

1949

Exo glikozid hidroláz enzimek működésének tanulmányozása Az édesburgonya β-amiláz és a DiszperzinB enzim vizsgálata

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

Szerző neve: Fazekas Erika

Témavezető neve: Dr. Gyémánt Gyöngyi

DEBRECENI EGYETEM Természettudományi Doktori Tanács Kémia Doktori Iskola Debrecen, 2013.

EXO GLIKOZID HIDROLÁZ ENZIMEK MŰKÖDÉSÉNEK TANULMÁNYOZÁSA

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében a kémia tudományágban

Írta: Fazekas Erika okleveles biológus

Készült a Debreceni Egyetem Kémia doktori iskolája (Szénhidrátok kémiája és kémiai biológiája programja) keretében

Témavezető: Dr. Gyémánt Gyöngyi

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: tagok: Dr. Kéki Sándor Dr. Báthori Mária Dr. Kiss László

egyetemi tanár egyetemi tanár ny. egyetemi docnes

A doktori szigorlat időpontja: 2013. április 15.

Az értekezés bírálói:

Dr	
Dr	
Dr	
Dr	
	Dr Dr Dr Dr Dr Dr Dr Dr Dr Dr Dr Dr

Az értekezés védésének időpontja: 201....

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi Doktori Tanács Kémia Doktori Iskola Szénhidrátok kémiája és kémiai biológiája programja keretében készíttetem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 2013. október 31.

jelölt

Tanúsítom, hogy Fazekas Erika doktorjelölt 2009-2013 között a fent megnevezett Doktori Iskola Szénhidrátok kémiája és kémiai biológiája programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javasolom.

Debrecen, 2013. október 31.

témavezető

Köszönetnyilvánítás

Hálával és köszönettel tartozom témavezetőmnek *Dr. Gyémánt Gyöngyi* egyetemi docensnek, hogy a sok együtt töltött év alatt irányította munkámat. Bevezetett az analitikai módszerek világába és megtanított a pontos, precíz és igényes munkavégzésre. Minden felmerült kérdésemmel bátran fordulhattam hozzá, készségesen állt rendelkezésemre egyetemi hallgató korom óta.

Őszintén köszönöm *Dr. Kandra Lilinek*, hogy Ph.D munkám készítése során hasznos tanácsokkal látott el illetve javaslataival és ötleteivel hozzájárult kutatásom sikeréhez.

Köszönettel tartozom *Prof. Dr. Fábián István* tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy doktori értekezésemet az általa vezetett Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszéken készíthettem el és hogy ösztöndíjas időm után álláslehetőséget biztosított munkám és dolgozatom nyugodt befejezéséhez.

Köszönöm *Dr. Gáspár Attila* egyetemi docensnek és kutatócsoportjának, hogy segítették munkámat és baráti légkört biztosítottak munkám elvégzéséhez.

Hálával tartozom Dr. Mótyán János András egyetemi tanársegédnek, hogy bevezetett a labormunka alapjaiba.

Köszönöm *Dr. Batta Gyula* egyetemi tanárnak és munkatársainak a ¹H-NMR mérések során nyújtott segítséget. Köszönöm *Dr. Docsa Tibor* tudományos munkatársnak, hogy az enzimes szintézishez felhasznált glikogén foszforiláz b enzimet rendelkezésemre bocsátotta. Továbbá köszönettel tartozom *Dr. Fekete Anikó*nak a DiszperzinB enzim szubsztrátjainak előállításáért.

Köszönettel tartozom a *Szerves Kémai Tanszék* és a volt *MTA Szénhidrátkémiai Kutatócsoport* oktatóinak és dolgozóinak a közös munka során nyújtott sok segítségért, valamint a Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék minden dolgozójának és oktatójának, hogy segítették munkámat.

Köszönöm a volt *Biokémia Tanszék* minden munkatársának a mai napig tartó készséges segítséget illetve, hogy bármilyen problémával fordulhattam hozzájuk.

Köszönöm a *TÁMOP* (4.2.1./B-09/1/KONV-2010-0007 és 4.2.2/B-10/1-2010-0024) pályázatok és az *NTP-OKA-VIII-B* anyagi támogatását.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm családomnak, barátomnak és barátaimnak, külön kiemelve *édesanyámat* és *testvéremet*, folyamatos támogatásukat, szeretetüket és azt, hogy mindig bátorítottak és mellettem álltak az elmúlt évek során.

Elkészült dolgozatomat édesapámnak szeretném ajánlani, aki már nem lehet velünk.

Tartalom

Köszönetnyilvánítás	6
Tartalom	7
Rövidítések	9
1. Bevezetés	.11
2. Irodalmi áttekintés	.14
2.1. Glikozidázok általános bemutatása	. 15
2.2. Glikozid hidrolázok hidrolízis stratégiája	. 16
2.3. Glikozidázok mechanizmusa	. 18
2.3.1. Retenciós glikozid hidrolázok	.18
2.3.2. Inverziós glikozid hidrolázok	.20
2.4. Enzimreakció sebességének meghatározása	. 21
2.5. Az édesburgonya β-amiláz vizsgálatának irodalmi előzményei	. 23
2.5.1. Az édesburgonya β-amiláz általános jellemzői	.23
2.5.2. Az édesburgonya β-amiláz szerkezete	.24
2.5.3. Az édesburgonya β-amiláz katalizálta reakció pH függése	.25
2.5.4. Az édesburgonya β-amiláz működésének hőmérséklet függése	.26
2.5.5. Az édesburgonya β-amiláz inhibítorai	.26
2.5.6. Az édesburgonya β-amiláz alhely szerkezete	.27
2.5.7. Az édesburgonya β-amiláz hidrolítikus mechanizmusa	.28
2.6. DiszperzinB enzim vizsgálatának irodalmi előzményei	. 29
2.6.1. Biofilmek	.29
2.6.2. Hexózaminidázok általános jellemzői	.32
2.6.3. DiszperzinB enzim	.33
3. Célkitűzések	.37
4. Vizsgálati eredmények és értékelésük	.38
4.1. Az édesburgonya béta-amiláz vizsgálata	. 38
4.1.1. A reakciók enzimkoncentráció függése	.38
4.1.2. CNPG5 teljes hidrolízise édesburgonya β-amiláz enzimmel	.39
4.1.3. CNPG6 teljes hidrolízise édesburgonya β-amiláz enzimmel	.40
4.1.4. CNPG7 teljes hidrolízise édesburgonya β-amiláz enzimmel	.42
4.1.5. CNPG8 teljes hidrolízise édesburgonya β-amiláz enzimmel	.43
4.1.6. CNPG11 teljes hidrolízise édesburgonya β-amiláz enzimmel	.44
4.2. Az édesburgonya β-amiláz enzim vizsgálati eredményeinek értékelése	. 45
4.2.1. Teljes hidrolízis vizsgálatok kiértékelése Scientist® programmal	.45
4.2.2. Az édesburgonya β-amiláz katalitikus hatékonysága	.48
4.2.3. Pszeudo elsőrendű kinetikai állandók meghatározása (kobs)	.49
4.2.4. Az édesburgonya β-amiláz enzim exo karakterének ellenőrzése	.50
4.2.5. Az édesburgonya β-amiláz enzim processzivitása	.51
4.2.6. Transzglikozilezés édesburgonya βAMY által katalizált hidrolízis reakciók	
során	.54
4.3. DiszperzinB enzim vizsgálatának eredményei	. 55
4.3.1. Előzetes vizsgálatok tiofenil glikozidokon DiszperzinB és mutáns enzimeive	el
	.55

4.3.2. Enzimkoncentráció függés vizsgálata	.57
4.3.3. Oligomer szubsztrátok teljes hidrolízisének nyomon követése	.58
4.4. DiszperzinB enzim vizsgálati eredményeinek értékelése	. 62
4.4.1. Retenciós hidrolízis mód igazolása	.62
4.4.2. Oxazolin közti termék kimutatása és szintézise	.63
4.4.3. Pszeudo elsőrendű kinetikai értékelése a DspB által katalizált teljes hidrolíz	is
reakcióknak	.64
4.4.4. Több produktív kötőmód jelenlétének kimutatása oligomer szubsztrátokon	.65
4.4.5. Katalitikus hatékonyság vizsgálata oligomer sorozaton	.67
4.4.6. Javaslat az aktív hely alhely szerkezetére	.68
4.4.7. DiszperzinB enzim szigorú nem redukáló végi specifitásának igazolása	.70
4.4.8. Javaslat az DiszperzinB enzim CAZy rendszerbe történő besorolására	.71
5. Felhasznált anyagok és módszerek	.73
5.1. Felhasznált enzimek	. 73
5.1.1. Az édesburgonyából származó β-amiláz	.73
5.1.2. DiszperzinB	.74
5.1.3. Nyúl vázizom glikogén foszforiláz b	.74
5.2. Felhasznált szubsztrátok	. 75
5.2.1. 2-klór-4-nitrofenol (CNP) maltooligomerek	.75
5.2.2. N-acetilglükózamin oligomerek	.76
5.3. A vizsgálatokhoz használt módszerek	. 77
5.3.1. Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC)	.77
5.3.2. Kalibrációs görbék készítése koncentráció meghatározásához és	
enzimkoncentráció függéshez HPLC módszerrel	.78
5.3.3. MALDI-TOF MS	.80
5.3.4. ¹ H-NMR	.80
5.4. Enzimkinetikai vizsgálatok	. 81
5.4.1. Kezdeti reakciósebességek meghatározása	.81
5.4.2. Enzimkoncentráció függés teljes hidrolízis vizsgálatoknál	.81
5.4.3. Teljes hidrolízis vizsgálatok	.82
5.5. Vizsgálati adatok kiértékelése	. 83
5.5.1. Kezdeti reakciósebességek és kinetikai paraméterek meghatározása Grafit	
programmal	.83
5.5.2. Szubsztrátok teljes hidrolízise és kinetikai konstansok meghatározása	
Scientist [®] programmal	.84
5.5.3. Katalitikus hatékonyság meghatározása	.86
6. Összefoglalás	.88
7. Summary	.91
8. Irodalomjegyzék	.94
9. Dolgozat publikációi1	.02

Rövidítések

 α -CD: alfa-ciklodextrin A. actinomycetemcomitans: Aggregatibacter actinomycetemcomitans Ai: alhely kötési energiája AMP: adenozin-monofoszfát BAMY: béta-amiláz BRENDA: Enzimek Széleskörű Információs Rendszere, adatbázis CAZy: Carbohydrate Active Enzymes database - Szénhidrátokon ható enzimek adatbázisa (http://www.cazy.org/) CBM: Cellulose Binding Module, szénhidrát kötő modul CNP: 2-klór-4-nitrofenol csoport Da: dalton, tömegegység DP: "degree of polymerisation", polimerizáció foka DspB: diszperzinB enzim [E₀]: kiindulási enzimkoncentráció EC: Enzyme Comisson, Enzim Bizottság G: glükóz G2: maltóz G4: maltotetraóz GH: "glycoside hydrolase", enzimcsaládok rövidítése GlcNAc: N-acetil-D-glükózamin G-1-P: glükóz-1-foszfát HPLC: nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia k: sebességi állandó k_{cat}: információt ad a reakciósebességről telítési szubsztrát koncentrációnál K_i: inhibíciós állandó K_{M:} Michaelis-Menten állandó, az a szubsztrátkoncentráció, amelynél a reakciósebesség a maximális felét eléri MALDI-TOF: mátrix segítette lézer deszorpciós ionizációs technika repülési idő analizátorral MeCN: acetonitril P: GlcNAc. P₂: GlcNAc₂, β(1,6) kötésű N-acetil-D-glükózamin dimer P₃: GlcNAc₃. β(1,6) kötésű N-acetil-D-glükózamin trimer PDB: Protein Data Bank, fehérjék szerkezetének adatbázisa

PGA: PGlcNAc, poli-glükózamin, baktériumok által szintetizált extracelluláris poliszacharid mátrix

S₁: fenil-tio-N-acetil-β-D-glükózaminid

S₂: Ph-S-(N-acetil- β -D-glükózamin)₂, $\beta(1,6)$ kötésű N-acetil-D-glükózamin dimer fenil-tioglikozidja

S₃: Ph-S-(N-acetil-β-D-glükózamin)₃

S₄: Ph-S-(N-acetil-β-D-glükózamin)₄

S₅: Ph-S-(N-acetil-β-D-glükózamin)₅

[S₀]: kiindulási szubsztrát koncentráció

S. aureus: Staphylococcus aureus baktérium

S. epidermidis: Staphylococcus epidermidis baktérium

SDS PAGE: Na-dodecilszulfát poliakrilamid gélelektroforézis technika,

-SH: tiol csoport

TrisHCl: hidroximetil-aminoetán-hidroklorid

v_{max}: enzimreakció maximális sebessége

VRK: vékonyréteg kromatográfia

1. Bevezetés

A szénhidrátokat átalakító enzimek vizsgálata határterület a kémiai és biológiai kutatások között, hiszen a biológiai kérdések megválaszolása többnyire kémiai módszerekkel történik. A biológia és a biológiai módszerek feilődésével igény mutatkozott az enzimek működési mechanizmusának és az általuk katalizált folyamatoknak a megismerésére is. A Debreceni Egyetem Természettudományi és Technológiai Karának Biokémia Tanszékén korábban *endo* hatásmechanizmusú α-amilázokat tanulmányoztak [1-3]. Ezen munka folytatásaként a Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékén Dr. Gyémánt Gyöngyi egyetemi docens irányításával exo hatásmechanizmusú, glikozidos kötéseket hidrolizáló enzimek vizsgálatába kapcsolódtam be. Exo hatásmechanizmusú enzimek alhelytérképezéséhez és hatásmechanizmusuk tanulmányozásához egy inverziós és egy retenciós enzimet választottunk. Inverziós modell fehérjének az édesburgonyából származó béta-amilázt (βAMY) használtuk. Az édesburgonyát több mint 100 országban termesztik, fontos élelmiszerforrás főleg a fejlődő világban: Afrikában, Dél-Amerikában táplálék, valamint Indiában, Indonéziában és Kínában is fogyasztják és használják állati takarmányként [4]. Jelentőségét mutatja, hogy 2020-ra több mint 2 milliárd ember élelmezésének alapját biztosítják a gumós és gyökeres növények, köztük az édesburgonya is. Az édesburgonya gyökere a főzés közben válik édessé. A keményítőből α-amiláz és β-amiláz hatására maltóz (G2) keletkezik, amely az édes ízt adja [5,6]. Az édesburgonya (Ipomoea batatas) a legfőbb βAMY forrás, mennyisége hozzávetőlegesen 5%-a az oldott fehérjéknek. Más gumós növények csak nyomnyi mennyiségben tartalmaznak βAMY-t [7], de magasabb rendű növények magjaiban, mint szójabab és árpa [8] valamint különböző baktériumokban és gombákban is megtalálható [9]. Széles körű irodalommal rendelkezik, amely lehetővé teszi eredményeink helyességének ellenőrzését és összevetését korábbi vizsgálatokkal.

Másik vizsgált enzimünk, a DiszperzinB (DspB), amelyet 2003-ban írtak le először. Egy szájban található patogén mikroorganizmusból, az Aggregatibacter actinomycetemcomitansból izolálták, amely szerepet játszik különböző betegségek kialakításában, mint például a fogínyvérzés vagy szívbelhártya-gyulladás [10]. Az enzim önmagában és antibiotikumokkal együtt alkalmas biofilmek felületről való eltávolítására [11,12]. A biofilmek problémájának a gyógyászatban egyre nagyobb figyelmet szentelnek, köszönhetöen a nagyszámú, biofilmhez köthető komoly betegségnek. Így minden olvan módszer, ami megoldást kínál érdemes az alapos tanulmányozásra.

Az α-amilázoknál alkalmazott módszerek alapján terveztük meghatározni a kiválasztott enzimek alhely szerkezetét, működési mechanizmusukat. Ehhez a megfelelő szubsztrátok mellett a termékek és szubsztrátok enzimreakció közbeni koncentráció változásának követésére alkalmas analitikai módszerre volt szükség. Erre а célra egy elválasztástechnikai módszer, a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC) bizonyult alkalmasnak. Korábban az elsőrendű kinetikai állandók meghatározását a kezdeti sebességek módszerével, a Michalis-Menten kinetika alapján végezték, azonban így a többlépéses reakciók egyes reakciólépéseinek kinetikájáról és azok sebességi állandóinak egymáshoz viszonyított arányáról nem kapunk pontos információt. A teljes hidrolízis reakciók követése megoldás lehet erre a problémára. A vizsgált hidrolízis reakciókban a folyamatok modellezéséhez több reakciót kell figyelembe venni, úgymint többféle produktív kötőmódot, processzív hidrolízist, transzglikozilezést, termékgátlást. Ezáltal jobban megismerhetővé válik a vizsgált fehérje működése, szerkezete.

12

2. Irodalmi áttekintés

Az enzimek csoportosítására és osztályokba sorolására 1992-ben hozták létre azt a rendszert, amelyet ma is használunk [13]. Csoportosításuk az általuk katalizált reakciók típusa alapján történt meg (International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB - http://www.iubmb.org/).

1. Az **oxidoreduktázok** oxidációs és redukciós folyamatokat katalizálnak (Enzyme Comisson (EC) 1...) Jelenleg 23 alosztályba sorolják az ide tartozó enzimeket. Ilyenek például az oxidázok, katalázok, dehidrogenázok.

2. A **transzferázok** (EC 2...) valamilyen atom vagy atomcsoport átvitelét segítik egyik molekuláról a másikra. Átvihetnek például acil, alkil, glikozid, foszfát és szulfát csoportokat. 10 alosztályába tartoznak az acetiltranszferázok, aminotranszferázok, de a polimerázok is, amelyek a DNS és RNS felépítéséhez nélkülözhetetlenek.

3. A **hidrolázok** (EC 3...) olyan enzimek, amelyek vízmolekula segítségével kovalens kötéseket bontanak, így az adott szubsztrát molekula két kisebb egységre bomlik szét. 13 alosztályukba tartoznak a glikozidázok (mint pl. az amilázok, glükoamilázok), észterázok, proteázok.

4. A **liázok** (EC 4...) nem hidrolízis és nem is redox folyamatok során hasítják fel a szén-szén, szén-oxigén és szén-nitrogén kötéseket. 7 alcsoportjukat a hasítandó kötésben szénhez kapcsolódó másik atom szerint csoportosították.

5. Az **izomerázok** (EC 5...) olyan enzimek, amelyek az átalakítandó molekulán belüli kötések átrendezését végzik. Az átalakítás típusa alapján sorolják őket 6 alosztályba, például a *cisz-transz* izomerázok, epimerázok vagy racemázok csoportjába.

6. A **ligázok** (EC 6...) két molekula összekapcsolását katalizálják. 6 alosztályába olyan enzimek sorolhatók, amelyek szén-oxigén, szén-szén vagy

éppen szén-nitrogén kötéseket alakítanak ki. Ide tartoznak a peptid szintázok, DNS és RNS ligázok.

2.1. Glikozidázok általános bemutatása

A glikozid hidrolázok (GH) (EC 3.2.1) olyan, a hidrolázok osztályába tartozó enzimek csoportja, amelyek az O-, N- vagy S-glikozidok glikozidos kötését két szénhidrát vagy egy szénhidrát és egy nem szénhidrát rész között hasítják, egy vízmolekula belépésével. Nomenklatúrájuk szubsztrát specifitásukon és molekuláris mechanizmusukon alapul. A hasított kötéseket egy általános sav és egy nukleofil vagy bázis segítségével bontják fel.

A szénhidrátokon ható hidrolázok és transzferázok csoportosítására Henrissat egy szerkezeti alapú rendszert hozott létre Carbohydrate Active Enzymes database (CAZy) néven [14]. Felismerték, hogy az azonos családba tartozó enzimek aminosav szekvenciája és harmadlagos szerkezete nagyfokú hasonlóságot mutat [15] és a glikozidos kötés körüli geometria is túlnyomó többségben konzervált megjelenésű. Ez egy új szerkezet alapú besorolást tett lehetővé. A szerkezeti jellemzők jobban tükrözik azt, hogy az enzim melyik családba tartozik, mint az egy szubsztráton megállapított specifitásuk, valamint az enzimek közötti evolúciós kapcsolatok is jobban feltárhatóak. A CAZy adatbázis folyamatosan frissíti a glikozid hidroláz családok listáját. Jelenleg 132 családot ismerünk, de több mint 1700 ismert glikozid hidroláz van, amit nem soroltak még be egyik családba sem. Mivel a fehérjék szerkezete jobban konzervált, mint az aminosav szekvenciájuk, ezért néhány családot nagyobb csoportokba, úgynevezett "klánokba" soroltak.

2.2. Glikozid hidrolázok hidrolízis stratégiája

Aszerint, hogy a szubsztrát lánc belsejéből vagy szigorúan csak annak végéről szabadítanak fel terméket, megkülönböztetünk endo és exo hatásmechanizmusú enzimeket. Nem produktív kötőmód esetében a szubsztrát kapcsolódik az enzim aktív centrumába, de kötés módosulása, azaz új termék képződése nem következik be. Produktív kötőmódról akkor beszélünk, amikor az enzim és a szubsztrát kapcsolódását követően az enzimreakció során új termék képződik új kötés létrejöttével vagy kötés hidrolízisével. Az új termék nemcsak úgy alakulhat ki, hogy egy enzimszubsztrát komplexből létrejön az enzim-termék komplex, majd a termék ledisszociál a fehérje felületéről. Úgynevezett processzíven ható enzimek esetében az enzim-termék komplex teljes disszociációja nem történik meg, hanem egy újabb kötés hasítása következik be, így egymás után két vagy több kötés bontása történik meg két vagy több termék képződésével. A processzív vagy "multiple attack" hasítás számos, polimer szubsztráton ható enzim esetében megfigyelhető, amelyek gyakran nem oldódó szubsztrátot, például kitint vagy cellulózt bontanak [16]. Ezen enzimek között találunk retenciós és inverziós enzimeket is, és gyakran tartalmaznak szénhidrát kötő modult (CBM) az aktív katalitikus doménen kívül [17]. Gyakran a processzív enzimeknek alagútszerú (tunnel) szubsztrátkötő helyük van, de ez nem kizárólagos feltétel [18]. A βAMY működésének modellezése során leírtak egy mozgékony kart, ami képes lezárni a szubsztrátot a hidrolízis idejére, majd elősegíteni a maltóz termék távozását [19]. Azt is feltételezik, hogy a szubsztrát kötődés gyengébb a processzíven ható enzimeknél, ami segíti a szubsztrát továbbcsúszását. Ebben főleg aromás és hidrofób oldalláncok játszanak szerepet.

