

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**EXO GLIKOZID HIDROLÁZ ENZIMEK MŰKÖDÉSÉNEK
TANULMÁNYOZÁSA
AZ ÉDESBURGNYA β -AMILÁZ ÉS A DISZPERZINB ENZIM VIZSGÁLATA**

Fazekas Erika

Témavezető: Dr. Gyémánt Gyöngyi egyetemi docens



DEBRECENI EGYETEM

Kémia Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2013

I. BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉSEK

A szénhidrátokat átalakító enzimek vizsgálata határterület a kémiai és biológiai kutatások között, hiszen a biológiai kérdések megválaszolására többnyire kémiai módszereket alkalmaznak. A glikozid hidrolázok (EC 3.2.1.-) az enzimek széles körű csoportja, két szénhidrát vagy egy szénhidrát és egy nem szénhidrát molekula közötti glikozidos kötést bontják. α -Amilázokkal folytatott korábbi vizsgálatokon alapulva célul tűztem ki *exo* hatásmódú glikozidáz enzimek vizsgálatát. Alhely szerkezetük és hatásmechanizmusuk tanulmányozásához egy inverziós és egy retenciós enzimet választottunk.

Inverziós modell fehérjének az édesburgonyából származó béta-amilázt (β AMY) használtuk. Jelentőségét mutatja, hogy 2020-ra több mint 2 milliárd ember élelmezése a gumós és gyökeres növényektől fog függeni. Az édesburgonya (*Ipomoea batatas*) a legfőbb β AMY forrás, mennyisége hozzávetőlegesen 5%-a az oldott fehérjéknek. Más gumós növények csak nyomnyi mennyiségben tartalmaznak β AMY-t. A β AMY (EC 3.2.1.2.-) a keményítő nem redukáló vége felőli második $\alpha(1,4)$ glikozidos kötés hidrolízisét katalizálja, az anomer konfiguráció inverziójával, β -maltóz felszabadításával. Felépítése nagyfokú homológiát mutat a többi, GH14 családba tartozó glikozid hidroláz enzimével (CAZy adatbázis), PDB azonosítója 1FA2. Vizsgálataink során 2-klór-4-nitrofenil maltooligomer sorozatot (CNP3-15) használtunk szubsztrátként. A szubsztrátokat a kromofor csoport abszorpciós maximumán, 302 nm hullámhosszon detektáltuk.

A DiszperzinB (DspB) (EC 3.2.1.52 vagy 3.2.1.-) egy N-acetil-glükózaminidáz enzim, amely az N-acetil-glükózamin egységek közötti $\beta(1,6)$ glikozidos kötések hidrolízisét katalizálja a szubsztrát lánc nem redukáló vége felől. A DspB-t egy szájjában található patogén mikroorganizmusból az *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-ból izolálták, képes a poli-N-acetil-glükózamin alapú biofilmek hidrolízisére. Az abiotikus felszínekről kiinduló fertőzéseket a legtöbb esetben biofilmet képző mikroorganizmusok okozzák és világszerte több millió olyan betegnek okoznak problémát, akinek orvosi eszközöket ültettek be. A DspB irányadó szerkezete a Fehérje Adatbázisban (PDB- Protein Data Bank) megtalálható (kódja: 1YHT), az enzimet a Glikozid Hidrolázok 20-as családjába sorolták (CAZy: Carbohydrate Active Enzymes database <http://www.cazy.org>). $(\beta/\alpha)_8$ hordó szerkezettel rendelkezik, a retenciós hidrolízis mechanizmusban az aktív hely glutaminsava és a szubsztrát N-acetil csoportja vesz részt. A DspB hidrolízis módjának tanulmányozásához kromofor csoporttal jelölt oligomer sorozatot alkalmaztunk, $\beta(1,6)$ kötésű N-acetil-glükózamin tiofenil glikozidokat (Ph-S-NAG_n), amelyek tagszáma 2, 3, 4 és 5 volt.

Mindkét enzim esetében a vizsgálatokhoz nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiát (HPLC) alkalmaztunk MALDI-TOF MS módszerrel együtt, a redukáló és nem redukáló végi termékek azonosítására. Szerettük volna megtudni, hogy az oligomer szubsztrátok hogyan kötődnek a modell enzimek aktív centrumába, illetve hogyan hasítódnak el. A kinetikai vizsgálatokhoz és a bontási képek tanulmányozásához ^1H -NMR módszert is alkalmaztunk. A vizsgálatokhoz szükséges szubsztrát sorozatok kereskedelmi forgalomban nem kaphatók, így szintézisüket meg kellett oldani.

II. ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

Analitikai mérések során Hewlett Packard 1090 folyadékkromatográfot használtam, amely diódasoros detektorral, automata mintaadagolóval és ChemStation-nal volt felszerelve. A mérések során Zorbax Eclipse XDC C18 (15 cm x 4,6 mm, 5 μ m), Kinetex XB C18 (10 cm x 4,6 mm, 2,6 μ m), YMC Polyamine II (25 cm x 4,6 mm, 5 μ m) kolonnákat alkalmaztunk a szubsztrátok és hidrolízis termékeik elkülönítéséhez, amelyeket a CNP (302 nm) és tiofenil (254 nm) csoportok abszorpciós maximumán detektáltunk. A preparatív készülék Youngling típusú, gázmentesítővel, kézi mintaadagolóval, valamint UV-Vis és CoronaCAD detektorral volt felszerelve. A tisztítások során SupelcosilTM LC-18 (25 cm x 10 mm, 5 μ m) és YMC Polyamine II (25 cm x 10 mm, 5 μ m) kolonnákat használtunk.

