létre. Az *exo*-enzimek esetében az aktív hely egyféleképpen képes a szubsztrátot megkötni produktívan, úgy, hogy a glikozidos kötés bekerül az aktív helyre és megtörténik a hidrolízis. Létezik több nem-produktív kötési mód, mikor hasítható glikozidos kötés nem fed át a katalitikus aminosavakkal (3. ábra).



3.ábra: A szubsztrát kötődésének ábrázolása *exo*-glikozidázok esetében a Hiromi féle nomenklatura alapján (monoszacharid egység: O, az oligoszacharid tagszáma: n, az alhely száma: j)

A modell hátránya, hogy csak *exo*-glikozidázokra alkalmazható, mivel ebben az esetben az enzim mindig a nem redukáló vég felőli egymást követő hidrolitikus lépésekben végzi a hasítást, és mindig ugyanazon két alhely között történik [44]. Az *endo*-enzimek ezzel a módszerrel nehezen modellezhetők, mivel ebben az esetben több produktív kötődés jöhet létre, ami egy komplex termékeloszlást eredményez. Davies és munkatársai ezért dolgoztak ki egy új nomenklaturát, melyben a hasítási helytől számolva a nem redukáló véget kötő alhelyek sorszámai negatív, míg a redukáló végi részt kötő alhelyek számai pozitív előjelet kaptak (4. ábra) [44].



4. ábra: Alhelyek számozása a Davies nomenklatura alapján, ahol a nyíl a hidrolízis helyét, a negatív értékek a glikon kötőhelyeket (nem redukáló végi rész) és a pozitív értékek az aglikon kötőhelyeket (redukáló végi rész) jelölik (monoszacharid egység: O)

Az alhely modell készítéséhez szükséges az enzim kötési régiójának teljes feltérképezése, az alhelyek számának meghatározása, a katalitikus

aminosavak helyzetének megállapítása az alhelyeken belül, valamint az egyes alhely szubsztrát-monomer egységek kötési energiáinak számolása. Több glikozid-hidroláz enzim természetes szubsztrátja nagy molekulatömegű, elágazó láncú poliszacharid. Ezek szerkezete rendkívül bonyolulttá teszi az enzim működésének vizsgálatát. A vizsgálatokat praktikusabb olyan oligoszacharidon végezni, melynek szerkezete jól definiálható. A bontási kép meghatározását olyan oligoszacharid sorozatokon kell végezni, amelyek teljesen lefedik az enzim kötőrégióját, ellenkező esetben nem megbízható az alhely térkép. Ahhoz, hogy a hasítási termékek kvalitatívan és kvantitatívan meghatározhatók legyenek, szükséges a szubsztrátként alkalmazott oligoszacharid sorozat redukáló végének jelölése, ami történhet ^{14}C izotóppal [59] vagy a glikozidos hidroxil csoport kromofor csoporttal történő származékképzésével [63-66]. A mellékreakciók elkerülése érdekében a szubsztrátnak kis koncentrációban kell jelen lennie. A termékek mennyiségének aránya megadja a kötés-hasítási frekvencia (BCF: *Bond-Cleavage Frequency*) értékeket [65]. A mért kötés-hasítási frekvencia értékek alapján az alhely térkép számítógépes program segítségével meghatározható a Gyémánt és munkatársai által fejlesztett SUMA (*Subsite Mapping of α -Amylases*) nevű program segítségével [58]. A szoftveres kiértékeléssel meghatározhatók az egyes alhelyekhez tartozó energiák értékei, kivéve a hasítás helye melletti +1 és -1 alhelyét. Ha az adott alhely energiája negatív érték, akkor a kialakuló kötőhely-monomer kölcsönhatás kedvező, ha pozitív, akkor nem kedvező.

2.4. Transzglikozilezés

A glikozid-hidrolázok reverzibilis enzimek, oligo- és poliszacharidok lebontását és szintézisét is képesek katalizálni megfelelő kísérleti körülmények között. A szénhidrátok kémiai úton történő előállítása rendkívül

bonyolult és időigényes, a regio- és sztereospecifikus szintézisek kivitelezése komoly nehézségeket jelent. A kívánt termék előállítása kis hozammal történik. Ezzel szemben az enzimes módszerek megfelelő körülmények között gyorsabbak, sztereoszelektív termék keletkezik egy lépésben és az enzimek a szintézis végén rendszerint visszanyerhetők. A szintézis hatékonyságának növelésére optimalizálni kell a kísérleti körülményeket, a donor-akceptor arányt, a reakcióidőt, a reakció hőmérsékletét, pH-ját és az enzim mennyiségét. Az enzimes szintézisek során általában az *exo*-glikozidázok transzferáz képességét használják ki, míg az *endo*-glikozidázok alkalmasságát ritkábban tanulmányozzák. Az *exo*-glikozidázok szintézis irányban képesek konszekutív módon glikozid donor molekula és mono-, oligo- vagy poliszacharid akceptor között 1,4-glikozidos kötés kialakítására, például a *Bacillus circulans* és a *Kluyveromyces lactis* [69] eredetű β -D-galaktozidázok segítségével monomerjeiből N-acetil-laktóزامint, illetve N-acetilallolaktóزامint szintetizáltak. A sertés tüdő eredetű β -D-galaktozidáz [70] katalízisével galaktóz egységekből diszacharidokat állítottak elő regioszelektív módon. A *Macrotermes subhyalinus* termeszfaj extraktumában több *exo*-glikozidázt is izoláltak, például: β -galaktozidáz, β -glükózidáz, β -fukozidáz, β -xilozidáz, β -mannozidáz, β -fruktozidáz, β -N-acetilgalaktozaminidáz, β -N-acetilglükózaminidáz, α -galaktozidáz, α -glükózidáz, α -mannozidáz, α -fukozidáz, α -arabinozidáz – amelyek potenciálisan alkalmasak szénhidrátok szintézisére megfelelő kísérleti körülmények között [71]. Az α -amilázok az *exo*-glikozidázokkal szemben oligomer donor molekulákból di- és oligoszacharidokat képesek az akceptor molekulához kapcsolni. Egyes α -amilázok szénhidrátok előállítására való használatáról több tanulmány is készült. Az enzimes szintézisek esetében meg kell határozni az optimális pH-t és hőmérsékletet a legjobb hozam elérésére. Emellett több esetben is vizsgálták, hogy az enzim mutációjával, tehát egyes

aminosavak cseréjével hogyan lehet befolyásolni az α -amilázok működését. Ezen mutációk célja lehet a pH tűrés és a termostabilitás növelése [72-77], melyeknél az aktív centrumtól és a kötőhelyektől független aminosav cseréje történik, vagy éppen a bontási/transzglikozilezési reakció arányának módosítása, ahol a kötőhelyben vagy a kötőhely közelében lévő aminosav cseréje történik meg, ezáltal az enzim aktivitása jelentősen megváltozik.

A transzglikozilezési reakciót sikeresen használták glikozid-hidroláz inhibitorok szintézisére. A *Bacillus stearothermophilus* eredetű α -amilázzal katalizált reakcióban egy α -amiláz inhibítort, az akarbóz donort és több akceptor molekulát vizsgáltak meg, például: metil- α -D-glükopiranozt, D-glükózt, D-xilózt, D-galaktózt, D-mannózt és fruktózt [78]. Az enzimátikus reakció során az akarbózból egy pszeudotriszacharid keletkezik, melyhez aztán a különböző akceptor molekulák kapcsolódnak transzglikozilezési reakcióban. A használt kromatográfiás és ^{13}C NMR módszerrel látható volt, hogy mindegyik akceptorral lejátszódik a transzglikozilezési reakció, valamint glükóz jelenlétében az akarbóz mellett izoakarbóz megjelenését is tapasztalták, tehát a vizsgált α -amiláz az α -1,4-glikozidos kötések mellett az α -1,6-kötések kialakulását is katalizálta. További vizsgálatok bizonyították, hogy egyes akceptorok esetében a pszeudotriszacharid α -1,3-glikozidos kötéssel kapcsolódik az akceptorhoz, valamint a transzglikozilezés lejátszódik di- és triszacharidokat – maltóz, laktóz, gentiobióz, cellobióz, szukróz, raffinóz, maltotrióz – alkalmazva akzeptorként.

Rivera és munkatársai *Bacillus licheniformis* eredetű α -amiláz bontási és transzglikozilezési reakcióját vizsgálták [79]. Ezt a bakteriális eredetű α -amilázt rendkívül széles körben alkalmazzák a keményítő iparban a termostabilitása miatt. Ezen amiláz segítségével a keményítőből magas hőmérsékleten közepes lánchosszúságú maltooligoszacharid termékeket állítottak elő. A hasonló szekvenciájú amilázok tanulmányozása alapján arra

a megállapításra jutottak, hogy az aktív centrum hidrofobicitásának növelése a transzglykozidáz aktivitást. Ezek alapján cserélték a *Bacillus licheniformis* eredetű α -amiláz Val286 aminosavát fenilalaninra, illetve treoninra. A két mutáns enzim teljesen eltérő tulajdonságot mutatott. A Val286Thr mutáns ötször aktívabbnak adódott a keményítő hidrolízisét tekintve, mint a vad típus. Ezzel szemben a Val286Phe mutáns, ami egy aromás oldalláncot jelent a poláris oldallánccal módosított Val286Thr mutáns enzimhez képest, harmadakkora hidrolitikus aktivitást mutatott, mint a vad típus, viszont sokkal nagyobb volt az aktivitása a transzglykozilezési reakció esetében. Az eredmények azt mutatták, hogy hidrofób és elektrosztatikus kölcsönhatások lényegesen befolyásolják az enzim aktív helyének affinitását.

A korábbiakban már elvégezték a *Bacillus stearothermophilus* eredetű α -amiláz mutáns típusainak vizsgálatát is [80]. Az enzimben az Ala289 aminosavat cserélték fenilalaninra és tirozinra. Kísérleteik hasonló eredményt mutattak a *Bacillus licheniformis* eredetű α -amiláz esetében kapott eredményekkel, emellett megfigyelték, hogy az enzim alkoholízist is katalizál, ami a vad típusú enzim esetében nem tapasztalható [79].

Ugyancsak a transzglykozilezési reakció aktivitásának növelése érhető el a *Bacillus licheniformis* eredetű α -amiláz olyan mutációjával, ahol a His235 aminosavat glutaminra cserélik [81], a Glu235 ugyanis fontos szerepet játszik a második szubsztrát kötődésében, ami azután akceptorként viselkedik. A vizsgálatokat ^{14}C izotóppal jelölt maltooktaózzal végezték el. Az első maltooktaóz molekula a -5-től a +3-ig alhelyeket tölti be az enzimben. A hidrolízis mechanizmusa szerinti első lépés után a glikozil-enzim intermedier +1 alhelyére egy második maltooktaóz lép be. Ez a kötődés egy széles nyitott geometriai teret biztosít a -5-től -1 alhelyekig, amely lehetőséget nyújt az akceptor molekula fogadására. A mutáció hatásossága azon alapszik, hogy a His235 nagyon közel van a +1 kötőhelyhez, így a cseréjével drasztikusan

módosítható az enzim aktivitása. A Glu235 stabilizálja az akceptor kötődését a transzglikozilezési reakcióban. A transzglikozilezési aktivitás növelése érhető el a *Thermus* baktérium eredetű α -amiláz Glu332 hisztidinre történő cseréjével is [82].

Az OPMA (*Oligosaccharide-Producing Multifunctional Amylase*) a *Bacillus sp.* extracelluláris enzime, melyet kínai talajból izoláltak [83]. Az enzim képes a keményítőben lévő α -1,4- és α -1,6-glikozidos kötések hidrolízisére, melynek fő termékei maltóz, maltotrióz és izomaltotrióz, de megtalálhatók a termékei között a maltotetraóz és a glükóz is. Az OPMA egyik előnyös tulajdonsága, hogy aktivitása viszonylag magas hőmérsékleten, 50 °C-n optimális. Ezen tulajdonságai miatt tartják az egyik lehetséges oligoszacharid előállítására alkalmas enzimnek az élelmiszer- és a gyógyszeriparban. Wang és munkatársai az OPMA előnyös tulajdonságai miatt az enzim transzglikozilezési aktivitását vizsgálták [84]. Tapasztalataik alapján az enzim képes olyan rendszerben izomaltooligoszacharidok szintézisére, melyben szubsztrátként csak maltóz és glükóz van jelen. Az OPMA N-terminálisán módosított enzim az OPMA-N, egy termofil multifunkcionális amiláz [85]. Az OPMA-N az OPMA-tól az N-terminális doménban különbözik. Ennek “csonkolásával” állították elő az OPMA-hoz hasonló Δ OPMA-N-t. A módosított enzimet a vad típusú enzim hőstabilitásának növelése, valamint a hidrolitikus és transzglikozilezési aktivitásának növelése céljából hozták létre. A módosított enzimek hőmérséklet optimuma 60 °C, amely magasabb, mint a vad típusú enzim esetében. Az OPMA-N, valamint a Δ OPMA-N esetében viszont a transzglikozilezési reakció aktivitása nem nőtt az N-terminális domén jelenléte miatt az OPMA-hoz képest. Az új domén kis mértékben módosította a maltóz-izomaltóz termékarányt úgy, hogy a megváltoztatott N-terminális domén jelenlétében az enzim némileg jobban katalizálja az α -1,4-glikozidos

kötés hidrolízisét és az α -1,6-glikozidos kötés transzglikozilezését, tehát nő az izomaltooligoszacharid termék arány. Azt is megfigyelték, hogy egyes fémionok jelenléte 1 mM koncentrációban befolyásolja az OPMA-N és Δ OPMA-N aktivitását. A kalcium, magnézium, kálium, vas(II) és vas(III) ionok hatására nem történik szignifikáns változás, míg a réz(II) esetében jelentős csökkenés, addig nikkel(II) és cink(II) ionok jelenlétében ~10-20% aktivitás növekedés tapasztalható.

Usui és Murata *Pseudomonas stutzeri* NRRL B 3389 mutáns amiláz transzglikozilezési aktivitását vizsgálták maltopentaóz donor és p-nitrofenil- α -D-glükopiranozid akceptor molekulákkal [86]. A pH és a hőmérséklet függés mellett a reakcióelegy szerves oldószer tartalmának függését is vizsgálták és arra a megállapításra jutottak, hogy a szerves oldószer (MeOH) koncentrációja jelentősen befolyásolja a transzglikozidáz aktivitást. A kísérleteket először metanol koncentrációjának változtatásával hajtották végre, melyben megállapították, hogy 50% metanol tartalom mellett maximális a reakció sebessége, majd a továbbiakban a szerves oldószer minőségének befolyásoló hatását vizsgálták. A metanollal azonos koncentrációban (50-50%) adtak etanolt, 1-propanolt és t-butanolt a reakcióelegyekhez. A hosszabb láncú alkoholok minden esetben csökkentették a transzglikozilezési reakció sebességét. Későbbi tanulmányukban elvégezték a *Streptomyces griseus* eredetű α -amiláz transzglikozidáz aktivitásának optimalizálását is [87].

A *Thermotoga maritima* eredetű α -amiláz, amely szintén bakteriális amiláz, vad típusában is jelentős transzglikozidáz aktivitást tapasztaltak [88]. A vizsgálatokhoz különböző szubsztrátokat alkalmaztak. Az egyik esetben maltózt alkalmaztak egyedüli szubsztrátként, így mind a donor, mind az akceptor maltóz volt, a másokban pedig G3-G7 maltooligoszacharidokat használtak fel szubsztrátként. A reakciókat TLC és HPLC módszerekkel

kövezték. Eredményeik alapján a vad típusú enzim esetében egyszerre megy végbe a transzglykozilezés és a hidrolízis, mivel a maltóz szubsztrát tartalmú reakcióelegyben megjelentek a páratlan glükóz tagszámú maltooligoszacharid termékek. A nagyobb tagszámú maltooligoszacharidok esetében a reakció kezdeti időszakában keletkeztek transzglykozilezett termékek, azonban két nap inkubálást követően minden transzglykozilezett termék elhidrolizált, a fő termékek a glükóz és a maltóz voltak. A diszacharid termék azonban a TLC mérések során két jelet adott. További HPLC vizsgálatokkal, standardok segítségével bizonyították, hogy a maltóz mellett α 1- β 1 kötésű neotrehalóz (α -D-glükopiranozil- β -D-glükopiranozil) jelent meg termékként a transzglykozilezési és hidrolitikus reakciók során eredményeképpen.

Az utóbbi időszakban már született olyan tanulmány is, amely a rovar eredetű α -amilázok transzglykozilezési reakciójával foglalkozik. Kouadio és munkatársai trópusi tücsök (*Gryllodes sigillatus*) eredetű α -amiláz1 és 2 (AMY1 és AMY2) segítségével állított elő transzglykozilezett termékeket, ahol donorként keményítőt, akceptorként pedig fenolt használtak, majd a keletkezett összes termékre állapították meg a hozamot [89]. Az AMY1 és az AMY2 is mutatott transzglykozidáz aktivitást, de az AMY1 esetében nagyobb hozamot kaptak, mint az AMY2 vizsgálatakor. A két enzim közötti aktivitás különbség viszont igaz a hidrolitikus irányban is. Tanulmányukból kiderül az is, hogy szükségeszerű a két szubsztrát koncentrációjának és arányának pontos beállítása is, mivel az optimumtól való eltérés a hozamot csökkenti.

A Debreceni Egyetem glikoenzim kutatócsoportjában is történtek már a transzglykozilezéssel kapcsolatos kutatások. Kandra és munkatársai mutáns humán nyál α -amiláz (HSA) transzglykozidáz aktivitását vizsgálták [90, 91]. Az enzimben a Tyr151-et cserélték metioninra. A módosítás csökkentette az összes kötőhely energia értékét. A legfeltűnőbb csökkenés a +2 alhelynél jelentkezett, ahol a mutáció történt. A vizsgálatokhoz PNP-glikozidokat

alkalmaztak akzeptorként és maltotetraózt donorként. Az eredmények azt mutatták, hogy az aminosav csere megnöveli a HSA transzglikozidáz aktivitását és a mutáns enzimnek jobb akceptorai a PNP-glikozidok. Három PNP-glikozid akzeptort próbáltak ki: a PNP- β -D-glükopiranozidot, PNP- α -D-glükopiranozidot és PNP-1-tio- β -D-glükopiranozidot, melyek mind jó hozammal adtak transzglikozilezett termékeket. Azt is megállapították, hogy a hőmérséklet is nagyban befolyásolja a termékarányt. A PNP-1-tio- β -D-glükopiranozid esetében 8°C hőmérsékleten a főtermék PNP-1-tio- β -D-maltotetraozid, míg 15°C hőmérsékleten PNP-1-tio- β -D-maltotrioizid volt. Ebből arra lehet következtetni, hogy a hőmérséklet némileg módosítja a hidrolízis és a transzglikozilezés arányát. További vizsgálatokat folytattak PNP- β -D-mannopiranozid és PNP- β -D-xilozid akceptorokkal, viszont ezekben az esetekben a transzglikozilezett termékek nagyon kis mennyiségben jelentek meg. Ennek oka a glükóztól való szerkezeti eltérések.

Mótyán és munkatársai árpa eredetű AMY1 és mutánsainak vizsgálatával foglalkoztak [92]. Az árpa eredetű AMY1 és AMY2 transzglikozidáz aktivitását korábban már bizonyították, azonban a folyamat elhanyagolható a hidrolízis irányú reakció mellett [93], ezért az enzim csak mutációval alkalmazható szénhidrátok szintézisére. A vizsgálatokat nyolc mutáns enzimen hajtották végre különböző kromofor tartalmú monoszacharid akceptor és maltopentaóz donor molekulákkal [92]. Az enzim mutációja során a Tyr105-t alaninra, fenilalaninra, triptofánra vagy a Thr212-t tirozinra, triptofánra, prolinra cserélték, illetve volt olyan módosítás, ahol mindkét aminosav cseréje megtörtént. Ezek az aminosavak a szubsztrát kötőhelyek közelében helyezkednek el, így cseréjük szignifikáns változást jelent az enzim működésében. Az eredmények azt mutatták, hogy minden mutáns enzim nagyobb transzglikozidáz aktivitással rendelkezik, mint a vad típus. A vizsgálatok során több kromofor csoport tartalmú monoszacharidot is

kipróbáltak – PNP- β -D-galaktozid, PNP- β -D-fukozid, PNP- α -L-arabinozid, PNP- β -D-N-acetil-glükozaminid, PNP- β -D-N-acetil-galaktozaminid, PNP- β -D-galakturonid, PNP- β -D-glükuronid, klorogénsav –, de egyik sem bizonyult megfelelő akzeptornak. A probléma oka a különböző monoszacharidok és származékaik hidroxil-csoportjainak térállásában van. Tapasztalataik alapján, ha a 4. hidroxil csoport axiális térállású, mint például a galaktóz, a fukóz és az arabinóz esetében, akkor az enzim nem képes a transzglikozilezési reakcióra. Emellett a monoszacharid származékok, mint például az N-acetil-glükózamin sem alkalmazhatóak akceptorokként a mutáns árpa eredetű α -amiláz1 enzimek esetében.

3. Célkitűzés

- Elsődleges célom volt a burgonyabogár szénhidrát emésztésének vizsgálata a rovar bél extraktumából. Ehhez aktivitás és bontási kép vizsgálatokat terveztem különböző kromofor aglikonnal rendelkező mono- és oligoszacharid szubsztrátokkal spektrofotometriás és HPLC módszereket használva.
- Terveztem megvalósítani a középbel extraktum α -amilázának tiszta formában való kinyerését és az ehhez szükséges tisztítási módszer kidolgozását.
- A tisztított rovar bél eredetű α -amiláz birtokában lehetséges az aktív centrum szerkezetének vizsgálata HPLC bontási kép meghatározással. Az így kapott adatokból alhely térkép számítható, melynek összevetését terveztem más, korábban már vizsgált amilázokéval.
- A vizsgálatok közben tapasztalt transzglikozilezési reakció részletes tanulmányozása is felmerült. Kérdéses volt, hogy mekkora lánchosszúságú, illetve milyen monoszacharidokat tartalmazhat az a szubsztrát (donor, akceptor), mellyel ez a reakció végbe megy. Terveztem a transzglikozilezési reakció körülményeinek vizsgálatát is.

4. Saját eredmények

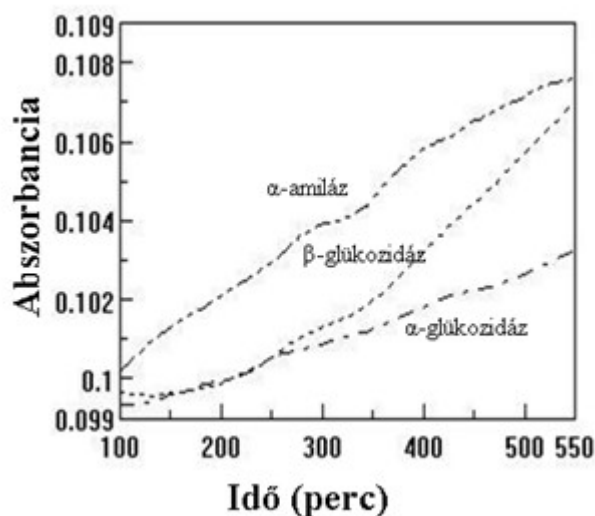
4.1. A burgonyabogár α -amiláz aktivitásának vizsgálata

A korábbiakban Khorram és munkatársai leírták a burgonyabogár eredetű α -amiláz működésének pH és hőmérséklet optimumát keményítő szubsztráton, a felszabaduló redukáló végek dinitroszalicilsav módszerrel való meghatározásával [43]. Mivel a saját vizsgálataimhoz 4-8 tagszámú maltooligoszacharid szubsztrátokat terveztem használni, az aktivitásméréseket pedig rövid, kromofor aglikon tartalmazó 2-klór-4-nitrofenil-4-O- β -D-galaktopiranozil-maltozid (GalG₂CNP) szubsztráttal végeztük, ezért a rovar középbél extraktum α -amiláz pH és hőmérséklet optimumát a rövid szubsztrát esetén is meghatároztam.

Az aktivitásméréseket a Moroshita és munkatársai által leírt módszer alapján végeztük nátrium-azidot (NaN₃) tartalmazó pufferben [94]. A NaN₃ szerkezete hasonlít a hisztidin bázikus imidazol részéhez, emiatt a szubsztrát kötő helyen aminosavszerű funkciót tölthet be. Így fontos szerepet játszik a szubsztrát megfelelő pozícióban való bekötődésében és az első glükóz egység felismerésében a nem redukáló vég felől. Emellett a NaN₃ antibakteriális hatása is ismeretes, mint a bakteriális eredetű kataláz enzim inhibitora [96].

Meghatároztuk a rovar amiláz optimális működési paramétereit ezen a rövid szubsztráton, melyek: pH6,0 és T=30-40°C. A burgonyabogár középbél extraktum tisztítatlan állapotában igen bonyolult összetételű, több enzimet tartalmaz. Az α -amiláz működésének vizsgálatát az olyan szénhidrátbontó enzimek zavarhatják, melyek a glükóz egységek közötti 1,4-glikozidos kötések hidrolízisét katalizálják, ezért a további vizsgálatokban az α - és β -glükozidáz jelenlétének és aktivitásának meghatározására fókuszáltunk. A két enzimet az α -amiláz aktivitásmérése során használt körülmények között

vizsgáltam pH6 értékű nátrium-azid tartalmú MES pufferben, a hőmérséklet pedig 37°C volt. Az α - és β -glükozidáz *exo*-enzimek, a GalG₂CNP nem redukáló végén lévő galaktóz egység hasítására nem képesek [96]. A két enzim vizsgálatához ezért 4-nitrofenil- α - és β -D-glükopiranozidot alkalmaztunk szubsztrátként. Kiemelendő, hogy az α - és β -glükozidáz aktivitásmérését nem az enzimek saját pH és hőmérséklet optimumán hajtottam végre. Az α -amiláz optimumán kapott adatok azért érdekesek, mert arra voltam kíváncsi, vajon a két glükozidáz jelenlétét el lehet-e hanyagolni a későbbi bontási kép vizsgálatok során. Az aktivitásmérések során az abszorbancia változást követtük az idő függvényében (5. ábra). Az ábrán látható, hogy mindhárom enzim aktív a középbél extraktumban és az aktivitás értéke a három enzim esetén nagyságrendileg azonos, tehát a további vizsgálatokban az α - és β -glükozidáz jelenléte nem elhanyagolható.



5. ábra: A burgonyabogár középbél extraktum α -amiláz, illetve α - és β -glükozidáz aktivitásának vizsgálata

Mivel az aktivitás mérések az α -amiláz szubsztrátra optimalizált körülmények között történtek, ezért a kapott dA/perc értékek nem tükrözik az enzimek aktivitásának arányát. Az α -amiláz tulajdonságainak további vizsgálataihoz

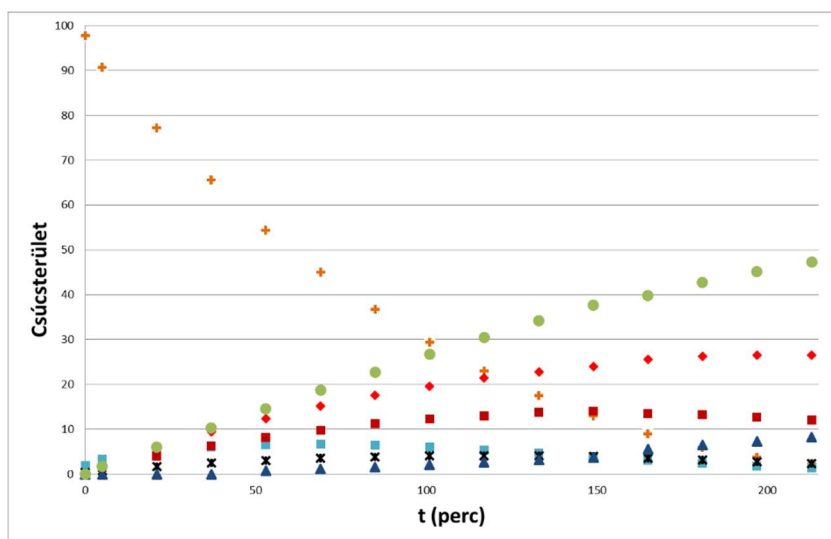
olyan maltooligoszacharid szubsztrátokat kívántunk alkalmazni, melyek a redukáló, illetve mindkét végen kromofor csoportot tartalmaznak.

4.2. A burgonyabogár középbél extraktum α -amiláz bontási képének vizsgálata

A szénhidrát-bontó enzimek bontási képének vizsgálatával információk nyerhetők, melyek segítenek megérteni a katalízis hátterében zajló molekuláris folyamatokat. Az α -amilázok *endo*-enzimek, vagyis az oligoszacharid láncban véletlenszerűen hidrolizálják a glikozidos kötéseket. Emiatt több termék keletkezik, melyeket el kell választani egymástól, ezért a bontási kép vizsgálatához olyan maltooligoszacharid szubsztrátokra van szükség, melyek kromofor csoporttal vannak ellátva. A szubsztrát hasítása után így azonosíthatóak a redukáló végi termékek és arányuk is meghatározható.

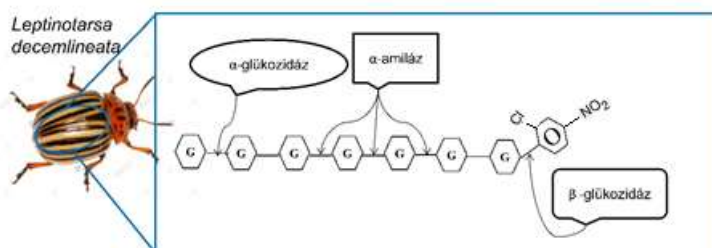
A bontási kép vizsgálatokat 2-klór-4-nitrofenil-O- β -D-maltoheptaoid (CNPG₇) szubsztráttal kezdtem. A szubsztrát bontás főtermékei a 2-klór-4-nitrofenil-O- β -D-maltozid (CNPG₂), -maltotrioizid (CNPG₃) és -maltotetraoid (CNPG₄), azonban jelentős mennyiségben keletkezik CNP-O- β -D-glükopiranoizid (CNPG), -maltopentaoizid (CNPG₅) és -maltohexaoizid (CNPG₆) is. A főtermékek mellett a CNPG, CNPG₅ és CNPG₆ keletkezésének oka a bél extraktum glükozidáz aktivitása. Mivel az α -glükozidáz egymást követő lépésekben hasít α -1,4-glikozidos kötéseket a szubsztrát nem redukáló végéről, ezért a CNPG₆ és CNPG₅ csúcsterülete növekszik, majd idővel elkezd csökkenni, mivel ezek a termékek szubsztrátjai az α -amiláznak és az α -glükozidáznak is (6. ábra). Bizonyos idő után megjelenik a CNPG terméként, amely szintén az α -glükozidáz hidrolitikus aktivitása miatt keletkezik CNPG₂-ből. A CNPG viszont a β -glükozidáz szubsztrátja, melynek a termékei glükóz és CNP. Az α -amiláz és az α -glükozidáz együttes jelenléte bonyolulttá teszi a

kiértékelést, mivel egyes termékek származhatnak mindkét enzim aktivitásából, valamint az egyik enzim terméke szubsztrátja a másik enzimnek.