Endo enzimek esetében az aktív hely a fehérie felületén, egy úgynevezett árokban helyezkedik el. Az általuk katalizált hidrolízis során több produktív kötési mód eredményeként több, különböző tagszámú termék van jelen egy komplex termékelegyben. A különböző tagszámú termékek képződésének relatív hidrolítikus sebességét kötéshasítási frekvenciának vagy BCF nevezzük. Kísérletileg meghatározott BCF (Bond Cleavage Frequency) értékeket használnak a katalitikus hely pozíciójának és az alhelyek számának meghatározásához, illetve az alhelyek kötési energiájának számításához. Az alhelyek számát a Phillips-féle "alhely modell" segítségével írjuk le [20]. Az alhely modell úgy tekinti az enzim szubsztrátkötő régióját [21], mint az egymást követő alhelyek tandem sorát. Mindegyik alhely komplementer, és kölcsönhatást létesít a szubsztrát egy monomer egységével. A Davies-féle nomenklatúra szerint [22] az alhelyeket a katalitikus helytől kezdve jelöljük: a katalitikus helytől balra negatív számokkal (-1, -2, -3...) a glikon kötőhelyeket, jobbra pedig pozitív számokkal (+1, +2, +3...) az aglikon kötőhelyeket (1.ábra).

 1.ábra: Maltooligomer szubsztrátok kötőmódjai egy 9 alhelyet tartalmazó *endo* enzim aktív centrumában. A nyíl a katalitikus helyet jelöli. G-glükóz egység, a katalitikus hely a -1 és +1 alhelyek között található

Exo enzimeknél egy úgynevezett zsebben található a hasító hely. Csak egyféle produktív kötőmód tud kialakulni, amelynek következtében mindig

azonos termék képződik. Az ilyen enzimek eltérő hatékonysággal hasítják a különböző hosszúságú szubsztrátokat.

Ezt a tulajdonságot használják fel az alhely térképek elkészítéséhez, a kinetikai adatokból történő alhely energiák számításához a Hiromi által leírt képlet használható [23]:

$$(k_{cat} / K_M)_n = (0,018)k_{int} * \exp(\sum_{-1}^{n-1} Ai / RT)$$
(1)

ahol k_{cat}/K_M = kinetikai adat, n = szusztrát tagszáma (DP: degree of polymeristaion), 0,018 = keverési entrópia 25°C-on, k_{int} = független az n-től, A_i = az i-edik alhely affinitása, R = gázállandó és T = abszolút hőmérséklet. Kísérletek során a K_M és v_{max} értékek valamint a k_{cat} meghatározhatóak.

2.3. Glikozidázok mechanizmusa

2.3.1. Retenciós glikozid hidrolázok

Koshland 1953-ban írta le a kettős helvettesítéses retenciós mechanizmust [24]. Ebben az esetben a glikozidos kötés hasítása során az anomer központ konfigurációja megmarad, α kötésből α anomer, β kötésből pedig β anomer glikozidos -OH keletkezik. A reakció a következő lépésekből áll (2. ábra). Első lépésként az egyik katalitikus aminosav deprotonált karboxil csoportja nukleofilként támadja az anomer központot, ugyanakkor egy másik aminosav protonált karboxil csoportja savként katalizál és protonálja a glikozidos oxigént. Megtörténik a kötés felhasadása és létrejön egy glikozilenzim intermedier. Második lépésként egy víz molekula belépésével a glikozil-enzim intermedier hidrolizál, a támadó víz molekula deprotonálódik. A második aminosav sav/bázisként lép fel. Így két közti állapoton át és egy intermedieren keresztül megvalósul a glikozidos kötés hidrolízise.



Retaining mechanism for a β -glycosidase:

2. ábra: Retenciós β-glikozid hidrolázok hidrolízis mechanizmusának sémája (forrás: http://www.cazypedia.org/index.php/File:Retaining_glycosidase_mechanism.png)

Ennek a retenciós mechanizmusnak egy változata, amikor magán a szubsztrát molekulán található egy a katalízisben résztvevő csoport. Ez a mechanizmus azokra az enzimcsaládokra jellemző, amelyek szubsztrátja N-acetil csoportot tartalmaz a 2-es pozícióban. Első lépésként a 2-acetamino csoport intramolekuláris nukleofilként hatva egy átmeneti állapot után létrehozza az oxazolin közti terméket. Majd második lépésként egy újabb átmeneti állapoton át felbomlik az oxazolin gyűrű és kialakul a termék.

Anionos tio-glikozidok hidrolízise során a mirozinázok esetében hiányzik az általános savként funkcionáló aminosav, azaz a glutaminsav helyett glutamin található, amely taszítja az anionos szulfát aglikont. Az alternatív bázikus csoport pedig exogén módon van jelen, amelyet az L-aszkorbinsav biztosít [25].

19

A neuraminidázok, amelyek a sziálsavak közötti glikozidos kötést hidrolizálják katalitikus nukleofilként tirozint használnak, amely aktivál egy bázisként szereplő aminosavat.

NAD⁺ kofaktort igényelnek a kötések hasításához a GH4 és 109 családba tartozó enzimek. Anionos átmeneti állapotok, eliminációs és redox lépések során szabadítják fel termékeiket [26].

Retenciós glikozdázoknál általánosan megfigyelhető a transzfer reakció is, amely során az adott enzimek nem csak hidrolizálják szubsztrátjaikat, hanem képesek új glikozidos kötéseket is létrehozni [27].

2.3.2. Inverziós glikozid hidrolázok

Inverziós enzimekre jellemző, hogy a szubsztrát hidrolízise során az anomer központ konfigurációja megváltozik, ellentétes térállást vesz fel. Tehát α kötésből β anomer termék, még β kötésből α termék keletkezik. Egy lépésben történik a reakció egy közti állapoton keresztül, amelyben a bázisként szereplő aminosav protonálódik, a savként szereplő deprotonálódik, egy víz molekula pedig a távozó csoport cseréjét végzi el, így kialakítva a terméket (3.ábra) [27].

Inverting mechanism for an $\alpha\text{-glycosidase}$



 ábra: α-glikozid hidrolázok inverziós mechanizmussal történő szubsztrát hidrolízisének sémája

 $(forr \'as: http://www.cazypedia.org/index.php/File:Inverting_glucosidase_mechanism.png)$

A retenciós enzimekkel ellentétben az inverzióval működő fehérjék esetében nem jellemző a transzglikozilezési reakció. Azonban Hehre megállapította, hogy az inverziós glikozidázok hidrolizálják a megfelelő glikozil fluoridok mindkét anomer konfigurációját. β AMY katalizálta reakcióban maltozilfluorid szubsztrátból transzglikozilezésre utaló közti terméket detektált [28]. Bebizonyították, hogy a glükodextranáz, amely egy *exo* hatásmódú inverziós a hidroláz enzim, α -glükopiranozil-fluoridból β -glükózt állít elő. Ebből a termékből pedig β -D-fluorid akceptorral α -D-glükozil transzfer termék keletkezik [29]. Ezekben az esetekben az enzimek anomer szelektivitása által meghatározott glikozidos kötés és a glikozil-fluorid anomer szenének konfigurációja ellentétes térállású.

2.4. Enzimreakció sebességének meghatározása

Korábban az elsőrendű kinetikai állandók meghatározására a Michaelis-Menten kinetika volt az egyetlen és legjobban alkalmazható módszer, amely távol áll a kvázi egyensúlyi állapottól és az egyensúly feltétele, hogy $[E_0] >>$ $[S_0]$ [30].

Azonban így az egyes reakciólépések kinetikájáról és azok sebességi állandóinak egymáshoz viszonyított arányáról nem kaptunk pontos információt. Az enzim működési mechanizmusát a steady-state és a kvázi egyensúlyi rendszer sem írja le megfelelően. Ezért olyan tranziens módszer szükséges, amely ezekre a kérdésekre együttes választ ad. A teljes hidrolízis reakciók követése megoldás lehet mindezen kérdésekre. Schnell és munkatársai 2004-es írásukban először mutatták be, hogy az enzim katalizálta reakciókban a kinetikai állandók az enzim koncentrációjától függetlenek, amennyiben [S₀] << K_M. Ha a kezdeti enzimkoncentráció ismert, a szubsztrát fogyására illesztett görbe segítségével a k₁, k₋₁ és k₂ sebességi állandók megadhatóak [31]. Az enzimek aktív centrumának és katalízisüknek tanulmányozására alkalmazható általános kinetikai módszer a teljes hidrolízis reakciók követése, mert megkönnyíti a k₂ elsőrendű kinetikai konstans vagy más néven átviteli szám meghatározását [30].

Polimer szubsztráton ható enzimek esetében gyakran (például: *Trichoderma reesei* cellobiohidroláz I és II, a bakteriofág T7 DNS polimeráz, az *Escherichia coli* exonukleáz I,) már a reakció kezdeti szakaszában is több termék van jelen a termékelegyben, ezért nem lehet egyértelműen eldönteni, hogy milyen módon történik a kötések hasítása [32]. Történhet több produktív kötőmód által, konszekutív lépések során vagy többszörös hasítással. Amennyiben ezek a lépések nem egyértelműen azonosítottak és meghatározottak úgy a vizsgált enzim működési mechanizmusa sem írható le. A korábban használt kezdeti reakciósebesség mérésekkel [33] ezeket a kérdéseket nem lehet megválaszolni, ezért szükséges a szubsztrátok teljes hidrolízis reakcióit követni és értékelni.

A reakciók időbeli, teljes vizsgálatának előnye, hogy többlet információkkal szolgál az enzim tulajdonságairól. Egy egyszerű reakcióelegyet felhasználva többféle vizsgálati eredményt kaphatunk meg egyszerre. Minden adat ugyanabból az egyetlen mérésből származik, így minden komponens (enzim, szubsztrát, puffer, inhibítor) a megfelelő koncentrációban van jelen. A reakció során történő koncentrációváltozások egyértelműen követhetőek, vagy számíthatók. Ezért az alkalmazott módszer nem befolyásolja az enzim tulajdonságait. Egyaránt alkalmazható egyensúlyra és nem egyensúlyra vezető reakcióknál is [34].

A mért szubsztrát és keletkezett termék koncentrációkat az idő függvényében ábrázoljuk, majd egy matematikai modellt felállítva és azt megfeleltetve az adatoknak, leírhatjuk a teljes enzimreakciót.

22

2.5. Az édesburgonya β-amiláz vizsgálatának irodalmi előzményei

2.5.1. Az édesburgonya β-amiláz általános jellemzői

Az édesburgonyából származó β AMY (EC 3.2.1.2.) vagy más néven 1,4- α -D-glükán maltohidroláz, egyike volt az első kristályosított enzimeknek. [35] Természetes szubsztrátja a keményítő, katalizálja a lánc nem redukáló vége felőli második $\alpha(1,4)$ glikozidos kötés hidrolízisét [36], maltóz egységeket hasítva le β -anomer konfiguráció kialakításával [37,19]. Keményítőhöz való affinitása kisebb, mint az α -amilázé [36]. Poliglükózokon, úgymint glikogénen vagy dextrineken szintén hat [38]. Szerkezetét, amely megtalálható a PDB adatbázisban is (PDB: Protein Data Base, http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do), röntgendiffrakcióval fejtették meg, azonosítója 1FA2 (4. ábra) [39].



 4. ábra: Az édesburgonya βAMY tetramer szerkezetének szalag modellje, azonosítója: 1FA2 (forrás: PDB adatbázis)

Az α-amilázoktól eltérően spektroszkópiás vizsgálatok nem mutatták fémion vagy prosztetikus csoport jelenlétét, az aktivitáshoz nem igényel klorid vagy más aniont, nem aktiválódik kálcium ion jelenlétében [35,39].

2.5.2. Az édesburgonya β-amiláz szerkezete

Négy alegységből felépülő, tetramer fehérje, amelynek kialakításáért ionos kölcsönhatások lehetnek felelősek. Szerkezete egy (β/α)₈ hordó felépítésű magból és egy C terminális végi hurokból áll [40-42].

Szójából származó βAMY-val 64-68%-ban egyezik meg [43] az árpából nyerttel 53%-ban azonos az aminosav szekvenciája. Legkevesebb 6 konzervatív régiót tartalmaz [43].

Egy alegysége 498 aminosavból áll, 319 vízmolekula veszi körül, az Nterminálison alanin, a C-terminálison aszparaginsav található [42]. A β AMY magszerkezetét váltakozva β -redők és α -hélixek alkotják, amelyeket 15 hurok kapcsol össze. A nagy és a kis domének formálják a mély árkot, ahol az aktív centrum található és a Glu187 lokalizálódik, amelynek pKa értéke 3,5, még pKb értéke 8,0 [44]. A Glu187 γ -karboxil csoportja funkciós csoportként működik, részt vesz a katalízisben [42] és az aktív helyen konzervált megjelenésű [43]. Ez egy konzervált régió [39], amely különböző eredetű β AMY-kban is megtalálható [45]. A Glu186 karboxil csoportja a glikozidos kötés hidrolízise során proton donorként funkcionál, még a Glu380 az aktív hely mélyén köti a glükóz egységet [46]. Ez a három aminosav alkotja az aktív centrum +1 és -1-es alhelyeit [41], az L4 hurok tagjai.

Fontos szerepet játszanak a szulfhidril (-SH) csoportok a szubsztrát monomer egységek kötéseiben. Az –SH csoport pK-ja 10, ami azt mutatja, hogy a szulfhidril csoportot tartalmazó aminosav nincs közvetlenül jelen az aktív helyen, de esszenciális az enzim aktivitáshoz, így közel kell lennie az aktív centrumhoz [47,48].

Egy alegységen 10 Cys aminosav található, a korábban leírt 5 helyett [49,50], amelyek közül 4 reaktív az enzimben és a maltóz megkötéséért felelősek valamint esszenciálisak az enzim funkciójához [51,52]. A Cys97 a legreaktívabb és ez helyezkedik el legközelebb az aktív helyhez [53]. Az L3as hurkon, az aktív hely bejáratánál található a konzervatív Cys96. A Phe341, Thr342, Cys343 konzervatív régió, amely a szubsztrát vagy inhibítor kötésében vesz részt és nélkülözhetetlen az enzim számára [36,50,51]. A Cys96 és a Cys345 a Glu187 két oldalán helyezkedik el, meghatározva az 1,2,3 és 4 alhelyeket. A Cys345 növeli az alhelyek flexibilitását [54].

A Glu380 és a Thr342 között egy víz molekula alakít ki hidrogén kötést, támadja az anomer szénatomot, így fordítva meg a konfigurációt β-maltózt képezve [55]. A Phe341 második nukleofilként szerepel. A Trp303 a 4-es alhely mellett található és szerepet játszik az alhelyek flexibilitásában [54]. Az Asp53, amely a szubsztrátkötő hely szélén található és a His93 közreműködik a hidrogén kötés kialakításában az enzim és a szubsztrát nem redukáló vége között [41].

Az édesburgonyából izolált βAMY tetramer fehérje molekulatömegét különböző közleményekben közelítőleg 150-200 kDa-nak adták meg [35,36, 56], amely jól egyezett az egy alegységre megadott körülbelül 50 kDa-al [36,47]. Majd a cDNS szekvenciából a monomer alegység tömegét 48 kDa-nak [53] és 56 kDa-nak állapították meg [42].

A korai leírásokban szereplő tömegeltérések a mérési módszerek különbségéből adódtak, a DNS szekvencián alapuló tömeg meghatározások és a még pontosabb meghatározást lehetővé tevő aminosav szekvencián alapuló meghatározások alapján már pontos értékek adhatóak meg. Az így számított monomer egység tömege 56079 Da (Protein Calculator 3.3). Az általunk használt enzim molekulatömegét SDS PAGE-val határoztuk meg, amelyet később, az anyagok és módszerek részben mutatok be.

2.5.3. Az édesburgonya β-amiláz katalizálta reakció pH függése

A natív enzim pH optimuma 5,5 [57], de széles pH tartományban aktív, 3-as és 10-es pH érték között stabil [19,47]. Acetát puffer esetén pH 4 és 5, míg

citrát puffer esetén pH 5 és 6 között a legaktívabb az enzim, izoelektromos pontja 4,74-4,79 [35]. Kitinen immobilizált enzim esetén a pH optimum hasonló tendenciát mutat: 4-10 között stabil, de pH 7-10 között aktívabb [58]. pH 4 és 9 között elektroforetikus mérések során nem láttak jelentős aktivitásvesztést [59]. Hagenimana és munkatársaik által édesburgonyából izolált βAMY enzim pH optimumát 5,3-5,8 között határozták meg, stabilitását pH 4,0 és 8,0 között [60]. Alacsonyabb pH-értékeken az enzim gyorsan denaturálódott, pH 3-nál már nem tudtak értékelhető aktivitást mérni [19].

2.5.4. Az édesburgonya β-amiláz működésének hőmérséklet függése

Az enzim hőmérséklet optimuma változó, a fehérje állapotától függően 25 °C [61] és 70 °C között aktív [62]. A natív enzim hőmérséklet optimuma 50 °C, a kitinnel immobilizálté 70°C [58]. Az édesburgonya sejtfalához kötötten található oldhatatlan βAMY aktivitása 100-ad része az oldhatóénak, azonban hőstabilitása sokkal nagyobb, így hőmérséklet optimuma 75 °C, de 90 °C felett 3 percig még megmarad az aktivitásának 45%-a [63]. Hagenimana vizsgálatai során megállapította, hogy az enzim 53 °C-on mutatja aktivitásának maximumát, 60°C-on inaktiválódik [60]. Az -SH-csoportok módosítása csökkenti az enzim hőstabilitását [36].

2.5.5. Az édesburgonya β-amiláz inhibítorai

Az enzim aktivitását többféle inhibítor jelenlétében vizsgálták. Az alfaciklodextrinről (α -CD) megállapították, hogy kompetitív inhibítorként hat [19,47,64]. Az enzimet radioaktívan jelölt α -CD-el reagáltatták és megállapították, hogy a kötőhelyek függetlenül hatnak, egy inhibítor kötőhely található minden monomer alegységen [65]. Az α -CD azonban nem okoz szerkezeti változást [39], specifikusan kötődik, lezárja a hasító zseb bejáratát, de nem jut olyan mélyre, hogy elérje a katalitikus helyet, ezért csak fizikálisan blokkolja azt [45].

A maltóz kompetitív inhibítora az enzimnek, Ki értéke 6 mM, de a többszörös hasítás jelenlétén nem változtat még 5% maltóz sem [19]. Két különböző módon történhet meg a β AMY gátlása, amely során a szubsztrátkötő helyek energiacsökkenése következik be. Az első eset, amikor a maltóz csak az enzimstruktúra flexiblis részével reagál, ekkor a kötőmód a normál szubsztrátkötést nem fogja befolyásolni, de a katalitikus folyamatot megakadályozza (nem kompetitív gátlás). A másik esetben, mint kompetitív gátlószer, a katalitikus helyhez kötődik. G11 szubsztrát esetében azt tapasztalták, hogy a maltóz, ha 5% koncentrációban (0,15 M) van jelen a reakcióelegyben, akkor kompetitíven gátol [19]. Az α-metil-glikozid szintén kompetitív inhibítora az édesburgonya β AMY-nak [19,44]. Nem kompetitív inhibítorai az enzimnek a glükóz [19] valamint a glicerol [66].

2.5.6. Az édesburgonya β-amiláz alhely szerkezete

Az enzimet radioaktívan jelölt α -CD-el reagáltatták, majd az egyensúly beállta után megállapították a kötő helyek számát. Kristályosítás után az enzimmel 4 maltóz vált ki, 4 maltóz kötődött a 4 szubsztrát kötő helyhez, azaz alegységenként egy [50]. Első feltételezések szerint egy kötő helyet 3 kötő alhely alkot, egy katalitikus hellyel alegységenként [65]. A hasító hely a kötőhelyek egyik végéhez közelebb van, amely magyarázhatja a többszörös hasítás mechanizmusát [67]. Szójából származó β AMY aktív helye 6 alhelyből áll, ellentétben az édesburgonya β AMY-éval, amelyre 5 alhelyet valószínűsítettek [41]. Az enzim alhelyeinek a száma limitálja a keményítő felülettel való érintkezését [61]. Búzakorpa eredetű β AMY esetében a hasító hely a 2-es és 3-as alhelyek között található (5. ábra), az alhelyeket balról jobbra számozták, a szubsztrát lánc nem redukáló vége felől [68].



5. ábra: Korpából származó βAMY alhely szerkezetének sematikus ábrája és a szubsztráttal kialakított produktív és nem produktív komplexek [68] i-alhelyek száma, Ax-alhely affinitása

2.5.7. Az édesburgonya β-amiláz hidrolítikus mechanizmusa

"Multiple attack" azaz többszörös hasítási módot először az édesburgonya βAMY-nál figyeltek meg [41,69]. Ekkor az enzim-szubsztrát komplexből kialakult enzim-termék komplexről csak a maltóz, mint nem redukáló végi termék disszociál. A redukáló végi termék, mint új szubsztrátja az enzimnek tovább csúszik annak felületén és egy újabb kötés hasítása történik meg. A folyamat során a βAMY felületéhez több glükóz egység képes egyszerre kapcsolódni, így tud végbemenni a katalízis folyamata majd a keletkező maltóz lediffundál az enzim felületéről, a "maltóz felszabadító helyről" [19]. Mindezek ellenére nem tudtak különbséget tenni a "multiple attack" és egy konszekutívan lezajló reakció között [47]. A továbbcsúszás valószínűségének meghatározására már történtek kísérletek radioaktívan jelzett szubsztrátokon VRK mérések eredményeit használva. [70] Monte Carlo módszer segítségével 0,6-nek adódott ez a szám, a lánchossztól függetlenül [71]. Ezek a mérések azonban nem tudtak különbséget tenni a redukáló és nem redukáló végi maltóz között, így páros tagszámú szubsztrátok hidrolízise nem volt modellezhető.