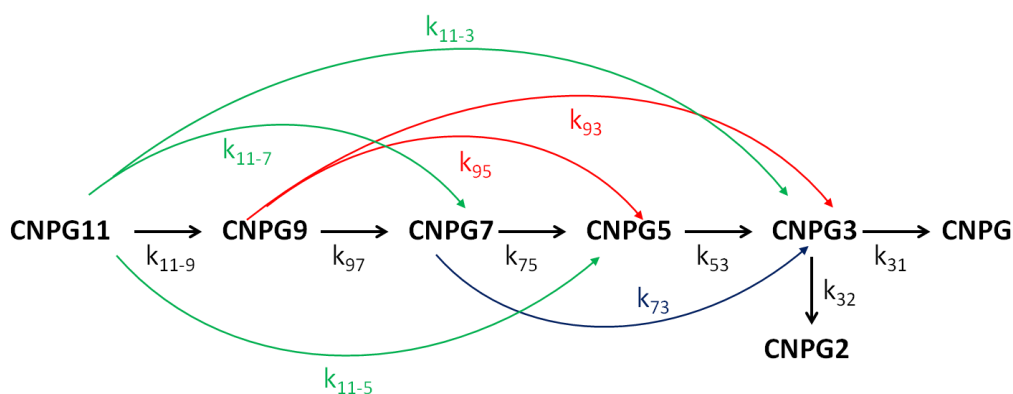
Az adatok kiértékelése a kezdeti reakciósebességek és a sebességi egyenletek felhasználásával történt. A kezdeti reakciósebességeket kis szubsztrát koncentráció mellett, 10% konverzió értékig határoztuk meg. A HPLC kromatogramokból a kiindulási szubsztrát koncentrációjának ismeretében kiszámoltuk a keletkezett termékek csúcs alatti területei alapján a termék koncentrációkat. Majd a kapott koncentrációkat a Grafit 2.1. program (Erithaus Software LTD, Harley, UK) segítségével ábrázoltuk az idő függvényében és a megfelelő pontokra egyenest illesztettünk. A szubsztrátok teljes hidrolízisének követésekor meghatározott szubsztrát- és termékkoncentráció-idő adatpárokat a Scientist[®] program (Micromath St. Luis, USA) segítségével értékeltük ki. A Scientist[®] program lehetőséget nyújt arra, hogy a mért pontokra modell egyenletek alapján görbéket illesszünk. A matematikai modell ebben az esetben az összegzett reakció sémából nyert differenciál egyenletek komplex rendszere. A program lehetővé teszi a differenciál egyenletek numerikus megoldását. A kinetikai állandókat (k) meghatároztuk. A minták elemzéséhez pozitív ion módban Bruker Biflex III MALDI-TOF tömegspektrométert alkalmaztunk. A minták ionizációjához 337 nm hullámhosszon sugárzó nitrogén lézert használtunk. A mintákat 2,4,6-trihidroxiacetofenon (THAP) mátrixában vittük fel a mintatartó lemezre és hagytuk megszáradni. A spektrumok több (legalább 100) lézer lövés összegzett eredményéből készültek 19 kV gyorsító és 20 kV reflektoron feszültség mellett. A kalibráció 6-8 tagszámú ciklodextrinek $[M+Na]^+$ csúcsaira történt (m/z 995,31, 1157,36 és 1319,41 Da). ¹H-NMR spektroszkópiát az enzimreakciók követésére és közti termékek megfigyelésére alkalmaztunk. A termékek azonosítását Dr. Batta Gyula és munkatársai végezték Bruker Advance II készülékkel 500 MHz-en.

III. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Az édesburgonya β AMY vizsgálatának eredményei

A) Teljes hidrolízis reakciók modellje

Édesburgonya β -amiláz teljes hidrolízis reakcióinak kromoforos oligomer szubsztrátokon való követése HPLC módszerrel történt. β AMY katalizálta hidrolízisek kromoforral jelölt redukáló végi termékeinek mennyiségét meghatároztuk. A koncentráció-idő adatpárokat a Scientist® program segítségével értékeltük ki. Ha $n-1$ szekvenciális reakció jön létre, akkor n differenciálegyenlettel írható fel az $n-1$ szubsztrát és végtermék koncentrációjának időbeli változása. Párhuzamos és egymást követő reakciólépéseket vettünk figyelembe a modell megalkotásakor. A CNPG11 szubsztrát hidrolízise során a legjobban illeszkedő modell az 1. ábrán látható.



1. ábra: CNPG11 szubsztrát édesburgonya β AMY enzim által katalizált 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 minden szubsztrátnál. Az egyes reakciólépéshez tartozó „ k ” sebességi állandó indexébe a kiindulási szubsztrát és a belőle keletkezett termék tagszáma került. Transzglikozilezés és processzív hasítás minden szubsztrát esetében megfigyelhető volt kivéve a legrövidebb CNPG5 esetében. Az illesztések akkor voltak sikeresek, ha a kezdeti gyors hidrolízis és transzglikozilezési szakaszt elhanyagoltuk és a reakciók harmadik szakaszára illesztettük a modellünket. Ezért a pontos leíráshoz további számítások szükségesek.