6. ábra: A CNPG₇ bontása során keletkező termékek csúcsterületének ábrázolása az idő függvényében (CNPG₇: +, CNPG₆: ■, CNPG₅: *, CNPG₄: ■, CNPG₃: ◆, CNPG₂: ●, CNPG: ▲).

A redukáló vég felől 2-klór-4-nitrofelnil (CNP) csoporttal védett maltooligoszacharid szubsztrátok esetén az α -amiláz véletlenszerűen, a lánc belsejében katalizálja az α -1,4-glikozidos kötések hidrolízisét, az α -glükózidáz a nem redukáló vég felől konszekutív módon hasít glükóz egységet, míg a β -glükózidáz a bontás termékeként megjelenő CNP-O- β -D-glükopiranozid β -glikozidos kötésének hidrolízisét katalizálja. A három enzim támadási helyeit a CNPG₇ szubsztrát esetében a 7. ábra mutatja be.



7. ábra: A burgonyabogár középbeli extraktum glikozidos kötések hidrolitikus hasítását végző enzimeinek támadási lehetőségei CNPG₇ szubsztráton

A bontási kép meghatározása során kapott eredményeimet összehasonlítottam már vizsgált, más szervezetből származó α -amilázok bontási kép eredményeivel (2. táblázat). Az összehasonlítás során a kapott főtermékek arányát vettem figyelembe, mivel ezek keletkezése az α -amiláz aktivitás eredménye.

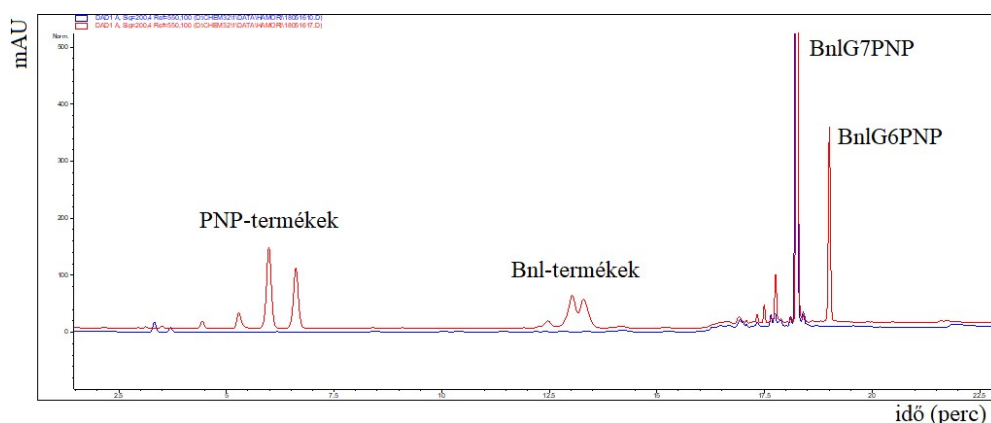
2. táblázat: A rovarbél extraktum-CNPG₇ bontási kép vizsgálatával kapott eredmények összehasonlítása más α -amilázok bontási képével (PPA: sertés pankréász α -amiláz, HSA: humán nyál α -amiláz, BLA: *Bacillus licheniformis* eredetű α -amiláz, árpa AMY1 és AMY2: árpa eredetű α -amiláz1 és 2.)

Enzim	Redukáló végi termékek (%)				Referenciák
	CNPG	CNPG ₂	CNPG ₃	CNPG ₄	
extraktum	0	39	36	24	[saját eredmény]
PPA	0	41	33	26	[63]
HSA	0	18	50	32	[65]
BLA	5	84	11	0	[64]
árpa AMY1	95	2	2	1	[66]
Árpa AMY2	68	8	12	11	[66]

A táblázat alapján látható, hogy a rovarbél extraktum bontási képe a CNPG₇ szubsztráton legjobban a PPA bontási képéhez hasonlít, ez alapján feltételeztük, hogy a két enzim aktív centrum szerkezete hasonló lehet.

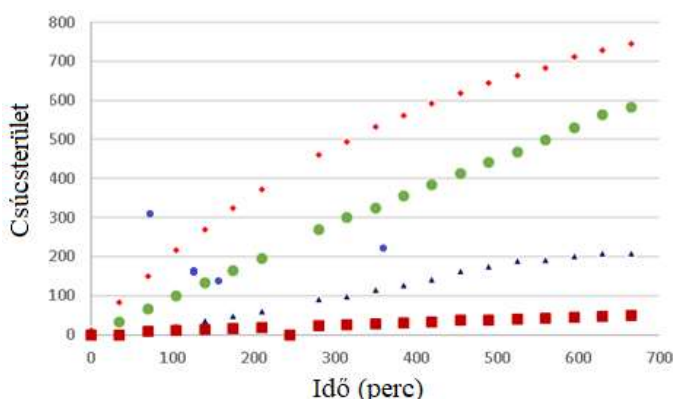
A vizsgálat alapján kapott eredmények azt mutatják, hogy az extraktumban található három enzim együttes jelenléte rendkívül bonyolulttá teszi az α -amiláz működésének leírását. Ennek megfelelően célszerű a további vizsgálatokhoz olyan szubsztrátot használni, mellyel a glükozidázok aktivitása részlegesen kizárható. A 4,6-benzilidén-4-nitrofenil-O- β -D-maltooligoszacharid (BnlG_nPNP) származékok a nem redukáló végi benzilidén védőcsoport miatt nem szubsztrátjai sem az α -, sem a β -glükozidáznak, kizárólag az α -amiláznak.

Elsőként a 4,6-benzilidén-4-nitrofenil-O- β -D-maltoheptaozidot (BnlG₇PNP) használtam szubsztrátként, mivel ennek a szerkezete a védőcsoportok kivételével azonos a CNPG₇ oligomerével. A reakcióelegy 1 mg BnlG₇PNP-t tartalmazott 1 ml azid mentes MES pufferben. A reakciót 5 μ l rovarbél extraktum hozzáadásával indítottam. Az enzimatis hidrolízis során keletkező termékek csúcsait a 8. ábrán mutatom be.



8. ábra: A BnlG₇PNP bontási kép meghatározása során kapott kromatogramok (kék: 0 perc, piros: 215 perc)

A kromatogram három jól elkülöníthető részre osztható. Az első szakaszban a redukáló végi PNP származékok csúcsai, a középső részben a nem redukáló végi Bnl védőcsoportot tartalmazó termékek csúcsai és a gradiens elúció utolsó lépcsőjében pedig a kiindulási BnlG₇PNP csúcsa található. A Bnl termékek átfedő csúcsot adnak, a csúcsok kiértékelése és minőségi meghatározása emiatt nehézségekbe ütközik. A kiértékelések során emiatt a redukáló végi termékek mennyiségi változását vettem figyelembe. A BnlG₇PNP mellett megfelelő inkubációs idő elteltével egy nagyobb visszatartású csúcs területe is jelentősen megnövekszik, amely a mindkét végén kromoforral jelölt maltohexaozidhoz tartozik, ami annak a következménye, hogy a rovarbél extraktum a hidrolitikus reakció mellett a hasítási termékek transzglykozilezését is katalizálja. Ezt a terméket standard injektálásával sikerült azonosítani. A termékek csúcsterületeit az idő függvényében ábrázoltam (9. ábra).



9. ábra: PNP-maltooligoszacharid termékek csúcsterületének változása az idő függvényében (PNPG₄: ■, PNPG₃: ◆, PNPG₂: ●, PNPG: ▲)

A reakció első részében csak az LDAm_y hidrolitikus aktivitása érvényesül a nem redukáló végi védőcsoport miatt. Ebben a szakaszban a CNP-maltozid és maltotriozid a főtermék, mennyiségük jelentősen növekszik. Az α -amiláz által katalizált hidrolitikus hasítás következtében keletkező PNP-

maltooligoszacharidok viszont szubsztrátjai az α -glükózidáznak, emiatt a nitrofenil-4-O- β -D-maltotriozid (PNPG₃) és nitrofenil-4-O- β -D-maltotetraozid (PNPG₄) termékhez tartozó csúcsok területeinek növekedése lassulni kezd, a PNP- β -D-glükopiranozid mennyisége pedig növekedni kezd. Mindemellett 100 perc inkubációt követően a 4,6-benzilidén-4-nitrofenil-O- β -D-maltohexaozidot (BnlG₆PNP) csúcsa is megjelenik a kromatogramokon, mivel ekkor már a hidrolitikus reakcióban keletkező termékek mennyisége megfelelően nagy ahhoz, hogy a hidrolízis mellett transzglikozilezési reakció is lejátszódjon. Ezen okokból kifolyólag célszerűnek tartottam a reakció kezdeti szakaszában – ahol a kiindulási szubsztrát csúcsterületének csökkenése nem éri el a 10%-ot - kapott eredményeket használni a termékarányok megállapítására. A kapott értékeket összehasonlítottam a már vizsgált, más szervezetekből származó α -amilázok bontási vizsgálata során kapott eredményekkel (3. táblázat).

3. táblázat: A rovarbél extraktum BnlG₇PNP bontási kép vizsgálatával kapott eredmények összehasonlítása más α -amilázok bontási képével (PPA: sertés pankreász α -amiláz, HSA: humán nyál α -amiláz, BLA: *Bacillus licheniformis* eredetű α -amiláz)

Enzim	Redukáló végi termékek (%)					Referenciák
	PNPG	PNPG ₂	PNPG ₃	PNPG ₄	PNPG ₅	
Extraktum	8	26	64	2	0	[saját eredmény]
PPA	0	20	80	0	0	[63]
HSA	0	67	12	11	10	[65]
BLA	5	67	33	0	0	[64]

A CNPG₇ bontási vizsgálatához hasonlóan a BnlG₇PNP vizsgálata során kapott eredmények is a PPA bontási képével mutatja a legjobb egyezést. Ez

az eredmény alátámasztja, hogy a két enzim aktív centruma hasonlóságot mutathat.

További vizsgálatokat végeztem BnIG_nPNP szubsztrátokon, melyek n= 4, 5, 6 és 8 glükóz egységet tartalmaztak. A reakcióelegyeket minden esetben a 4,6-benzilidén-4-nitrofenil-O-β-D-maltoheptaoid (BnIG₇PNP) szubsztrát esetében alkalmazott összetétellel megegyező módon állítottam össze. Az egyes szubsztrátok bontási vizsgálatával kapott eredmények segítségével kinetikai görbék vehetők fel. A további kiértékeléshez a különböző szubsztrátok esetén reakció modelleket hoztam létre a rovarbél kivonatban jelen levő α-amiláz, valamint α- és β-glükozidáz enzimek hatását feltételezve. A β-glükozidáz enzim csak a monomer szubsztráton hat (az aglikont hasítja le), mivel a többi kötés α konfigurációjú (1-5. függelék). A 4,6-benzilidén-4-nitrofenil-O-β-D-maltotetraoid (BnIG₄PNP) szubsztrát bontásának főtermékei a PNPG és a 4-nitrofenil-4-O-β-D-maltozid (PNPG₂), de emellett megjelenik a PNPG₃ is. A kiindulási szubsztrát PNPG₄ szennyeződést tartalmazott, emiatt a modell összeállításához ennek a komponensnek a bontását is figyelembe kellett vennem. A 4,6-benzilidén-maltotetraoid (BnIG₄) szubsztrátban az α-amiláz három glikozidos kötés hidrolízisét végezheti. A kiindulási PNPG₄ mennyisége folyamatosan csökken, amely az α-amiláz véletlenszerű és az α-glükozidáz egymást követő hasításának következménye. A BnIG₄PNP hidrolíziséből keletkező redukáló végi termékek szubsztrátjai az α-glükozidáznak, tehát a hidrolitikus aktivitásával ezen termékek esetében számolni kell. A két enzim kombinált bontási termékeként keletkező PNPG további hidrolízisen megy keresztül a β-glükozidáz aktivitásnak köszönhetően.

A feltételezett modell alapján felírtam a reakciósebességet leíró differenciálegyenletet minden komponensre, és ennek felhasználásával végeztem görbe illesztést a mért pontokra, aminek a változtatható paramétere

a reakciósebességi állandó. A kinetikai görbék illesztését a Scientist program segítségével végeztem. Az illesztésekhez használt differenciálegyenleteket és a kinetikai görbékre történő illesztéseket a 1-5. függelékben tüntettem fel.

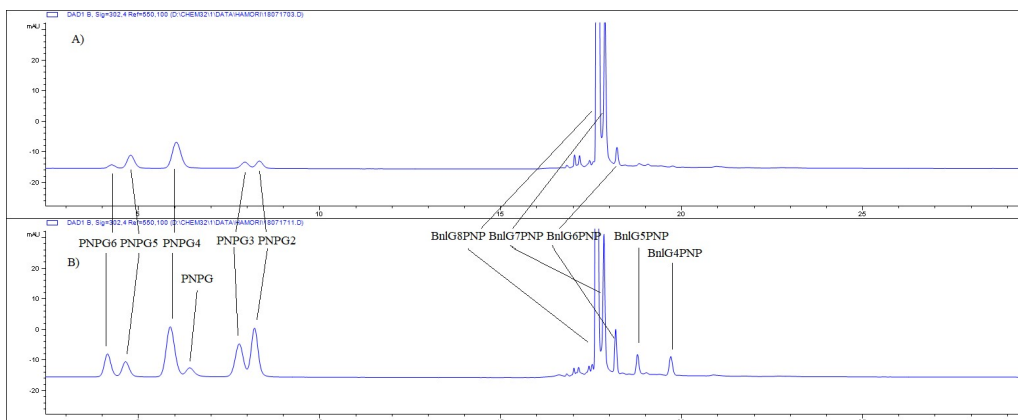
A 4,6-benzilidén-4-nitrofenil-O- β -D-maltopentaozid (BnlG₅PNP) eggyel több glikozidos kötést tartalmaz, mint a BnlG₄PNP, emiatt többféle termék keletkezését vártam. A kiindulási szubsztrát 4-nitrofenil-4-O- β -D-maltopentaozid (PNPG₅) szennyeződést tartalmazott, ezért a kiértékelés alatt ennek a szubsztrátnak a jelenlétét is figyelembe kellett vennem. Az öt cukoregységet tartalmazó szubsztrátok hidrolízisének főterméke PNPG₃. A termékek között megjelenő PNPG₄ a reakcióelegyben lévő PNPG₅ az α -glükózidáz által katalizált konszekutív hidrolitikus reakcióból keletkező termék. A PNPG, PNPG₂ és PNPG₃ keletkezése az α -amiláz és az α -glükózidáz együttes aktivitásának a terméke, ezért a reakció kezdeti szakaszában még a PNPG keletkezése lassabban történik. A keletkező PNPG szubsztrátja az extraktumban levő β -glükózidáznak, emiatt a mennyiségének növekedése az hosszabb inkubációs idő esetében csökken.

A BnlG₆PNP szubsztrát 4-nitrofenil-4-O- β -D-maltohexaozid 4-nitrofenil-4-O- β -D-maltohexaozidot (PNPG₆) tartalmazott kis mennyiségben szennyezőként, tehát a modellalkotásnál figyelembe kellett venni jelenlétét. A BnlG₅PNP hidrolíziséhez hasonlóan, ezesetben is a PNPG₂ jelentkezett főtermékként, amely keletkezhethet egy lépésben az α -amiláz katalizálta hidrolízissel, α -amiláz hasítása után PNPG₃, illetve PNPG₄ termék α -glükózidáz katalizálta hidrolitikus reakcióban vagy többszöri egymást követő α -glükózidázzal történő hidrolízis során PNPG₆ szubsztrátból kiindulva. A PNPG₄ második domináns termékként jelenik meg. A PNPG₅ kizárólag a PNPG₆ konszekutív hasításának terméke lehet. A hidrolitikus reakciók sorozatában, ebben az esetben is megjelenik a PNPG, mint termék.

A BnlG₇PNP mintát a rovarbél kivonat hozzáadása előtt injektálva kis mennyiségű PNPG₆ jelenlétét detektáltam. A szennyező jelenléte ez esetben is befolyásolja a bontási eredményeket, ezért figyelembe kellett vennem a jelenlétét. A maltoheptaozid származék bontása során a dominándrolitikus termékek a PNPG₂ és PNPG₃. Kis mennyiségben megjelenik a PNPG₄ és PNPG₅ is, melyek főként a PNPG₆ α -glükózidáz katalizált egy, illetve két lépéses hidrolízis termékei. A többlépéses hidrolízis eredményeképpen, szintén megjelenik a PNPG termékként, amely a továbbiakban p-nitrofenollá és glükózzá hidrolizál az extraktum β -glükózidáz aktivitásának köszönhetően. Az illesztés ebben az esetben már nem adott túl jó egyezést, ami valószínűleg a transzglikozilezési reakció elhanyagolásának is köszönhető.

A 4,6-benzilidén-4-nitrofenil-O- β -D-maltootaozid (BnlG₈PNP) kiindulási szubsztrát PNPG₇ és PNPG₄ szennyezőt is tartalmazott. A nyolc cukoregységet tartalmazó oligoszacharid hidrolízise sok elsődleges terméket eredményez, melyek közül a megfelelő hosszúságúak mind az α -glükózidáz és az α -amiláz szubsztrátjai lehetnek. A többszörös hidrolitikus lépések sorozata és a kevert mechanizmus rendkívül bonyolulttá teszi a kiértékelést.

Az oktamer származék megfelelően hosszú ahhoz, hogy a bontási termékei a sokszoros kétféle enzim katalizált hidrolízis mellett transzglikozilezési reakcióban is részt vegyenek. Amint az a 10. ábrán látható, a szubsztrát fogyasztásával párhuzamosan ezek a transzfer termékek a szubsztrátnál nagyobb és kisebb retenciós idővel is megjelennek, és mennyiségük jelentős.



10. ábra: A BnlG₈PNP enzimatis reakciójában keletkező termékek elválasztása és azonosítása fordított fázisú folyadékkromatográfiás módszerrel (A: 35 perc, B: 280 perc).

A nyolc tagú oligoszacharid származék bontási képének bonyolultsága lehetetlenné tette az eredmények precíz kiértékelését. A keletkező transzglykozilezett termékeket standardok injektálásával sikeresen azonosítottam. A szintézis irányú reakcióban BnlG₇PNP, BnlG₆PNP, BnlG₅PNP és BnlG₄PNP keletkezik.

A többi szubsztrát esetében számolt reakciósebességi állandók értékét a 4. táblázatba gyűjtöttem.

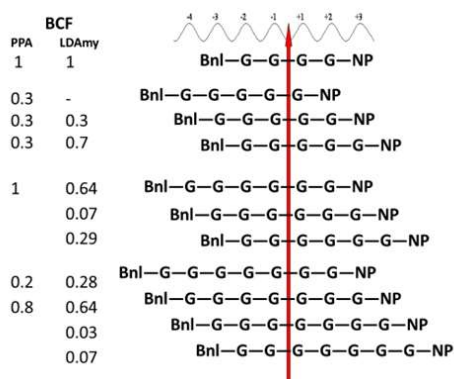
4. táblázat: A kinetikai görbék illesztésével kapott sebességi állandók 4-7 tagszámú maltooligoszacharid szubsztrátok esetében

		Szubsztrát			
		BnlG ₄ PNP	BnlG ₅ PNP	BnlG ₆ PNP	BnlG ₇ PNP
Enzim	A'75	-	-	-	$4,400 \cdot 10^{-5}$
	A'74	-	-	-	$3,600 \cdot 10^{-5}$
	A'73	-	-	-	$6,700 \cdot 10^{-4}$
	A'72	-	-	-	$2,900 \cdot 10^{-4}$
	A'64	-	-	$5,811 \cdot 10^{-5}$	-
	A'63	-	-	$1,490 \cdot 10^{-5}$	-
	A'62	-	-	$1,294 \cdot 10^{-4}$	-
	A'53	-	$5,223 \cdot 10^{-5}$	-	-
	A'52	-	$2,224 \cdot 10^{-5}$	-	-
	A'42	$5,509 \cdot 10^{-3}$	-	-	-
	A64	-	-	$4,811 \cdot 10^{-5}$	$4,500 \cdot 10^{-8}$
	A63	-	-	$5,490 \cdot 10^{-6}$	$5,000 \cdot 10^{-4}$
	A62	-	-	$3,409 \cdot 10^{-4}$	$3,500 \cdot 10^{-4}$
	A53	-	$6,561 \cdot 10^{-5}$	$6,812 \cdot 10^{-4}$	$4,000 \cdot 10^{-3}$
	A52	-	$2,807 \cdot 10^{-5}$	$4,811 \cdot 10^{-4}$	$3,000 \cdot 10^{-3}$
	A42	$5,409 \cdot 10^{-3}$	$1,192 \cdot 10^{-4}$	$1,490 \cdot 10^{-3}$	$9,000 \cdot 10^{-4}$
	G65	-	-	$7,040 \cdot 10^{-4}$	$2,700 \cdot 10^{-4}$
	G54	-	$1,235 \cdot 10^{-3}$	$9,123 \cdot 10^{-5}$	$3,000 \cdot 10^{-4}$
	G43	$2,627 \cdot 10^{-3}$	$4,266 \cdot 10^{-3}$	$3,922 \cdot 10^{-4}$	$3,700 \cdot 10^{-4}$
	G32	$1,241 \cdot 10^{-3}$	$3,338 \cdot 10^{-4}$	$1,922 \cdot 10^{-3}$	$1,800 \cdot 10^{-3}$
	G21	$1,925 \cdot 10^{-3}$	$1,999 \cdot 10^{-3}$	$2,996 \cdot 10^{-3}$	$2,850 \cdot 10^{-3}$
	βG1	$1,466 \cdot 10^{-3}$	$1,233 \cdot 10^{-3}$	$7,100 \cdot 10^{-3}$	$6,500 \cdot 10^{-3}$

A táblázatban az „A” jelöli az LDAmY sebességi állandóit a redukáló végén kromofor csoporttal jelölt szubsztrát esetében, melyeket a mindkét végén kromofor csoportot tartalmazó maltooligoszacharid hasítása során kaptam, a „G” az α-glükozidáz, míg a „βG” a β-glükozidáz reakciósebességi állandóit jelölik. A szám jelölések a kiindulási szubsztrát tagszámát és a belőle keletkező redukáló végi termék tagszámát adják meg. Az eredmények alapján az LDAmY minden szubsztrát esetében legalább egy maltóz vagy annál nagyobb tagszámú maltooligoszacharid egységet hasít a nem redukáló vég felől. A vizsgált szubsztrátok mindegyikénél a PNP-maltozid és maltotriozid

a domináns redukáló végi termék. A BnlG_nPNP szubsztrátok elsődleges hidrolízisének termékei szubsztrátjai az α -glükozidáznak, emiatt azok további hidrolízisen mennek keresztül. A bontási reakciókban kivétel nélkül megfigyelhető a PNPG keletkezése és β -glükozidáz katalizálta hidrolitikus reakciója, melyben PNP és glükóz keletkezik.

A különböző lánchosszúságú szubsztrátok bontása során kapott reakciósebességi állandók arányait, vagyis a kötéshasítási frekvencia értékeit összehasonlítottuk a PPA vizsgálata során kapott termékarányokkal és bár a CNPG₇ és a BnlG₇PNP esetében a kapott értékek hasonlóságot mutattak, a többi szubsztrát esetén jelentős eltérést tapasztaltunk. Ez alapján a PPA és az LDAm_y aktív centrumának szerkezetének eltérését valószínűsítettük (11. ábra).



11. ábra: A rovarbél extraktum és a PPA mindkét végen védett szubsztrátokon meghatározott kötéshasítási frekvencia értékeinek (BCF) összehasonlítása

A különböző szubsztrátok bontása során kapott reakciósebességi állandók értékei az LDAm_y, illetve az α - és β -glükozidáz esetében nagyágrendileg megegyező értékek, emiatt a glükozidázok aktivitása nem hanyagolható el az α -amiláz aktivitásához képest. Mindemellett a nyolc glükózegységet tartalmazó szubsztrát vizsgálata során kapott eredményekből

a sebességi állandók értékét a túlzottan sok mellékreakció miatt már nem tudtam meghatározni. Az eredmények alapján az α -amiláz aktív centrumának pontos feltérképezéséhez az enzim kinyerése szükséges a rovarbél extraktumból.

4.3. A rovarbél α -amiláz tisztítása

Esetemben a rovarbél extraktum két olyan szénhidrátbontó fehérjét tartalmazott, mely az LDAmY bontási képének vizsgálatát zavarta. A két glükozidáz LDAmY-tól való elválasztásával az extraktum már megfelelő tisztaságú lehet ahhoz, hogy a célenzim működése egyértelműen vizsgálható legyen.

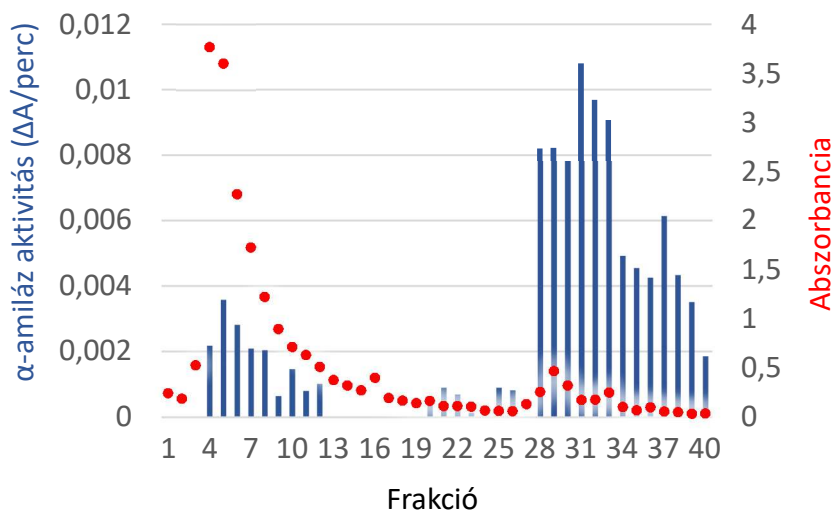
A fehérjék tisztításához számos módszer alkalmazható, mint például a kisózás, dialízis, illetve az elektroforetikus és kromatográfiás módszerek, a gélelektroforézis, izoelektromos fókuszálás, hidrofób kölcsönhatási kromatográfia (HIC), vizes mozgó fázisú méretkizárásos kromatográfia (SEC), ioncserélő kromatográfia (IEC) és az affinitás kromatográfia [97]. A HIC, SEC és IEC módszereket általában kombináltan alkalmazzák a célfehérje kinyeréséhez, ezért ez a tisztítási folyamat több lépéses. Bár a kisózás bonyolult, több fehérjét tartalmazó rendszer esetén nem mindig célravezető, előtisztítási lépésként kipróbáltam, de nem sikerült számottevő eredményt elérni.

Az α -amiláz tisztításának másik lehetősége az affinitás kromatográfia. Kobayashi és munkatársai keresztkötött keményítő gélen választottak el α -amilázokat [98]. A 2.3. részben tárgyaltam, hogy a glikozid-hidrolázok produktív és nem produktív kötést képesek létesíteni a szubsztráttal. Ha az elválasztani kívánt α -amiláz produktív kötést létesít a keményítő géllel, akkor hidrolizálja azt, ami az állófázis degradációjához vezethet, ezért az elválasztás során a nem produktív kötésmódok az előnyösek. Az elválasztáshoz használt

állófázis saját készítésű volt. Mivel az állófázisként alkalmazandó keményítő szubsztrátja az α -amiláznak, ezért vizsgáltam az állófázis stabilitását PPA enzimmel szemben az enzim koncentráció és a pH változtatásával. A keményítőtől degradációja a hidrolitikus reakcióban keletkező oligoszacharidok mennyiségének változásával monitorozható, amit TLC módszerrel követtem. Az oligomer termékek minőségi azonosítását 5-7 glükóz egységet tartalmazó maltooligoszacharid keverékkel végeztem. Az eredmények alapján, csak nagyobb PPA koncentráció mellett számottevő a keményítő hidrolízise. A teljes inkubációs időt tekintve a 5; 2,5; 1,25; 0,625 mg/ml PPA-t tartalmazó oldatok esetében tapasztalható az oligoszacharid termékek megjelenése, azonban a reakció elég lassú ahhoz, hogy még az 5 mg/ml enzim tartalom se okozzon jelentős kárt az állófázisban a kromatográfia ideje alatt.

Az eluens pH hatásának vizsgálata során a minták mindegyikében megfigyelhető volt a hidrolitikus reakcióban keletkezett oligoszacharid termékek jelenléte. A termékek mennyisége pH4 esetében kisebb, míg pH6; 7 és 8 értéken nem tapasztalható nagy különbség. A keményítőtől hidrolízise tehát pH7 $\pm$ 1 nagyobb, mint pH4 értéken, de figyelembe véve a hosszú inkubációs időt és a termékek kis mennyiségét megállapítható, hogy az állófázis megfelelően stabil a célenzim elválasztásához.

Az LDAm elválasztását spektrofotometriás módszerrel követtem. A frakciókban lévő fehérjék mennyiségét 280 nm, míg a frakciók α -amiláz aktivitását 400 nm hullámhosszon vizsgáltam GalG₂CNP szubsztráton (12. ábra).

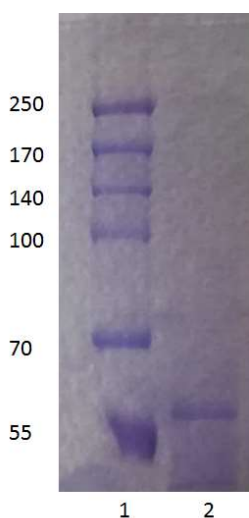


12. ábra: Az LDamy affinitás kromatográfiás tisztításának követése spektrofotometriával (piros: az összes fehérje tartalom követése 280 nm hullámhosszon, kék: a frakciók α -amiláz aktivitásának vizsgálata során kapott dA/perc értékek GalG₂CNP szubsztráttal 400 nm hullámhosszon)

Az 1-17 frakciók 280 nm hullámhosszon magas abszorbancia értéket mutattak, amely annak köszönhető, hogy az extraktumban jelenlévő szennyezők visszatartás nélkül jutnak végig az oszlopon. Ezeknek a frakcióknak egy részében tapasztalható volt α -amiláz aktivitás. Ez azt jelenti, hogy átléptem az állófázis kapacitását, kis mennyiségű α -amiláz nem tudott megkötődni a gélen. Az elúciós puffer hozzáadása a 25. frakció begyűjtése után indult. A 27-40 frakciók jelentős α -amiláz aktivitással rendelkeztek, ezeket összeöntöttem, majd ismételen ultraszűrővel szűrtem, töményítettem és mostam azid-mentes MES pufferrel. Az LDamy oldat végső térfogata 250 μ l, a koncentrációja 18 μ M volt. Annak érdekében, hogy meggyőződjek arról, hogy a célenzim a tisztítási folyamat során nem veszítette el aktivitását és nem tartalmazza az α - és a β -glükózidázt a tisztított mintán további vizsgálatokat végeztem, melyben ezen enzimek aktivitását mértem GalG₂CNP és PNP- α - és

- β -D-glükopiranozidot alkalmazva szubsztrátként. A mérések során az α -amiláz aktivitásra 0,029 dA/perc értéket kaptam, ami nagyságrendileg megegyezett a rovarbél extraktumban mérhető 0,031 dA/perc értékkel, míg az α - és a β -glükozidáz vizsgálata során nem tapasztaltam aktivitást, tehát az LDAmY-t tiszta állapotban sikerült visszanyerni.