2.6. DiszperzinB enzim vizsgálatának irodalmi előzményei 2.6.1. Biofilmek

Az orvosi eszközökkel kapcsolatba hozható fertőzéseket a legtöbb esetben biofilmet képző mikroorganizmusok okozzák és világszerte több millió olyan betegnek okoznak problémát, akiknek ilyen eszközöket ültettek be [72,73].

A legfontosabb ilyen baktériumok a S. aureus és S. epidermidis, amelyek orvosi implantátumok felületén telepednek meg, létrehozva a saját maguk alkotta extracelluláris poliszacharid mátrixot (PGA) (biofilmet) és okoznak fertőzéseket [74,75]. Napjaink orvoslásában az egyik legnagyobb probléma ezen biofilmek kialakulása az orvosi eszközök felületén [76]. A National Institute of Health (US) szerint a kórházi fertőzések 80%-a biofilmekkel kapcsolatos [77]. A biofilmek a fogászati problémák mellett a beültetett eszközök kilökődéséhez és a körülöttük található szervek gyulladásához vezethetnek. A kórházakban bekövetkező húgyúti fertőzések 95%-át a beültetett katéterek, a légúti megbetegedések 86%-át a klímaberendezések nem megfelelő tisztítása okozza, valamint a gyakran kórházi kezelés közben felhasznált eszközök, mint például a kanulök felszínén található biofilmek okoznak gyulladást kontaktlencsék [78,79]. А felszínén а mikroorganizmusok alkotta közösségek a szem irritációját és érzékenységét fokozzák [80]. Az elfertőződött sebekben a S. aureus, E. coli fajok képeznek biofilmeket, amelyek hatására súlyos nyiroködéma alakulhat ki [81,82]. Miután ezek a biofilmbe csoportosult baktériumok ellenállnak az antibiotiumoknak, ezért sebészeti vagy probiotikus kezelés segítségével távolíthatók csak el a felületről, illetve csak ezek közreműködésével képesek megakadályozni a baktériumok további elszaporodását. Jelenleg nincs olyan kezelési mód, amelynek segítségével teljesen eltávolítható az összes biofilm sejtcsoportosulás a katéterek felszínéről.

A gyógyszerfeilesztés során illetve a mikrobiológusi gyakorlatban a különböző szerek hatékonyságát általában oldatban vagy táptalajon növő baktériumokon vizsgálták. Az utóbbi évek vizsgálatai azonban kimutatták, hogy bizonyos baktériumok gyorsabban nőnek különböző felületekhez kötötten. Ez a tulajdonságuk merőben megváltoztatja a viselkedésüket és az antibiotikumokkal szembeni érzékenységüket. Így egy biofilmet alkotó, mátrixszal körülvett kolóniában növő baktérium elpusztításához akár ezerszeres dózisú antibiotikum szükséges, szemben egy "normál", nem biofilm-képző baktériummal [83]. A biofilmek évről évre dollármilliárdos része károkat okoznak. Ezen összeg egy különböző készülékek meghibásodásából illetve a lerakódott réteg miatt kialakuló plusz energiafogyasztásból származik, másrészt az orvosi eszközök magasabb sterilezési költségeiből, és az ilyen baktériumok által okozott krónikus betegségek, gyulladások, szövődmények kezelésének árából adódik össze. Az ilyen fertőzések kezelésének kidolgozása még folyamatban van, de enzimek és antibiotikumok együttes alkalmazásával ígéretes eredményeket értek el, mind a biofilm eltávolításában és azok megakadályozásával kapcsolatban [84,85]. DNA-zokat és glikozid hidrolázokat már régóta használnak biofilmek enzimatikus megsemmisítésére vagy biofilm kialakulásának meggátlására [84,85].

A biofilmeket alkotó baktérium tömegeket az önmaguk által szintetizált PGA öleli körül és tartja egyben, ezzel elősegítve, hogy a biofilm a szilárd aljzathoz rögzülni tudjon [86]. Poli-β-D-(1,6)-N-acetil-glükózamin (PGlcNAc) az egyik fő alkotó komponense a biofilm mártixának és közvetítője néhány humán patogén mikroorganizmus intracelluláris adhéziójának, úgymint az *Escherichia coli, a* különböző *Staphylococcusok* [87,88,89] és az *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* [90].

30

A biofilmet általában nem egyfajta baktérium, hanem különböző fajok keveréke alkotja. A baktériumokon kívül gyakran algák, gombák, protozoák is beépülnek a biofilmbe. A különböző szervezetek által termelt biofilmek mátrixa is különböző összetételű [91]. A bevonatban élő sejtek bonyolult szerkezeteket, gyakran másodlagos struktúrákat (pl. mikrokolónia) hoznak létre, melyek között csatornarendszerhez hasonló képződmények biztosítják a tápanyagok megfelelő áramlását az azt felhasználó sejtekhez [92]. A biofilmek érése bonyolult folyamatok sorozatából tevődik össze (6. ábra) [93]. A baktériumok van der Waals kötéssel kapcsolódnak a szilárd felülethez, majd a poliszacharid mátrixba ágyazódnak. Az így kialakult telephez további mikroorganizmusok kapcsolódnak és létrehozzák a mikrokolóniát, amik ha megfelelő számban vannak jelen, kialakul az érett biofilm. Majd ez a mátrix kinyílik, így lehetővé téve a baktériumok kiáramlását és új felületen való megkötődésüket.



6. ábra: Biofilmek érési folyamatának sematikus ábrája; 1: a baktériumok megtapadnak a szilárd felületen, 2: poliszacharid mátrixba ágyazódnak 3: baktérium telep kialakulása 4: további mikroorganizmusok csatlakozása a telephez 5: érett biofilm létrejötte

Az A. actinomycetemcomitans által termelt DspB a baktériumok biofilmből való kiszabadulását segíti elő a poliszacharid mátrix bontásával. A DspB, mint a poliszacharid hidrolízisére képes enzim fontos lehet a biofilmek elleni védekezésben. A folyamat a következő képen zajlana. A már megtapadt kolóniákat DspB-vel kezelve, így megbontva a PGA mártixot, az antibiotikumoknak ellenálló burok megbomlik és eltávolíthatók a felületről. Emellett rezisztenciájuk az antibiotikumokkal szemben is csökken, vagyis ha az eltávolítás nem is teljes a baktérium elpusztítható. PGA mátrixot termelnek a különböző Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok is, ezért a DspB alkalmas lehet az ezek által létrehozott biofilmek eltávolítására is.

A Kane Biotech Inc. munkatársai DspB-vel történő vizsgálatokat végeztek az enzim egészségügyi alkalmazásának céljából [94]. Az enzim hatékonyságát önmagában és különböző antimikrobiális szerekkel kombinálva tesztelték. A kísérletek alapján a következő területeken tervezik a DspB enzim felhasználását:

- 1, orvosi eszközök felszínének bevonására
- 2, sebkezelő termékek
- 3, fogászati termékek
- 4, állatgyógyászati termékekben való alkalmazásra, valamint
- 5, cisztás fibrózis ellen tervezik felhasználni.

2.6.2. Hexózaminidázok általános jellemzői

Az EC 3.2.1.52 csoportba tartozó enzimek az általuk katalizált reakciók alapján "terminális nem redukáló vég felőli N-acetil-D-hexózamin egységet hidrolizáló N-acetil-β-D-hexózaminidázok, amelyek N-acetilglikozidokon és N-acetilgalaktozidokon hatnak".

A GH20 család hexózaminidázai, amelyek kitinen vagy hasonló oligoszacharidokon hatnak, széles körben tanulmányozottak a szerkezet,

inhibíció és reakcióik mechanizmusa alapján [95-99], azonban a $\beta(1,6)$ -Nacetilglükózaminidáz, amelynek eddigi egyetlen ismert képviselője a DiszperzinB (DspB), sokkal kevésbé vizsgált. A GH-K klánba tartozó enzimek, amelyhez a GH20 család is tartozik, (β/α)₈ hordó szerkezetűek, de az aktív hely felépítésében és a katalitikus mechanizmusban különböznek. A vizsgálatok felderítették a katalitikus hely szerkezetét és ezzel együtt azokat az aminosavakat, amelyek a szubsztrát kötésben és a katalízisben részt vesznek. A GH20 család enzimei esetében az aktív hely glutaminsava és a szubsztrát N-acetil csoportja vesz részt a szerkezet megtartó retenciós hasítási mechanizmusban [14]. Megállapították, hogy a 184-es helyen található Glu proton donorként funkcionál karboxil csoportja révén, még a 183-as helyen található Asp a szubsztrát kötésben játszik szerepet.

2.6.3. DiszperzinB enzim

A DspB-t egy szájban található Gram-negatív patogén baktérium az Aggregatibacter actinomycetemcomitans termeli. [90] Ramasubbu és munkatársai 4-nitrofenil- (PNP-) és 4-metilumbelliferil-2-acetamido-2-deoxiβ-D-glükopiranozid segítségével (4-MU-GlcNAc) vizsgálták [100,101]. Chibba és munkatársai 2011-ben 4-nitrofenil-glükozilkarbamát szubsztrát felhasználásával végeztek vizsgálatokat, amely során az enzim aktivitását összehasonlították a kardbabból származó β-hexózaminidázéval [102]. A DspB az N-acetil-glükózaminidázok közé tartozik, egyedülállóan specifikusan bontja a $\beta(1,6)$ glikozidos kötést N-acetil-glükózamin (GlcNAc) egységek között. 4-metoxifenil-β-GlcNAc oligomer vizsgálatok alapján az enzim exo karaktert mutatott [103]. Ezzel ellentétben, PGlcNAc hidrolízise során GlcNAc₉-től GlcNAc₂₈-ig tartó oligomer sorozat keletkezett és a termékarányok alapján *endo* típusú hasítási módot feltételeztek [101].

A DspB szerkezetét Ramasubbu és munkatársai röntgenkrisztallográfiával határozták meg, a PDB adatbázisban 1YHT kód alatt található [75] a GH20 glikozid hidroláz családba besorolva.

Az enzimet 361 aminosav alkotja. Az 1-től 60-ig illetve 91-től 358-ig aminosavak a tipikus TIM-hordó szerkezetet alkotják. Kisebb doménjeit a β 2 (egy α -hélix és 3 β -redő), β 3 (2 α -hélix), β 6 (egy β -hélix) valamint α 7 (egy β -redő és egy α -hélix) alkotják.

Katalitikus doménje homológ a többi humán és bakteriális GH20 családba tartozó hidrolázéval a 40-297-es aminosavakig bezárólag.



7. ábra: A DspB katalitikus helyének felépítése, amely homológ a többi GH 20 családba tartozó enzimével. A Glu184 és az Asp183 katalitikus aminosavak elhelyezkedését mutatja az aktív centrumban, ahol a bekötődő GlcNAc egységet glicerin és ecetsav mimikálja [75]

A C-terminálison található Trp aminosavak konzervatívak [90] a Tyr187 körül viszont gyenge a homológia. Ezen aminosav mutációja a szubsztrát kötését befolyásolja. Az Asp183, a Glu184 és a Glu332 együttesen alkotják a -1-es alhelyet (7. ábra). Az Asp183 kapcsolódik a szubsztrát acetamido csoportjának nitrogénjével, a Glu332 a cukor molekula C3 és C4 hidroxil csoportjaihoz, amellyel stabilizálja a bekötődő GlcNAc egységet. A Trp216, Trp237 és Trp330 alkotják a hidrofób zsebet, amely a GH20 családra jellemző (8. ábra).



8. ábra: DspB enzim aktív centruma, a hasító helyet alkotó aromás aminosavak és a bekötődő GlcNAc egység között kialakuló kötések

A Tyr278 a mozgó hurkon helyezkedik el, a katalitikus hely bejáratát alkotja. A Tyr278 és az Asp183 szerepet játszanak az acetil csoport orientációjában, az Arg27 hidrogénkötést létesít a GlcNAc egység C3, C4 és O atomjaival. A GH20 családra jellemző, hogy aromás aminosavak alkotják a hasító zsebet. A DspB esetében viszont Trp nem található az aktív helven. A +1 és +2-es alhelyek között potenciális kapcsolat áll fenn. A -1-es alhelyen található aminosavak esszenciálisak. A DspB aktív centrumában található aromás aminosavak fontosságát mutáns enzimek segítségével tanulmányozták [100]. Trp237 mutációja teljesen megszűnteti az enzim hidrolítikus aktivitását 4nitrofenil-N-acetil-B-D-glükózamin (PNP- β -GlcNAc) szubsztráton, de kismértékű biofilm eltávolító képessége megmarad. Tyr187 és Tyr278 aminosavak mutációja csökkenti a hidrolítikus aktivitást PNP-β-GlcNAc-on és PGA-n is [100].

Mivel a GlcNAc-tiazolin, amely átmeneti állapot analógja a szubsztrátnak, kompetitív inhibítornak bizonyult, feltételezik, hogy retenciós

35

mechanizmussal, szomszéd csoport segítségével hidrolizálja szubsztrátját. Molekulatömege szekvencia alapján 42 kDa, pH optimuma 5.8, pKa értéke $6,8 \pm 0,1$ [100].

A biofilm poliszacharidok nem jól definiált szubsztrátok és a PGlcNAc molekulák nem rendelkeznek jól definiált szerkezettel, ezért nehéz tanulmányozni enzimatikus degradációjukat. Mivel az enzim diszpergálja és eltávolítja a S. epidermidis által termelt biofilmet, ezért alkalmas lehet antibiofilm ágensként, illetve antiszeptikus Triclosannal együtt alkalmazva széles spektrumú antibiofilm és antimikrobiális aktivitást mutatott [104]. A DspB a korábbi ligand kötő és hidrolízis vizsgálatok során úgy tűnt, hogy specifikusan csak a lineáris, $\beta(1,6)$ kötésű polimer GlcNAc láncon hat és GlcNAc egységet hasítja le a lánc nem redukáló vége felől [103]. $\beta(1.6)$ p-metoxifenil-GlcNAc oligomereket szintetizáltak, kötésű amelynek tagszáma (DP) 2, 4 és 6 volt. A vizsgálatok során arra következtettek, hogy a $\beta(1,6)$ kötésű oligomerek jobban kötődnek az enzim aktív centrumába, mint a $\beta(1,4)$ kötésűek, valamint a DspB *exo* hatásmódú enzim. Sajnos a β kötésű pmetoxifenil aglikont az enzim a hidrolízis vizsgálatok során szintén hasította, amely megakadályozta a pontos HPLC elemzést. Ezen túlmenően, az alkalmazott blokk szintézis következtében csak páros tagszámú oligomerek voltak elérhetőek [103].
3. Célkitűzések

Dolgozatom témája két *exo* hatásmódú glikozidáz enzim működésének vizsgálata volt.

Korábbi tanulmányok a Debreceni Egyetem Biokémia Tanszékén kizárólag az *endo* hatású α-amilázokra korlátozódtak, így az *exo* enzimek vizsgálata új kihívást jelentett.

Az *exo* típusú fehérjék alhely szerkezetének számításához meg kellett határoznom a kinetikai állandókat különböző lánchosszúságú szubsztrátokon és így működési és hasítási módjuk is feltárható. Vizsgálati módszerük a reakciósebességek meghatározása vagy a felhasznált szubsztrát teljes nyomonkövetése volt. Célul tűztük ki egy új analitikai módszer kidolgozását a szubsztrátok teljes hidrolízis reakcióinak követéséhez, amely alkalmas a termékek és szubsztrátok koncentráció változásának követésére az enzimreakció során.

Az édesburgonya a fejlődő világ fontos tápláléka és kitűnő βAMY forrás. Feladatom volt a teljes hidrolízis vizsgálatokhoz nyert adatok feldolgozása és a korábbi irodalomban fellelhető eredményekkel való összevetése. A vizsgálatokhoz a kereskedelemi forgalomban nem kapható kromoforos maltooligomer szubsztrát sorozatot (DP3-15) szintetizáltam. Az orvosi gyakorlatban igen nagy probléma a biofilmek kialakulása a különböző implantátumok felületén. A biofilm mátrixának egyik fő komponense a PGlcNAc. A DspB ezen poliszacharid hidrolízisére képes exo enzim. Célom volt az enzim működési mechanizmusának mélyebb megismerése, a szubsztrátok aktív helyhez való kötődésének és hidrolízisének felderítése, melyhez meg kellett oldani az oligomer kromoforos szubsztrátok valamint a redukáló és nem redukáló végi termékek azonosítását.

37

4. Vizsgálati eredmények és értékelésük

4.1. Az édesburgonya béta-amiláz vizsgálata

4.1.1. A reakciók enzimkoncentráció függése

CNPG7 szubsztrát segítségével különböző enzimkoncentrációknál követtük a teljes hidrolízis reakciókat HPLC módszerrel. A kiindulási szubsztrát koncentrációk 4,61 mM, 4,59 mM és 4,59 mM voltak, a hozzájuk tartozó reakciókban az enzim koncentrációk 4 x 10^{-9} , 8 x 10^{-8} és 2 x 10^{-7} M.



9. ábra: Édesburgonya βAMY enzimreakciónak HPLC módszerrel CNPG7 szubsztráton (4,6 mM) (pH 5.0, [E]= 4 x 10⁻⁹, 8 x 10⁻⁸ és 2 x 10⁻⁷ M) meghatározott reakciósebességeinek függése az alkalmazott enzimkoncentrációtól.

A v_{max}/K_M értékeket ábrázolva az enzimkoncentráció függvényében egy egyenesre illeszkedő pontokat kaptunk (9. ábra). Közel lineáris összefüggést tapasztaltunk, amely azt mutatja, hogy az enzimkoncentráció változásával egyenes arányban változnak a v_{max}/K_M értékek.

Az enzim aktivitása a hígítás függvényében azonban változhat. Mivel az enzim tetramer szerkezetű, több alegységből áll, ezért a túl nagy hígítás során megváltozhat az enzim szerkezete akár kitekeredhet, széteshet alegységekre,

ezért fordulhat elő az, hogy bizonyos hígítás után az enzim jelentősen veszít aktivitásából vagy inaktívvá is válhat. Stabilitás vizsgálatok során megállapítottuk, hogy a β AMY a saját ammónium-acetátos pufferében megtartja aktivitását +4°C-on tárolva 24 órán át.

4.1.2. CNPG5 teljes hidrolízise édesburgonya β-amiláz enzimmel

Kezdeti reakciósebességeket szerettünk volna meghatározni különböző tagszámú szubsztrát sorozaton, azonban már a reakciók kezdeti szakaszában tapasztaltunk olyan folyamatokat (transzglikozilezés, többszörös hasítás), amelyek nem voltak egyértelműen azonosíthatóak. Továbbá a szubsztrátok oldékonysági problémái miatt nem lehetett a méréseket a 0,5-10 K_M koncentráció tartományban végezni, így azokat a K_M és v_{max} meghatározáshoz felhasználni. Ezért úgy döntöttünk, hogy a reakciókat hosszabb ideig követjük nyomon. HPLC módszerrel követtük az egyes szubsztrátok teljes hidrolízisét az időben. Azonos időközönként 5 ul mintát injektáltunk a vizsgált reakcióelegyből a HPLC kolonnára.

Minden esetben a kiindulási szubsztrát lánc egy maltóz egységgel rövidült meg. Páratlan tagszámú szubsztrátok esetében azt tapasztaltuk, hogy a lánc lebontása során a reakció nem megy végig teljesen, a keletkezett CNPG3 bontása már nagyon lassú (10. ábra). β AMY enzim katalizálta kromoforos, CNPG5 szubsztrát enzimatikus, teljes hidrolízise egyszerű egy lépéses reakció. A mért pontokra görbét illesztettünk, amely során a k₅ kinetikai állandó 3,16 x 10⁻⁵ M⁻¹s⁻¹-nek adódott, ahol a k₅ a CNPG5 hidrolízisének sebességi állandója.



10. ábra: Édesburgonya βAMY (3,06 x 10⁻⁸ M) katalizálta CNPG5 (2,42 mM)(pH 5,0) teljes hidrolízisének nyomon követése HPLC módszerrel. (■CNPG5, ○ CNPG3, □ CNPG2, x

CNPG)

Azonban a reakció során megjelenik egy másik végtermék is, amely a CNPG2. Ez azzal magyarázható, hogy amikor a CNPG3 lebontásra kerül, akkor itt a bekötődés során kétféle produktív kötőmód alakulhat ki, amely során nemcsak maltózt, hanem glükóz egységet is képes hasítani az enzim [19]. A keletkezett CNPG2 mennyisége nem elhanyagolható, ezért mindenképpen figyelembe kell venni a mechanizmus leírásakor.

4.1.3. CNPG6 teljes hidrolízise édesburgonya β-amiláz enzimmel

Páros tagszámú szubsztrátok esetében az enzimreakció teljesen végbe megy, a végső termék CNPG2 lesz. CNPG6 hidrolízise során (11. ábra) a keletkezett CNPG4 és CNPG2 a reakció kezdeti szakaszában processzív módon keletkezik, mivel a két termék mennyisége egymással párhuzamosan növekszik.



11. ábra: Édesburgonya βAMY (3,06 x 10⁻⁸ M) katalizálta CNPG6 (4,44 mM) (pH 5,0) teljes hidrolízisének nyomon követése HPLC módszerrel.