Szubsztrátjaink kromofor aglikonként aromás gyűrűt és béta glikozidos kötést tartalmaztak, amely kedvező kötődésüket eredményezte az aktív centrumba. A korábbi vizsgálatokkal ellentétben glükóz hasítását tapasztaltuk maltotrióz hidrolízise során CNPG2 termék

keletkezése mellett páratlan tagszámú szubsztrátok esetében (5, 7 és 11 tagszám). A trimer hidrolízis sebessége sokkal kisebb a tetramer vagy pentamer hidrolíziséénél, amely a +2 és +3 aglikon kötőhelyek fontosságát jelzi a szubsztrát kötésében. Mindamellett a dimer redukáló végi termék nagyobb mennyisége trimer szubsztrát esetében arra enged következtetni, hogy a glükóz kedvezőbben kötődik a +2-es aglikon kötőhelyhez, mint a -2-es glikon kötőhelyhez.

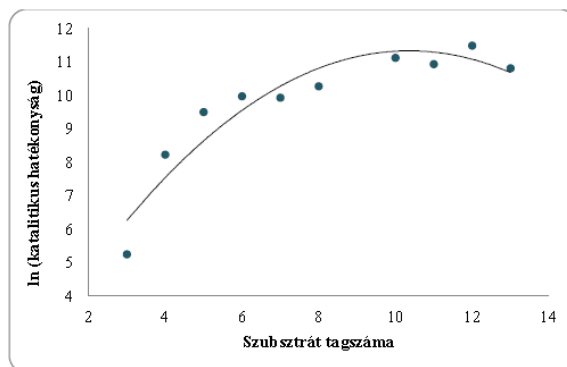
B) Az édesburgonya β AMY katalitikus hatékonysága és *exo* karakterének igazolása

A katalitikus hatékonyság meghatározásához kis szubsztrát koncentráció mellett HPLC módszert alkalmaztunk. A kezdeti sebességekből a katalitikus hatékonyság k_{cat}/K_M értékei a következő alap egyenlettel számíthatók (1):

$$v_o \approx \left(\frac{v_{max}}{K_M} \right) [S] \quad \text{ha a } [S] \ll K_M \quad (1)$$

ahol v_{max} megadja az enzim átviteli számát (k_{cat}) ha az enzimkoncentráció $[E_t]$ ismert, mert $v_{max} = k_{cat}[E_t]$. A k_{cat}/K_M kifejezés az enzim katalitikus hatékonyságának mérésére szolgál.

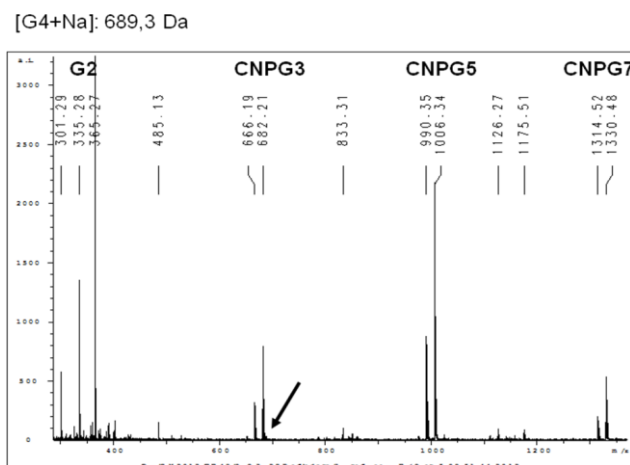
A katalitikus hatékonyság növekszik a szubsztrát lánchosszának növekedésével, amely jelzi, hogy a hosszabb szubsztrátok bekötődése és hasítása kedvezőbb (2. ábra)



2.ábra: Édesburgonya β AMY enzim által katalizált hidrolízis reakció során CNP maltooligomer sorozaton meghatározott katalitikus hatékonyság értékek ábrázolása a felhasznált szubsztrátok tagszámának függvényében

CNPG7 szubsztrát reakcióelegyében kizárólag maltóz keletkezését igazoltuk a nem redukáló vég felől MALDI-TOF MS méréssel (3. ábra). Egy napos reakcióidőt követően a maradék szubsztrát mellett két redukáló végi termék, a pentamer és a trimer jelent meg, és csak egy nem redukáló végi termék, a maltóz. Ez processzivításra utal, amikor a hasítás után az egyik termék nem disszociál le az enzim felületéről, hanem azon továbbcsúsztatva egy újabb kötés hasítása következik be. Így a sebesség meghatározásában nemcsak a kötődés, hanem ezen

processzív lépések száma is szerepet játszhat, kisebb lesz a mért sebesség, mert a szubsztrát sokáig elfoglalja az enzimet. Emiatt az alhelytérkép számítások nem lehetségesek.

