

**EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS**

**$\alpha$ -Amilázok termékanalízisen és  
molekuláris modellezésen alapuló alhelytérképezése és  
transzglykozidáz aktivitásuk vizsgálata**

**Mótyán János András**



**DEBRECENI EGYETEM  
MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA  
DEBRECEN, 2011.**

# Tartalom

<b>1. Tartalom</b> .....	2
<b>2. Bevezetés</b> .....	4
<b>3. Irodalmi áttekintés és célkitűzés</b> .....	6
3.1 $\alpha$ -Amilázok előfordulása és jelentősége .....	6
3.2 $\alpha$ -Amilázok besorolása, az $\alpha$ -amiláz család jellemzése.....	7
3.3 $\alpha$ -Amilázok működése.....	10
3.4 $\alpha$ -Amilázok szerkezete .....	13
3.5 $\alpha$ -Amilázok alhelyszerkezete, aktív centrum térképezés.....	15
3.6 Az AMY1 szubsztrátkötő helyei .....	20
3.7 Amilázok alkalmazása szintézis reakciókban.....	23
3.8 Célkitűzés .....	26
<b>4. Anyagok és módszerek</b> .....	27
4.1 Felhasznált anyagok .....	27
4.1.1 Szubsztrát, donor és akceptor molekulák.....	27
4.1.2 Enzimek.....	28
4.2 Módszerek .....	29
4.2.1 Nagynyomású folyadékkromatográfiás (HPLC) elválasztások .....	29
4.2.2 CNP csoporttal jelölt maltooligoszacharid szubsztrátsorozat előállítása.....	29
4.2.3 Bontási képek meghatározása.....	32
4.2.4 Számítások a SUMA számítógépes programmal.....	32
4.2.5 Transzglykozilezés reakciók.....	33
4.2.6 MU csoporttal jelölt maltooligoszacharid szubsztrátsorozat előállítása.....	33
4.2.7 Kinetikai mérések MU-MOS szubsztrátokkal .....	34
4.2.8 $^1\text{H}$ és $^{13}\text{C}$ NMR analízisek.....	34
4.2.9 Tömegspektrometriás mérések (MALDI-TOF MS).....	34
4.2.10 Alhelytérképezés molekuláris modellezéssel.....	35
<b>5. Eredmények és megbeszélés</b> .....	38
5.1 Az AMY1 másodlagos szubsztrátkötő hely mutánsainak vizsgálata .....	38
5.2 Az AMY1 aktív hely mutánsainak vizsgálata .....	43
5.3 Vad típusú és mutáns AMY1 enzimek transzferáz aktivitásának vizsgálata .....	49
5.3.1 A szubsztrátkötő alhelyek mutációjának hatása az AMY1 transzferáz aktivitására	49

5.3.2 Enzimatis transzglikozilezés a V47F AMY1 enzimmel - a reakciókörülmények optimalizálása.....	52
5.3.3 Enzimatis transzglikozilezés a V47F AMY1 enzimmel - a preparatív méretű szintézis.....	56
5.3.4 Kinetikai mérések fluoreszcens MU- $\alpha$ -D-MOS szubsztrátokkal .....	58
5.4 $\alpha$ -Amiláz enzimek alhelytérképezése molekuláris modellezéssel.....	62
5.4.1 A tanító és az ellenőrző halmazok létrehozása.....	62
5.4.1.1 A tanító halmaz .....	62
5.4.1.2 Az ellenőrző halmaz .....	64
5.4.1.3 Szerkezetillesztés és szekvenciaelemzés .....	67
5.4.2 A számítások lépései.....	68
5.4.3 Bontási képek jóslása.....	73
<b>6. Összefoglalás .....</b>	<b>77</b>
<b>7. Summary .....</b>	<b>78</b>
<b>8. Irodalomjegyzék .....</b>	<b>79</b>
<b>9. Tárgyszavak.....</b>	<b>87</b>
<b>10. Rövidítések.....</b>	<b>88</b>
<b>11. Köszönetnyilvánítás .....</b>	<b>89</b>
<b>12. Függelék .....</b>	<b>90</b>

## 2. Bevezetés

Az  $\alpha$ -amilázok (EC 3.2.1.1) igen elterjedt enzimek, melyek csaknem minden élő szervezetben megtalálhatóak. Szénhidrátokon ható enzimek, melyek a növényekben a tartaléktápanyagok hidrolízise, az állatok és az ember esetében a táplálkozással felvett poli- és oligoszacharidok bontása révén nélkülözhetetlenek a szénhidrátanyagcsere során. A bakteriális eredetű, a növényi, az állati és a humán  $\alpha$ -amilázok vizsgálatát egyaránt indokolja széleskörű felhasználásuk és az ipar számos területén, pl. a gyógyszeriparban, valamint a klinikumban betöltött jelentős szerepük.

Az enzim-szubsztrát kölcsönhatások tanulmányozása révén közelebb kerülhetünk az amilázok működési mechanizmusának megértéséhez, melyre számos szénhidrátkémiai, glikobiológiai és biokémiai eszköz is rendelkezésünkre áll. Az  $\alpha$ -amilázok aktív centrumának térképezésére irányuló vizsgálatok nemcsak az enzim-szubsztrát kölcsönhatások kvantitatív meghatározását foglalják magukba. Elválaszthatatlan tőle az enzimológiai mérésekhez szükséges maltooligoszacharid szubsztrátok előállítása is. A kemoenzimatikus szintézissel előállított valamint az összetett termékelegyet alkotó molekulák analízise elválasztástechnikai problémák megoldását is szükségessé teszi. A transzglykozidáz aktivitás tanulmányozása révén szintén jelentős ismeretek nyerhetők az enzimek működésére vonatkozóan. A transzfer reakcióval történő glikozilezések hasznos eszközök lehetnek nemcsak a szerves kémiai szintézisek során felmerülő problémák megoldására, hanem az amilázok vizsgálatára alkalmas inhibítor és aglikon vagy glikon csoporttal jelölt oligomerek kemoenzimatikus előállítására is.

Az aktív centrum térképezésének termékanalízisen alapuló módszerét igen elterjedten alkalmazzák, azonban a megbízható alhelytérképek elkészítéséhez szükséges kromogén szubsztrátok elérhetősége meglehetősen korlátozott. A megfelelő tagszámú oligomerból álló szubsztrátsorozatok kevés tagja érhető el a kereskedelmi forgalomban, és ezek ára igen magas. Tiszta formában történő előállításuk és a bontási képek meghatározása, azaz a termékanalízis során a molekulák elválasztása és mennyiségi meghatározása HPLC technika alkalmazását teszi szükségessé, ami időigényes és nagy oldószerigényű folyamat. A kísérletes eljárások támogatására, költségeinek vagy időigényének csökkentésére számos esetben alkalmaznak számítógépes eljárásokat. Az aktív centrum térképezésre irányuló vizsgálatokban jelentős segítséget jelentett például a SUMA szoftver („Subsite mapping of  $\alpha$ -amylases”) kifejlesztése, mely az  $\alpha$ -amilázok alhelytérképezését az adatok gyors feldolgozása és kiértékelése révén tette egyszerűbbé és hatékonyabbá. Az enzim-szubsztrát kölcsönhatások tanulmányozásának

további hatékony eszköze lehet a molekulák röntgenkristallográfiával meghatározott szerkezetének molekuláris modellezéssel történő elemzése. Számos esetben használtak bioinformatikai módszereket az  $\alpha$ -amilázok szerkezet-funkció összefüggéseinek vizsgálatára, azonban nem ismert olyan eljárás, mely a röntgenkristallográfiás szerkezeteik vagy a homológ modelljeik felhasználásával tenné lehetővé az enzim-szubsztrát kölcsönhatások kvantitatív meghatározását. A molekulamechanikai számítások lehetőséget adhatnak a vad típusú enzimek működésének jobb megismerésére és a módosított enzimek tulajdonságainak jóslására. Ezért a bioinformatikai módszerek felhasználása a kísérletes vizsgálatok támogatásában számos előnnyel járhat akár a kísérletes adatok gyors és egyszerű jóslása, akár a költségek csökkentése szempontjából.

Doktori munkámat 2006-ban kezdtem el, bekapcsolódva az  $\alpha$ -amilázok enzim-szubsztrát kölcsönhatásainak felderítésére irányuló kutatásokba. Az  $\alpha$ -amilázok hidrolitikus és transzferáz aktivitásának vizsgálatára, valamint az aktív centrum térképezésére irányuló enzimológiai vizsgálatokat a Debreceni Egyetem Természettudományi és Technológiai Karának (DE TEK TTK) Biokémiai Tanszékén végeztem, Dr. Harangi János témavezetésével és Dr. Gyémánt Gyöngyi irányításával. Munkám az enzimológiai kutatások kiterjesztését és bioinformatikai eljárások alkalmazását célozta, így már kezdetekől fogva szoros együttműködés alakult ki a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrumának (DE OEC) Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézetével. Az  $\alpha$ -amiláz enzimek molekuláris modellezéssel történő vizsgálataim során csatlakozhattam a Retrovirális Biokémiai Laboratórium Szerkezeti Biológiai és Bioinformatikai Csoportjához, ahol nagy tapasztalattal rendelkeztek a molekuláris modellezéssel történő vizsgálatokban és a bioinformatikai módszerek alkalmazásában. A munkához szükséges elméleti és gyakorlati feltételeket Dr. Bagossi Péter csoportvezető biztosította számomra, aki a munka irányítása mellett kezdettől fogva vállalt témavezetői feladatokat is.

### 3. Irodalmi áttekintés és célkitűzés

#### 3.1 $\alpha$ -Amilázok előfordulása és jelentősége

Az  $\alpha$ -amilázok széles körben elterjedt enzimek, melyek csaknem minden élő szervezetben megtalálhatóak: *Archea* fajokban, baktériumokban, gombákban, növényekben, állatokban és az emberben egyaránt. Nélkülözhetetlen szerepet töltenek be a szénhidrát-anyagcserében, a növényi amilázok a tartaléktápanyagként raktározott keményítő hidrolíziséért felelősek, az állatok és az ember esetében is a táplálékkal felvett poli- és oligoszacharidok lebontásában szerepelnek.

Az  $\alpha$ -amilázok jelentőségét széleskörű felhasználásuk is mutatja. A világszerte ipari felhasználás céljából előállított enzimek megközelítőleg 30%-át az  $\alpha$ -amilázok teszik ki (van der Maarel és mtsai., 2002). Túlnyomó többségük mikrobiális eredetű, köszönhetően annak, hogy egyszerűen és nagy mennyiségben állíthatók elő biotechnológiai eljárásokkal és az ipari célú felhasználás szempontjából előnyös tulajdonságokkal rendelkeznek. Napjainkra a keményítő savas hidrolízissel történő bontását egyre inkább felváltották a keményítóbontó enzimeket használó, hatékony és környezetbarát technológiák, melyekben igen fontos szerep jut az  $\alpha$ -amilázoknak. A *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amiláz (BLA), a *Bacillus amyloliquefaciens*  $\alpha$ -amiláz (BAA), a *Bacillus stearothermophilus* maltózképző  $\alpha$ -amiláz (BSMA) és az *Apergillus oryzae* TAKA-amiláz (TAA) az iparban legelterjedtebben használt enzimek közé tartoznak, elsősorban nagy hőstabilitásuk miatt (Haki és mtsai., 2003). Az iparban elsősorban a keményítő ipari méretű hidrolízisére használnak  $\alpha$ -amilázokat a módosított keményítő, maltodextrin, maltotrióz és glükóz szirupok előállítása során (van der Maarel és mtsai., 2002). Nélkülözhetetlen enzimek számos, a keményítő felhasználásán alapuló eljárás során az élelmiszeriparban (cukoripar, söripar, sütőipar, gyümölcslevek gyártása), a papíriparban, a tisztítószerek gyártásában, a textiliparban, a szennyvízkezelési eljárásokban és a bioüzemanyagok előállításában is, valamint az állateledelek fontos adalékanyagai (Gupta és mtsai., 2003; de Souza és mtsai., 2010). A keményítő hidrolízise révén összetett termékelegy keletkezik, mely különböző tagszámú maltooligoszacharidok és glükóz elegyből áll. A termékösszetétel nagyban függ az enzim eredetétől, specificitásától, pH és hőmérsékleti optimumától, ezért az utóbbi években számos törekvés irányult az ipari felhasználású enzimek tulajdonságainak (pH és hőmérsékleti optimum, termékmintázat, stb.) célzott megváltoztatására (Svensson 1994; Nielsen és mtsai., 2000; Kelly és mtsai., 2009; Prakash és mtsai., 2010).

A növényi amilázok közül az árpa (*Hordeum vulgare*)  $\alpha$ -amiláz 1 és 2 izoenzimek (AMY1 és AMY2) szerepe élelmiszeripari felhasználásuk miatt jelentős, legnagyobb mennyiségben a söripar használ árpa  $\alpha$ -amilázt a keményítő hidrolízisére (Finnie és mtsai., 2009).

Az emberi szervezetben külső elválasztású mirigyek, a nyálmirigyek és a hasnyálmirigy termelnek  $\alpha$ -amilázokat. A humán nyál  $\alpha$ -amiláz (HSA) és a humán pankreász  $\alpha$ -amiláz (HPA) enzimek a táplálékkal felvett szénhidrátok emésztéséért felelősek. A szérumban és a vizeletben mérhető amiláz szint változik az életkorral, továbbá befolyásolhatja a táplálkozás módja, a dohányzás, az alkoholfogyasztás, fizikai és pszichológiai hatások is. Az amiláz szintjének meghatározása fontos a hasnyálmirigyet és a nyálmirigyeket érintő rendellenességek és bizonyos betegségek diagnosztizálásában is (Rohleder és mtsai., 2009). Az amiláz szint emelkedése tapasztalható például *pancreatitis* vagy mumpsz esetében is (Bhagavan 2002). Az amilázok gátlása fontos szempont lehet a vércukorszint csökkentésére irányuló diétás étrend kialakításakor (Bhagavan 2002). A vércukorszint csökkentésére amiláz inhibitorokat is használhatnak, ezért az  $\alpha$ -amilázok a gyógyszertervezés fontos célpontjai. A szervezetbe bejutott szénhidrátok lebontása ezáltal gátolható, a felszívódó szénhidrátok mennyiségének csökkentése fontos például a *hyperglycaemia*, a diabetes és az elhízás kezelésében is. A legáltalánosabban használt inhibitor az akarbóz (Precose) (Tierney és mtsai., 2004), de hatékony amiláz inhibitoroknak bizonyultak például az akarbóz különböző származékai (Yoon és mtsai., 2003), a természetes eredetű tanninok (Kandra és mtsai., 2004; Zajác és mtsai., 2007) és bizonyos szintetikus inhibitorok is (Gyémánt és mtsai., 2003)(Kandra és mtsai., 2005b). A HSA fontos tulajdonsága, hogy hidrolitikus aktivitása mellett baktériumkötő képességgel is rendelkezik. Hidrolitikus aktivitását megőrizve képes elsősorban *Streptococcus* baktériumokat kötni. Az enzim a hidroxipatitához kötődve vesz részt a fog felszínén kialakuló plakkok képzésben is. A szénhidrátok bontásából származó oligoszacharidokat a baktériumok hasznosítják és a felszabaduló bomlástermékek szerepet játszanak a fogszuvasodás kialakulásában (Scannapieco és mtsai., 1993). Ezért a nyál amiláz inhibitorokkal történő gátlása révén megelőzhető lehet a fogszuvasodás kialakulása.

### **3.2 $\alpha$ -Amilázok besorolása, az $\alpha$ -amiláz család jellemzése**

Az  $\alpha$ -amilázok ( $\alpha$ -1,4-glükán-4-glükánhidrolázok; EC 3.2.1.1) a glikozid hidrolázok családjába tartozó enzimek, melyek a keményítő és a keményítővel rokon szerkezetű poli- és oligoszacharidok  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) glikozidos kötéseinek hidrolízisét katalizálják az  $\alpha$ -anomer

konfigurációt megtartó retenciós katalitikus mechanizmussal. Besorolásuk háromféle csoportosítás szerint is történhet.

Az első csoportosítási mód általánosan alkalmazható az enzimekre. A Nemzetközi Biokémiai és Molekuláris Biológiai Egyesület („International Union of Biochemistry and Molecular Biology”, IUBMB) az enzimeket az általuk katalizált reakció típusa szerint és a szubsztrátspecifitás alapján enzimosztályokba, alosztályokba és azon belül további csoportokba sorolva rendszerezi ([www.iubmb.org](http://www.iubmb.org)). Minden egyes enzim rendelkezik egy specifikus azonosítóval, melyet a Nevezéktani Bizottság („Nomenclature Committee of IUBMB”) hagy jóvá. Az  $\alpha$ -amilázok (EC 3.2.1.1) a hidroláz enzimosztályon belül (EC 3.-.-.-) a glikoziláz enzimek alosztályába (EC 3.2.-.-) és az O- és S-glikozidos kötéseket hidrolizáló glikozidázok (EC 3.2.1.-.) csoportjába tartoznak („Enzyme Structures Database”) ([www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/enzymes](http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/enzymes)).

A másik csoportosítási mód a szénhidrátokon ható enzimek szekvenciája és szerkezete közötti hasonlóságon alapuló osztályozási rendszer, melyet Henrissat vezetett be (Henrissat 1991). A szénhidrátokon ható enzimek osztályozásának céljából létrehozott adatbázis, a „Carbohydrate-Active enZYmes Database” (CAZy) tartalmazza a glikozid hidrolázok, a glikozil transzferázok, poliszacharid liázok és szénhidrát észterázok csoportosítását és a katalitikus folyamatokért felelős fehérjékre vonatkozó információkat is (Cantarel és mtsai., 2009). A CAZy ([www.cazy.org](http://www.cazy.org)) folyamatosan frissülő információs adatbázis, mely a glikozid hidrolázokat 2011.03.09-ig összesen 123 enzimeszaládba sorolja (Henrissat és mtsai., 1993; Henrissat és mtsai., 1996; Cantarel és mtsai., 2009).

A szénhidrátokon ható enzimek gyakran tartalmaznak jól meghatározott szerkezetű, önálló katalitikus aktivitással nem, de szénhidrát-kötő aktivitással rendelkező funkcionális doméneket, úgynevezett szénhidrát-kötő modulokat („carbohydrate-binding module”, CBM). Az ilyen modulokat tartalmazó enzimeket a CAZy egy integrált rendszer szerint úgynevezett szénhidrát-kötő modul családokba rendszerezi („Carbohydrate-binding Module Family Classification”). Az adatbázis a 2011.03.09-i állapot szerint összesen 61 szénhidrát-kötő modul családot tartalmaz ([www.cazy.org/Carbohydrate-Binding-Modules.html](http://www.cazy.org/Carbohydrate-Binding-Modules.html)).

A harmadik csoportosítási mód szerint az amilolitikus enzimek, azaz a keményítő, a glikogén és a rokon szerkezetű poli- és oligoszacharid szubsztrátok glikozidos kötéseit hidrolizáló illetve szintetizáló enzimek alapvetően négy csoportba sorolhatóak (Kuriki és mtsai., 1999):

1)  $\alpha$ -(1→4) glikozidos kötéseket hidrolizálók:

pl.  $\alpha$ -amilázok (EC 3.2.1.1),  $\beta$ -amilázok (EC 3.2.1.2), glükóamilázok (EC 3.2.1.3);

2)  $\alpha$ -(1→6) glikozidos kötéseket hidrolizálók:

pl. pullulanáz (EC 3.2.1.41) és izoamiláz (EC 3.2.1.68);

3)  $\alpha$ -(1→4) glikozidos kötéseket létrehozók:

pl. ciklodextrin-glükóziltranszferáz (EC 2.4.1.19);

4)  $\alpha$ -(1→6) glikozidos kötéseket létrehozók:

pl. (1→4)- $\alpha$ -D-glükán: (1→4)- $\alpha$ -D-glükán-6- $\alpha$ -D-((1→4)- $\alpha$ -D-glükano)-transzferáz, azaz elágazást létrehozó enzim (EC 2.4.1.18) és oligo-1,6-glükozidáz (EC 3.2.1.10).

A legismertebb amilolitikus enzimek az  $\alpha$ -amilázok (EC 3.2.1.1), a  $\beta$ -amilázok (EC 3.2.1.2) és a glükóamilázok (EC 3.2.1.3). Mindhárom enzim a glikozid hidrolázok közé tartozik, azonban a szekvenciák, a háromdimenziós szerkezetek és a katalitikus mechanizmusok közötti eltéréseken alapuló osztályozásnak megfelelően különböző glikozid hidroláz (GH) családokba tartoznak (Janeček 2009) (1. táblázat).

1. Táblázat Különböző glikozid hidroláz családok tulajdonságai a CAZY adatbázis alapján.

GH család	Klán	Ismert aktivitások száma	Szerkezet	Katalitikus mechanizmus	Katalitikus nukleofil	Katalitikus proton donor
13	GH-H	22	( $\beta/\alpha$ ) <sub>8</sub>	retenciós	Asp	Glu
14	-	1	( $\beta/\alpha$ ) <sub>8</sub>	inverziós	Glu	Glu
15	GH-L	3	( $\alpha/\alpha$ ) <sub>6</sub>	inverziós	Glu	Glu
70	GH-H	4	( $\beta/\alpha$ ) <sub>8</sub>	retenciós	Asp	Glu
77	GH-H	1	( $\beta/\alpha$ ) <sub>8</sub>	retenciós	Asp	Glu

A Henrissat-féle osztályozáson alapuló rendszerezés szerint az  $\alpha$ -amilázok a glikozid hidroláz enzimek 13. családjába tartoznak. A GH13, a GH70 és a GH77 családok együtt alkotják a glikozid hidroláz család H klánját (GH-H) (MacGregor és mtsai., 2001) (1. táblázat). A GH-H klánba sorolt enzimek által alkotott csoportot  $\alpha$ -amiláz családnak is nevezik (MacGregor és mtsai., 2001). A GH-H klán tagjai sok közös tulajdonsággal rendelkeznek, de a szekvencia és szerkezeti hasonlóságokon alapuló rendszerezésnek köszönhetően az  $\alpha$ -amiláz családon belül mintegy 30 különböző specifitású enzim található, köztük hidrolázok (EC 3.2.1.-), transzferázok (EC 2.4.1.-) és izomerázok is (EC 5.4.99.-) (Cantarel és mtsai., 2009). Az  $\alpha$ -amiláz enzimek túlnyomó többsége a GH13 család tagja, azonban néhány, a GH13

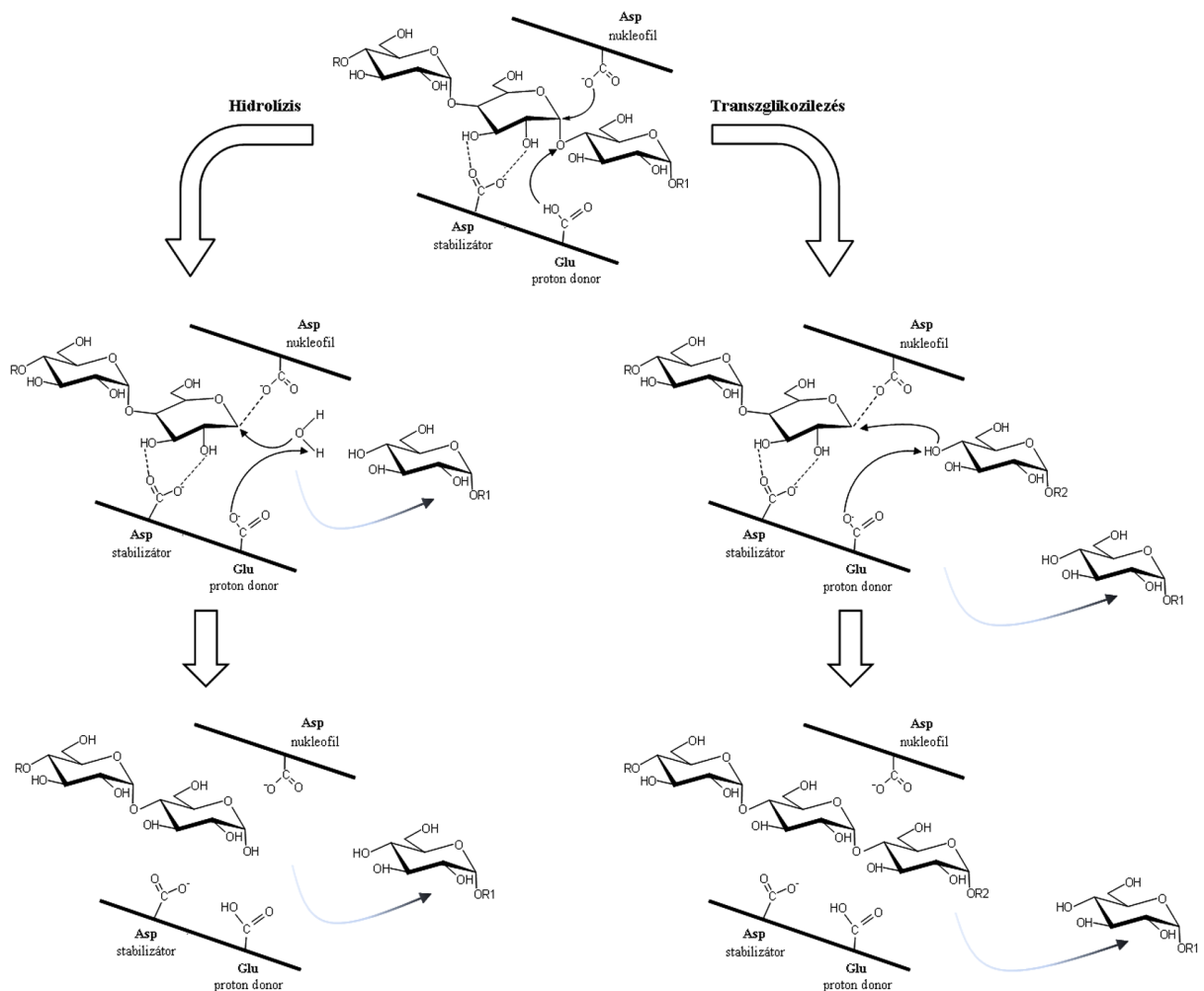
enzimektől szekvenciájában és szerkezetében is jelentősen eltérő  $\alpha$ -amiláz a GH57 családba tartozik, de találunk példát a GH119 családba tartozó  $\alpha$ -amilázra is (Janeček 2009).

A GH-H klánba, azaz az  $\alpha$ -amiláz családba tartozó enzimek közös tulajdonsága, hogy (Kuriki és mtsai., 1999; MacGregor és mtsai., 2001; Janeček 2002; van der Maarel és mtsai., 2002; Janeček 2009):

- 1)  $\alpha$ -glikozidos kötéseken fejtik ki hatásukat;
- 2) az  $\alpha$ -anomer konfigurációt megtartó (retenciós) katalitikus mechanizmussal működnek:  $\alpha$ -glikozidos kötést hidrolizálnak  $\alpha$ -anomer konfigurációjú monomer vagy oligomer termék felszabadulása mellett, vagy  $\alpha$ -glikozidos kötést hoznak létre transzglikozilezéssel;
- 3) legalább 4 konzervált régiót tartalmaznak, amelyek tartalmazzák az összes katalitikus aminosavat és a legfontosabb szubsztrátkötő helyeket;
- 4) azonos katalitikus mechanizmus szerint működő  $(\beta/\alpha)_8$ -hordó szerkezetű fehérjék, melyek esetében a  $(\beta/\alpha)_8$ -hordó szerkezetben a katalitikus nukleofil aszpartát a  $\beta$ 4-redő végének közelében, a katalitikus proton donor glutamát a  $\beta$ 5-redő végének közelében és az átmeneti állapot stabilizálásáért felelős aszpartát a  $\beta$ 7-redő végének közelében helyezkedik el.

### **3.3 $\alpha$ -Amilázok működése**

Az enzim specifitásától függően a glikozidázokat két csoportba lehet osztani: a retenciós és az inverziós mechanizmussal működő enzimekre (Koshland 1953; Withers 2001). Az  $\alpha$ -amilázok (EC 3.2.1.1) retenciós mechanizmussal működő enzimek, azaz az *endo* módon történő támadás révén a lánc belsejében lévő glikozidos kötéseket az  $\alpha$ -anomer konfiguráció megtartásával hasítják, tehát az  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) kötések hidrolíziséből  $\alpha$ -anomer konfigurációjú termékek, elsősorban oligoszacharidok szabadulnak fel. Inverziós mechanizmussal, azaz az  $\alpha$ -anomer konfigurációt megváltoztató mechanizmussal működnek például a  $\beta$ -amilázok (EC 3.2.1.2), melyek  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) glikozidos kötéseket hasítanak. A nem-redukáló végről *exo* módon történő hasítással felszabaduló termék  $\beta$ -anomer konfigurációjú ( $\beta$ -maltóz). Tehát a  $\beta$ -amilázok esetében a „ $\beta$ ” a felszabaduló termék anomer konfigurációjára vonatkozik és nem a hidrolizált glikozidos kötés konfigurációjára. Míg az inverziós enzimek egyszeres behelyettesítés („single displacement”) mechanizmus szerint működnek, addig a retenciós enzimek katalitikus mechanizmusa a Koshland által javasolt kettős behelyettesítés mechanizmuson („double displacement mechanism”) alapul (Koshland 1953). A katalízis folyamatát a retenciós mechanizmusú amilázok esetében az 1. ábra szemlélteti (Koshland 1953; Withers 2001).



1. ábra A retenciós mechanizmussal történő kettős behelyettesítési katalitikus folyamat lépései hidrolízis és transzglikozilezés esetén.

- 1) A szubsztrát bekötődése után a sav/bázis katalizátor glutamát protonálja a katalitikus hely mellett kötött glükóz molekulák közötti  $\alpha$ -(1→4) glikozidos kötés oxigénjét, a nukleofil aszpartát megtámadja a glükóz C-1 szénatomját.
- 2) Kovalens glikozil-enzim intermedier állapot alakul ki egy oxokarbonium ion jellegű átmeneti állapoton keresztül.
- 3) A protonált glükóz távozik a szubsztrátkötő helyről. Eközben egy vízmolekula (vagy egy akceptor molekula) lép be az aktív helyre és támadja a glükóz és a katalitikus nukleofil aszpartát közötti kovalens kötést.
- 4) Ismételten egy oxokarbonium ion jellegű átmeneti állapot alakul ki.
- 5) Az enzim és a szubsztrát közötti kovalens kötés hasításával a glikozil-enzim kovalens intermedier állapot felbomlik. A bázikus katalizátor glutamát felvesz egy hidrogént a bejövő vízmolekulától. A vízmolekula oxigénje helyettesíti a glükóz és az aszpartát közötti oxokarbonium kötést, így létrejön a glükóz C-1 pozíciójánál egy új hidroxil csoport.

A kettős behelyettesítéssel történő katalízis folyamatában közvetlenül csak a katalitikus nukleofil aszpartát és a katalitikus proton donor glutamát vesz részt, a harmadik katalitikus aminosav, az átmeneti állapot stabilizálásáért felelős aszpartát hidrogénhid kötéssel kötődik a glükóz 2-OH és 3-OH csoportjához és a szék konformációjú piranóz gyűrű eltorzítása révén járul hozzá a glikozidos kötés hidrolíziséhez (1. ábra). Amennyiben a vízmolekula helyett egy szénhidrát molekula szabad hidroxil csoportja támadja a kovalens glikozil-enzim intermediert, akkor a hidrolízis helyett transzglykozilezés történik (1. ábra), azaz új glikozidos kötés alakul ki a glükóz C-1 atomja és az akceptor O-4 atomja között (Withers 2001). A retenciós mechanizmussal működő glikozid hidrolázok transzglykozilezésre való képességét több esetben is igazolták (Crout és mtsai., 1998; Palcic 1999; Withers 2001).