(◊ CNPG6, + CNPG4, □ CNPG2)

CNPG6 hidrolízise során a második maltóz egység keletkezésének valószínűsége P= 0,26, amely a következő képlettel számítható a reakció kezdeti szakaszának adataiból:

$$P = \frac{[CNPG2]}{[CNPG2] + [CNPG4]}$$
(3)

A gyors kezdeti hidrolítikus lépés után a kiindulási CNPG6 szubsztrát újra szintetizálódik az enzim által katalizált fordított irányú reakció során. A számított maltóz koncentráció (2,14 mM) hasonló a CNPG6 koncentrációjához (2,7 mM) és magasabb, mint a CNPG4-é (1,26 mM) 20 perc reakcióidő eltelte után. A teljes hidrolízis után pedig CNPG2 lesz a végső termék.

4.1.4. CNPG7 teljes hidrolízise édesburgonya β-amiláz enzimmel

A CNPG7 teljes hidrolízise nagyon hasonló a CNPG6-éhoz. A gyors processzív lépést követően, ahol P=0,5,

$$P = \frac{[CNPG3]}{[CNPG3] + [CNPG5]} \tag{4}$$

CNPG5 és CNPG3 csaknem azonos mennyiségben keletkezett, majd transzglikozilezéssel a CNPG7 koncentrációja újra megnövekedett. A CNPG5 koncentrációja konstans marad a hidrolízis teljes vizsgált ideje alatt, miközben a CNPG7 mennyisége csökken és a második termék a CNPG3 mennyisége folyamatosan növekszik (12. ábra).



12. ábra: Édesburgonya βAMY (6,68 x 10⁻⁹ M) katalizálta CNPG7 (2,95 mM) (pH 5,0) teljes hidrolízisének nyomon követése HPLC módszerrel. (▲ CNPG7, ■CNPG5, ○ CNPG3, □ CNPG2, x CNPG2, x CNPG)

Monte Carlo szimuláció során az édesburgonyából származó βAMY esetében a processzivitás 58%-nak adódott radioaktívan jelzett maltoheptaózon, amelyet papírkromatográfiával követtek, míg 55%-nak szójából származó enzim esetén [41,71]. Ezek az adatok jól egyeznek az általunk meghatározott P értékekkel.

4.1.5. CNPG8 teljes hidrolízise édesburgonya β-amiláz enzimmel

CNPG8 hidrolízise során már a reakció korai szakaszában jelen van a CNPG2, amely két processzív lépést jelent az első hidrolítikus hasítás után. A számított valószínűség a reakció korai szakaszában P=0,8.

$$P = \frac{[CNPG2] + [CNPG4]}{[CNPG2] + [CNPG4] + [CNPG6]}$$
(5)

Transzglikozilezést figyeltünk meg ebben a reakcióban is, amikor a maltóz koncent<u>r</u>árciója elérte a 2,7 mM-t, 25 perc reakcióidő után (13. ábra).



 13. ábra: Édesburgonya βAMY (2,95 x 10⁻⁸ M) katalizálta CNPG8 (3,73 mM) (pH 5,0) teljes hidrolízisének nyomon követése HPLC módszerrel.

(● CNPG8, CNPG6, + CNPG4, □ CNPG2)

Oktamer szubsztráton végzett korábbi szimulációs tanulmányok szerint a G4 kis reakcióképességet mutat [71]. Teljes hidrolízis vizsgálataink során azonban azt láttuk, hogy a CNPG4 koncentrációja nullára csökken és a kromoforos dimer lesz a végső termék. Ez egy nagyon fontos előnye a szubsztrátjainknak, mert így különbséget tudunk tenni a nem redukáló végi és a redukáló végi végtermékek között, amely mindkét esetben maltóz a páros tagszámú maltooligomer szubsztrátok esetén. Úgy gondoljuk, hogy a korábbi sikertelen szimulációk oka ennek a termék komponensnek a hiánya volt.

4.1.6. CNPG11 teljes hidrolízise édesburgonya β-amiláz enzimmel

Az 14. ábrán a CNPG11 βAMY-val történő teljes hidrolízise során mért termékeloszlás látható.

βAMY katalizálta CNPG11 hidrolízise során egyértelmű transzglikozilezés figyelhető meg. A hidrolítikus reakció kezdeti szakaszában fő termékként CNPG3 keletkezett 3 processzív lépés után, de a koncentrációja jelentősen csökkent a következő 90 percben, mialatt minden hosszabb láncú termék és a CNPG11 szubsztrát koncentrációja növekszik. Ezt követően a hidrolízis válik újra dominánssá. Meglepő, hogy a CNPG2 jelentős koncentrációban van jelen, nagyobban, mint a CNPG1.



14. ábra: Édesburgonya βAMY (3,2 x 10⁻⁸ M) katalizálta CNPG11 (2,45 mM) (pH 5,0) teljes hidrolízisének nyomon követése HPLC módszerrel.

4.2. Az édesburgonya β-amiláz enzim vizsgálati eredményeinek értékelése

4.2.1. Teljes hidrolízis vizsgálatok kiértékelése Scientist[®] programmal

A szubsztrátok teljes hidrolízisének követésekor a HPLC módszerrel meghatározott szubsztrát- és termékkoncentráció-idő adatpárokra Scientist® program segítségével kinetikai görbét illesztettünk. A program az általunk felírt modell differenciál egyenletei alapján, iterációval végezte el a számításokat. Példaként a CNPG11 hidrolízisekor felírt differenciálegyenleteket (6-12) mutatom be.

$$\frac{d[CNPG11]}{dt} = -k_{11-9}[CNPG11] - k_{11-7}[CNPG11] - k_{11-5}[CNPG11] - k_{11-3}[CNPG11] (6)$$

$$\frac{d[CNPG9]}{dt} = k_{11-9}[CNPG11] - k_{97}[CNPG9] - k_{95}[CNPG9] - k_{93}[CNPG3] (7)$$

$$\frac{d[CNPG7]}{dt} = k_{11-7}[CNPG11] + k_{97}[CNPG9] - k_{75}[CNPG7] - k_{73}[CNPG7] (8)$$

$$\frac{d[CNPG5]}{dt} = k_{11-5}[CNPG11] + k_{95}[CNPG9] + k_{75}[CNPG7] - k_{53}[CNPG5] (9)$$

$$\frac{d[CNPG3]}{dt} = k_{113}[CNPG11] + k_{93}[CNPG9] + k_{73}[CNPG7] + k_{53}[CNPG5] - k_{32}[CNPG3] - k_{31}[CNPG3] (10)$$

$$\frac{d[CNPG2]}{dt} = k_{32}[CNPG3] \tag{11}$$

$$\frac{d[CNPG]}{dt} = k_{31}[CNPG3]$$
⁽¹²⁾

Az egyenletek módosításaival eljuthatunk a legjobban illeszkedő modellhez. Ezáltal megadhatók az egyes reakciólépések kinetikai állandói és a hidrolízis mechanizmusa is. A reakció során többféle termék képződött, amelyek folyamán párhuzamos és egymást követő reakciólépések egyaránt lejátszódnak. Ezeket figyelembe véve a differenciálegyenleteken változtatva eljuthattunk a legmegfelelőbb modellig (15. ábra).



15. ábra: Édesburgonya βAMY enzim által katalizált CNPG7 teljes hidrolízisének reakciómodellje, ahol párhuzamos és egymást követő reakciólépések következnek be a szubsztrát hidrolízise során (k_{xy}- egy reakciólépés sebességi állandója, ahol x a kiindulási szubsztrát, y pedig az abból keletkezett termék tagszámát jelöli)

A modell megalkotása során egységes jelölést alkalmaztunk. Az egyes reakciólépésekhez tartozó "k" sebességi állandó indexébe a kiindulási szubsztrát és a belőle keletkezett termék tagszáma került. Így a különböző tagszámú CNP maltooligomer sorozat hidrolízise során az azonos lépésekhez tartozó sebességeket azonos indexekkel jelöltünk. Így azok a kiértékelések során egymással összehasonlíthatóak.

Ezt a formulát használva a páratlan tagszámú szubsztrátok esetében kinetikai görbéket illesztettünk a mérési pontjainkra. Az illesztések azonban csak a kezdeti szélsőértékek előtti pontok elhagyásával voltak sikeresek (1. táblázat).

A páros tagszámú szubsztrátok teljes hidrolízis reakciói során a mért pontokra illesztett kinetikai görbékből számított állandókat a 2. táblázatban foglaltam össze.

46

Kinetikai állandók (perc ⁻¹ x 10 ⁻³)	CNPG11	CNPG7	CNPG5
k ₁₁₉	1,92	-	-
k ₉₇	6,3 x 10 ⁻¹⁹	-	-
k ₇₅	4,69	1,17	-
k ₅₃	2,1	6,3 x 10 ⁻⁶	1,9
k ₃₁	6,3 x 10 ⁻¹⁹	0,2	6,3 x 10 ⁻¹⁹
k ₃₂	0,15	8,6 x 10 ⁻⁵	8,2 x 10 ⁻⁵
k ₁₁₇	2,99	-	-
k ₉₅	5,58	-	-
k ₇₃	0,53	1,26	-
k ₅₁	5,4 x 10 ⁻⁶	6,3 x 10 ⁻¹⁹	1,2 x 10 ⁻⁵
Σ	4,91	2,43	1,9

1.táblázat: Páratlan tagszámú CNP-maltooligomer szubsztrátok édesburgonya
 βAMY enzim által katalizált teljes hidrolízis reakcióinak HPLC módszerrel történő vizsgálatából származó kinetikai állandók

 táblázat: Páratlan tagszámú CNP-maltooligomer szubsztrátok édesburgonya βAMY enzim által katalizált teljes hidrolízis reakcióinak HPLC módszerrel történő vizsgálatából származó kinetikai állandók

Kinetikai állandók (perc ⁻¹ x 10 ⁻³)	CNPG8	CNPG6
k ₈₆	0,45	-
k ₆₄	2,13	0,85
k ₄₂	0,59	6,3 x 10 ⁻¹⁹
k ₈₄	0,19	-
k ₆₂	3 x 10 ⁻⁶	0,48
k ₈₂	1,6 x 10 ⁻⁵	-
k _{64a}	-	1,2
Σ	0,64	1,33

A táblázatok minden esetben a reakciók harmadik szakaszának, a teljes hidrolízisek során kapott adatokból számított kinetikai állandókat tartalmazzák. A táblázatok értékelése csak akkor válik lehetővé, ha a kezdeti gyors hidrolízis és transzglikozilezési szakaszt is megfelelően tudjuk leírni. Így ezek az értékek csak megközelítőek és pontos következtetések nem vonhatóak le belőlük, így az egyes reakciólépések sebességei sem meghatározhatóak.

4.2.2. Az édesburgonya β-amiláz katalitikus hatékonysága

A katalitikus hatékonyság számításához a reakciók kezdeti sebességét határoztuk meg kis kiindulási szubsztrát koncentráció mellett, 10% konverzió értékig, HPLC módszerrel. A kezdeti sebességekből a katalitikus hatékonyság értékei a következő (13) alap egyenlettel számíthatók, ha [S] \ll K_M.

$$v_o \approx \left(\frac{v_{\max}}{K_M}\right) [S] \tag{13}$$

A képletben v_{max} megadja az enzim átviteli számát, ha az enzimkoncentráció ismert. A k_{cat} / K_M kifejezés az enzim katalitikus hatékonyságának mérésére szolgál. A katalitikus hatékonyság értékek logaritmusát ábrázoltuk a szubsztrát lánchossz függvényében (16. ábra). A hatékonyság növekszik a szubsztrát lánchosszának növekedésével, amely jelzi, hogy a hosszabb szubsztrátok bekötődése kedvezőbb.



16. ábra: Édesburgonya βAMY enzim által katalizált hidrolízis reakció során CNP maltooligomer sorozaton meghatározott katalitikus hatékonyság értékeinek változása a felhasznált szubsztrátok tagszámának függvényében

4.2.3. Pszeudo elsőrendű kinetikai állandók meghatározása (kobs)

A teljes hidrolízis reakciók első szakaszát használtuk fel a számításokhoz. A különböző mérési időpontokban meghatározott szubsztrát koncentráció értékeket logaritmizáltuk addig a pontig, amíg a szubsztrát mennyiségének csökkenése lineáris. Ez a reakciók első fél, egy órájának időintervalluma. Majd az így kapott pontokra egyenest illesztettünk, amelynek meredekség értékei adták a k_{obs} értéket (17. ábra). A kapott görbe lefutása hasonló a katalitikus hatékonyság meghatározásánál látotthoz. Ez azt mutatja, hogy a reakciók kezdeti, gyors hidrolitikus szakaszánál megállapított kezdeti reakciósebesség értékek és az általunk kidolgozott teljes hidrolízis reakciók követése során kapott eredmények azonos tendenciát mutatnak.



17. ábra: Édesburgonya βAMY enzim által katalizálta, HPLC módszerrel nyomon követett teljes hidrolízis reakciók kezdeti szakaszából meghatározott elsőrendű kinetikai állandók ábrázolása a szubsztrát tagszámának függvényében

4.2.4. Az édesburgonya β-amiláz enzim exo karakterének ellenőrzése

A kezdeti sebesség mérések során kapott termékelegyek már néhány százalék bomlása után is tartalmazták a több maltóz egység lehasításával a szubsztrátból keletkező rövidebb termékeket. Ugyanakkor a termékelegyben nem jelenik meg más nem redukáló végi termék (szabad maltooligomer) csak a maltóz, amint ez a MALDI spektrumon jól látható (18. ábra).



 18. ábra: Édesburgonya βAMY enzim által katalizált CNPG7 hidrolízis reakció MALDI-TOF MS spektruma 1 nap reakcióidő után. A számított m/z értékek: CNPG7= 1330,348;
 CNPG5= 1006,242; CNPG3= 682,132; G2= 365,106, G4= 689,3, amely nem jelenik meg a spektrumon.

A CNPG7 szubsztrát hidrolízisében keletkező trimer jelentős mennyisége ellenére maltotetraóznak (G4) megfelelő m/z értékű csúcs nincs jelen a spektrumban. Ez többszörös hasításra utal, amikor is a redukáló végi termék az enzim felületéről nem disszociál le, hanem tovább csúszik és újabb kötés hasítása következik be. Így a sebesség meghatározásában nemcsak a kötődés, hanem ezen processzív lépések száma is szerepet játszhat, kisebb lesz a sebesség, mert a szubsztrát sokáig elfoglalja az enzimet. Emiatt az alhelytérkép számítások nem lehetségesek.

4.2.5. Az édesburgonya β-amiláz enzim processzivitása

Többszörös hasítási módot írtak le az édesburgonya βAMY esetében [19]. A továbbcsúszás valószínűségének meghatározására már történtek kísérletek. Különböző lánchosszúságú radioaktívan jelzett szubsztrátokon VRK mérések eredményeit használva 0,6-nek adódott ez a szám, a lánchossztól függetlenül [71]. Ezek a mérések azonban nem tudtak különbséget tenni a redukáló és nem redukáló végi maltóz között, így páros tagszámú szubsztrátok hidrolízise nem volt modellezhető (19. ábra) A 19. A ábrán látható, hogy a kiindulási oktamer szubsztrátból csak G6 és G4 termék keletkezését igazolták. Az általunk szintetizált kromoforos szubsztrát vizsgálata során azonban különbséget tudtunk tenni a redukáló és nem redukáló végi termékek között így a reakciókoordináták számításakor a keletkezett CNPG2 mennyiségét is meg tudtuk adni és számolni tudtunk vele. Az enzim működési mechanizmusáról pontosabb képet tudtunk adni. A 19. B árán látható, hogy a keletkezett termékek mennyisége egymással párhuzamosan növekszik.



 ábra: A: Édesburgonya βAMY által katalizált G₈ szubsztrát hidrolízisének VRK mérésekből származó értékei és Monte-Carlo szimulációval a kapott pontokra illesztett görbék [71] és B: édesburgonya βAMY által katalizált HPLC módszerrel nyomon követett CNPG8 szubsztrát hidrolízis reakciójából számított reakciókoordináták összehasonlítása

A processzivitás jelenségét nukleinsav motor enzimek működése során is leírták és matematikai formulát javasoltak a processziv lépés kulcs paraméterének meghatározására (14), amit számításainkhoz is alkalmaztunk [105,106].

$$n = \frac{P}{1 - P} (1 - P^{N}) \tag{14}$$

Ahol P, az a számérték, amely megmutatja, hogy a hidrolízis során a második hasítás mekkora valószínűséggel következik be az enzim-termék komplex disszociációja nélkül. A termék disszociációjának valószínűsége 1-P. Számításához a HPLC-vel meghatározott termékarányokat használtuk. Ennek a valószínűség értéknek a felhasználásával <u>n</u> számítható, amely a processzív lépések átlagos számát adja meg egy enzim-szubsztrát komplex esetén (3. táblázat).

Szubsztrát tagszáma	Р	Ν	n
5	0	1	0
6	0,26	2	0,33
7	0,50	2	0,7
8	0,80	3	1,95
11	0,93	4	3,34

3. táblázat: A szubsztrát (CNP maltooligomer) második hasításának valószínűsége édesburgonya ßAMY enzim felületén (P) az első hasítás után és annak átlagos száma (n)

N: a lehetséges reakciólépések száma

A szubsztrát lánchossz növekedésével növekszik a lépések átlagos száma. Ez a kapcsolat a vizsgált tartományban lineáris, amelyet ábrázolva az x-tengely metszete mutatja, hogy 5 tagú az a legkisebb szubsztrát, ahol még nincs jelen processzivitás (20. ábra).

11-es tagszámú szubsztrát esetén ez az érték 3,34-nek adódott, amely megegyezik az irodalomban leírt 44-es átlagos tagszámú amilózon mért 3,3mal [36]. Ez arra utal, hogy 11 tagnál hosszabb lánc esetén a processzív lépések száma állandósul.



20. ábra: Édesburgonya βAMY enzim processzív lépéseinek száma CNP maltooligomer sorozaton a szubsztrátok lánchosszának függvényében

4.2.6. Transzglikozilezés édesburgonya βAMY által katalizált hidrolízis reakciók során

Megfigyeléseink alapján megállapítottuk, hogy spontán maltóz transzfer következik be a hidrolízis reakció korai szakaszában minden szubsztrát esetében, ahol a processziv hasítás lehetséges. A transzglikozilezéssel keletkezett termékek mennyisége jelentős. Összehasonlítottuk az összetevők koncentrációját a 65-dik és 155-dik percben. A CNPG11 koncentrációja 0,24 mM és 0,54 mM. Ugyanebben a reakcióban a CNPG9 (0,16 és 0,37 mM) és a CNPG7 (0,09 és 0,18 mM) koncentrációjának változása szintén a kétszeres növekedést mutatja. A CNPG9 és CNPG7 a hidrolízis termékei, de a CNPG11 koncentrációjának növekedése csak transzglikozilezés útján következhet be. Hasonló tendencia figvelhető meg CNPG8, CNPG7 és CNPG6 kiindulási szubsztrát esetében (13,12,11 ábra), habár az arány kisebb. Az α-amiláz és más retenciós glikozidázok transzglikozilezési reakciói jól ismertek és részletesen tanulmányozottak [107,108]. Ezt az aktivitást viszont eddig nem írták le inverziós glikozidázoknál hidrolízis reakciók során. Ez az első alkalom, hogy maltooligomer hidrolízise során transzglikozilezés reakciót tudtunk megfigyelni egy inverziós glikozidáz esetében. Ez megerősíti azt a glikozil transzferrel kapcsolatos elgondolást, hogy a hidrolízis és a transzfer megegyező folyamatok és az átmeneti állapotú szerkezet közel azonos a retenciós és inverziós enzimeknél [109]. A processzív reakció feltételezi a redukáló végi termék hosszabb kötődését az aktív centrumba és a felhalmozódó β-maltóz jelenléte miatt a mikroszkópikus reverzibilitás hosszabb transzfer termék formájában jelenik meg.

54

4.3. DiszperzinB enzim vizsgálatának eredményei

4.3.1. Előzetes vizsgálatok tiofenil glikozidokon DiszperzinB és mutáns <u>enzimeivel</u>

Aglikonként kromofor csoportot tartalmazó oligomer szubsztrátokat szintetizáltak (Fekete A. MTA-DE Szénhidrátkémiai Kutatócsoport), amelyek során $\beta(1,6)$ -N-acetilglükózamin-tiofenil glikozid oligomereket (Ph-S-GlcNAc_n) állítottak elő. Polimerizációs fokuk 2-től 5-ig terjedt, amelyek segítségével a DspB hidrolítikus tulajdonságai vizsgálhatóvá váltak [110]. Vizsgáltuk a szubsztrát lánchosszának hatását a hidrolízis sebességére. Megállapítottuk, hogy a dimernél (S₂) hosszabb szubsztrátok esetében a hidrolízis sebessége növekszik a lánchosszal (21. ábra).



21. ábra: DspB által katalizált különböző lánchosszúságú tiofenil glikozidokon vizsgált hidrolízis reakciók időbeli követése HPLC módszerrel ([S]= 0,4 mM; [E]= 2 μM; pH 5.9; T= 25 °C; ο- dimer, ■- trimer, Δ-tetramer, •- pentamer glikozid) [110]

Érdekesség, hogy a tetramer (S_4) és pentamer (S_5) esetében a sebességek közel azonosak. A reakciósebesség tehát növekszik a tetramerig, de az ötödik GlcNAc egység bekötődésével nem tapasztaltunk sebesség növekedést. Ezen eredmények alapján feltételeztük, hogy legalább négy GlcNAc egység szükséges az alhelyek betöltéséhez. Azért, hogy az aromás aminosavak szerepét feltárjuk (22. ábra) a Tyr187Ala, Tyr278Ala és Trp237Ala mutánsok hidrolítikus aktivitását szintén vizsgáltuk tiofenil glikozid szubsztrátokon és összehasonlítottuk a vad típusú enzimével.



22. ábra: A DspB enzim aktív centrumában található aromás aminosavak elhelyezkedése a hasítóhely környezetében (Dr. Mótyán János András, nem közölt ábra)

 S_5 szubsztráton összevetve a hidrolízis sebességeket megállapítottuk, hogy a vad típusú enzim sokkal aktívabb a pentameren, mint a mutánsok (23. ábra).