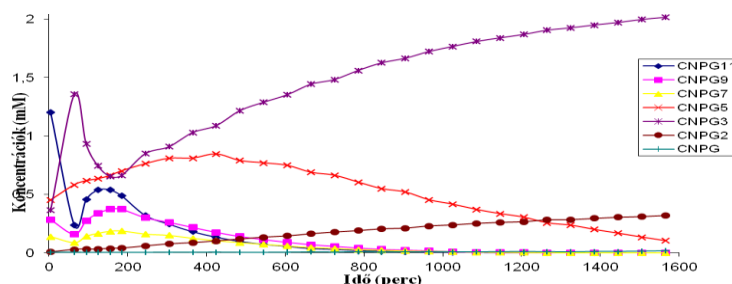


3.ábra: Édesburgonya β AMY enzim által katalizált CNPG7 hidrolízis reakció MALDI-TOF MS spektruma 1 nap reakcióidő után. A számított m/z értékek: CNPG7= 1330,348; CNPG5= 1006,242; CNPG3= 682,132; G2= 365,106, G4= 689,3, amely nem jelenik meg a spektrumon.

C) Transzglikozilezés hidrolízis reakciók során

Megfigyeléseink alapján megállapítottuk, hogy spontán maltóz transzfer következik be a hidrolízis reakció korai szakaszában minden szubsztrát esetében, ahol a processzív hasítás lehetséges. CNPG11 hidrolízisekor a transzglikozilezéssel keletkezett termékek mennyisége jelentős (4. ábra). Összehasonlítottuk az összetevők koncentrációját a 65 és 155 percnél, a CNPG11 koncentrációja kétszeresére növekszik: 0,24 mM-ról 0,54 mM-ra. Ugyanebben a reakcióban a CNPG9 és a CNPG7 koncentrációjának változása szintén kétszeres növekedést mutat. A CNPG9 és CNPG7 a hidrolízis termékei is lehetnek, de a CNPG11 koncentrációjának növekedése csak transzglikozilezés útján következhet be. Hasonló tendencia figyelhető meg CNPG8, CNPG7 és CNPG6 kiindulási szubsztrát esetében, habár az arány kisebb. Az α -amiláz és más retenciós glikozidázok transzglikozilezési reakciói jól ismertek és részletesen tanulmányozottak. Ezt az aktivitást viszont eddig nem írták le inverziós glikozidázok hidrolízis reakciói során. Ez az első alkalom, hogy maltooligomerek hidrolízise során transzglikozilezési 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. 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.

Abban az esetben, amikor külön maltóz donort és kromoforos akzeptort alkalmaztunk nem tapasztaltunk transzglykozilezési reakciót. Ennek oka még nem tisztázott. Valószínűleg a hidrolízis során keletkező β -maltóz nem disszociál le az enzim felületéről, így a reverz reakció azonnal megtörténhet, ellentétben azzal mikor a maltóz α/β anomer elegyként van jelen a reakcióelegyben.



4.ábra: CNPG11 (2,45 mM) édesburgonya β AMY ($3,2 \times 10^{-8}$ M) katalizálta teljes hidrolízisének nyomon követése HPLC módszerrel.

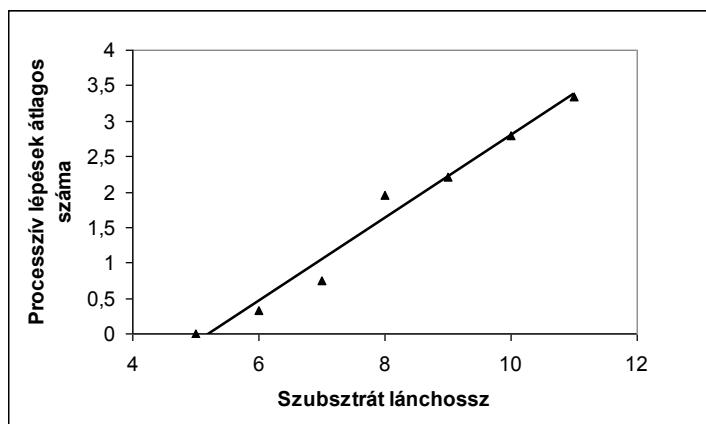
D) Processzív hasítási mód igazolása

A processzív hasítás vagy *multiple attack* számos, polimer szubsztráton ható enzim esetében megfigyelhető, amelyek gyakran nem oldódó szubsztrátot, például kitint vagy cellulózt bontanak. A processzív lépések átlagos száma $\underline{n}$ egy enzim-szubsztrát komplex esetén számítható, ehhez a HPLC módszerrel meghatározott termékarányokat és a (2) egyenletet használtuk fel.

$$n = \frac{P}{1-P} (1 - P^N) \quad (2)$$

ahol P a második hasítás valószínűsége a hidrolízis során az enzim-termék komplex disszociációja nélkül, $1-P$ a termék disszociációjának valószínűsége és N a csúszás lehetőségének maximális száma.

A szubsztrát lánchossz növekedésével növekszik a lépések átlagos száma, a kapcsolat közel lineáris a vizsgált tartományban, az x-tengely metszete mutatja meg azt a lánchosszt, ahol még nincs jelen processzivitás. A legmagasabb érték 3,34 DP11 tagszámú szubsztrát esetében, amely jó egyezést mutatott a korábban a DP44 átlagos tagszámú amilózon mért 3,3 értékkel (5. ábra).