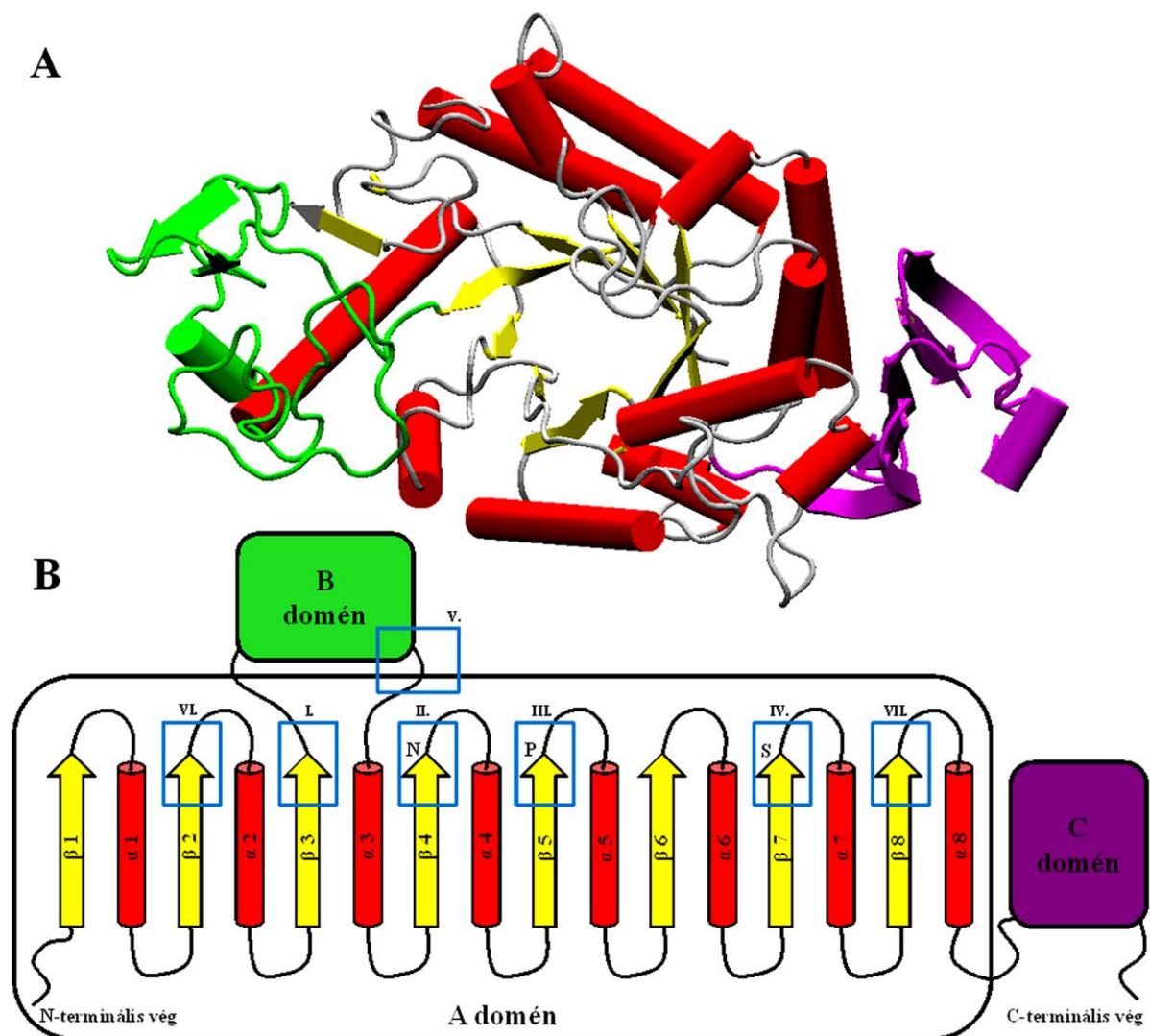
Mindössze négy olyan aminosav található az  $\alpha$ -amiláz családon (GH-H klán) belül, mely teljes mértékben konzervált a családba tartozó minden enzim esetében (Machovic és mtsai., 2003). A TAA szekvenciájának megfelelő számozás szerint a  $\beta$ 4-redő végének közelében elhelyezkedő katalitikus nukleofil aszpartát (Asp206), a  $\beta$ 5-redő végének közelében a katalitikus proton donor glutamát (Glu230) és az átmeneti állapot stabilizálásáért felelős aszpartát (Asp297) a  $\beta$ 7-redő végének közelében (2. ábra), valamint a katalitikus hely közvetlen közelében a  $\beta$ 4-redőn elhelyezkedő arginin (Arg204). A 3. és 7.  $\beta$ -redőn elhelyezkedő His122 és His296 aminosavak is az átmeneti állapot stabilizálásáért felelősek (Sogaard, Kadziola et al. 1993) és teljes mértékben konzerváltak az  $\alpha$ -amilázok (EC 3.2.1.1), a maltózképző amilázok (EC 3.2.1.133), izoamilázok (EC 3.2.1.68) és a ciklodextrin glikoziltranszferázok (EC 2.4.1.19) esetében, azonban a GH-H klán többi enzime között nem (Machovic és mtsai., 2003).

Az  $\alpha$ -amilázok egyszeres („single attack”), többszörös („multiple attack”) vagy rendszertelen támadással („random attack”) hathatnak a szubsztráton (Robyt és mtsai., 1967; MacGregor és mtsai., 1985). A többszörös támadás során az enzim az aktív helyen kötött szubsztrát polimer több glikozidos kötését is hidrolizálja, mielőtt a kialakult enzim-szubsztrát komplex felbomlana. Ha a felszabaduló termékek is szubsztrátjai az enzimnek, akkor másodlagos támadás („secondary attack”) következhet be, ami a termékek hidrolízissel vagy transzglykozilezéssel történő átalakítását jelenti.

### 3.4 $\alpha$ -Amilázok szerkezete

Az  $\alpha$ -amilázok egyetlen polipeptidláncból álló enzimfehérjék. Harmadlagos szerkezetük alapját a  $(\beta/\alpha)_8$ -hordó szerkezetű katalitikus domén (A domén) képezi, mely az  $\alpha$ -amilázok túlnyomó többségében a fehérje N-terminális végén helyezkedik el (2. ábra).

A jellegzetes  $(\beta/\alpha)_8$ -hordó szerkezetet az  $\alpha$ -amilázok közül először az *Aspergillus oryzae*-ből származó TAKA-amiláz esetében mutatták ki (Matsuura és mtsai., 1984). A  $(\beta/\alpha)_8$ -hordó szerkezetet „TIM hordó”-nak is nevezik, ugyanis először triózfoszfát-izomeráz enzimben írták le (Banner és mtsai., 1975).



2. ábra Az AMY1 kristályszerkezetének (PDB kód: 1RPK) szalagmodellje (A) és a szerkezet sematikus ábrázolása (B). Az A domént alkotó  $\beta$ -redőket sárga nyilak, az  $\alpha$ -hélixeket piros hengerek, a hurokrégiókat sötét vonalak jelölik, a B domén zöld, a C domén lila színű. A katalitikus aminosavak, azaz a nukleofil (N), a proton donor (P) és a stabilizátor (S) a konzervált régiókon belül (I-VII. számú kék színű keretek) helyezkednek el.

A nyolc parallel  $\beta$ -béta redő teljesen zárt szerkezetet - mintegy hordót - alkotva képezi a fehérje belső magját, a nyolc alternáló  $\alpha$ -hélix ezen a hordón kívül helyezkedik el. A katalitikus aminosavak a hordó szerkezetet alkotó  $\beta$ -redőket és az azokat körülvevő  $\alpha$ -hélixeket összekötő hurokrégiókban helyezkednek el (2. ábra). Ez a  $(\beta/\alpha)_8$ -hordó nemcsak az  $\alpha$ -amiláz család enzimeire jellemző, hanem általánosan előforduló  $\beta/\alpha$ -szerkezet. Az ismert fehérjék 10 %-ában megtalálható, köztük számos eltérő aktivitású enzimben, így például oxidoreduktázokban, transzferázokban, hidrolázokban, liázokban és izomerázokban is („Database of TIM barrel Enzymes”, <http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/genomes/date>).

Az  $\alpha$ -amiláz család minden enzimében megtalálható egy további domén: a B domén (van der Maarel és mtsai., 2002), mely az A doménbe illeszkedik és a  $(\beta/\alpha)_8$ -hordó szerkezet  $\beta_3$ -redője és  $\alpha_3$ -hélice közötti hurokrégióban helyezkedik el (2. ábra). Az A és B domén közötti árokban található szubsztrátkötő helyeket azon aminosav oldalláncok alakítják ki, melyek a hordó szerkezetet alkotó  $\beta$ -redők C-terminális végeihez csatlakozó hurokrégiókban helyezkednek el (MacGregor és mtsai., 2001). Az enzimek specificitása közötti különbségek a szubsztráttal való kölcsönhatások kialakításáért felelős hurokrégiókon belüli eltérésekből (Svensson 1994; Janeček és mtsai., 1997) és a B domén hosszúságának, szekvenciájának és másodlagos szerkezetének eltéréseiből is adódnak (Jespersen és mtsai., 1991; Janeček és mtsai., 1997; MacGregor és mtsai., 2001; Pujadas és mtsai., 2002).

Az  $\alpha$ -amilázok tartalmazzak egy úgynevezett C domént is, mely a fehérje C terminális részén helyezkedik el, közvetlenül az A domént követően (2. ábra). A C domén önálló katalitikus aktivitással nem rendelkezik, de fontos szerepe van a fehérjeszerkezet stabilitásának kialakításában és foldingjában, továbbá az enzim-szubsztrát kölcsönhatások kialakításában (MacGregor és mtsai., 2001). A C domén görög-kulcs motívumot tartalmazó, antiparallel  $\beta$ -redőkből álló domén. Szekvenciája és szerkezete nagy változatosságot mutat az  $\alpha$ -amilázok között (Robert és mtsai., 2003). A GH-H klán enzimei közül a C domén jellemzően nem található meg a GH70 és a GH77 családba tartozó enzimekben (Janeček és mtsai., 2003).

Az  $\alpha$ -amiláz családon belüli enzimek az A, B és C doméneken kívül további N és/vagy C terminális doméneket is tartalmazhatnak. Összesen nyolc további különböző domén jelenlétét mutatták ki (van der Maarel és mtsai., 2002). A maltózképző  $\alpha$ -amiláz (BSMA) és a ciklodextrin glükóziltranszferáz esetében a fehérje karboxi-terminális végén, a C domént követően elhelyezkedő D domén pontos funkciója nem ismert (Jespersen és mtsai., 1991; Janeček 2002). Számos, az  $\alpha$ -amiláz családba tartozó enzim tartalmaz egy úgynevezett E domént, mely a katalitikus doméntől távol elhelyezkedő modul, aminek a keményítőszemcsék kötésében van szerepe. Az E domént keményítő-kötő doménnek („starch-binding domain”)

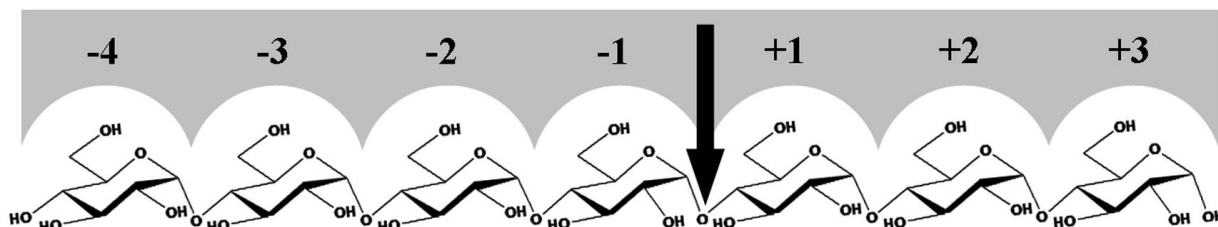
vagy szénhidrát-kötő modulnak („carbohydrate binding module”) is nevezik (Janeček és mtsai., 2003). A fehérje N-terminális régiójában elhelyezkedő F, G és H domének jelenlétét *endo* módon ható illetve  $\alpha$ -(1→6) glikozidos kötések vagy elágazások hidrolízisét katalizáló enzimekben figyelték meg (Jespersen és mtsai., 1991). Számos  $\alpha$ -amilázt soroltak különböző szénhidrát-kötő modul (CBM) családokba, azonban kizárólag a fonalas gombákból, Gram-pozitív baktériumokból,  $\gamma$ -proteobaktériumokból és bizonyos *Archea* fajokból származó  $\alpha$ -amilázok tartalmazzak szénhidrát-kötő modult (Janeček és mtsai., 2003). Fontos megjegyezni, hogy a vizsgálatainkban szereplő  $\alpha$ -amilázok (EC 3.2.1.1) nem tartalmazzak az A, B és C doméneken kívül további doméneket, ezért nem sorolhatóak egyetlen CBM családba sem. Kivételt képez a BSMA (EC 3.2.1.133) öt doménből álló maltózképző amiláza, mely A, B, C, D és E doméneket tartalmazó fehérje (Dauter és mtsai., 1999). A CBM20 család tagja, mely a legkorábban létrehozott és a legalaposabban tanulmányozott szénhidrátkötő-modul család (Christiansen és mtsai., 2009).

Minden ismert  $\alpha$ -amiláz tartalmaz konzervált  $\text{Ca}^{2+}$  iont, mely az A és B domén illeszkedésénél helyezkedik el. A  $\text{Ca}^{2+}$  ionnak fontos szerepe van a fehérje megfelelő feltekeredésében (foldingjában), a szerkezet stabilizálásában, a hőstabilitás kialakításában és ezáltal az aktív enzimforma kialakításában (Nielsen és mtsai., 2000). Számos amiláz esetében figyelték meg a  $\text{Ca}^{2+}$  ionon kívül további fémionok jelenlétét. A BLA és a BAA esetében  $\text{Na}^+$  ion jelenlétét mutatták ki (Brzozowski és mtsai., 2000).  $\text{Cl}^-$  iont elsősorban az emlősökből és bizonyos baktériumokból származó enzimek tartalmazzak. A  $\text{Cl}^-$  ion allosztérikus aktivátorként szolgál az enzim számára (D'Amico és mtsai., 2000). A  $\text{Cl}^-$  ion kötésében résztvevő Arg195 és Asn298 a legtöbb amilázban megtalálható (PPA számozás szerint). Az Arg337 azonban a  $\text{Cl}^-$  ion-függő amilázokra specifikus (D'Amico és mtsai., 2000).  $\text{Cl}^-$  ion-függő amilázok például az *Alteromonas haloplanctis*  $\alpha$ -amiláza, a HSA, a HPA és a PPA is. Jellemző rájuk a  $\beta$ 7-redőt követő flexibilis hurokrégió megléte (PPA számozás szerint Asn298–Ser311), mely hiányzik a  $\text{Cl}^-$  ion-független enzimekből (AMY1, AMY2, TAA, BLA, BAA és BSMA), amit a megfelelő aminosavak deléciója és az adott régió eltérő foldingja is mutat (Maurus és mtsai., 2005).

### **3.5 $\alpha$ -Amilázok alhelyszerkezete, aktív centrum térképezés**

A glikozid hidroláz enzimek az oligomer vagy polimer szubsztrát egy-egy monomer egységével az egyes szubsztrátkötő alhelyeken alakítanak ki kölcsönhatást. A szubsztrátkötő alhelyekre vonatkozó általánosan elfogadott nevezéktant Davies és munkatársai vezették be

(Davies és mtsai., 1997). A nomenklatura alapján az alhelyek számozása a katalitikus helytől balra a nem-redukáló vég (vagy másnéven glikon-kötő helyek) felé kiindulva negatív számokkal történik, a redukáló vég (vagy másnéven aglikon-kötő helyek) felé jobbra az alhelyeket pozitív számok jelölik (3. ábra).



3. ábra A HSA maltoheptaózzal alkotott komplexének sematikus ábrázolása. A hasítás helyét nyíl mutatja.

Az  $\alpha$ -amiláz család (GH-H klán) enzimei  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 1),  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2),  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3),  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4),  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 5) vagy  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) glikozidos kötések tartalmazó szubsztráton is kifejthetik hatásukat. Ezen szubsztrátok egyetlen közös tulajdonsága az, hogy olyan  $\alpha$ -glikozidos kötéssel kapcsolt glükóz egységet tartalmaznak, mely az első aglikon-kötő helyre képes kötődni (MacGregor és mtsai., 2001). A GH13 család enzimei azonos katalitikus mechanizmussal működnek, amit a katalitikus aminosavak térbeli pozíciójának nagyfokú konzerváltsága is mutat (Kumar 2010). A szubsztrátkötő hely kialakításáért felelős hurokrégiók azonban nagymértékű változatosságot mutatnak az  $\alpha$ -amilázok között, a szubsztrátkötő árok szerkezete, a szubsztrátkötő alhelyek száma és azok felépítése az egyes enzimekre jellemző tulajdonság (Jespersen és mtsai., 1991) (Janeček és mtsai., 1997; MacGregor és mtsai., 2001; Pujadas és mtsai., 2002).

Az alhelytérképezés az aktív centrum szubsztrátkötő helyeinek vizsgálatára, az enzim és a szubsztrát közötti kölcsönhatások kvantitatív módon történő meghatározására irányuló eljárás. A megbízható alhelytérképek elkészítéséhez felhasználható szubsztrátoknak több kritériumnak is meg kell felelniük (Gyémánt és mtsai., 2002; Kandra és mtsai., 2002a). A legalkalmasabb szubsztrátok a vízben jól oldódó, kis molekulatömegű, jól azonosítható, kromogén oligoszacharid sorozatok tagjai. A kromofor csoport jelenléte biztosítja a redukáló és a nem-redukáló végek megkülönböztethetőségét. Az  $\alpha$ -amilázok bontási képeinek vizsgálatához korábban használt maltooligoszacharidokkal (MOS) és 4-nitrofenil csoportot tartalmazó maltooligomerekkel (PNP- $\alpha$ -D-MOS) (Macgregor és mtsai., 1992) ellentétben a 2-klór-4-nitrofenil maltooligoszacharidok (CNP- $\beta$ -D-MOS) redukáló végi kromofor csoportját rögzítő  $\beta$ -glikozidos kötést az  $\alpha$ -amilázok nem képesek hasítani. A  $\beta$ -glikozidos kötéssel

kapcsolt aglikon kromofor csoport biztosítja, hogy a szubsztrátok és a redukáló végről felszabaduló hidrolízis-termékek is mindig tartalmazzanak kromofor csoportot. Ezek könnyen detektálhatóak, ami lehetővé teszi a szubsztrátok és a termékek megbízható azonosítását és mennyiségük pontos meghatározását is. A szubsztrátsorozatnak megfelelő tagszámú („degree of polymerization”, DP) oligomereket kell tartalmaznia, melyek segítségével a hosszú szubsztrátkötő árokkal rendelkező enzimek teljes kötőrégiója is teljesen lefedhető.

Az oligomer szubsztrátok produktív (hasítási terméket adó) és nem-produktív (hasítási terméket nem adó) kötőmódban is kötődhetnek az  $\alpha$ -amiláz aktív centrumába. Produktív kötési módban valamelyik  $\alpha$ -glikozidos kötés átfedi a hasítási helyet, ami a kötés hidrolíziséhez vezet. Ezzel ellentétben, a nem-produktív kötőmód esetében a szubsztrát bár kötődik az aktív centrumhoz, azonban vagy nem fedi át a hasítóhelyet vagy olyan kötés (például  $\beta$ -glikozidos kötés) esik a hasítóhely fölé, amit az enzim nem képes hasítani. Az *endo* módon ható enzimek esetében a láncon belüli kötések hasítása, a különböző kötési módoknak köszönhetően összetett termékmintázatot eredményez. A bontási kép („action pattern”) alapján meghatározható a különböző produktív komplexek kötéshasítási gyakorisága („bond cleavage frequency”), mely felhasználható lehet az alhelyek kötési energiáinak meghatározására.

Az alhelytérképezés módszerét az 1970-es években egymástól függetlenül, több munkacsoport is kidolgozta. A Hiromi által kidolgozott kinetikai eljárás a különböző tagszámú szubsztrátok hidrolízise sebességének meghatározásán alapul és az *exo*-amilázok aktív centrumának térképezésére alkalmas (Hiromi 1970). Az Allen és Thoma által kidolgozott eljárás kizárólag az *endo* hatásmechanizmusú enzimek esetében szolgál az alhelytérképek termékanalízisen alapuló meghatározására (Allen és mtsai., 1976a; Allen és mtsai., 1976b). A Suganuma által kidolgozott eljárás kombinálja a kinetikai paraméterek és a bontási képek felhasználását (Suganuma és mtsai., 1978).

A Biokémiai Tanszéken Gyémánt és munkatársai egy, az  $\alpha$ -amilázok alhelytérképezésére szolgáló szoftvert fejlesztettek ki (Gyémánt és mtsai., 2002). Az ingyenesen hozzáférhető SUMA szoftver („Subsite mapping of  $\alpha$ -amylases”) az Allen és Thoma által kidolgozott módszeren alapul (Allen és mtsai., 1976b; Allen és mtsai., 1976a). A szoftver a bontási képekből számított kötéshasítási frekvenciákat használja az egyes szubsztrátkötő alhelyek kötési energiájának meghatározására a 4. ábrán bemutatott egyenlet szerint (4. ábra).



A SUMA program szerkezetét az 5. ábra mutatja. A mért adatok bevitele az alhelyek feltételezett számának és a hasítási helyek pozíciójának beállítása enzimspecifikus módon történik. A kísérletesen meghatározott és a program által újraszámolt BCF adatok közötti különbségek minimalizálása iterációs eljárás segítségével van lehetőség, azaz a mért és a számolt értékek közötti legkisebb különbség keresésével. A program nemcsak a kötési energiák számítására, hanem a bontási képek energiaértékekből számítására is alkalmas. A számítási eredmények kiírása a „Note” ablakban, a grafikus megjelenítés a „Chart” ablakban történik. A szoftver lehetőséget nyújt a kötési energiák és a bontási képek számításához használt hőmérséklet értékének és az iterációs eljárás interpolációs léptékének változtatására is (Gyémánt és mtsai., 2002).

A program megadja az alhelyek számát, a hasítóhely pozícióját és az egyes szubsztrátkötő alhelyek látszólagos kötési energia értékeit. A közvetlenül a hasítóhely mellett elhelyezkedő alhelyek energiái nem határozhatóak meg a kötéshasítási frekvenciákból, mivel a  $-1$  és  $+1$  alhelyek minden produktív komplex esetében be vannak töltve (Gyémánt és mtsai., 2002). Az alhelyek között megkülönböztethetünk kötőhelyeket és gátalhelyeket. Előbbiek esetében a negatív energiaértékek az alhelyeken az enzim és a szubsztrát között vonzó kölcsönhatást, utóbbiak esetében a pozitív energiaértékek taszító kölcsönhatást jelentenek. A mutációk hatására megváltozott bontási képekből számolt energiaértékek eltérnek a vad típusú enzimétől, tehát az aminosavcserek az enzim alhelytérképének megváltozását is okozzák. Az energia értékének negatívabbá válása a kötési energia növekedését, azaz az alhelyen a vonzó kölcsönhatás erősödését jelzi. Az energia értékének pozitívabbá válása a kötési energia csökkenését, azaz az alhely szubsztrát iránti affinitásának csökkenését vagy a gátalhelyeken a taszító kölcsönhatás erősödését mutatja.

A kötéshasítási frekvenciákon alapuló alhelytérképezés módszerét számos vad típusú és mutáns  $\alpha$ -amiláz enzim esetében alkalmazták már: BAA (Allen és mtsai., 1976a), BSMA (Remenyik és mtsai., nem publikált eredmény), BLA (Kandra és mtsai., 2002b), TAA (Allen és mtsai., 1976a), rizs  $\alpha$ -amiláz (Gyémánt és mtsai., 2002), AMY1 és AMY2 (Kandra és mtsai., 2006), PPA (Gyémánt és mtsai., 2002) és HSA (Kandra és mtsai., 2003; Ramasubbu és mtsai., 2004). Az eljárás alkalmas más *endo* hatásmechanizmussal működő enzimek aktív centrumának térképezésére is, az *endo*-poligalakturonáz (EC 3.2.1.15, GH28) (Benen és mtsai., 1999; Hunt és mtsai., 2006) és az *endo*- $\beta$ -1,4-D-xilanáz (EC 3.2.1.8, GH11) (Pollet és mtsai., ) esetében is sikeresen alkalmazták.

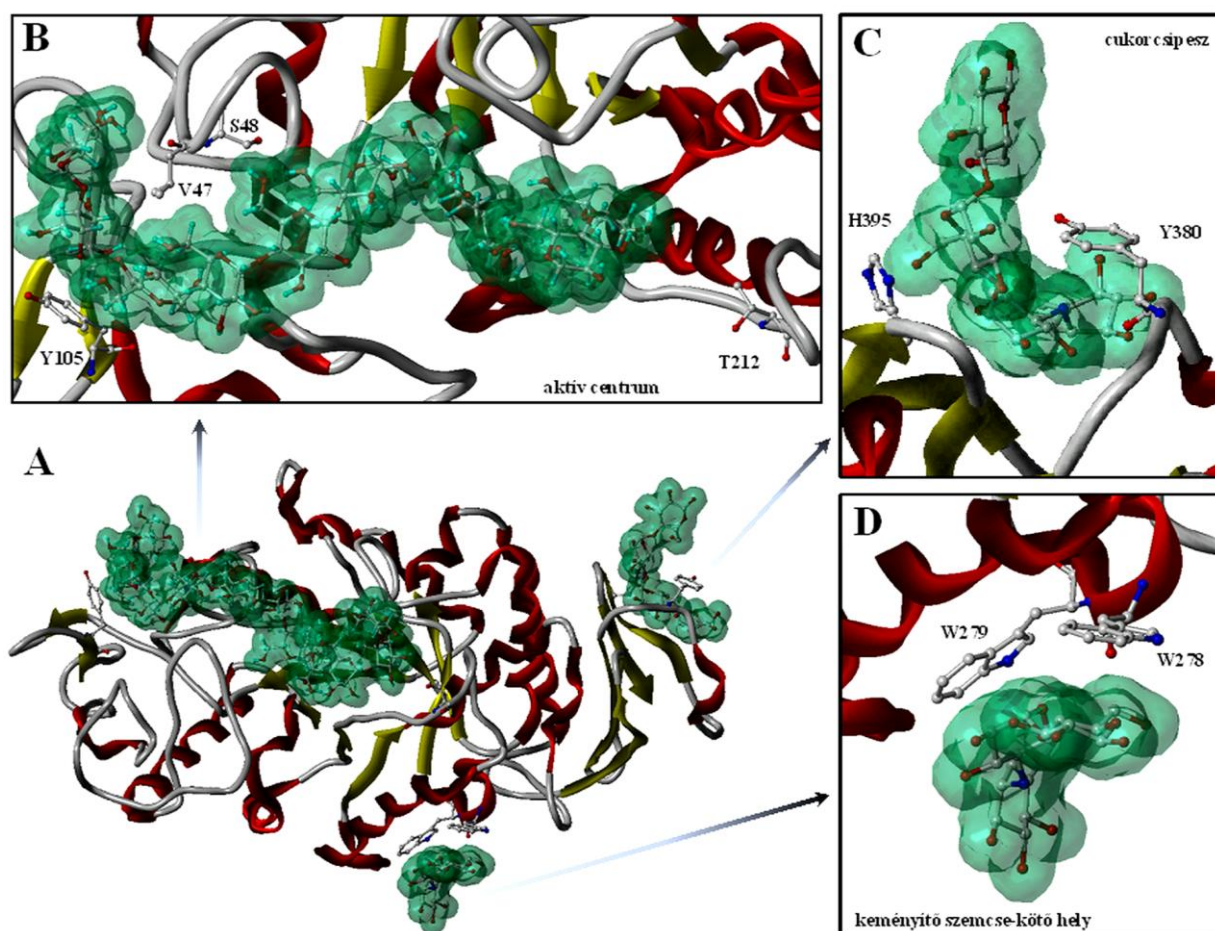
Az amilolitikus enzimek nemcsak az aktív helyen, a szubsztrátkötő árokban létesíthetnek kölcsönhatást a szubsztráttal, hanem az aktív helytől távolabb, az enzimmolekula

felszínén elhelyezkedő másodlagos kötőhelyeken is. Az AMY1 (Sogaard és mtsai., 1993; Robert és mtsai., 2003), az AMY2 (Kadziola és mtsai., 1998), a PPA (Machius és mtsai., 1996) és a HSA (Ramasubbu és mtsai., 2003) az aktív helytől távol is létesít kölcsönhatást a szubsztráttal, azonban ezek a kölcsönható helyek nem önálló szénhidrát-kötő modulok, hanem a fehérje A és/vagy C doménjain elhelyezkedő másodlagos kötőhelyek. Önálló katalitikus aktivitással nem rendelkeznek, de a szubsztráttal kialakított többszörös kölcsönhatások révén fontos szerepük van az enzim működésében. Az ezeket érintő mutációk hatására változhatnak a szubsztrátokkal és a termékekkel kialakított kölcsönhatások, a többszörös támadás mértéke („degree of multiple attack”), az enzim aktivitása és a szubsztrátkötő alhelyek affinitásai is (Nielsen és mtsai., 2008b).

Az enzim szubsztrátkötő helyének vizsgálatára és a szerkezet-funkció összefüggések felderítésére számos lehetőség van. Ilyen módszer lehet az enzim aminosavainak irányított vagy random mutagenézissel, vagy más kovalens módosításokkal történő megváltoztatása. A módosítást követően elvégzett aktivitás- és kinetikai mérések információt adnak a módosított aminosavak enzimműködésben betöltött szerepéről. Az aktív centrum térképezése is alkalmas a szerkezet-funkció összefüggések vizsgálatára, az egyes módosítások kötőhasítási frekvenciákra vagy kötési energiákra gyakorolt hatásának követésével. További hatékony módszer lehet az enzim szubsztráttal (Robert és mtsai., 2005), szubsztrát-analóg molekulával vagy inhibitorral kristályosított komplexéről készült röntgenkristallográfiai adatok elemzése. Az enzimfehérjék háromdimenziós szerkezetének molekuláris modellezéssel történő analízise lehetőséget biztosít a szubsztrát kötésében szereplő aminosavak felderítésére és az enzim és a szubsztrát közötti kölcsönhatások vizsgálatára és kvantitálására is.

### **3.6 Az AMY1 szubsztrátkötő helyei**

Az AMY1 fehérje felszínén elhelyezkedő hosszú szubsztrátkötő árok 12 alhelyet tartalmaz, a 8 glikon és 4 aglikon-kötő helyből álló alhelymodellnek megfelelően (Bak-Jensen és mtsai., 2004; Kandra és mtsai., 2006).



6. ábra Az AMY1 szerkezetének szalagmodellje (A) (1RPK.pdb). Az enzim-szubsztrát komplexben a másodlagos kötőhelyeken (C, D) a kristályszerkezetben található szubsztrátok, az aktív centrumban (B) a 11 tagszámú maltooligomer szubsztrát modellje látható.