4. táblázat: DspB és mutáns enzimei által katalizált különböző lánchosszúságú szubsztrátok
 (S₂-S₅) hidrolízis reakcióiknak konverzió értéke 6 óra inkubációs idő után

Szubsztrát	Enzim			
SEubler ut	Vad típusú	Tyr187Ala	Tyr278Ala	
Dimer	4,3	2,8	0	
Trimer	23,2	24,4	2,6	
Tetramer	39,8	15,4	4,36	
Pentamer	49,8	18,0	7,7	

A Trp237Ala mutáns teljesen inaktív volt. Eredményeink megegyeznek Manuel és munkatársai következtetésével [100], miszerint DspB enzim esetében a Trp237 fontos szerepet tölt be a szubsztrát kötésében a hidrofób zsebben.



23. ábra: DspB és mutáns enzimei által katalizált pentamer szubsztrát hidrolízisének konverzió értékei. Δ-DspB vad típus, +- Tyr187Ala, □-Tyr278Ala; az illesztett egyenesek meredekség értékei: DspB m=0,17, b=13,76, r=0,997; Tyr187Ala m=0,073 b=10,5 r=0,999; Tyr278Ala m=0,013 b=10,3, r=0,973. [110]

Az Tyr187Ala mutáció csökkenti a hidrolítikus aktivitást és megváltoztatja a szubsztrátspecifitást (4. táblázat). Eredményeink megerősítették több tandem alhely jelenlétét, mivel a Tyr187 mutációja (távolabb van az aktív helytől) jobban befolyásolta tetramer és pentamer hidrolízisiét, mint a trimerét és dimerét.

4.3.2. Enzimkoncentráció függés vizsgálata

Trimer (S₃) szubsztrát segítségével különböző enzimkoncentrációk mellett követtük nyomon a reakciókat az 5.4. fejezetben leírt körülmények között és az 5.3.1. fejezetben szereplő kromatográfiás rendszerben. A kiindulási szubsztrát koncentráció 3,27 mM volt, az enzimkoncentrációk 2 és 10,5 μ M között változtak a 3 különálló mérés során. Az elsőrendű kinetikai konstansokat a szubsztrát fogyásokból adtuk meg.



24. ábra: DspB enzim által katalizált HPLC módszerrel nyomon követett S₃-on megállapított elsőrendű kinetikai konstansok ábrázolása a reakcióelegyben található DspB enzimkoncentrációjának függvényében

A 24. ábrán látható, hogy az enzimkoncentráció növekedésével a kinetikai állandók is változnak. Ez az összefüggés lineárisnak adódik.

4.3.3. Oligomer szubsztrátok teljes hidrolízisének nyomon követése

Az S2-es szubsztrát teljes hidrolízisét követtük nyomon fordított fázisú HPLC módszerrel А kiindulási szubsztrát koncentráció 3.6 mM. az enzimkoncentráció 8,3 µM volt. A mérések során a dimer szubsztrátból egyértelműen csak monomer keletkezett. egy glikozidos kötés felhasadásával. A kinetikai görbék kiértékelése (25. ábra) után a $k_{21}=0.95$ perc⁻¹x10⁻³-nak adódott. А dimer hidrolízisére а következő reakciómechanizmus írható fel:

$$S_2 \xrightarrow{k_{21}} S_1$$

Az S₃-as szubsztrát teljes hidrolízisét követtük nyomon fordított fázisú HPLC módszerrel. A kiindulási szubsztrát koncentráció 3,6 mM, az enzimkoncentráció 8,3 μ M volt. A trimer hidrolízise tipikus konszekutív reakciómintázatot mutat (25. ábra). A dimer termék mennyisége növekszik

meg először, majd megjelenik a monomer termék és növekszik mialatt a dimer mennyisége csökkenni kezd. A kapott kinetikai állandók a következőknek adódtak: $k_{32}=1,76$; $k_{21}=0,68$; $k_{31}=0,28$ perc⁻¹x10⁻³. A reakció leírására javasolt mechanizmus a következő, amely során a k_{31} elhanyagolható:



A S₄-es szubsztrát teljes hidrolízise során a kiindulási szubsztrát koncentráció 3,6 mM, az enzimkoncentráció 8,3 μ M volt. A termékeloszlás a tetramer esetében eltérő hatásmódot mutat (25. ábra).



25. ábra: Szubsztrát és keletkezett termékek koncentrációjának ábrázolása a mintavétel időpontjainak függvényében Scientist programmal. Az értékek az S₂-S₅ (3,6 mM) szubsztrát sorozat DspB (8,3 μM) által katalizált teljes hidrolízis reakcióinak HPLC módszerrel történő nyomon követéséből származnak. A görbék a válsztott modell alapján Scientist programmal illesztettek. (S₅, S₄, S₃, S₂, S₁)

A reakció korai szakaszában a trimer és a dimer termékek mennyisége azonos. Ez alátámasztja azt, hogy nem csak egymást követő lépésekből álló reakcióról van szó, hanem vagy a többféle produktív kötőmód következtében a javasolt reakcióséma parallel vagy a konszekutív reakciólépések mellett megjelenik egy úgynevezett "*multiple attack*" lépés. Ennek során a kiindulási tetramer szubsztrát az első GlcNAc egység felszabadulása után nem hidrolizál le az enzim felületéről, hanem azon továbbcsúszva egy újabb monomer egység lehasadása következik be. Így a tetramerből közvetlenül dimer is képződik. Ennek eldöntésére végeztünk MALDI-TOF MS méréseket.

A kinetikai állandók párhuzamos reakciókat feltételezve a következőknek adódtak: $k_{43}=1,85$; $k_{42}=1,46$; $k_{32}=2,06$; $k_{21}=1,46$ perc⁻¹ x10⁻³. A javasolt reakcióséma a következő:

$$\begin{array}{ccc} \mathsf{S}_4 & \xrightarrow{\mathsf{k}_{43}} \mathsf{S}_3 \xrightarrow{\mathsf{k}_{32}} \mathsf{S}_2 \xrightarrow{\mathsf{k}_{21}} \mathsf{S}_1 \\ & & & & \\ & & &$$

A tetramerhez hasonlóan a pentamer szubsztrát esetében is eltérést tapasztalunk az egymást követő reakció képtől. A tetramer, a trimer és a dimer mennyisége a teljes hidrolízis reakció első szakaszában azonos sebességgel nő (25. ábra). Ez is magyarázható a parallel vagy processzív hasítással. A monomer mennyisége a vártnak megfelelően változik, majd végső termékként felszaporodik. A Scientist[®] program által meghatározott kinetikai állandók a következők lettek: $k_{54}=3,8$; $k_{53}=2,36$; $k_{52}=0,69$; $k_{43}=2,11$; $k_{42}=2,58$; $k_{32}=2,2$; $k_{31}=1,25$; $k_{21}=0,76$ perc⁻¹ x10⁻³.

A reakciómechanizmus egy konszekutív reakciósort mutat paralel lépésekkel, amelyekben jelöltük a nem redukáló végi termékeket is (P: GlcNAc, P₂: GlcNAc₂, P₃: GlcNAc₃).



A paralel reakciólépések termékei szintén szubsztrátjai a DspB-nek, a tetramer és trimer mennyiségének csökkenése igazolja ezt, valamint a dimer mennyiségének növekedése a konszekutív reakciólépésnek köszönhetően.

4.4. DiszperzinB enzim vizsgálati eredményeinek értékelése

4.4.1. Retenciós hidrolízis mód igazolása

¹H-NMR módszert alkalmaztunk a retenciós hasítási mód igazolására. Sorozatméréseket végeztünk, szubsztrátként para-nitrofenil-β-D-Nacetilglükózamint használva. Retenciós hasítási mód során az anomer központ konfigurációja megmarad, DspB esetében a keletkezett termék glikozidos csoportja β térállást vesz fel. A mérések során megjelenő βanomer proton az enzim retenciós mechanizmusára utal. A jelek időbeli változását követve megállapítható (26. ábra), hogy még az aromás jelek csökkenésével a hozzájuk rendelhető új jelek párhuzamosan növekednek, addig az eredeti β-anomer proton jelének csökkenését később követi az αanomer proton jelének növekedése.



26. ábra: Para-nitrofenil-β-D-N-acetilglükózamin DspB-vel történő reakciójának ¹H-NMR spektruma; az aromás és anomer protonok jeleinek eltolódása a reakció előrehaladtával

Ez azt mutatja, hogy a reakció során β anomer keletkezik (jele a víz jel miatt nem értékelhető) és mutarotációval α -konfigurációjúvá válik, amíg az egyensúly be nem áll. A mérések során a kapott jelek intenzitásának kiértékelése is megtörtént. A jelek intenzitásának változása is igazolja azt, hogy a DspB retenciós mechanizmussal hidrolizálja szubsztrátját (27. ábra).



27. ábra: A különböző proton csúcsokhoz tartozó jelintenzitások változása az ¹H-NMR mérés során (◊-aromás protonok jele a glikozidban, ◊-aromás protonok jele a szabad PNPben, □-β-anomer protonok jele a glikozidban, □-szabad monoszacharid α-anomer protonok jele)

4.4.2. Oxazolin közti termék kimutatása és szintézise

А β-hexózaminidázokkal való homológia alapján enzim az hatásmechanizmusánál oxazolin köztitermék keletkezését egy valószínűsítették. Az oxazolin kialakulása során vízkilépés mellett, a cukormolekula szénatomja és a GlcNAc N-acetil csoportja között gyűrűzáródás következik be. Feltételezik, hogy ez a közti termék a PNAG hidrolízis során keletkezik, segíti azt, majd víz belépése során hidrolizál és visszaalakul a kiindulási GlcNAc egységgé.

A reakciót ¹H-NMR sorozatmérés segítségével követtük nyomon, 10 mM PNP-β-D-GlcNAc szubsztrátot és 10 μl DspB (3,63 mg/ml) enzimet alkalmazva. Az oxazolinnak 6 ppm környékén kellene látszódnia az ¹H-NMR spektrumon [111]. A mérések során azonban ezt egyszer sem tapasztaltuk (28. ábra).

Ennek oka lehet, hogy a reakció vizes közegben játszódik le, ahol az oxazolin vízfelvétellel visszaalakul a kiindulási GlcNAc-á. A termék instabilitása miatt feltehetően kialakul egy olyan dinamikus egyensúly a képződés

63

visszaalakulás között, mely során a keletkező oxazolin koncentrációja nem éri el az ¹H-NMR mérés során a kimutathatósági alsó határát (10-100 μ M).



28. ábra: Oxazolin közti termék kimutatásának kísérlete ¹H-NMR segítségével 10 mM PNPβ-D-GlcNac és 10 μl DspB (3,63 mg/ml) enzim felhasználásval

Próbálkozásaink oxazolin szintetikus útonon történő előállítására Yuan He és munkatársai módszere alapján [112] és szintézis reakciókban való felhasználására nem vezetettek eredményre.

<u>4.4.3. Pszeudo elsőrendű kinetikai értékelése a DspB által katalizált teljes</u> <u>hidrolízis reakcióknak</u>

A hidrolízis reakciók időbeli függésének kiértékeléséhez jobb módszerek is léteznek. kezdeti reakciósebességek meghatározása. mint а Az adatfeldolgozás ilyen módja lehetővé teszi, hogy az enzim működéséről is információt szerezzünk. Az enzimreakciók idő függésének kiértékelését és alapelveit Duggleby írta le először [34]. Ez a megközelítés azonban nem kezeli a konszekutív reakciókat. Jó néhány enzimre jellemző, hogy olyan reakciókat katalizálnak, amelyekben több, azonos hidrolítikus lépés következik egymás után. Ilyenek például a lipázok, foszfatázok. glikozidázok. Ugyanazon enzimek sorozat reakcióinak kiértékelésére

Mitchell és munkatársai fejlesztettek ki módszert [113], de az a modell nem foglalta magába a parallel reakciót első lépésként. A mi modellünk a reakciót az időben folyamatosan nyomon követi, bár az enzim-szubsztrát komplex kialakulását nem kezeli külön lépésként. A Scientist[®] software lehetőséget ad illesszünk arra, hogy а mért pontokra görbéket modell egyenletek/összefüggések alapján. A pszeudo első rendű kinetikai konstansok k_{obs} számításra kerültek (5. táblázat). A konstansok értékeinek növekedése is azt mutatja, hogy hosszabb szubsztrátok szükségesek a teljes alhely térkép megalkotásához.

5. táblázat: DspB enzim által katalizált HPLC módszerrel követett teljes hidrolízis reakciók kiértékeléséből származó elsőrendű kinetikai állandóik

	Pentamer	Tetramer	Trimer	Dimer
k_{obs} (perc ⁻¹)	6,7	3,2	2,2	1,0

4.4.4. Több produktív kötőmód jelenlétének kimutatása oligomer szubsztrátokon

A nem redukáló végi termékek összetételét a reakcióelegyben MALDI-TOF módszerrel határoztuk meg. A reakcióelegyben megjelenő kromoforos és szabad oligomerek számított és mért m/z értékei a 6. táblázatban találhatóak.

A 29. ábrán látható a pentamer hidrolízis reakcióelegyének spektruma különböző időpontokban. 10 perc elteltével (29. ábra A) két redukáló végi termék, a tetramer (S₄) és a trimer (S₃) jelenik meg, ezzel párhuzamosan az annak megfelelő monomer (P₁) és dimer (P₂) nem redukáló végi termékek is láthatóvá válnak.

6. Táblázat: DspB enzim által katalizált pentamer szubsztrát hidrolízise során keletkezett reakcióelegy alkotóinak nátriummal ionizált MALDI-TOF MS spektrumból mért és számított m/z értékei

DP	Ph-β-S-GlcNAc _x sorozat		GlcNAc _x sorozat	
X érték	számított	mért	számított	mért
1	336,090	336,1	244,080	244,3
2	539,157	539,1	447,159	447,1
3	742,246	742,2	650,238	650,2
4	945,526	945,2	853,318	-

A 204,3 Da m/z értékkel rendelkező $[M-H_2O+H]^+$ csúcs is megjelenik. Ez az m/z érték jelezheti az oxazolin jelenlétét, a szubsztrát segítette hidrolízis mechanizmus közti termékét DspB esetében, amelyet korábban már javasoltak [100]. Azonban lehet műtermék is, mivel jelét megfigyeltük GlcNAc spektrum felvétele során is. 20 perc elteltével (29. ábra B) minden redukáló végi és nem redukáló végi termékpár (S₄+P, S₃+P₂, S₂+P₃) jelen van a tömegspektrumon. Egy órával az enzimreakció elindítása után (29. ábra C) a konszekutív reakció utolsó végtermékeként megjelenik a monomer glikozid. Egy nap elteltével (29. ábra D) az egymást követő reakció lépések termékei az S, S₂ és P, P₂ válnak fő termékekké.

A további kísérletek során a kromoforral jelölt redukáló végi termékek vizsgálatát végeztem el.



29. ábra: DspB által katalizált pentamer szubsztrát hidrolízis reakciójának különböző időpontokban rögzített MALDI-TOF spektruma, S_x- redukáló végi termékek, P_x- nem redukáló végi termékek (A: 10 perc, B: 20 perc, C: 60 perc, D: 1 nap)

4.4.5. Katalitikus hatékonyság vizsgálata oligomer sorozaton

A katalitikus hatékonyság meghatározása során 3 független méréssort használtunk.

A reakciók kezdeti sebességét kis szubsztrát koncentrációk mellett (0,2 mM) határoztuk meg, a termékek koncentrációjának változását HPLC módszerrel követtük nyomon szakaszos mérési módszerrel. A koncentráció-idő adatpárokra illesztett egyenesek meredeksége adja a kezdeti sebességeket, amelyekből a katalitikus hatékonyság k_{cat}/K_M értékeit számítottuk a (13)-as egyenlet alapján. A szubsztrát koncentráció-idő adatpárok a teljes hidrolízis reakciók kivonatai. Az adat pontokra a Scientist[®] programmal illesztettem kinetikai görbéket a Michaelis-Menten egyenlet alapján. A k_{cat}/K_M értékek a számított v_{max} és K_M értékekből valamit a teljes enzim koncentrációból [E]₀ adódnak.

Végül, kezdeti reakciósebességet határoztam meg a szubsztrát koncentrációjának változásából. A kezdeti reakciósebesség lineárisan növekszik alacsony szubsztrát koncentráció mellett, amikor a termék keletkezése függ a szubsztrát és az enzim koncentrációjától. A görbe lineáris szakaszának meredeksége megegyezik a k_2/K_M sebességi állandóval, amelyből a katalitikus hatékonyság számolható. A kapott hatékonyság értékek átlaga és szummája a 30. ábrán látható.

A katalitikus hatékonyság növekszik a szubsztrát lánchosszának a növekedésével (2,11; 6,07; 7,11; 8,6 M⁻¹s⁻¹), jelezve a hosszabb szubsztrátok preferáltabb kötését és nagyobb reakció készségét. A számított pszeudo elsőrendű kinetikai konstansok hasonló értékeket és tendenciát mutatnak.



30.ábra: DspB enzimáltal katalizált HPLC módszerrel követett teljes hidrolízis reakciók tiofenil glikozidokon (S₂-S₅) megállapított katalitikus hatékonyság átlag értékei és az elsőrendű kinetikai állandók ábrázolása a felhasznált szubsztrátok lánchosszának függvényében

4.4.6. Javaslat az aktív hely alhely szerkezetére

Szisztematikus bontási kép és kinetikai vizsgálatokat végeztem oligomer szubsztrát sorozaton, hogy megadjam a DspB enzim aktív helyének szerkezetét és hasítási módját. Szigorúan nem redukáló végi specifitást és több produktív kötőmód jelenlétét igazoltam MALDI-TOF MS és HPLC mérések alapján. A folyamat (teljes hidrolízis) görbék analízise azt is mutatja, hogy a több produktív kötőmód eredményeként a hosszabb szubsztrátok esetében (tetramer és pentamer) parallel reakció megy végbe. Monoton növekedést figyeltem meg a k_{cat}/K_M és a pszeudo elsőrendű kinetikai állandók esetében a kinetikai értékelések során (7. táblázat).

Paraméter	Kinetikai konstans (perc ⁻¹ x10 ⁻³)				
1 urunieter	pentamer	tetramer	trimer	dimer	
k ₅₄	3,82	-	-	-	
k ₅₃	2,36	-	-	-	
k ₅₂	0,66	-	-	-	
k ₅₁	0	-	-	-	
k ₄₃	2,11	1,85	-	-	
k ₄₂	2,66	1,46	-	-	
k ₄₁	0	0	-	-	
k ₃₂	2,2	2,06	1,76	-	
k ₃₁	0,76	0	0,28	-	
k ₂₁	1,26	1,46	0,68	0,95	
Σ^{a}	6,84	3,33	2,04	0,95	
k' (PFO)	6,7	3,2	2,2	1,0	
k _{cat} /K _m ^b	8,60±1,27	7,11±1,03	6,07±1,27	2,11±1,25	

7. táblázat: DspB enzim által katalizált tiofenil glikozidokon HPLC módszerrel követett teljes hidrolízis reakciók során számított pszeudo elsőrendű kinetikai állandók

^a az adott szubsztrát összesített kinetikai állandója

 ${}^{b}M^{-1}s^{-1}$

- az adat nem számított

0 számolt adat de nagyon alacsony érték

Az új monomer egység bekötődése az aktív centrumba javítja a szubsztrát bekötődését a katalitikus helyhez. Ezek az adatok tisztán mutatják, hogy 5

GlcNAc egység a szubsztrátban nem elég ahhoz, hogy az enzim összes alhelyét lefedje. Ahhoz, hogy a teljes alhely térkép sikeresen meghatározható legyen hosszabb szubsztrátokra lenne szükség.

4.4.7. DiszperzinB enzim szigorú nem redukáló végi specifitásának igazolása

A 31. ábrán azonos méréssorból származó adatok kétféle kiértékelése látható. Bontási kép vizsgálatok során a HPLC kromatogramokon látható csúcsok területeinek egymáshoz viszonyított arányát adjuk meg. Az első esetben a teljes hidrolízis vizsgálatok során az egy órás mintavételkor rögzített kromatogram bontási kép kiértékeléséből származó arányok, a második sorban a különböző szubsztrátok teljes hidrolízise során a Scientist[®] program által a mért pontokra illesztett görbékből számított kinetikai állandók aránya látható. Hexamer szubsztrát esetében csak bontási kép adatok álltak rendelkezésünkre, kinetikai mérések ezen a szubsztrátok nem történtek.