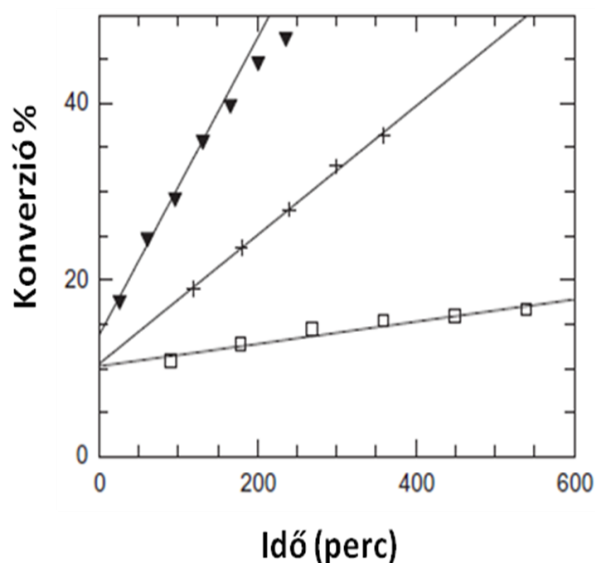
5. ábra: Processzív lépések száma CNP maltooligomerek édesburgonya β AMY enzim által katalizált hidrolízise során

2. DiszperzinB enzim vizsgálatának eredményei

A) Aromás aminosavak mutációjának hatása az aktív centrumban

Vizsgáltuk a szubsztrát lánchosszának hatását a hidrolízis sebességére. Megállapítottuk, hogy a szubsztrát lánchossz növekedésével növekszik a hidrolízis sebessége. A reakciósebesség tehát növekszik a lánchosszal a tetramerig, de az ötödik GlcNAc egység bekötődésével a pentamer esetén nem tapasztaltunk további sebesség növekedést. Ezen eredmények alapján feltételeztük, hogy legalább négy GlcNAc egység szükséges az alhelyek betöltéséhez.

Tyr187Ala, Tyr278Ala és Trp237Ala mutánsok hidrolitikus aktivitását szintén vizsgáltuk tiofenil glikozid szubsztrátokon és összehasonlítottuk a vad típusú enzimével (6. ábra). Megállapítottuk, hogy a vad típusú enzim sokkal aktívabb a pentamer szubsztráton, mint a Tyr187Ala mutáns, a Tyr278Ala mutáns kisebb aktivitást mutat, míg a Trp237Ala mutáns teljesen inaktív volt. Eredményeink megerősítették a Manuel és munkatársai felvetését, mely szerint a Trp237 fontos szerepet tölt be a szubsztrát kötésében a hidrofób zsebben DspB esetében.



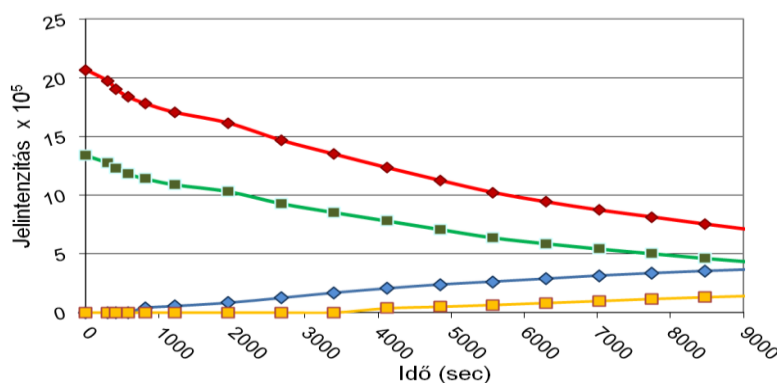
6. ábra: Pentamer szubsztrát DspB katalizálta hidrolízisének konverzió értékei ▼ vad típusú enzim, +Tyr187Ala és □Tyr278Ala mutáns.

B) Enzimreakció sztereokémiájának igazolása ^1H -NMR mérésekkel

^1H -NMR módszert alkalmaztunk a retenciós hasítási mód igazolására.

Para-nitrofenil- β -D-N-acetilglükózamin glikozid hidrolízisét nyomon követve az NMR spektrumon új dublettek megjelenését tapasztaltuk a szabad aromás és anomer protonok jelének megfelelően. Az α -anomer proton jele a reakció későbbi szakaszában jelent meg (7. ábra), amely azt mutatta, hogy a primer β -GlcNAc hidrolízis termékből mutarotációval α -GlcNAc keletkezik. A β -GlcNAc anomer proton jele szintén jelen van a ^1H -NMR