A  $-1$  katalitikus hely kialakításában az Asp180, a Glu205 és az Asp291 katalitikus aminosavak mellett további erősen konzervált aminosavak, így az Arg178, a His93 és a His290 is részt vesznek. Az Arg183, Glu205 és Asp291 oldalláncoknak a  $+1$  hely (Robert és mtsai., 2005), a Met298 oldalláncnak a  $+2$  hely kialakításában van szerepe (Mori és mtsai., 2001). A szubsztrátkötő árok végein a glikon és az aglikon-kötő helyeket gátalhelyek szegélyezik ( $-8$ ) ( $+3$ ) ( $+4$ ), további belső gátalhelyek találhatóak a  $-5$  és a  $-3$  alhelyeken. A  $-6$  és a  $-5$  alhelyeken a Cys95 felelős a szubsztrátkötésért (Mori és mtsai., 2001). A hasítóhely melletti nagy energiájú  $-2$  alhely ( $-7,0$  kJ/mol) kialakításában a Met53 játszik szerepet (Mori és mtsai., 2002; Kandra és mtsai., 2006). A nagy affinitású  $-6$  alhelyen ( $-12,4$  kJ/mol) a Tyr105 oldallánc hidrofób („stacking” vagy „ring to ring”) kölcsönhatás révén rögzíti a szubsztrát glükóz gyűrűjét, míg a Thr212 a  $+4$  hely kialakításáért felelős (Bak-Jensen és mtsai., 2004; Kandra és mtsai., 2006) (6. ábra). Az aktív centrum nagy és alacsony affinitású alhelyeinek, valamint a

gátlóhelyeknek az eloszlása határozza meg a produktív komplexek kialakulásának és ezáltal a különböző tagszámú szubsztrátok hidrolízisének sebességét. A -6 hely nagy affinitása révén erőteljes horgonyzó hatást gyakorol a szubsztrát oligomerre és ezzel koordinálja a hosszabb szubsztrátok bekötődését, a hasítóhely melletti -2 és +2 helyek nagy affinitása pedig a rövidebb szubsztrátok kötéséért felelős (Kandra és mtsai., 2006). A Val47 és Tyr105 aminosavak együttesen koordinálják a szubsztrát aktív helyre történő belépését. A szubsztrát oligomer itt mintegy félkör-alakban veszi körül a Val47 és az Ser48 aminosavakat (Robert és mtsai., 2005) (6. ábra). A röntgenkristallográfiás adatok elemzésével megállapították, hogy a Val47 a -7 helyen közvetlenül, míg a Ser48 a -1 és -2 helyeken közvetett módon, vízmolekulán keresztül alakít ki hidrogén-híd kötések a szubsztráttal (Robert és mtsai., 2005). Molekuláris modellezéssel történő dokkolási vizsgálatok szerint azonban ezek az aminosavak több helyen is alakítanak ki kölcsönhatásokat a szubsztráttal, a Val47 a -6 és -4, a Ser48 a -4 és -2 helyek között (Bak-Jensen és mtsai., 2004). További előzetes kísérletek eredményei alapján is a -7 és -2 közötti helyek kialakításában szerepelnek (Mori és mtsai. beküldés előtt). Ezen aminosavak kiemelkedő jelentőségét tehát az adja, hogy a szubsztrátkötő árok csaknem teljes glikonkötő régiójában játszanak szerepet a szubsztráttal való kölcsönhatások kialakításában.

Az AMY1 felszínén, az aktív helytől távol további szénhidrátkötő helyek találhatóak: angol elnevezés szerint „starch granule binding site” és „a pair of sugar tongs” kötőhelyek (Sogaard és mtsai., 1993; Robert és mtsai., 2003; Kramhoft és mtsai., 2005; Nielsen és mtsai., 2008b).

A „starch granule binding site”, azaz a keményítő szemcse-kötő hely az A doménon helyezkedik el. A kötőhelynek elsősorban az enzim keményítő granulához való kötődésében van fontos szerepe (Nielsen és mtsai., 2009). A szubsztráttal való „stacking” kölcsönhatások kialakításáért a Trp278 és Trp279 aminosavak felelősek (Kadziola és mtsai., 1998) (6. ábra). A két Trp gyűrű által bezárt szög pontosan  $135^\circ$ . Ez az érték az AMY1 és AMY2 esetében is megegyezik, ezért ennek a kötőhelynek feltételezhetően, mint „geometriai szűrőnek” van fontos szerepe a megfelelő szubsztrátok kiválasztásában (Robert és mtsai., 2003), pozíciójukat számos környező aminosav stabilizálja. A Trp278 erősen konzervált a növényi amilázokban és jelentős szerepet tölt be a fehérje foldingjában és a szerkezeti stabilitás kialakításában is (Sogaard és mtsai., 1993).

A „a pair of sugar tongs” kötőhely, azaz a cukorcsipesz a C doménon helyezkedik el (6. ábra) és elsősorban a szabad  $\alpha$ -glükán láncok kötéséért felelős (Nielsen és mtsai., 2009). A kötőhelyet alkotó flexibilis hurokrégió térbeli elhelyezkedése és a Tyr380 pozíciója is változik, a natív fehérjéről és tio-maltotetraózzal kristályosított komplexéről készült

szerkezetek összehasonlítása alapján (Robert és mtsai., 2003). Ugyancsak az enzim tio-maltotetraóz szubsztráttal kristályosított szerkezetének elemzésével igazolták, hogy a kötőhely megléte specifikus az AMY1-típusú növényi amilázokra, az AMY2-ben nem található meg ez a kötőhely (Robert és mtsai., 2003). A különbség a szekvenciabeli eltérésekből adódhat, ugyanis az AMY2 az AMY1 Ser378-nak megfelelő pozíciójában prolint tartalmaz, amely változás megakadályozza a szubsztrát kötésekor bekövetkező konformációs változásokat (Robert és mtsai., 2003). A szubsztráttal való kölcsönhatások kialakításában jelentős a Tyr380 és His395 szerepe, a Tyr380 a szubsztrát molekula koordinálásában játszik szerepet a többszörös támadás mechanizmusban (Nielsen és mtsai., 2008a), ezért ez az aminosav egyedülálló módon konzervált a növényi  $\alpha$ -amilázok között (Robert és mtsai., 2003).

### **3.7 Amilázok alkalmazása szintézis reakciókban**

A glikozidos kötések hidrolízise megfordítható folyamat, így a glikozidázok nemcsak a glikozidos kötések hidrolízisét katalizálhatják, hanem képesek azok létrehozására is. A szintézissel előállított oligoszacharidok hidrolízisének elkerülésére, azaz a transzglykozilezés reakció kitermelésének növelése érdekében Withers és munkatársai úgynevezett „glikoszintáz” enzimeket állítottak elő glikozidáz enzimek aktív helyen történő módosításával. Az enzimek hidrolitikus aktivitásukat elveszítve csak transzferáz reakció katalízisére voltak képesek (Withers 2001). Ugyanezen az elven alapultak azok a vizsgálatok is, melyek során az AMY1 katalitikus nukleofil aminosavának (Asp180) mutációja révén kívántak glikoszintáz enzimet létrehozni (Sogaard és mtsai., 1993). Azonban sem a D180G, sem a D180A AMY1 mutánsok nem mutattak transzferáz aktivitást, és hidrolitikus aktivitásukat is gyakorlatilag teljes mértékben elveszítették (Sogaard és mtsai., 1993). A további kísérletek során igazolták a katalitikus aminosavak hidrolitikus reakcióban betöltött nélkülözhetetlen szerepét: az AMY1 katalitikus aminosavainak (Asp 180, Glu205 és Asp 291) eltávolítása az enzim inaktiválódását okozza (Sogaard és mtsai., 1993). Az AMY1  $\alpha$ -amiláz esetében számos további esetben végeztek irányított vagy random mutagenézissel végrehajtott enzimmodosításokat, melyek vagy a szerkezet-funkció összefüggések mutációs analízissel történő vizsgálatára vagy a specifitás, az aktivitás vagy a termékmintázat megváltoztatására irányultak (2. táblázat).

Az utóbbi években számos esetben alkalmaztak enzimeket oligoszacharidok szintézisére, mert a kemoenzimatis módszerrel, transzglykozilezéssel történő szintézis lehetővé teszi jól definiált oligoszacharidok előállítását. Az enzimatis eljárásnak számos

előnye van a hagyományos szerves kémiai módszerekkel történő oligoszacharid szintézisekkel szemben.

2. táblázat Az *AMY1* esetében elvégzett, az aktív helyet és a másodlagos szubsztrátkötő helyeket érintő mutációk, irodalmi adatok alapján.

AMY1 mutánsok	Alhely / kötőhely	Hivatkozások
<b>Aktív hely-mutánsok</b>		
S48Y, V47A, V47F, V47D, V47K/S48G, V47G/S48D, V47I/S48I, V47L/S48A, V47L/S48E	-7 → -1	(Mori és mtsai., 2001) (Mori és mtsai., 2002) (Svensson és mtsai., 2002)
Y105A, Y105F, Y105W, T212Y, T212P, T212W, Y105A/T212Y, Y105A/T212W	-6 és +4	(Bak-Jensen és mtsai., 2004)
D180N, E205Q, D291N, H93N, H290N	-1 → +1	(Sogaard és mtsai., 1993)
M53E, M53A, M53S, M53G, M53D, M53Y, M53W	- 2	(Mori és mtsai., 2002)
C95A, C95T, M298A, M298N, M298S, C95A/M298A, C95A/M298N, C95A/M298S	-6 → -5 és +2	(Mori és mtsai., 2001)
R183K, R183N, R183S-Y185M, R183T-Y185L, Y185C	+1 → +2	(Matsui és mtsai., 1997)
<b>Másodlagos kötőhely-mutánsok</b>		
Y105A/Y380A, Y105A/Y380M, H395A, Y380A/H395A	-6 és cukorcsipesz	(Nielsen és mtsai., 2008a)
W279A, W278A/Y380A, W279A/Y380A	keményítő szemcse kötő-hely és cukorcsipesz	(Nielsen és mtsai., 2009)
Y380A, Y380M	cukorcsipesz	(Bozonnet és mtsai., 2007)

A hagyományos kémiai eljárásokkal történő reakciók sok lépésből álló, bonyolult és időigényes folyamatok, a régió -és sztereoselektív szintézisek számos védőcsoport használatát teszik szükségessé. Az enzimatisz szintézissel a kívánt konfigurációjú glikozidos kötések egy egyszerűbb, kevés lépésből álló folyamatban hozhatók létre, ami jelentősen lerövidíti az oligomerek előállításához szükséges időt. Az enzimatisz szintézisek a jelentősen kisebb oldószerigény miatt nemcsak a költségeket tekintve, de a környezeti terhelés szempontjából is hatékonyabb eljárások. Az *endo* módon ható glikozidázok felhasználásával történő szintézis reakcióknak a sok előnye mellett természetesen hátrányai is vannak. Az előállított oligoszacharidok egyben szubsztrátjai is az enzimnek, így az elfogadható kitermelés eléréséhez a reakciókörülmények megfelelő megválasztása szükséges.

Számos példát találunk az  $\alpha$ -amiláz enzimek felhasználására kemoenzimatisz transzglykozilézissel történő szintézis reakciókban. A humán nyál amiláz esetében az Y151M mutáció hatására a transzglykozidáz aktivitás megjelenését tapasztalták, melyet különböző 4-nitrofenil glikozidok szintézisére használtak fel és  $^1\text{H}$  és  $^{13}\text{C}$  NMR vizsgálatokkal igazolták, hogy a mutáns enzim megőrizte sztereo- és régiószelektivitását (Remenyik és mtsai., 2003; Kandra és mtsai., 2005a). A *Bacillus stearothermophilus* maltózképző  $\alpha$ -amilázát (BSMA) is

sikeresen alkalmazták maltóz (Li és mtsai., 2004; Choi és mtsai., 2010) és akarviozin-glükóz pszeudotriszacharid transzfer reakciókban is (Kandra és mtsai., 2005b). Az utóbbi transzfer reakcióban használt pszeudotriszacharid az akarbóz hidrolíziséből származott. A pszeudotetraszacharid akarbóz az  $\alpha$ -amiláz enzimek természetesen előforduló kompetitív inhibitora molekula, melyet *Actinoplanes* fajok állítanak elő. Három szerkezeti egységből áll: egy telítetlen ciklitol (2,3,4-tri-hidroxi-5-hidroximetil-5,6-ciklohexén) a nem redukáló végen, egy hozzá  $\alpha$ -(1-4) kötéssel kapcsolódó 4-amino-4,6-didezoxi-D-glükopiranozt és egy ahhoz  $\alpha$ -(1-4) kötéssel kapcsolódó maltóz egységet. A ciklitol egység és az amino cukor által alkotott szerkezeti részt akarviozinnak nevezik (Kandra és mtsai., 2005b). Az előállított  $\alpha$ -akarviozinil-(1-4)- $\alpha$ -D-glükopiranozil-(1-6)-D-glükopiranozilidén-spirotiohidantoin molekula hatékonyabb inhibítornak bizonyult a humán nyál-amiláz számára, mint a glükopiranozilidén-spirotiohidantoin (Kandra és mtsai., 2005b).

A vad típusú és mutáns AMY1  $\alpha$ -amiláz esetében is tapasztaltak transzglykozilezést. Az AMY1 és AMY2 bontási képeinek elkészítése során transzfer termékek nyomnyi mennyiségben történő felszabadulását tapasztalták a G4, G5 és G6 valamint 4-nitrofenil maltotetraozid (PNP-G4) szubsztrátok esetében is (Macgregor és mtsai., 1992). A hidrolitikus aktivitás csökkenése mellett a transzferáz aktivitás megnövekedését mutatták ki a vad típusú enzimhez képest az M53A, M53W és M53Y AMY1 mutánsoknál. Transzfer termékek megjelenését tapasztalták PNP-G5 és PNP-G6 szubsztrátokon is mindhárom mutáns esetében. A M53W mutáns esetében a termékek 15 %-a keletkezett transzglykozilezéssel, a M53A mutáns esetében PNP-G11 termék is megjelent nyomnyi mennyiségben (Mori és mtsai., 2002). Ugyancsak PNP-glikozid szubsztrátokon mért reakcióban a T212W AMY1 mutáns a PNP-G5 szubsztrát 35 %-os konverziója mellett a termékek 3 %-át a transzfer reakcióban felszabadított PNP-G6 adta. A T212W mutációt is tartalmazó kétszeres Y105A/T212W mutáns esetében azonban nem tapasztaltak transzglykozilezést (Bak-Jensen és mtsai., 2004). A HSA és BSMA enzimektől eltérően azonban az AMY1 és AMY2 esetében nem tanulmányozták részletesebben a transzferáz aktivitást és annak felhasználhatóságát enzimatiszintézisekben.

### **3.8 Célkitűzés**

A doktori munkám során az alábbi célokat fogalmaztuk meg:

- I.) Az árpa  $\alpha$ -amiláz 1 (AMY1) felszínén, az aktív helytől távol elhelyezkedő másodlagos szubsztrátkötő helyek kulcsfontosságú aminosavait (Trp278, Trp279, Tyr380 és His395) érintő mutációk hatásának vizsgálata kísérletes módszerrel történő alhelytérképezés révén.
- II.) Az árpa  $\alpha$ -amiláz 1 aktív centrumában található Val47 és Ser48 aminosavak mutációját tartalmazó, AMY1 mutánsok vizsgálata kísérletes módszerrel történő alhelytérképezéssel.
- III.) A módosított AMY1 enzimek termékmintázat-elemzése során tapasztalt megnövekedett transzferáz aktivitás tanulmányozása. A transzglykozilezésre való képesség felhasználása metil-umbelliferil csoporttal jelölt maltooligoszacharidok előállítására. Az előállított metil-umbelliferil-glükozidok szubsztrátként történő felhasználása  $\alpha$ -amiláz enzimek fluorimetriás módszerrel történő aktivitásmérésében.
- IV.) A háromdimenziós kristályszerkezetek és a homológ modellek felhasználásán alapuló, egyszerű molekulamechanikai számításokat alkalmazó számítógépes eljárás kidolgozása, melynek segítségével meg tudjuk jósolni az enzim és a szubsztrát közötti kölcsönhatási energiákat valamint az elsődleges kísérleti adatokat képező bontási képeket.

## 4. Anyagok és módszerek

### 4.1 Felhasznált anyagok

#### *4.1.1 Szubsztrát, donor és akceptor molekulák*

- Maltooligoszacharidok és amilóz

A maltoheptaózt (G7) Jánossy Lóránt (Debreceni Egyetem, MTA Szénhidrátkémiai Kutatócsoport) bocsátotta rendelkezésünkre (Farkas és mtsai., 1997), a további maltooligoszacharidokat a SIGMA-tól vásároltuk. Az amilózt a GENAY-tól rendeltük és Na-acetát pufferrel (pH 5,5) készült 0,25 m/v %-os oldatát használtuk.

- 2-klór-4-nitrofenil- $\beta$ -D-maltooligoszacharidok (CNP- $\beta$ -D-MOS)

A tisztított, liofilizált 2-klór-4-nitrofenil- $\beta$ -D-maltoheptaózidot (CNP-G7) Jánossy Lóránt bocsátotta rendelkezésünkre (Farkas és mtsai., 1997). A 3–6 és 8–11 tagszámú CNP-maltooligoszacharidokat kemoenzimatisz szintézissel állítottam elő a DE TEK TTK Biokémiai Tanszéken, a korábban publikált eljárások alapján (Kandra és mtsai., 1999; Kandra és mtsai., 2001). A munkafolyamat részletes leírását a 4.2.2. fejezet tartalmazza.

- 4-metil-umbelliferon és 4-metil-umbelliferil glükozidok (MU- $\alpha$ - és  $\beta$ -D-MOS)

A 4-metil-umbelliferont, a 4-metil-umbelliferil- $\alpha$ - és  $\beta$ -D-glükopiranozidot (MU- $\alpha$ -D-G1 és MU- $\beta$ -D-G1) a SIGMA-tól vásároltuk. A 2–5 tagszámú (DP2–5) MU-maltooligoszacharidokat kemoenzimatisz szintézissel állítottuk elő a DE TEK TTK Biokémiai Tanszéken, az 5.3.3 fejezetben bemutatott eljárás alapján.

- Akceptor molekulák

A 4-nitrofenil- $\alpha$ - és  $\beta$ -D-glükopiranozid (PNP- $\alpha$ -D-Glc és PNP- $\beta$ -D-Glc), PNP- $\beta$ -D-galaktopiranozid, PNP- $\beta$ -D-fukopiranozid, PNP- $\beta$ -D-xilopiranozid, PNP- $\alpha$ -D-mannopiranozid, PNP- $\alpha$ -D-arabinozid, PNP- $\beta$ -D-N-acetil-glükózamin, PNP- $\beta$ -D-N-acetil-galaktózamin, PNP- $\beta$ -D-galakturonsav, PNP- $\beta$ -D-glükuronsav, salicin, amigdalín, klorogénsav, benzilalkohol, MU- $\alpha$ -D-neuraminsav, MU- $\beta$ -D-mannopiranozid molekulákat a SIGMA-tól rendeltük. A 4-metoxifenil- $\beta$ -D-N-acetil-glükózaminil- $\beta$ -(1→6)-N-acetil-glükózamin, a glükopiranozilidén-spirohidantoin, a N-( $\beta$ -D-glükopiranozil)-fenilacetamid, a N-( $\beta$ -D-glükopiranozil)-benzilurea és a 4-fluorofenil-( $\beta$ -D-glükopiranozilidén)-spiro-oxatiazol molekulákat Prof. Somsák László (DE TEK TTK, Szerves Kémiai Tanszék) bocsátotta rendelkezésünkre.

### 4.1.2 Enzimek

#### - Glikogén foszforiláz *b* (EC 2.4.1.1)

A glikogén foszforiláz *b* glicerines szuszpenzióját használtuk (1000 U/ml, fehérje tartalom 62 mg/ml), melyet Dr. Dombrádi Viktor bocsátott rendelkezésünkre. Az enzimet nyúl vázizomból izolálták és tisztították a DE OEC Orvosi Vegytani Intézetében.

#### - $\alpha$ -Amiláz enzimek

A vad típusú és valamennyi mutáns árpa (*Hordeum vulgare*)  $\alpha$ -amiláz 1 izoenzimet (AMY1) (EC 3.2.1.1) Prof. Birte Svensson (Enzyme and Protein Chemistry, Department of Systems Biology, Technical University of Denmark) és együttműködő munkatársai termeltették és tisztították. Az enzimoldatokat Prof. Birte Svensson bocsátotta rendelkezésünkre (3. táblázat).

3. táblázat A rendelkezésünkre bocsátott AMY1 enzimek.

Enzim	Aktivitás (U/mg)	Forrás/Hivatkozás
AMY1	2800	(Mori és mtsai., 2002)
Y105A	4000	(Mori és mtsai., 2001; Bak-Jensen és mtsai., 2004)
Y380A	1400	(Bozonnet és mtsai., 2007)
Y105A/Y380M	2300	(Nielsen és mtsai., 2008a)
H395A	2300	
Y380A/H395A	3200	
W279A	2415	(Nielsen és mtsai., 2009)
W278A/Y380A	1800	
W279A/Y380A	2000	
V47A	1002*	(Mori és mtsai., 2001; Mori és mtsai., 2002) (Svensson és mtsai., 2002) *(Mori és mtsai, beküldés előtt)
V47F	818*	
V47D	2764*	
S48Y	18*	
V47K/S48G	1040*	
V47G/S48D	73*	
V47L/S48A	5457*	
V47I/S48I	3626*	

A *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amilázt (BLA) (EC 3.2.1.1) (Típus XII-A.) és a humán nyál  $\alpha$ -amiláz (HSA) (EC 3.2.1.1) (Típus IX-A.) a SIGMA-tól vásároltuk. A *Bacillus stearothermophilus* hőstabil maltózképző  $\alpha$ -amilázt (BSMA) (EC 3.2.1.133) Cha és munkatársai termeltették és tisztították és Dr. Kwan-Hwa Park bocsátotta rendelkezésünkre (Department of Food Science, Seoul National University, Korea) (Cha és mtsai., 1998).

## **4.2 Módszerek**

### ***4.2.1 Nagynyomású folyadékkromatográfiás (HPLC) elválasztások***

A HPLC-vel történő elválasztásokat Hewlett-Packard 1090 Series II készülékekkel végeztük. A folyadékkromatográf diódasoros detektorral (DAD) felszerelt és folyadékszállító rendszere lineáris gradiens képzésére alkalmas. Az analitikai elválasztások során az injektáláshoz az 1–25 µl, a félpreparatív elválasztások során a 10–250 µl változtatható térfogatú, beépített, automata injektort használtuk. A kromatográfiás analízisek esetében a ChemStation szoftvert *online* módban használtuk a készülék vezérlésére és *offline* módban a kromatogramok kiértékelésére (ChemStation Software for LC 3D Rev.A.10.02, Agilent Technologies). Az elválasztások során HPLC gradiens tisztaságú oldószereket használtunk, a kolonnatér hőmérsékletét 40 °C-ra állítottuk be.

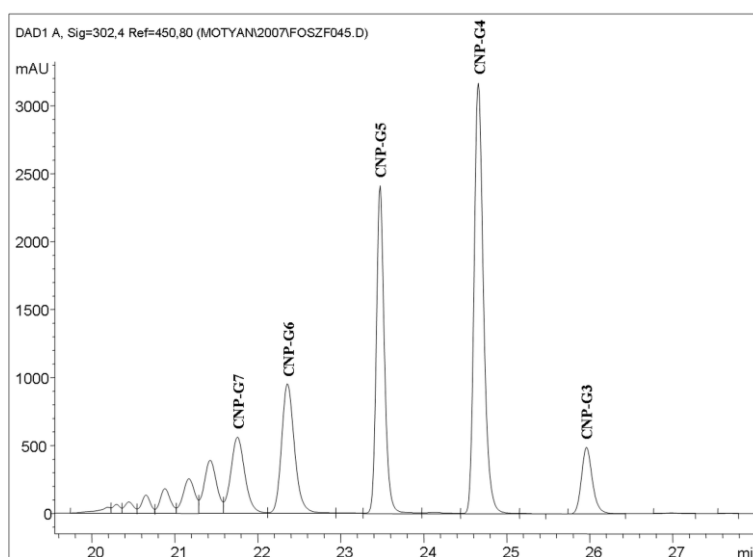
### ***4.2.2 CNP csoporttal jelölt maltooligoszacharid szubsztrátsorozat előállítása***

A CNP csoporttal jelölt maltooligoszacharidok (CNP-β-D-MOS) olyan szubsztrátok, melyek megfelelnek a megbízható alhelytérképek elkészítésével szemben támasztott követelményeknek (Gyémánt és mtsai., 2002; Kandra és mtsai., 2002a). A szubsztrátsorozat előállítása CNP-G7 primerből (Farkas és mtsai., 1997) kiindulva, a korábban publikált eljárások alapján történt (Kandra és mtsai., 1999; Kandra és mtsai., 2001). A kemo-enzimatiszintézisekhez felhasznált módszerek leírása megtalálható Dr. Gyémánt Gyöngyi „A nagyhatékonyságú-folyadékkromatográfia alkalmazása szénhidrátkémiai és szénhidrát-biókémiai kutatásokban” és Dr. Gálné Remenyik Judit az „Oligoszacharidok előállítása kemoenzimatiszintézissel” című doktori értekezéseiben is.

### ***3–6 tagszámú szubsztrátok előállítása foszforolízissel***

A CNP-MOS maltooligomer szubsztrátok (DP3–6) előállítását glikogén foszforiláz *b* által katalizált foszforolízis reakcióval végeztem (Kandra és mtsai., 1999). A CNP-G7 primer (325 mg, 5 mM) foszfát pufferrel (50 ml 100 mM, pH 6,8, 10 mM β-merkaptoetanol, 2 mM EDTA, 4 mM AMP) készült oldatához 500 µl 1000 E/ml enzimet adtam. A reakcióelegyet 37 °C-on 60 percig inkubáltam, majd az enzimreakciót az elegy 1 perces forralásával állítottam le. Hűtés után a kicsapódott enzimet 0,2 µm-es pórusméretű fecskendő-szűrővel (Whatman, Maidstone, UK) kiszűrtem, az oldatot liofilizáltam, majd desztillált vízben való oldás után injektáltam a HPLC oszlopra. Az elválasztás során Supelcosil LC-18 félpreparatív oszlopot (5 µm, 250\*10 mm) és Supelcosil LC-18 előtétoszlopot (5 µm, 50\*10 mm) használtam,

3 ml/perc áramlási sebesség alkalmazása mellett, gradiens elúcióval az acetonitril/víz elegy összetételének változtatásával (0–3 perc: 0-100, 3–28 perc: 0-100 → 20-80) (7. ábra).

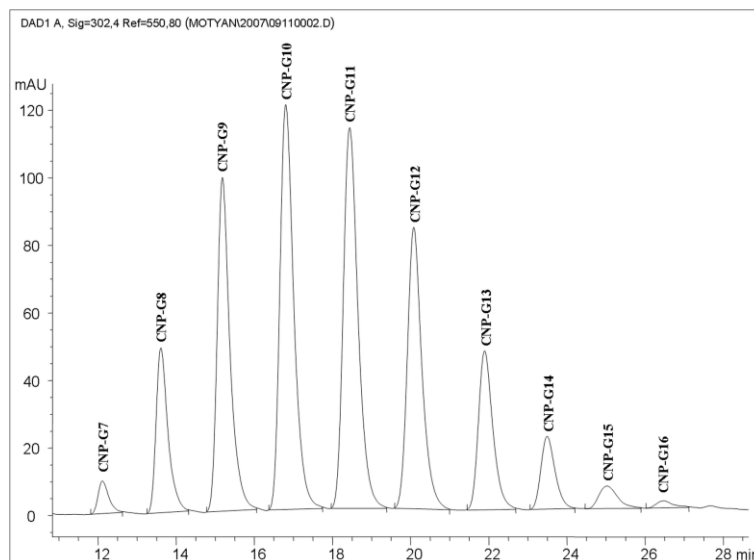


7. ábra A CNP-G3–CNP-G6 maltooligomerek elválasztásának HPLC kromatogramja.

A szintézis reakcióban a CNP-G7 primer 72,4 %-os konverziója mellett a foszforilázissal keletkezett termékek 7,96 %-át a CNP-G3, 44,76 %-át a CNP-G4, 28,9 %-át a CNP-G5 és 18,38 %-át a CNP-G6 adta, valamint a reakció során kis mennyiségben keletkeztek a CNP-G7 primernél nagyobb tagszámú transzfer termékek is (7. ábra).

### **8–11 tagszámú szubsztrátok előállítása transzglikozilezéssel**

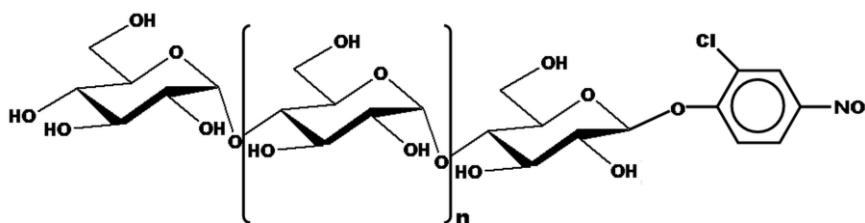
A CNP-G8–CNP-G12 tagszámú maltooligomer szubsztrátok előállítása glikogén foszforiláz *b* által katalizált transzglikozilezéssel történt (Kandra és mtsai., 2001). A CNP-G7 primer (65 mg, 5 mM) és a glükóz-1-foszfát (G-1-P) (100 mg, 30 mM) glicerofoszfát pufferrel (10 ml 25 mM, pH 6,8, 10 mM  $\beta$ -merkaptotanol, 2 mM EDTA, 4 mM AMP) készült oldatához 100  $\mu$ l 1000 E/ml glikogén foszforiláz *b* enzimet adtam. Az elegyet 37 °C hőfokon 30 percig inkubáltam, majd az enzim reakciót az elegy 1 perces forralásával állítottam le. Hűtés után a kicsapódott enzimet 0,2  $\mu$ m-es pórusméretű fecskendőszűrővel (Whatman, Maidstone, UK) kiszűrtem, az oldatot liofilizáltam, majd desztillált vízben való oldás után injektáltam a HPLC oszlopra. Az elválasztás során Hypersil NH<sub>2</sub> aminopropil-szilika (APS) félpreparatív oszlopot (5  $\mu$ m, 250\*10 mm), Hypersil NH<sub>2</sub> előtétoszlopot (5  $\mu$ m, 20\*4 mm) használtam, 3 ml/perc áramlási sebesség mellett, gradiens elúcióval az acetonitril/víz elegy összetételének változtatásával (0–30 perc: 70-30 → 50-50) (8. ábra).



8. ábra A CNP-G8–CNP-G16 maltooligomerek elválasztásának HPLC kromatogramja.

A CNP-G7 primer 98,6 %-os konverziója mellett a transzglykozilezés révén felszabadított termékek közül a CNP-G8 7,66 %-ban, a CNP-G9 16,62 %-ban, a CNP-G10 21,91 %-ban, a CNP-G11 22,26 %-ban, a CNP-G12 16,33 %-ban, a CNP-G13 9,10 %-ban, a CNP-G14 4,13 %-ban, a CNP-G15 1,55 %-ban és a CNP-G16 0,43 %-ban keletkezett (8. ábra).

A CNP-csoporttal jelölt termékek elválasztása és tisztítása során a detektálás a foszforolízissel (Kandra és mtsai., 1999) és a transzglykozilezéssel (Kandra és mtsai., 2001) végzett reakció esetében is diódasoros detektorral történt 302 nm hullámhosszon. A termékek retenciós idején történő azonosításához CNP- $\beta$ -D-MOS standard sorozatot használtam. Az CNP- $\beta$ -D-MOS oligomerek (9. ábra) megfelelő frakcióit egyesítve liofilizáltam, az így kapott termékek azonosságát és tisztaságát HPLC-vel ellenőriztem, a kapott fehér színű liofilizátumot felhasználásig  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltam.



9. ábra A CNP- $\beta$ -D-MOS molekulák szerkezete.

### **4.2.3 Bontási képek meghatározása**

A 3–11 tagszámú CNP- $\beta$ -D-MOS szubsztrátokat (~1 mM végkoncentrációban) nátrium-acetát pufferben (20 mM, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 5,5) oldottuk fel és az elegyet 37 °C-os vízfürdőben előinkubáltuk. A reakció indítása a megfelelő mértékben hígított enzimoldat hozzáadásával történt, a reakcióközeget 37 °C hőmérsékleten inkubáltuk. A 100  $\mu$ l térfogatú reakcióközegeből meghatározott időközönként 10  $\mu$ l-es térfogatokat injektáltunk a kromatográfiás oszlopra azért, hogy nyomon kövessük az enzimreakciót, és a szubsztrát megfelelő konverziója mellett mért termékarányok segítségével meghatározzuk a bontási képeket. Az enzimreakciót a kolonnára injektálással állítottuk le, az enzim kiszűrésére Supelcosil LC-18 előtétoszlopot (5  $\mu$ m, 50\*10 mm) használtunk. A CNP- $\beta$ -D-MOS szubsztrátok hidrolízise és transzglykozilezése révén felszabaduló CNP-glükozidokat HPLC folyadékkromatográffal, ZORBAX Eclipse XDB-C18 fordított fázisú oszlop (5  $\mu$ m, 150\*4,6 mm) segítségével választottuk el, izokratikus elúcióval, acetonitril és víz 13-87 arányú elegyét használva, 1 ml/perc áramlási sebesség alkalmazásával, a kolonnatér hőmérsékletének 40 °C-ra történő beállítása mellett. Az elválasztott CNP-glükozidok detektálása 302 nm hullámhosszon történt, a termékek retenciós idők alapján történő azonosítására CNP-MOS standardsort használtunk. A keletkezett termékek szubsztráthoz és egymáshoz viszonyított arányának megállapításához a csúcs alatti terület értékeket használtuk. A keletkezett termékek hidrolízissel vagy transzglykozilezéssel történő átalakításának elkerülésére a bontási képeket a szubsztrát  $\leq 10$  % konverziója mellett határoztuk meg.