A két eltérő kiértékelési módszer által számított arányok jó egyezést mutatnak. Ez is alátámasztja az általunk javasolt modell helyességét. Korábban azt feltételezték, hogy a különböző produktív kötő módok esetében a hasítási együtthatók egyenlőek, valamint a kötéshasítás relaítv aránya függ a kötő mód preferenciájától. DspB szigorúan nem redukáló végi preferenciát mutat, de több produktív kötőmód is lehetséges.

$$\begin{array}{c|cccccc} \mathbf{O} - \mathbf{\triangle} \\ 100 \\ \mathbf{O} - \mathbf{O} - \mathbf{\Box} \\ 100 \\ 100 \\ k \ ar ánya \\ \mathbf{O} - \mathbf{O} - \mathbf{O} - \mathbf{\Box} \\ 90 \\ 10 \\ 86 \\ 14 \\ \mathbf{O} - \mathbf{O} - \mathbf{O} - \mathbf{O} - \mathbf{\Box} \\ 52 \\ 48 \\ 56 \\ 44 \\ 0 \\ \mathbf{O} - \mathbf{O} - \mathbf{O} - \mathbf{O} - \mathbf{O} - \mathbf{\Box} \\ 52 \\ 44 \\ 0 \\ \mathbf{O} - \mathbf{O} - \mathbf{O} - \mathbf{O} - \mathbf{O} - \mathbf{\Box} \\ 56 \\ 34 \\ 10 \\ 0 \\ \mathbf{O} - \mathbf{O} - \mathbf{O} - \mathbf{O} - \mathbf{O} - \mathbf{O} - \mathbf{\Box} \\ 60 \\ 36 \\ 34 \\ 10 \\ 0 \\ \mathbf{O} - \mathbf{O} - \mathbf{O} - \mathbf{O} - \mathbf{O} - \mathbf{O} - \mathbf{O} \\ \mathbf{A} \\ 46 \\ 25 \\ 17 \\ 6 \\ 6 \end{array}$$

31. ábra: DspB enzim tiofenil glikozidokon meghatározott bontási képeinek vizsgálata; felső értékek: teljes hidrolízis reakciók kezdeti szakaszából származó kromatogramon látható termékek egymáshoz viszonyított aránya; *alsó értékek*: Scientist® program által megadott kinetikai állandók egymáshoz vizsonyított aránya ugyanabban a reakcióelegyben (O-GlcNAc egység, - β(1-6) glikozidos kötés, □- tiofenil aglikon, Δ- 4-nitrofenil aglikon, ◊- 4-metoxifenil aglikon)

4.4.8. Javaslat az DiszperzinB enzim CAZy rendszerbe történő besorolására

A DspB EC 3.2.1.52 [90] és/ vagy GH 20 családba és EC 3.2.1.- (CAZy)-ba történő besorolása már korábban megtörtént, a specifitás, a szekvencia homológiája és mechanizmus azonosság alapján. Az EC 3.2.1.52 csoportba tartozó enzimek az általuk katalizált reakciók alapján "terminális nem redukáló vég felőli N-acetil-D-hexózamin egységet hidrolizáló N-acetil-β-Dhexózaminidázok, amelyek N-acetilglikozidokon és N-acetilgalaktozidokon hatnak". A DspB csak PNP-β-GlcNAc-on hat, PNP-β-GalNac-on nem [90]. Valószínűleg ez az oka annak, hogy a CAZy adatbázis az EC 3.2.1.tipológiát használja. Az EC 3.2.1.30 β-D-acetilglükózaminidáz kategória törölve lett és beleillesztették az EC 3.2.1.52 β-D-N-acetilhexózaminidázok közé. Mindamellett más adatbázisok, mint BRENDA (BRENDA: Enzimek Széleskörű Információs Rendszere (http://www.brenda-enzymes.info/) és a PDB még mindig az EC 3.2.1.52 osztályba sorolják az enzimet. Ezért javasoljuk az EC 3.2.1.- általános használatát, mivel a DspB nem hidrolizál N-acetilgalaktozidokat [90], több produktív kötőmódot képes kialakítani és nem valódi *exo* enzim.
5. Felhasznált anyagok és módszerek

5.1. Felhasznált enzimek

5.1.1. Az édesburgonyából származó β-amiláz

A vizsgálat során használt natív β AMY édes burgonyából származott (EC 3.2.1.2). Az enzimet a Serva gyártotta, aktivitás értéke ~ 500 U/mg. Az enzim hígításához külön hígító puffert alkalmaztunk (2,45 M (NH₄)₂SO₄, pH 3,7), így aktivitása akár 3-5 hétig is azonos szinten tartható volt. A kis koncentrációjú mérések esetében 1,75 x 10⁻⁹ M, még a szubsztrátok teljes hidrolízis vizsgálatainál 6,68 x 10⁻⁹ és 3,25 x 10⁻⁸ M (reakcióelegy térfogatától függően) enzimkoncentrációkat alkalmaztunk. Alegység molekulatömegét és tisztaságát SDS PAGE segítségével igazoltuk (1. kép).



 kép: A vizsgálatokhoz használt édesburgonya βAMY SDS PAGE képe, amelyen 55 kDa tömegegységnél látható széles sáv a βAMY enzimet jelzi

5.1.2. DiszperzinB

Az enzimet (EC szám: 3.2.1.52 vagy 3.2.1.- CAZy) a KANE Biotech Inc-től (Winnipeg, Canada) vásároltuk [94]. A rekombináns fehérje molekulatömegét 41,78 kDa-nak adták meg, amely jó egyezést mutatott az általunk felvett MALDI-TOF tömegspektrummal ([M+H]⁺ m/z= 41,79 kDa). A fehérje elméleti molekulatömegét a Q840G9 UniProt szekvencia felhasználásával számítottuk. A spektrumon látható, hogy az enzim preparátum tiszta (32. ábra).

A szilárd enzim 3,48 mg-ját oldottuk 1000 µl 20 mM TrisHCl-t (pH 7,5) és 500 mM NaCl-t tartalmazó pufferben, amelyet 4 °C-on tároltunk. Ezt a törzsoldatot használtuk fel a mérésekhez.



32. ábra: DspB enzim MALDI-TOF MS spektruma: $\rm [M+2H]^{2+}$ m/z=20,87 kDa, $\rm [M+H]^{+}$ m/z=41,79 kDa and $\rm [2M+H]^{+}$ m/z=83,54 kDa

5.1.3. Nyúl vázizom glikogén foszforiláz b

Az enzimet CNP-maltooligomer sorozat szintéziséhez használtuk fel, amelyet nyúl vázizom szövetéből preparáltak a Debreceni Egyetem Orvosi Vegytani

Intézetében Dr. Docsa Tibor és munkatársai. A fehérje aktivitása △E=1000 E/ml, 163 mg/ml fehérjét tartalmazott.

5.2. Felhasznált szubsztrátok

5.2.1. 2-klór-4-nitrofenol (CNP) maltooligomerek

A kromoforral jelölt maltooligomer sorozatot kemoenzimatikus úton állítottuk elő. A Debreceni Egyetem Biokémia Tanszékén β-ciklodextrinből kromofor csoporttal jelölt maltoheptaózt állítottak elő (CNPG7) [114]. Ezt kiindulási vegyületként használtuk fel. A 3-6 tagszámú szubsztrátok előállításához a glikogén foszforiláz b enzimnek azt a tulajdonságát használtuk fel, hogy maltooligomerekből a láncvégi glükóz egységet képes lehasítani glükóz-1-foszfát (G-1-P) keletkezése közben. A reakcióelegy a következő volt: 7,6 mM CNPG7-et feloldottunk 5 ml pufferben (4 mM AMP, 2 mM EDTA, 1 M Na₂HPO₄, 17 μl β-merkaptoetanol, pH 6,8), a reakció 10 foszforiláz hozzáadásával μl glikogén b indult. Az elegyet szobahőmérsékleten inkubáltuk 40 percig. Az inkubációs idő változtatásával lehetőség van a termékösszetétel befolyásolására [115,116]. A hosszabb tagszámú szubsztrátok előállítása hasonlóképpen zajlik, azzal a különbséggel, hogy abban az esetben 115 mM G-1-P jelenlétében a szintézis irányába történik (puffer: 4 mM AMP, 2 mM EDTA, 25 mM β-glicerofoszfát, 17 μl βmerkaptoetanol, pH 6,8). Az így kapott maltooligomer sorozatot (33. ábra) használtuk fel az édesburgonyából származó BAMY feltérképezésére. A maltooligomereket a kromofor csoport abszorpciós maxumumán, 302 nm-es hullámhosszon detektáltuk.



33. ábra: Édesburgonya βAMY vizsgálatokhoz felhasznált 2-klór-4-nitrofenol (CNP) maltooligomer sorozat szerkezeti képlete

5.2.2. N-acetilglükózamin oligomerek



34. ábra: DspB enzim vizsgálatokhoz felhasznált tiofenil-N-acetilglükózamin oligomer sorozat szintézisének lépései [110]

A DspB vizsgálatokhoz a megfelelő kromoforral jelölt szubsztrát sorozatot (34. ábra) Dr. Fekete Anikó a Debreceni Egyetem Szénhidrátkémiai Kutatócsoportjának tagja állította elő [110]. A többlépéses szintézis során a kapott maltooligomer sorozat tagszáma 2-5. Kromoforként tiofenol (-SPh) aglikont használtak, amelynek abszorpciós maximuma 254 nm hullámhosszon található, amelyen a HPLC-s detektálás is történt. A

szubsztrátok tisztaságát MALDI-TOF módszerrel ellenőrizték. A reakciók során a keletkezett termékeket standardok használatával azonosítottuk.

5.3. A vizsgálatokhoz használt módszerek

5.3.1. Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC)

A folyadékkromatogriáfiás vizsgálatokhoz kétféle készüléket alkalmaztunk. Az egyik egy Hewlett Packard 1090 folyadékkromatográf volt, amely diódasoros detektorral, automata mindaadagolóval és ChemStation-nal volt felszerelve. A preparatív készülék Youngling típusú, gázmentesítővel, kézi mintaadagolóval, valamint UV-Vis és Corona Cad detektorral volt ellátva. A mérésekhez használt acetonitril gradiens tisztaságú volt (VWR HiPerSolv Chromanorm_®), a 3-szorosan ioncserélt víz ioncserélővel és szénszűrűvel felszerelt tisztítóberendezésből származott (Millipore, Bedford, MA, USA). Az analitikai mérések során felhasznált kolonnák és paramétereik:

- Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 μm) MeCN : H₂O = 1:9, 1 ml/perc áramlási sebesség
- Kinetex XB-C18 (100 mm x 4.6 mm, 2,6 μm)
 MeCN : H₂O = 1:9, 0,8 ml/perc áramlási sebesség
- YMC Polyamine II (250 mm x 4,6 mm, 5 μm)
 MeCN : H₂O = 6:4, 1 ml/perc áramlási sebesség (kontrolként)

Preparatív tisztítások során felhasznált kolonnák:

- SupelcosilTM LC-18 (250 mm x 10 mm, 5 μm) MeCN : H₂O = 2:8, 3 ml/perc áramlási sebesség
- YMC Polyamine félpreparatív (250 mm x 10mm, 5 μm) MeCN : H₂O = 6:4, 4 ml/perc áramlási sebesség

A mérések során az eluens összetétele néhány százalékkal változtatható a jobb elválasztás érdekében.

5.3.2. Kalibrációs görbék készítése koncentráció meghatározásához és enzimkoncentráció függéshez HPLC módszerrel

A β AMY enzim vizsgálatnál szükség volt egy kalibrációs görbe felvételére, amely segítette az enzimreakciók során a szubsztrát fogyásának nyomon követését és a keletkezett termékek mennyiségének meghatározását. Az általunk használt mérési tartományban, mM-os koncentrációjú oldatokat készítettünk el. Azonos térfogatot injektálva (5 µl) a kolonnára összevethetőek a mért csúcs alatti területek. A szubsztrát koncentrációk függvényében ábrázoltuk a csúcs alatti területeket (35. ábra) majd a kapott pontokra egyenest illesztettünk. A kapott egyenes meredeksége és tengelymetszete használható a termékkoncentrációk számításához.



35. ábra: CNP csoporttal jelölt maltooligoszacharidok koncentrációjának meghatározásához használt kalibrációs egyenes, amely CNPG7 szubsztrát különböző koncentrációjú oldataiból készült fordított fázisú HPLC módszerrel

DspB enzim esetében a különböző tagszámú oligoszacharid szubsztrátok (DP 2-5) hidrolízise során a szubsztrát mennyiségének változását és a keletkezett termékeket fordított fázisú HPLC módszerrel követtük nyomon. Kalibrációs egyenest készítettünk annak érdekében, hogy az enzimkinetikai mérések során a keletkezett termékek koncentrációját meg tudjuk állapítani. Ehhez S_3 különböző koncentrációjú standard oldataiból azonos térfogatokat (5 µl)

injektáltunk a rendszerbe, majd a kapott csúcs alatti területeket ábrázoltuk a koncentráció függvényében (36. ábra). A kapott pontokra illesztett egyenes meredekség értékével és a tengelymetszet felhasználásával pontos termékkoncentrációkat tudtunk megadni.



36. ábra: DspB enzim vizsgálatához felhasznált szubsztrátok (S-S₅) koncentrációinak meghatározásához készített kalibrációs egyenes. HPLC kromatogramokon található csúcsok területeinek ábrázolása a bemért S₃ szubsztrát koncentrációinak függvényében.

Mindkét enzim esetében az enzimkoncentráció függésének vizsgálatához a Scientist[®] program segítségével a szubsztrát fogyásokat (mM) ábrázoltuk a mintavétel időpontjának függvényében. Majd a Michaelis-Menten összefüggés alapján görbét illesztettünk a pontokra. A program megadta az általa számított K_M és v_{max} értékeket, amelyekből képezhetők hányadosaik (8. táblázat).

8. táblázat: Édesburgonya βAMY által katalizált HPLC módszerrel nyomon követett CNPG7 teljes hidrolíziséből Scientist[®] program segítségével meghatározott v_{max}/K_M értékek és a meghatározás reakcióelegyében jelen lévő enzimkoncentárciók.

[E]	v _{max} /K _M értékek	
(M)	(1/perc)	
4 x 10 ⁻⁹	5 x 10 ⁻⁵	
8 x 10 ⁻⁸	0,3 x 10 ⁻³	
2 x 10 ⁻⁷	2,5 x 10 ⁻³	

5.3.3. MALDI-TOF MS

spektrumok pozitív ion módban Bruker Biflex MALD-TOF A tömegspektrométeren készültek, amelyhez repülési idő analizátor kapcsolódik. A minták ionizációjához 337 nm hullámhosszon sugárzó nitrogén lézert alkalmaztunk. A spektrumok 150 lézer lövés összegzett eredményéből készültek 19 kV gyorsító feszültség mellett pozitív ion módban. A fehérje vizsgálatok során a kalibrációhoz marha szérum albumint (BSA) használtunk, amelynek [M+H]⁺ és [M+2H]²⁺ csúcsaihoz tartozó molekulatömegek 66,43 és 33,2 kDa. A spektrumokat 3,5-dimetoxi-4hidroxifahéjsav (SA) mártixában vettük fel, az általános fehérje minta előkészítési leírást használva.

Az enzimreakciók MALDI-TOF elemzése során pozitív reflekton módot és 2,4,6-trihidroxiacetofenon (THAP) mátrixot alkalmaztunk, a minta előkészítés az általános módon történt. A spektrumok több (legkevesebb 100) lézer lövés összegéből készültek 19 kV gyorsító és 20 kV reflekciós feszültséggel. Külső kalibrációként a ciklodextrinek DP 6-8 [M+Na]⁺ csúcsait használtuk fel, mely során a hozzájuk tartozó molekulatömegek rendre 995, 1157, 1319 Da.

5.3.4. ¹H-NMR

¹H-NMR spektroszkópiás méréseket az enzimreakciók követésére, közti termékek megfigyelésére, illetve termékek azonosítására alkalmaztuk. A méréseket Dr. Batta Gyula és munkatársai Bruker Avance II készülékkel 500 MHz-en végezték el.

5.4. Enzimkinetikai vizsgálatok

5.4.1. Kezdeti reakciósebességek meghatározása

Az enzimreakciók során a szubsztrátokat pufferben oldottuk fel. Egy reakciót mindig 10% konverzió értékekig vizsgáltunk, ami 5 illetve 6 mintavételi pontnak felelt meg. A reakcióelegyek 50 µl össztérfogatúak voltak, amelyhez 1 µl enzimet adtunk.

 β AMY vizsgálatok során minden szubsztrátból 5 mM-os törzsoldatot készítettünk, majd az 50 µl-es reakcióelegyekhez ebből hígítottunk az aktuális méréshez szükséges koncentrációkat. Pufferként 5 mM-os nátrium-acetát puffert használtunk, (pH 5,0). Az enzim minden esetben 5 µl volt, 1,75 x 10⁻⁹ M koncentrációban. Az így összeállított reakcióelegyeket 30 °C-on, a készülék mintaterében tartottuk.

DspB enzim vizsgálatok esetében a puffer 50 mM NaH₂PO₄ és 0,1 M NaCl tartalmazott (pH 5.9). A szubsztrátok rossz oldékonysága miatt a legtöményebb törzsoldat minden esetben 4 mM-os volt. A 4-es tagszámú szubsztrát esetén pár nap után csapadékkiválást tapasztaltunk, így az azzal való munka során mindig friss beméréseket alkalmaztunk. A szubsztrátkoncentrációk 0,2-2 mM között változtak.

5.4.2. Enzimkoncentráció függés teljes hidrolízis vizsgálatoknál

Az enzimkoncentráció függés vizsgálatokat βAMY esetében CNPG7 szubsztráton végeztük el, ugyanolyan reakciókörülmények és kromatográfiás paraméterek mellett, mint azt már korábban a kezdeti reakciósebesség meghatározásánál bemutattam (5.4.1. fejezet). Az első rendű kinetikai konstansokat a szubsztrát fogyására illesztett kinetikai görbéből számítottuk.

A kiindulási szubsztrát koncentráció minden esetben 5 mM volt, még az enzim koncentrációk rendre 0,0117 nM, 0,68 nM, 3,06 nM voltak.

DspB esetében a S₃ szubsztráton végeztük el ugyanezen méréseket, ahol a kiindulási szubsztrát koncentráció 3,27 mM volt, még az enzim koncentrációk rendre 2,5 μ M, 5 μ M és 10 μ M voltak a három különböző mérés során.

5.4.3. Teljes hidrolízis vizsgálatok

A szubsztrátok teljes hidrolízis vizsgálata során a már korábban leírt anyagokkal és pufferekkel dolgoztunk. A korábbiaktól eltérően azonban a reakciókat több napig is nyomon követtük.

βAMY esetében a szubsztrátok koncentrációja 2,5 és 4,5 mM között változott, az egyes szubsztrátok oldhatóságától függően. A reakcióelegyek végtérfogata és a felhasznált enzim mennyisége kis tartományon belül változott, amely a 9. táblázatban látható.

DspB esetében a kiindulási szubsztrát koncentráció minden alkalommal 3,6 mM volt, amelyhez 8,3 µM enzimet adtunk.

Szubsztrát	Szubsztrát kezdeti	Enzim mennyisége	Reakcióelegy végtérfogata
	koncentrációja (mM)	(M)	(szubsztrát+enzim)
CNPG5	2,4	3,06 x 10 ⁻⁸	250 μl + 5 μl
CNPG6	4,16	3,06 x 10 ⁻⁸	$250 \ \mu l + 5 \ \mu l$
CNPG7	2,95	6,68 x 10 ⁻⁹	1750 μl + 3 μl
CNPG8	3,73	2,95 x 10 ⁻⁸	$400 \ \mu l + 3 \ \mu l$
CNPG11	2,45	3,25 x 10 ⁻⁸	235 µl + 5 µl
CNPG12	0,39	2,79 x 10 ⁻⁸	250 μl + 7 μl

 táblázat: Édesburgonya βAMY általa katalizált kromoforos maltooligomer szubsztrát sorozat enzimreakcióinak térfogata és a rekaciókhoz felhasznált enzim mennyiségek

5.5. Vizsgálati adatok kiértékelése

5.5.1. Kezdeti reakciósebességek és kinetikai paraméterek meghatározása Grafit programmal

Kis enzimkoncentrációk mellett. kezdeti reakciósebességek а megállapításához Grafit programot használtunk (Grafit 2.1. program, Erithaus Software LTD, Harley, UK). A mintavételezés az időben szakaszosan történt, 10% konverzió értékig. A HPLC kromatogramokból a kiindulási szubsztrát koncentrációjának ismeretében kiszámoltuk а keletkezett termékek csúcsalatti területeinek összegéből az össztermék koncentrációkat. Majd ezt a Grafit program segítségével ábrázoltuk az idő függvényében. A megfelelő kiindulási szubsztrát koncentrációkhoz tartozó pontokra egyenest illesztünk. A kapott egyenesek meredekség értéke adta meg a reakciók kezdeti sebességét. A 37. ábrán egy DspB enzimmel történt hidrolízis kezdeti szakaszának kiértékelése látható.



37. ábra: DspB enzim által katalizált S3 szubsztrát hidrolízisének nyomon követése HPLC módszerrel, az eltérő kiindulási szubsztrát koncentrációk mellett mért termékkoncentrációk ábrázolása az idő függvényében Grafit program segítségével (S3 koncentrációk: +:0,4 mM; x: 0,6 mM; o:0,8 mM; •:1,6 mM; □:2 mM)

Majd az így kapott kezdeti reakciósebességi értékeket ábrázoltuk a szubsztrátkoncentráció függvényében. A kapott pontokra a Michaelis-Menten egyenlet alapján görbét illesztettünk (38. ábra). A program megadja az általa számított K_M és v_{max} értékeket. Az így kapott kinetikai görbe kezdeti szakaszára egyenest illesztve a kapott egyenes meredekség értékét a katalitikus hatékonyság számításánál alkalmaztuk.



38. ábra: DspB által katalizált S₃ szubsztrát különböző szubsztrátkoncentrációihoz tartóz reakciósebességek ábrázolása a Michaelis-Menten egyenlet alapján Grafit programmal

5.5.2. Szubsztrátok teljes hidrolízise és kinetikai konstansok meghatározása Scientist[®] programmal

A szubsztrátok teljes hidrolízisének nyomon követésére HPLC módszert alkalmaztunk. Viszonylag nagy kiindulási szubsztrátkoncentrációt felhasználva az időben szakaszosan mintát véve követtük a reakciókat hosszabb időn keresztül. Az ismert kiindulási koncentrációt felhasználva a kromatogramok kiértékelése során meg tudtuk adni az egyes keletkezett termékek koncentrációit. Ezeket a koncentráció-idő adatpárokat importáltuk a Scientist[®] programba (Micromath St. Luis, USA). Az idő függvényében ábrázolva a különböző koncentráció értékeket, a kapott pontokra kinetikai görbéket illesztettünk (39. ábra).



39. ábra: S₅ szubsztrát teljes hidrolízise DspB enzimmel, HPLC módszerrel nyomon követve. A HPLC módszerrel meghatározott szubsztrát és termékkoncentárció-idő adatpárokra Scientist® program segítségével illesztett kinetikai görbék.

 $(S_5, S_4, S_3, S_2, S_1)$

A görbe illeszkedését függő változók (szubsztrát és termék koncentrációk) és paraméterek (kiindulási koncentrációk, reakciósebességi állandók, a hidrolízis és a szintézis irányában mutató reakciólépések) segítségével a modell alapján felírt differenciál egyenletek használatával, iterációval végezte el a program.