A tisztított enzim oldat tisztaságát SDS-PAGE módszerrel is ellenőriztem (13. ábra). A fehérje sávok előhívása Coomassie Blue festékkel történt.



13.ábra: Tisztított fehérjeoldat tisztaság ellenőrzése SDS-PAGE módszerrel.
(1) Standard fehérje elegy (Mt - kDa) (2) Tisztított rovar amiláz minta.

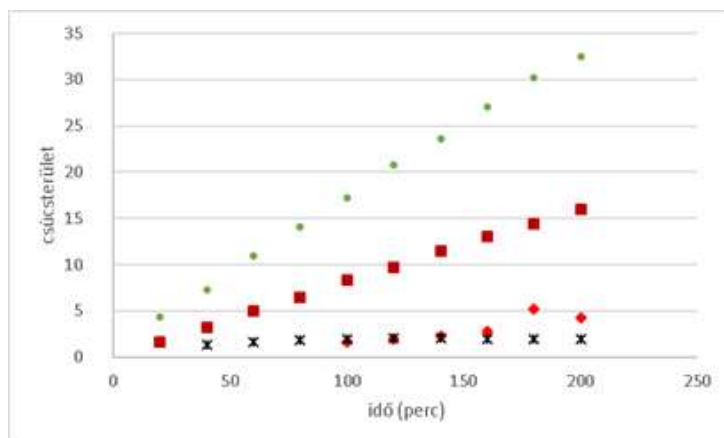
A minta sávjában 55 kDa értéknél látható az amiláz jelenléte, a glükozidázok ~ 100 kDa molekulatömeg értékénél viszont nem látszik sáv.

4.4. Transzglikozilezés vizsgálata

4.4.1. Megfelelő donor molekula keresése

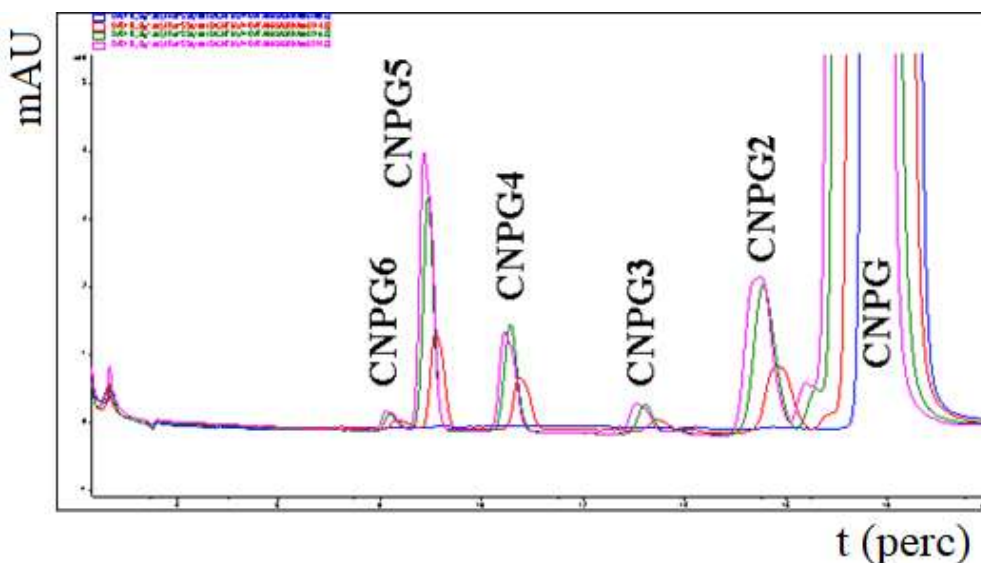
A glikozid-hidrolázok reverzibilis enzimek, bizonyos körülmények között képesek glikozidos kötések kialakulásának katalizálására. Az irodalmi áttekintésből kiderül, hogy néhány α -amiláz vad típusa jelentős transzglikozidáz aktivitással bír [78, 83, 88], de sok esetben csak az enzim mutációjával érhető el, hogy szintézis irányában szignifikáns katalitikus aktivitással rendelkezzenek [79-82, 85-87, 90, 92]. Az általam vizsgált burgonyabogár eredetű α -amiláz bontási képének meghatározása során arra a megállapításra jutottam, hogy az enzim vad típusa is képes transzglikozilezést katalizálni.

Első lépésben a transzglikozilezési reakciót az α -amiláz természetes szubsztrátjával, keményítővel vizsgáltam úgy, hogy a keményítő oldatot egy napig előemésztettem LDAmj jelenlétében annak érdekében, hogy a keményítóből kisebb tagszámú oligoszacharidok keletkezhessenek, melyek donor molekulaként szolgálhatnak a szintézis irányú reakcióban. Akceptorként CNP- β -D-glükopiranozidot (CNPg) használtam. Az enzim reakciót egy napon át követtem (6. függelék). A reakció követése során 2-5 tagszámú maltooligoszacharid termékek megjelenését tapasztaltam. Ezek a termékek a hidrolitikus és a transzglikozilezési reakciók sorozatából keletkeznek. Először a keményítő bontása történik meg kisebb tagszámú maltooligoszacharidokra, melyek a kromofor csoport tartalmú akceptor jelenlétében transzglikozilezési reakcióban vesznek részt. Azonban a transzglikozilezett termékek szubsztrátjai az α -amiláznak, emiatt újra részt vesznek a hidrolitikus reakcióban is. A keletkezett, kromofor csoportot tartalmazó termékek csúcsterületeit ábrázoltam az idő függvényében (14. ábra).



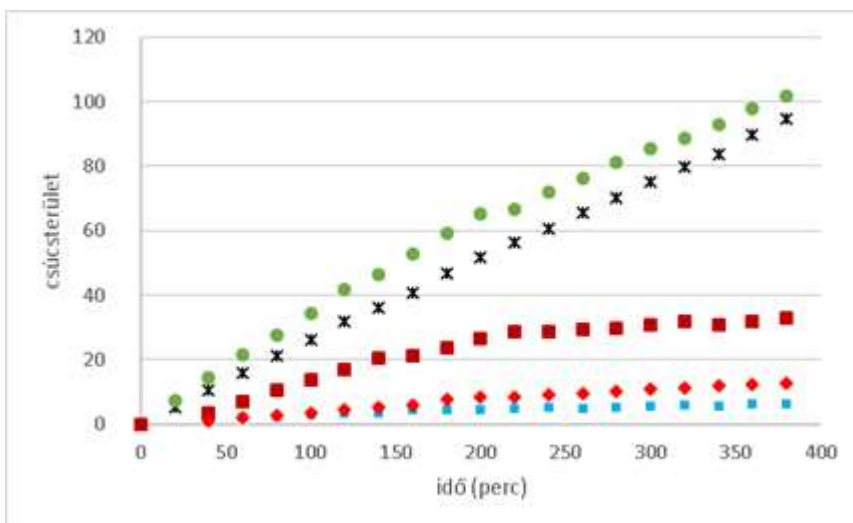
14. ábra: Az LDAm transzglykozilezési reakciójának vizsgálata CNPG akceptor és egy napig előemésztett keményítő tartalmú reakcióelegy esetében (CNPG₅: *, CNPG₄: ■, CNPG₃: ◆, CNPG₂: ●).

A maltopentaozid és a maltotetraozid mennyisége elér egy maximumot, majd csökken. Ez arra utal, hogy a keletkezett transzglykozilezett termékek hidrolízise történik, melyben maltozid és maltotrioizid keletkezik, melyek mennyisége folyamatosan nő. A bontási kép vizsgálatok során fény derült arra, hogy a maltozidot az LDAm nem képes tovább hidrolizálni, emiatt főtermékként fog jelentkezni. Mindemellett megállapítható, hogy az általam használt kromatográfias módszerrel a keményítőtől keletkező hidrolitikus és szintetikus útvonalon keletkező termékek jól azonosíthatók és mennyiségük meghatározható, míg a korábban a Kouadio és munkatársai által publikált módszer esetében csak összes termék csúcssterületének meghatározására van lehetőség [89]. A mérésorozatot megismétltem ugyanazon körülmények között, de előinkubálás nélkül (15. ábra).



15. ábra: A transzglikozilezési reakció fordított fázisú folyadékkromatográfiás módszerrel történő követése során kapott kromatogramok 1%-os keményítő-tartalmú reakcióelegy esetében CNPG akceptor jelenlétében (kék: 0 perc, piros: 100 perc, zöld: 200 perc, rózsaszín: 300 perc).

Ebben az esetben is a transzglikozilezés és a hidrolízis egyaránt lejártszódik, kis tagszámú maltooligoszacharid termékek keletkeznek. Az egy napig előinkubált rendszerrel szemben, ebben az esetben megjelenik a CNP-maltohexaozid termékként, valamint a CNP-maltopentaozid keletkezése is lényegesen megnő. A keletkezett termékek csúcsterületeit ábrázoltam az idő függvényében (16. ábra).

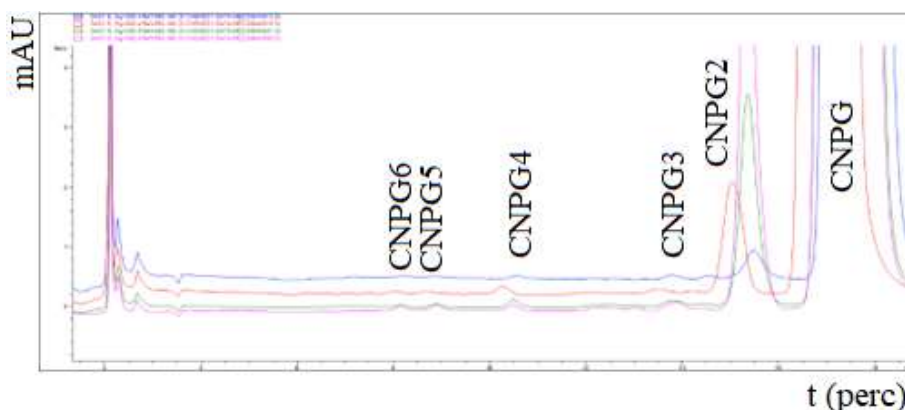


16. ábra: Az LDAmY transzglykozilezési reakciójának vizsgálata CNPG akceptor és keményítő tartalmú reakcióelegy esetében (CNPG₆: ■, CNPG₅: *, CNPG₄: ■, CNPG₃: ◆, CNPG₂: ●)

A CNP-maltozid mellett a CNP-maltopentaozid főtermékként jelenik meg, ami azt jelenti, hogy a keményítő bontás nem redukáló végi főterméke maltotetraóz, mivel a CNPG₅ a maltotetraóz és a CNPG szintézis irányú reakciójában jöhet létre egy lépésben. A CNP-maltopentaozid a bontási kép vizsgálatok alapján hidrolízis reakcióban egyféle produktív kötődést képes létrehozni az enzimmal, aminek főterméke a CNP-maltozid, mely az inkubált reakcióelegy esetében is nagy mennyiségben keletkezik, mint a másodlagos hidrolízis terméke.

A vizsgálatok következő részében a célom az volt, hogy kiderítsem, melyik az a legkisebb molekula, amely egy szintézis reakcióban donorként alkalmazható. A glükóz és maltóz nem szubsztrátja az amiláznak, ezért itt „reverz hidrolízisről” beszélhetünk, vagyis a megfordítható hidrolízis reakció a szintézis irányba játszódik le. Első lépésben a glükóz vizsgálatát végeztem el. A vizsgálatok során nem keletkezett transzglykozilezett termék, tehát a monoszacharid nem alkalmazható donor molekulaként.

A következő potenciális donor jelölt a két glükóz egységet tartalmazó maltóz volt. A maltóz természetes inhibitora az α -amilázoknak. Első lépésben olyan reakcióelegyet állítottam össze, melyben a maltóz koncentrációja 10 mM volt (17. ábra).

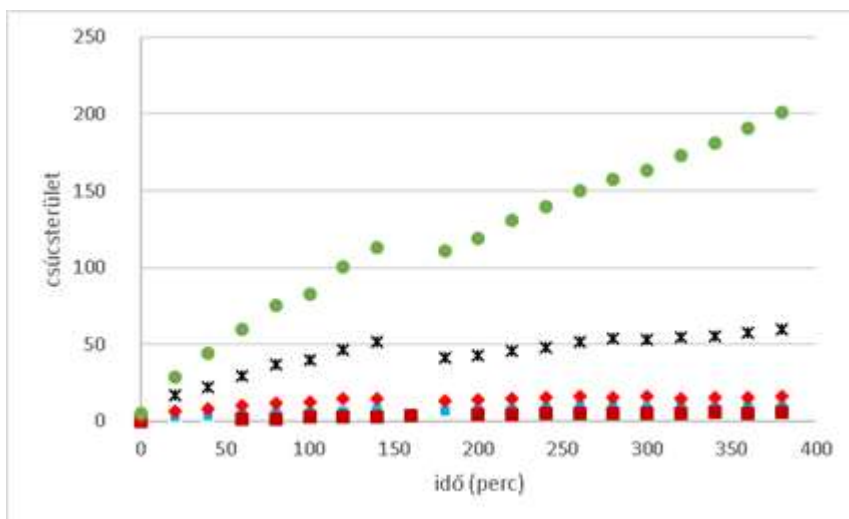


17. ábra: Az LDAm szintézis irányú reakciójának fordított fázisú folyadékkromatográfiás módszerrel történő követése során kapott kromatogramok 10 mM maltóz donor és CNPG akceptor esetében (kék: 20 perc, piros: 100 perc, zöld: 200 perc, rózsaszín: 400 perc).

A maltóz esetében már lejátszódik a reakció, tehát ahhoz, hogy az enzimhez történő kötődés és a szintézis megtörténjen, legalább két cukor egység tartalmú donor szükséges. A reakcióban fő termékként CNP-maltozid keletkezik. Az OPMA esetében is vizsgálták a glükózt és a maltózt szubsztrátként szintézis irányú reakcióban, melyben maltooligoszacharid termékek keletkeztek, azonban egyik szubsztrát sem volt kromofor csoporttal jelölve, emiatt nem definiálható, hogy melyik molekula a donor és melyik az akceptor [84]. Az általam végzett vizsgálatokban a detektálható termékeknél az akceptor molekula szerepét mindig a kromofor csoportot tartalmazó CNPG töltötte be. Természetesen a szabad glükóz és maltóz molekulák is kötődhetnek akceptorként az LDAm aktív centrumába, de a detektált termékek esetében kizárólag donor molekulaként vehetnek részt az enzim

reakcióban. Egy maltóz molekula CNPG akceptorhoz való kötődése során keletkezhet a legkisebb tagszámú kondenzációs termék, a CNP-maltotriozid, azonban a hidrolitikus reakció ezt a terméket bontja. Ez az oka annak, hogy a hosszabb tagszámú maltooligoszacharidok is csak elenyésző mennyiségben vannak jelen. Az egyensúlyi reakciót befolyásoló tényező a reaktánsok koncentrációja, ezért növeltem a donor molekula koncentrációját, ezáltal növelni próbálva a szintézis irányú folyamatot. Az előbbi kísérletet megismételtem úgy, hogy a reakcióelegy 25 mM maltózt tartalmazott.

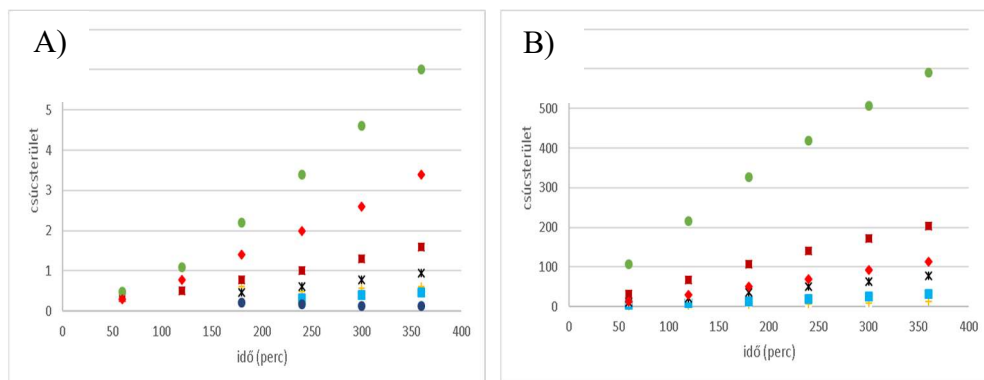
Nagyobb koncentrációjú maltóz esetében a szintézis irányú reakció jobban érvényesül. A CNP-maltozid mellett CNP-maltopentaozid jelenik meg főtermékként. A maltopentaozid keletkezhet CNP-maltotriozid maltóz egységgel történő kondenzációja során, már összekapcsolt maltóz egységekkel létrejött maltotetraóz és CNPG összekapcsolásával vagy nagyobb tagszámú szintézis irányú termék kondenzációs és transzglikozilezési reakciójában. Emellett a CNPG₅ rész vehet kondenzációs reakcióban, melyben maltóz egységgel összekapcsolódva CNPG₇ keletkezik, illetve a kötődése után transzglikozilezési reakcióban is rész vehet. A maltopentaozid egyféle produktív kötés módot tud kialakítani, tehát a nem redukáló vég felől egy maltotrióz egység vehet részt donor molekulaként a transzglikozilezésben valamilyen szabad vagy kromoforral jelölt akceptor molekulával és a transzglikozilezett termék mellett CNPG₂ keletkezik. A keletkezett termékek csúcsterületeit ábrázoltam az idő függvényében (18. ábra).



18. ábra: Az LDAm szintézis irányú reakciójának vizsgálata során kapott termékek csúcsterületének idő függése 25 mM maltóz tartalmú reakcióelegy esetében (CNPG₆: ■, CNPG₅: *, CNPG₄: ■, CNPG₃: ◆, CNPG₂: ●).

A vizsgálatok következő részében megkíséreltem 25 mM koncentrációjú maltotrióz donor molekula használatát is a szintézis irányú reakcióban, azonban a reakció követés során nem detektáltam terméket.

Abban az esetben, ha nagyobb tagszámú maltooligoszacharidokat alkalmazunk donorként, nagyobb tagszámú transzglikozilezett termékek várhatók, ezért vizsgálatokat végeztem egy a rendelkezésemre álló szabad maltooligoszacharid sorozat segítségével, mely 5-7 glükóz egyégből felépülő oligomereket (G₅-G₇) tartalmazott (40. ábra). A G₅-G₇ keveréket alkalmazva donorként megjelennek nagyobb tagszámú maltooligoszacharid termékek. A CNPG₂-G₅ termékek a másodlagos hidrolitikus reakció termékei. A termékek csúcsterületének időbeli változását a 19. ábra tartalmazza (7. függelék).



19. ábra: Az LDAmly szintézis irányú reakciójának vizsgálata során kapott termékek csúcsterületének idő függése 10 mg/ml G₅-G₇ tartalmú reakcióelegy esetében: A) A hétnél több glükóz egységet tartalmazó CNP-maltooligoszacharid termékek csúcsterületének időbeni változása (CNPG₁₄: ●, CNPG₁₃: +, CNPG₁₂: ■, CNPG₁₁: *, CNPG₁₀: ■, CNPG₉: ◆, CNPG₈: ●), B) A nyolcnál kevesebb glükóz egységet tartalmazó CNP-maltooligoszacharid termékek csúcsterületének időbeni változása (CNPG₇: +, CNPG₆: ■, CNPG₅: *, CNPG₄: ■, CNPG₃: ◆, CNPG₂: ●).

A CNP-maltozid ilyen reakció körülmények között is főtermékként jelentkezik. A CNP-triozid és tetraozid nagy mennyiségben keletkezik, mivel ezek a hasítási termékei a hosszabb tagszámú CNP-maltooligoszacharidoknak. A reakcióidő növekedésével megjelennek egyre nagyobb tagszámú oligomerek növekvő mennyiségben. Ez azt jelenti, hogy a transzglikozilezés domináns. Minden megjelenő termék potenciális szubsztrátja az LDAmly-nak szintézis és hidrolitikus irányban is. Az egyetlen termék, amelynek a hidrolízise nem lehetséges, a CNP-maltozid, viszont akceptor molekula lehet transzglikozilezési reakcióban.

A maltotriózzal történő sikertelen kísérlet miatt a G₅-G₇ tartalmú reakcióelegyből összeállítottam két párhuzamos mintát, melyek egyikébe 25 mM maltotriózt oldottam. A reakció elegyeket 30 perc inkubációs idő után injektáltam (8. függelék). A tapasztalataim alapján a maltotrióz természetes

inhibitora az LDAmY-nak, a három tagú maltooligomer hozzáadásával a transzglikozilezett termékek csúcsterületei drasztikusan csökkennek.

4.4.2. A transzglikozilezési reakció optimalizálása

A burgonyabogár eredetű α -amiláz hidrolitikus aktivitásának pH optimumát és termostabilitását meghatároztuk kis tagszámú, kromofor csoportot tartalmazó maltooligoszacharid szubsztrátok esetében, azonban kérdéses volt, hogy ezek a körülmények megfelelőek-e a transzglikozilezési reakció számára. Az optimalizálást CNPG akceptor és G₅-G₇ donor reakciójában végeztem el. A pH optimum meghatározásához a különböző pH értéken kapott termékek összesített csúcsterületét az idő függvényében ábrázoltam és kezdeti sebességeket határoztam meg (5. táblázat).

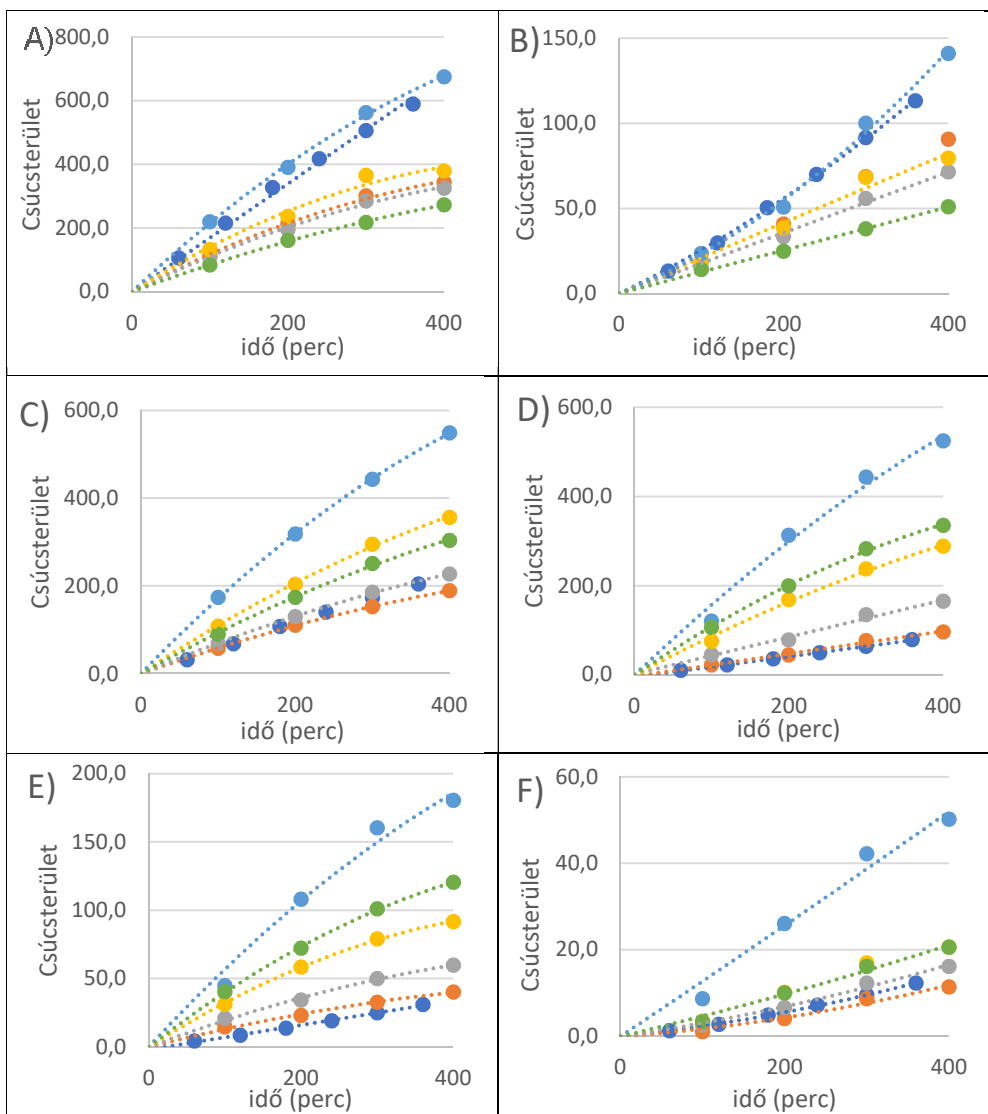
5. táblázat: Az LDAmY katalizálta CNPG akceptor és G₅-G₇ donor molekulák jelenlétében lejátszódó transzfer reakció sebességének pH függése a különbözőtermékekre, ahol a CNPG_n termékek legnagyobb képződési sebességei kiemelve szerepelnek.

Termék	Termék képződés sebessége (csúcsterület/perc)				
	pH4	pH5	pH6	pH7	pH8
CNPG ₂	0,72	1,03	1,61	0,24	0,00
CNPG ₃	0,36	0,25	0,33	0,06	0,00
CNPG ₄	0,77	0,40	0,58	0,14	0,04
CNPG ₅	0,19	0,12	0,23	0,17	0,07
CNPG ₆	0,07	0,04	0,09	0,06	0,02
CNPG ₇	0,03	0,02	0,04	0,02	0,00

A pH változtatása jelentős változást okoz a szintézis irányú reakció esetében is. Semleges és enyhén lúgos pH értéken a termékek keletkezésének jelentős csökkenése látható. Savas pH értékeken a csúcsterület értékekben kis változás tapasztalható. A termékek csúcsterület összege pH6 értéken 1035,4, pH5-n 777,6 és pH4-n 827,5 a 400 percnél történő mintavétel esetében, tehát, ha az összes termék keletkezését nézzük, akkor az optimum pH6 érték. A pH

változása azonban befolyásolja a termékarányt is. Míg CNPG₅-G₇ és CNPG₂ termékekből pH6 értéken keletkezik a legnagyobb mennyiség, addig azonos közel azonos mennyiségű CNPG₃ keletkezik pH6 és pH4 értékeken és a CNPG₄ termék a legnagyobb mennyiségben pH4 esetében keletkezik. Ezek alapján a pH bizonyos mértékben befolyásolja a hidrolitikus és a transzglikozidáz aktivitás arányát, tehát az enzimreakció termékaránya szabályozható a pH megválasztásával.

A hidrolízis során az enzim-szubsztrát intermedier hasítása egy víz molekula részvételével történik. A víz koncentráció csökkentésével elérhető lehet, hogy a transzglikozilezési reakció domináns legyen a hidrolízissel szemben. Az irodalmi áttekintés során fény derült arra, hogy egyes szerves oldószerek meghatározott koncentrációban jótékony hatást gyakorolnak a szintézis irányú útvonalra. Usui és Murata metanol koncentrációjának hatását vizsgálták és eredményeik alapján a *Pseudomonas stutzeri* NRRL B 3389 mutáns α -amiláz 50% metanol tartalomnál maximális az enzim aktivitás, azonban más alkoholok esetében az enzim aktivitása csökken [86]. Ez alapján kijelenthető, hogy a szerves oldószer mennyisége és minősége is befolyásolja az enzimatisztikus szintézis sebességét. Az alkoholok használata oldószerként hátrányos lehet, mivel az alkoholos hidroxil csoport lehetőséget ad, hogy részt vegyenek a szintézis irányú enzim reakcióban, melyben alkil-glikozid keletkezhet. Ez a mellékreakció befolyásolhatja a mérési eredményeket, de a termékei UV detektálással nem láthatók. Ennek elkerülése érdekében acetonitrilt választottam a szerves oldószer hatásának vizsgálatához. A kísérleteimben az acetonitril koncentráció enzim reakcióra gyakorolt hatását vizsgáltam. A különböző ACN (V/V)%-k esetén kapott termékek csúcsterületét az idő függvényében ábrázoltam (20. ábra).



20. ábra: Az LDAm szintézis irányú reakciójának vizsgálata során kapott termékek csúcsterületének szerves oldószer (V/V)% függése 10 mg/ml G₅-G₇ és 10 mM CNPG tartalmú reakcióelegy esetében: A) CNPG₂ B) CNPG₃ C) CNPG₄ D) CNPG₅ E) CNPG₆ F) CNPG₇ termék csúcsterületének időbeni változása (kék: 0 (V/V)% ACN, narancssárga: 5 (V/V)% ACN, szürke: 10 (V/V)% ACN, sárga: 15 (V/V)% ACN, világoskék: 20 (V/V)% ACN, zöld: 25 (V/V)% ACN).

Az ACN koncentráció növelésével a transzglykozilezési reakcióban egyre nagyobb mennyiségű termék keletkezik 20 (V/V)%-ig. A 25 (V/V)%-os minta

esetében a termékek keletkezésének romlása tapasztalható. Ez a szerves oldószer mennyiség már csökkenti az α -amiláz aktivitását. A tapasztalataim alapján tehát a transzglikozilezési reakció pH6 értéken és a reakcióelegyben 20 (V/V)% ACN jelenlétében éri el a legnagyobb hozamot, 400 percnél kétszer nagyobb az összes termék csúcsterület értéke, mint a szerves oldószer nélküli rendszerben. Figyelembe véve, hogy a kisebb tagszámú CNPG₂ és CNPG₃ keletkezésének sebessége azonosnak tekinthető a szerves oldószer nélküli és a 20 (V/V)% acetonitril tartalmú rendszer esetén és hogy 20 (V/V)% szerves oldószer alkalmazásával a nagyobb tagszámú CNPG_n (n=4-7) termékek keletkezése kedvezőbb, kijelenthető, hogy ennél a szerves oldószer koncentrációnál a legnagyobb a szintézis/hidrolízis arány. Mivel a célom a szintézis irányú reakció növelése volt a további vizsgálatokhoz célszerű ezeket a reakció körülményeket alkalmazni.

4.4.3. Fémionok hatása a transzglikozilezési reakcióban

A különböző alkáli-, alkáliföld- és átmenetifémek változatos hatást gyakorolnak az α -amilázok működésére, növelhetik, illetve csökkenthetik is az enzim aktivitását [85]. Ipari méretű szintéziseknél a reaktorból bekerülhetnek az oldatba, ezért vizsgáltam néhány fémion - réz(II), vas(II), cink(II) és mangán(II) - hatását a reakció lefutására. Ezek az átmenetifémek fontos szerepet töltenek be az élő szervezetekben. Több fehérjében szerkezetalkító hatásúak, emellett egyes enzimek aktív centrumának a részei. A vizsgálatokhoz az 5.4. fejezetben optimált módszert használtam. A négy fémion tartalmú oldat mellett kontrollként vizsgáltam egy fémiont nem tartalmazó reakcióelegyet is. Az LDAm 340 μ M réz(II) koncentráció mellett denaturálódik, aktivitása teljesen elvész. Ez az eredmény egyezést mutat az OPMA-N és Δ OPMA-N vizsgálata során kapottakkal, ahol igaz a teljes aktivitás nem veszett el, de drasztikusan csökkent réz(II) jelenlétében [85].