### **4.2.4 Számítások a SUMA számítógépes programmal**

Az alhelytérképek számítását a SUMA szoftver segítségével végeztem el, Windows operációs rendszeren (Gyémánt és mtsai., 2002). Az alhelyek látszólagos kötési energiájának ( $E_{SUMA}$ ) számításához a bontási képek képezték a beviteli adatot. A bontási képeket tartalmazó táblázat elkészítésekor a CNP-MOS szubsztrátok és a keletkezett termékek tagszámának megadása, az alhelyek számának és a hasítóhely pozíciójának beállítása enzimspecifikus módon történt. A paramétereket minden számítás során egységesen, a program alapbeállításától eltérő értékre állítottuk be. Az iterációs eljárás interpolációs léptéke 0,01 és a hőmérséklet 37 °C volt. A párhuzamos mérésekkel meghatározott bontási képekből számolt alhelytérképek esetében az ugyanazon enzimre számolt energiák  $\pm 0,4$  kJ/mol pontossággal határozhatók meg. A bontási képek számítása során az alhelykötési energiaértékeket ( $E_{SUMA}$  vagy  $E_{Transf.}$ ) használtam beviteli adatként, az energiaszámításokhoz használt egységes paraméter-beállítások mellett.

#### **4.2.5 Transzglykozilezés reakciók**

A transzglykozilezéssel történő enzimatiszintézis reakció paramétereinek optimalizálása során az akceptor (1–15 mM) és donor (10–40 mM) molekulák nátrium-acetát pufferrel (50 µl 20 mM, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 4,5–6,5) készült oldatát használtuk. A reakció indítása 5 µl enzimoldat (0,2–1000 nM) hozzáadásával történt, a reakcióközegeket 25 °C-on inkubáltuk. Az enzimreakciót a kolonnára injektálással állítottuk le, az enzim kiszűrésére Supelcosil LC-18 előtétoszlopot (5 µm, 50\*10 mm) használtunk. A felszabaduló termékek HPLC-vel történő elválasztásához ZORBAX Eclipse XDB-C18 kolonnát (5 µm, 150\*4,6 mm) és/vagy Supelcosil C18 kolonnát (3 µm, 150\*4,6 mm) használtunk, acetonitril és víz 10-90 arányú elegyével történő izokratikus elúcióval, 1 ml/perc áramlási sebesség alkalmazásával, a kolonnater hőmérsékletét 40 °C-ra állítva. A PNP kromoforral jelölt glükozidok detektálása 302 nm, a MU fluorofort tartalmazó glükozidok detektálása 317 nm hullámhosszon történt. A transzglykozilezés mértékének megállapítására az akceptor konverziójának értékét használtuk, amit a kromatogramok csúcs alatti terület értékeinek segítségével számoltunk ki.

#### **4.2.6 MU csoporttal jelölt maltooligoszacharid szubsztrátsorozat előállítás**

A MU- $\alpha$ -D-MOS oligomerek preparatív méretű enzimatiszintéziséhez szükséges MU- $\alpha$ -D-G1 akceptort (10 mg) DMSO-ban oldottuk fel (0,730 ml). Az enzimreakciót a MU- $\alpha$ -D-G1 akceptort (40 mM) és a G7 donort (25 mM) is tartalmazó nátrium-acetát pufferben (6,25 ml, 20 mM; 5 mM CaCl<sub>2</sub>; pH 5,5) végeztük és a V47F AMY1 enzimoldat (0,5 nM) hozzáadásával indítottuk el. A reakciót 12 órán keresztül 25 °C-on inkubáltuk. Az enzimreakciót az elegy 1 percig tartó forralásával állítottuk le, majd centrifugálás után a felülúszót 0,2 µm-es fecskendőszűrőn (Whatman, Maidstone, UK) átszűrtük. A kapott oldatot liofilizáltuk, majd az így nyert liofilizátumot feloldottuk 500 µl DMSO és 1,6 ml acetonitril/víz 70-30 arányú elegyében. A MU- $\alpha$ -D-MOS sorozat tagjainak elválasztása és tisztítása félpreparatív HPLC módszer segítségével történt: YMC-Pack Polyamine II. oszlop (5 µm, 250\*4,6 mm) használatával, gradiens elúcióval az acetonitril/víz elegy összetételének változtatásával (0–15 perc: 70-30 → 60-40), 3 ml/perc áramlási sebesség mellett. A MU-glükozidok detektálása 317 nm hullámhosszon történt. A tisztított oligomer frakciókat liofilizáltuk, a kapott fehér színű liofilizátumot -20 °C-on tároltuk felhasználásig.

#### 4.2.7 Kinetikai mérések MU-MOS szubsztrátokkal

A HSA, BLA és BSMA enzimek kinetikai paramétereinek meghatározása MU- $\alpha$ -D-MOS szubsztrátok (0,25–10 mM) segítségével történt. A HSA aktivitásméréséhez a MU- $\alpha$ -D-G3 szubsztrát MES pufferrel (50 mM, 5 mM Ca(OAc)<sub>2</sub>, 51,6 mM NaCl, 152 mM NaN<sub>3</sub>, pH 6,0) készült oldatát használtuk. A BLA esetében a MU- $\alpha$ -D-G5, a BSMA esetében a MU- $\alpha$ -D-G2 szubsztrátok MES pufferrel (50 mM, 5 mM Ca(OAc)<sub>2</sub>, 51,6 mM NaCl, pH 6,0) készült oldatát használtuk. A kinetikai mérések során a pufferben feloldott MU- $\alpha$ -D-MOS szubsztrátot (100  $\mu$ l) 96 lyukú fehér mikrotiter lemez lyukaiba mértük, majd a reakciókat 2  $\mu$ l (BLA, HSA) vagy 5  $\mu$ l (BSMA) enzim hozzáadásával indítottuk. A reakcióközegeket a Wallac VICTOR<sup>2</sup> 1420 fluoriméter-luminométer (PerkinElmer Inc. VICTOR Multilabel Plate Readers, 940, Winter Street, Waltham, Massachusetts 02451, USA.) készülék mintatartó terében inkubáltuk szobahőmérsékleten. A felszabaduló MU csoport detektálása 355 nm gerjesztési hullámhossz ( $\lambda_{ex}$ ) és 460 nm fluoreszcencia kisugárzási hullámhossz ( $\lambda_{em}$ ) használatával történt. A fluoreszcencia méréshez szükséges kalibrációhoz 4-metil-umbelliferont használtunk, 0,1–250  $\mu$ M koncentráció tartományban. A kinetikai paraméterek meghatározásához a GRAFIT (Erithacus Software Ltd.) enzimkinetikai szoftvert használtuk.

#### 4.2.8 <sup>1</sup>H és <sup>13</sup>C NMR analízisek

Az MU-MOS molekulák vizsgálatához, az anomer konfiguráció valamint az interglikozidos kötés típusának megállapításához NMR spektroszkópiát használtunk. A <sup>1</sup>H (500,13 MHz) és <sup>13</sup>C NMR (125,76 MHz) spektrumok Bruker DRX-500 spektrométerrel készültek D<sub>2</sub>O-ban. A <sup>1</sup>H és <sup>13</sup>C NMR spektroszkópiai méréseket és a spektrumok kiértékelését Prof. Batta Gyula végezte a DE TEK TTK Szerves Kémiai Tanszékén.

#### 4.2.9 Tömegspektrometriás mérések (MALDI-TOF MS)

Az MU-MOS molekulák molekulatömeg szerinti azonosítása MALDI-TOF tömegspektrometriával történt. Méréseinkhez Bruker Biflex III reflektronnal és késleltetett ion extrakcióval felszerelt tömegspektrométert használtunk, 2,5-dihidroxi-benzoésav (DHB) mátrix alkalmazásával, pozitív-ion módban. A minták gázfázisba juttatása és ionizálása 337 nm-es nitrogén lézer alkalmazásával történt. Többszöri, általában 100 impulzust alkalmaztunk 19 kV gyorsító és 20 kV reflektoron feszültség mellett. A készüléket ciklodextrin (DP6–8) [M+Na]<sup>+</sup> ionjainak  $m/z$  értékeire: (995; 1157 és 1319 Da) kalibráltuk, külső kalibrációt alkalmazva. A MALDI-TOF MS méréseket a DE TEK TTK Alkalmazott Kémiai Tanszékén végeztük.

#### 4.2.10 Alhelytérképezés molekuláris modellezéssel

Az enzim és a szubsztrát közötti kölcsönhatási energiák számításához alkalmas modelleket a vad típusú és/vagy módosított  $\alpha$ -amiláz enzimekről készült kristályszerkezeti adatokból kiindulva építettük fel, mely adatokat a 4. táblázat tartalmazza. Az ingyenesen hozzáférhető, röntgenkristallográfiával meghatározott szerkezeteket a Fehérje adatbázisból („Protein Data Bank”) töltöttük le (Berman és mtsai., 2000) (4. táblázat). A szekvenciaelemzéshez szükséges szekvenciák a UniProt adatbázisból (UniProtConsortium 2010) származnak (4. táblázat).

A vad típusú és a mutáns enzimek esetében a kötési energia számításokhoz használt háromdimenziós szerkezetek felépítése a Sybyl programcsomag (Tripos International) segítségével történt. A számítások és a modellek megjelenítését is Silicon Graphics Fuel munkaállomáson végeztük (Silicon Graphics International). Az ábrák készítéséhez a Sybyl és a VMD (Humphrey és mtsai., 1996) szoftvereket használtuk.

4. táblázat A felhasznált  $\alpha$ -amiláz enzimek adatai.

$\alpha$ -Amiláz	Rövid név	UniProt kód	PDB kód	Felbontás	Hivatkozás
humán nyál	HSA	P04745	1SMD	1,60 Å	(Ramasubbu és mtsai., 2003)
árpa ( <i>Hordeum vulgare</i> ) izoenzim 1	AMY1	P00693	1RP8	2,00 Å	(Robert és mtsai., 2005)
árpa ( <i>Hordeum vulgare</i> ) izoenzim 2	AMY2	P04063	1BG9	2,80 Å	(Kadziola és mtsai., 1998)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	BAA	P00692	3BH4	1,40 Å	(Alikhajeh és mtsai., 2010)
sertés ( <i>Sus scrofa</i> ) hasnyálmirigy	PPA	P00690	1PIG	2,20 Å	(Machius és mtsai., 1996)
<i>Aspergillus oryzae</i>	TAA	P0C1B3	7TAA	1,98 Å	(Brzozowski és mtsai., 1997)

Az enzim-szubsztrát közötti kölcsönhatási energiák molekuláris modellezéssel történő számításához az enzim természetes szubsztrátjával azonos szerkezetű,  $\alpha$ -(1→4) glikozidos kötések tartalmazó maltooligoszacharid molekulákat építettünk fel. Ezen szubsztrátok modelljeinek felépítéséhez olyan kristályszerkezeteket használtunk fel, melyek az enzimek maltózzal (PDB kód: 2GVY) (Vujicic-Zagar és mtsai., 2006), maltoheptaózzal (PDB kód: 1RP8) (Robert és mtsai., 2005) vagy a szubsztrát-analóg inhibitor akarbózzal (PDB kód: 1MFU) (Ramasubbu és mtsai., 2003), (PDB kód: 1RPK) (Robert és mtsai., 2005), (PDB kód: 1E3Z) (Brzozowski és mtsai., 2000), (PDB kód: 1OSE) (Gilles és mtsai., 1996) alkotott komplexéről készültek.

Az enzim-szubsztrát közötti kölcsönhatási energiák molekuláris modellezéssel történő számítását a következő lépések szerint végeztük.

1. *A maltooligoszacharid szubsztrátmolekula modelljének felépítése.* A kiindulási kristályszerkezetben, az aktív helyen található szubsztrát vagy szubsztrát-analóg molekula egységeit használtuk sablonként és erre illesztettük rá a glükóz egységeket a Sybyl programmal. A felépített maltooligomer szubsztrát egymást követő glükóz egységei között létrehoztuk az  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) glikozidos kötéseket, és a szubsztrát konformációját egy rövid minimalizálási procedúrával finomítottuk (Powell iterációk száma: 20, dielektromos állandó: 1, erőter (,force field): AMBER7\_FF99).

2. *Az enzim-szubsztrát komplexek létrehozása.* Az enzim-szubsztrát komplexek modelljének létrehozása első lépéseként a felépített maltooligoszacharid szubsztrátot beillesztettük a szubsztrátkötő zsebbe, a kiindulási szerkezetben található szubsztrát-analóg molekulára történő illesztéssel, és az aktív helyen eredetileg található molekula törlésével. Bizonyos esetekben a beillesztett szubsztrát hidroxilcsoportjának oxigénje a kristályszerkezetben lévő vízmolekula oxigénjével gyakorlatilag azonos térbeli pozícióban foglalt helyet, ami egyes vízmolekulák eltávolítását tette szükségessé. A mutáns enzimek homológ modelljeinek létrehozása a vad típusú enzim megfelelő aminosav oldalláncainak mutációjával történt. Egyes aminosav oldalláncok módosítása szintén további vízmolekulák eltávolítását tette szükségessé, hogy elkerüljük a minimalizálás során a nagy kiindulási energia által okozott torzulást.

Elkerülendő a módosított aminosav oldalláncoknak a nem módosított aminosav oldalláncokkal, szubsztrát egységekkel vagy vízmolekulákkal történő egymásra illeszkedését, a módosított aminosav oldalláncok feltételezett térbeli pozícióját rövid molekuladinamikai számítással jósoltuk meg (lépések száma: 1000, lépések hossza: 1 fs, hőmérséklet: 300 K, dielektromos állandó: 1, erőter: AMBER7\_FF99, csak a módosított aminosav oldallánc atomjainak minimalizálásával, a többi atomot aggregátumként definiálva). A módosított aminosav oldalláncok és a szubsztrát konformációjának „finomítása” egy rövid energiainimalizálási procedúrával történt: Powell iterációk száma: 100, dielektromos állandó: 1, erőter: AMBER7\_FF99, csak a módosított oldalláncok és a szubsztrát molekula 8 Å környezetén belüli atomok minimalizálásával, a többi atomot aggregátumként definiálva.

3. *Az enzim-szubsztrát közötti kölcsönhatási energiáinak számítása.* Az enzim-szubsztrát komplex minimalizálása a teljes molekula minimalizálásával történt, aggregátumok definiálása nélkül. Az energiainimalizálás paraméterei: Powell iterációk száma: 100, dielektromos állandó: 1, erőter: AMBER7\_FF99, nem-kötő kölcsönhatások határtávolság

értéke („cutoff”): 8 Å. A minimalizálást követően minden szubsztrátkötő alhely esetében kiszámítottuk az egyes glükóz monomer egységek és az enzim közötti kölcsönhatási energiákat ( $E_{\text{SYBYL}}$ ).

4. *Az adatok feldolgozása.* Az adatok feldolgozásának és kiértékelésének első lépéseként elvégeztük a kísérletesen meghatározott bontási képből a SUMA programmal számolt látszólagos kötési energia értékek ( $E_{\text{SUMA}}$ ) és a Sybyl programmal molekuláris modellezéssel számolt enzim-szubsztrát kölcsönhatási energia értékek ( $E_{\text{SYBYL}}$ ) közötti lineáris regressziós analízist. A jóslott értékek pontosságának megállapítására a pontokra illesztett regressziós egyenes korreláció koefficiens ( $r^2$ ) értékét használtuk. Az  $E_{\text{SYBYL}}$  (kcal/mol) értékeket lineáris transzformációval az  $E_{\text{SUMA}}$  értékekkel (kJ/mol) azonos nagyságrendű energiákká ( $E_{\text{Transf.}}$ ) (kJ/mol) alakítottuk azért, hogy így mérsékeljük a számításokat terhelő hibák mértékét. A lineáris transzformáláshoz az  $E_{\text{SYBYL}}$  és az  $E_{\text{SUMA}}$  értékek közötti lineáris regressziós analízis során kapott regressziós egyenes egyenletének meredekség ( $m$ ) és tengelymetszet ( $b$ ) értékeit használtuk, az alábbi egyenlet szerint:

$$E_{\text{Transf.}} = (E_{\text{SYBYL}} - b) / m.$$

A lineáris regressziós analízishez, az értékek transzformálásához és az ábrázoláshoz a Microsoft Excel (Microsoft Corporation) és a SigmaPlot (Systat Software Inc.) szoftvereket használtuk. A vizsgált modellek összehasonlítását a Sybyl program segítségével végeztük el, Silicon Graphics Fuel munkaállomáson.

## 5. Eredmények és megbeszélés

### 5.1 Az AMY1 másodlagos szubsztrátkötő hely mutánsainak vizsgálata

Az enzimfehérje felszínén, az aktív helytől távol elhelyezkedő szubsztrátkötő helyek a szubsztráttal kialakított többszörös kölcsönhatások révén fontos szerepet játszanak az enzimműködésben, ezért az azokat érintő mutációk befolyásolják az enzim-szubsztrát kölcsönhatásokat. A másodlagos kötőhelyeket érintő mutációk hatásának kimutatására alkalmas az aktív centrum térképezés módszere. A termékanalízis módszerével megállapítható a hidrolízissel valamint a transzglykozilezéssel felszabadított termékek mennyiségének változása és így kiszámítható a mutáció alhelykötési energiákra gyakorolt hatása is.

A keményítő szemcse-kötő hely és a cukorcspesz kulcsfontosságú aminosavainak mutációit tartalmazó W279A, W278A/Y380A, W279A/Y380A, H395A, H395A/Y380A és Y105A/Y380M enzimek mindegyikében a szénhidrát-szubsztráttal kialakított kölcsönhatásokért felelős oldalláncok alaninra lettek kicserélve, az Y105A/Y380M mutáns kivételével. Az egyszeres és kétszeres AMY1 mutánsok bontási képeit 3–11 tagszámú CNP- $\beta$ -D-MOS szubsztrátok hidrolízisével határoztam meg. A vad típusú enzimre és az Y105A és Y380A mutánsokra vonatkozó méréseket és számításokat korábban Dr. Gyémánt Gyöngyi végezte el. A módosított enzimek esetében a mutációk által okozott változásokat a vad típusú enzimhez viszonyítva értékeltük. Az Y105A/Y380M kétszeres mutáns az aktív hely nagy energiájú –6 alhelyén elhelyezkedő Y105 aminosav mutációját is tartalmazza, így ebben az esetben az összehasonlításhoz az Y105A egyszeres mutáns adatait is használtuk (Kandra és mtsai., 2006).

A bontási képeket CNP- $\beta$ -D-MOS szubsztrátsorozatokon mért reakciókkal határoztuk meg, azonban  $\leq 10\%$  szubsztrátkonverzió mellett is tapasztaltunk transzglykozilezést. A transzglykozidáz aktivitás mértékének megállapításához az összes termék mennyiségéhez viszonyítva határoztuk meg a transzglykozilezéssel keletkezett termékek százalékos arányát. Az 5. táblázat a 3–11 tagszámú CNP-MOS szubsztrátok hidrolízisével keletkező termékek egymáshoz viszonyított arányát (%) mutatja. A bontási képek nem mutatnak jelentős különbséget a vad típus és mutánsai között (5. táblázat). Az egyes termékek mennyiségének csak kismértékű növekedése vagy csökkenése tapasztalható. A különböző szubsztrátokkal végzett reakciók többségében azonos tagszámú oligomerek keletkeztek fő termékként. A legjelentősebb változások az Y105A/Y380M mutáns esetében tapasztalhatóak. Bontási képe nagy hasonlóságot mutat az Y105A mutánséval (5. táblázat), ami arra utal, hogy az Tyr105-t érintő mutáció hatása érvényesül az Y380M mutáció hatásával szemben.

5. táblázat A másodlagos kötőhelyeken módosított AMY1 enzimek bontási képei.

Szubsztrát	Termék	AMY1*	W279A	W278A/ Y380A	W279A/ Y380A	Y380A	H395A	H395A/ Y380A	Y105A <sup>a</sup>	Y105A/ Y380M
CNP-G3	CNP-G1	84,0	71,9	70,2	73,8	78,0	73,2	76,2	80,0	74,4
	CNP-G2	16,0	28,1	29,8	26,2	22,0	26,8	23,8	20,0	25,6
CNP-G4	CNP-G1	4,0	1,6	7,1	6,3	2,0	7,9	12,8	3,0	7,1
	CNP-G2	95,0	95,7	91,1	91,8	96,1	89,3	83,3	96,0	87,9
	CNP-G3	1,0	2,7	1,8	1,9	1,9	2,8	3,9	1,0	5,0
CNP-G5	CNP-G1	12,0	26,8	19,3	15,5	21,5	16,8	19,5	8,0	9,6
	CNP-G2	56,0	53,8	59,8	62,0	54,5	63,1	59,6	62,0	67,2
	CNP-G3	20,0	9,8	20,9	22,5	24	20,1	20,9	24,0	23,2
	CNP-G4	12,0	9,6	0	0	0	0	0	6,0	0
CNP-G6	CNP-G1	17,0	16,4	8,6	11,2	14,2	10,3	19,0	6,0	5,7
	CNP-G2	62,0	50,4	62,3	58,6	56,7	60,2	53,3	64,0	63,5
	CNP-G3	12,0	21,5	14,0	14,5	15,6	14,3	11,9	15,0	14,8
	CNP-G4	9,0	9,5	11,2	11,8	13,5	13,8	12,4	15,0	12,4
	CNP-G5	0	2,2	3,9	3,9	0	1,4	3,4	0	3,6
CNP-G7	CNP-G1	95,0	88,2	86,0	92,1	94,7	68,8	91,4	41,0	39,8
	CNP-G2	2,0	3,6	4,2	2,8	2,5	7,4	2,7	33,0	30,2
	CNP-G3	2,0	2,2	5,3	1,5	1,6	11,9	1,0	16,0	16,1
	CNP-G4	1,0	1,2	2,3	0,9	0,7	4,7	1,7	5,0	6,5
	CNP-G5	0	4,8	2,2	1,0	0,5	7,2	1,0	5,0	4,9
	CNP-G6	0	0	0	1,7	0	0	2,2	0	2,5
CNP-G8	CNP-G1	66,0	60,9	53,9	64,4	66,4	59,4	67,1	38,0	39,0
	CNP-G2	34,0	37,5	41,5	34,4	33,6	37,1	30,6	55,0	47,7
	CNP-G3	0	0,7	0,9	0,1	0	0,6	0,6	3,0	2,7
	CNP-G4	0	0,9	1,6	0,4	0	1,1	1,3	3,0	3,2
	CNP-G5	0	0	0,6	0,2	0	0,5	0,4	15,0	1,1
	CNP-G6	0	0	1,5	0,5	0	1,3	0	0	3,3
	CNP-G7	0	0	0	0	0	0	0	0	3,0
CNP-G9	CNP-G1	34,0	21,3	18,7	23,1	6,6	22,8	24,7	16,0	13,7
	CNP-G2	52,0	53,1	45,9	51,6	73,3	65,5	63,3	71,0	62,7
	CNP-G3	14,0	9,4	10,1	9,7	7,5	7,8	8,3	11,0	10,8
	CNP-G4	0	5,0	7,5	4,6	12,6	1,5	1,2	1,0	4,3
	CNP-G5	0	7,9	12,9	8,0	0	1,7	2,0	1,0	6,0
	CNP-G6	0	3,3	4,9	3	0	0,7	0,5	0	2,5
CNP-G10	CNP-G1	22,0	18,4	23,3	18,2	4,5	21,1	20,5	10,0	9,5
	CNP-G2	37,0	45,8	46,1	40,9	62,9	45,3	44,8	50,0	48,7
	CNP-G3	34,0	26,8	26,8	24,7	14,0	27,3	27,8	33,0	30,4
	CNP-G4	7,0	7,1	3,8	7,6	11,5	6,3	6,9	6,0	7,2
	CNP-G5	0	1,1	0	7,1	7,1	0	0	1,0	1,8
	CNP-G6	0	0,8	0	1,5	0	0	0	0	0,9
	CNP-G7	0	0	0	0	0	0	0	0	1,5
CNP-G11	CNP-G1	12,0	20,0	18,6	20,0	14,1	20,2	20,1	9,0	6,5
	CNP-G2	40,0	27,5	33,3	31,0	44,6	33,4	31,6	43,0	31,8
	CNP-G3	20,0	18,2	17,9	17,3	18,7	17,1	17,3	24,0	21,5
	CNP-G4	25,0	30,0	26,4	27,8	22,6	25,7	27,2	22,0	24,3
	CNP-G5	3,0	4,3	3,8	3,9	0	3,6	3,8	2,0	4,8
	CNP-G6	0	0	0	0	0	0	0	0	2,0
	CNP-G7	0	0	0	0	0	0	0	0	4,5
	CNP-G8	0	0	0	0	0	0	0	0	3,1
	CNP-G9	0	0	0	0	0	0	0	0	1,5

\*(Kandra és mtsai., 2006).

Minden vizsgált enzim esetében tapasztaltuk a CNP-G4 szubsztráton mért transzglykozilezés mértékének növekedését, valamint az Y380A és Y105A kivételével a CNP-G3 szubsztráton is mértük transzfer termékek keletkezését (6. táblázat). Hosszabb, 5–7 tagszámú szubsztrátokon csak az Y105A/Y380M mutáns mutatott transzferáz aktivitást. A legnagyobb mértékű transzglykozilezést a W278A/Y380A mutáns mutatta, több mint háromszoros mennyiségű transzfer terméket szabadított fel (24,4 %) a vad típushoz képest (8 %) a CNP-G4 szubsztráton mért reakcióban (6. táblázat).

6. táblázat A másodlagos kötőhely-mutánsok bontási képeinek elkészítése során tapasztalt transzglykozilezés. A táblázat a transzglykozilezéssel keletkezett termékek százalékos arányát mutatja az összes termék mennyiségéhez képest.

Enzim	Szubsztrát				
	CNP-G3	CNP-G4	CNP-G5	CNP-G6	CNP-G7
AMY1	0	8	0	0	0
W279A	10,1	20,8	0	0	0
W278A/Y380A	4,9	24,4	0	0	0
W279A/Y380A	5,8	18,2	0	0	0
H395A	5,8	12,3	0	0	0
H395A/Y380A	13,9	17,2	0	0	0
Y105A/Y380M	12,0	13,1	8,2	3,7	3,9
Y380A	0	20	0	0	0
Y105A	0	10	0	0	0

A W279A, W278A/Y380A, W279A/Y380A, Y380A, H395A, H395A/Y380A és Y105A/Y380M AMY1 mutánsok alhelytérképeit a CNP- $\beta$ -D-MOS szubsztrátokkal készített bontási képek alapján számítottuk ki (7. táblázat). A látszólagos kötési energia értékeket 8 glikon és 4 aglikon alhelyre számítottuk ki, a korábban meghatározott 12 alhelyből álló modell (Kandra és mtsai., 2006) megtartásával.

A mutációk hatásának kiértékelése során az Y380A cukorcípesz mutáns az összeenergia jelentős növekedését (-39,7 kJ/mol) mutatta, míg az H395A mutáns esetében jelentős csökkenését tapasztaltuk (-12,6 kJ/mol) a vad típusú enzimhez képest (-22,6 kJ/mol) (7. táblázat).

7. táblázat A másodlagos kötőhelyeken módosított AMY1 enzimek alhelytérképei.

Enzim	Az egyes szubsztrátkötő alhelyek látszólagos kötési energiái (kJ/mol)												Összes energia (kJ/mol)
	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	+1	+2	+3	+4	
AMY1*	0,30	-4,00	-12,40	0,80	-1,30	1,00	-7,00			-2,70	1,90	0,80	-22,60
W279A	0,23	-3,95	-10,01	-0,17	-1,87	0,69	-4,59			-3,02	2,28	-1,09	-21,50
W278AY380A	0,35	-2,96	-10,57	2,86	-1,06	0,85	-5,08			-2,68	2,35	0,31	-15,63
W279AY380A	0,55	-3,90	-11,74	1,66	-0,80	0,77	-5,71			-2,70	2,33	-0,01	-19,55
Y380A	-1,00	-6,90	-14,00	-1,90	-2,70	0,20	-8,70			-5,40	2,00	-1,30	-39,70
H395A	1,28	-3,80	-8,04	2,61	-0,47	0,87	-5,52			-2,77	2,93	0,23	-12,68
Y380A/H395A	0,81	-4,31	-10,67	0,08	-0,68	0,45	-5,76			-2,53	2,42	-0,20	-20,39
Y105A*	0,70	-3,80	-5,60	0,20	-1,40	0,20	-8,00			-5,00	2,00	0,90	-19,80
Y105A/Y380M	0,23	-3,75	-5,43	0,18	-1,56	-0,63	-7,57			-4,79	1,61	-0,25	-21,96

\* (Kandra és mtsai., 2006)

Az Y380A mutáns esetében tapasztalható jelentős energiatöbbletet nem az egyes alhelyek energiájának kiugróan nagy változása okozza, hanem az egyes kötési energiák kismértékű változásának együttes hatása. Megfigyelhető a kötőhelyek affinitásának növekedése, a vad típusú enzimből megtalálható -8, -5 és +4 gátalhelyek (Kandra és mtsai., 2006) kötőhelyekké átalakulása és a -3 gátalhely kötési energiájának növekedése (7. táblázat).

Ezzel ellentétben, a cukorcsipesz Tyr380 aminosavval ellentétes oldalán elhelyezkedő His395 aminosav mutációját tartalmazó enzim (H395A) az összenergia jelentős csökkenését mutatta a vad típusúhoz képest (7. táblázat). Ez a változás az Y380A mutánshoz hasonlóan az egyes alhelyeken tapasztalt kismértékű változásokból tevődik össze. A szubsztrát iránti affinitás csökkenését a -6 és -2 nagy energiájú glikonkötő alhelyek és a -8, -5 és +3 gátalhelyek kötési energiájának csökkenése is mutatja (7. táblázat).

A Y380A/H395A kétszeres mutáns esetében az egyes mutációk által okozott hatások kiegyenlítik egymást, az összenergia értékében (-20,39 kJ/mol) sem tapasztalható az egyszeres mutánsok esetében mért jelentős változás (7. táblázat). Az Y380A és a H395A egyszeres mutációk által okozott hatásoknak a kétszeres mutánsban megfigyelhető kiegyenlítődése nemcsak az alhelytérképek esetében, hanem az enzimaktivitás értékek esetében is tapasztalható, míg az egyszeres mutánsok jelentősen csökkent aktivitást mutatnak, a kétszeres mutáns aktivitása a vad típusúhoz hasonló érték (3. táblázat).

Az Y105A/Y380M kétszeres mutáns a cukorcsipesz kulcsfontosságú aminosavának és a nagy energiájú -6 glikonkötő alhelyen lévő Tyr105 aminosavnak a mutációját is tartalmazza. Az aktív helyet érintő Y105A mutáció hatása dominál a másodlagos kötőhely Y380M mutációjával szemben (Nielsen és mtsai., 2008a), amit a bontási kép és alhelytérkép adatok

mutatnak. A kétszeres mutáns az Y105A mutánsához hasonlóan a -6 hely energiájának közel 7 kJ/mol-os csökkenését mutatja a vad típus -12.4 kJ/mol értékéhez képest (7. táblázat).

A keményítő szemcse-kötő hely kulcsfontosságú aminosavainak mutációját is tartalmazó egyszeres (W279A) és kétszeres mutáns (W278A/Y380A és W279A/Y380A) enzimek esetében nem tapasztaltunk jelentős változásokat a bontási képekben (5. táblázat), az egyes helyek kötési energiáiban és az összenergia értékekben sem (7. táblázat). Alhelytérképük és bontási képük is nagyon hasonló a vad típusú enziméhez.