Ha n-1 szekvenciális reakcióként jelentkezik, akkor az n differenciál egyenlettel az n-1 szubsztrát koncentrációk és a végső termékek időbeli változása írható le:

$$\frac{d[S_5]}{dt} = -k_{54}[S_5] - k_{53}[S_5] - k_{52}[S_5]$$
(15)

$$\frac{d[S_4]}{dt} = k_{54}[S_5] - k_{43}[S_4] - k_{42}[S_4]$$
(16)

$$\frac{d[S_3]}{dt} = k_{53}[S_5] + k_{43}[S_4] - k_{32}[S_3] - k_{31}[S_3]$$
(17)

$$\frac{d[S_2]}{dt} = k_{52}[S_5] + k_{42}[S_4] + k_{32}[S_3] - k_{21}[S_2]$$
(18)

$$\frac{d[S]}{dt} = k_{21}[S_2] + k_{31}[S_3]$$
(19)

A kinetikai számítások pszeudo elsőrendű körülmények között történtek, az adatsorok a hidrolízis reakciók korai szakaszából származtak és a következő egyenlettel meghatározhatóak (20).

$$\ln[S] = -k_{obs}t + S_0 \tag{20}$$

A számítás végeztével a program megadja a különböző kinetikai állandókat. Ugyanezen elvek és szabályok alapján készültek el a βAMY enzimreakcióinak kiértékelései.

5.5.3. Katalitikus hatékonyság meghatározása

Az enzim reakciók a már korábban leírtak szerint (5.4. fejezet) és kromatográfiás rendszerben (5.3.1. fejezet) készültek. Mindkét enzim esetében a katalitikus hatékonyság értékei kis szubsztrát koncentráció mellett (0,2-0,5 mM) lettek meghatározva. Meghatározott időpontokban 5 µl mintát injektáltunk a fordított fázisú HPLC kolonnára.

Második meghatározási módszer a Michaelis-Menten görbe elejére illesztett egyenes meredekségéből számított értékek meghatározása. β AMY esetében 0,5 és 5 mM között változott a szubsztrátok kiindulási koncentrációja még az enzim koncentárciója 1,42 x 10⁻⁸ M volt a reakciókban. DspB esetében 0,5 és 1,5 mM szunsztrátkoncentrációk valamint 8,3 μ M enzimkoncentráció mellett történtek a mérések. Kiértékelésük az 5.5. fejezetben leírtak szerint történt. Így tehát a kezdeti sebesség úgy lett meghatározva, mint a valódi folyamat görbe kezdeti érintője. Ezen körülmények között:

$$v_0 \approx \left(\frac{v_{\text{max}}}{K_M}\right) [S] \quad \text{ha} [S] \ll K_M$$
 (13)

 v_{max} mutatja az enzim átalakítási számát (k_{cat}) ha [E_t] ismert, mert v_{max} = $k_{cat}[E_t]$. A k_{cat} / K_M tag az enzim katalitikus hatékonyságaként meghatározható.

Teljes hidrolízis vizsgálatoknál βAMY esetében 2,5 és 5 mM, DspB esetében 3,6 mM szubsztrát koncentrációk mellett határoztuk meg a hatékonyságot. A kezdeti reakciósebesség értékek a (13)-as egyenlet alapján, ahol a kezdeti sebességek lineáris szakaszának meredekség értékeit ábrázoltuk a szubsztrát koncentrációk függvényében, minden oligomer szubsztrát esetében.

6. Összefoglalás

A biológia és a biológiai módszerek fejlődésével igény mutatkozott az enzimek működési mechanizmusának megismerésére is illetve az általuk katalizált folyamatok leírására. Exo hatásmechanizmusú enzimek alhelytérképezéséhez és hatásmechanizmusuk tanulmányozásához egy inverziós és egy retenciós enzimet választottunk. Inverziós modell fehérjének az édesburgonyából származó β-amilázt (βAMY) (EC 3.2.1.2.) használtuk. Széles körű irodalommal rendelkezik, amely lehetővé tette az általunk alkalmazni kívánt módszer helyességének ellenőrzését és összevetését korábbi eredményekkel. Másik vizsgált enzimünk a DiszperzinB (DspB) (EC 3.2.1.52 vagy EC 3.2.1.-), amely feltételezhetően retenciós mechanizmussal, szomszéd csoport segítségével hidrolizálja szubsztráját. Az enzimet 2003-ban írták le először, egy szájban található patogén mikroorganizmusból izolálták, az Aggregartibacter actinomycetemcomitansból, amely szerepet játszik különböző betegségek kialakításában, mint fogínyvérzés vagy szívbelhártyagyulladás. Az enzim önmagában és antibiotikumokkal együtt alkalmas biofilmek felületről való eltávolításában.

Az *exo* típusú fehérjék alhely szerkezetének számításához meg kellett határoznom a kinetikai állandókat különböző lánchosszúságú szubsztrátokon és így működési és hasítási módjuk is feltárható. Célul tűztük ki egy új analitikai módszer kidolgozását a szubsztrátok teljes hidrolízis reakcióinak követéséhez, amely alkalmas a termékek és szubsztrátok koncentráció változásának követésére az enzimreakció során.

Célom volt az enzimek működési mechanizmusának mélyebb megismerése, a szubsztrátok aktív helyhez való kötődésének és hidrolízisének felderítése melyhez meg kellett oldani az oligomer kromoforos szubsztrátok valamint a redukáló és nem redukáló végi termékek azonosítását.

88

Vizsgálataink során a szubsztrátok teljes hidrolízis reakcióit követtük nyomon HPLC módszerrel. A keletkezett termékek azonosításához MALDI-TOF MS-t, míg a hidrolízis utak igazolásához ¹H-NMR módszert alkalmaztunk.

Vizsgálataink során kapott eredmények a következők voltak.

Az édesburgonyából származó βAMY aktivitás mintázatát aromás kromofor csoporttal jelölt szubsztrát sorozaton vizsgáltuk. Szubsztrátjaink aglikonként aromás gyűrűt tartalmaztak és β-glikozidos kötést, amely kedvező kötődésüket eredményezte az aktív centrumba. A korábbi eredményekkel szemben, maltotrióz hidrolízise során CNPG2 termék keletkezett egy glükóz lehasításával páratlan tagszámú szubsztrátok esetében. Transzglikozilezést, amelvet inverziós enzimeknél most írtunk le először, minden szubsztráton megfigyeltünk, kivéve a CNPG5-nél rövidebbeknél. Spontán maltóz transzfert figyeltünk meg a hidrolízis reakciók kezdeti szakaszában, ahol a processzív hasítás lehetséges. A processzív reakció feltételezi a redukáló végi termék hosszabb kötődését az aktív centrumba és a felhalmozódó β-maltóz jelenlétében mikroszkópikus reverzibilitás jelenik meg hosszabb transzfer termék formájában. Így tehát többszörös hasítási módot karakterizáltuk, a szubsztrát lánchossz növekedésével növekszik a lépések átlagos száma, a kapcsolat lineáris és DP 5-nél mutatja azt a szubsztrát hosszt, ahol még nincs jelen processzivitás.

DspB enzim vizsgálata során ¹H-NMR módszer segítségével igazoltuk, hogy az enzim a retenciós glikozidázok közé tartozik, mivel a szubsztrát láncon belüli β-glikozidos kötést hidrolizálja és termékként β-maltóz szabadul fel. Az enzim szigorúan nem redukáló végi specifitást mutat, valamint több produktív kötőmód kialakulása lehetséges, amelyet teljes hidrolízis reakciók során MALDI-TOF MS mérésekkel igazoltunk. Meghatároztuk az enzim katalitikus hatékonyságát DP 5 tagszámú szubsztrátig, ahol a katalitikus

hatékonyság növekszik a szubsztrát lánchosszának a növekedésével, valamint a hosszabb szubsztrátok preferáltabb kötődését és nagyobb reakció készséget mutatja. A számított pszeudo elsőrendű kinetikai konstansok hasonló tendenciát mutatnak. Az enzim alhely szerkezetéről értékeket és megállapítható, hogy 5 N-acetil-glükózamin (GlcNAc) egység а szubsztrátban nem elég ahhoz, hogy az enzim összes alhelyét lefedje. Ahhoz, hogy az enzim teljes alhely térképe sikeresen meghatározható legyen hosszabb szubsztrátokra lenne szükség. Ezen eredmények alapján javaslatot tettünk a DspB enzim helyes besorolására a különböző adatbázisokban.

7. Summary

Progression of biology and biological methods demanded the understanding of enzyme mechanisms and the detailed description of the catalyzed reactions. An inverting and a retaining enzyme were chosen for examination of mechanism and active site structure of exo acting glycoside hydrolases. β -Amylase from sweet potato (β AMY) (EC 3.2.1.2.) was used as an inverting model enzyme. It has comprehensive literature which allows to compare the exactness of our results. Another studied enzyme was the DispersinB (DspB) (EC 3.2.1.52. or EC 3.2.1.-) which catalyses the hydrolysis of substrate presumably with retention mechanism and neighboring group participation. The enzyme was isolated from an oral pathogen microorganism, Aggregatibacter actinomycetemcomitans, which plays a role in development of different diseases as periodontitis and infective endocarditis. The enzyme is capable itself and together with antibiotics to disperse the biofilm from the surface.

Kinetic constants had to be determined on substrates with different chain length to understand the subsite structure of *exo* type enzymes and to explore the mechanism and cleavage modes, as well. We aimed to elaborate a new analytical method to follow the total hydrolysis reactions of the substrates, which capable to monitor the change of the products and substrate concentrations during the enzyme reaction.

My goal was to deeply recognize the mechanism of the enzymes, discover the substrates binding and they hydrolysis in the active centre and identification of the reducing and non-reducing end products, as well. During our research the total hydrolysis reaction of the substrates was followed by HPLC. MALDI-TOF MS was used to identify the generated products, while ¹H-NMR was used to verify the stereochemistry of the hydrolysis.

91

Our results were as follows.

Action pattern of sweet potato β -amylase was measured on a series of aromatic chromophore group-containing substrates. Our substrates contain aromatic ring as chromophore aglycon and β glycosidic bond, which are caused favorable binding to the active centre. In contrast with earlier results, we found glucose cleavage from maltotriose resulted in CNPG2 reducing end product in case of odd numbered substrates. Our results are the first presentation that during hydrolysis of maltooligomers, catalysed by an inverting enzyme, transglycosylation can also be observed. Spontaneous maltose transfer happened in the early stage of the hydrolysis to each substrate, where processive cleavage was possible. The processive reaction assumes the longer staying of the reducing end products in the active centre, and in the presence of the accumulating β -maltose the microscopic reversibility manifested in the longer transfer product. Processivity was characteristic, the mean number of steps increases with the degree of polymerization (DP) of the substrate, the relationship is quasi-linear and xaxis intercept shows the size of substrate without processivity.

As a result of the study of DspB enzyme we confirmed with ¹H-NMR technique that the enzyme belongs to the retention glycosidases, because it cleaved the β -glycosidic bond in the substrate chain and liberated β -glycoside product. The enzyme showed a strictly nonreducing-end preference, but more productive binding modes are also possible, which was verified with MALDI-TOF technique during the total hydrolysis reactions. We defined the catalytic efficiency of the enzyme up to DP5 substrate, which increased with increasing DP of the substrate, indicating favourable binding and higher reaction rate of longer substrates. The calculated pseudo first order kinetic constants show similar values and tendency. From the subsite structure of the enzyme is established that five N-acetyl-glucosamine (GlcNAc) moieties in

the substrate were not enough for the total subsite occupancy. Synthesis of longer substrate is needed for successful subsite mapping of the enzyme. Based on these results we suggested the right classification of the DspB in different databases.

8. Irodalomjegyzék

- 1. Gy. Gyémánt, Gy. Hovánszki, L. Kandra, "Subsite mapping of the binding region of alpha-amylases with a computer program." *Eur. J. Biochem.*, **269**, 5157-5162. (2002)
- L. Kandra, "α-Amylases of medical and indrustial importance" J. Mol.Struct. Theochem., 666-667, 487-498. (2003)
- J. A. Mótyán, E. Fazekas, H. Mori, B. Svensson, P. Bagossi, L. Kandra, Gy. Gyémánt, "Transglycosylation by barley α-amylase 1" J. Mol. Catal., B Enzym., 72, 229-237. (2011)
- G.J. Scott, R. Best, M. Rosegrant, M. Bokanga, "Roots and Tubers in the Global Food System: A Vision Statements to the Year 2020" Printed in Lima International Potato Center, Peru, (2000)
- T. Morrison, R. Pressey, S.J. Kays, "Changes in α- and β-amylase during storage of sweet potato lines with varying starch hydrolysis potential" J. Am. Soc. Hortic. Sci., 118, 236-242. (1993)
- W.A. Sistrunk, J.C. Miller, L.G. Jones, "Carbohydrate changes during storage and cooking of sweet potato" *Food Technol.*, 8, 223–226. (1954)
- K. Nakamura, M. Ohto, N. Yoshida, K. Nakamura, "Sucrose induced accumulation of βamylase occurs concomitant with the accumulation of starch and sporamin in leaf-petiole cuttings of the sweet potato" *Plant Physiol.*, **96**, 902–909. (1991)
- D. French, P.D. Boyer, H. Lardy, K. Myrbäck, "β-Amylases" *The Enzymes, 2nd edition,* Academic Press, New York, 345–368, (1960)
- R.R. Ray, "β-Amylases from various fungal strains. A review" Acta Microbiol. Immunol. Hung., 51, 85–95. (2004)
- J. B. Kaplan, M. F. Meyenhofer, D. H. Fine, "Biofilm growth and detachment of Actinobacullis actinomycetemcomitans" J. Bacteriol., 185, 1399-1404. (2003)
- 11. G. Donelli, I. Francolini, D. Romoli, E. Guaglianone, A. Piozzi, C. Ragunath, and J. B. Kaplan, "Synergistic Activity of Dispersin B and Cefamandole Nafate in Inhibition of Staphylococcal Biofilm Growth on Polyurethanes" *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **51**, 2733-2740. (2007)
- A. Dashiff and D.E. Kadouri "Predation of oral pathogens by Bdellovibrio bacteriovorus 109J" *Mol. Oral Microbiol.*, **26**, 19-34. (2011)
- "Enzyme Nomenclature, Recommendations of the Nomenclature Committee Union of Biochemisrty and Moleculra Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes, NC-IUBMB." Academic Press, New York, NY. (1992)
- 14. B. L. Cantarel, P. M. Coutinho, C. Rancurel, T. Bernard, V. Lombard, B. Henrissat, "The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics" *Nucleic. Acids. Res.*, 37, 233-238. (2009)
- B. Henrissat, "A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities" J. Biochem., 280, 309-316. (1991)
- M. Kurašin and P. Väljamäe1, "Processivity of cellobiohydrolasa is limited by the substrate" J. Biol. Chem., 286, 169-177, (2011)

- 17. A. B. Boraston, D. N. Bolam, H. J. Gilbert and G. J. Davies, "Carbohydrate-binding modules: fine-tunong polysaccharide recognition" *Biochem.J.*, **382**, 769–781. (2004)
- 18. C. Divne, J. Stahlberg, T. Reinikainen, L. Ruohonen, G. Pettersson, J. K. Knowles, T. T. Teeri and T. A. Jones, "The three-dimensional crystal structure of the catalytic core of cellobiohydrolase I from Trichoderma reesei" *Science*, **265**, 524–528. (1994)
- 19. D. French, R.W. Youngquist, "Die wirkungsweise von β-amylase auf stärkeoligosaccharide" *Die Stärke*, **12**, 425–431. (1963)
- 20. D. C. Phillips, "The three-dimensional structure of an enzyme molecule" *Sci. Am.*, **215**, 78-90. (1966)
- 21. J. F. Robyt, D. French, "The action pattern of porcine pancreatic alpha-amylase in relationship to the substrate binding site of the enzyme" J. Biol. Chem., 245, 3917-3927. (1970)
- G. J. Davies, K. S. Wilson, B. Henrissat, "Nomenclature for sugar-binding subsites is glycosyl hydrolases" *Biochem. J.*, 321, 557-559. (1997)
- 23. K. Hiromi, "Interpretation of dependency of rate parameters on the degree of polymerization of substrate in enzmye-catalyzed reactions. Evaluation of subsite affinities of exo-enzyme" *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **40**, 1-6. (1970)
- D. E. Koshland Jr., "Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions" Biological Reviews, 28, 416-436. (1953)
- 25. W. P. Burmeister, S. Cottaz, P. Rollin, A. Vasella and B. Henrissat, "High resolution X-ray crystallography shows that ascorbate is a cofactor for myrosinase and substitutes for the function of the catalytic base" *J. Biol. Chem.*, **275**, 39385-39393. (2000)
- 26. S. S. Rajan, X. Yang, F. Collart, V. L. Yip, S. G. Withers, A. Varrot, J. Thompson, G. J. Davies and W. F. Anderson, "Novel catalytic mechanism of glycoside hydrolysis based on the structure of an NAD+/Mn2+ -dependent phospho-alpha-glucosidase from Bacillus subtilis" *Structure*, **12**, 1619-1629. (2004)
- 27. M. L. Sinnott, "Catalytic mechanisms of enzymic glycosil transfer" *Chem. Rev.*, **90**, 1171-1202. (1990)
- 28. E. J. Hehre, C. F. Brewer and D. S. Genghof, "Scope and mechanism of carbohydrase action. Hydrolytic and nonhydrolytic actions of β-amylase on α- and β-maltosyl fluoride" *J. Biol. Chem.*, **254**, 5942-5950. (1979)
- 29. S. Kitahata, C. F. Brewer, D. S. Genghof, T. Sawai, T. E. J. Hehre, "Scope and mechanism os carbohydrase action. Stereocomplementary hydrolytic and glucosyltransferring action of glucoamylase and glucodextranase with alpha- and beta-D-glucosyl fluoride" *J. Biol. Chem.*, **256**, 6017-6026. (1981)
- 30. G. Petterson, "A generalized theoretical treatment of the transient-state kinetics of enzymic reaction systems far from equilibrium" Acta Chem. Scand. B., 32, 437-446. (1978)
- S. Schnell, C. Mendoza, "The condition for pseudo-first-order kinetics in enzymatic reactions is independent of the initial enzyme concentration" *Biophys. Chem.*, 107, 165-174. (2004)
- 32. W. A. Breyer and B. W. Matthews, "A structural basis for processivity" *Protein Sci.*,10, 1699-1711. (2001)

- M. A. Savageau, "Enzyme kinetics in vitro and in vivo: Michaelis-Menten revisited" *Princ. of Med. Biol.*, 4, Cell Chem. Physiol., 1, 93-146. (1995)
- 34. R. G. Duggleby, "Quantitative analysis of the time courses of enzmye-catalyzed reactions" *Methodes*, **24**, 168-174. (2001)
- 35. A. K. Balls, M. K. Walden, R. R. Thompson, "A crystalline β-amylase from sweet potatoes" *J. Biol. Chem.*, **173**, 9-19. (1948)
- 36. J.A. Thoma, J.E. Spradlin, S. Dygert, "Plant and animal amylases" in: P.D. Boyer (Ed.), The Enzymes, *Academic Press*, 115-189. (1971)
- 37. M. J. van der Maarel, B. van der Veen, J. C. Uitdehaag, H. Leemhuis, L. Dijkhuizen, "Properties and applications of starch-converting enzymes of the α-amylase family" J. *Biotechnol.*, 94, 137–155. (2002)
- 38. P. Bernfeld, "Amylases,α and β" Meth. Enzymol., 1, 149-158. (1955)
- 39. C. G. Cheong, S. H. Eom, C. Chang, D. H. Shin, H. K. Song, K. Min, J. H. Moon, K. K. Kim, K. Y. Hwang and S. W. Suh, "Crystallization, molecular replacement solution, and refinement of tetrameric β-amylase from sweet potato" *Proteins*, **21**, 105-117. (1995)
- 40. Y-G. Ann, M. Iizuka, T. Yamamoto and N. Minamiura, "Preparation and some properties of active monomer of sweet potato β-amylase" *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 769-774. (1990)
- 41. K. Ishikawa, H. Nakatani, Y. Katsuya, C. Fukazawa, "Kinetic and structural analysis of enzyme sliding on substrate: multiple attack in α-amylase" *Biochem.*, 46, 792–798. (2007)
- 42. H. Toda, Y. Nitta, S. Asanami, J. P. Kim, F. Sakiyama, "Sweet potato β-amylase. Primary structure and identification of the active-site glutamyl residue" *Eur. J. Biochem.*, 216, 25-38. (1993)
- 43. H. Toda, "Sequence analysis of sweet potato β-amylases" *Denpun Kagaku*, **36**, 87-101. (1989)
- 44. J. A. Thoma and D. E. Koshland, "Stereochemistry of enzyme, substrate, and products during β-amylase action" *J. Biol. Chem.*, **235**, 2507-2510. (1960)
- 45. B. Mikami. E. J. Hehre, M. Sato, Y. Katsube, M. Hirose, Y. Morita and J. C. Sacchettini, "The 2.0-Å resolution structure of soybean β-amylase complexed with α-cyclodextrin" *Biochem.*, **32**, 6836-6845. (1993)
- 46. B. Mikami, M. Degano, E.J. Hehre, J.C. Sacchettini, "Crystal structure of soybean βamylase reacted with β-maltose and maltal: active site components and their apparent roles in catalysis" *Biochem.*, **33**, 7779-7787. (1994)
- 47. C. T. Greenwood and E.A. Milne, "Beta-amylase" Adv. Carbohydr. Chem., 23, 330-343. (1968)
- 48. D. French and M. Abdullah, "Transferase activity in malt amylase preparations" *Cereal. Chem.*, **43**, 555-562. (1966)
- 49. K. Nomura, B. Mikami, Y. Morita, "Partial amino acid sequence arounds sulfhydryl groups of soyabean beta-amylase" *J. Biochem.*, **102**, 341-349. (1987)
- 50. K. Uehara and S. Mannen, "Interaction of Sweet Potato β-Amylase with Its Reaction Product, Maltose" *J.Biochem.*, **85**, 105-113. (1979)
- 51. G. Pujadas and J. Palau, "Anatomy of a conformational transition of β -strand 6 in soybean β -amylase caused by substrate (or inhibitor) binding to the catalítical site" *Prot. Sci.*, **6**, 2409-2417. (1997)