Cink(II) jelenlétében az enzim aktivitása jelentősen lecsökken, a keletkezett termékek mennyisége a kontroll rendszer 15,2 %-a (6. táblázat), ami nagy eltérést mutat a Wang és munkatársai által kapott eredményektől, amelyben a két módosított OPMA aktivitás növekedést mutatott cink(II) jelenlétében [85]. Vas(II) hatására szintén az aktivitás kismértékű romlása figyelhető meg, a termékek keletkezése a kontrollhoz képest 70,8 %-ra csökkent. Az imént említett két enzim nem mutatott szignifikáns aktivitásváltozást vas(II) jelenlétében [85].

6. táblázat: A transzglykozilezési reakció során keletkezett kromofor tartalmú maltooligoszacharid szubsztrátok csúcsterület értékei 300 perc inkubációt követően különböző fémionok mellett.

	Termékek csúcsterület értékei								Összes termék mennyisége a kontrollhoz képest (%)
	CNPG ₉	CNPG ₈	CNPG ₇	CNPG ₆	CNPG ₅	CNPG ₄	CNPG ₃	CNPG ₂	
kontroll	7,7	16,7	42,2	160,3	444,0	443,0	100,2	562,8	100,0
Fe(II)	4,0	9,3	25,1	95,4	276,8	326,8	67,3	454,3	70,8
Zn(II)	0,6	1,4	4,9	31,5	80,8	70,5	2,9	78,2	15,2
Mn(II)	8,0	17,6	43,2	132,1	388,0	508,3	174,4	801,9	116,7

A mangán(II) az összes termékkeletkezést tekintve jótékony hatással van a reakcióra, azonban a termékek csúcsterületeit tekintve látható, hogy a legnagyobb tagszámú termékek jelenléte kis mértékben nőtt és inkább a kisebb tagszámú termékek, maltozid, maltotriozid és maltotetraozid keletkezését növelte meg, melyek a másodlagos hidrolitikus reakció termékei, tehát összességében a mangán(II) mindkét irányú reakció sebességét növeli, azonban a hidrolízisét jobban.

Az előző kíséretekben alkalmazott fémionok többsége az aktivitás csökkenését vagy teljes megszűnését okozta, azonban kérdéses volt, hogy kisebb koncentrációban milyen hatást váltanak ki, ezért vizsgálatokat

7. táblázat: A transzglykozilezési reakció során keletkezett kromofor tartalmú maltooligoszacharid szubsztrátok csúcsterület értékei 300 perc inkubációt követően különböző fémionok mellett

	Termékek csúcsterület értékei								Összes termék területe a kontrollhoz képest (%)
	CNPG ₉	CNPG ₈	CNPG ₇	CNPG ₆	CNPG ₅	CNPG ₄	CNPG ₃	CNPG ₂	
Kontroll	7,7	16,7	42,2	160,3	444,0	443,0	100,2	562,8	100,0
Cu(II)	10,1	20,7	46,7	162,6	458,7	512,5	112,8	497,6	102,5
Fe(II)	7,0	14,8	35,3	138,1	398	437,3	87,4	491,2	90,6
Zn(II)	5,7	12,8	30,9	104,7	337	516,5	117,3	656,5	100,3
Mn(II)	5,8	11,9	27,9	106,8	333,8	406,5	79,5	458,4	80,5

A vas(II) 28 mM koncentrációban is az aktivitás 10%-os romlását okozza. Ezzel szemben a cink(II) az összes termék mennyiségén nem változtat, azonban növeli a CNP-maltozid, CNP-maltotriozid és CNP-maltotetraozid keletkezésének arányát a hosszabb tagszámú CNP-maltooligoszacharid termékekkel szemben, tehát eltolja a reakciót a hidrolízis irányába.

A mérési eredmények alapján a 100 μ M nagyságrendű átmenetifémion koncentrációk általában nagymértékben csökkentik az α -amiláz transzglykozidáz aktivitását, ezzel szemben a 10 μ M nagyságrendben jelenlévők kismértékű változást jelentenek. A kisebb koncentrációban jelenlévő fémionok közül a réz(II) és a cink(II) kismértékben képes befolyásolni a termékarányt.

4.4.4. Különböző glikozidok mint potenciális akceptor molekulák

Az eddigiekben glükóz egységekből felépülő maltooligoszacharid enzimatisz szintézisét vizsgáltam. Szintetikus szempontból értékes lenne olyan di- és oligoszacharidok létrehozása enzimatisz reakcióban, melyek különböző cukor egységekből épülnek fel. A kísérleteim során vizsgált vegyületek a 4-nitrofenil- β -D-mannopiranozid, 4-nitrofenil- β -D-

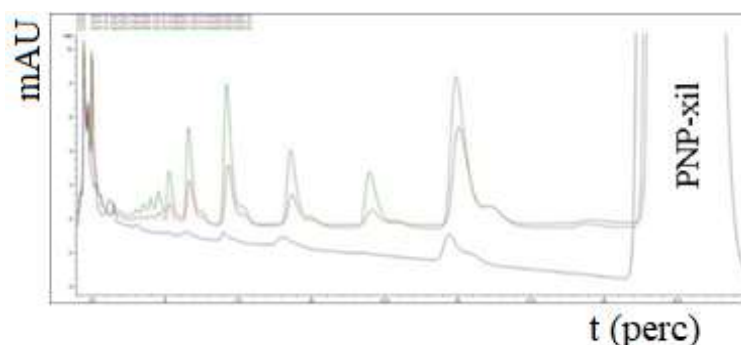
galaktopiranozid, 4-nitrofenil- β -D-xilopiranozid és 4-nitrofenil- β -D-N-Ac-glükózaminid, melyek szerkezetét a 8. táblázatban tüntettem fel. Ezeket a molekulákat a Debreceni Egyetemen már korábban alkalmazták transzglykozilezési vizsgálatokban mutáns α -amilázokon [90]. Emellett felmerült a paranitrofenol alkalmazása is akceptorként.

8. táblázat: A transzglykozilezési reakcióban akceptor molekulaként alkalmazott cukor származékok neve és szerkezete

Név	Szerkezet
2-klór-4-nitrofenil- β -D-glükopiranozid	
4-nitrofenil- β -D-mannopiranozid	
4-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid	
4-nitrofenil- β -D-xilopiranozid	
4-nitrofenil- β -D-N-Ac-glükózaminid	
(Hidroxmetil) fenil- β -D-glükopiranozid (szalicin)	

Ezek a monoszacharid származékok a CNPG-vel ellentétben 4-nitrofenil (PNP) csoportot tartalmaznak, emiatt kromatográfiás szempontból eltérő tulajdonságúak. A reakció követéséhez használt módszerben ezért meg kellett változtatni az eluens összetételt. Vizsgálatot végeztem paranitrofenollal is, de

nem tapasztaltam termék keletkezését, tehát szintén nem akceptor molekula a szintézis irányú reakcióban. A PNP-xilopiranozid a glükopiranoziddal hasonló térszerkezetű, a királis hidroxil csoportok térállása azonos, emiatt a megfelelő oligoszacharid termékek megjelennek (22. ábra).

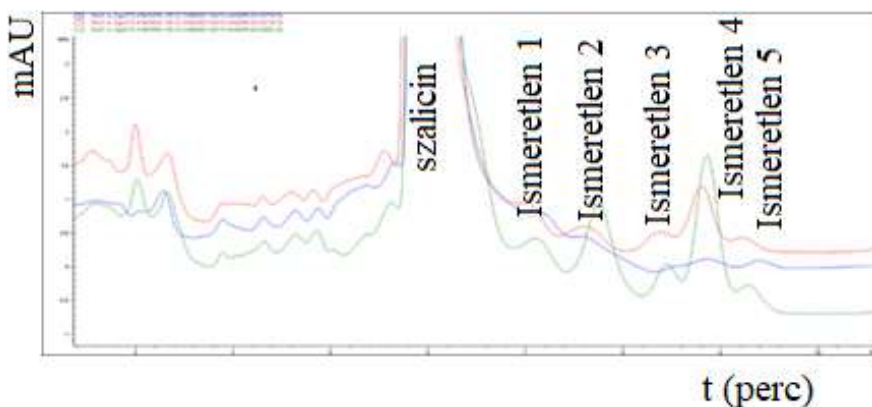


22. ábra: Az LDAmY szintézis irányú reakciójának vizsgálata fordított fázisú folyadékkromatográfiával, ahol az akceptor PNP- β -D-xilopiranozid. A kromatogramok az enzim reakcióban keletkező oligoszacharid termékek csúcsait ábrázolják (kék: 90 perc, piros: 690 perc, zöld: 2880 perc).

A PNP- β -D-mannopiranoziddal, β -D-galaktopiranoziddal és β -D-N-Ac-glükozaminiddal további kísérleteket végeztem, melyekben a fémionok módosító hatását vizsgáltam. Ezekhez az 1 ml térfogatú reakcióelegyeket az 5.4. fejezetben leírt módon állítottam össze. A PNP- β -D-galaktopiranozid ezekben az esetekben sem működött akceptorként. A PNP- β -D-N-Ac-glükozaminid vizsgálata során növekvő csúcsot tapasztaltam, azonban standard injektálásával bizonyítottam, hogy a PNP- β -D-N-Ac-glükozaminid lassú izomerizációja következik be PNP- α -D-N-Ac-glükozaminiddá, amelyet a fordított fázisú oszlop a poláris utószilanizálás biztosította hidrofíl kölcsönhatás miatt képes elválasztani. A PNP-galaktopiranozid 4. hidroxil csoportjának térállása nem megfelelő, hogy az LDAmY képes legyen akceptor molekulaként befogadni. A PNP-N-acetil-glükozamidin az N-acetil csoport miatt nem megfelelő akceptor molekula. A PNP-galaktopiranozid és N-acetil-glükozamidin korábbi vizsgálatait során ugyanilyen eredményre jutottak

mutáns α -amilázok esetében [90]. A PNP- β -D-mannopiranozid bizonyos fémionok jelenlétében akceptor molekulaként viselkedik. A transzglikozilezési reakció vas(II), cink(II) és mangán(II) jelenlétében végbemegy. A folyamat lassú, egy nap inkubációt követően a keletkezett termékek összes csúcsterülete az akceptor molekula területének a 0,03%-a (9. függelék).

A további vizsgálataimban kipróbáltam egy glikozidáz inhibitor, a szalicint ((hidroxmetil)fenil- β -D-glükopiranozid), mint akceptor molekulát a transzglikozilezési reakcióban, melynek szerkezetét a 8. táblázat mutatja be. A szalicin megtalálható a természetben, mint növényi hormon [99]. A szalicin egy β -D-glükopiranozid egységet tartalmazó monoszacharid származék, hasonló szerkezetű a vizsgálataim során eddig alkalmazott CNPG-vel, ezért várható volt, hogy az akceptor molekulaként fog viselkedni a transzglikozilezési reakcióban. A vegyület kromatográfiás szempontból eltért az eddigiektől, az alifás hidroxil csoport megnöveli a polaritását, így az eddig alkalmazott módszerek megváltoztatása volt szükséges. A szalicint akceptorként alkalmazva a szintézis irányú reakció esetében öt terméket detektáltam (23. ábra).



23. ábra: Az LDAmY szintézis irányú reakciójának vizsgálata fordított fázisú folyadékkromatográfiás módszerrel, ahol az akceptor szalicin. A kromatogramok az enzim reakcióban keletkező oligoszacharid termékek csúcsait ábrázolják (kék: 5 perc, piros: 325 perc, zöld: 1440 perc).

A detektált ismeretlen termékeket frakcióba gyűjtöttem és meghatároztam az m/z értéküket ESI-TOF (elektrospray ionizáció – repülési idő analizátor) tömegspektrometriás módszerrel (9. táblázat, 10. függelék).

9. táblázat: Az LDAmY szintézis irányú reakciójának során kapott termékek frakciójának ESI-TOF vizsgálata során kapott m/z értékei, valamint az azonosított termékek összegképletei. (A „szal” jelzés a redukáló végi szalicin egységet jelöli, a „Gn”(n=1-5) pedig a kapcsolt glükóz egységeket)

Vegyület	Összegképlet	Számolt moláris tömeg (g/mol)	m/z
Szalicin	$[C_{13}H_{18}O_7]Na^+$	309,10	309,34
szal-G	$[C_{19}H_{28}O_{12}]Na^+$	471,15	471,15
szal-G ₂	$[C_{25}H_{38}O_{17}]Na^+$	633,20	633,20
szal-G ₃	$[C_{31}H_{48}O_{22}]Na^+$	795,25	795,25
szal-G ₄	$[C_{37}H_{58}O_{27}]Na^+$	957,31	957,31
szal-G ₅	$[C_{43}H_{68}O_{32}]Na^+$	1119,36	1119,36

A tömegspektrometriás analízis eredményei alapján a szalicin alkalmazható akceptorként az LDAmY katalizált szintézis irányú reakcióban. Sikeresen azonosítottam a 2-6 glükóz egység tartalmú termékeket. A glükóz egységek számának növekedésével a molekulák polaritása növekszik, emiatt fordított

fázisú kromatográfiában az akceptor molekulánál kisebb visszatartású csúcsokat kellene kapni, azonban a polárisan utószilanizált állófázison a hidrofil kölcsönhatások jobban érvényesülnek.

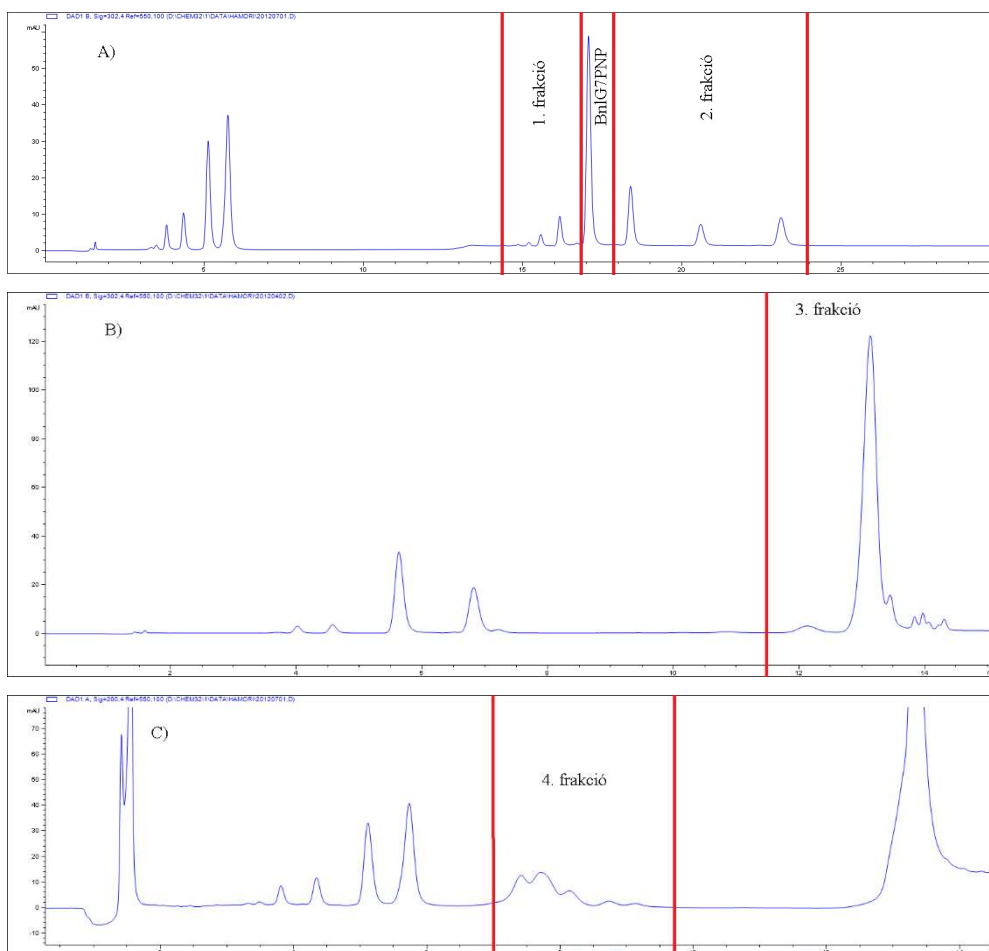
A szalicin bizonyítottan α -glükózidáz inhibitor. Ha a vegyületben levő cukor rész tagszámát növeljük, azok a vegyületek képesek kölcsönhatásba lépni az α -amilázok aktív centrumával, ezáltal potenciális amiláz inhibitorok lehetnek, ha az enzim szintézis során α -(1,6)-glikozidos kötést sikerül az oligomer láncba építeni.

4.4.5. Nem redukáló végi alifás és aromás védőcsoportok hatása

Az LDAmY transzglykozidáz aktivitását először a középbél extraktum bontási kép vizsgálatait során tapasztaltam BnIG₈PNP szubsztrát esetében. A hasított nem redukáló és redukáló végi termékekből transzglykozilezési reakcióban különböző tagszámú mindkét végén kromofor csoporttal jelölt maltooligoszacharid származékok jöttek létre, BnIG_nPNP (n=4-7) termékek voltak detektálhatók. A további vizsgálatok célja az volt, hogy kiderítsem, a nem redukáló végi védőcsoport minősége befolyásolja-e a kapcsolt termékek keletkezésének arányát. A vizsgálatokhoz rendelkezésemre állt a korábbiakban már használt BnIG₇PNP és a vele azonos tagszámú, klinikai diagnosztikában alkalmazott 2,4-etilidén-4-nitrofenil-O- α -D-maltoheptaozid (Et-4-G₇-PNP). A két szubsztrát a szénhidrát lánc nem redukáló végén lévő védőcsoport minőségében különbözik. A BnIG₇PNP esetében egy benzilidén csoport az Et-4-G₇-NP egy etilidén csoport létesít kötést a hetedik glükóz egység 4. és 6. hidroxil csoportjával.

A vizsgálatok során mindkét esetben a kiindulási szubsztrát adja a donor és az akceptor molekulát is. Mindkét szubsztrát esetében megjelentek a redukáló végi hidrolízis termékek (PNPG_n), valamint a nagyobb visszatartású

mindkét végén védőcsoportot tartalmazó transzglikozilezett termékek is. Ezen termékek azonosítása érdekében háromszor 50 µl mintatérfogatot injektáltam és frakciókat gyűjtöttem (24. ábra).



24. ábra: A BnlG₇PNP (A) és az Et-G₇-PNP (B) bontási és transzglikozilezési reakciójának követése során kapott kromatogramok 302 nm és a BnlG₇PNP (C) termékei 200 nm hullámhosszon (kék: 0 perc, piros: 1440 perc). Az ESI-MS méréshez gyűjtött frakciók piros vonallal, számozással jelölve.

Négy különböző frakciót gyűjtöttem: a BnlG₇PNP-nél kisebb visszatartású termékeket, melyek várhatóan nagyobb tagszámúak (1), mint a kiindulási szubsztrát, a BnlG₇PNP nagyobb visszatartású termékeit (2), melyekben várhatóan a glükóz egységek száma kisebb, mint hét, az Et-G_n-PNP termékeket (3) és a BnlG₇PNP hidrolízise során keletkező nem redukáló végi termékeket (4). Az ESI-TOF tömegspektrometriás analízis során kapott

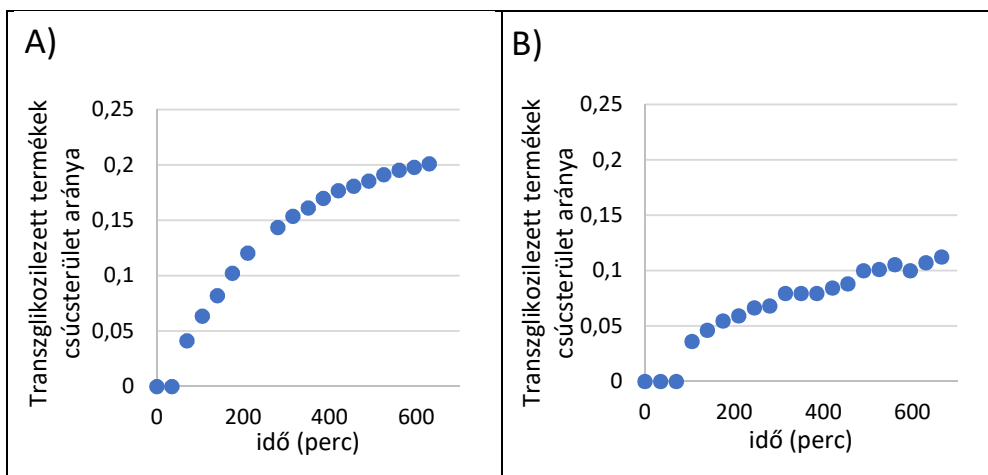
m/z értékeket és a hozzájuk tartozó összegképletet és számított molekulatömeget a 10. táblázatba gyűjtöttem (Spektrumok: 11-14. függelék).

10. táblázat: A reakcióelegyekből gyűjtött frakciók ESI-TOF analízise során kapott m/z értékek, az azonosított termékek és a hozzájuk tartozó összegképletek.

Frakció	Azonosított vegyület	Összegképlet	Számolt moláris tömeg	m/z
	BnlG ₁₀ PNP	[C ₇₃ H ₁₀₉ O ₅₃ N]Na ⁺	1870,58	1870,58
	BnlG ₉ PNP	[C ₆₇ H ₉₉ O ₄₈ N]Na ⁺	1708,52	1708,53
	BnlG ₈ PNP	[C ₆₁ H ₈₉ O ₄₃ N]Na ⁺	1546,47	1546,48
2	BnlG ₆ PNP	[C ₄₉ H ₆₉ O ₃₃ N]Na ⁺	1222,36	1222,36
	BnlG ₅ PNP	[C ₄₃ H ₅₉ O ₂₈ N]Na ⁺	1060,31	1060,31
	BnlG ₄ PNP	[C ₃₇ H ₄₉ O ₂₃ N]Na ⁺	898,26	898,26
3	Et-4-G ₁₀ -NP	[C ₆₈ H ₁₀₆ O ₅₃ N]Na ⁺	1807,55	1807,55
	Et-4-G ₉ -NP	[C ₆₂ H ₉₆ O ₄₈ N]Na ⁺	1645,50	1645,50
	Et-4-G ₈ -NP	[C ₅₆ H ₈₆ O ₄₃ N]Na ⁺	1483,45	1484,45
	Et-4-G ₇ -NP	[C ₅₀ H ₇₆ O ₃₈ N]Na ⁺	1321,39	1322,40
	Et-4-G ₆ -NP	[C ₄₄ H ₆₆ O ₃₃ N]Na ⁺	1159,34	1157,84
	Et-4-G ₅ -NP	[C ₃₈ H ₅₆ O ₂₈ N]Na ⁺	997,28	998,30
	Et-4-G ₄ -NP	[C ₃₂ H ₄₆ O ₂₃ N]Na ⁺	835,24	836,24
4	BnlG ₆	[C ₄₃ H ₆₆ O ₃₁]Na ⁺	1101,35	1101,35
	BnlG ₅	[C ₃₇ H ₅₆ O ₂₆]Na ⁺	939,30	939,30
	BnlG ₄	[C ₃₁ H ₄₆ O ₂₁]Na ⁺	777,24	777,24
	BnlG ₃	[C ₂₅ H ₃₆ O ₁₆]Na ⁺	615,19	615,19
	BnlG ₂	[C ₁₉ H ₂₆ O ₁₁]Na ⁺	453,14	453,14

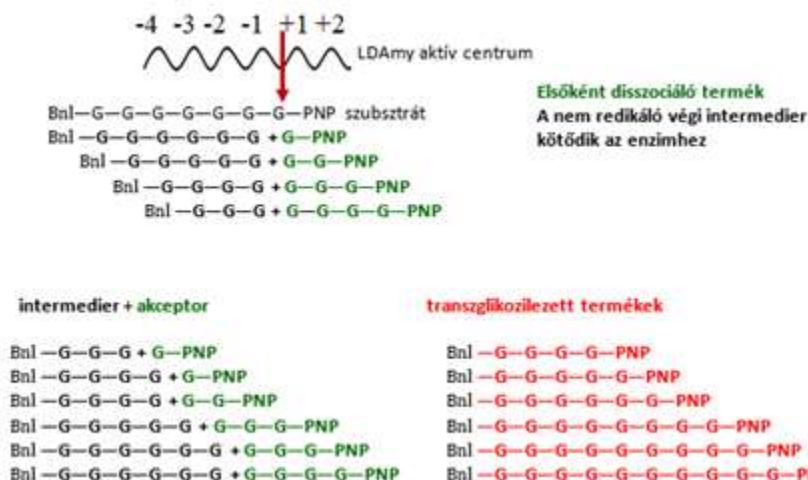
A termékeket Na⁺ ionnal ionizált formában sikerült azonosítani. A vizsgált szubsztrátokból azonos tagszámú mindkét végén védőcsoportot tartalmazó transzglykozilezett termékek keletkeztek.

Vizsgáltam a rovarbél extraktum transzferáz aktivitását 7 és 8 tagszámú oligomereken. A transzglykozilezéssel keletkező Bnl-PNP termékek arányát számítottam az összes termékhez viszonyítva a reakció követésére használt HPLC kromatogramok csúcsterületei alapján (25. ábra).



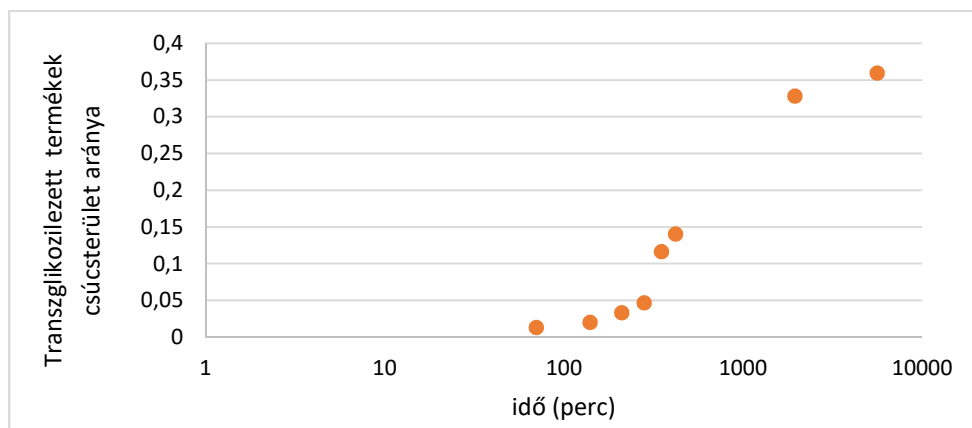
25. ábra: A rovarbél extraktum szintézis irányú reakciójának vizsgálata A) BnlG₇PNP és B) BnlG₈PNP szubsztrátokon

A rovarbél extraktum szintézis irányú reakciójának vizsgálata során kapott eredmények alapján 630 perc inkubációs időt követően a BnlG₇PNP esetében 20% a transzglykozilezett termékek összterületének aránya az összes termék összterületéhez képest, míg BnlG₈PNP szubsztráton 12%, tehát a mindkét végén kromoforral jelölt hét tagú szubsztráton a transzferáz aktivitás kifejezettebb. A transzglykozilezési reakció folyamatát a 26. ábra mutatja be. Amikor a szubsztrát produktívan kötődik az α -amiláz aktív helyéhez, a glükózegységek kölcsönhatásba lépnek az alhelyekkel. A glikozidos kötés hasadása átmeneti állapotban keresztül megy végbe. A redukáló végtermék disszociál, és kovalens intermedier keletkezik a nem redukáló végtermék és az enzim részvételével, a glikozid-hidrolázok retenciós mechanizmusa szerint.



26. ábra: Az LDAm transzglykozilezési reakciójának sematikus ábrája, melyben BnlG₇PNP szubsztrátból és az abból hidrolízissel keletkező PNPG_n akceptorból BnlG_nPNP transzfer termékek keletkeznek. Az LDAmy aktív hely glikonkötő alhelyeit negatív, míg az aglikonkötő helyeket pozitív számmal jelöltem.

A heptamer szubsztráttal a kísérletet a tisztított enzimmel 20 (V/V)% acetonitril jelenlétében is megismétltem (27. ábra).



27. ábra: Az LDAm szintézis irányú reakciójának vizsgálata BnlG₇PNP szubsztráton 20 % ACN jelenlétében

A transzglykozilezett termékek csúcsterület összegének aránya a teljes termék keletkezéshez képest 14% 420 perc inkubációs időt követően. Ezen a

Az emlős α -amilázok tartalmaznak egy olyan rugalmas, glicin gazdag hurkot ($^{304}\text{GHGAGGA}^{310}$), amely a maltooligoszacharid szubsztrátok kötődésekor rendeződik és elmozdul a szubsztrát felé [101]. Ramasubbu és munkatársai a flexibilis hurok szerepének felderítése érdekében a HSA-ból egy deléciós mutánszt hoztak létre, amely ezt a hurkot nem tartalmazta. A hurok szerepébe betekintést nyerhetünk a két enzim akarbózzal kötött kristályszerkezete alapján, amelyek átmeneti állapot analóg struktúrát mutatnak. Az akarbózt mindkét enzim hidrolízissel, kondenzációval vagy transzglikozilezési reakciókkal módosítja. A kinetikai adatok arra utalnak, hogy a mobil hurok részt vehet a katalízis elősegítésében az átmeneti állapot alatt, a kristálytani adatok pedig azt mutatják, hogy a hurok szerepet játszhat a termékek felszabadulásában az aktív centrumból. A 28. ábrán látható szekvencia részletek mutatják, hogy ez a mozgékony hurok régió hiányzik a rovar eredetű enzimekből, ami egyik oka lehet a megfigyelt transzferáz aktivitásnak. A mobil hurok hiányában a termék kovalens köztitermékből történő felszabadulása gátolt/lassú, lehetővé téve az akceptor kötést az aglikon kötési helyén és a transzglikozilezést. A korábbi irodalmi adatok azt mutatják, hogy a His235Glu szubsztitúció az aktív hely közelében transzferáz aktivitást hozott létre a *Bacillus licheniformis* α -amiláz számára, amely nem volt kimutatható a vad típusú enzimben [81]. A szekvencia illesztés azt mutatja, hogy az Asp101, ami eredetileg a vad típusú LDAmY -ban van jelen, és megfelel a -1 alhelyen található His101-nek a HSA szekvenciában. Ez a szubsztitúció szintén hozzájárulhat az LDAmY megfigyelt transzglikozilációs képességéhez. Korábban Ramassubu és munkatársai leírták a Trp58 aminosav több alhelyen bekövetkező koordináló szerepét a HSA-ban, ahol a Trp58Leu mutáció csökkentette az összes alhely energiáját és fokozott transzglikozilációs aktivitást okozott [102]. A CNPG₄ szubsztráton közel 0,5 transzglikozilezés/hidrolízis arányt találtak. Az Ala307 és a Gly308 jelenléte

a mobil hurok részeként szükségesnek bizonyult a hidrolízishez szükséges vízcsatorna kialakításához. A Trp58 az LDAm_y szekvenciában is jelen van, de a mobil hurok összetevői teljesen hiányoznak. Az LDAm_y-ban Asp által felváltott His305 helyzete és megfelelő konformációja szintén fontosnak bizonyult a hidrolízis szempontjából [102]. Ezenkívül néhány poláris aminosavat (pl. Tyr232 és Asn250) a HSA aglikonkötő helyei közelében Phe helyettesít az LDAm_y-ban. A poláris aminosavak az aktív hely környezetében szükségesek a hidrolízishez vízmegkötő determinánsokként, míg a Phe oldallánc felelős lehet a transzglykozilációért [103]. Érdekes, hogy a Tyr232Phe helyettesítés jelen van az AMYR_DROME-ban is, de nincs jelen a TMA-ban. Ezek az eredmények felvetik annak lehetőségét, hogy a rovar α -amilázok transzferáz aktivitása gyakoribb lehet, mint azt korábban gondolták.