A jelen fejezetben bemutatott vizsgálatok során elsőként vizsgáltuk az AMY1 aktív helyétől távol elhelyezkedő aminosavait érintő mutációk hatását a CNP- $\beta$ -D-MOS szubsztrátok termékanalízisén alapuló alhelytérképezéssel. Elsőként végeztük el a W279A, W278A/Y380A, W279A/Y380A, Y380A, H395A, H395A/Y380A és Y105A/Y380M AMY1 másodlagos kötőhely-mutánsok aktív centrumának térképezését (Nielsen és mtsai., 2009).

## **5.2 Az AMY1 aktív hely mutánsainak vizsgálata**

A V47 és S48 aminosavak egyszeres és/vagy kétszeres mutációját tartalmazó enzimeket (S48Y, V47A, V47F, V47D, V47K/S48G, V47G/S48D, V47I/S48I és V47L/S48A) korábban az aktív hely glikon-kötő helyein betöltött szerepének tanulmányozása céljából állították elő random mutagenézissel (Mori és mtsai., 2001; Mori és mtsai., 2002; Svensson és mtsai., 2002). Munkánk során ezen AMY1 mutánsok aktív centrumának térképezését végeztük el.

A mutánsok bontási képeit 3–11 tagszámú CNP- $\beta$ -D-MOS szubsztrátsorozat tagjainak hidrolízisével határoztuk meg. A bontási képek elkészítésében Fazekas Erika nyújtott segítséget a kromatográfiás analízisek során. A 8. táblázat a 3–11 tagszámú szubsztrátok hidrolízisével keletkező termékek egymáshoz viszonyított arányát (%) mutatja.

A mutációk hatására a preferált kötési módok megváltozása az alhelykötési energiák megváltozásával magyarázható. A vad típusú AMY1 esetében a fő kötési mód a kromofor csoportot tartalmazó heptamer szubsztrát (CNP-G7) esetében a -6 és +2 alhelyek közötti kötődés, amikor is a nagy energiájú alhelyek rögzítik a szubsztrát két végét. A vad típus esetében a nagy energiájú -6 alhely határozza meg a CNP-G7 kötődését, csaknem kizárólag CNP-G1 szubsztrát felszabadulását okozva (Kandra és mtsai., 2006). Az aktív hely mutánsok esetében az alhelyek energiaváltozásai együttesen a hosszabb termékek nagyobb mennyiségben történő keletkezését eredményezik. Ez a hatás érvényesül az S48Y, V47K/S48G és V47G/S48D mutánsok esetében is, aminek következtében a CNP-G7 szubsztráttal végzett reakcióban a CNP-G1 termék csak igen kis mennyiségben szabadul fel (8. táblázat). A V47A és V47L/S48A esetében a preferált kötőmódok jó egyezést mutatnak az előzetes vizsgálatok során PNP-G5–G7 szubsztrátokon mért reakciók eredményeivel (Svensson és mtsai., 2002).

A másodlagos kötőhely-mutánsok vizsgálatához hasonlóan ebben az esetben is tapasztaltunk transzglykozilezést a CNP- $\beta$ -D-MOS szubsztrátok  $\leq 10$  % konverziója mellett. A 9. táblázat a transzglykozilezéssel keletkezett termékek százalékos arányát mutatja az összes termék mennyiségéhez képest, mely értékeket a csúcs alatti területek felhasználásával határoztunk meg.

Korábbi vizsgálatok a vad típusú AMY1 bontási képének vizsgálata során transzfer termékek keletkezését mutatták ki G4, G5 és G6, valamint PNP- $\alpha$ -D-G4 szubsztrátokon (Macgregor és mtsai., 1992). Az AMY1 transzglykozilezésre való képességét vizsgálataink során szintén sikerült igazolni: a CNP-G4 szubsztrát esetében CNP-G5 és CNP-G6 transzfer termékek felszabadulását tapasztaltuk, a keletkezett termékek 8 %-a keletkezett transzglykozilezéssel (9. táblázat) (10.A ábra).

8. táblázat Az aktív helyen módosított AMY1 enzimek bontási képei.

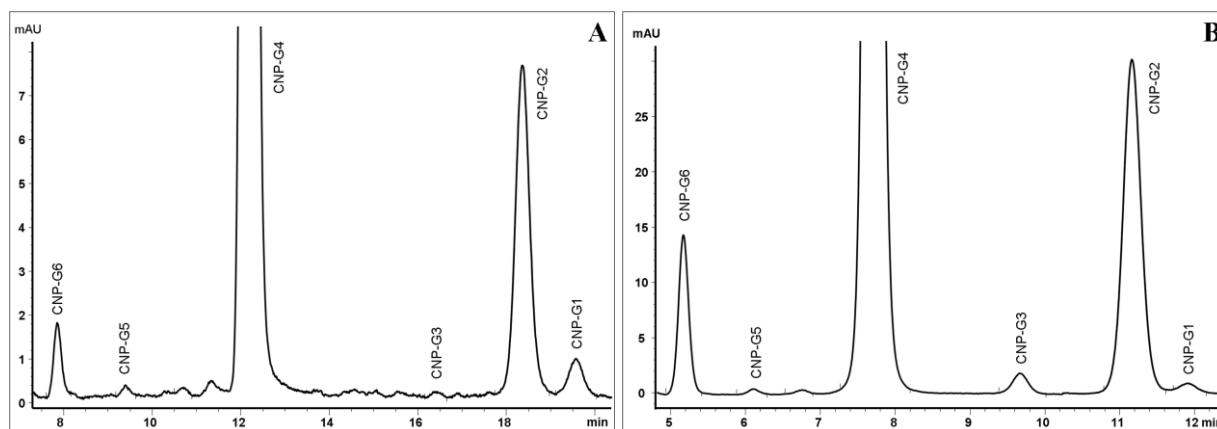
Szubsztrát	Termék	AMY1*	S48Y	V47A	V47F	V47D	V47K/S48G	V47G/S48D	V47I/S48I	V47L/S48A
CNP-G3	CNP-G1	84	57,9	69,8	77,4	75,2	74,7	72,8	40,9	57,3
	CNP-G2	16	42,1	30,2	22,6	24,8	25,3	27,2	59,1	42,7
CNP-G4	CNP-G1	4	1,3	6,0	2,3	5,2	2,9	2,0	6,0	6,8
	CNP-G2	95	98,7	93,4	97,7	94,8	97,1	98,0	94,0	93,2
	CNP-G3	1	0	0,6	0	0	0	0	0	0
CNP-G5	CNP-G1	12	0,6	17,2	8,5	6,2	0,7	1,9	6,7	10,6
	CNP-G2	56	62,6	60,0	67,0	69,0	76,7	73,9	73,5	59,8
	CNP-G3	20	33,9	20,1	22,2	22,9	21,2	22,1	17,2	27,6
	CNP-G4	12	2,9	2,7	2,3	1,9	1,4	2,1	2,6	2,0
CNP-G6	CNP-G1	17	0,5	12,5	3,9	4,4	0,8	1,3	2,6	8,4
	CNP-G2	62	35,8	67,1	66,4	65,6	34,5	55,7	53,3	69,1
	CNP-G3	12	26,7	9,6	15,3	14,2	36,7	20,9	35,5	9,7
	CNP-G4	9	34,5	8,5	12,7	13,2	24,5	16,8	7,3	9,5
	CNP-G5	0	2,5	2,3	1,7	2,6	3,5	5,3	1,3	3,3
CNP-G7	CNP-G1	95	2,6	85,5	22,4	51,9	1,8	7,9	72,4	70,5
	CNP-G2	2	29,3	7,4	39,1	27,1	26,1	26,3	18,1	18,7
	CNP-G3	2	13,4	4,3	20,8	11,4	19,2	28,0	5,2	7,0
	CNP-G4	1	22,7	1,5	10,4	5,4	32,8	21,8	2,6	2,0
	CNP-G5	0	32,0	1,3	7,3	4,2	20,1	14,5	1,7	1,8
	CNP-G6	0	0	0	0	0	0	1,5	0	0
CNP-G8	CNP-G1	66	7,6	55,2	61,3	22,9	11,6	31,4	28,6	44,1
	CNP-G2	34	33,8	41,3	34,3	72,5	32,1	34,5	69,7	53,6
	CNP-G3	0	8,8	1,0	0,1	3,2	6,5	2,6	0,8	1,0
	CNP-G4	0	11,5	2,0	3,8	1,0	11,1	10,9	0,7	1,0
	CNP-G5	0	18,8	0,5	0,5	0,4	20,2	8,9	0,2	0,3
	CNP-G6	0	19,5	0	0	0	18,5	11,7	0	0
CNP-G9	CNP-G1	34	7,6	21,6	10,4	5,3	3,1	8,2	10,0	10,6
	CNP-G2	52	42,1	49,1	79,8	45,4	45,7	59,8	81,7	69,0
	CNP-G3	14	7,4	10,6	4,3	39,3	8,8	9,5	5,1	7,9
	CNP-G4	0	7,6	5,4	2,0	4,3	8,4	3,9	1,4	1,8
	CNP-G5	0	11,5	8,9	2,9	3,1	10,8	8,8	1,8	9,2
	CNP-G6	0	9,7	4,4	0,6	1,3	11,8	4,9	0	1,5
	CNP-G7	0	14,1	0	0	1,3	11,4	4,9	0	0
CNP-G10	CNP-G1	22	3,5	20,9	8,5	4,0	3,2	6,8	11,0	5,5
	CNP-G2	37	53,4	49,9	54,9	44,5	41,2	40,5	55,5	39,1
	CNP-G3	34	14,9	22,9	30,3	20,0	24,7	27,0	13,0	25,1
	CNP-G4	7	5,6	6,3	4,0	29,6	4,3	8,3	6,7	8,5
	CNP-G5	0	3,6	0	2,3	1,9	3,5	4,7	2,7	6,5
	CNP-G6	0	4,5	0	0	0	5,9	6,8	5,7	10,3
	CNP-G7	0	5,9	0	0	0	8,1	3,9	5,4	5,0
	CNP-G8	0	8,6	0	0	0	9,1	2,0	0	0
CNP-G11	CNP-G1	12	3,4	19,7	5,9	1,2	1,9	5,3	2,8	10,0
	CNP-G2	40	37,5	39,2	61,2	26,9	31,7	31,2	50,7	50,8
	CNP-G3	20	18,8	17,3	20,0	15,6	12,6	15,2	28,5	20,2
	CNP-G4	25	12,6	17,1	12,9	24,6	13,5	20,5	13,9	19,0
	CNP-G5	3	3,8	3,7	0	10,2	7,0	14,6	1,8	0
	CNP-G6	0	2,6	1,1	0	4,3	4,0	3,0	0,4	0
	CNP-G7	0	9,0	1,1	0	9,9	7,1	4,5	1,0	0
	CNP-G8	0	5,2	0,8	0	6,3	11,5	3,6	0,9	0
	CNP-G9	0	7,1	0	0	1,0	10,7	2,1	0	0

\*(Kandra és mtsai., 2006)

9. táblázat Az aktív hely-mutánsok bontási képeinek elkészítése során tapasztalt transzglykozilezés. A táblázat a transzglykozilezéssel keletkezett termékek százalékos arányát mutatja az összes termék mennyiségéhez képest.

Enzim	Szubsztrát					
	CNP-G3	CNP-G4	CNP-G5	CNP-G6	CNP-G7	CNP-G8
AMY1	0	8,0	0	0	0	0
V47A	16,6	32,0	3,5	1,8	0	2,2
V47F	20,3	35,0	23,2	6,7	0	3,7
V47D	16,4	30,7	17,9	6,0	0	2,3
S48Y	14,8	31,7	25,9	16,0	25,0	15,1
V47K/S48G	10,2	32,8	25,9	16,2	17,8	15,6
V47G/S48D	20,8	43,2	35,0	23,7	19,9	19,4
V47L/S48A	14,5	25,7	6,9	0,0	2,0	5,6
V47I/S48I	17,0	35,9	2,3	0,0	0,0	4,2

A módosított enzimek mindegyike nagyobb mennyiségű transzfer terméket szabadított fel a CNP-G4 szubsztráttal végzett reakciók során, mint a vad típusú enzim (9. táblázat). A megnövekedett transzglykozilezési képességet a V47F mutáns példáján a 10. ábra mutatja, ahol a CNP-G4 szubsztráton mért reakcióban a CNP-G5–6 termékek transzglykozilezéssel keletkeztek, míg a kisebb tagszámúak (DP1–3) hidrolízissel. A vad típusú enzimhez képest (10.A ábra) a V47F mutáció (10.B ábra) jelentősen megnövelte a transzglykozilezéssel keletkezett termékek mennyiségét.



10. ábra Az AMY1 (A) és a V47F (B) enzimek CNP-G4 szubsztráttal készült bontási képeinek HPLC kromatogramja. Az AMY1 esetében (A) a termékek 8 %-a, a V47F AMY1 esetében (B) 35 %-a keletkezett transzglykozilezéssel. ZORBAX Eclipse XDB-C18 oszlop (5  $\mu$ m, 150\*4,6 mm), izokratikus elúció: acetonitril/víz = 13-87, áramlási sebesség: 1 ml/perc, DAD: 302 nm.

Nem csak a CNP-G4 szubsztráton, hanem a kisebb (CNP-G3) és nagyobb tagszámú (CNP-G5–8) oligomer szubsztrátokon is tapasztaltuk transzfer termékek felszabadulását (9. táblázat). A V47 mutánsok elsősorban a rövidebb szubsztrátokon mutattak jelentős transzferáz aktivitást (CNP-G3–5). A legkisebb mértékű transzglykozilezést pentamer szubsztáton az V47A esetében mértük (3,5 %) míg a V47G/S48D esetében a volt a legmagasabb (35 %). A V47K/S48G, V47G/S48D, V47F és S48Y mutánsok esetében jelentős mértékű transzglykozilezést tapasztaltunk mind a rövidebb, mind a hosszabb szubsztrátokon (9. táblázat).

Az alhelytérképeket a korábban meghatározott 8+4 alhelymodell megtartásával (Kandra és mtsai., 2006) 12 alhelyre számítottam ki (10. táblázat).

10. táblázat Az aktív helyen módosított AMY1 enzimek alhelytérképei.

Enzim	Az egyes szubsztrátkötő alhelyek látszólagos kötési energiái (kJ/mol)												Összes energia (kJ/mol)
	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	+1	+2	+3	+4	
AMY1*	0,30	-4,00	-12,40	0,80	-1,30	1,00	-7,00			-2,70	1,90	0,80	-22,60
S48Y	-1,62	-1,91	-1,13	0,18	0,99	0,49	-8,49			-7,65	1,98	-0,40	-17,56
V47A	0,15	-2,99	-9,42	2,07	-0,91	1,29	-4,97			-2,64	2,96	1,00	-13,46
V47F	1,21	-6,88	-4,00	1,36	-0,43	0,65	-8,61			-5,41	3,03	1,99	-17,09
V47D	-1,15	-0,32	-8,23	-0,93	-2,58	-1,57	-9,58			-6,67	0,84	-1,27	-31,46
V47K/S48G	0,21	-2,28	-1,28	0,83	1,90	-0,87	-10,75			-7,96	1,97	0,27	-17,96
V47G/S48D	1,33	-3,56	-2,29	2,14	-0,19	-0,32	-8,11			-5,53	2,33	0,14	-14,06
V47L/S48A	1,70	-3,31	-7,88	1,02	-1,14	1,12	-5,02			-4,16	2,89	1,56	-13,22
V47I/S48I	-0,84	-4,55	-10,84	-0,97	0,39	-1,57	-6,12			-6,98	1,71	1,10	-28,67

\*(Kandra és mtsai., 2006).

A Ser48 aminosav számos glikonkötő helyen játszik szerepet a szubsztrát kötésében. Az eredmények azt mutatják, hogy a mutáció hatására az S48Y AMY1 mutáns aktív helyének glikon-kötő régiója rövidül. A -7 és a nagy energiájú -6 alhely affinitása drasztikusan lecsökken, aminek következtében a -6 kötőhely csaknem teljesen megszűnik (10. táblázat). A vad típusú enzim -4 kötőhelye (-1,30 kJ/mol) gátalhelyé alakul át (0,99 kJ/mol). A +2 alhely kötési energiája csaknem 5 kJ/mol-os növekedést mutat, ami a -2 alhely energiájának növekedésével együtt úgy változtatja meg a preferált kötőmódokat, hogy az a rövidebb szubsztrátok bekötődésének kedvez.

Erre a változásra utalt a szubsztrátok hasításához szükséges reakcióidőben bekövetkező változás is. A vad típusú enzim esetében a CNP-G7 szubsztrátot a nagy energiájú -6 és +2 alhely rögzíti, ami a szubsztrát gyors hidrolíziséhez vezet. Az S48Y mutáns esetében azonban a

CNP-G4 szubsztrát bekötődése kedvezőbb a -6 hely horgonyzó hatásának megszűnése miatt. Ez azt eredményezi, hogy a vad típus a CNP-G7, míg az S48Y a CNP-G4 a szubsztrátot hidrolizálja nagyobb sebességgel, ami megállapítható a különböző tagszámú szubsztrátok esetében az időegység alatt az átalakított szubsztrát mennyiségében bekövetkező változásból ( $v_{\text{CNP-Gn}}$ ) (konverzió %/perc). A  $v_{\text{CNP-G4}}/v_{\text{CNP-G7}}$  értéke 23-nak adódott az S48Y esetében, míg a vad típusnál ez az érték csupán 0,08 volt, ami jól mutatja a szubsztrátspecifitás változását, az S48Y mutáns CNP-G4 iránti affinitásának növekedését.

A V47A mutáció szintén csökkentette a -6 hely szubsztrát iránti affinitását, ám nem olyan jelentős mértékben, mint az S48Y mutáció. A 47 pozícióban található valin alaninra történő cseréje a -2 hely energiáját is csökkentette. A többi alhelyen nem tapasztalható jelentős változás, az energiaértékek a vad típuséhoz hasonlóak (10. táblázat). Mind az alanin, mind a valin hidrofób aminosavak, alifás oldallánccal. Az oldallánc méretében bekövetkező változás lehet a magyarázat a V47A által okozott kevésbé jelentős hatásra. Érdekes megfigyelés, hogy bár a mutáció nem okozott kiugró változásokat az egyes alhelyek energiáiban, mégis az összenergia érték igen jelentős csökkenése tapasztalható (10. táblázat).

AV47F mutáció hatására a -7, -2 és +2 alhelyek energiája is megnövekedett és a -6 hely energiája csaknem harmadára csökkent (10. táblázat). A jelenség magyarázatául az szolgálhat, hogy a V47F mutáns esetében a fenilalanin az Y105 aromás gyűrűjével kerül kölcsönhatásba. A -6 hely szubsztrát iránti nagy affinitása (-12,4 kJ/mol) révén erőteljes horgonyzó hatást gyakorol a bekötődő szubsztrátokra a vad típus esetén. A mutáció hatására lecsökkent affinitás (-4,0 kJ/mol) azonban a maltoheptaóznál rövidebb szubsztrátok bekötődése esetén nem kedvez a produktív komplexek kialakulásának. A megváltozott szubsztrátspecifitás következményeképpen a CNP-G7 szubsztrát hidrolízisének sebessége csökken, a rövidebb szubsztrátok bontásának sebessége azonban nő ( $v_{\text{CNP-G4}}/v_{\text{CNP-G7}} = 22$ ).

A V47D mutáns esetében a -7 hely gyakorlatilag megszűnik, a belső (-5 és -3) gátalhelyek azonban kötőhelyekké alakulnak. Ebben az esetben is tapasztalható a -6 hely affinitásának csökkenése és a hasítóhelyek melletti alhelyek (-2 és +2) energiájának növekedése (10. táblázat).

Az S48Y-hoz asonló hatás tapasztalható a V47K/S48G kétszeres mutáns esetében is, az alhelytérkép jelentősen megváltozott. A -6 hely szubsztrát iránti affinitása gyakorlatilag megszűnik (-1,28 kJ/mol), a -4 hely gátalhelyé alakul és a hasítóhely melletti -2 és +2 alhelyek energiája jelentősen megnő (10. táblázat). A CNP-G4 iránti nagyobb affinitást az is mutatja, hogy a CNP-G4 és CNP-G7 bontásának sebessége között igen nagy különbség tapasztalható ( $v_{\text{CNP-G4}}/v_{\text{CNP-G7}} = 35$ ).

A V47G/S48D mutáns esetében a V47G mutáció hatása feltételezhetően igen hasonló a V47A mutáció hatásához, ugyanis mind a glicin, mind az alanin rövid oldalláncú apoláris aminosavak. Az S48D mutáció hatása látszik érvényesülni, amit az S48Y mutáns alhelytérképével való nagy hasonlóság is mutat (10. táblázat). A dupla mutáns enzim esetében a különböző tagszámú szubsztrátok hasításának sebessége is változott és az S48Y mutáns esetében tapasztalható értéknek adódott ( $v_{\text{CNP-G4}}/v_{\text{CNP-G7}} = 23$ ).

A V47L/S48A mutáns esetében az egyes alhelyek energiája csak kismértékben csökkent, a kismértékű változások azonban az összenergia nagymértékű csökkenését eredményezték (-13,22 kJ/mol) a vad típushoz képest (-22,60 kJ/mol) (10. táblázat).

A V47I/S48I mutáns összenergiájának értéke -28,67 kJ/mol-ra növekedett, a legjelentősebb változás a +2 alhely affinitásának megnövekedése és a -8, -5 és -3 gátalhelyek kötőhelyé alakulása (10. táblázat).

A V47 és S48 aminosavakat érintő mutációk által okozott jelentős változások magyarázatául szolgálhat, hogy ezek az aminosavak csaknem minden glikon-kötő alhelyen részt vesznek a szubsztráttal való kölcsönhatások kialakításában. Az aktív helyen kötött szubsztrát mintegy félkör alakban veszi körül a V47 és S48 aminosavakat (Svensson és mtsai., 2002; Bak-Jensen és mtsai., 2004; Robert és mtsai., 2005) (6. ábra). Továbbá a V47 kiemelkedő szerepet tölt be a glikon-kötő alhelyeken, ugyanis az Y105 aminosavval együtt a szubsztrát aktív helyre történő belépését koordinálják (Robert és mtsai., 2005).

A jelen fejezetben bemutatott vizsgálatok során elsőként végeztük el az S48Y, V47A, V47F, V47D, V47K/S48G, V47G/S48D, V47I/S48I és V47L/S48A AMY1 mutánsok aktív helyének térképezését. Eredményeink, a korábban elvégzett előzetes kísérletek adataival együtt (Svensson és mtsai., 2002) fontos információkkal szolgálnak a szerkezet-funkció összefüggések mutagenézissel történő vizsgálatában (Mori és mtsai. beküldés előtt). Adatainkat felhasználtuk az AMY1 enzimek transzferáz aktivitásának tanulmányozása során (Mótyán és mtsai., *J. Mol. Catal., B Enzym.* folyóirathoz beküldve) és a molekuláris modellezésen alapuló számítógépes eljárás ellenőrzéséhez szükséges ellenőrző halmaz létrehozásához is (Mótyán és mtsai., 2011).

### **5.3 Vad típusú és mutáns AMY1 enzimek transzferáz aktivitásának vizsgálata**

A doktori dolgozat témájául szolgáló alhelytérképezési vizsgálatok során CNP- $\beta$ -D-MOS szubsztrátokkal meghatároztuk a W279A, W278A/Y380A, W279A/Y380A, Y380A, H395A, H395A/Y380A és Y105A/Y380M másodlagos kötőhely mutánsok (5. táblázat) és az S48Y V47A, V47F, V47D, V47G/S48D, V47K/S48G, V47L/S48A és V47I/S48I aktív hely mutánsok bontási képeit (8. táblázat).

Minden mutáns enzim megnövekedett transzferáz aktivitást mutatott a CNP-G4 szubsztráton, valamint a kisebb (CNP-G3) és a nagyobb (CNP-G5–8) tagszámú szubsztráttal végzett reakciókban is történt transzglykozilezés (6. és 9. táblázat). A korábban, más  $\alpha$ -amiláz enzimek esetében vizsgált és sikeresen alkalmazott transzfer reakciók, valamint az AMY1 transzglykozilezésre való képességére vonatkozó irodalmi és a saját vizsgálatokból származó adatok sarkalltak bennünket az AMY1 mutánsok transzferáz aktivitásának további vizsgálatára.

Az aktív helyen módosított AMY1 enzimeket ezért metil-umbelliferil csoporttal jelölt maltooligomerek transzglykozilezéssel történő szintézisére kívántuk felhasználni, továbbá az előállított molekulákat szubsztrátként alkalmazni  $\alpha$ -amilázok fluoreszcens módszerrel történő enzimkinetikai méréseiben.

Bár a másodlagos kötőhelyeken (6. táblázat) és az aktív helyen módosított enzimek (9. táblázat) esetében is tapasztaltunk megnövekedett transzferáz aktivitást, azonban a transzglykozilezés tanulmányozásához az aktív hely mutánsokat választottuk. Ezek az enzimek nemcsak nagyobb mértékű transzglykozilezést mutattak, de a vizsgált aminosavak a szubsztrátkötő árok alhelyeinek felépítésében szerepelnek. A szubsztráttal való kölcsönhatások kialakításában közvetlenül érintett aminosavak mutációját tartalmazó enzimek szignifikáns eltéréseket mutatnak a szubsztrátspecifitásban és a termékmintázatban. Ezért ezek képezhetik esetleges célpontjait a transzferáz aktivitás megnövelésére és a termékmintázat megváltoztatására irányuló vizsgálatoknak.

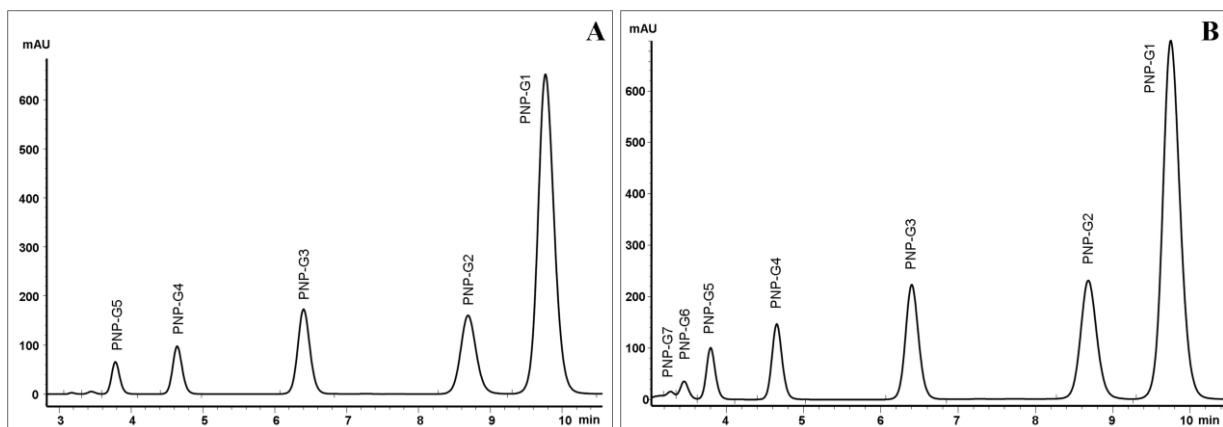
#### ***5.3.1 A szubsztrátkötő alhelyek mutációjának hatása az AMY1 transzferáz aktivitására***

A közelmúltban Kandra és munkatársai végezték el a vad típusú AMY1 és Y105A mutánsainak alhelytérképezését a Biokémiai Tanszéken (Kandra és mtsai., 2006). A bontási képek meghatározásakor a vad típusú és a mutáns enzimek esetében is tapasztaltak transzglykozilezést CNP-MOS szubsztrátokon. Az AMY1 esetében a termékek 8 %-a keletkezett transzfer reakció révén a CNP-G4 szubsztráttal végzett reakcióban, míg az Y105A megnövekedett transzferáz aktivitást mutatott ugyanezen szubsztráton (9,7 %) valamint a

hosszabb CNP-G5 szubsztrát esetében is 3 % transzfer termék szabadult fel (Mótyán és mtsai., *J. Mol. Catal., B Enzym.* folyóirathoz beküldve).

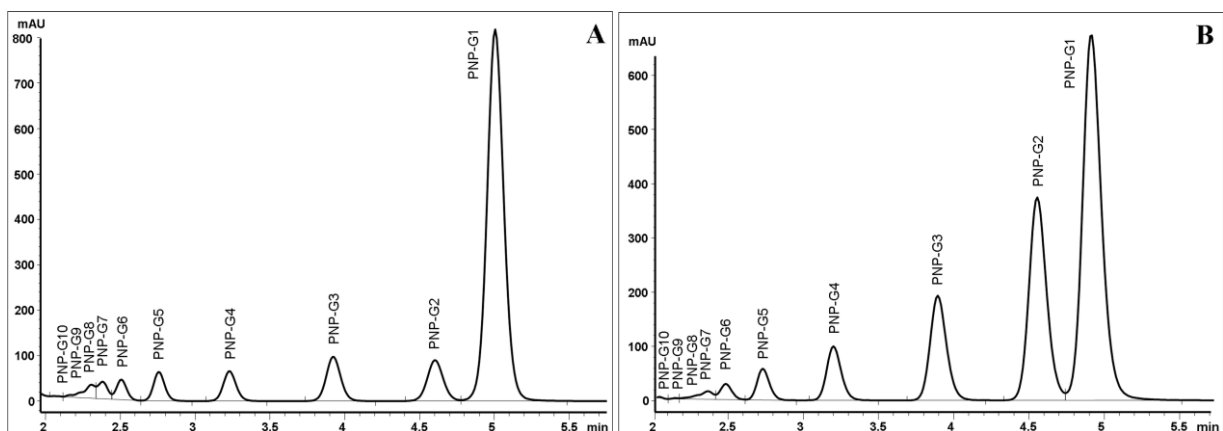
Annak érdekében, hogy megállapítsuk az AMY1 és aktív hely mutánsainak enzimátikus transzglykozilezésekben való felhasználhatóságát, a transzglykozidáz aktivitást szisztematikusan vizsgáltuk, különböző körülmények változtatásával. Az 5.3 fejezetben bemutatott vizsgálatok elvégzésében Fazekas Erika és Dr. Gyémánt Gyöngyi nyújtott segítséget. Az akceptor molekula aglikon csoportja meghatározó jelentőségű a transzferáz reakció során. Ezért a transzglykozilezésben felhasználható donor és akceptor molekulák ellenőrzése céljából végzett előzetes kísérletek során mintegy 20 különböző, kromoforcsoportot tartalmazó akceptor molekulát teszteltünk (lásd az *Anyagok és módszerek* fejezetben). Annak elkerülésére, hogy az enzim hidrolizálja ezeket a transzfer termékeket, a transzglykozilezés reakciókat az akceptor  $\leq 10$  % konverziójánál mértük. Eredményeink azt mutatták, hogy csak az ekvatoriális pozíciójú 4-OH csoportot tartalmazó molekulák alkalmasak akceptornak, az axiális pozíciójú 4-OH csoportot tartalmazó monoszacharidok (például galaktóz, fukóz, L-arabinóz) használatakor nem keletkeztek transzfer termékek. Az N-acetil-glükózamin és a glükuronsav sem bizonyult alkalmas akceptornak. Megállapítottuk, hogy az akceptor molekula anomer konfigurációja nem befolyásolja a transzfer reakciót, tehát a  $\beta$ - és az  $\alpha$ -glikozidos kötéssel kapcsolt kromofor csoportot tartalmazó glikozidok jól használhatóak akceptorként. Különböző tagszámú maltooligoszacharid donor molekulákat is teszteltünk. Az előzetes vizsgálatok során a glükóz és maltóz nem, azonban a maltotetraóz, maltopentaóz és maltoheptaóz molekulák jó donoroknak bizonyultak minden vizsgált enzim számára (AMY1, Y105A, V47F, S48Y, V47K/S48G és V47G/S48D).