- 52. N. Anwar, A. Kikuchi, T. Kumagai and K. Watanabe, "Nucleotide sequence variation associated with β-amylase deficiency in the sweet potato Ipomoea batatas (L.) Lam" *Breed. Sci.*, **59**, 209-216. (2009)
- 53. N. Yoshida and K. Nakamura, "Molecular cloning and expression in Escherichia coli of cDNA encoding the subunit of sweet potato β-amylase" *J. Biochem.*, **110**, 196-201. (1991)
- N. Tanaka, S. KAjimoto, D. Mitani, S. Kunugi, "Effects of guanidine hydrochloride and high pressure on subsite flexibility of beta-amylase" *Biochim. Biophys. Acta*, 1596, 318-325. (2002)
- 55. A. Totsuka and C. Fukazawa, "Functional analysis of Glu380 and Leu383 of soybean βamylase. A proposed action mechanism" *Eur. J. Biochem.*, **240**, 655-659. (1996)
- 56. P. M. Colman and B. W. Matthews, "Symmetry, molecur weight and crystallographic data for sweet potato β-amylase" *J. Mol. Biol.*, **60**, 163-168. (1971)
- 57. R. Ohba, T. Shibata, S. J. Ueda, "Preparation and properties of covalently immobilized beta-amylase on p-aminobenzyl-cellulose" *Ferment. Technol.*, **57**, 146-150. (1979)
- 58. T. Noda, S. Furuta, I. Suda, "Sweet potato β-amylase immobilized on chitosan beads and its application in the semi-continuos production of maltose" *Carbohydr. Polym.*, 44, 189-195. (2001)
- 59. S. Englard, T. P. Singer, "Physicochemical studies on beta-amylase" J. Biol. Chem., **187**, 213-219. (1950)
- 60. V. Hagenimana, L-P. Vézina, R. E. Simard, "Sweetpotato α- and β-amylases: characterization and kinetic studies with endogenous inhibitors" *J. Food Sci.*, **59**, 373-376. (1994)
- 61. J. C. Kim, B. W. Kong, M. J. Kim, and S. H. Lee, "Amylolytic hydrolysis of native starch granules affected by granule surface area" *J. Food Sci. C: Food Chem.*, **73**, 621-624. (2008)
- 62. P. Germain, R. R. Crichton, "Characterization of a chemically modified beta-amylase immobilized on porous silica" *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **41**, 297-315. (1988)
- 63. N. Ogura, Y. Hirato, D. Kazami, "Detection of a heat-stable and insoluble form of BETA-amylase in sweet potatoes" *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, **48**, 218-220. (2001)
- 64. J. E. Spradlin, J. A. Thoma, D. Filmer, "Beta amylase thiol groups. Possible regulator sites?" *Arch. Biochem. Biophys.*, **134**, 262-264. (1969)
- 65. J. A. Thoma, D. E. Koshland, Jr., J. Ruscica and R. Baldwin, "The numer of binding sites of sweet potato beta amylase" *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **12**, 184-188. (1963)
- 66. J. F. Robyt, D. French, "Multiple attack and polarity of action of porcine pancreatic αamylase" Arc. Biochem. Biophys., **138**, 662-670. (1970)
- 67. J. F. Roby, D. French, "The action pattern of porcin pancreatic α-amylase in relationship to the binding site of the enzyme" *J. Biol. Chem.*, **245**, 3917-3927. (1970)
- 68. M. Kato, K. Hiromi and Y. Morita, "Purification and kinetic studies of wheat bran βamylase" J. Biochem., 75, 563-576. (1974)
- 69. R. Bird and R. H. Hopkins, "The mechanism of b-amylase action. 2. "Multichain action on amylose fission products" *Biochem. J.*, **56**, 140-146. (1954)

- J. A. Thoma and D. E. Koshland, Jr., "Competitive inhibition by substrate during enzyme action. Evidence for induced-fit theory" J. Am. Chem. Soc., 82, 3329-3333. (1960)
- 71. H. Nakatani, "Monte Carlo Simulation of multiple attack mechanism of β-amylase catalyzed reaction" *Biopolym.*, **42**, 831-836. (1997)
- 72. D. Mack, H. Rohde, L. G. Harris, A. P. Davies, M. A. Horstkotte, J. K. Knobloch, "Biofilm formation in medical device-related infection" *Int. J. Artif. Organs*, **29**, 343-359. (2006)
- 73. J. W. Costerton, P. S. Stewart, E. P. Greenberg, "Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections" *Science*, 284, 1318-1322. (1999)
- 74. B. R. Boles, A. R. Horswill, "Staphylococcal biofilm disassembly" *Trend Microbiol.*, 19, 449-455. (2011)
- 75. N. Ramasubbu, L. M. Thomas, C. Ragunath and J. B. Kaplan, "Structural analysis of dispersinB, a biofilm-releasing glycoside hydrolase from the peridontopathogen Actinobacillus actinomycetemcomitans" J. Mol. Biol., 349, 475-486. (2005)
- 76. H. Rohde, S. Frankenberger, U. Zähringer, D. Mack, "Structure, function and contribution of polysaccharide intercellulare adhesin (PIA) to Staphylococcus epidermidis biofilm formation and pathogenesis of biomaterial associated infections" *Eur. J. Cell Biol.*, **89**, 103-111. (2010)
- 77. J. M. Haro, B. M. Peters, G. A. O'May, N. Archer, P. Kerns, R. Prabhakara, M. E. Shirtiff, "Vaccine development in Staphylococcus aureus: taking the biofilm phenotype into consideration" *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **59**, 306–323. (2010)
- 78. T. S. J. Elliott, H. A. Moss, S. E. Tebbs, I. C. Wilson, R. S. Bonser, T. R. Graham, L. P. Burke, M. H. Farogui, "Novel approach to investigate a source of microbial contamination of central venous catheters" *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 16, 210-213. (1997)
- 79. H. Raad, M. F. Sabbagh, K. H. Rand, R. J. Sherertz, "Quantitative tip culture methodes and the diagnosis of central venous catheter-related infections" *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 15, 13-20. (1992)
- M. E. Zegans, H. I. Becker, J. Budzik, G. O'Toole, "The role of bacterial biofilms in ocular infections" DNA Cell Biol., 21, 415-420. (2002)
- D. Franklin, M. D. Lowy, "Staphylococcus aureus Infections" N. Engl. J. Med., 339, 520-532. (1998)
- M. M. Levine, "Escherichia coli Infections" Bacterial Vaccines, Academic Press Inc, 7, 187-229. (1984)
- H. Ceri, M. E. Olson, C. Stremick, R. R. Read, D. Morck, A. Buret, "The Calgary biofilm device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms" *J. Clin. Microbiol.*, 37, 1771–1776. (1999)
- 84. P. D. Fey, "Modality of bacterial growth presents unique targets: how do we treat biofilm-mediated infections?" *Curr. Opin. Microbiol.*, **13**, 610-615. (2010)
- J. B. Kaplan, "Therapeutic potential of biofilm-disersing enzymes" Int. J. Artif. Organs, 32, 545–554. (2009)
- 86. C. G. Kumar, S. K. Anand, "Significance of microbial biofilms in food industry: a review., *Int. J. Food Microbiol.*, 42, 9-27. (1998)

- 87. E. A. Izano, I. Sadovskaya, H. Wang, E. Vinogradov, C. Ragunath, N. Ramasubbu, S. Jabbouri, M. B Perrry, J. B. Kaplan, "Poly-N-acetylglucosamine mediates biofilm formation and detergent resistance in Aggregatibacter actinomycetemcomitans" *Microb. Pathog.*, 44, 52-60. (2008)
- 88. D. Mack, W. Fischer, A. Krokotsch, K. Leopold, R. Hartmann, H. Egge, R. J. Laufs, "The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of Staphylococcus epidermidis is a linear beta-1,6-linked glucoseaminoglycan: purification and structural analysis" *J. Bacteriol.*, **178**, 175-183. (1996)
- 89. J. G. Joyce, C. Abeygunawardana, Q. W. Xu, J. C. Cook, R. Hepler, C. T. Przysiecki, K. M. Grimm, K. Roper, C. C. Y. Ip, L. Cope, D. Montgomery, M. Chang, S. Campie, M. Brown, T. B. McNeely, J. Zorman, T. Maira-Litran, G. B. Pier, P. M. Keller, K. U. Jansen, G. E. Mark, "Isolation, structural characterization, and immunological evaluation of high-molecular-weight exopolysaccharide from Staphylococcus aureus" *Carbohydr. Res.*, **338**, 903-922. (2003)
- 90. J. B. Kaplan, C. Ragunath, N. Ramasubbu and D. H. Fine, "Detachment of Actinobacillus actinomycetemcomitans biofilm cells by an endogenous β-hexosaminidase activity" J. *Bacteriol.*, **185**, 4693-4698. (2003)
- 91. I. W. Sutherland, "The biofilm matrix an immobilized but dynamic microbial environment" *Trend. Microbiol.*, **9**, 222-227. (2001)
- R. M. Donlan, "Biofilms: microbial life on surfaces" Emerg. Infect. Dis., 8, 881–890. (2002)
- 93. K. C. Marshall, "Biofilms: an overview of bacterial adhesion, activity and control at surfaces" *Am. Soc. Microbiol. News*, **58**, 202–207. (1992)
- 94. N. Yakandawala, P. V. Gawande, K. LoVetri, T. Romeo, J. B. Kaplan, S. Madhyastha, "Enhanced expression of engineered ACA-less β-1,6-N-acetylglucosaminidase (dispersin B) in Escherichia coli" *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **36**, 1297-1305. (2009)
- 95. T. Fukamizo, C. Sasaki, E. Schelp, K. Bortone, J. D. Robertus, "Kinetic properties of chitinase-1 from the fungal pathogen Coccidioides immitis" *Biochem.*, 40, 2448-2454. (2001)
- 96. K. Slámová, P. Bojarová, L. Petrásková, V. Křen, "β-N-Acetylhexoseaminidase: What's in a name...?" *Biotechnol. Adv.*, 28, 682-693. (2010)
- 97. C. Gorzelanny, B. Pöppelmann, K. Pappelbaum, B. M. Moerschbacher, S. W. Schneider, "Human macrophage activation triggered by chitotriosidase-mediated chitin and chitosan degradation" *Biomater.*, **33**, 8556-8563. (2010)
- 98. H. Zakariassen, B. B. Aam, S. J. Horn, K. M. Vårum, M. Sørlie, V. G. H. Eijsink, "Aromatic residues in the catalytic center of chitinase A from Serratia marcescens affect processivity, enzyme activity, and biomass converting efficiency" *J. Biol. Chem.*, 284, 10610-10617. (2009)
- 99. A. Makino, H. Nagashima, M. Ohmae, S. Kobayashi, "Chitinase-catalyzed synthesis of an alternatingly N-sulfonated chitin derivative" *Biomacromol.*, **8**, 188-195. (2007)
- 100. S. G. A. Manuel, C. Ragunath, H. B. R. Sait, E. A. Izano, J. B. Kaplan, N. Ramasubbu, "Role of active-site residues of dispersin B, a biofilm.releasing β-hexosaminidase from a peridontal pathogen, in substrate hydrolysis" *FEBS J*, 274, 5987-5999. (2007)

- 101. Y. Itoh, X. Wang, B. J. Hinnebusch, J. F. Preston, T. Romeo, "Depolymerization of β-1,6-N-acetyl-D-glucosamine disrupts the integrity of diverse bacterial biofilms" J. Bacteriol., 187, 382-387. (2005)
- 102. A. Chibba, S. Dasgupta, N. Yakandawala, S. Madhyastha, M. Nitz, "Chromogenic carbamate and acetal substrates for glycosaminidases" *Carbohydr. Chem.*, **30**, 549-558. (2011)
- 103. J. E. Kerrigan, C. Ragunath, L. Kandra, G. Gyémánt, A. Lipták, L. Jánossy, J. B. Kaplan, N. Ramasubbu, "Modeling and biochemical analysis of the activity of antibiofilm agent Dispersin B" *Acta Biol. Hung.*, **56**, 439-451. (2008)
- 104. R. O. Darouiche, M. D. Mansouri, P. V. Gawande, S. J. Madhyastha, "Antimicrobal and antibiofilm efficacy of triclosan and DispersinB* combination" *Antimicrob. Chemother.*, 64, 88-93. (2009)
- 105. B. Kramhøft, K.S. Bak-Jensen, H. Mori, N. Juge, J. Nøhr, B. Svensson, "Involvement of individual subsites and secondary substrate binding sites in multiple attack on amylose by barley alpha-amylase" *Biochem.*, **44**, 1824–1832. (2005)
- 106. M. Gyimesi, K. Sarlós, I. Derényi, M. Kovács, "Streamlined determination of processive run length and mechanochemical coupling of nucleic acid motor activities" *Nucleic. Acids. Res.*, 38, 102. (2010)
- 107. E. J. Hehre, G. Okada, and D. S. Genghof, "Configurational specificity: Unappreciated kex to understanding enzymic reversions and de novo glycosidic bond synthesis. I. Reversal of hydrolysis by α-, β- andd glucoamylases with donors of correct anomeric form" *Arch. Biochem. Biophys.*, **135**, 75-89. (1969)
- 108.T. Kasumi, Y. Tsumuraya, C. F. Brewer, H. Kersters-Hilderson, M. Claeyssens, and E. J. Hehre, "Catalytic versatility of Bacillus pumlus beta-xylosidase: glycosyl transfer and hydrolysis promoted with alpha- and beta-D-xylosyl fluoride" *Biochem.*, 26, 3010-3016. (1987)
- 109. E. J. Hehre, S. Kitahata, C. F. Brewer, "Catalytic flexibility of glycosylases. The hydration of maltal by β -amylase to form 2-deoxymaltose" *J. Biol. Chem.*, **261**, 2147-2153. (1986)
- 110. A. Fekete, G. Gyémánt, A. Borbás, L. Kandra, E. Fazekas; N. Ramasubbu, S. Antus, "Synthesis of β-(1,6)-linked N-acetyl-D-glucosamine oligosaccharide substrates and their hydrolysis by DispersinB" *Carbohydr. Res.*, **346**, 1445-1453. (2011)
- 111. M. Noguchi, T. Tanaka, H. Gyakushi, A. Kobayashi, S. Shoda, "Efficient synthesis of sugar sxazolines from unprotected N-aceil-2-amino sugars by using chloroformamidinium reagent in water" J. Org. Chem., 74, 2210-2212. (2009)
- 112. Y. He, M. S. Macauley, K. A. Stubbs, D. J. Vocadlo and G. J. Davis, "Visualizing the reaction coordinate of an O-GlcNac hydrolase" J. Am. Chem. Soc., 132, 1807-1809. (2010)
- 113. D. A. Mitchell, F. Carrière, N. Krieger, "An analitycal methode for detemining relative specificities for sequential reactions catalyzed by the same enzyme: general formulation" *Biochim. Biophys. Act.*, **1784**, 705-715. (2008)
- 114. E. Farkas, L. Jánossy, J. Harangi, L. Kandra, A. Liptak, "Synthesis of chromogenic substrates of a-amylases on a cyclodextrin basis" *Carhydr. Res.*, **303**, 407-415. (1997)

- 115. L. Kandra, G. Gyémánt, A. Lipták, Chemoenzymatic preparation of 2-chloro-4nitrophenyl β-maltooligosaccharide glycosides using glycogen phosphorylase b" *Carbohydr. Res.*, **315**, 180-186. (1999)
- 116. L. Kandra, G. Gyémánt, M. Pál, M. Petró, J. Remenyik, A. Lipták, "Chemoenzymatic sythesis of 2-chloro-4-nitrophenyl β-maltoheptaoside acceptor-products using glycogen phosphorylase b" *Carbohydr. Res.*, 333, 129-136. (2001)

9. Dolgozat publikációi

Az értekezés alapját képző közlemények

 Anikó Fekete, Gyöngyi Gyémánt, Anikó Borbás, Lili Kandra, <u>Erika</u> <u>Fazekas</u>, Narayanan Ramasubbu, Sándor Antus
 Synthesis of β-(1,6)-linked N-acetyl-D-glucosamine oligosaccharide substrates and their hydrolysis by DispersinB *Carbohydrate Research* (2011) 346, 1445-1453. Impakt faktor: 2,332

2. Erika Fazekas, Lili Kandra, Gyöngyi GyémántModel for β-1,6-N-acetylglucosamine oligomer hydrolysis catalysed byDispersinB, a biofilm degreding enzymeCarbohydrate Research (2012) 363, 7-13.Impakt faktor: 2,332

3.<u>Erika Fazekas</u>, Katalin Szabó, Lili Kandra, Gyöngyi Gyémánt **Unexpected mode of action of sweet potato beta-amylase on maltooligomer substrates**

BBA- Protein and Proteomics (2013) 1834, 10, 1976-1981

Impakt faktor: 3,73

Az értekezésben nem tárgyalt közlemények

 János A. Mótyán, <u>Erika Fazekas</u>, Haruhide Mori, Birte Svensson, Péter Bagossi, Lili Kandra, Gyöngyi Gyémánt **Transglycosylation by barley α-amylase 1** *Journal of Molecular Catalysis B – Enzymatic* (2011) 72, 229-237. Impakt faktor: 2,4

2.Zs. M. Szigeti, Sz. Szaniszló, <u>E. Fazekas</u>, Gy. Gyémánt, J. Szabon, K. Antal, T. Emri, J. Balla, Gy. Balla, L. Csernoch and I. Pócsi **Optimization of triacetylfusarinine C and ferricrocin productions in** *Aspergillus fumigatus*

Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica Impakt faktor:0,646 közlésre benyújtva

Előadások

1.Lili Kandra, János Mótyán, <u>Erika Fazekas</u>, Birte Svensson, Gyöngyi Gyémánt

Mapping of barley amylases. effect of mutation on subsite maps and activities

Annual Meeting of the Carbohydrate Working Group of Hungarian Academy of Sciences, Mátrafüred, Magyarország, 2008. május 29-30.

2.Mótyán, J.A., Fazekas, E., Sevensson, B., Kandra, L., Gyémánt, G.

Transglycosylations by modified barley amylase 1 enzymes-Enzymatic synthesis of 4-methylumbelliferyl-β-D-maltoologosaccharides

Annual Meeting of the Carbohydrate Working Group of Hungarian Academy of Science Mátrafüred, Magyarország, 2009.május 28-29.

3.Erika Fazekas, Gyöngyi Gyémánt

Exo enzimek alhely szerkezetének vizsgálata

Annual Meeting of the Carbohydrate Working Group of Hungarian Academy of Sciences, Mátrafüred, Magyarország, 2010. május 27-28.

4. János A. Mótyán, <u>Erika Fazekas</u>, János Harangi, Péter Bagossi, Birte Svensson, Lili Kandra, Gyöngyi Gyémánt

Enzymatic synthesis 4-methylembelliferyl group-containing maltooligosaccharides as new substrates for α-amylases

Annual Meeting of the Carbohydrate Working Group of Hungarian Academy of Sciences, Mártafüred, Magyarország, 2010. május 27-28.

5. Fazekas Erika, Marinó Sándor, Harangi János, Gyémánt Gyöngyi

Egy új számítógépes program exo-típusú glükozidáz enzimek alhely térképezéséhez

MTA Szénhidrátkémiai Munkabizottság Ülése, Budapest, Magyarország, 2011.szeptember 01.

6. Fazekas Erika, Kandra Lili, Gyémánt Gyöngyi

Szénhidrátok analízise enzimvizsgálatok során

MTA Szénhidrátkémiai Munkabizottság Ülése, Debrecen, Magyarország, 2012. május 30-31.

Poszterek

1.Mótyán János András, <u>Fazekas Erika</u>, Harangi János, Bagossi Péter, Birte Svensson, Kandra Lili, Gyémánt Gyöngyi

Másodlagos szubsztrátkötő-helyek vizsgálata az árpa amilázban (AMY1) Biokémiai Vándorgyűlés, Szeged, Magyarország, 2008.augusztus 31.szeptember 03.

2. Erika Fazekas, Lili Kandra, Gyönygi Gyémánt

Kinetic study of sweet potato β-amylase on CNP-β-maltooligosides *16th European Carbohydrate Symposium*, Sorrento-Nápoly, Olaszország, 2011.július 03-07.

3.Gyöngyi Gyémánt, Lili Kandra, <u>Erika Fazekas</u> **Subsite structure of DispersinB; a biofilm degreding enzyme** *16th European Carbohydrate Symposium*, Sorrento-Nápoly, Olaszország, 2011.július 03-07.

4. <u>Erika Fazekas</u>, Sándor Marinó, János Harangi, Gyöngyi Gyémánt **Subsite mapping of** *exo-***type enzymes**

4th European Conference on Chemistry for Life Science, Budapest, Magyarország, 2011.augustus 31- 2011.szeptember 03.

5.<u>Erika Fazekas</u>, Lili Kandra, Gyöngyi Gyémánt **Glycan analysis as a tool for enzymatic studies** *CIC biomaGUNE*, San Sebastian, Spanyolország, 2012. július 19-21.

6.<u>Erika Fazekas</u>, Gabriella Kiss, Kármen Szabó, Gyöngyi Gyémánt **New methode for activity measurement of glycogen phosphorylase b** *13th International Symposium and Summer School on Bioanalysis*, Debrecen, Magyarország 2013. június 27-július 7.

7.Gábor Lehoczki, <u>Erika Fazekas</u>, Gyöngyi Gyémánt **Investigation of active site structure and mechanism of a \beta(1,6)-N-acetyl-glucosaminidase enzyme**

13th International Symposium and Summer School on Bioanalysis, Debrecen, Magyarország 2013. június 27-július 7.