4. 5. A tisztított LDAm_y bontási képének meghatározása

A tisztított LDAm_y bontási kép vizsgálatát 4-8 glükózegység tartalmú CNP- β -D-maltooligoszacharid szubsztrátokon hajtottam végre [106]. A szubsztrátok bontásából keletkező termékek minőségi és mennyiségi meghatározását, valamint mennyiségük időbeli változását fordított fázisú folyadékkromatográfiás módszerrel határoztam meg. A CNPG_n szubsztrátokat 1 ml azid-mentes MES pufferben oldottam és a reakciókat mindig 1 μ l LDAm_y oldat hozzáadásával indítottam, melynek koncentrációja 18 μ M volt. A szubsztrátok kiindulási koncentrációit minden esetben 100 μ M körüli értékre állítottam be, hogy a kondenzációs és transzglykozilezési folyamatok elhanyagolhatóak legyenek. A keletkező termékek aránya megadja a hasított glikozidos kötések helyét és azt, hogy az enzim az adott glikozidos kötést milyen gyakorisággal hasítja, tehát a BCF értékét. A BCF értékek megmutatják a vizsgált szubsztrátok produktív kötődési módjait. A bontási

kép meghatározása során csak a kromogén, redukáló végi termékek változását lehet időben követni, melyek arányát a 11. táblázatban tüntettem fel.

11. táblázat: Az LDAmY katalizált hidrolitikus reakció BCF értékei a különböző CNP-maltooligoszacharid szubsztrátok esetében

Szubsztrát	CNP-glikozid termékek			
	CNPG	CNPG ₂	CNPG ₃	CNPG ₄
CNPG ₄	0,34	0,47	0,19	
CNPG ₅		1,00		
CNPG ₆		0,70	0,30	
CNPG ₇		0,39	0,40	0,21
CNPG ₈		0,30	0,30	0,39

Az LDAmY-nak egyedülálló hasítási módja van a CNP-maltooligoszacharid szubsztrátokon. A CNP-maltozid 0,47 és 1 közötti arányban keletkezik a rövidebb láncú szubsztrátok bontása során, ez alapján a nem-redukáló végi termékek maltóz, maltotrióz és maltotetraóz. Ahogy nő a maltooligoszacharid lánc hossza a maximális hasítási frekvencia eltolódik a nem redukáló vég felé. A CNPG₇ és CNPG₈ esetében a domináns nem-redukáló végi termék a maltotetraóz lesz. A CNP-maltoheptaozid esetében a CNPG₂ és CNPG₃ azonos mennyiségben keletkezik.

A CNP-maltotetraozid katalitikus hidrolízise során három főtermék keletkezett: CNP-β-D-glükopiranozid, maltozid és maltotriózid. A differenciálegyenleteket ennek megfelelően a kiindulási szubsztrát, valamint a három termék időbeli változására írtam fel (1-4 egyenletek).

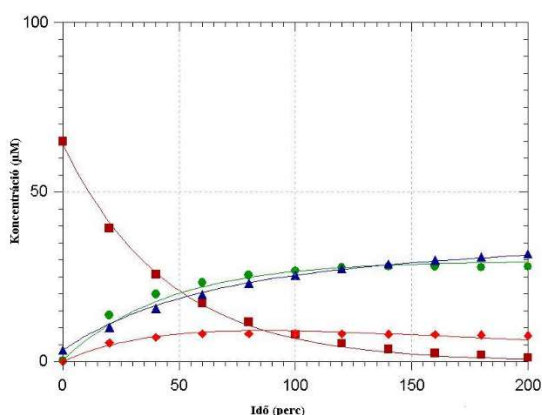
$$\frac{d[S_4]}{dt} = -k_{43}[S_4] - k_{42}[S_4] - k_{41}[S_4] \quad (1)$$

$$\frac{d[S_3]}{dt} = k_{43}[S_4] - k_{31}[S_3] \quad (2)$$

$$\frac{d[S_2]}{dt} = k_{42}[S_4] \quad (3)$$

$$\frac{d[S]}{dt} = k_{41}[S_4] + k_{31}[S_3] \quad (4)$$

A differenciálegyenletek segítségével görbét illesztettem a mérési pontokra a Scientist szoftver segítségével, amely lehetőséget ad a reakciósebességi állandók numerikus megoldására a differenciálegyenlet-rendszer alapján (30. ábra). A görbeillesztés akkor adta a legpontosabb eredményt, ha a CNP-maltotriozid hidrolízisét is figyelembe vettem, melynek terméke maltóz és CNP- β -D-glükopiranozid.



30. ábra: A CNPG₄ bontási kép vizsgálata során kiindulási szubsztrát és a termékek koncentrációjának időbeni változása, valamint a kinetikai görbék illesztése a kísérleti úton meghatározott pontokra (CNP_{G4}: ■, CNP_{G3}: ◆, CNP_{G2}: ●, CNP: ▲).

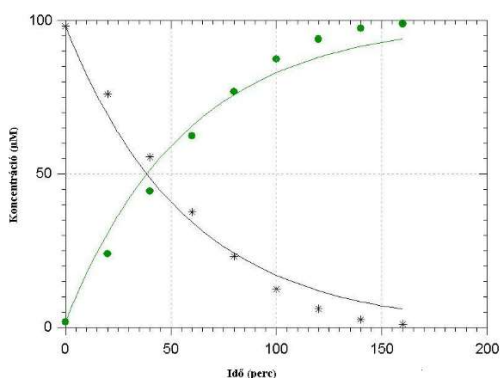
A CNP_{G3} görbéről megállapítható, hogy egy maximum érték elérése után a termék koncentrációja csökken, ami azt jelenti, hogy a CNP_{G3} másodlagos hidrolízisben vesz részt.

A CNP_{G5} bontásának egyféle redukáló végi terméke van, a CNP_{G2}, emiatt a felírt differenciálegyenlet is lényegesen egyszerűbb, mint a CNP_{G4} szubsztrát esetében (5., 6. egyenletek).

$$\frac{d[S_5]}{dt} = -k_{52}[S_5] \quad \frac{d[S_3]}{dt} = k_{43}[S_4] - k_{31}[S_3] \quad (5)$$

$$\frac{d[S_2]}{dt} = k_{52}[S_5] \quad (6)$$

Az egyféle termék keletkezése arra utal, hogy a CNPG₅ egy módon tud produktívan kötődni az LDAm_y aktív részében. A CNPG₂ nem szubsztrátja a vizsgált enzimnek, nem volt más termék detektálható, tehát ebben az esetben nem áll fenn a másodlagos hidrolízis lehetősége (31. ábra).



31. ábra: A CNPG₅ bontási kép vizsgálata során kiindulási szubsztrát és a CNPG₂ termék koncentrációjának időbeni változása, valamint a kinetikai görbék illesztése a kísérleti úton meghatározott pontokra (CNPG₅: *, CNPG₂: ●).

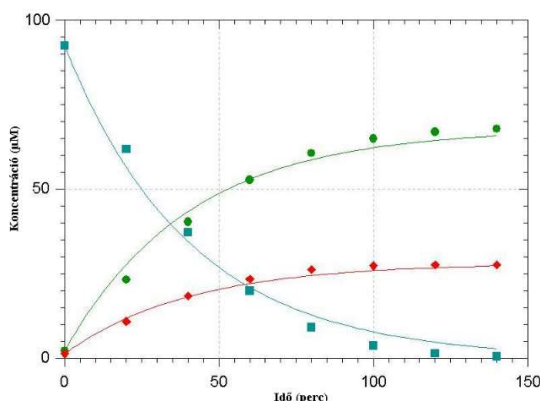
A CNPG₆ szubsztrát esetében két hasítási lehetőség van, két redukáló végi termék keletkezik, a CNPG₂ és CNPG₃. A differenciálegyenleteket ennek a két terméknek a keletkezésére írtam fel (7-9. egyenlet).

$$\frac{d[S_6]}{dt} = -k_{63}[S_6] - k_{62}[S_6] \quad (7)$$

$$\frac{d[S_3]}{dt} = k_{63}[S_6] \quad (8)$$

$$\frac{d[S_2]}{dt} = k_{62}[S_6] \quad (9)$$

A CNPG₆ kétféle produktív kötésmódot tud létrehozni az enzim aktív részével, viszont a CNPG₃ a domináns termék. A vizsgálati idő alatt nem tapasztaltam a CNPG₃ másodlagos hidrolízisét, nem keletkezett CNP-β-D-glükopiranozid (32. ábra).



32. ábra: A CNPG₆ bontási kép vizsgálata során kiindulási szubsztrát és a termékek koncentrációjának időbeni változása, valamint a kinetikai görbék illesztése a kísérleti úton meghatározott pontokra (CNPG₆: ■, CNPG₃: ◆, CNPG₂: ●).

A tagszám további növekedésével a hasítási termékek száma is nőtt. A CNPG₇ szubsztrát hidrolízisének már három redukáló végi terméke jelentkezik: CNPG₂, CNPG₃ és CNPG₄. Emellett 20 perc inkubációt követően megjelenik a CNP-β-D-glükopiranozid is, tehát a termékek másodlagos hidrolízisét is figyelembe kellett vennem a differenciálegyenletek felírásakor (10-14. egyenletek).

$$\frac{d[S_7]}{dt} = -k_{74}[S_7] - k_{73}[S_7] - k_{72}[S_7] \quad (10)$$

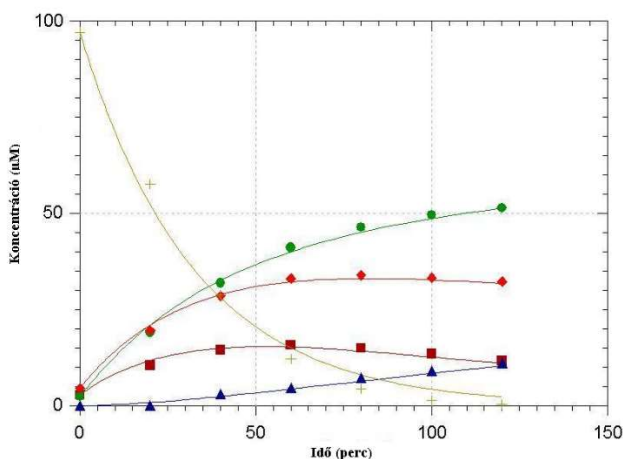
$$\frac{d[S_4]}{dt} = k_{74}[S_7] - k_{43}[S_4] - k_{42}[S_4] - k_{41}[S_4] \quad (11)$$

$$\frac{d[S_3]}{dt} = k_{73}[S_7] + k_{43}[S_4] \quad (12)$$

$$\frac{d[S_2]}{dt} = k_{72}[S_7] + k_{42}[S_4] \quad (13)$$

$$\frac{d[S]}{dt} = k_{41}[S_4] \quad (14)$$

A differenciálegyenlet-rendszer annyiban vált bonyolultabbá, hogy hozzá kellett adni a CNPG₄ esetén felírt egyenleteket. Figyelembe kellett venni azt is, hogy a CNPG₂ és CNPG₃ keletkezhet CNPG₇ bontása során, valamint a CNPG₄ keletkezése után, annak másodlagos hidrolitikus terméke is lehet. A CNPG₄ mennyisége a reakció során elért egy maximális értéket, majd csökkenni kezdett (33. ábra).



33. ábra: A CNPG₇ bontási kép vizsgálata során kiindulási szubsztrát és a termékek koncentrációjának időbeni változása, valamint a kinetikai görbék illesztése a kísérleti úton meghatározott pontokra (CNPG₇: +, CNPG₄: ■, CNPG₃: ◆, CNPG₂: ●, CNPG: ▲).

A CNPG₈ bontása során a CNPG₇ hidrolíziséhez hasonló tendenciát tapasztaltam. Ebben az esetben is három elsődleges hidrolitikus redukáló végi termék keletkezett: CNPG₂, CNPG₃ és CNPG₄. A CNPG₄ másodlagos hidrolízisét ez esetben is figyelembe kellett venni (14-19. egyenletek).

$$\frac{d[S_8]}{dt} = -k_{84}[S_8] - k_{83}[S_8] - k_{82}[S_8] \quad (15)$$

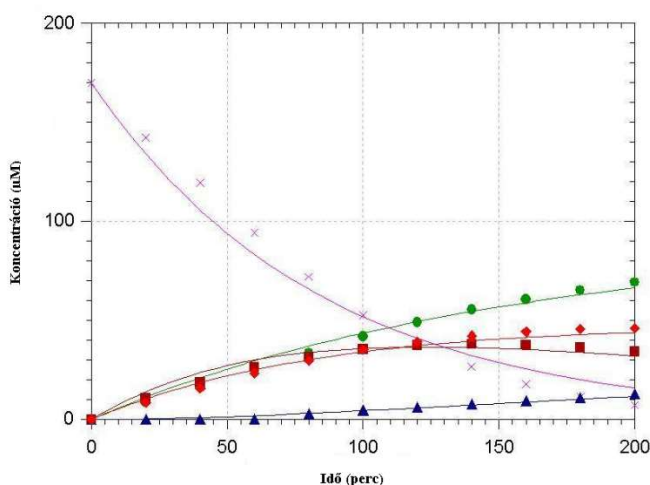
$$\frac{d[S_4]}{dt} = k_{84}[S_8] - k_{43}[S_4] - k_{42}[S_4] - k_{41}[S_4] \quad (16)$$

$$\frac{d[S_3]}{dt} = k_{83}[S_8] + k_{43}[S_4] \quad (17)$$

$$\frac{d[S_2]}{dt} = k_{82}[S_8] + k_{42}[S_4] \quad (18)$$

$$\frac{d[S]}{dt} = k_{41}[S_4] \quad (19)$$

A CNPG₈ bontási eredményeinél is figyelembe kellett venni azt is, hogy a CNPG₂ és G3 keletkezhet CNPG₈ bontása során, valamint keletkezhet CNPG₄-ből is. A CNPG₄ mennyisége a reakció során elért egy maximális értéket, majd csökkent (34. ábra).



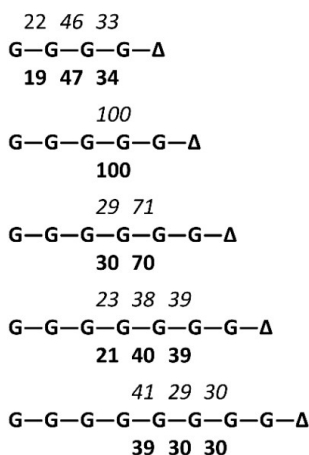
34. ábra: A CNPG₈ bontási kép vizsgálata során kiindulási szubsztrát és a termékek koncentrációjának időbeni változása, valamint a kinetikai görbék illesztése a kísérleti úton meghatározott pontokra (CNPG₈: X, CNPG₄: ■, CNPG₃: ◆, CNPG₂: ●, CNPG: ▲).

A kinetikai görbék illesztésével kapott reakciósebességi állandók értékét a 12. táblázatba gyűjtöttem.

12. táblázat: Az LDAm_y katalizált hidrolitikus reakció sebességi állandóinak értéke a különböző CNP-maltooligoszacharid szubsztrátok esetében.

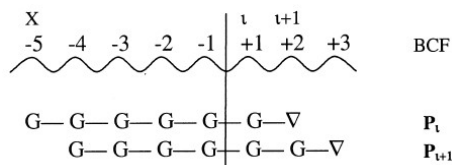
Paraméter	Reakciósebességi állandó (s ⁻¹)				
	CNPG ₈	CNPG ₇	CNPG ₆	CNPG ₅	CNPG ₄
k ₈₄	8,17*10 ⁻⁵				
k ₈₃	5,70*10 ⁻⁵				
k ₈₂	5,93*10 ⁻⁵				
k ₇₄		1,20*10 ⁻⁴			
k ₇₃		1,99*10 ⁻⁴			
k ₇₂		2,00*10 ⁻⁴			
k ₆₃			1,23*10 ⁻⁴		
k ₆₂			2,89*10 ⁻⁴		
k ₅₂				2,92*10 ⁻⁴	
k ₄₃	1,18*10 ⁻⁵	1,67*10 ⁻⁵			8,22*10 ⁻⁵
k ₄₂	5,71*10 ⁻⁵	1,35*10 ⁻⁴			1,70*10 ⁻⁴
k ₄₁	1,99*10 ⁻⁵	1,27*10 ⁻⁵			1,21*10 ⁻⁴
k ₃₁	1,26*10 ⁻⁵	4,57*10 ⁻⁵			8,40*10 ⁻⁵
Σk	1,98*10 ⁻⁴	5,18*10 ⁻⁴	4,12*10 ⁻⁴	2,92*10 ⁻⁴	3,73*10 ⁻⁴

Az első párhuzamos lépések kinetikai állandóinak aránya jó egyezésben van a kötés hasítási frekvenciáival (35. ábra), ami azt mutatja, hogy feltételezett modellünk megfelelő módon írja le a hidrolízis folyamatát. A CNPG₄ termék szekunder hidrolíziséhez és a CNPG₄ szubsztrát primer hidrolíziséhez kiszámított kinetikai konstansok egymástól eltérnek, de a szimmetrikus hasítást, amely redukáló és nem redukáló végből dimer termékeket eredményezett, minden esetben hasonlóan előnyben részesítették.



35. ábra: A kötés hasítási frekvenciái (alsó, félkövér) és a reakciósebesség-állandók aránya (felső, dőlt) a CNP-maltooligomerek kinetikai görbéiből számítva (ahol Δ jelöli a CNP csoportot).

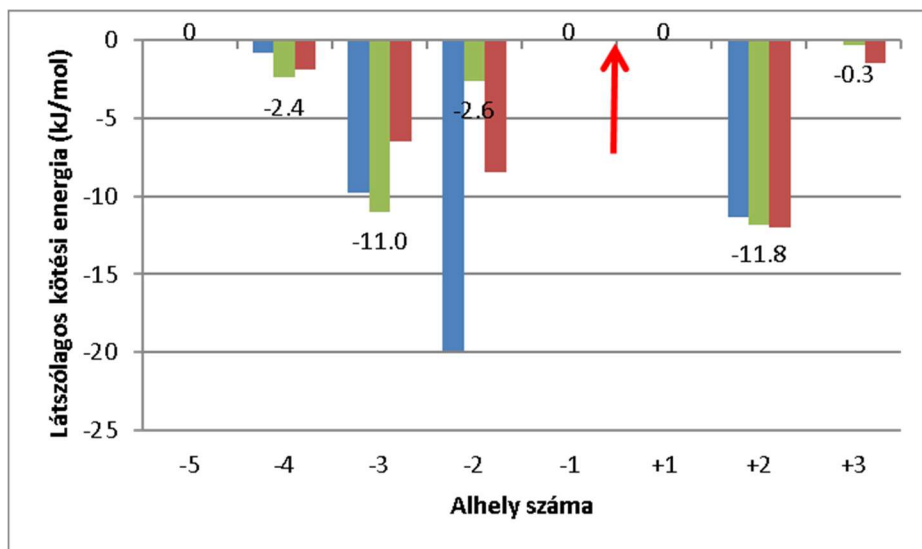
Az alhely térkép meghatározásához a 36. ábrán található egyenletet használtam a szoftveres kiértékelés során kapott kötéshasítási frekvencia értékek felhasználásával, ahol a ΔG_{i+1} az $i+1$ alhely kötési energiája, G_x az x alhely kötési energiája, P_i és P_{i+1} a termékek kötés hasítási frekvenciái, amelyek abban a kötési módban keletkeztek, amiben a szubsztrát redukáló vége az i vagy az $i+1$ alhelyhez kötődött.



$$\Delta G_{i+1} + \Delta G_x = -RT * \ln \frac{P_i}{P_{i+1}}$$

36. ábra: Az α -amilázok működésének ábrázolása, a glikon (-) és aglikon (+) kötőhelyek jelölése a Davies nomenklatúra alapján és alhely energiák számításához használt egyenlet (G: glükóz egység, ∇ : kromofor csoport)

Az elsődlegesen számolt kötőhely energiák iterációjával megkerestem a legmegfelelőbb értékeket a mért és az újra számolt kötőhasítási frekvenciák alapján a SUMA program segítségével [58]. A kötőhelyeket a Davies féle nomenklatúra alapján jelöltem, ahol a hasítási helytől az alhelyek a nem redukáló vég felé negatív, a redukáló vég felé pedig pozitív előjelet kaptak [44]. Az LDAmY alhely térképét összehasonlítottam a HSA [63] és a HSA [65] alhely térképével (37. ábra). A +1, +2 és +3 alhelyek teljes egyezést mutatnak, inkább a glikon alhelyek esetében látható eltérés. A HSA és a PPA esetében monoton csökken a kötési energia a hasító helytől távolodva, míg az LDAmY esetében nem ez a tendencia.



37. ábra: Az LDAmY (zöld), a HSA (kék) és a PPA (piros) alhely térképe. A számok az LDAmY látszólagos kötési energiáinak értékei, a piros nyíl a hidrolízis helyét jelöli.

Ezek különbségek az aminosav szekvencia különbségéből adódnak. Hogy megtaláljam ezeket a különbségeket, az általam vizsgált enzimet összehasonlítottam a HSA, a PPA és a közönséges lisztbogár α -amiláz (TMA) aminosav szekvenciájával a CLUSTAL program segítségével. A kötőhelyek

környezetében levő aminosav szekvencia különbségeket (melyeket félkövér betűvel jelöltem) a 13. táblázatban mutatom be.

13. táblázat: Az LDAmY, a HSA, a PPA és a TMA azon aminosavai, amelyek részt vesznek a szubsztrát kötődésében

Alhely	Aminosav ^a (és a pozíciója a HSA-ban)			
	<i>HSA</i> ^b	LDAmY	PPA	TMA
-4	Asp147	Thr147	Gly147	Glu147
	Asn105	Gln105	Ser105^c	Met105
-3	Ser163	Val163	Val163	Val163
	Gln63	Gln63	Gln63	Gln63
	Asp356	Asp356	Asp356	Asp356
-2	Trp58	Trp58	Trp58	Trp58
	Trp59	Trp59	Trp59	Trp59
	Tyr62	Tyr62	Tyr62	Tyr62
	His305	Asp305	His305	Gly305
-1	His101	Asp101	His101	His101
	Arg195	Arg195	Arg195	Arg195
	<i>Asp197</i>	<i>Asp197</i>	<i>Asp197</i>	<i>Asp197</i>
	His299	His299	His299	His299
	Asp300	Asp300	Asp300	Asp300
+1	His201	His201	His201	His201
	<i>Glu233</i>	<i>Glu233</i>	<i>Glu233</i>	<i>Glu233</i>
	Ile235	Ile235	Ile235	Ile235
+2	Tyr151	Tyr151	Tyr151	Tyr151
	Lys200	Lys200	Lys200	Lys200
	Glu240	Glu240	Glu240	Glu240

^a A számozás az I SMD HSA szekvencia alapján történt

^b Az aminosav pozíciója a HSA aktív helyén [104]

^c Az aminosav pozíciója a PPA aktív helyén [105]

A katalitikus aminosavak, valamint az aglikon kötőhelyek aminosavai nem mutatnak különbséget, ezzel összhangban a kötési energiák is szinte azonosak. A burgonyabogár eredetű alfa-amiláz -4 alhelyén egy OH-tartalmú treonin foglal helyet, szemben a HSA-val, ahol egy negatív töltésű aszparaginsav oldallánc található. Ez a különbség kis energia változásként jelenik meg az alhely térképén. A -3 kötőhelynél az alhely térkép szerint sincsenek túl nagy

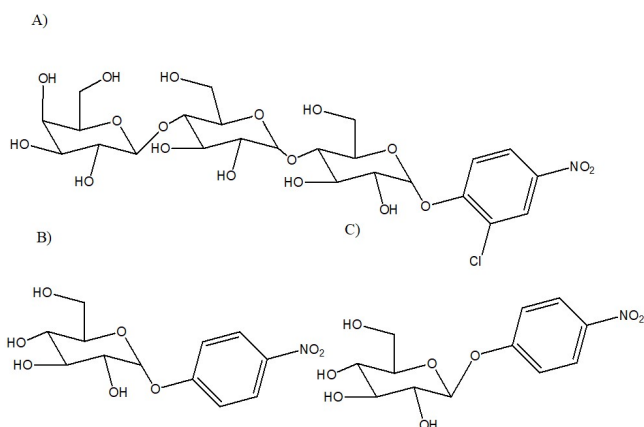
eltérések. Látható, hogy a HSA szerin oldalláncot tartalmaz, míg ebben a pozícióban LDAm_y valint, egy apoláris aminosavat. A legnagyobb különbség a -2 alhely kötési energiájában van, ahol a HSA bázikus hisztidinje helyett az LDAm_yban negatív töltésű aszparaginsav oldallánc található. Ez magyarázza a drasztikus különbséget az erre az alhelyre számolt energiákban. Világossá vált, hogy az LDAm_y és a TMA között szekvenciakülönbségek vannak, és a TMA esetében nagyobb a szekvencia hasonlóság a HSA-val és a PPA-val az aktív hely környezetében.

5. Felhasznált eszközök és módszerek

A burgonyabogár lárvákat és imágókat a Debreceni Egyetem Mezőgazdaság-Élelmiszertudomány és Környezetgazdálkodási Kar Növényvédelmi Intézetének munkatársai gyűjtötték be. A rovar emésztőszervét kipreparálták, majd 250, illetve 500 μ l fiziológiás sóoldatba (0,9% NaCl) helyezték. A bél kivonatot tartalmazó oldatot ezután 30 másodpercig vortexelték, majd öt percig centrifugálták 1000 g-vel 5 °C hőmérsékleten. A felülúszót elválasztották és a vizsgálatokig -20, illetve -80 °C hőmérsékleten tárolták.

5.1. Enzimaktivitás mérése spektrofotometriás módszerrel

A rovarbél extraktumban lévő α -amiláz, α - és β -glükózidáz aktivitásmérését Jasco V-550 spektrofotométerrel valósítottam meg. Szubsztrátként 5 mM koncentrációjú 2-klór-4-nitrofenil-4-*O*- β -D-galaktopiranozilmaltozidot (GalG₂CNP, SORACHIM SA), p-nitrofenil- α - (Sigma-Aldrich) és β -D-glükopiranozidot (Sigma-Aldrich) (38. ábra) használtam, melyet 50 mM 2-(N-morfolino)-etánszulfonsav (MES, (Sigma-Aldrich), 5 mM kalcium-acetát (Reanal), 51,5 mM nátrium-klorid (Molar) és 152 mM nátrium-azid (Sigma-Aldrich) tartalmú pufferben oldottam (pH6) [94, 95].



38. ábra: A rovarbél extraktum enzim aktivitásának méréséhez alkalmazott szubsztrátok szerkezete: A) GalG₂CNP B) p-nitrofenil-α-D-glükopiranozid C) p-nitrofenil-β-D-glükopiranozid.

A pH beállításához 0,1 M koncentrációra hígított sósavat (Sigma-Aldrich), ill. 0,1 M nátrium-hidroxid (Reanal) oldatot használtam.

A szubsztrátok spektrofotometriával detektálható hidrolitikus termékei a 2-klór-4-nitrofenol, illetve a p-nitrofenol. Ezek elnyelési maximuma 400 nm, ezért a méréseket ezen a hullámhosszon valósítottam meg.

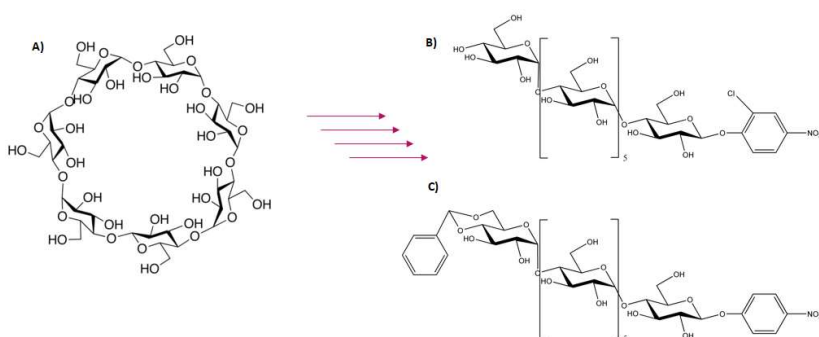
A rovarbél extraktum esetében a reakció elegyeket a következő módon állítottam össze: 200 µl szubsztrát tartalmú MES puffer, 290 µl MES puffer és 10 µl rovarbél extraktum. A reakcióelegyet 5 percreg inkubáltam a mikroküvetében, majd mértem az abszorbancia változását. A mérési idő minden esetben 3 perc volt.

A rovarbél eredetű α-amiláz pH függésének vizsgálatához a pufferoldatok pH-ját rendre 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 6,6; 7 és 8 értékre állítottam be. A hőmérséklet a mérések során 37 °C volt.

A termostabilitás vizsgálatához a reakcióelegyek pH-ját 6 értékre állítottam és követtem az α-amiláz aktivitását. A kísérleteket 20, 25, 30, 38, 45, 50, 55, 65 és 70 °C hőmérsékleteken hajtottam végre.

5.2. Rovarbél extraktum bontási képének meghatározása HPLC módszerrel

Az LDAmY bontási képének, valamint transzglylikozidáz aktivitásának vizsgálatát folyadékkromatográfiás módszerrel valósítottam meg, melyhez Agilent 1260 infinity II (kvaterner pumpa, automata injektor, diódasoros detektor) HPLC rendszer állt rendelkezésemre, amihez egy ESA Corona CAD detektor volt csatolva. A mérések kivitelezéséhez a következő vegyszereket használtam fel: acetonitril (Sigma-Aldrich), metanol ((Sigma-Aldrich), trietilamin (Merck) és HPLC tisztaságú víz, melyet MilliQ víztisztító rendszerrel tisztítottam. A bontási kép vizsgálatokhoz használt hét glükóz egységet tartalmazó maltoligoszacharid szubsztrátokat, a 2-klór-4-nitrofenil- β -D-maltoheptaozidot (CNPG₇) és a benzilidén-2-(4-nitrofenil- β -D)-maltoheptaozidot (BnlG₇PNP) Farkas és munkatársai állították elő β -ciklodextrin acetolitikus gyűrűnyitásával, majd származékképzésével (39. ábra) [106].



39. ábra: Az LDAmY bontási kép vizsgálatai során használt CNPG₇ (B) és BnlG₇PNP (C) szerkezete, melyet β -ciklodextrinből (A) állítottak elő [106]

A bontási vizsgálatokhoz felhasznált rövidebb tagszámú kromofor csoportot tartalmazó maltooligoszacharid szubsztrátok a maltoheptaozidok

szintézise során melléktermékként keletkeztek, melyeket tisztított formában használtam fel.