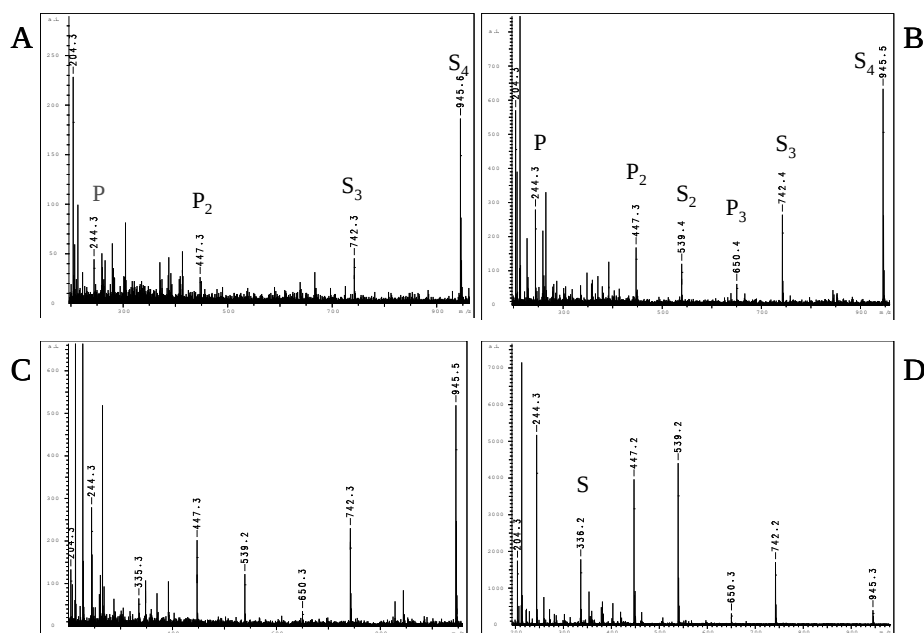
spektrumban, de a víz jele részben elfedi azt. A kapott eredmények egyértelműen igazolják, hogy a DspB enzim retenciós mechanizmussal működik.



7.ábra: A különböző proton csúcsokhoz tartozó jelintenzitások változása az ^1H -NMR mérés során ($\diamond$ -aromás protonok jele a glikozidban, $\diamond$ -aromás protonok jele a szabad PNP-ben, $\square$ - β -anomer protonok jele a glikozidban, $\square$ -szabad monoszacharid α -anomer protonok jele)

C) Több produktív kötőmód jelenlétének kimutatása

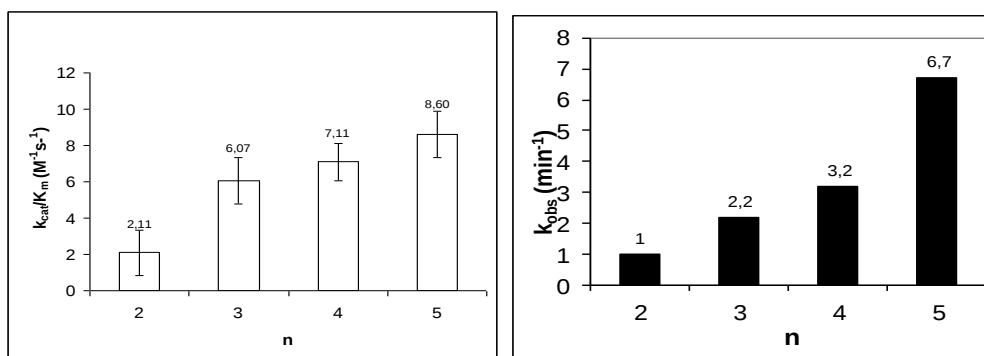
A nem redukáló végi termékek összetételét a reakcióelegyben MALDI-TOF módszerrel határoztuk meg. A 8. ábrán látható a pentamer hidrolízis reakcióelegyének spektruma különböző időpontokban. 10 perc elteltével (8.ábra A) két redukáló végi termék, a tetramer (S_4) és a trimer (S_3) jelenik meg, ezzel párhuzamosan az annak megfelelő monomer (P) és dimer (P_2) nem redukáló végi termékek is láthatóvá válnak. A 204,3 Da m/z értékkel rendelkező $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ csúcs is megjelenik, jelezve az oxazolin jelenlétét, ami a szubsztrát segítette hidrolízis mechanizmus közterméke lehet DspB esetében. 20 perc elteltével (8.ábra B) minden redukáló végi és nem redukáló végi termékpár ($S_4+\text{P}$, $S_3+\text{P}_2$, $S_2+\text{P}_3$) jelen van a tömegspektrumon. Egy órával az enzimreakció elindítása után (8.ábra C) a konszekutív reakció utolsó végtermékeként megjelenik a monomer glikozid. Egy nap elteltével (8.ábra D) a konszekutív lépések termékei S, S_2 és P, P_2 válnak fő termékekké. Ezzel igazoltuk az alternatív produktív kötőmódok jelenlétét.