A transzfer reakció további tanulmányozására a PNP- $\beta$ -D-glükopiranozidot választottuk, mint modell akceptor molekulát, maltoheptaóz donor használata mellett. Az AMY1 és az Y105A mutánssal végzett reakcióban az akceptornál (PNP-G1) nagyobb tagszámú termékek (PNP-G2–G7) keletkezését tapasztaltuk. Azonos reakciókörülmények között végzett reakcióban, 3 óra inkubálás után az AMY1 által katalizált reakció 33 %-os konverziót (11.A ábra), az Y105A 40 %-os konverziót ért el (11.B ábra). Az Y105A mutáns esetében nemcsak az akceptor konverziójának növekedését, hanem a termékmintázat megváltozását is tapasztaltuk: az AMY1-hez képest (DP2–5) (11.A ábra) a nagyobb tagszámú termékek is keletkeztek (DP2–7) (11.B ábra).



11. ábra Az AMY1 (A) és az Y105A (B) által katalizált transzglykozilezési reakció HPLC kromatogramja, PNP-G1 akceptor és G7 donor jelenlétében, 3 óra inkubálás után. ZORBAX Eclipse XDB-C18 oszlop (5  $\mu$ m, 150\*4,6 mm), izokratikus elúció: acetonitril/víz = 10-90, áramlási sebesség: 1 ml/perc, DAD: 302 nm.

A V47G/S48D mutáns alacsony hidrolitikus aktivitása (3. táblázat) ellenére jelentős transzglykozilezést tapasztaltunk. 48 óra inkubálás után a szubsztrát 55 %-os konverziója mellett kilenc különböző tagszámú transzfer termék keletkezett (DP2–10) (12. ábra).



12. ábra PNP-G1 akceptor és G7 donorral végzett transzglykozilezési reakció HPLC kromatogramja a V47G/S48D mutáns által katalizált reakcióban 24 óra (A) és 48 óra (B) inkubálást követően. ZORBAX Eclipse XDB-C18 oszlop (5  $\mu$ m, 150\*4,6 mm), izokratikus elúció: acetonitril/víz = 10-90, áramlási sebesség: 1 ml/perc, DAD: 302 nm.

Az AMY1 hosszú szubsztrátkötő árokkal rendelkezik, ami kedvez a nagyobb tagszámú szubsztrátok esetében a produktív komplexek kialakulásának. Ez a hosszabb PNP-oligomerek gyorsabb hidrolíziséhez vezet. A termékarány változását tapasztaltuk a V47G/S48D mutánssal végzett reakcióban, ahol az idő előrehaladtával a nagyobb tagszámú termékek mennyisége

csökkent és a termékek egymáshoz viszonyított aránya is megváltozott 24 (12.A ábra) és 48 óra inkubálást követően (12.B ábra). A hosszabb transzfer termékek hidrolízissel történő átalakítását a kromatogramok csúcs alatti területeinek csökkenése is mutatja (12. ábra).

### **5.3.2 Enzimatis transzglykozilezés a V47F AMY1 enzimmel - a reakciókörülmények optimalizálása**

A metil-umbelliferil csoportot tartalmazó maltooligoszacharidok potenciálisan jó szubsztrájai az  $\alpha$ -amiláz enzimeknek (Winn-Deen és mtsai., 1988). A fluorogén szubsztrátok elérhetősége azonban korlátozott, kereskedelmi forgalomban csak a MU- $\alpha$ - és  $\beta$ -D-glükopiranozid kapható (www.sigmaaldrich.com). Az  $\alpha$ -amilázok MU-oligomer szubsztrátokkal történő aktivitásmérése ezért a 4-metil-umbelliferil-maltooligomerek (MU- $\alpha$ -D-MOS) előállítását teszi szükségessé. A fluorimetriás aktivitásmérési eljárás az egyes enzimek alhelytérképei alapján kiválasztott szubsztrátok használatán alapul. Az enzim a megfelelő tagszámú MU- $\alpha$ -D-MOS szubsztrátot olyan módon köti, hogy a szubsztrát metil-umbelliferil csoportját rögzítő  $\alpha$ -glikozidos kötés a hasítóhely felett helyezkedik el. Ez a produktív kötőmód a fluorofor csoport lehasadását eredményezi és a keletkező MU csoport koncentrációja fluorimetriásan mérhető és arányos az enzim aktivitásával. A MU- $\alpha$ -D-MOS szubsztrátok szintéziséhez azonban szükség volt a transzferáz reakció paramétereinek optimalizálására.

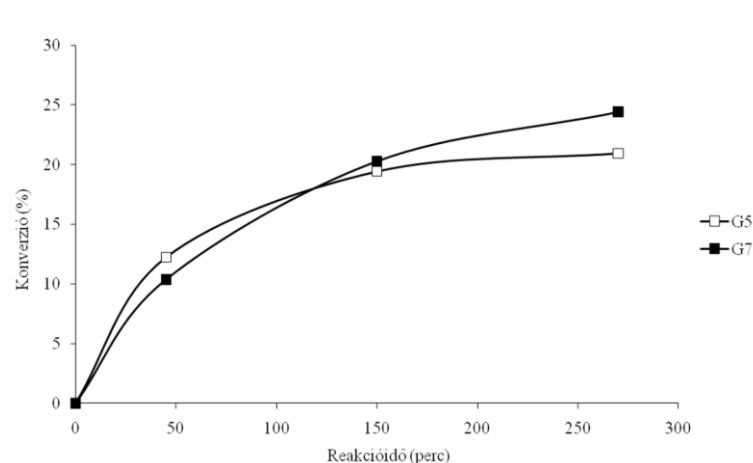
A transzglykozilezés vizsgálatokor a MU- $\alpha$ -D-G1 és a MU- $\beta$ -D-G1 molekulák egyaránt megfelelő akceptoroknak bizonyultak. A szintézis reakció körülményeinek optimalizálásához a MU- $\beta$ -D-G1 akceptort választottuk, mivel az  $\alpha$ -amilázok nem képesek a  $\beta$ -glikozidos kötés hidrolízisére, ezáltal elkerülhető a fluorofor csoport lehasadása és biztosítható a redukáló végen fluorofor csoportot tartalmazó termékek azonosítása.

A bontási képek elkészítésekor a CNP- $\beta$ -D-MOS szubsztrátokkal végzett hidrolitikus reakciókban a mutáns enzimek transzferáz aktivitásának nagymértékű növekedését tapasztaltunk a vad típusú enzimhez képest (9. táblázat), azonban a transzferáz reakciók tanulmányozásakor, a megfelelő akceptor molekula jelenlétében nem tapasztaltunk ugyanilyen mértékű különbségeket az enzimek között. Ennek magyarázatául szolgálhat, hogy a bontási képek meghatározásakor a termékek másodlagos támadásának elkerülésére a bontási képeket a reakció kezdeti szakaszában, a szubsztrát  $\leq 10$  % konverziója mellett határoztuk meg. Ezzel ellentétben, az akceptor és donor molekulák nagy feleslegének jelenlétében végzett transzglykozilezési reakciók során a minél nagyobb konverzió elérése volt a cél. A szubsztrát

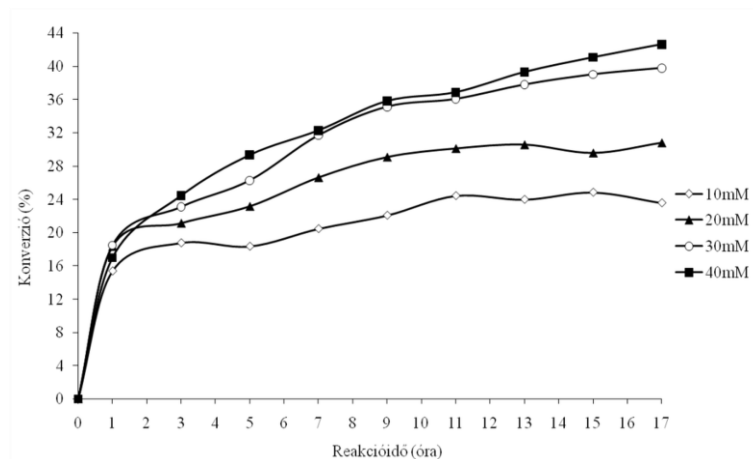
alacsony és az akceptor nagyobb konverziója mellett vizsgált reakcióban tehát nem mutatkoztak a korábban tapasztalt különbségek.

Az enzimátikus szintézist a V47F AMY1 mutáns által katalizált transzglykozilezés reakcióval kívántuk elvégezni.

A MU- $\beta$ -D-G1 akceptort különböző koncentrációkban teszteltük (4, 8, 12 és 15 mM). A várakozásoknak megfelelően az akceptor mennyiségének növelésével nőtt a transzglykozilezéssel keletkezett termékek mennyisége is, így a további kísérletekben 15 mM koncentrációban használtuk az akceptort. Különböző donor molekulákat is teszteltünk. Az enzim természetes szubsztrátjának, a keményítő használatával csak 0,7 %-os konverziót sikerült elérni, 7,5 óra inkubálás után. A keményítő hidrolízisének, azaz az enzim számára donorként használható oligomerek keletkezésének sebessége igen alacsonynak bizonyult. Ezért a keményítőt feltehetően csak megfelelő előemésztés alkalmazása mellett lehetne donorként használni a csökkent hidrolitikus aktivitást mutató enzimek által katalizált reakcióban. A transzfer reakció sebességének növelése érdekében különböző maltooligoszacharid donor molekulákat is teszteltünk. Mind a maltopentaóz, mind a maltoheptaóz donorok használható molekuláknak bizonyultak. A transzglykozilezés során mindkét donorral hasonló mértékű konverziót ért el a reakció (13. ábra).



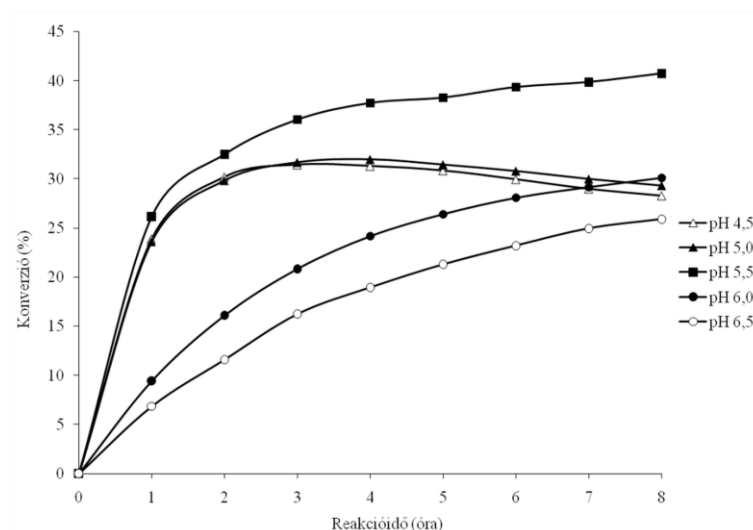
13. ábra A G5 és G7 donorokkal végzett transzferáz reakcióban elért konverzió.



14. ábra A G7 donor koncentráció változtatásának hatása a MU-β-D-G1 akceptor konverziójára (%) a V47F AMY1 által katalizált transzglykozilezés reakcióban.

A várakozásoknak megfelelően a G7 koncentráció emelése megnövelte a konverzió értékét, azaz a transzglykozilezéssel keletkezett termékek mennyiségét (14. ábra). A G7 nagy mennyiségben állt rendelkezésre, ezért ezt használtuk donorként a további kísérletek során.

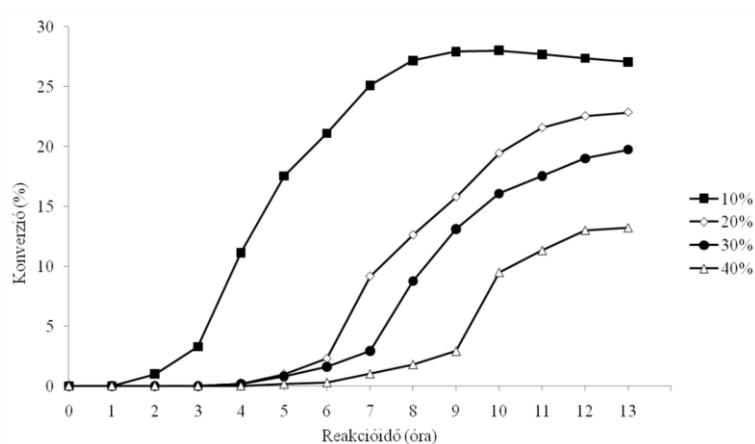
A pH transzglykozilezési reakcióra gyakorolt hatását 4,5 és 6,5 közötti pH tartományban vizsgáltuk. A legnagyobb konverziót az 5,5 pH-jú pufferben végzett reakció érte el, ami arra utal, hogy a hidrolitikus és a transzferáz reakció pH optimuma megegyezik (15. ábra).



15. ábra A puffer pH változtatásának hatása a konverzióra a V47F által katalizált reakcióban, G7 donor és MU-β-D-G1 akceptor használata mellett.

Az optimalizáláshoz használt MU-β-D-G1 akceptortól eltérően a preparatív méretű szintézishez használni kívánt MU-α-D-G1 csak DMSO jelenlétében oldódik. Ezért vizsgáltuk,

hogy milyen hatást gyakorol a puffer DMSO tartalmának változtatása az akceptor konverziójára. Azt tapasztaltuk, hogy a puffer DMSO koncentrációjának növelésével csökken a transzfer reakció sebessége. A vizsgált reakciók közül a legmagasabb konverziót (28 %) a legkisebb DMSO koncentráció mellett végzett reakció érte el, ezért a preparatív reakció során 10 % DMSO-t tartalmazó puffert használtunk (16. ábra).



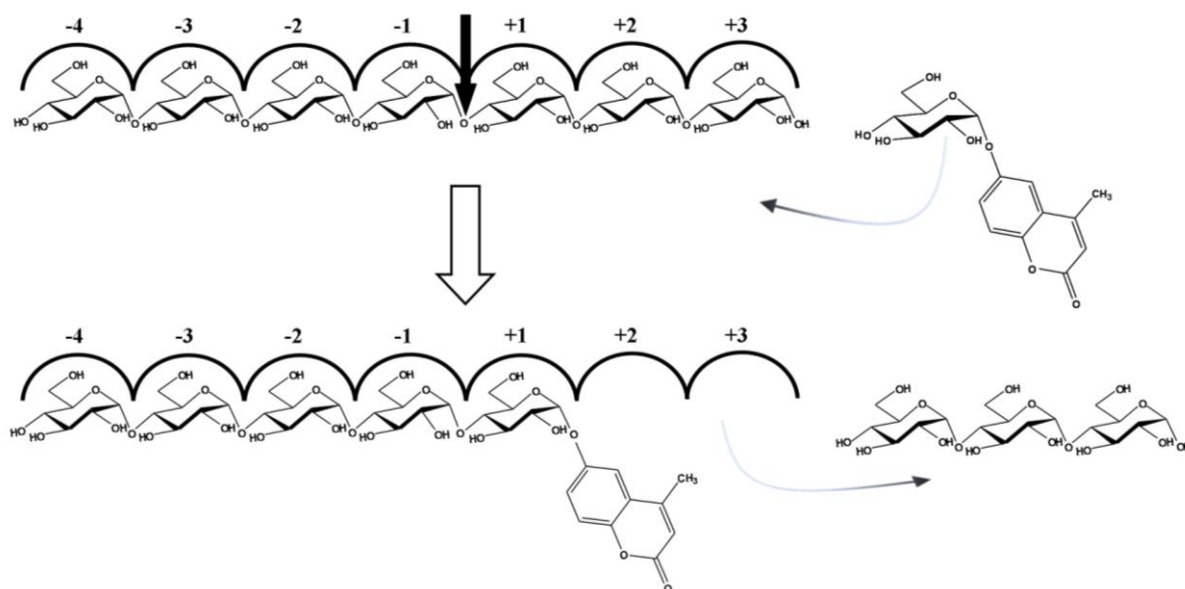
16. ábra A DMSO koncentráció változtatásának hatása a konverzióra a V47F AMY1 által katalizált reakcióban, G7 donor és MU-β-D-G1 akceptor jelenlétében.

A transzferáz reakció optimális körülményeinek megállapítása mellett szükség volt az enzim régió- és sztereospecifitásának ellenőrzésére is. A transzglykozilezéssel előállított MU-β-D-MOS oligomerek anomer konfigurációjának és az interglikozidos kötések típusának azonosítása egy- és kétdimenziós  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spektroszkópiával történt. Az NMR spektrumok elkészítését és az adatok kiértékelését Prof. Batta Gyula végezte el. A MU-β-D-G2 1D  $^1\text{H}$  NMR spektrumában megjelenő dublett 7,9 Hz csatolási állandója β-glikozidos kötésre utal, míg a 3,7 Hz  $^3J_{1,2}$  csatolási állandó az újonnan képződött glikozidos kötés α konfigurációját igazolja a glükóz egységek között. Ezt támasztja alá az atomok kémiai eltolódásának mértéke is, mely a C-4 atomok esetében adódott a legnagyobb értéknek (76,51 ppm) a szénvázon belül. A gyűrűk kapcsolódásának megállapítása, azaz az interglikozidos kötésben részt vevő hidrogének (H1' és H3 és H4) téren át ható kölcsönhatásainak vizsgálata a ROESY („Rotating Frame Overhouse Effect Spectroscopy”) spektrum segítségével történt. A MU-β-D-G3-ban mindkét α-anomer proton dublettnak adódott, azonos  $^3J_{1,2} = 3,9$  Hz csatolási állandóval. A  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumban a C4 és C4' szénatomok eltolódásának értékei 76,72 és 77,04 ppm értékeknek adódtak. Az interglikozidos kötések jelenlétét HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) spektrum is igazolta.

Az NMR vizsgálatok segítségével sikerült igazolni, hogy a szintézissel előállított termékek  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) glikozidos kötéssel kapcsolt glükóz egységeket tartalmaznak, tehát a módosított AMY1 enzim a mutációt követően is megőrizte sztereo- és régiószелеktivitását.

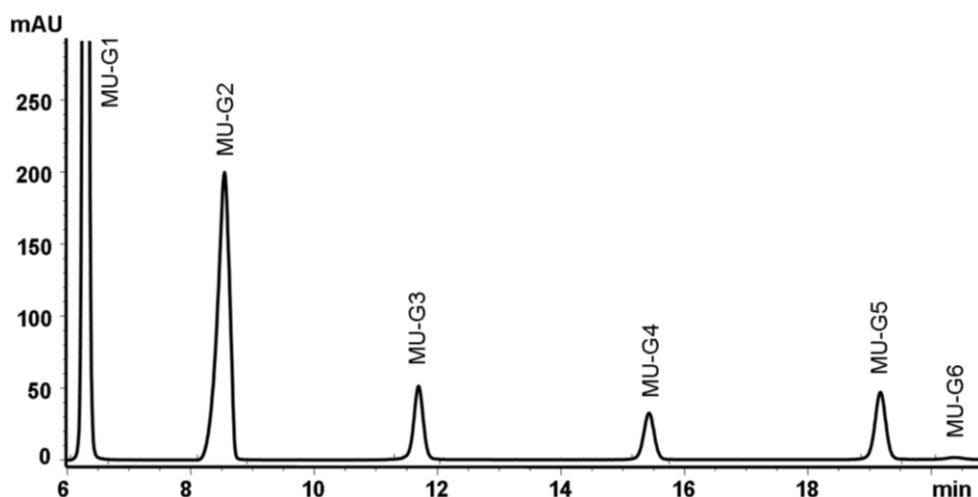
### 5.3.3 Enzimatis transzglykozilezés a V47F AMY1 enzimmal - a preparatív méretű szintézis

A reakciókörülmények optimalizálását követően elvégeztük a MU- $\alpha$ -D-MOS molekulák preparatív méretű szintézisét V47F AMY1 által katalizált transzglykozilezéssel, MU- $\alpha$ -D-G1 akceptor és G7 donor felhasználásával (17. ábra).



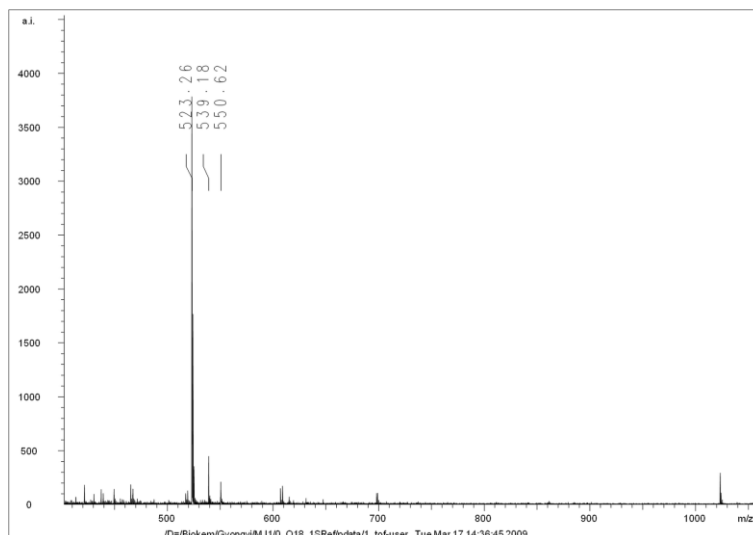
17. ábra A transzglykozilezés sémája.

A transzferáz reakciót 12 óra inkubálás után, az akceptor 37,5 %-os konverziója mellett állítottuk le azért, hogy a nagyobb tagszámú termékek másodlagos támadását elkerüljük, és így megakadályozzuk a hosszabb oligomerek mennyiségének csökkenését. A 2–6 tagszámú MU- $\alpha$ -D-MOS termékeket HPLC segítségével választottuk el és tisztítottuk (18. ábra).



18. ábra A preparatív méretű enzimátikus transzglykozilezés reakció során keletkezett MU- $\alpha$ -D-MOS termékek HPLC kromatogramja. YMC-Pack Polyamine II. oszlop (5  $\mu$ m, 250\*4,6 mm), gradiens elúció: acetonitril/víz = 0–15 perc 70-30  $\rightarrow$  60-40, áramlási sebesség: 3 ml/perc, DAD: 317 nm.

A szintézis reakció eredményeként az összes termék mennyiségének 64,1 %-át a MU- $\alpha$ -D-G2 adta, a MU- $\alpha$ -D-G3 12,9 %, a MU- $\alpha$ -D-G4 9,0 % és a MU- $\alpha$ -D-G5 13,4 %-ban keletkezett. Fő terméként a MU- $\alpha$ -D-G2 szabadult fel, mely feltehetően a transzferáz reakció mellett a hosszabb transzfer termékek másodlagos támadása révén hidrolízissel is keletkezett. A legnagyobb tagszámú termék (MU- $\alpha$ -D-G6) csak nyomnyi mennyiségben volt jelen a termékek között (0,6 %). A 2–5 tagszámú MU-glükozidokat a MALDI-TOF MS spektrum alapján meghatározott  $[M+Na]^+$  molekulatömegek segítségével sikeresen azonosítottuk a MU- $\alpha$ -D-G5 számított (1009,23 Da) és mért (1009,30 Da), a MU- $\alpha$ -D-G3 számított (685,19 Da) és mért (685,12 Da) valamint a MU- $\alpha$ -D-G2 számított (523,31 Da) és mért (523,14 Da) molekulatömeg értékei alapján (19. ábra). Az enzimátikus szintézis reakció eredményeként a 2–5 tagszámú MU- $\alpha$ -D-maltooligoszacharidok tiszta frakcióit sikerült előállítani.

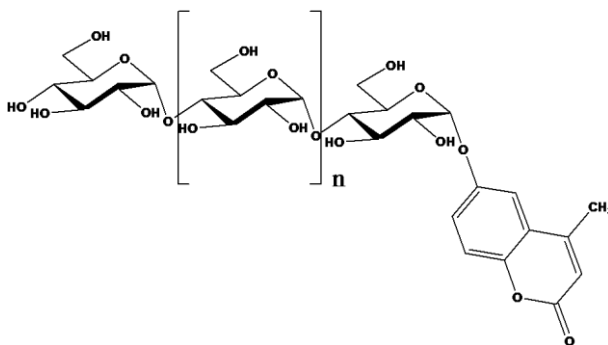


19. ábra A MU- $\alpha$ -D-G2 MALDI-TOF MS spektruma.

### 5.3.4 Kinetikai mérések fluoreszcens MU- $\alpha$ -D-MOS szubsztrátokkal

Az enzimátikus transzglykozilezéssel előállított fluorogén szubsztrátokat (20. ábra)  $\alpha$ -amilázok aktivitásméréséhez használtuk fel.

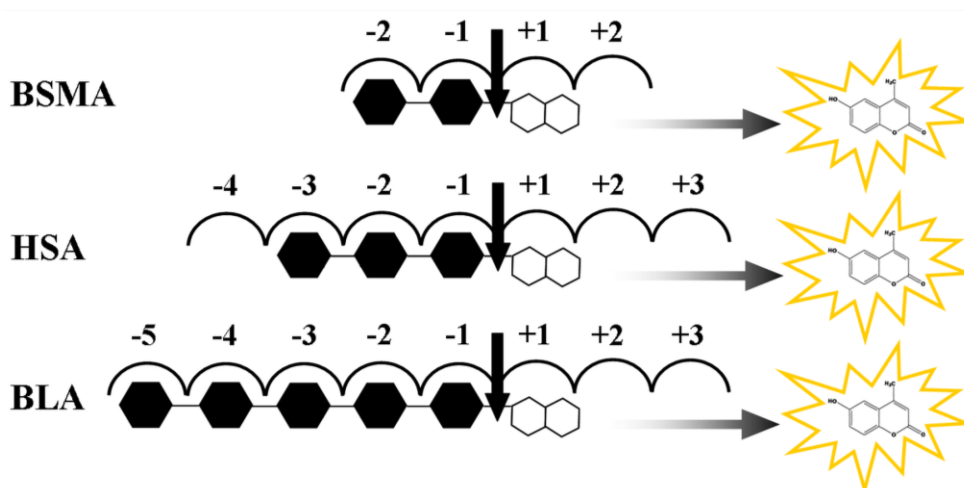
A BSMA, HSA és a BLA  $\alpha$ -amilázok aktivitásméréseihez szükséges megfelelő tagszámú szubsztrátokat az enzimek alhelytérképei alapján választottuk ki (21. ábra). A BLA 5 glikon és 3 aglikon kötőhellyel rendelkezik, melyeket gátal helyek követnek (Kandra és mtsai., 2002b).



20. ábra A MU- $\alpha$ -D-MOS szubsztrátok szerkezete.

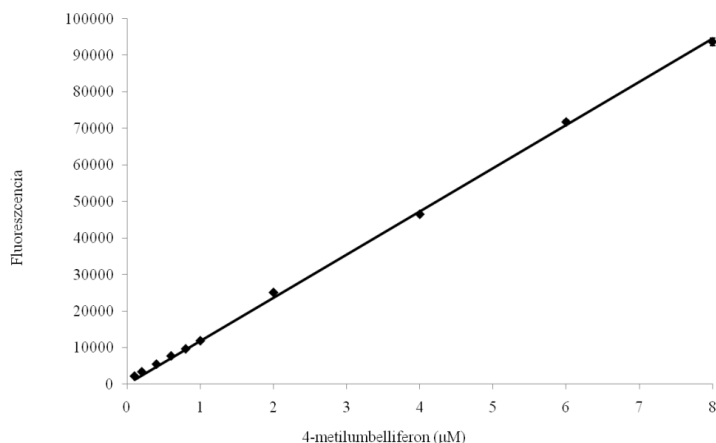
A HSA aktív helye 4 glikon és 3 aglikon alhelyből áll (Kandra és mtsai., 2003). A BSMA a 4 alhelyből álló modell szerint 2 glikon és 2 aglikon kötőhelyet tartalmaz (Remenyik és mtsai. nem publikált eredmény) (21. ábra). A szubsztrátok bekötődését az aktív hely nagy energiájú alhelyei koordinálják, így a MU- $\alpha$ -D-G5 szubsztrát a -5 és +1 alhelyek között kötődik a BLA szubsztrátkötő helyére.

A MU- $\alpha$ -D-G3 szubsztrát a HSA -3 és +1 alhelyei között kötődik, a BSMA esetében a MU- $\alpha$ -D-G2 szubsztrát a -2 és +1 alhelyek között helyezkedik el a fluorofor csoport lehasadását eredményező kötőmódban (21. ábra). Annak érdekében, hogy a HSA esetében megnöveljük a MU-G3 szubsztrát hidrolízisének, azaz a metil-umbelliferil csoport felszabadulásának sebességét, a MES pufferhez nátrium-azidot (NaN<sub>3</sub>) adtunk. Korábbi kutatások során ugyanis azt tapasztalták, hogy a HSA-val és HPA-val végzett reakcióban is megnövekedett a CNP-G3 és PNP-G3 szubsztrátok hidrolízisének sebessége NaN<sub>3</sub> jelenlétében (Winn-Deen és mtsai., 1988). A nátrium-azid a katalitikus aminosavak közvetlen környezetében, a +1 és +2 alhelyeken kötődik, azonban nem ismert, hogy pontosan milyen folyamatok vezetnek a reakciósebesség megnövekedéséhez (Maurus és mtsai., 2008).



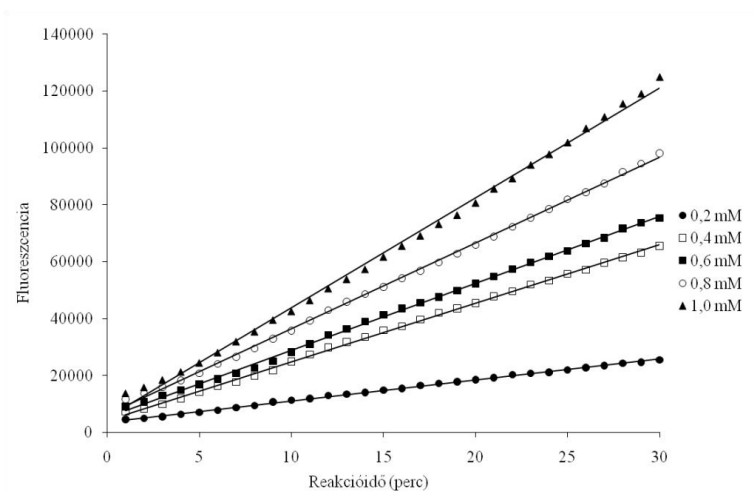
21. ábra A MU- $\alpha$ -D-G2, MU- $\alpha$ -D-G3 és MU- $\alpha$ -D-G5 szubsztrátok kötődése az aktív helyre a BSMA, HSA és BLA esetében. A hasítás helyét nyíl jelöli, a fekete hatszögek a szubsztrát glükóz egységeit szimbolizálják, a felszabaduló MU csoport sárga keretben van.

A fluorimetriás méréshez szükséges kalibrációt 4-metil-umbelliferonnal végeztük 0,1–250  $\mu$ M koncentrációtartományban. A mérhető fluoreszcens jel nagysága és a metil-umbelliferil koncentrációja közötti erős korreláció ( $r^2 = 0,999$ ) alapján megállapítottuk, hogy a módszer alkalmas a MU- $\alpha$ -D-MOS szubsztrátok hidrolízisével felszabadított fluorofor csoport mennyiségének meghatározására (22. ábra).



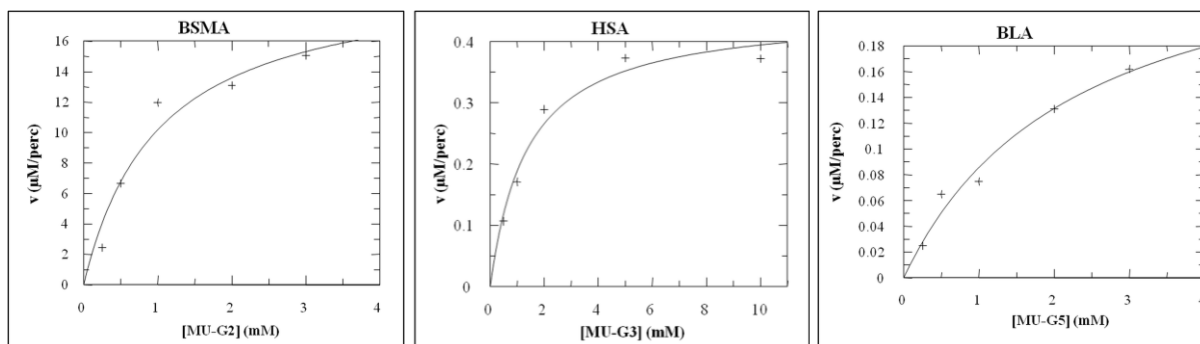
22. ábra A fluoreszcencia változása a 4-metil-umbelliferon koncentráció függvényében.