A tisztítatlan rovarbél extraktum bontási kép vizsgálatának első lépésében a CNPG₇ szubsztrát hidrolitikus bontását vizsgáltam. A reakcióelegy 1 mg CNPG₇-t tartalmazott 1ml azid mentes MES pufferben (50 mM MES, 5 mM Ca(OAc)₂, 51,5 mM NaCl (pH6,0). A hidrolitikus reakciót 5 µl rovar emésztőnedv hozzáadásával indítottam. A kiindulási szubsztrát és a termékek elválasztásához az alábbi kromatográfiás módszert használtam:

- Oszlop: Accucore-aQ (150x2,1 mm, 2,6 µm, Thermo)
- Előtét oszlop: Security Guard Cartridge C₁₈ (4x3,0 mm)
- Áramlási sebesség: 0,4 ml/perc
- Inj. térfogat: 5 µl
- Kolonnatér: 30 °C
- Mintatér: 30 °C
- Eluens: ACN:Víz 7:93 (V/V)%
- Detektálási hullámhossz: 302 nm

A BnlG_nPNP szubsztrátok esetében a két védőcsoport jelentősen megnöveli a maltooligoszacharid származék apolaritását, ezért a kromatográfiás módszer módosítása szükségessé vált. A kiindulási szubsztrát mellett megjelennek a PNP-maltooligoszacharid termékek, melyeknek kevésbé apolárisak, mint az azonos tagszámú CNP-oligomerek, valamint a nem redukáló végi benzilidén védőcsoportot tartalmazó termékek, melyeknek eltérő a detektálási hullámhossza. A módszerben tett változtatások az alábbiak voltak:

- Eluens:
 - A: víz
 - B: Acetonitril

t (perc)	B %(V/V)
0	5
4	5
5	7
13,5	7
14	30
30	30

- Detektálási hullámhossz: 200 és 302 nm

5.3. Az LDAm_y tisztítása

Az LDAm_y tisztítási módszer kidolgozásához 1 mg/ml PPA oldatot használtam. Az affinitás kromatográfiás állófázist az alábbi lépésekben állítottam elő [97]:

1. 2 g vízzoldható keményítőt oldottam 1,2 ml 5 M koncentrációjú nátrium-hidroxid oldatban, melyhez 1,2 ml vizet és 0,8 ml epiklórhidrint adtam
2. 10 perc melegítés 90 °C hőmérsékleten vízfürdőben
3. 1 éjszakás inkubáció szobahőmérsékleten
4. Porítás dörzsmozsárban
5. Vízzel, majd felviteli pufferrel történő mosás (1 M acetát puffer, mely 1 M ammónium-szulfátot tartalmaz (pH5,2))
6. Oszlop töltése és további mosás a felviteli pufferrel

A keményítő állófázis stabilitásának vizsgálatához különböző koncentrációjú PPA oldatokat készítettem, melyek koncentráció értéke rendre 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125; 0,1563; 0,0781; 0,0391; 0,0195 és 0,0098 mg/ml volt. A sorozat a felviteli pufferben volt oldva. Ezen oldatok 1 ml térfogatú

részletébe 0,1 g keményítőgél helyeztem. A mintákat 5 napig inkubáltam szobahőmérsékleten. A keményítőgél hidrolízisét vékonyrétegekromatográfiás (TLC) módszerrel követtem. Az elválasztást Whatmann típusú szilikagélen hajtottam végre. Az eluens összetétele a következő volt: butanol:etanol:víz:ecetsav – 10:6:3:0,4. A minták állapotát 24 óránként vizsgáltam. A pH függés vizsgálatát a felviteli puffer pH-ját 4; 6; 7 és 8 értékre állítottam be. A PPA pH optimuma 6,9 [107], tehát ennek közelében várható a legintenzívebb keményítő bontás. A mintákban a PPA koncentrációja minden esetben 2,5 mg/ml volt. A TLC vizsgálatokat hét nap inkubációt hatottam végre.

Az affinitás kromatográfiás elválasztást először 1 mg/ml PPA oldatával kíséreltem meg, melyből 200 µl részletet injektáltam az állófázisra. Az elválasztás alatt 1 ml térfogatú frakciókat gyűjtöttem. Az összes enzim koncentrációt a frakciókban 280 nm hullámhosszon követtem spektrofotometriával. A frakciók α -amiláz aktivitását a rovarbél extraktum vizsgálatakor alkalmazott módszerrel azonos módon határoztam meg. Kobayashi és munkatársai elúciós pufferként 1 M acetát puffert (pH5,2) ajánlanak [98], azonban az amiláz aktivitást vizsgálva a kromatográfia ideje nagyon hosszú, a célenzim hosszú, elnyújtott frakcióban érkezik. Ennek a kiküszöbölése érdekében az elúciós pufferhez 10 mg/ml maltózt adtam az α -amiláz állófázisról való leszorítása érdekében. A felviteli pufferrel addig mostam a rendszert, míg az összes fehérje koncentráció lecsökkent a frakciókban, ezután az elúciós pufferrel visszanyertem a célfehérjét tiszta állapotban. A kromatográfiás eljárás finomítását követően megkíséreltem az LDAmylelválasztását a rovarbél extraktumból. A fiziológiás sóoldatban lévő extraktum 5 ml részletét 30K ultraszűrővel 5 °C hőmérsékleten és 10000 g-n töményítettem és ennek a mintának 200 µl részletét injektáltam a keményítőgél tartalmú oszlopra.

A burgonyabogár α -amiláz tisztaságát SDS-PAGE módszerrel ellenőriztem, a Laemmli által leírt módon [108]. Az SDS-PAGE 8% elválasztó gélt és 4% tömörítő gélt tartalmazott. A tisztított enzimhez futtató puffert adtak, illetve 5% β -merkaptóetanolt, majd 5 percen keresztül forralták. A molekulatömeg markereket a Bio-Rad Laboratories-től szerezték be. A detektáláshoz 0,25%-os Coomassie blue R-250 festék metanol-ecetsav-desztillált víz 3:1:6 arányú elegyét alkalmazták, majd a mosást pedig szintén metanol-ecetsav-desztillált víz eleggyel végezték.

5.4. Az LDAm_y szintézis irányú reakciójának vizsgálata

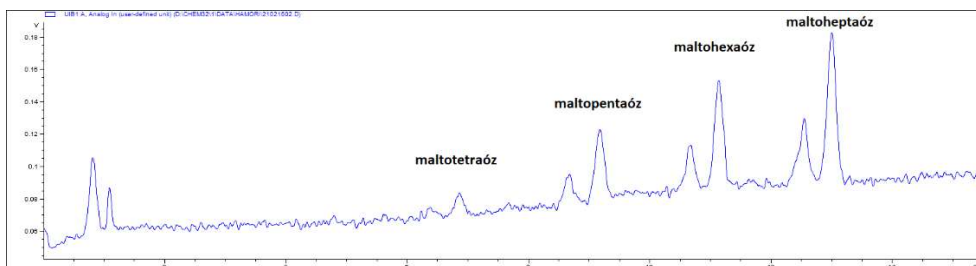
Az LDAm_y szintézis irányú reakcióját CNP- β -D-glükopiranozid, PNP- β -D-galaktopiranozid (Sigma-Aldrich), PNP- β -D-mannopiranozid (Sigma-Aldrich), PNP- β -D-glükozaminid (Sigma-Aldrich) és PNP- β -D-xilopiranozid (Sigma-Aldrich) akceptorok, valamint vízzoldható keményítő (Sigma-Aldrich), glükóz (Sigma-Aldrich), maltóz, maltotrióz (Sigma-Aldrich) és egy maltooligoszacharid keverék donorok jelenlétében valósítottam meg. A maltooligoszacharid keverék minőségi vizsgálatát hidrofíl kölcsönhatási folyadékkromatográfiás módszerrel valósítottam meg CAD (Charged Aerosol Detector) detektálással:

- Oszlop: Acquity BEH amide (150*2,1mm, 1,7 μ m, Waters)
- Áramlási sebesség: 0,3 ml/perc
- Kolonnatér hőmérséklete: 60 °C
- Mintatér hőmérséklete: 30 °C
- Eluens összetétel:
 - A: 0,2% trietilamint tartalmazó víz
 - B: Acetonitril

Idő (perc)	B (V/V)%
0	30
10	40

- Injektált térfogat: 5 µl
- Detektor érzékenysége: 100 pA
- Mérési idő: 20 perc

Az injektált 1 mg/ml koncentrációjú maltooligoszacharid keverék (G5-G7) maltopentaózt, maltohexaózt és maltoheptaózt tartalmazott. Emellett detektálható volt kis mennyiségű maltotetraóz is (40. ábra). A maltooligoszacharid sorozat minőségi azonosítását 1,23 mg/ml koncentrációjú maltohexaóz standard (Sigma-Aldrich) injektálásával végeztem.



40. ábra: A G5-G7 keverék komponenseinek elválasztása során kapott kromatogram hidrofíli kölcsönhatási folyadékkromatográfiával CAD detektálással. A kromatográfiás körülmények között az α és β anomerek elváltak egymástól, ezért a maltooligomerek dupla csúcsként jelentek meg.

Az azonosításhoz használt maltohexaóz standard koncentrációja a csúcsterülete 2710,7. A csúcsterületek alapján kiszámoltam a keverék komponenseinek a koncentrációját, melyet a 14. táblázatban foglaltam össze.

14. táblázat: A G5-G7 keverék komponenseinek csúcsterülete és koncentrációja

Komponens	Csúcsterület	Koncentráció (mg/ml)
G4	119,8	0,05
G5	450,7	0,20
G6	615,7	0,28
G7	965,9	0,44

A kapott koncentráció értékek csak megközelítők, a pontos koncentráció meghatározásához minden komponens esetében kalibrációt kellene végrehajtani.

Az LDAmY szintézis irányú reakcióját a tisztított enzim bontási kép vizsgálatához használt kromatográfiás módszerrel követtem. Első lépésben keményítő és CNPG tartalmú oldatban vizsgáltam a kromofor tartalmú malooligoszacharid termékek keletkezését. Ehhez keményítóből azid-mentes MES pufferben 1%-os oldatot készítettem, majd 2,2 μm pórusméretű membránnal szűrtem, melynek térfogata 1 ml volt. Két különböző reakcióelegyet készítettem. Az első esetben a mintaoldat keményítőtartalmát 1 nap inkubációval előemésztettem 1 μl 18 μM koncentrációjú LDAmY hozzáadásával és a 10 mM akceptort ezután adtam hozzá. A másik mintaoldat esetében előemésztés nélkül indítottam a reakciót.

A donor molekulák vizsgálatához 10 mM glükózt, 10 és 25 mM maltózt, 25 mM maltotriózt és 10 mg/ml G5-G7 keveréket oldottam 10 mM CNPG tartalmú 1 ml térfogatú azidmentes MES pufferben. A reakciót minden esetben 1 μl 18 μM koncentrációjú LDAmY oldatának hozzáadásával indítottam.

A transzglikozilezési reakció pH optimumának meghatározásához azidmentes MES oldatot használtam, melyek pH-ját 4, 5, 6, 7 és 8 értékre állítottam. A reakcióelegyetek úgy állítottam össze, hogy a különböző pH értékű oldatok térfogata 1 ml legyen és 10 mg/ml G₅-G₇ keveréket, valamint 10 mM CNPG-t tartalmazzon.

A szintézis irányú reakció szerves oldószer tartalom hatásának vizsgálatához olyan mintákat állítottam össze, amelyek 10 mg/ml G₅-G₇ elegyet és 10 mM CNPG donort tartalmaztak, oldószerként pedig azid-mentes MES puffert (pH6) és acetonitrilt (ACN) alkalmaztam, melyek végső térfogata 1 ml volt és ahol az összetételek rendre a következők voltak: 100 (V/V)% pufferoldat, 95 (V/V)% pufferoldat és 5 (V/V)% ACN, 90 (V/V)% pufferoldat és 10 (V/V)% ACN, 85 (V/V)% pufferoldat és 15 (V/V)% ACN, 80 (V/V)% pufferoldat és 20 (V/V)% ACN, 75 (V/V)% pufferoldat és 25 (V/V)% ACN. A fémionok hatásának vizsgálatához felhasznált fém sók a következők voltak: CuSO₄·5H₂O (Reanal), FeSO₄·7H₂O (Reanal), MnCl₂·4H₂O (Sigma-Aldrich), Zn(AcO)₂·2H₂O (Sigma-Aldrich). Ehhez, 1 ml mintákat készítettem elő úgy, hogy 700 µl pH6 értékű azid mentes MES puffert és 200 µl ACN-t tartalmazzon. Ezekhez a rendszerekhez adtam a különböző mennyiségű és minőségű fémionok azid mentes MES pufferben oldott 100 µl térfogatú részletét, melyben a fémion tartalmú puffer hozzáadása után a G₅-G₇ keverék 10 mg/ml és a CNPG 10 mM koncentrációjú volt.

A kísérletek első részében a használni kívánt sókat úgy mértem ki, hogy az adott fémionok az oldat sorozatban a következő vég koncentrációban legyenek jelen:

- $c_{\text{Cu(II)}} = 340 \mu\text{M}$
- $c_{\text{Fe(II)}} = 280 \mu\text{M}$
- $c_{\text{Zn(II)}} = 590 \mu\text{M}$
- $c_{\text{Mn(II)}} = 180 \mu\text{M}$

A fémion vizsgálatok következő részében a mintákat úgy állítottam össze, hogy azok 790 μ l azid-mentes MES puffert és 10 μ l fémion tartalmú azid-mentes MES puffert tartalmazzanak. Az így készült minták fémion koncentrációja a következő volt:

- $c_{\text{Cu(II)}} = 34 \mu\text{M}$
- $c_{\text{Fe(II)}} = 28 \mu\text{M}$
- $c_{\text{Zn(II)}} = 59 \mu\text{M}$
- $c_{\text{Mn(II)}} = 18 \mu\text{M}$

A szalicin akceptor molekulaként való viselkedésének vizsgálatához 1 ml mintákat készítettem elő úgy, hogy 800 μ l pH6 értékű azid-mentes MES puffert és 200 μ l ACN 10 mM szalicint és 10 mg/ml G₅-G₇ elegyet tartalmazzon. A vizsgálatokhoz használt folyadékkromatográfiás módszer a következő volt:

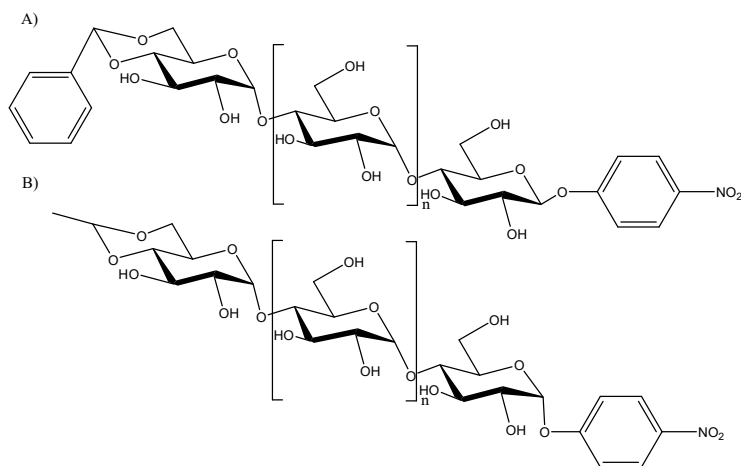
- Oszlop: Zorbax SB-Aq (150*4,6mm, 5 μ m, Agilent)
- Áramlási sebesség: 1 ml/perc
- Kolonnatér hőmérséklete: 40 °C
- Mintatér hőmérséklete: 30 °C
- Eluens összetétel:
 - Metanol: 2 (V/V)%
 - Víz: 98 (V/V)%
- Injektált térfogat: 5 μ l
- Detektálási hullámhossz: 270 és 210 nm
- Mérés idő: 20 perc

A PNP- β -D-mannopiranozid tartalmú reakcióelegyben keletkező termékek „preparatív” elválasztásához a következő kromatográfiás módszert használtam:

- Oszlop: Supelcosil LC-18 (250*4,6mm, 5 μ m, Supelco)
- Áramlási sebesség: 1,5 ml/perc
- Kolonnatér hőmérséklete: 40 °C
- Eluens összetétel:
 - Acetonitril: 10 (V/V)%
 - Víz: 90 (V/V)%
- Injektált térfogat: 25 μ l
- Detektálási hullámhossz: 302 nm

A kiindulási szubsztrát és a termékek elválasztásához az alábbi folyadékkromatográfiás módszert alkalmaztam:

A nem redukáló végi védőcsoport minőségének a transzglykozilezési reakcióra való hatását BnlG₇PNP és etilidén-4-nitrofenil- α -D-maltoheptaoid (Et-4-G₇-NP, SORACHIM,) szubsztrátokon vizsgáltam (41. ábra).



41. ábra: A BnlG₇PNP (A) és az Et-4-G₇-NP (B) szubsztrátok szerkezetének összehasonítása

A reakcióelegyek 1 ml térfogatú azid mentes MES puffer:ACN 8:2 elegyben oldott 5 mM szubsztrát volt. A reakciókat 1 μ l 8 μ M koncentrációjú LDAmY

oldat hozzáadásával indítottam. A reakció követéséhez alkalmazott folyadékkromatográfiás körülmények a következők voltak:

- Oszlop: Zorbax SB-Aq (150*4,6mm, 5 µm, Agilent)
- Áramlási sebesség: 1 ml/perc
- Kolonnatér hőmérséklete: 40 °C
- Mintatér hőmérséklete: 30 °C
- Eluens A: acetonitril, eluens B: víz

Idő (perc)	A (V/V)%
0	5
11	15
20	18

- Injektált térfogat: 1 µl
- Detektálási hullámhossz: 200 és 302 nm
- Mérés idő: 30 perc
- Ekvilibrációs idő: 5 perc

5.5. Az LDAm_y bontási képének meghatározása HPLC módszerrel

A tisztított LDAm_y bontási képének vizsgálatát CNPG_n (n=4-8) szubsztrátokon hatottam végre. A reakcióelegyek minden esetben ~100 µM szubsztrátot tartalmazott 1 ml azid-mentes MES pufferben. Az enzim reakció indítása minden esetben 1 µl 18 µM koncentrációjú LDAm_y oldattal volt indítva. A vizsgálatokhoz használt folyadékkromatográfiás módszer a következő volt:

- Oszlop: Venusil AQ_C18 (150*4,6mm, 3 µm, Agela)
- Áramlási sebesség: 0,6 ml/perc

- Kolonnatér hőmérséklete: 40 °C
- Mintatér hőmérséklete: 30 °C
- Eluens összetétel:
 - Acetonitril: 18 (V/V)%
 - Víz: 82 (V/V)%
- Injektált térfogat: 5 µl
- Detektálási hullámhossz: 302 nm
- Mérés idő: 20 perc

6. Összefoglalás

A doktori munkámban a burgonyabogár szénhidrát emésztésének megismerését, ezen belül a rovarbél eredetű α -amiláz bontási képének vizsgálatát, valamint aktív centrum szerkezetének meghatározását tűztem ki célul. A rovarbél extraktum spektrofotometriás aktivitás vizsgálata során azon szénhidrátbontó enzimek jelenlétét igazoltam különböző kromofor csoportot tartalmazó szubsztrátok segítségével, melyek a glükóz egységekből felépülő összetett cukrok bontását végzik, ezek: az α -amiláz, az α - és a β -glükozidáz. Ezek a glikoenzimek nagyságrendileg azonos aktivitással rendelkeznek a közép bél extraktumban.

Az enzim aktivitás vizsgálatokat követően meghatároztam a rovarbél extraktum bontási képét és összehasonlítottam a már korábban vizsgált, más szervezetből származó α -amilázok bontási képével (PPA, BLA, HSA, árpa AMY1 és AMY2). Első lépésben a redukáló végén kromofor csoporttal jelölt CNPG₇-t alkalmaztam szubsztrátként. Ebben az esetben a rovarbél extraktum bontási képe hasonlóságot mutatott a PPA bontási képével. Az alkalmazott szubsztrát esetében nem elhanyagolható, hogy a hasonló aktivitással rendelkező α -glükozidáznak is szubsztrátja, ami a reakció kezdetétől konszekutív módon bontja nem redukáló vég felől a kiindulási szubsztrátot és a termékeket is. A probléma kiküszöbölése érdekében olyan szubsztrátot is alkalmaztam, amely a nem redukáló vég felől benzilidén védőcsoportot tartalmaz. Igaz a redukáló vég felőli hidrolízis termékek ez esetben is szubsztrátjai α -glükozidáznak, de az elsődleges hidrolízis termékek kizárólag az α -amiláz termékei. A β -glükozidáz mindkét esetben csak az α -amiláz és az α -glükozidáz hidrolitikus hasítási reakció sorozataként keletkező CNP- β -D-glükopiranozid glikozidos kötésének bontására képes. A mindkét végén kromofor tartalmú maltoheptaózid esetében is arra a megállapításra jutottam,

hogy az LDAmY és a PPA bontási képe között hasonlóság van. A bontási reakciók vizsgálatát ezután végrehajtottam olyan 4-8 tagszámú maltooligoszacharid szubsztrátokon, melyek redukáló vége p-nitrofenil, a nem redukáló vége pedig benzilidén csoporttal voltak jelölve. A különböző szubsztrátok esetében a három enzim reakcióit együttesen kellett számításba venni, ez alapján készítettem el a kinetikai modellt. A feltételezett modellek alapján a reakciósebességeket leíró differenciálegyenletekkel végeztem el a kinetikai görbékre az illesztést. A kapott eredmények azt mutatták, hogy a három enzimnek nagyságrendileg azonos a reakciósebessége az egyes szubsztrátok, illetve a belőlük keletkező termékek esetében. A hét tagú szubsztrátok vizsgálatakor kapott eredmények az LDAmY és a PPA aktív centrum szerkezete hasonlóságot mutatott, azonban a kisebb tagszámú szubsztrátok esetében a kötőhasítási frekvencia értékei jelentősen eltértek egymástól, tehát a két enzim aktív centruma mégis eltérhet egymástól. Emellett a 8 glükóz egység tartalmú maltooligoszacharid szubsztrát esetén megjelentek olyan új termékek, amelyek mindkét végén kromofor csoportot tartalmaztak, ami arra engedett következtetni, hogy a hidrolitikus reakciók mellett történt szintézis irányú reakció is.

Az LDAmY tisztítását affinitás kromatográfiás módszerrel végeztem saját készítésű keresztkötött keményítő gél alkalmazva állófázisként. Az elválasztást spektrofotometriás módszerrel követtem. A frakciók enzim aktivitás vizsgálatával bizonyítottam, hogy az LDAmY-t sikeresen elválasztottam és a tisztított fehérje oldat nem rendelkezik α - és β -glükozidáz aktivitással.

A rovarbél extraktum esetében a bontási vizsgálatok során megfigyelt szintézis irányú, illetve transzglikozilezési reakciók feltételezhetően az LDAmY transzferáz aktivitásának köszönhetőek. Ennek a fordított irányú reakciónak gyakorlati jelentősége lehet, mivel egy sztereoszelektív és

környezetbarát útvonalat biztosít az oligomerek szintéziséhez. Első lépésben vizsgáltam, hogy melyek azok a szubsztrátok, amelyek donor molekulaként játszhatnak szerepet a reakcióban. Az eredményeim alapján a legkisebb tagszámú cukor, amely donor molekulaként funkcionálhat a maltóz. A nagyobb tagszámú maltooligoszacharidok rendre részt vesznek a transzglykozilezési reakcióban, kivéve a maltotriózt, melynél nem volt megfigyelhető termék, emellett a jelenléte gátolja a többi donor molekula esetén is a termék keletkezést. A megfelelő donor molekulák megállapítása után az enzim reakció pH optimumát határoztam meg, aminek az értéke szintézis irányban is pH6 maradt. Alacsonyabb pH 4 és 5 értéken a termékarány változása, valamint az összes termék mennyiségének minimális csökkenése volt megfigyelhető, míg a semleges és lúgos tartományban drasztikusan csökkent a termékek mennyisége. A szerves oldószer jelenléte jelentősen befolyásolja szintézis irányú reakció során keletkező termékek mennyiségét. Az eredmények alapján 20% acetonitril tartalom mellett a legnagyobb a szintézis/hidrolízis arány. Ha az acetonitril nagyobb mennyiségben van jelen, akkor az LDAmY aktivitása csökken. Az átmeneti fémionok csak kismértékű hatást gyakorolnak a reakcióra. 0,3-0,6 mM koncentráció tartományban a Cu^{2+} , Zn^{2+} és Fe^{2+} aktivitás csökkenést okoznak, míg kisebb koncentrációban a Cu^{2+} a szintézis míg a Zn^{2+} a hidrolízis reakciónak kedvez. A potenciális akceptor molekulák vizsgálata esetében a fémiont nem tartalmazó rendszerekben csak a CNP- β -D-glükopiranozid és a PNP- β -D-xilopiranozid alkalmazásával tapasztaltam termékek keletkezését. Vas(II), cink(II) és mangán(II) jelenlétében azonban a PNP- β -D-mannopiranozid is akceptor molekulaként viselkedik, de a szintézis lassú és nagyon kis mennyiségű kromofor csoportot tartalmazó termék keletkezik. A PNP- β -D-galaktopiranozid és a PNP- β -D-glükozaminid a szerkezetük miatt nem alkalmazhatók akceptor molekulaként.

A szintézis irányú reakció további vizsgálataiban a nem redukáló végi csoport minőségének hatását vizsgáltam. A mérési eredményeim alapján a nem redukáló végen etilidén és benzilidén csoportot tartalmazó maoltooligoszacharidok esetében is keletkeztek transzglikozilezett termékek, melyeket ESI-TOF tömegspektrometriával azonosítottam.

A következőkben a tisztított alfa-amiláz bontási képét határoztam meg. A méréseket és a kiértékelést öt különböző hosszúságú szubsztráton végeztem el, amelyek 4-8 cukoregységet tartalmaztak. A CNP-maltoheptaoid és a CNP-maltooktaoid már megfelelően hosszúak ahhoz, hogy olyan termékek keletkezzenek, melyek szintét szubsztrátjai az α -amiláznak, ezek másodlagos hidrolízisben vesznek részt. Ez a másodlagos hidrolízis azonos a CNP-maltotetraoid hidrolízise során kapott mechanizmussal. A kapott eredményekből kiszámítottam a kötés-hasítási frekvenciákat. A CNP-maltozid valamennyi szubsztrátból keletkezik, ez alapján a nem-redukáló végi fő termékek maltóz, maltotrióz és maltotetraóz. Ahogy nő a maoltooligoszacharid lánc hossza a maximális hasítási frekvencia mindig a tetramer keletkezéséhez köthető, így a CNPG₈ esetében a domináns termék a redukáló vég felől a CNP-maltotetraoid lesz.

A kötés-hasítási frekvencia értékek felhasználásával meghatároztam az LDAm_y alhely térképét. Az a LDAm_y a PPA és a HSA alhely térképének összehasonlítása során megállapítható volt, hogy bár az alhelyek száma megegyezik az energia különbségek a glikon kötő alhelyeknél jelentősek. Ezek eltérések a három enzim aminosav szekvencia különbségeivel magyarázhatók. Szekvencia összevetést végeztem az LDAm_y a HSA a PPA és a közönséges lisztbogár α -amiláz enzimekre. Az alhely térkép mutatta energia eltérések minden esetben köthetőek a szekvenciában megjelenő olykor jelentős polaritásbeli eltérésekhez. A burgonyabogár eredetű alfa-amiláz -4 alhelyén egy OH tartalmú treonint tartalmaz. Ezzel szemben a HSA-ban levő

aszparaginsav egy negatív töltésű oldalláncot tartalmaz, ami kis energia változásként jelenik meg az alhely térképen. A -3 kötőhelynél az alhely térkép szerint sincsenek túl nagy eltérések. A HSA szerin oldalláncot tartalmaz, míg ebben a pozícióban LDAm_y valint, egy apoláris aminosavat, hasonlóan a PPA és a TMA-hoz. A legnagyobb különbség a -2 alhely kötési energiájában van, ahol a HSA bázikus hisztidinje helyett az LDAm_y-ban negatív töltésű aszparaginsav oldallánc található. A kapott eredményeim a továbbiakban hasznos információt nyújtanak a burgonyabogár elleni védekezésben. Az aktív centrum szerkezetének ismeretében természetes inhibitorok kereshetők, ill. segítséget nyújt a szintetikus gátlószerek tervezésében és kifejlesztésében.

7. Summary

The goal of my doctoral thesis is the uncovering of Colorado potato beetle (CPB) carbohydrate digestion with emphasis on the action pattern and the structure of the active site of the CPB α -amylase (LDAmy). I have proved the presence of three glycosyl hydrolases (α -amylase, α - and β -glucosydase) in the insect gut extract, using chromogenic substrates for activity measurements by spectrophotometry. These enzymes have activity of the same order of magnitude in the gut extract. After the examination of enzyme activities, I determined the action pattern of gut extract and compared with the action pattern of human salivary- (HSA), porcine pancreas- (PPA), *Bacillus licheniformis*- (BLA) and barley α -amylases (Barley AMY1 and AMY2).

First of all, I used 2-chloro-4-nitrophenyl β -D-maltoheptaoside as a substrate. In this case the action pattern of gut extract was similar to action pattern of PPA. If CNPG₇ was applied as substrate the activity of α -glucosidase was not negligible since α -glucosidase also act on that substrate and products formed in consecutive reactions from the non-reducing end. I used a substrate, which contains a protecting group at the non-reducing end to avoid this problem. In this case the reducing end products are substrates of α -glucosidase too, but primary hydrolysis products belong only to α -amylase activity. The β -glucosidase can catalyze only the hydrolysis of CNP- β -D-glucopyranoside, which is the endproduct of the multistep hydrolysis catalyzed by α -amylase and α -glucosidase. In case of BnlG₇PNP substrate I concluded that there is a similarity between the action pattern of CPB gut extract and PPA.

Action pattern of the gut extract was examined with 4- to 8 -membered maltooligosaccharide substrates, which have chromophor groups on both ends. I created a kinetic model considering the hydrolysis reactions of all the

three enzymes kinetical curves were fitted according to the hypothetical model with the kinetical reaction rate constants describing differential equations. The reaction rates of the three enzymes were the same order of magnitude for these substrates. Despite of the action pattern of LDAm and the PPA showed similarity on the seven membered maltooligosaccharide substrates, the bond cleavage frequencies of shorter substrates showed significant differences therefore there should be differences between the active sites of these two enzymes. Moreover, in case of two chromophore containing maltooligomer octaose new products appeared, which contained chromophore groups on both ends. Based on this observation, I deduced that besides the hydrolysis synthetic reaction also occurred.

The LDAm was purified by affinity chromatography on a home-made cross-linked starch stationary phase. The separation was followed by UV-spectrophotometry. I successfully purified the LDAm and the purified enzyme did not contain glucosidases based on the measurement of enzymes activities of fractions.

The transglycosylation activity, which was observed in the gut extract was likely due to α -amylase. This reverse reaction has practical importance because of it provides a stereoselective and environmentally friendly way of carbohydrate synthesis. Firstly, I examined which substrates are suitable as donor molecules. The smallest oligosaccharide was the maltose, which may be a donor molecule in the synthetic reaction. The larger maltooligosaccharides participate in hydrolytic and transglycosylation reactions simultaneously, except the maltotriose, for which no products were formed and its presence decreased the amount of products generated from other donor molecules. pH 6.0. was found as optimum for transglycosylation reaction. At lower pH values - pH 4 and 5 - the change of product ratio and

minimal decrease of products amount was observed. At neutral and alkaline pH values the amount of products decreased.