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

D) Katalitikus hatékonyság vizsgálata oligomer sorozaton

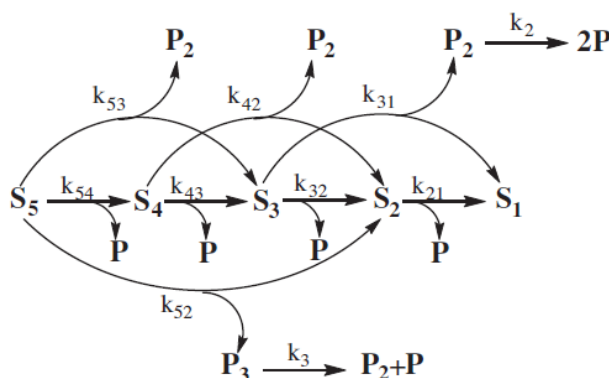
A katalitikus hatékonyság meghatározása során 3 független méréssort használtunk. A reakciók kezdeti sebességét kis szubsztrát koncentrációk mellett (0,2 mM) vizsgáltuk, a termékek koncentrációját szakaszos mérési módszerrel, HPLC-vel határoztuk meg. A szubsztrátkoncentráció-idő adatpárok a teljes hidrolízis reakciókból is meg lettek határozva. Az adat pontokra a Scientist[®] programmal illesztettem kinetikai görbéket a Michaelis-Menten egyenlet alapján. A k_{cat}/K_M értékeket a v_{max} és K_M értékekből valamint a teljes enzim koncentrációból $[E]_0$ számítottam. Végül, kezdeti reakciósebességet határoztam meg a szubsztrát koncentrációjának változásából. A kezdeti reakciósebesség lineárisan növekszik alacsony szubsztrát koncentráció mellett, a görbe lineáris szakaszának meredeksége megegyezik a k_2/K_M sebességi állandóval, amelyből a katalitikus hatékonyság számolható. A kapott hatékonyság értékek átlaga és a megfelelő kinetikai állandók összege a 9. ábrán látható. A katalitikus hatékonyság növekszik a szubsztrát lánchosszának a növekedésével, jelezve a hosszabb szubsztrátok preferáltabb kötődését és nagyobb reakció készségét. A számított pszeudo elsőrendű kinetikai konstansok hasonló értékeket és tendenciát mutatnak.



9. ábra: A számított katalitikus hatékonyság átlaga és az elsőrendű kinetikai állandók szummája ábrázolva a szubsztrát lánc hosszának függvényében. DspB enzim által katalizált HPLC módszerrel követett teljes hidrolízis reakciók tiofenil glikozidokon (S₂-S₅)

E) Kinetikai adatok meghatározása

Szisztematikus bontási kép és kinetikai vizsgálatokat végeztem oligomer szubsztrát sorozaton, hogy megadjam a DspB enzim aktív helyének szerkezetét és hasítási módját. Folyamatgörbét Scientist[®] program segítségével illesztettünk, a modell párhuzamos és egymást követő reakciólépései az 1. sémán láthatóak.



1. séma: Pentamer szubsztrát hidrolízise DspB-vel.

A folyamat (teljes hidrolízis) görbék analízise azt mutatja, hogy több produktív kötőmód eredményeként a hosszabb szubsztrátok esetében (tetramer és pentamer) párhuzamos reakció megy végbe. Monoton növekedést figyeltem meg a pszeudo elsőrendű kinetikai állandók esetében a kinetikai értékelések során (1.táblázat).

Az új monomer egység bekötődése az aktív centrumba javítja a szubsztrát bekötődését az aktív helyhez a katalitikus átalakítás során. 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.

1.táblázat: DspB által katalizált teljes hidrolízis reakciók során számított kinetikai állandók

Paraméter	Kinetikai állandók (perc ⁻¹ x10 ³)			
	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 ⁷ (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

^a az adott szubsztrát összesített kinetikai állandója

^b M⁻¹s⁻¹

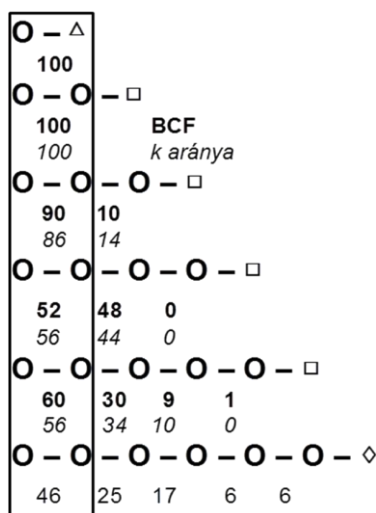
- az adat nem számított

0 számolt adat de nagyon alacsony érték

F) Szigorú nem redukáló végi specifitás igazolása

A hidrolízis bontási képét HPLC módszerrel határoztuk meg. A kinetikai konstansok összehasonlítása minden egyes szubsztrát esetében a párhuzamos reakciókból történt. A kötés-hasítási frekvencia (BCF) adatok és a számított arányok összefoglalása a 10. ábrán látható. A BCF értékek jó egyezést mutatnak a kinetikai állandók arányával. Ez megerősíti az általunk javasolt modell helyességét (1. séma).

DspB szigorúan nem redukáló végi preferenciát mutat, de több produktív kötőmód is lehetséges.



8.ábra: DspB enzim tiofenil glikozidokon meghatározott bontási képeinek vizsgálata; **felső értékek:** teljes hidrolízis reakciók kezdeti szakaszából származó termékek egymáshoz viszonyított aránya; **alsó értékek:**

Scientist® program által megadott kinetikai állandók egymáshoz viszonyított aránya ugyanabban a reakcióelegyben (O-GlcNAc egység, - β(1-6) glikozidos kötés, □- tiofenil aglikon, Δ- 4-nitrofenil aglikon, ◇- 4-metoxifenil aglikon)

G) Javaslat a DspB helyes besorolására

A DspB EC 3.2.1.52 és/ vagy GH20 családba és EC 3.2.1.- (CAZy)-ba történő besorolása már korábban megtörtént, a specifikitás, a szekvencia homológia 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 -D-hexózaminidázok. N-acetilglikozidokon és N-acetilgalaktozidokon hatnak”. A DspB csak PNP- β -GlcNAc-on hat, PNP- β -GalNAc-on nem, 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. Mindamellet más adatbázisok, mint BRENDA (BRENDA: Enzimek Széleskörű Információs Rendszere (<http://www.brenda-enzymes.info/>) és a PDB (Protein Data Bank- Fehérje adatbázis (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) még mindig az EC 3.2.1.52 osztályba sorolják az enzimet.