HPLC módszer segítségével megállapítottuk, hogy az enzimek csak a MU csoportot hasítják le a szubsztrátról, és a MU-glükozid szubsztrát kromatográfias csúcsának csökkenése mellett nem észlelhető más termék felszabadulása. Minden enzim esetében különböző szubsztrátkoncentrációk mellett mértük a szubsztrátok hidrolízise révén felszabaduló metil-umbelliferon mennyiségét, ami arányos volt a szubsztrát koncentrációjával (23. ábra).



23. ábra A fluoreszcencia változása az idő függvényében, a HSA által katalizált reakcióban MU- $\alpha$ -D-G3 akceptor jelenlétében, különböző szubsztrátkoncentrációk esetében.

A kezdeti sebességek megállapításához a pontokra illesztett regressziós egyenesek meredekség értékeit használtuk fel. A  $K_M$  és  $v_{max}$  értékeket a Michaelis-Menten kinetika alapján nem-lineáris regresszióval határoztuk meg, és meghatároztuk a  $k_{cat}$  és  $k_{cat}/K_M$  kinetikai paramétereket (24. ábra).



Enzim	Szubsztrát	$K_M$ (mM)	$k_{cat}$ (perc <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_M$ ( $\mu M^{-1}perc^{-1}$ )
BSMA	MU- $\alpha$ -D-G2	1,012	80,9	0,080
HSA	MU- $\alpha$ -D-G3	1,373	111,3	0,081
BLA	MU- $\alpha$ -D-G5	2,294	32,8	0,014

24. ábra A BSMA, a HSA és a BLA enzimkinetikai paramétereit és meghatározásukat Michaelis-Menten kinetika alapján, nem lineáris regresszióval.

Az elvégzett alhelytérképezési vizsgálatok során az AMY1 mutánsok bontási képeinek meghatározásakor a transzglykozilálással keletkezett termékek mennyiségének növekedését tapasztaltuk a vad típusú enzimhez viszonyítva. Elsőként vizsgáltuk részletesen az AMY1 transzglykozidáz aktivitását és elsőként végeztünk módosított AMY1 enzim által katalizált kemoenzimatikus szintézis reakciót. A MU-maltooligoszacharidok nem kaphatóak kereskedelmi forgalomban, ezért a bemutatott eljárás alkalmazható lehet ezen molekulák előállítására és megoldást jelenthet elérhetőségükre. Sikeresen használtuk a MU- $\alpha$ -D-MOS szubsztrátokat különböző eredetű  $\alpha$ -amilázok enzimkinetikai paramétereinek meghatározásához. A fluoreszcens módszer nagyszámú minta egyszerű és gyors vizsgálatát teszi lehetővé és széles körben alkalmazható lehet  $\alpha$ -amiláz enzimek fluorimetriás aktivitásméréséhez. A jelen fejezetben bemutatott eredményeket összefoglaló közlemény jelenleg elbírálás előtt áll a 2010.12.09-i beküldést követően (Mótyán és mtsai., *J. Mol. Catal., B Enzym.* folyóirathoz beküldve).

## **5.4 $\alpha$ -Amiláz enzimek alhelytérképezése molekuláris modellezéssel**

A jelen fejezetben bemutatott munka során célunk volt egy olyan számítógépes eljárás kidolgozása, mely az általunk is használt kísérletes alhelytérképezési vizsgálatok támogatása révén segíthet bennünket az  $\alpha$ -amilázok szerkezet-funkció összefüggéseinek megértésében.

Munkahipotézisünk szerint az enzim-szubsztrát kölcsönhatások kvantitatív módon meghatározhatóak az enzim-szubsztrát komplexek homológ modelljeinek felhasználásával. Az alhelyek szubsztrátkötési energiái egyszerű molekulamechanikai számításokkal megjósolhatóak a Sybyl programmal számolt enzim-szubsztrát kölcsönhatási energiákból. A bontási képek, azaz az alhelytérképezés elsődleges kísérletes adatai a SUMA program segítségével határozhatóak meg. Az molekuláris modellezésen alapuló számítógépes eljárás kidolgozását, a tanító és ellenőrző halmazok létrehozását, a programok megírását és az adatok kiértékelését Dr. Bagossi Péterrel végeztem.

### **5.4.1 A tanító és az ellenőrző halmazok létrehozása**

A molekuláris modellezéssel történő alhelytérképezésen alapuló számítógépes eljárás kidolgozásához és ellenőrzéséhez két halmazt hoztunk létre. A tanító halmazba („training set”) az irodalmi adatok alapján rendelkezésre álló bontási képeket és az alhelytérképek kötési energia értékeit gyűjtöttük össze, melyeket a számítási paraméterek optimalizálásához használtunk. Az ellenőrző halmazt („test set”) a számítógépes módszer ellenőrzésére olyan értékek felhasználásával hoztuk létre, melyeket a kísérletes alhelytérképezés módszerével határoztunk meg (Mótyán és mtsai., 2011).

#### **5.4.1.1 A tanító halmaz**

A tanító halmazba olyan enzimek adatait csoportosítottuk, melyek esetében rendelkezésre álltak mind kristályszerkezeti adatok, mind a kísérletesen meghatározott bontási képek és az ezekből számított alhelytérképek.

Egyes enzimek esetében nem teljesült mindkét feltétel, így ezeket nem tudtuk felhasználni az eljárás kidolgozásához. A rizs (*Oryza sativa*)  $\alpha$ -amilázának a bontási képét (Terashima és mtsai., 1996) és alhelytérképét (Gyémánt és mtsai., 2002) korábban meghatározták, azonban az enzim-szubsztrát komplexről készült kristályszerkezeti adatok hiányában nem volt, és napjainkig sincs lehetőség a molekuláris modellezéssel történő alhelytérképezésre. További példaként említhető a BSMA, melynek bontási képét és alhelytérképét még nem publikálták (Remenyik és mtsai. nem publikált eredmény), viszont a

PDB adatbázisban elérhető az enzim akarbózzal kristályosított szerkezete (PDB kód: 1QHO) (Dauter és mtsai., 1999). A BLA esetében bár rendelkezésünkre álltak az alhelytérkép adatok (Kandra és mtsai., 2002b), azonban az adatbázisban elérhető BLA/BAA kiméra  $\alpha$ -amilázzal készült kristályszerkezeti adatok (Brzozowski és mtsai., 2000) nem tették lehetővé megbízható modell felépítését. A HPA esetében a kristályszerkezeti adatok (PDB kód: 2QV4) (Maurus és mtsai., 2008) rendelkezésre álltak, és bár végeztek is az aktív centrum térképezésére irányuló vizsgálatokat (Brayer és mtsai., 2000), azonban a megbízható alhelytérkép elkészítésére alkalmas bontási kép adatok hiányában nem volt lehetőség a tanító halmazba történő felvételre.

A tanító halmazt a BAA, TAA, AMY1 és AMY2, PPA és HSA vad típusú  $\alpha$ -amiláz enzimek és mutánsaik adatait tartalmazza. Ezen enzimek mindegyike megfelelt a halmazba kerülésnek támasztott feltételeknek, tehát a megfelelő kristályszerkezeti adatok és a kísérletesen meghatározott bontási képek birtokában felhasználhattuk a számítógépes eljárás kidolgozásához. A halmazokon belül a vad típusú enzimeken alapuló osztályozás szerint olyan csoportokat hoztunk létre, melyekbe az adott vad típusú enzim és annak mutánsai tartoznak. Így a vad típusú enzimek mellett a HSA csoportba az Y151M és W58L mutánsok, az AMY1 csoportba az Y105A, Y105F, Y105W, T212Y és Y105A/T212Y mutánsok is beletartoznak.

A tanító halmazba összegyűjtött bontási képeket CNP- $\beta$ -D-MOS és/vagy kromofor csoportot nem tartalmazó maltooligoszacharid szubsztrátsorozat használatával határozták meg. A CNP- $\beta$ -D-MOS és MOS szubsztrátokkal készült bontási képek egyaránt jól használhatónak bizonyultak a modell felépítése során. A különböző bontási képek összehasonlítása során megerősítést nyert az a korábbi megállapítás, mely szerint a CNP- $\beta$ -D-MOS szubsztrátok esetében a redukáló végi CNP csoport jelenléte nem befolyásolja a bontási képeket és így a számolt alhelytérképek energiáit sem (Gyémánt és mtsai., 2002).

Az enzim-szubsztrát komplexek modelljeinek felépítése során a kiindulási kristályszerkezetek nem tették lehetővé minden esetben olyan tagszámú maltooligomer szubsztrát felépítését, hogy a publikált alhelymodellekkel megegyező számú helyre tudjunk kötési energiákat számolni. Ezért az eljárás egységesítése végett a publikált bontási képekből újraszámoltuk az alhelytérképeket a SUMA program segítségével, és ezeket a publikált energiaértékkel hasonlítottuk össze. Az eljárást a HSA tanító csoport példáján mutatom be. A publikált alhelytérképek a HSA és W58L mutánsa (Ramasubbu és mtsai., 2004) valamint az Y151M mutáns (Kandra és mtsai., 2003) esetében 8 helyből álló modellnek felelnek meg, mely 5 glikon és 3 aglikon-kötő hely energiáit tartalmazza. A HSA esetében a kristályszerkezeti adatok alapján azonban csak 7 glükóz egységből álló szubsztrátmolekula felépítése volt lehetséges, ami 4 glikon és 3 aglikon-kötő helyet tartalmazó alhelymodell energiáinak

számítását tette lehetővé. A vad típusú enzim esetében a -5 hely kötési energiája igen alacsony érték (0,65 kJ/mol) így gyakorlatilag nem minősül kötőhelynek (Ramasubbu és mtsai., 2004) és esetünkben elhagyható az alhelymodellből. Az egyszerűsített, 7 helyből álló és a -5 hely energiáját mellőző alhelymodellre számolt  $E_{SUMA}$  értékek csak igen csekély mértékű változást mutatnak a publikált értékekhez képest. Az eredeti és az újraszámolt energiaértékek közötti lineáris regressziós analízis eredményeként nagyon jó korrelációt kaptunk ( $r^2 = 0,986$ ) (11. táblázat). Ehhez a módszerhez hasonlóan, az összes vad típusú és mutáns enzim esetében elvégeztük az alhelytérképek újraszámolását, a lineáris regressziós analízis eredményeként minden esetben jó korrelációt kaptunk (11. táblázat). A tanító halmaz 13 vad típusú és mutáns enzim összesen 97 alhelykötési energiáját tartalmazza (12. táblázat).

*11. táblázat A publikált és az újraszámolt alhelymodellek összehasonlítása a vizsgált vad típusú enzimek esetében.*

Enzim	Alhely modell		korrelációs koefficiens ( $r^2$ )	Hivatkozás
	eredeti	doktori		
HSA	-5 ... +3	-4 ... +3	0,986	(Ramasubbu és mtsai., 2004) (Kandra és mtsai., 2003)
PPA	-4 ... +3	-4 ... +3	0,942	(Gyémánt és mtsai., 2002)
AMY1	-8 ... +4	-7 ... +4	0,994	(Kandra és mtsai., 2006)
AMY2	-8 ... +4	-7 ... +4	0,999	(Kandra és mtsai., 2006)
TAA	-3 ... +5	-3 ... +5	--- *	(Allen és mtsai., 1976a)
BAA	-6 ... +4	-7 ... +3	0,996	(Allen és mtsai., 1976a)

\*A publikált munkában nem szerepelnek a konkrét energiaértékek.

#### 5.4.1.2 Az ellenőrző halmaz

A számítógépes módszer ellenőrzésére használt ellenőrző halmazt az S48Y, V47A, V47D, V47F, V47I/S48I, V47K/S48G, V47G/S48D és V47L/S48A AMY1 aktív hely mutánsainak bontási kép értékeiből és alhely-kötési energiáiból hoztuk létre. Ezeknek az enzimeknek a bontási képeit CNP- $\beta$ -D-MOS szubsztrátsorozat segítségével határoztuk meg (8. táblázat). Az AMY1 tanító csoport esetében használt 11 helyből álló modellnek megfelelően a molekuláris modellezéssel történő alhely-térképezéshez szükséges kötési energiákat 7 glikon és 4 aglikon-kötő helyre számoltuk ki a bontási képekből (11. táblázat). Az ellenőrző halmaz 8 mutáns enzim összesen 73 alhelykötési energiaértékét tartalmazza (12. táblázat).

12. táblázat A vizsgált enzimek esetében számított energiaértékek (kJ/mol).

Enzim		Energia	Alhelyek											Halmaz	
			-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	+1	+2	+3	+4		+5
PPA	vad típus	E <sub>SUMA</sub>				-0,86	-14,00	-19,99			-15,48	-0,04			Tantó
		E <sub>Transf.</sub>				-1,66	-10,66	-19,54			-19,03	0,53			
AMY2	vad típus	E <sub>SUMA</sub>	-3,21	-8,39	1,31	-2,07	1,51	-5,69			-3,53	1,33	0,25		
		E <sub>Transf.</sub>	-3,00	-8,57	-1,23	-0,37	3,27	-4,80			-5,84	1,41	0,66		
BAA	vad típus	E <sub>SUMA</sub>	-3,99	-8,13	-13,21	-4,12	-7,57	-13,15			-10,68	-7,48			
		E <sub>Transf.</sub>	-1,29	-7,68	-13,56	-7,08	-8,05	-12,54			-11,37	-6,76			
TAA	vad típus	E <sub>SUMA</sub>					-1,62	-19,99			-10,57	-4,9	2,26	-3,36	
		E <sub>Transf.</sub>					0,43	-20,79			-8,14	-4,19	2,59	-8,09	
HSA	vad típus	E <sub>SUMA</sub>				-1,90	-6,74	-9,04			-12,25	-1,72			
		E <sub>Transf.</sub>				-0,77	-2,74	-7,75			-7,10	-0,68			
	W58L	E <sub>SUMA</sub>				-0,08	-2,10	-5,72			-6,15	-0,81			
		E <sub>Transf.</sub>				-0,74	-3,26	-7,14			-6,29	-0,14			
	Y151M	E <sub>SUMA</sub>				-1,56	-6,51	-6,03			-2,99	-0,11			
		E <sub>Transf.</sub>				2,36	-5,54	-7,45			-3,82	0,42			
AMY1	vad típus	E <sub>SUMA</sub>	-4,24	-12,47	0,65	-1,30	0,92	-7,23			-2,86	1,99	0,59		
		E <sub>Transf.</sub>	-3,63	-9,53	-0,47	-3,09	1,76	-8,56			-5,12	2,58	0,77		
	Y105A	E <sub>SUMA</sub>	-4,06	-5,89	-0,11	-1,63	-0,05	-8,89			-5,27	1,72	0,43		
		E <sub>Transf.</sub>	-3,30	-5,09	2,92	-3,65	1,69	-8,08			-5,88	2,50	0,65		
	Y105F	E <sub>SUMA</sub>	-4,06	-13,59	0,75	-2,19	-0,25	-7,72			-4,07	0,91	0,01		
		E <sub>Transf.</sub>	-3,24	-9,29	0,16	-3,15	1,69	-8,36			-5,84	1,96	0,91		
	Y105W	E <sub>SUMA</sub>	-4,38	-10,84	0,74	-1,44	0,32	-7,06			-3,08	1,33	0,08		
		E <sub>Transf.</sub>	-3,95	-10,85	0,84	-2,00	1,69	-8,12			-5,63	2,73	0,68		
	T212Y	E <sub>SUMA</sub>	-4,05	-10,06	-1,40	-2,31	0,22	-4,72			-4,24	0,48	-0,20		
		E <sub>Transf.</sub>	-3,50	-9,44	-0,31	-2,24	1,58	-8,67			-8,54	1,72	-1,88		
	Y105A/ T212Y	E <sub>SUMA</sub>	-3,22	-5,49	-0,82	-1,70	0,75	-4,37			-6,85	1,94	0,00		
		E <sub>Transf.</sub>	-3,41	-5,26	2,40	-3,23	1,90	-8,49			-8,64	1,42	-0,34		
	S48Y	E <sub>SUMA</sub>	-2,41	-1,07	0,4	1,37	0,77	-8,16			-7,32	2,36	0,09		
		E <sub>Transf.</sub>	-4,50	-7,56	-0,82	-1,28	3,06	-10,71			-6,96	1,67	-0,62		
	V47A	E <sub>SUMA</sub>	-3,07	-9,49	1,98	-1	1,2	-5,05			-2,72	2,87	0,9		
		E <sub>Transf.</sub>	2,62	-6,03	0,90	1,16	1,27	-9,34			-5,37	2,26	0,70		
	V47F	E <sub>SUMA</sub>	-7,32	-4,44	0,83	-1	0,08	-9,05			-5,85	2,4	1,32		
		E <sub>Transf.</sub>	-3,69	-4,33	-2,01	-4,91	1,78	-9,44			-5,23	2,76	0,69		
	V47D	E <sub>SUMA</sub>	0,15	-7,54	-0,25	-1,86	-0,91	-8,88			-5,97	1,45	-0,35		
		E <sub>Transf.</sub>	9,71	-13,42	-9,53	-4,95	2,13	-10,52			-5,47	2,09	0,80		
V47K/ S48G	E <sub>SUMA</sub>	-2,22	-1,29	0,8	1,84	-0,91	-10,81			-8,02	1,92	0,2			
	E <sub>Transf.</sub>	-11,95	1,80	-7,00	1,71	3,18	-8,79			-5,17	2,47	0,73			
V47G/ S48D	E <sub>SUMA</sub>	-3,44	-2,53	1,63	-0,69	-0,76	-8,52			-5,93	1,76	-0,53			
	E <sub>Transf.</sub>	4,19	-7,25	1,24	1,12	7,64	-12,11			-5,44	2,31	0,81			
V47I/ S48I	E <sub>SUMA</sub>	-3,98	-10,32	-0,48	0,88	-1,07	-5,58			-6,43	2,22	1,54			
	E <sub>Transf.</sub>	-2,13	-6,01	-0,14	-1,78	3,05	-8,10			-5,60	2,51	0,37			
V47L/ S48A	E <sub>SUMA</sub>	-4,24	-8,77	0,06	-2,11	0,13	-5,94			-5,07	1,82	0,64			
	E <sub>Transf.</sub>	-1,82	-5,95	-1,57	-3,06	2,72	-8,44			-4,91	2,23	0,72			

Elvégeztük a vizsgált vad típusú enzimek modelljeinek illesztését és a szekvenciák összehasonlítását (25. ábra).

Minden, a tanító és az ellenőrző halmazba tartozó enzim a GH-13 családba sorolt  $\alpha$ -amiláz (EC 3.2.1.1), melyek azonos katalitikus mechanizmussal működnek. A szerkezet konzerváltsága képezheti az alapját annak, hogy a kidolgozott módszert széleskörben alkalmazhassuk, akár további  $\alpha$ -amiláz enzimek, akár más glikozidáz enzimek esetében.

A glikozid hidrolázok 13 családját (GH13) összefoglaló néven  $\alpha$ -amiláz családnak is nevezik (MacGregor és mtsai., 2001). Az amiláz családba tartozó enzimek több közös tulajdonsággal jellemezhetőek, melyek közül kiemelkedő jelentőségű a konzervált régiók megléte (Janeček 2002) és a katalitikus aminosavak erős konzerváltsága (Matsuura és mtsai., 1984; Machovic és mtsai., 2003; Kumar 2010). A szerkezetek nagyfokú konzerváltságát a  $(\beta/\alpha)_8$ -hordó szerkezetet alkotó  $\beta$ -redőkben található rövid konzervált szakaszok pontos illeszkedése is mutatja: (PPA számozás szerint)  $\beta$ 1-redő: 13-15;  $\beta$ 2-redő: 40-42;  $\beta$ 3-redő: 94-96;  $\beta$ 4-redő: 194-196;  $\beta$ 5-redő: 231-233;  $\beta$ 6-redő: 252-254;  $\beta$ 7-redő: 293-295;  $\beta$ 8-redő: 335-337 (Pujadas és mtsai., 2001) (25. ábra). Az  $\alpha$ -amilázok aktív helyét a  $(\beta/\alpha)_8$ -hordó szerkezet  $\beta$ -redőinek karboxi-terminálisait az  $\alpha$ -hélixekkel összekötő hurokrégiói alkotják, itt helyezkednek el az  $\alpha$ -amiláz családot jellemző konzervált régiók. A 7 konzervált régió (I–VII.) a  $\beta$ 2 (VI.),  $\beta$ 3 (I.),  $\beta$ 4 (II.),  $\beta$ 5 (III.),  $\beta$ 7 (IV.) és  $\beta$ 8 (VII.) redőkön, valamint a B domén C-terminális hurokrégiójában (V.) helyezkedik el (Janeček és mtsai., 1999; Janeček 2002) (25. ábra). Az V. konzervált régió fontos  $\text{Ca}^{2+}$  kötő helyet tartalmaz (Janeček 1992) és szekvenciája egyfajta ujjlenyomatként használható az amiláz családon belüli különböző specifitású enzimek azonosítására (Janeček 1995). Az antiparallel  $\beta$ -redőkből álló C domén felépítése eltérő az egyes enzimek között: a PPA és a HSA 10, az AMY1 és az AMY2 5, a BAA 7 és a TAA 8  $\beta$ -redőt tartalmaz (Robert és mtsai., 2003). A redők eltérő számának ellenére a vizsgált enzimek C doménjében található  $\beta$ -redők jó illeszkedést mutatnak (25. ábra).

13. táblázat A vizsgált enzimek szekvenciái közötti hasonlóság (az azonos aminosavak százalékában kifejezve).

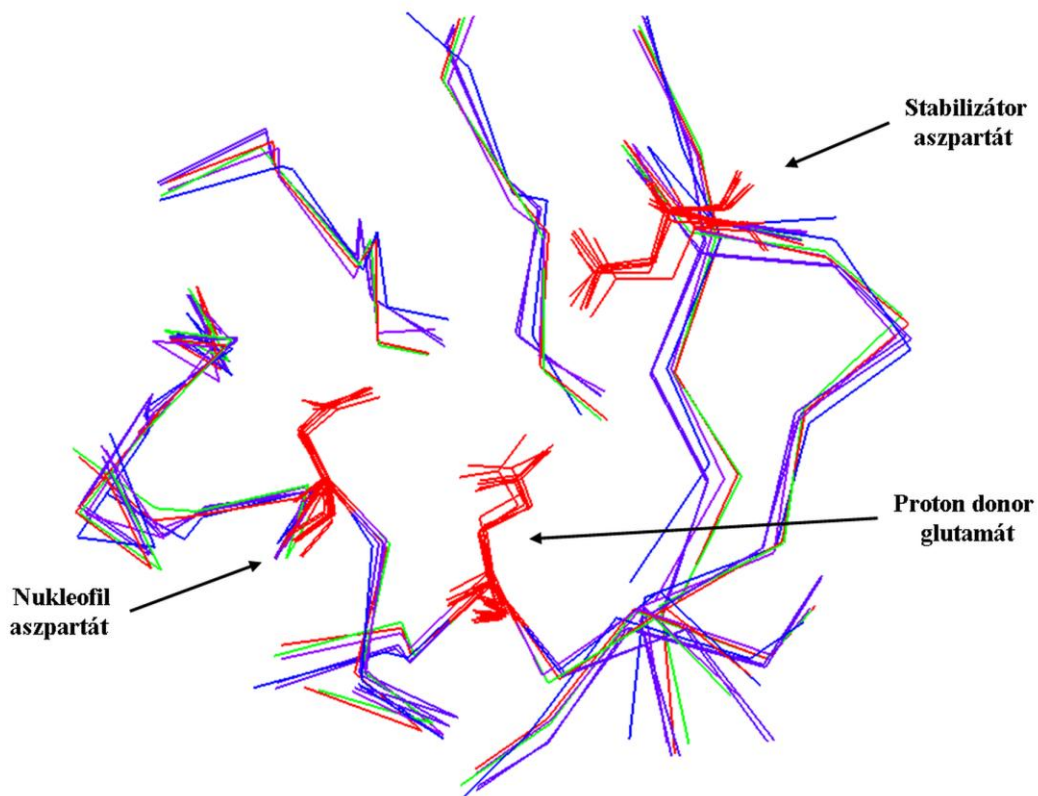
	HSA	PPA	AMY1	AMY2	TAA	BAA
HSA	100	--	--	--	--	--
PPA	86	100	--	--	--	--
AMY1	12	11	100	--	--	--
AMY2	12	11	74	100	--	--
TAA	18	19	14	13	100	--
BAA	16	18	15	15	20	100

### 5.4.1.3 Szerkezetillesztés és szekvenciaelemzés

25. ábra A tanító halmazba tartozó vad típusú enzimek szekvenciáinak összehasonlítása szerkezetillesztés alapján. A szekvenciák feletti sávok az A (szürke), B (lila) és C (bordó) doméneket jelölik, a sávokban lévő vonalak (---I---VII---) a konzervált régiókat jelölik (Janeček 2002). A szekvenciákban a konzervált  $\alpha$ -hélixekhez tartozó aminosavak piros, a konzervált  $\beta$ -redőkhöz tartozóak kék színűek. A katalitikus triád aminosavai fekete, a konzervált ionkötő helyek sötétzöld, a konzervált hisztidin aminosavak narancssárga, a konzervált arginin rózsaszín színnel van kiemelve.



A vad típusú enzimek szekvenciáinak összehasonlítása során a szekvenciák közötti igen változó mértékű hasonlóságot tapasztaltunk (13. táblázat). A nagyobb mértékű hasonlóság a közeli, az alacsonyabb pedig a távoli evolúciós rokoni kapcsolatokra utal (Janeček 1994). A szerkezetillesztés során azonban a hordó szerkezetet alkotó  $\beta$ -redők, a konzervált katalitikus aminosavak (26. ábra) és az ionkötő helyek nagymértékű konzerváltságát tapasztaltuk. A szerkezetek nagymértékű megőrzöttsége és az erősen konzervált régiók jó illeszkedése lehetőséget adhat arra, hogy a kidolgozott eljárást szélesebb körben, további  $\alpha$ -amiláz enzimek esetében is alkalmazhassuk.



26. ábra A HSA (rózsaszín), PPA (lila), AMY1 (zöld), AMY2 (narancssárga), TAA (kék) és BAA (ibolya) modelljeinek illesztése, csak a  $(\beta/\alpha)_8$ -hordót alkotó  $\beta$ -redők szénvázának és a katalitikus aminosavak (piros) megjelenítésével.

#### 5.4.2 A számítások lépései

A tanító halmaz esetében az enzim-szubsztrát komplexek homológ modelljeinek felépítését követően elvégeztük az enzim és a szubsztrátmolekula egyes glükózegységei közötti kölcsönhatási energiák ( $E_{\text{SYBYL}}$ ) számítását. Ezeket az  $E_{\text{SYBYL}}$  értékeket lineáris regressziós analízissel összehasonlítottuk a kísérletesen meghatározott bontási képekből számolt  $E_{\text{SUMA}}$  értékekkel.

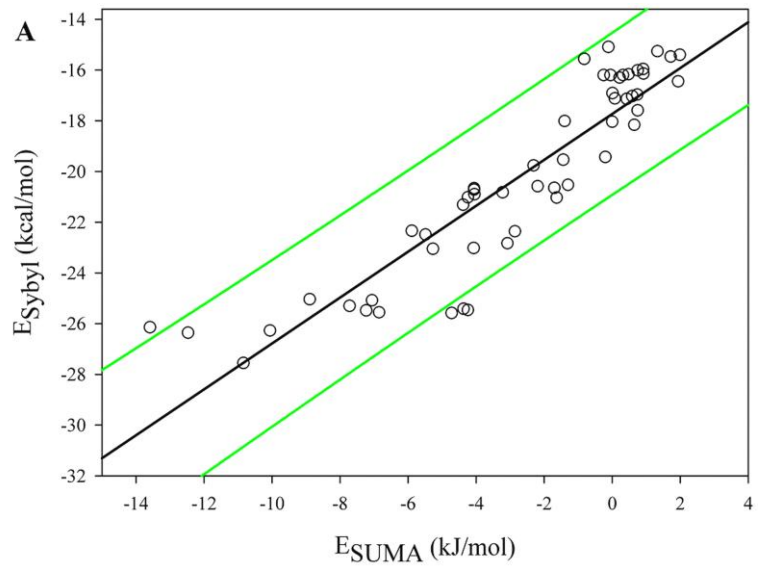
A SUMA program a kötőhasítási frekvenciákon alapuló kötési energiaszámítási módszer segítségével számolja ki a kötési energiaértékeket, ezért a  $-1$  és  $+1$  hasítóhelyek energiája nem számítható ki az alkalmazott módszerrel, mivel ezen alhelyek minden produktív komplex kialakításában részt vesznek (Gyémánt és mtsai., 2002), ezért a 13. táblázat nem tartalmazza a hasítóhely melletti alhelyekre számolt energiákat ( $E_{\text{SYBYL}}$ ).

Az  $E_{\text{SUMA}}$  és  $E_{\text{SYBYL}}$  értékek közötti jobb korreláció elérése érdekében az energia-minimalizálási eljárás paramétereit optimalizáltuk. A Sybyl programcsomagban számos molekulamechanikai erőter állt rendelkezésre. Az erőteret leíró függvény az atompárok közötti kötő (nyújtás, hajlítás és torziós) és nem-kötő (pl. van der Waals) kölcsönhatásokat is tartalmazza. Az optimalizálás során a Sybyl programcsomagban szereplő Kollman\_All\_Atom, Amber95 és Amber7\_FF99 erőtereken kívül az ingyenesen elérhető Glycam06 erőteret (Kirschner és mtsai., 2008) is teszteltük. Az elvégzett számítások eredményei alapján az Amber7\_FF99 erőter alkalmazásával végzett számítások adták a legjobb eredményt. További paramétereket is teszteltünk, változtattuk a dielektromos állandó (1, 2, 3, 4, 6 és 8) és a nem-kötő kölcsönhatások határtávolságának értékét (8, 10 és 12 Å), az iterációk számát 20–100 tartományban 20 lépésenként (20, 40, 60 80 és 100 iteráció) és 100–1000 tartományban 100 lépésenként változtattuk, továbbá a szubsztrát és a módosított aminosav oldalláncok körül minimalizált terület nagyságát is változtattuk a kezdeti minimalizálás során (távolság értéke: 1–12 Å). A jóslott értékek pontosságának megállapítására a regressziós egyenesek korrelációs koefficiens ( $r^2$ ) értékeit használtuk. Az optimalizálás eredményeként a számításokhoz az alábbi paraméterek kombinációja bizonyult a legjobbnak: dielektromos állandó értéke: 1, nem-kötő kölcsönhatások határtávolság értéke: 8 Å, a módosított oldalláncok és a szubsztrát molekula 8 Å környezetén belüli atomok minimalizálása, 20 iterációs lépés a maltooligoszacharid szubsztrátmolekula és 100 az enzim-szubsztrát komplex modelljének felépítése és a kölcsönhatási energiák számítása során. Célunk volt egy gyors eljárás kidolgozása, ezért elkerültük a kölcsönhatási energiák nagy mennyiségű oldószermolekula környezetében történő számítását illetve a hosszadalmas minimalizálási lépéseket. Az energiaminimalizálási folyamatok megváltoztatják a kötőszögeket, kötéstávolságokat és torziós szögeket, amelyek befolyásolják az enzim-szubsztrát komplex kiindulási konformációjában található kötő és nem-kötő kölcsönhatásokat egyaránt, ezért esetünkben a minimalizálási eljárás során az iterációk számának növelése a kísérletes és a jóslott értékek közötti korreláció romlását okozta. Az  $E_{\text{SUMA}}$  és  $E_{\text{SYBYL}}$  értékek közötti lineáris regressziós analízist (27. ábra) a  $-1$  és  $+1$  hasítóhelyek energiáinak kihagyásával végeztük, a korrelációs koefficiens ( $r^2$ ) értékeit használtuk a jóslott értékek pontosságának megállapításához.