The presence of organic solvent majorly affected the amount of products, which arise in the synthetic reaction, the highest the synthesis/hydrolysis ratio was achieved in presence of 20% acetonitrile. If acetonitrile concentration was higher than 20% the LDamy activity significantly decreased.

The transition metal ions have only a small effect on the reaction. In the concentration range of 0.3-0.6 mM, Cu^{2+} , Zn^{2+} and Fe^{2+} cause a decrease in activity, while at lower concentrations Cu^{2+} favors the synthesis while Zn^{2+} favors the hydrolysis reaction.

I examined which kind of chromogenic monosaccharides are potential acceptor molecules: In reactions systems, which did not contain metal ions products arised only from CNP- β -D-glucopyranoside and PNP- β -D-xilopyranoside. In the presence of iron(II), zinc(II) és manganese(II) PNP- β -D-mannopyranoside behaves as acceptor molecule, but the reaction is slow and very little amount chromogenic product arise. The PNP- β -D-galactopyranoside and the PNP- β -D-glucosaminide can not useable as acceptor molecules because of their structures.

In the further study of synthetic reaction I examined the effect of non-reducing end groups. My results show, that transfer products arised from maltoheptaosides containing both ethylidene or benzylidene groups on the non-reducing end. These products were identified by ESI-TOF mass spectrometry.

After that I determined the action pattern of purified α -amylase. The measurements and evaluations were performed on substrates, which contained 4-8 monosaccharide units. The CNP-maltoheptaoside and the CNP-maltooctaoside are properly long that arising products, which participate in

secondary hydrolysis. I calculated the values of bond cleavage frequency for all hydrolytic reactions. The CNP-maltoside arises from each of substrates, therefore the main non-reducing end products were maltose, maltotriose and maltotetraose. In the case of longer maltooligosaccharide chain the bond cleavage frequency always related to arises of tetramer product, therefore in case of CNPG₈ the main reducing end product was CNP-maltotetraoside. On the basis of bond cleavage frequency values I determined the subsite map of LDAm_y. There are significant differences between the subsite map of LDAm_y, PPA and HSA in the energies of negative subsites. These differences arise from the differences of amino acid sequences of enzymes. The differences in energies are in connection with significant differences of polarity of amino acids present in sequences of different amylases. A threonine is located at subsite -4 of the LDAm_y bearing OH group. HSA contains a negatively charged aspartate side chain, which resulted in a small energy difference between the subsite maps. For the subsite -3, the energy values of subsite maps do not show too large differences. It can be seen that HSA contains here a serine side chain, whereas LDAm_y contains apolar valine – similar than PPA and TMA. The largest difference is in the energy of subsite -2, where HSA contains a basic histidine while LDAm_y an acidic aspartate side chain.

My results can provide beneficial informations for defense against Colorado potato beetle. Understanding the structure of the active site is important for the search for natural inhibitors and can help in the design and development of synthetic inhibitors.

8. Felhasznált irodalom

- [1] IUBMB: Enzyme Nomenclature. Recommendations. San Diego: Academic Press; 1992.
- [2] B. Henrissat, G. Davies, 1997. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 7, 637-644. doi: 10.1016/S0959-440X(97)80072-3
- [3] M. Okuyama 2014. Function and Structure Studies of GH Family 31 and 97 α -Glycosidases. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75, 12, 2269–2277. doi: 10.1271/bbb.110610
- [4] <http://www.cazy.org> megtekintve: 2021. március 12.
- [5] D. E. Koshland 1953. Stereochemistry and mechanism of enzymatic reactions, *Biol. Rev.* 28, 416-436. doi: 10.1111/j.1469-185X.1953.tb01386.x
- [6] B. Henrissat 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J.* 280, 309-316. doi: 10.1042/bj2800309
- [7] <https://pdb101.rcsb.org/global-health/diabetes-mellitus/drugs/alpha-glucosidase-inhibitors/alpha-glucosidase>
- [8] S.D'Amico, C. Gerday, G. Feller 2000. Structural similarities and evolutionary relationships in chloride-dependent α -amylases. *Gene* 253, 95–105. doi: 10.1016/S0378-1119(00)00229-8
- [9] S. Janecek 1997. α -Amylase family: molecular biology and evolution, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 67, 67-97. doi: 10.1016/s0079-6107(97)00015-1
- [10] D. Philips 1966. The three-dimensional structure of an enzyme molecule, *Sci. Am.* 215, 78-90. doi: 10.1038/scientificamerican1166-78
- [11] E. C. Oerke 2006. Crop losses to pests, *J. Agric. Sci.* 144, 31-43. doi: 10.1017/S0021859605005708

- [12] J. L. Zettler, G. W. Cuperus, 1990. Pesticide resistance in *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) and *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae) in wheat. J. Econ. Entomol. 83, 1677–1681. doi: 10.1093/jee/83.5.1677 doi: 10.1093/jee/83.5.1677
- [13] J.L. Zettler 1991. Pesticide resistance in *Tribolium castaneum* and *Tribolium confusum* (Coleoptera, Tenebrionidae) from flour mills in the United States. J. Econ. Entomol. 84, 763–767. doi: 10.1093/jee/84.3.763
- [14] E. Donahay, D. Zalach, M. Rindner, 1992. Comparison of the sensitivity of the development stages of three strains of the red fourbeetle (Coleoptera: Tenebrionidae) to modified atmospheres. J. Econ.Entomol. 85, 1450–1452. doi: 10.1093/jee/85.4.1450
- [15] R. Jbilou, H. Amri, N. Bouayad, N. Ghailani, A. Ennabili, F. Sayah 2008. Insecticidal effects of extracts of seven plant species on larval development, alpha-amylase activity and offspring production of *Tribolium castaneum* (Herbst) (Insecta: Coleoptera: Tenebrionidae), Bioresour. Technol. 99 959-964. doi: 10.1016/j.biortech.2007.03.017
- [16] K. V. G. Lopes, L.B. Silva, A. P. Reis, R. N. C. Oliveira, M. G. A. Guedes 2010. Modified alpha-amylase activity among insecticide-resistant and -susceptible strains of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*, J. Insect Physiol. 56, 1050-1057. doi: 10.1016/j.jinsphys.2010.02.020
- [17] A. Valencia-Jiménez, J. W. Arboleda, A. L. Avila, M. F. Grossi-de-Sá 2008. Digestive alpha-amylases from *Tecia solanivora* larvae (Lepidoptera: Gelechiidae). Response to pH, temperature and plant amylase inhibitors, Bull. Entomol. Res. 98, 6, 575-9. doi: 10.1017/S0007485308005944
- [18] M. Nawaz, M. Taha, F. Qureshi, N. Ullah, M. Selvaraj, S. Shahzad, S. Chigurupati, A. Waheed, F. A. Almutairi 2020. Structural elucidation, molecular docking, α -amylase and α -glucosidase inhibition studies of 5-

amino-nicotinic acid derivatives, BMC Chem. 14, 43. doi: 10.1186/s13065-020-00695-1

[19] I. Ali, R. Rafique, K.M. Khan, S. Chigurupati, X. Ji, A. Wadood, A.U. Rehman, U. Salar, M.S. Iqbal, M. Taha, S. Perveen, B. Ali, 2020. Potent α -amylase inhibitors and radical (DPPH and ABTS) scavengers based on benzofuran-2-yl(phenyl)methanone derivatives: syntheses, in vitro, kinetics, and in silico studies, Bioorg. Chem. 104, 104238. doi: 10.1016/j.bioorg.2020.104238.

[20] W.R. Terra, C. Ferreira 2012. Biochemistry and molecular biology of digestion, in Gilbert, L. (Ed.) Insect Molecular Biology and Biochemistry. Cambridge, Massachusetts, USA: Academic Press., 366–418.

[21] Y. Horie, K. Watanabe 1983. Daily utilization and consumption of dry matter in food by silkworm *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae), Appl. Ent. Zool.; 18, 70-80. doi: 10.1303/aez.18.70

[22] J. E. Baker, 1983. Properties of amylases from midguts of larvae of *Sitophilus zeamais* and *Sitophilus granaries*, Insect Biochem. 13, 421-428. doi: 10.1016/0020-1790(83)90026-4

[23] M. F. Grossi de Sa, M. J. Chrispeels, 1997. Molecular cloning of bruchid (*Zabrotes subfasciatus*) α -amylase cDNA and interactions of the expressed enzyme with bean amylase inhibitors, Insect Biochem. Mol. Biol. 27, 271-281. doi: 10.1016/S0965-1748(96)00093-8

[24] E. Titarenko, M. J. Chrispeels, 2000. cDNA cloning, biochemical characterization and inhibition by plant inhibitors of the α -amylases of the Western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*, Insect Biochem. Mol. Biol. 30, 979-990. doi: 10.1016/S0965-1748(00)00071-0

[25] V. Buonocore, E. Poerio, V. Silano, M. Tomasi 1976. Physical and catalytic properties of α -amylase from *Tenebrio molitor* L. larvae, Biochem. J. 153, 621-625. doi: 10.1042/bj1530621

- [26] V. Nahoum, F. Farisei, V. Le-Berre-Anton, M. P. Egloff, P. Rougé, E. Poerio, F. Payan, 1999. A plant-seed inhibitor of two classes of α -amylases: X-ray analysis of *Tenebrio molitor* larvae α -amylase in complex with the bean *Phaseolus vulgaris* inhibitor, Acta Cryst. D55, 360-362. doi: 10.1107/S0907444998010701
- [27] P. H. Boer, D. A. Hickey 1986. The alpha-amylase gene in *Drosophila melanogaster*: nucleotide sequence, gene structure and expression motifs, Nucleic Acids Res. 14, 8399–8411. doi: 10.1093/nar/14.21.8399
- [28] R. Charlab, J. G. Valenzuela, E.D. Rowton, J. M. Ribeiro 1999. Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly, *Lutzomyia longipalpis*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 15155–15160. doi: 10.1073/pnas.96.26.15155
- [29] K. Ohashi, S. Natori and T. Kubo 1999. Expression of amylase and glucose oxidase in the hypopharyngeal gland with an age-dependent role change of the worker honeybee (*Apis mellifera* L.), Eur. J. Biochem. 265, 127–133. doi: 10.1046/j.1432-1327.1999.00696.x
- [30] F. Zeng, A.C. Cohen 2000. Partial characterization of alpha-amylase in the salivary glands of *Lygus hesperus* and *L. lineolaris*, Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. 126. 9–16. doi: 10.1016/S0305-0491(00)00176-0
- [31] S. M. Channale, A. J. Bhide, Y. Yadav, G. Kashyap, P. K. Pawar, V. L. Maheshwari, S. Ramasamy, A.P. Giri, 2016. Characterization of two coleopteran α -amylases and molecular insights into their differential inhibition by synthetic α -amylase inhibitor, acarbose, Insect Biochem. Mol. Biol. 74, 1-11. doi: 10.1016/j.ibmb.2016.04.009
- [32] S.W. Applebaum, 1964. The action pattern and physiological role of *Tenebrio* larval amylase, J. Insect Physiol., 10. 897-906. doi: 10.1016/0022-1910(64)90080-0

- [33] J. Nagaraju, E. G. Abraham, 1995. Purification and characterization of digestive amylase from the tasar silkworm, *Antheraea mylitta* (Lepidoptera: Saturniidae), Comp. Biochem. Physiol. 110, 201-209. doi: 10.1016/0305-0491(94)00121-A
- [34] F. Ahmadi, A. Khani, M. Ghadamyari, 2012. Some properties of α -amylase in the digestive system and head glands of *Cryptolaemus montrouzieri* (Coleoptera: Coccinellidae), J. Crop Prot. 1, 97-105.
- [35] S.D. Schoville, Y.H. Chen, M.N. Andersson, J.B. Benoit, A. Bhandari, J.H. Bowsher, K. Brevik, K. Cappelle, M.M. Chen, A.K. Childers, C. Childers, O. Christiaens, J. Clements, E.M. Didion, E.N. Elpidina, P. Engsontia, M. Friedrich, I. García-Robles, R.A. Gibbs, C. Goswami, A. Grapputo, K. Gruden, M. Grynberg, B. Henrissat, E.C. Jennings, J.W. Jones M. Kalsi, S.A. Khan, A. Kumar, F. Li, V. Lombard X. Ma, A. Martynov, N.J. Miller, R.F. Mitchell, M. Munoz-Torres, A. Muszewska, B.S.R. OppertPalli, K.A.Y. Panfilio, Pauchet, L.C. Perkin, M. Petek, M.F. Poelchau, J.P. Record, J.P. Rinehart, H.M. Robertson, A.J. Rosendale, V.M. Ruiz-Arroyo, G. Smagghe, Z. Szendrei, G.W.C. Thomas, A.S. Torson, I.M.V. Jentzsch, M.T. Weirauch, A.D. Yates, G.D. Yocum, J. Yoon, S. Richards 2018. A model species for agricultural pest genomics: the genome of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae), Sci Rep. 8 1931. doi: 10.1038/s41598-018-20154-1
- [36]https://animaldiversity.org/accounts/Leptinotarsa_decemlineata/classification/ (megtekintve: 2021. február 12.)
- [37] A. Q. S. Khidhir, R. A. Mustafa 2018. Illustrate the morphologic characters of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* say, 1824 (Coleoptera: Chrysomelidae), J. Entomol. Zool. Stud.. 6, 2, 456-462.

- [38] S. Santacruz, R. Andersson, P. Aman 2005. Characterization of potato leaf starch with iodine-staining, Carbohydr. Polym., 59, 397-400. doi: 10.1016/j.carbpol.2004.10.001
- [39] D. G. Harcourt, 1963. Population dynamics of *Leptinotarsa decemlineata* (Say) in eastern Ontario. I. Spatial pattern and transformation of field counts, Can. Entomol. 95, 813-820. doi: 10.4039/Ent95813-8
- [40] D. G. Harcourt, 1964. Population dynamics of *Leptinotarsa decemlineata* (Say) in eastern Ontario. 11. Population and mortality estimation during six age intervals. Can. Entomol. 96, 1190-1 198. doi: 10.4039/ent961190-9
- [41] D. G. Harcourt, 1971. Population dynamics of *Leptinotarsa decemlineata* (Say) in eastern Ontario. III. Major population processes, Can. Entomol. 103, 1049-1061. doi: <https://doi.org/10.4039/Ent1031049-7>
- [42] N. D. Ferro, J. A. Logan, R. H. Voss, and J. S. Elkinton. 1985. Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) temperature-dependent growth and feeding rates. Environ. Entomol. 14, 343-348. doi: 10.1093/ee/14.3.343
- [43] M.S. Khorram, R. F. P. Abad, M. Yazdaniyan, S. Jafarnia 2010. Digestive α -amylase from *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae); response to pH, temperature and some mineral compounds. Adv. Environ. Biol., 4, 101-107.
- [44] G.J. Davies, K.S. Wilson, B. Henrissat 1997. Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases, Biochem. J. 321, 557-559. doi: 10.1042/bj3210557
- [45] J. Huet, M. Azarkan, Y. Looze, V. Villeret, R. Wintjensa 2008. Crystallization and preliminary X-ray analysis of a family 19 glycosyl hydrolase from Carica papaya latex, Acta Cryst. F64, 371–374. doi: 10.1107/S1744309108007823
- [46] J. Huet, P. Rucktooa, B. Clantin, M. Azarkan, Y. Looze, V. Villeret, R. Wintjens 2008. X-ray structure of papaya chitinase reveals the substrate

binding mode of glycosyl hydrolase family 19 chitinases, *Biochem.*, 47, 32, 8283–8291. doi: 10.1021/bi800655u

[47] M. Verhaest, W. V. den Ende, K. L. Roy, C. J. De Ranter, A. V. Laere, A. Rabijns 2005. X-ray diffraction structure of a plant glycosyl hydrolase family 32 protein: fructan 1-exohydrolase IIa of *Cichorium intybus*, *Plant J.* 41, 3, 400–11. doi: 10.1111/j.1365-313X.2004.02304.

[48] K. Hövel, D. Shallom, K. Niefind, T. Baasov, G. Shoham, Y. Shoham, D. Schomburg 2003. Crystallization and preliminary X-ray analysis of a family 51 glycoside hydrolase, the α -L-arabinofuranosidase from *Geobacillus stearothermophilus* T-6, *Acta Cryst. Section D Biol. Cryst.* 59, 5, 913–915. doi: 10.1107/S0907444903004037

[49] W. Veldman, M. V. Liberato, V. M. Almeida, V. P. Souza, M. A. Frutuoso, S. R. Marana, V. Moses, Ö. T. Bishop, I. Polikarpov 2020. X-ray structure, bioinformatics analysis, and substrate specificity of a 6-phospho- β -glucosidase glycoside hydrolase 1 enzyme from *Bacillus licheniformis*, *J. Chem. Inf. Model.* 60, 12, 6392–6407. doi: 10.1021/acs.jcim.0c00759

[50] M. Machius, G. Wiegand, R. Huber 1995. Crystal structure of calcium-depleted *Bacillus licheniformis* α -amylase at 2.2 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* 246, 545–559. doi: 10.1006/jmbi.1994.0106

[51] C. Chang, K. K. Kim, K. Y. Hwang, M. U. Choi, S. W. Suh 1993. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of α -amylase from *Bacillus subtilis*, *J. of Mol. Biol.* 229, 1, 235–238. doi: 10.1006/jmbi.1993.1020

[52] H. J. Swift, L. Brady, Z. S. Derewenda, E. J. Dodson, G. G. Dodson, J. P. Turkenburg, A. J. Wilkinson 1991. Structure and molecular model refinement of *Aspergillus oryzae* (TAKA) [alpha]-amylase: an application of the simulated-annealing method, *Acta Cryst. B* 47, 535–544 doi: 10.1107/S0108768191001970

- [53] E. Boel, L. Brady, A. M. Brzozowski, Z. Derewenda, G. G. Dodson, V. J. Jensen, S. B. Petersen, H. Swift, L. Thim, H. F. Woldike, 1990. Calcium binding in α -amylases: an X-ray diffraction study at 2.1-Å resolution of two enzymes from aspergillus, *Biochem.* 29, 26, 6244-6249. doi: 10.1021/bi00478a019
- [54] A. Kadziola, M. Sogaard, B. Svensson, R. Haser 1998. Molecular structure of a barley α -amylase-inhibitor complex: implications for starch binding and catalysis, *J. of Mol. Biol.* 278, 1, 205-217. doi: 10.1006/jmbi.1998.1683
- [55] G. D. Brayer, Y. Luo, S. G. Withers 1995. The structure of human pancreatic alpha-amylase at 1.8 Å resolution and comparisons with related enzymes. *Prot. Sci.* 4, 1730-1742. doi: 10.1002/pro.5560040908
- [56] M. Qian, R. Haser, F. Payan 1995. Carbohydrate binding sites in a pancreatic alpha-amylase-substrate complex, derived from X-ray structure analysis at 2.1 Å resolution *Prot. Sci.* 4, 4, 747-755. doi: 10.1002/pro.5560040414.
- [57] S. B. Larson, J. S. Day, A. McPherson 2010. X-ray Crystallographic analyses of pig pancreatic α -amylase with limit dextrin, oligosaccharide and α -cyclodextrin, *Biochem.* 49, 14, 3101–3115. doi: 10.1021/bi902183w
- [58] G. Gyémánt, G. Hovánszki, L. Kandra 2002. Subsite mapping of the binding region of α -amylases with a computer program, *Eur. J. Biochem.* 269, 5157–5162 doi:10.1046/j.1432-1033.2002.03212.x
- [59] J. F. Robyt, D. French 1970. The action pattern of porcine pancreatic alpha-amylase in relationship to the substrate binding site of the enzyme, *J. Biol. Chem.* 245, 15, 3917-3927. doi: 10.1006/jmbi.1998.1683
- [60] X. Robert, R. Haser, T.E. Gottschalk, F. Ratajczek, H. Driguez, B. Svensson, N. Aghajari 2003. The structure of barley α -amylase isozyme 1

- reveals a novel role of domain C in substrate recognition and binding: a pair of sugar tongs, *Structure*, 11, 973-984. doi: 10.1016/S0969-2126(03)00151-5
- [61] J. D. Allen, J. A. Thoma 1976. Subsite mapping of enzymes. Depolymerase computer modeling, *Biochem. J.* 159, 105-120. doi: 10.1042/bj1590105
- [62] J.D. Allen, J.A. Thoma 1976. Subsite mapping of enzymes. Application of depolymerase computer model to two α -amylases, *Biochem. J.* 159, 121-132. doi: 10.1042/bj1590121
- [63] L. Kandra, G. Gyémánt, E. Farkas, A. Lipták 1997. Action pattern of porcine pancreatic alpha-amylase on three different series of β -maltooligosaccharide glycosides, *Carbohydr. Res.* 298 237-242. doi: 10.1016/S0008-6215(96)00310-2
- [64] L. Kandra, G. Gyémánt, J. Remenyik, G. Hovánszki, A. Lipták 2002. Action pattern and subsite mapping of *Bacillus licheniformis* α -amylase (BLA) with modified maltooligosaccharide substrates, *FEBS Lett.* 518 79-82. doi: 10.1016/S0014-5793(02)02649-2
- [65] L. Kandra, G. Gyémánt, J. Remenyik, C. Ragunath, N. Ramasubbu 2003. Subsite mapping of human salivary α -amylase and the mutant Y151M, *FEBS Lett.* 544, 194-198. doi: 10.1016/S0014-5793(03)00495-2
- [66] L. Kandra, M.A. Hachem, G. Gyémánt, B. Kramhøft, B. Svensson 2006. Mapping of barley α -amylases and outer subsite mutants reveals dynamic high-affinity subsites and barriers in the long substrate binding cleft, *FEBS Lett.* 580, 5049-5053. doi: 10.1016/j.febslet.2006.08.028
- [67] J.D. Allen 1980. Subsite mapping of enzymes: Application to polysaccharide depolymerases, *Methods Enzymol.* 64, 248–277. doi: 10.1016/S0076-6879(80)64012-9
- [68] K. Hiromi 1970. Interpretation of dependency of rate parameters on the degree of polymerization of substrate in enzyme-catalyzed reactions.

- Evaluation of subsite affinities of exo-enzyme, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 40, 1–6. doi: 10.1016/0006-291X(70)91037-5
- [69] K. Sakai, R. Katsumi, Hiroshi Ohi, Taichi Usui, Y. Ishido 1992. Enzymatic syntheses of N-acetyllactosamine and N-acetylallolactosamine by the use of β -D-galactosidases, *J. Carbohydr. Chem.* 11, 553-565. doi: 10.1080/07328309208016148
- [70] X. Zeng, R. Yoshino, T. Murata, K. Ajisaka, T. Usui 2000. Regioselective synthesis of p-nitrophenyl glycosides of β -D-alactopyranosyl-disaccharides by transglycosylation with β -D-galactosidases, *Carbohydr. Res.* 325, 120–131. doi: 10.1016/S0008-6215(99)00303-1
- [71] L P. Kouamé, S. Niamké, J. Diopoh, B. Colas 2001. Transglycosylation reactions by exoglycosidases from the termite *Macrotermes subhyalinus*, *Biotechnol. Lett.*, 23, 1575-1581. doi: 10.1023/A:1011969310742
- [72] N. Declerck, P. Joyet, J. Y. Trosset, J. Garnierand, C. Gaillardin 1995. Hyperthermostable mutants of *Bacillus licheniformis* α -amylase: multiple amino acid replacement and molecular modeling, *Protein Eng.* 8, 1029-1037. doi: 10.1093/protein/8.10.1029
- [73] N. Declerck, M. Machius, R. Chambert, G. Wiegand, R. Huber, C. Gaillardin 1997. Hyperthermostable mutants of *Bacillus licheniformis* α -amylase: Thermodynamic studies and structural interpretation, *Protein Eng.*, 10, 541-549. doi: doi.org/10.1093/protein/10.5.541
- [74] N. Declerck, M. Machius, R. Chambert, G. Wiegand, R. Huber, C. Gaillardin 2000. Probing structural determinants specifying high thermostability in *Bacillus licheniformis* alpha-amylase, *J. Mol. Biol.*, 301, 1041-1057. doi: 10.1006/jmbi.2000.4025
- [75] K. Igarashi, Y. Hatada, K. Ikawa, H. Araki, T. Ozawa, T. Kobayashi, K. Ozaki, S. Ito 1998. Improved thermostability of a *bacillus* α -amylase by deletion of an arginine-glycine residue is caused by enhanced calcium

- binding, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 248, 372-377. doi: 10.1006/bbrc.1998.8970
- [76] C. Bessler, J. Schmitt, K. H. Maurer, R. D. Schmid 2003. Directed evolution of a bacterial α -amylase: Toward enhanced pH-performance and higher specific activity, *Protein Sci.* 12, 10, 2141–2149. doi: doi.org/10.1110/ps.0384403
- [77] A. Shaw, R. Bott, A.G. Day 1999. Protein engineering of α -amylase for low pH performance, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 10, 349-352. doi: 10.1016/S0958-1669(99)80063-9
- [78] K. H. Park, M. J. Kim, H. S. Lee, N. S. Han, D. Kim, J. F. Robyt 1998. Transglycosylation reactions of *Bacillus stearotheophilus* maltogenic amylase with acarbose and various acceptors. *Carbohydr. Res.* 313, 235–246. doi: 10.1016/S0008-6215(98)00276-6
- [79] M. H. Rivera, A. López-Munguía, X. Soberón, G. Saab-Rincón 2003. Alpha-amylase from *Bacillus licheniformis* mutants near to the catalytic site: effects on hydrolytic and transglycosylation activity, *Prot. Eng.* 16, 7, 505-14. doi: 10.1093/protein/gzg060.
- [80] G. Saab-Rincon, G. del-Rio, R.I. Santamaria, A. Lopez-Munguia, X. Soberon, 1999. Introducing transglycosylation activity in a liquefying α -amylase, *FEBS Lett.* 453, 100-106. doi: 10.1016/S0014-5793(99)00671-7
- [81] P. L. Tran, H. J. Cha, J. S. Lee, S. H. Park, E. J. Wood, K. H. Park 2014. Introducing transglycosylation activity in *Bacillus licheniformis* α -amylase by replacement of His235 with Glu, *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* 451, 541–547. doi: doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.08.019
- [82] T. J. Kim, C. Park, H. Y. Cho, S. S. Cha, J. S. Kim, S. Lee, T. Moon, J. Kim, B. H. Oh, K. H. Park 2000. Role of the glutamate 332 residue in the transglycosylation activity of *Thermus* Maltogenic amylase, *Biochem.* 39, 23, 6773–6780. doi: 10.1021/bi992575i

- [83] Y. Wang, F. Li, C. H. Gao, Y. J. Zhang 2009. Characterization of a novel mesophilic bacterial amylase secreted by ZW2531-1, a strain newly isolated from soil, Chem. Res. Chinese U. 25, 198– 202. doi: 10.1128/AEM.70.12.7229-7235.2004
- [84] Y. Wang, F. Li, C. H. Gao, Y. J. Zhang 2010. Preliminary investigation on the catalytic mechanism of an oligosaccharide-producing multifunctional amylase, Appl. Biochem. Biotechnol. 160, 1955– 1967. doi: 10.1007/s12010-009-8704-y
- [85] F. Li, X. Zhu, C. H. Gao, Y. J. Zhang 2011. Functional characterization of a special thermophilic multifunctional amylase OPMA-N and its N-terminal domain, Acta Biochem. Biophys. Sin. 43, 4, 324–334. doi: 10.1093/abbs/gmr013
- [86] T. Usui, T. Murata 1988. Enzymatic synthesis of p-nitrophenyl- α -maltopentaoside in an aqueous-methanol solvent system by maltotetraose-forming Amylase: A substrate for human amylase in serum, J. Biochem. 103, 969-972. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a122395
- [87] T. Usui, T. Murata, Y. Yabuuchi, K. Ogawa 1993. Transglycosylation reaction of maltotriose-forming amylase from *Streptomyces griseus*, Carbohydr. Res. 250, 57-66. doi: 10.1016/0008-6215(93)84154-X
- [88] A. Moreno, J. Y. Damian-Almazo, A. Miranda, G. Saab-Rincon, F. Gonzalez, A. Lopez-Munguia 2010. Transglycosylation reactions of *Thermotoga maritima* α -amylase. Enz. and Microb. Tech. 46, 331–33. doi: 10.1016/j.enzmictec.2009.12.002
- [89] E. J. P. Kouadio, H.K. Konan, F. A. Tetchi, K. D. Brou, L. P. Kouamé 2012. Novel α -Amylases Amy A1 and Amy A2 from digestive tract of tropical house cricket *Gryllodes sigillatus* (Orthoptera: Gryllidae): hydrolysis and transglycosylation reactions, Agriculture Biol. J. North Am. 3, 198-207. doi: 10.5251/abjna.2012.3.5.198.207

- [90] K. S. Bak-Jensen, G. Andre, T. E. Gottschalk, G. Paës, V. Tran, B. Svensson 2004. Tyrosine 105 and threonine 212 at outermost substrate binding subsites 6 and 4 control substrate specificity, oligosaccharide cleavage patterns, and multiple binding modes of barley amylase 1*, J. Biol. Chem. 279, 11, 10093–10102. doi: 10.1074/jbc.M312825200
- [91] L. Kandra, G. Gyémánt, J. Remenyik, C. Ragunath, N. Ramasubbu 2005. Transglycosylations catalysed by Y151M mutant of human salivary α -amylase (HSA), *Biologia*, 16, 57-64.
- [92] J. A. Mótyán, E. Fazekas, H. Moric, B. Svenssonc, P. Bagossia, L. Kandra, G. Gyémánt 2011. Transglycosylation by barley α -amylase 1. J. Mol. Cat. B: Enzymatic 72, 229– 237. doi: 10.1016/j.molcatb.2011.06.010
- [93] E. A. MacGregor, A. W. MacGregor, L. J. Macri, J.E. Morgan 1994. Models for the action of barley alpha-amylase isozymes on linear substrates, *Carbohydr. Res.* 2. 57, 249-268. doi: 10.1016/0008-6215(94)80039-1
- [94] Y. Morishita, Y. Iinuma, N. Nakashima, K. Majima, K. Mizuguchi, Y. Kawamura 2000. Total and pancreatic amylase measured with 2-Chloro-4-nitrophenyl-4-O- β -D-galactopyranosyl-maltoside, *Clin. Chem.* 46, 928–933. doi: 10.1093/clinchem/46.7.928
- [95] Z. Ogawa, Y. Kitagawa, H. Ikeya, H. Suzuki 2014. Reaction mechanism of human α -amylase: The role of chloride and histidine residues, *Int. J. Anal. Bio-Sci.* 2, 1, 33-40.
- [96] H. C. Lichstein, M. H. Soule 1944. Studies of the Effect of Sodium Azide on Microbic Growth and Respiration: I. The Action of Sodium Azide on Microbic Growth, *J. Bacteriol.* 47, 3, 221-30. doi: 10.1128/JB.47.3.221-230.1944. doi: 10.1128/jb.47.3.239-251.1944
- [97] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, Lubert Stryer. *Biochemistry*, 5th edition, Section 4.1 The Purification of Proteins Is an Essential First Step in