Ezért javasoltuk az EC 3.2.1.- általános használatát, mivel a DspB nem hidrolizál N-acetilgalaktozidokat, több produktív kötőmódot képes kialakítani és nem valódi *exo* enzim.

IV. ÖSSZEFOGLALÁS

Édesburgonyából származó β -amiláz vizsgálatának eredményei:

1. Édesburgonyából származó β -amiláz aktivitás mintázatát aromás kromofor csoporttal jelölt szubsztrát sorozaton vizsgáltuk. Szubsztrátjaink aglikonként aromás gyűrűt tartalmaznak, amely kedvező kötődésüket eredményezi az aktív centrumba. Lehetővé teszi páros tagszámú szubsztrátok esetében a redukáló és nem redukáló végi termékek megkülönböztetését.
2. Korábbi eredményekkel szemben, azt találtuk, hogy egy glükóz egység lehasadásával a trimer szubsztrátból CNPG2 termék keletkezett páratlan tagszámú szubsztrátok esetében.
3. Transzglikozilezést minden szubsztráton megfigyeltünk, kivéve a CNPG5 és annál rövidebbeknél. Spontán maltóz transzfert figyeltünk meg a hidrolízis reakciók kezdeti szakaszában, ahol a processzív hasítás lehetséges.
4. A processzív hasítási módot igazoltunk. A lépések átlagos száma növekszik a szubsztrát lánchosszával növekedésével.

DiszperzinB enzim vizsgálatának eredményei:

1. ^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 -anomert szabadít fel.
2. MALDI-TOF mérésekkel kimutattuk a hidrolízis során keletkező összes redukáló és nem redukáló végi terméket, szigorú nem redukáló végi specifitást igazoltunk. Az enzim több produktív enzim-szubsztrát komplex kialakítására képes oligomer szubsztrátokkal.
3. Meghatároztuk a katalitikus hatékonyságot, amely a szubsztrát lánchosszával növekedésével növekszik. A hosszabb szubsztrátok preferáltabban kötődnek és nagyobb reakció készséget mutatnak. A számított pszeudo elsőrendű kinetikai konstansok hasonló értékeket és tendenciát mutatnak.
4. Megállapítottuk, hogy 5 GlcNAc egység a szubsztrátban nem elég ahhoz, hogy az enzim összes alhelyét lefedje. A DspB alhely térképének pontos meghatározásához hosszabb szubsztrátok előállítása szükséges.
5. Javaslatot tettünk az enzim pontosabb besorolására a különböző adatbázisokban.

V.TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓK

Az értekezés alapját képző közlemények

1. Anikó Fekete, Gyöngyi Gyémánt, Anikó Borbás, Lili Kandra, Erika Fazekas, 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 Gyémánt

Model for β -1,6-N-acetylglucosamine oligomer hydrolysis catalysed by DispersinB, a biofilm degreding enzyme

Carbohydrate Research (2012) 363, 7-13.

Impakt faktor: 2,332

3.Erika Fazekas, 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

1. János A. Mótyán, Erika Fazekas, 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, E. Fazekas, Gy. Gyémánt, J. Szabon, K. Antal, T. Emri, J. Balla, Gy. Balla, L. Csernoch and I. Pócsi

Optimization of triacetylfulvarin C and ferricrocin productions in *Aspergillus fumigatus*

Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica-közlésre benyújtva

Előadások

1.Lili Kandra, János Mótyán, Erika Fazekas, 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, Erika Fazekas, 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, Fazekas Erika, 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, Gyöngyi 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, Erika Fazekas

Subsite structure of DispersinB; a biofilm degrading enzyme

16th European Carbohydrate Symposium, Sorrento-Nápoly, Olaszország, 2011.július 03-07.

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

Subsite mapping of exo-type enzymes

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

5.Erika Fazekas, Lili Kandra, Gyöngyi Gyémánt

Glycan analysis as a tool for enzymatic studies

CIC biomaGUNE, San Sebastian, Spanyolország, 2012. július 19-21.

6.Erika Fazekas, Gabriella Kiss, Kármén Szabó, Gyöngyi Gyémánt

New method 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, Erika Fazekas, Gyöngyi Gyémánt

Investigation of active site structure and mechanism of a β (1,6)-N-acetyl-glucosaminidase enzyme

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

NYILATKOZAT

Tanúsítom, hogy Fazekas Erika Ph.D hallgató a lent feltüntetett cikkhez 50%-ban járult hozzá.

Tudományos publikáció:

Anikó Fekete, Gyöngyi Gyémánt, Anikó Borbás, Lili Kandra, Erika Fazekas, 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.

Debrecen, 2013. október 31.

.....
Dr. Gyémánt Gyöngyi
témavezető