Understanding Their Function. New York: W H Freeman 2002. ISBN-10: 0-7167-3051-0

[98] M. Kobayashi, Y. Sasaki, S. Kobayashi, 1997. Purification of amylases and other enzymes by a forced-affinity chromatography method. Biosci. Biotechnol. Biochem. 61, 5 813-5816. doi: 10.1271/bbb.61.813

[99] D. F. Klessig, M. Tian, H. W. Choi 2016. Multiple targets of salicylic acid and its derivatives in plants and animals, Front. Immunol. 7, 206. doi: 10.3389/fimmu.2016.00206

[100] G. Feller, M. Bonneau, J. L. Da Lage 2021. Amyrel, a novel glucose-forming α -amylase from *Drosophila* with 4- α -glucanotransferase activity by disproportionation and hydrolysis of maltooligosaccharides. Glycobiology, 31, 9, 1134-1144. doi: 10.1093/glycob/cwab036

[101] N. Ramasubbu, C. R. Prasunkumar, J. Mishra 2003. Probing the role of a mobile loop in substrate binding and enzyme activity of human salivary amylase. J. Mol. Biol. 325, 1061–1076. doi: 10.1016/S0022-2836(02)01326-8

[102] P. L. Tran, H. J. Cha, J. S. Lee, S. H. Park, E. J. Woo, K. H. Park 2014. Introducing transglycosylation activity in *Bacillus licheniformis* α -amylase by replacement of His235 with Glu, Biochem. Biophys. Res. Commun. 451, 541–547. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.08.019

[103] B. Bissaro, P. Monsan, R. Fauré, M. J. O'Donohue 2015. Glycosynthesis in a waterworld: new insight into the molecular basis of transglycosylation in retaining glycoside hydrolases. Biochemical Journal, 467, 1, 17-35. doi: ff10.1042/BJ20141412ff. fhal-02146118f

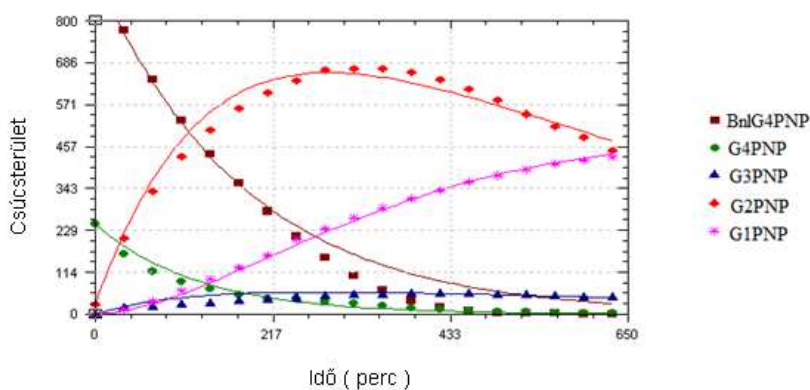
[104] N. Ramasubbu, V. Paloth, Y. Luo, G.D. Brayer, M.J. Levine 1996. Structure of human salivary alpha-amylase at 1.6 a resolution: implications for its role in the oral cavity, Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 52, 1, 435-446. <https://doi.org/10.1107/S09074444995014119>

- [105] C. Gilles, J.P. Astier, G. Marchis-Mouren, C. Cambillau, F. Payan, 1996. Crystal structure of pig pancreatic alpha-amylase isoenzyme II, in complex with the carbohydrate inhibitor acarbose, *Eur. J. Biochem.* 238, 561–569, <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.0561z.x>.
- [106] E. Farkas, L. Jánossy, J. Harangi, L. Kandra, A. Lipták 1997. Synthesis of chromogenic substrates of α -amylases on a cyclodextrin basis, *Carbohydr. Res.* 303, 407-415. doi: 10.1016/s0008-6215(97)00187-0
- [107] K. Ishikawa, I. Matsui, K. Honda, S. Kobayashi, H. Nakatani 1991. The pH dependence of the action pattern in porcine pancreatic α -amylase-catalyzed reaction for maltooligosaccharide substrates. *Arch. of Biochem. and Biophys.* 289, 1, 124-129. doi: 10.1016/0003-9861(91)90451-n
- [108] U. K. Laemmli 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685. doi: 10.1038/227680a0

Függelék

1. függelék: A rovarbél extraktum BnlG4PNP szubsztrát bontási reakcióit leíró differenciálegyenletek és kinetikai görbék

$$\begin{aligned}\frac{d[BnlG4PNP]}{dt} &= -A'42 * [BnlG4PNP] \\ \frac{d[G4PNP]}{dt} &= -A42 * [G4PNP] - G43 * [G4PNP] \\ \frac{d[G3PNP]}{dt} &= G43 * [G4PNP] - G32 * [G3PNP] \\ \frac{d[G2PNP]}{dt} &= A'42 * [BnlG4PNP] + A42 * [G4PNP] + G32 * [G3PNP] - G21 * [G2PNP] \\ \frac{d[G1PNP]}{dt} &= G21 * [G2PNP] - \beta G1 * [G1PNP] \\ \frac{d[G1]}{dt} &= \beta G1 * [G1PNP]\end{aligned}$$



2. függelék: A rovarbél extraktum BnlG5PNP szubsztrát bontási reakcióit
leíró differenciálegyenletek és kinetikai görbék

$$\frac{d[BnlG5PNP]}{dt} = -A'53 * [BnlG5PNP] - A'52[BnlG5PNP]$$

$$\frac{d[G5PNP]}{dt} = -A53 * [G5PNP] - A52 * [G5PNP] - G54 * [G5PNP]$$

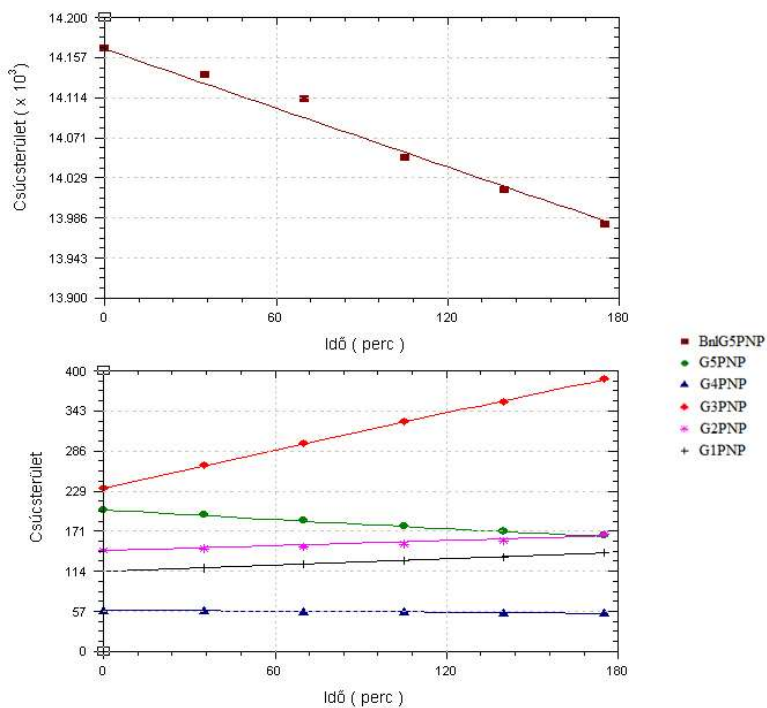
$$\frac{d[G4PNP]}{dt} = -A42 * [G4PNP] - G43 * [G4PNP] + G54 * [G5PNP]$$

$$\frac{d[G3PNP]}{dt} = A'53 * [BnlG5PNP] + A53 * [G5PNP] + G43 * [G4PNP]$$

$$\frac{d[G2PNP]}{dt} = A'52 * [BnlG5PNP] + A52[G5PNP] + A42 * [G4PNP] + G32 * [G3PNP] - G21 * [G2PNP]$$

$$\frac{d[G1PNP]}{dt} = G21 * [G2PNP] - \beta G1 * [G1PNP]$$

$$\frac{d[G1]}{dt} = \beta G1 * [G1PNP]$$



3. függelék: A rovarbél extraktum BnlG₆PNP szubsztrát bontási reakcióit
leíró differenciálegyenletek és kinetikai görbék

$$\frac{d[BnlG6PNP]}{dt} = -A'64 * [BnlG6PNP] - A'63 * [BnlG6PNP] - A'62 * [BnlG6PNP]$$

$$\frac{d[G6PNP]}{dt} = -A64 * [G6PNP] - A63[G6PNP] - A62[G6PNP] - G65 * [G6PNP]$$

$$\frac{d[G5PNP]}{dt} = -A53 * [G5PNP] - A52 * [G5PNP] - G54 * [G5PNP] + G65 * [G6PNP]$$

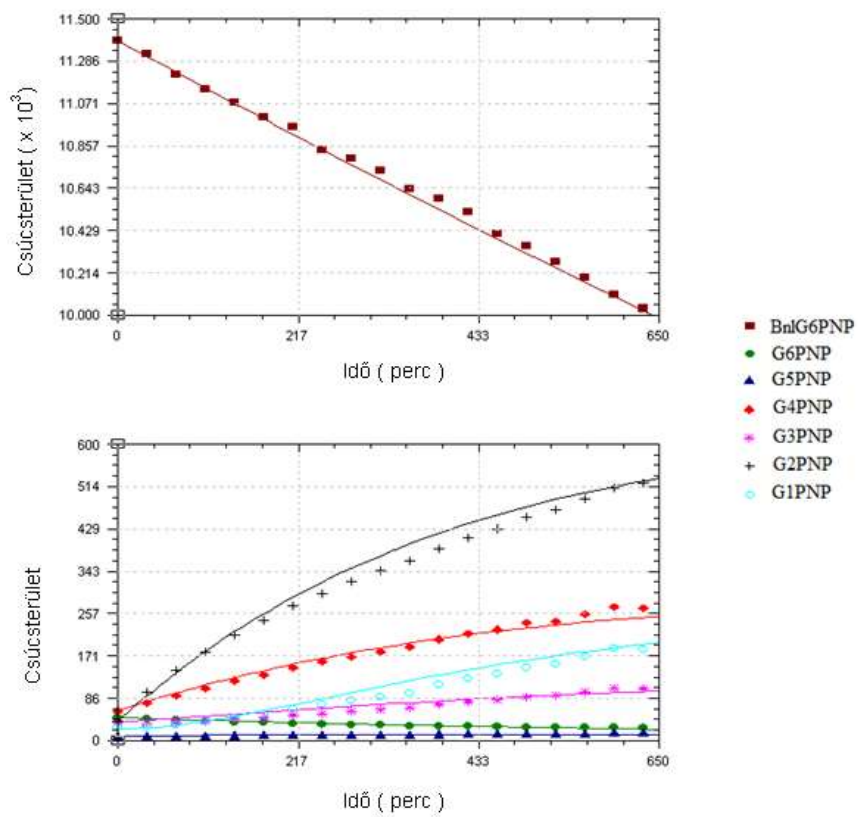
$$\begin{aligned} \frac{d[G4PNP]}{dt} = & -A42 * [G4PNP] + A'64 * [BnlG6PNP] + A64 * [G6PNP] - G43 \\ & * [G4PNP] + G54 * [G5PNP] \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{d[G3PNP]}{dt} = & A'63 * [BnlG6PNP] + A63 * [G6PNP] + A53 * [G5PNP] - G32 \\ & * [G3PNP] + G43 * [G4PNP] \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{d[G2PNP]}{dt} = & A'62 * [BnlG6PNP] + A62 * [G6PNP] + A52 * [G5PNP] + A42 \\ & * [G4PNP] - G21 * [G2PNP] + G32 * [G3PNP] \end{aligned}$$

$$\frac{d[G1PNP]}{dt} = G21 * [G2PNP] - \beta G1 * [G1PNP]$$

$$\frac{d[G1]}{dt} = \beta G1 * [G1PNP]$$



4. függelék: A rovarbél extraktum BnlG7PNP szubsztrát bontási reakcióit leíró differenciálegyenletek és kinetikai görbék:

$$\frac{d[BnlG7PNP]}{dt} = -A'75 * [BnlG7PNP] - A'74 * [BnlG7PNP] - A'73 * [BnlG7PNP] - A'72 * [BnlG7PNP]$$

$$\frac{d[G6PNP]}{dt} = -A64 * [G6PNP] - A63 * [G6PNP] - A62 * [G6PNP] - G65 * [G6PNP]$$

$$\frac{d[G5PNP]}{dt} = -A53 * [G5PNP] - A52 * [G5PNP] + A'75 * [BnlG7PNP] - G54 * [G5PNP] + G65 * [G6PNP]$$

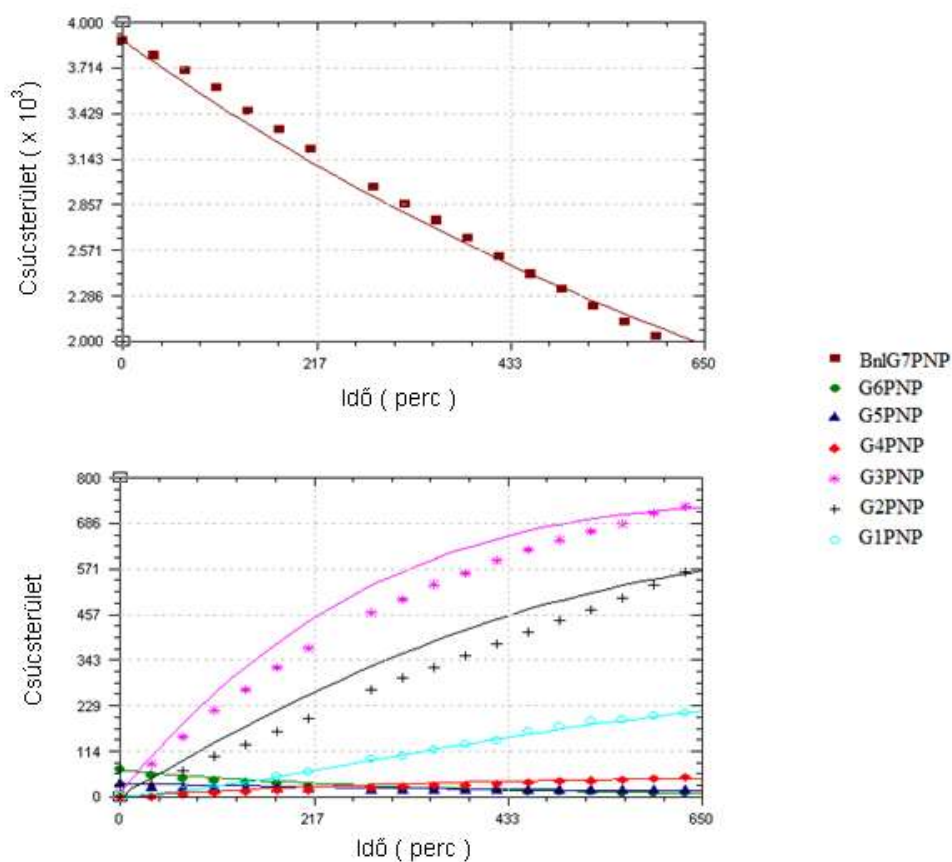
$$\frac{d[G4PNP]}{dt} = -A42 * [G4PNP] + A'74 * [BnlG7PNP] + A64 * [G6PNP] - G43 * [G4PNP] + G54 * [G5PNP]$$

$$\frac{d[G3PNP]}{dt} = A'73 * [BnlG7PNP] + A63 * [G6PNP] + A53 * [G5PNP] - G32 * [G3PNP] + G43 * [G4PNP]$$

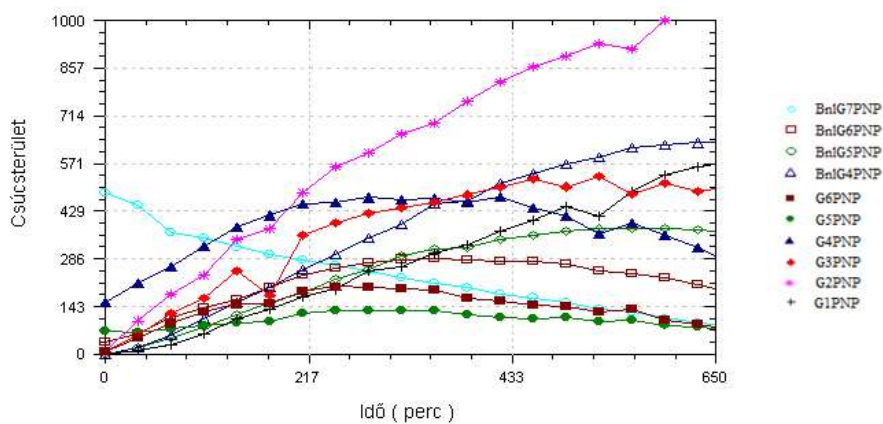
$$\frac{d[G2PNP]}{dt} = A'72 * [BnlG7PNP] + A62 * [G6PNP] + A52 * [G5PNP] + A42 * [G4PNP] - G21 * [G2PNP] + G32 * [G3PNP]$$

$$\frac{d[G1PNP]}{dt} = -\beta G1 * [G1PNP] + G21 * [G2PNP]$$

$$\frac{d[G1]}{dt} = \beta G1 * [G1PNP]$$

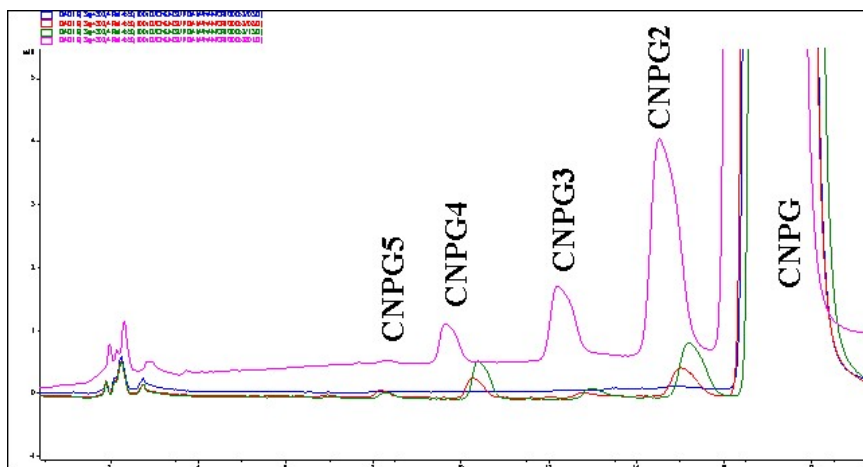


5. függelék: A rovarbél extraktum BnlG₈PNP szubsztrát bontási reakció kinetikai görbéi:



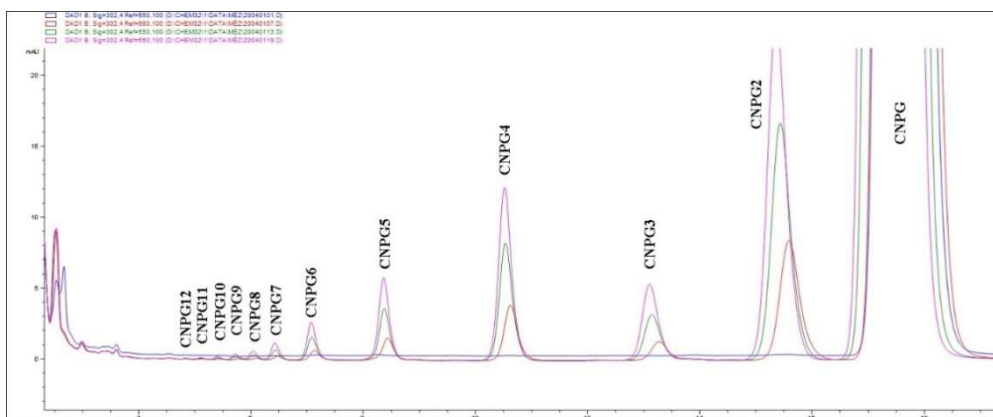
6. függelék: A transzglikozilezési reakció fordított fázisú

folyadékkromatográfiás módszerrel történő követése során kapott kromatogramok 1%-os keményítő tartalmú reakcióelegy esetében (kék: 0 perc, piros: 100 perc, zöld: 200 perc, rózsaszín: 1440 perc), amelyben az akceptort egy nap inkubációt követően adtam hozzá.

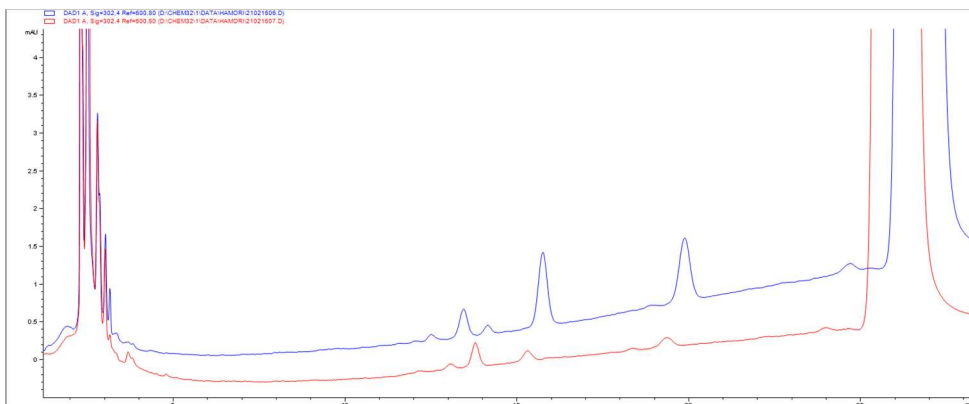


7. függelék: Az LDAmY szintézis irányú reakciójának fordított fázisú

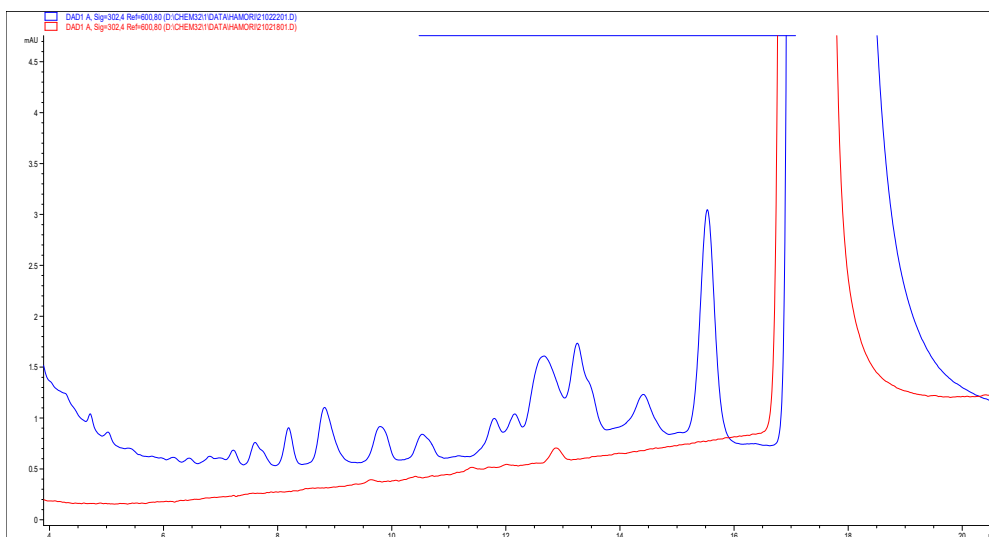
folyadékkromatográfiás módszerrel történő követése során kapott kromatogramok 10 mg/ml G₅-G₇ keverék és CNPG akceptor esetében (kék: 0 perc, piros: 120 perc, zöld: 240 perc, rózsaszín: 360 perc).



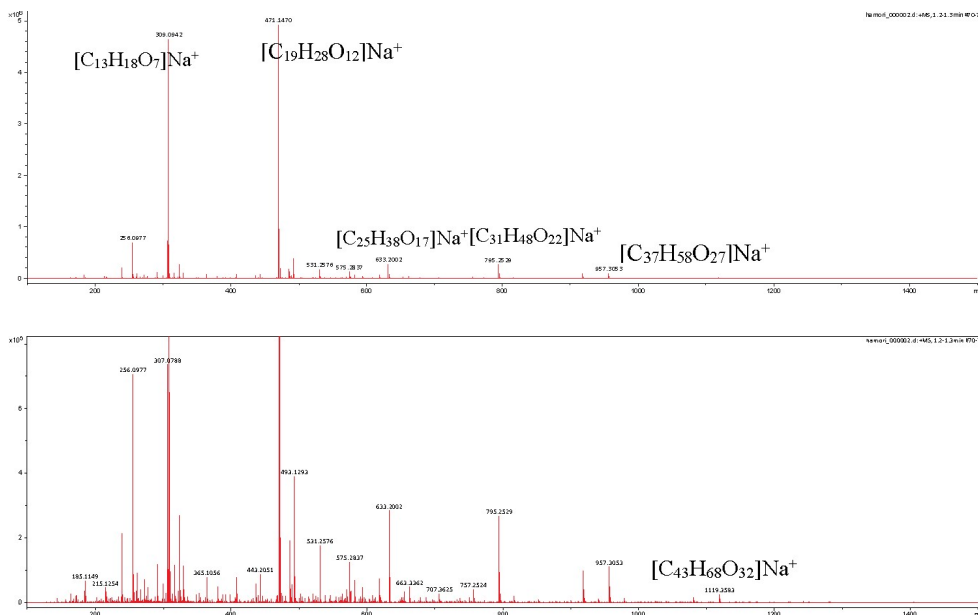
8. függelék: A G₅-G₇ donor és CNPG akceptor tartalmú kontroll (kék) és 25 mM maltotrióz (piros) tartalmú reakcióelegyek 30 perces inkubációt követő injektálása során kapott kromatogramok fordított fázisú folyadékkromatográfiás módszerrel.



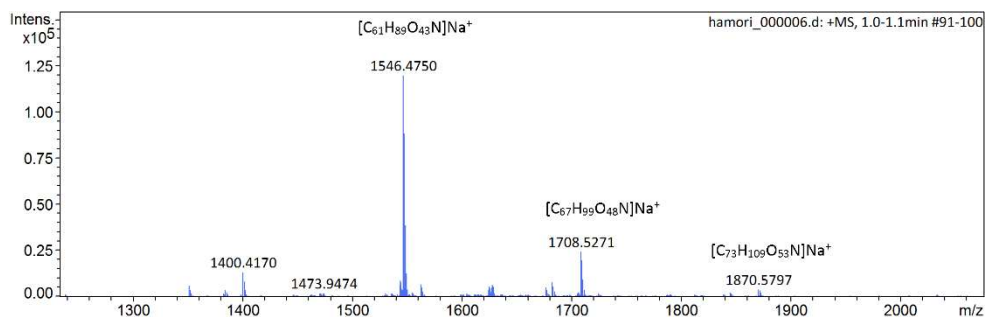
9. függelék: Az LDAm_y szintézis irányú reakciójának vizsgálata fordított fázisú folyadékkromatográfiás módszerrel PNP-mannopiranozid akceptor és vas(II) ion jelenlétében. A kromatogramok az enzim reakcióban keletkező oligoszacharid termékek csúcsait ábrázolják (piros: 0 perc, kék: 4 nap)



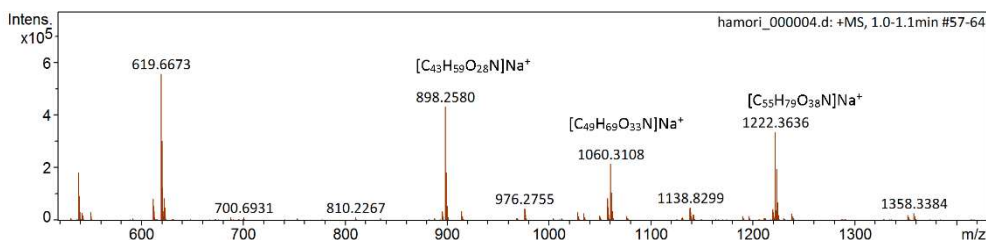
10. függelék: Az LDAmY szintézis irányú vizsgálata során kapott termékek tömegspektruma. Az akceptor molekula szalicin volt.



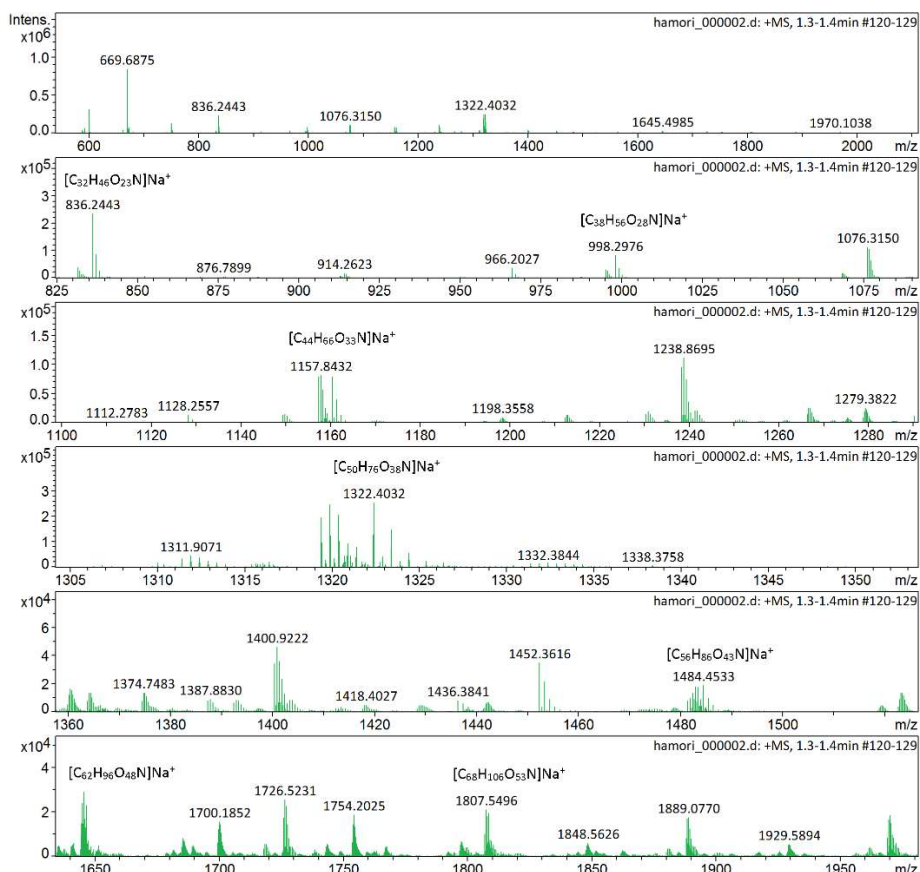
11. függelék: A BnlG₇PNP transzglykozilezési reakciójában keletkező BnlG_nPNP (n=8-10) termékek tömegspektruma



12. függelék: A BnlG₇PNP transzglykozilezési reakciójában keletkező
BnlG_nPNP (n=4-6) transzglykozilezett termékek tömegspektruma



13. függelék: Az Et-4-G₇-NP transzglykozilezési reakciójában keletkező
termékek tömegspektruma



14. függelék: A BnIG₇PNP hidrolitikus reakciójában keletkező BnIG_n (n=1-6) termékek tömegspektruma