27. ábra Az AMY1 csoportok  $E_{SUMA}$  értékei és a jóslott  $E_{SYBYL}$  és  $E_{Transf.}$  értékek közötti lineáris regressziós analízis. A regressziós egyenesek fekete színűek, a zöld vonalak a 95 %-os predikciós intervallum határokat jelölik.

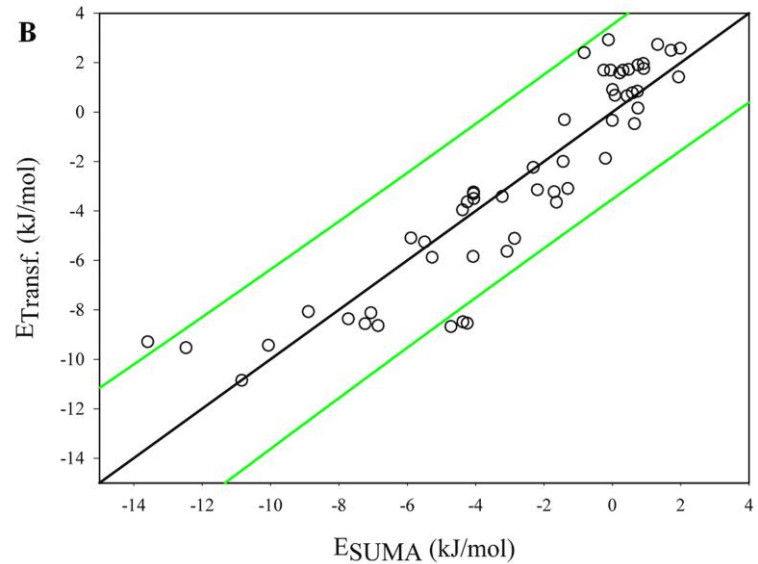
A)

Az AMY1 tanító csoport értékei  
a lineáris transzformálás előtt  
( $E_{SYBYL} = 0,905 \times E_{SUMA} - 17,731$ ).



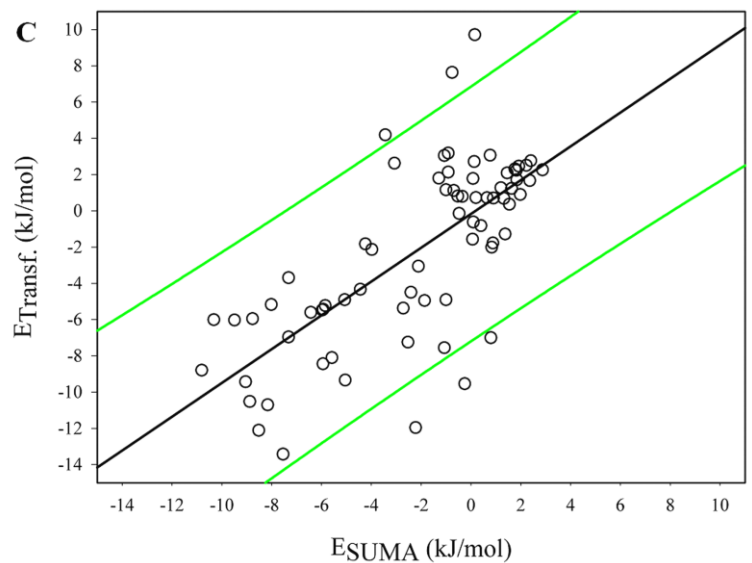
B)

Az AMY1 ellenőrző csoport értékei  
a lineáris transzformálás előtt  
( $E_{Transf.} = 1,000 \times E_{SUMA} - 0,000$ ).



C)

Az AMY1 ellenőrző csoport értékei  
a lineáris transzformálás után.



Az  $E_{SYBYL}$  értékeket lineáris transzformációval  $E_{Transf.}$  értékekké, az  $E_{SUMA}$  energiákkal azonos nagyságrendűvé alakítottuk át. A transzformáláshoz annak az enzimesoportnak a regressziós egyenes adatait használtuk, melybe az adott enzim tartozott (14. táblázat). Az ellenőrző halmaz csak az AMY1 aktív hely mutánsainak energiaértékeit tartalmazza, ezért az  $E_{SYBYL}$  értékek transzformálásához az AMY1 tanító csoportjának regressziós egyenes adatait használtuk (14. táblázat). Az AMY1 tanító csoport adatai esetében végzett lineáris regressziós analízist és a regressziós egyenes adatait a 27.A ábra mutatja. A transzformálást követően az  $E_{Transf.}$  értékek és az  $E_{SUMA}$  értékek közötti lineáris regressziós analízissel határoztuk meg a korrelációs koefficienseket ( $r^2$ ) a tanító (27.B ábra) és az ellenőrző (27.C ábra) halmaz esetében is (14. táblázat). Elvégeztük a tanító halmaz enzimeinek  $E_{SUMA}$  és  $E_{Transf.}$  értékei közötti lineáris regressziós analízist. A korrelációs koefficiensek ( $r^2$ ) értékei 0,827 és 0,929 közötti tartományba estek, ami a bontási képekből számolt és a jósolt energiaértékek közötti jó egyezést mutatja (14. táblázat).

14. táblázat Az  $E_{SUMA}$  és  $E_{SYBYL}$ , valamint a kísérletesen meghatározott és a számított bontási képek közötti lineáris regressziós analízis regressziós egyenseinek paraméterei ( $m$  – meredekség,  $b$  –  $y$ -tengelymetszet,  $r^2$  – korrelációs koefficiens).

Enzim		Kötési energia			Bontási kép			Halmaz
		m	b	$r^2$	m	b	$r^2$	
PPA	vad típus	0,510	-16,261	0,929	1,070	-2,054	0,835	Tanító
AMY2	vad típus	1,133	-17,106	0,839	0,912	1,616	0,756	
BAA	vad típus	1,044	-12,884	0,834	0,789	5,224	0,732	
TAA	vad típus	1,188	-13,403	0,902	0,988	0,171	0,782	
HSA	vad típus	0,912	-15,999	0,888	0,821	3,587	0,727	
	W58L							
	Y151M							
AMY1	vad típus	0,905	-17,731	0,827	0,936	1,229	0,801	
	Y105A							
	Y105F							
	Y105W							
	T212Y							
	Y105A/T212Y							
	S48Y	0,844	-17,888	0,502	0,838	3,042	0,538	
	V47A							
	V47F							
	V47D							
V47K/S48G								
V47G/S48D								
V47L/S48I								
V47L/S48A								

Az AMY1 ellenőrző csoport esetében a lineáris regressziós analízis (27.C ábra) során meghatározott korrelációs koefficiens értéke kisebb volt ( $r^2 = 0,502$ ), mint az AMY1 tanító csoportjának megfelelő értéke ( $r^2 = 0,827$ ) (14. táblázat), mint az várható volt. Azt tapasztaltuk, hogy a lineáris regressziós analízis során a rossz korrelációt okozó pontok eloszlása nem egyenletes: a 95 %-os predikciós intervallum határokön kívül eső pontok többsége a V47D, V47K/S48G és V47G/S48D AMY1 mutáns enzimekhez tartozik. Ezen enzimek mindegyike tartalmaz olyan mutációt, melyben egy töltés nélküli aminosav oldallánc töltött oldallánca van cserélve. Ha a lineáris regressziós analízis során ezen enzimek értékeit kihagytuk, az ellenőrző csoport esetében kapott korrelációs koefficiens értéke 0,638-ra emelkedett.

Az egyes esetekben kapott rosszabb korreláció magyarázatául a tanító és az ellenőrző halmazok közötti különbségek is szolgálhatnak.

Az AMY1 ellenőrző csoport enzimeit a kulcsfontosságú Val47 és Ser48 aminosavak egyszeres és/vagy kétszeres mutációját tartalmazzák. A szubsztrátkötő árok csaknem mindegyik glikon-kötő helyén szerepelnek a szubsztrátkötésben, mivel itt a szubsztrát mintegy félkör-alakban veszi körül ezen aminosavakat. Ezzel szemben az AMY1 tanító csoport enzimeit a Tyr105 és/vagy a Thr212 mutációját tartalmazzák, mely aminosavak csak egy vagy két hely kialakításáért felelősek, valamely külső helyen. Megállapítható tehát, hogy az általunk kidolgozott egyszerű eljárás nem elégséges minden esetben a kiemelkedően fontos aminosavak módosításával járó összetett hatások jóslására.

A módosított pozícióban a töltéseloszlásban bekövetkező nagymértékű változás hatásainak jóslása is problematikusnak tűnik, mint ahogyan azt a V47D, V47K/S48G és V47G/S48D mutánsok esetében is tapasztaltuk. Ennek egyik oka lehet az, hogy míg a tanító halmaz esetében az irodalomban elérhető bontási kép adatokat és az ezekből meghatározott helytérkép adatokat gyűjtöttük össze, addig az ellenőrző halmaz létrehozásához csak az együttműködő partnerek által rendelkezésünkre bocsátott mutáns enzimek álltak rendelkezésünkre. Az adatok ilyen módon történő összegyűjtése eredményezte azt a különbséget, hogy az ellenőrző halmazzal ellentétben a tanító halmaz nem tartalmaz olyan enzimeket, melyek töltött aminosavak mutációval történő bevezetését tartalmazzák. Így a számítási paraméterek optimalizálása során nem volt lehetőségünk olyan lépések kidolgozására, melyekkel a töltéseloszlásban bekövetkező jelentős változások okozta hatásokat megfelelő módon tudjuk jóslani. Eredményeink szerint tehát a mutációval bevezetett töltött aminosavak kezelése is nagyobb körültekintést igényel, egyedi módosítások vagy paraméterbeállítások alkalmazását teheti szükségessé. A kidolgozott eljárás egyszerű molekulamechanikai számításokon alapul, ezért nem alkalmas arra, hogy az aktív helytől távol

eső mutációk hatását kimutassa így nem használható fel a másodlagos szubsztrátkötő helyek vizsgálatára.

### 5.4.3 Bontási képek jóslása

A SUMA program a kötéshasítási frekvencia (BCF) adatokat használja fel a kötési energiaértékek számítására. Az energiaértékek számítása egy iterációs eljárás segítségével történik, melynek a során a program a kísérletesen meghatározott és a számított kötéshasítási frekvenciák közötti különbséget minimalizálja (Gyémánt és mtsai., 2002). Ezért a program nemcsak az  $E_{SUMA}$  energiák (alhelytérképek) meghatározására, hanem az elsődleges kísérletes adatok (bontási képek) számítására is alkalmazható. A bontási képek jóslását az  $E_{Transf.}$  értékek felhasználásával kívántuk elvégezni. Ezért ellenőriztük, hogy a SUMA program valóban alkalmas-e a kötési energiákból történő számítására: elvégeztük a kísérletesen meghatározott és az  $E_{SUMA}$  értékekből visszszámolt bontási képek közötti lineáris regressziós analízist (15. táblázat). A korrelációs koefficiensek ( $r^2$ ) értéke 0,852 és 0,996 közötti tartományba esett, így eredményeink alapján a SUMA jól használhatónak bizonyult a BCF adatok kötési energiákból történő számítására.

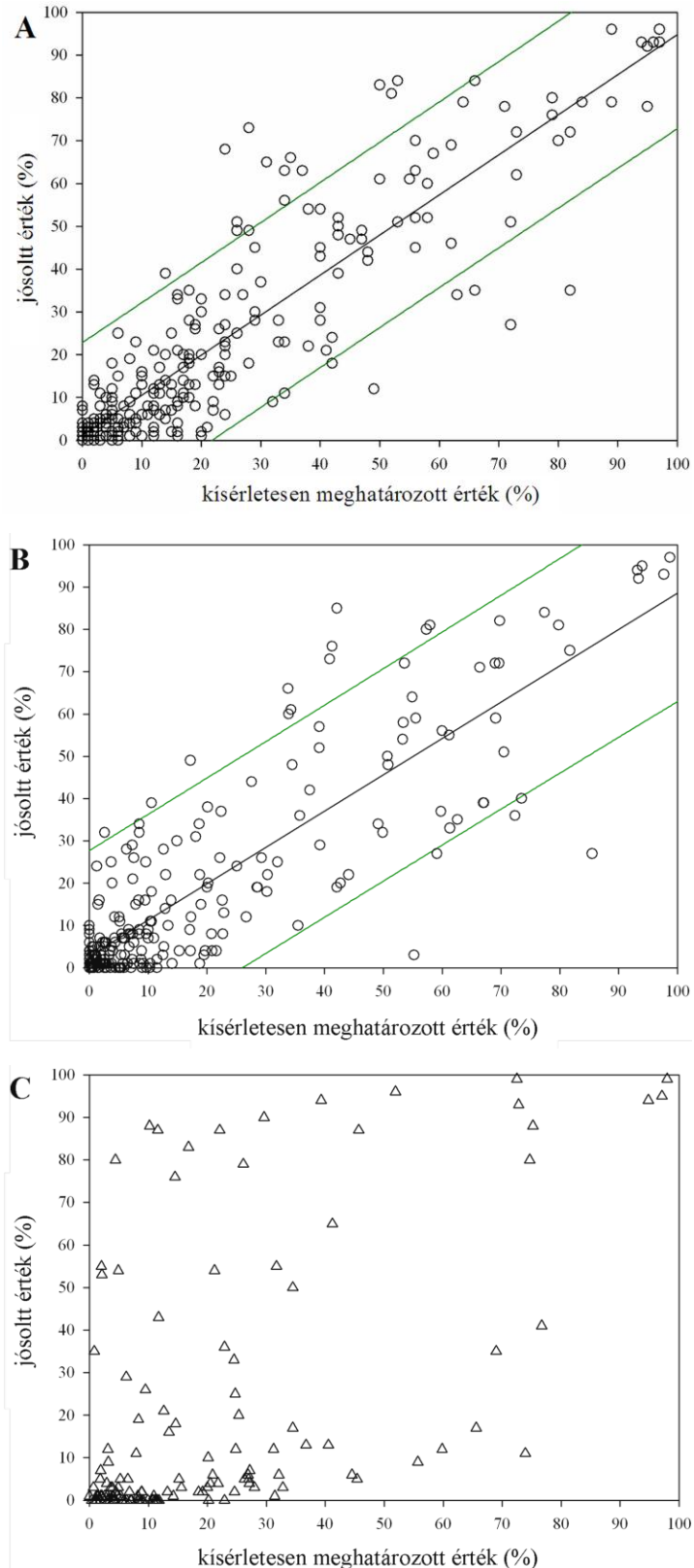
15. táblázat A SUMA program felhasználása a bontási képek visszszámolására. A táblázat a kísérletesen meghatározott és az  $E_{SUMA}$  értékekből közvetlenül visszszámolt bontási képek közötti lineáris regressziós analízissel meghatározott korrelációs koefficienseket mutatja.

Csoport	Bontási kép	Halmaz
	$r^2$	
PPA	0.982	Tanító
AMY2	0.938	
BAA	0.852	
TAA	0.996	
HSA	0.932	
AMY1	0.947	
	0.967	Ellenőrző

A bontási képek jóslása során az  $E_{Transf.}$  értékeket használtuk bemeneti adatként a SUMA programban és a jóslott bontási képeket a kísérletesen meghatározott értékekkel korreláltattuk. A lineáris regressziós analízis eredményeként jó korrelációs koefficiens értékeket kaptunk a tanító halmaz esetében ( $r^2 = 0,727-0,835$ ) (14. táblázat). Az AMY1 tanító csoportjához (28.A ábra) képest az AMY1 ellenőrző csoport esetében kapott korrelációs koefficiens értéke a várakozásoknak megfelelően alacsonyabb volt ( $r^2 = 0,538$ ). A 95 %-os

predikációs intervallum határokön kívül eső pontok többsége ezen esetben is olyan mutáns enzimek bontási képéhez tartozott, melyekben az enzim a módosított pozícióban töltött aminosav oldalláncot tartalmaz (28.C ábra). Tehát azon enzimek, melyek töltött aminosavak mutációval történő bevezetését tartalmazzák, a kötési energia értékekhez hasonlóan a bontási képek esetében is csökkentették az ellenőrző halmazra kapott korrelációs koefficiens értékét. A V47D, V47K/S47G és V47G/S48D mutánsok értékeinek kihagyásával a korrelációs koefficiens értéke 0,538-ról 0,728-ra emelkedett (28.B ábra).

28. ábra A kísérletesen meghatározott és a jóslott bontási képek közötti lineáris regressziós analízis az AMY1 enzimek tanító ( $r^2 = 0,801$ ) (A) és ellenőrző csoportja esetében (B és C). Külön ábrázolva az ellenőrző csoport módosított pozícióban töltött aminosav oldalláncot nem tartalmazó enzimeinek ( $r^2 = 0,728$ ) (B) és a V47D, V47K/S47G és V47G/S48D enzimek bontási képei (C).



A kidolgozott számítógépes eljárást sikeresen alkalmaztuk különböző eredetű  $\alpha$ -amiláz enzimek esetében (Mótyán és mtsai., 2011). A Baktériumok törzsébe tartozó BAA „folyósító” bakteriális  $\alpha$ -amiláz kivételével eukarióta szervezetekből származó enzimeket vizsgáltunk. Gomba eredetű az *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -amiláza (TAA), az árpa  $\alpha$ -amilázok (AMY1 és AMY2) növényi eredetűek, az emlősökből származó enzimek közül a PPA állati, a HSA humán eredetű. Ezen enzimek szerkezete nagymértékben megőrződött az evolúció során, a szekvenciák azonban változó mértékű konzerváltságot mutatnak. A szerkezetek nagyfokú megőrzöttsége lehetőséget adhat arra, hogy a kidolgozott eljárást szélesebb körben, további  $\alpha$ -amiláz enzimek vagy más glikozidázok esetében is alkalmazhassuk. Módszerünk segítséget nyújthat az enzimek szerkezet-funkció összefüggéseinek vizsgálatában úgy, hogy a molekuláris modellezéssel történő alhelytérképezés révén lehetővé teszi az kötési energiák jóslását és a SUMA program használatával lehetőséget nyújt az elsődleges kísérletes adatok számítására is. A számítógépes eljárás nagyszámú minta elemzését teszi lehetővé rövid idő alatt és költséghatékony módon, természetesen a számítógépes munkaállomás kapacitásától függően. Az ellenőrző halmaz esetében kapott eredmények azt mutatják, hogy a homológ modellek alaposabb vizsgálata és esetlegesen egyedi módosítások vagy paraméterbeállítások alkalmazása lehet szükséges olyan mutáns enzimek vizsgálata során, melyekben töltéssel rendelkező aminosavak bevezetése történt mutációval, vagy a vad típusú enzim töltött aminosava nem töltött aminosav oldalláncre lett kicserélve. A módszer felhasználható lehet a kísérletes módszerrel történő alhelytérképezéses vizsgálatok támogatására, az enzim-szubsztrát kötötti kölcsönhatások vizsgálata során a szubsztrátkötő alhelyeket felépítő aminosavak szerepének vizsgálatában. A bontási kép megváltoztatására irányuló munkálatokban szintén hatékony segítség lehet a mutációk tervezésében és az előzetes vizsgálatok támogatásában. Továbbá azon enzimek, melyek valamely okból nem feleltek meg a halmazokba kerülésnek támasztott feltételeknek, a későbbiekben további célpontjai lehetnek vizsgálatainknak.

## 6. Összefoglalás

A doktori értekezésben bemutatott munka során az aktív centrum térképezés módszerét használtuk a másodlagos kötőhelyeken módosított W279A, W278A/Y380A, W279A/Y380A, Y380A, H395A, H395A/Y380A és Y105A/Y380M AMY1 mutánsok vizsgálatára. Elvégeztük az aktív helyen módosított S48Y, V47A, V47F, V47D, V47K/S48G, V47G/S48D, V47L/S48A és V47I/S48I árpa  $\alpha$ -amiláz 1 (AMY1) mutánsok alhelytérképezését. A megbízható alhelytérképek elkészítéséhez szükséges bontási képeket 3–11 tagszámú 2-klór-4-nitrofenil- $\beta$ -D-maltooligoszacharid (CNP- $\beta$ -D-MOS) szubsztrátsorozat segítségével határoztuk meg. Az alhelytérképek számításához a SUMA (Subsite mapping of  $\alpha$ -amylases) számítógépes programot használtuk.

Az AMY1 enzimek bontási képeinek meghatározása során a transzglykozilezési aktivitás növekedését tapasztaltuk, elsőként tanulmányoztuk részletesen az AMY1 és mutánsai transzferáz aktivitását. A reakciókörülmények optimalizálását követően elvégeztük a 4-metilumbelliferil- $\alpha$ -D-maltooligoszacharidok (MU- $\alpha$ -D-MOS) enzimatiszintézisét a V47F AMY1 mutáns által katalizált transzglykozilezés reakcióban. A 2–5 tagszámú MU- $\alpha$ -D-MOS szubsztrátokat sikeresen alkalmaztuk egy gyors és egyszerű fluorimetriás eljárásban, a *Bacillus stearothermophilus* maltózképző  $\alpha$ -amiláz, a *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amiláz és a humán nyál  $\alpha$ -amiláz kinetikai paramétereinek meghatározásában. A kidolgozott eljárás megoldást jelenthet a fluoreszcens  $\alpha$ -amiláz szubsztrátok előállítására, melyek nem érhetők el kereskedelmi forgalomban.

Egy olyan számítógépes eljárást dolgoztunk ki az  $\alpha$ -amilázok vizsgálatára, mely az alhelytérképek molekuláris modellezéssel történő számításán alapul. A módszer kidolgozásához a különböző amilázok irodalmi adatai alapján létrehozott tanító halmazt használtuk, az eljárást a kísérletesen meghatározott és a jósolt értékek közötti korreláció alapján optimalizáltuk. Az ellenőrzéshez az AMY1 V47/S48 mutánsainak adataiból létrehozott ellenőrző halmazt használtuk, és a töltött aminosavak mutációval történő bevezetését tartalmazó mutáns enzimek kivételével szintén jó korrelációt kaptunk. A kidolgozott eljárás a vad típusú és mutáns enzimek homológ modelljeit használja az alhelytérképek Sybyl molekulamodellező szoftverrel történő molekulamechanikai számítására és a SUMA programot az elsődleges kísérletes adatok (BCF) jóslására. Módszerünk felhasználható lehet az  $\alpha$ -amilázok szerkezet-funkció összefüggéseinek megértésében és a módosított fehérjék előállítására irányuló vizsgálatok támogatásában.

## 7. Summary

In this work we used the method of subsite mapping to examine the W279A, W278A/Y380A, W279A/Y380A, Y380A, H395A, H395A/Y380A and Y105A/Y380M secondary substrate binding site mutants of AMY1. We mapped the active site of S48Y, V47A, V47F, V47D, V47K/S48G, V47G/S48D, V47L/S48A and V47I/S48I active site mutants of barley  $\alpha$ -amylase 1 (AMY1). 2-Chloro-4-nitrophenyl- $\beta$ -D-maltooligo-saccharides (CNP- $\beta$ -D-MOS) of degree of polymerization (DP) 3–11 were used to determine the bond cleavage frequencies (BCF). Subsite binding energies were calculated using the computer program for subsite mapping of  $\alpha$ -amylases (SUMA).

Enhanced transglycosylation activity of several mutants of AMY1 was observed during the BCF analysis and this ability was further explored and studied systematically. After optimization of reaction conditions, 4-methylumbelliferyl- $\alpha$ -D-maltooligosaccharides (MU- $\alpha$ -D-MOS) of DP2–5 have been successfully synthesized using V47F active site mutant of AMY1. MU- $\alpha$ -D-MOS were used efficiently as fluorogenic substrates in a fast and simple fluorometric  $\alpha$ -amylase assay to determine the kinetic parameters of *Bacillus stearothermophilus* maltogenic  $\alpha$ -amylase, *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amylase and human salivary  $\alpha$ -amylase. Described method may be the solution for preparation of fluorogenic  $\alpha$ -amylase substrates which are not commercially available up to now.

We developed a computer-aided subsite mapping procedure for  $\alpha$ -amylases. A training set of data was collected from the literature using published data, to prepare a test set of data we determined experimentally the BCF-s and calculated the subsite maps of V47/S48 single and double mutants of AMY1. Parameters of the calculations were set up to get correlation between the calculated and the experimental binding energies of enzymes of a training set. Calculations on an independent test set also resulted in good correlation, except mutants containing neutral to charged residue substitution. Developed method was adopted for several  $\alpha$ -amylases and is useful to calculate subsite binding energies of homologous models of wild-type and mutant enzymes by molecular mechanical program using Sybyl molecular modeling software as well as the primary experimental data (BCFs) with the use of computer program SUMA. Our computer-aided procedure may help to understand structure-function relationship of  $\alpha$ -amylases and to design enzymes with new features.

## 8. Irodalomjegyzék

### 8.1 Az értekezésben hivatkozott közlemények jegyzéke

- Alikhajeh, J., Khajeh, K., Ranjbar, B., Naderi-Manesh, H., Lin, Y. H., Liu, E. H., Guan, H. H., Hsieh, Y. C., Chuankhayan, P., Huang, Y. C., Jeyaraman, J., Liu, M. Y. és Chen, C. J. (2010). "Structure of *Bacillus amyloliquefaciens* alpha-amylase at high resolution: implications for thermal stability." Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Communications **66**: 121-129.
- Allen, J. D. és Thoma, J. A. (1976a). "Subsite mapping of enzymes. Application of the depolymerase computer model to two alpha-amylases." Biochem J **159**(1): 121-132.
- Allen, J. D. és Thoma, J. A. (1976b). "Subsite mapping of enzymes. Depolymerase computer modelling." Biochem J **159**(1): 105-120.
- Bak-Jensen, K. S., Andre, G., Gottschalk, T. E., Paes, G., Tran, V. és Svensson, B. (2004). "Tyrosine 105 and threonine 212 at outermost substrate binding subsites -6 and +4 control substrate specificity, oligosaccharide cleavage patterns, and multiple binding modes of barley alpha-amylase 1." J Biol Chem **279**(11): 10093-10102.
- Banner, D. W., Bloomer, A. C., Petsko, G. A., Phillips, D. C., Pogson, C. I., Wilson, I. A., Corran, P. H., Furth, A. J., Milman, J. D., Offord, R. E., Priddle, J. D. és Waley, S. G. (1975). "Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 angstrom resolution using amino acid sequence data." Nature **255**(5510): 609-614.
- Benen, J. A., Kester, H. C. és Visser, J. (1999). "Kinetic characterization of *Aspergillus niger* N400 endopolygalacturonases I, II and C." Eur J Biochem **259**(3): 577-585.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N. és Bourne, P. E. (2000). "The Protein Data Bank." Nucleic Acids Research **28**(1): 235-242.
- Bhagavan, N. V., Ed. (2002). Medical Biochemistry. Elsevier Chapter 15 - Carbohydrate Metabolism II: Gluconeogenesis, Glycogen Synthesis and Breakdown, and Alternative Pathways, Pages 275-305, Elsevier.
- Bozonnet, S., Jensen, M. T., Nielsen, M. M., Aghajari, N., Jensen, M. H., Kramhoft, B., Willemoes, M., Tranier, S., Haser, R. és Svensson, B. (2007). "The 'pair of sugar tongs' site on the non-catalytic domain C of barley alpha-amylase participates in substrate binding and activity." FEBS J **274**(19): 5055-5067.
- Brayer, G. D., Sidhu, G., Maurus, R., Rydberg, E. H., Braun, C., Wang, Y., Nguyen, N. T., Overall, C. M. és Withers, S. G. (2000). "Subsite mapping of the human pancreatic alpha-amylase active site through structural, kinetic, and mutagenesis techniques." Biochemistry **39**(16): 4778-4791.
- Brzozowski, A. M. és Davies, G. J. (1997). "Structure of the *Aspergillus oryzae* alpha-amylase complexed with the inhibitor acarbose at 2.0 angstrom resolution." Biochemistry **36**(36): 10837-10845.
- Brzozowski, A. M., Lawson, D. M., Turkenburg, J. P., Bisgaard-Frantzen, H., Svendsen, A., Borchert, T. V., Dauter, Z., Wilson, K. S. és Davies, G. J. (2000). "Structural analysis of a chimeric bacterial alpha-amylase. High-resolution analysis of native and ligand complexes." Biochemistry **39**(31): 9099-9107.
- Cantarel, B. L., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V. és Henrissat, B. (2009). "The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics." Nucleic Acids Res **37**(Database issue): D233-238.

- Cha, H. J., Yoon, H. G., Kim, Y. W., Lee, H. S., Kim, J. W., Kweon, K. S., Oh, B. H. és Park, K. H. (1998). "Molecular and enzymatic characterization of a maltogenic amylase that hydrolyzes and transglycosylates acarbose." *Eur J Biochem* **253**(1): 251-262.
- Choi, C. H., Kim, S. H., Jang, J. H., Park, J. T., Shim, J. H., Kim, Y. W. és Park, K. H. (2010). "Enzymatic synthesis of glycosylated puerarin using maltogenic amylase from *Bacillus stearothermophilus* expressed in *Bacillus subtilis*." *Journal of the Science of Food and Agriculture* **90**(7): 1179-1184.
- Christiansen, C., Abou Hachem, M., Janecek, S., Vikso-Nielsen, A., Blennow, A. és Svensson, B. (2009). "The carbohydrate-binding module family 20--diversity, structure, and function." *FEBS J* **276**(18): 5006-5029.
- Crout, D. H. és Vic, G. (1998). "Glycosidases and glycosyl transferases in glycoside and oligosaccharide synthesis." *Curr Opin Chem Biol* **2**(1): 98-111.
- D'Amico, S., Gerday, C. és Feller, G. (2000). "Structural similarities and evolutionary relationships in chloride-dependent alpha-amylases." *Gene* **253**(1): 95-105.
- Dauter, Z., Dauter, M., Brzozowski, A. M., Christensen, S., Borchert, T. V., Beier, L., Wilson, K. S. és Davies, G. J. (1999). "X-ray structure of Novamyl, the five-domain "maltogenic" alpha-amylase from *Bacillus stearothermophilus*: maltose and acarbose complexes at 1.7Å resolution." *Biochemistry* **38**(26): 8385-8392.
- Davies, G. J., Wilson, K. S. és Henrissat, B. (1997). "Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases." *Biochemical Journal* **321**: 557-559.
- de Souza, P. M. és Magalhaes, P. O. (2010). "Application of microbial alpha-amylase in industry - a review." *Brazilian Journal of Microbiology* **41**(4): 850-861.
- Erithacus Software Ltd. "Erithacus Software - GraFit Data Analysis and Graphics Software." [www.erithacus.com/grafit](http://www.erithacus.com/grafit).
- Farkas, E., Janossy, L., Harangi, J., Kandra, L. és Liptak, A. (1997). "Synthesis of chromogenic substrates of alpha-amylases on a cyclodextrin basis." *Carbohydr Res* **303**(4): 407-415.
- Finnie, C. és Svensson, B. (2009). "Barley seed proteomics from spots to structures." *J Proteomics* **72**(3): 315-324.
- Gilles, C., Astier, J. P., MarchisMouren, G., Cambillau, C. és Payan, F. (1996). "Crystal structure of pig pancreatic alpha-amylase isoenzyme II, in complex with the carbohydrate inhibitor acarbose." *European Journal of Biochemistry* **238**(2): 561-569.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K. és Chauhan, B. (2003). "Microbial alpha-amylases: a biotechnological perspective." *Process Biochemistry* **38**(11): 1599-1616.
- Gyémánt, G., Hovánszki, G. és Kandra, L. (2002). "Subsite mapping of the binding region of alpha-amylases with a computer program." *Eur J Biochem* **269**(21): 5157-5162.
- Gyémánt, G., Kandra, L., Nagy, V. és Somsák, L. (2003). "Inhibition of human salivary [alpha]-amylase by glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **312**(2): 334-339.
- Haki, G. D. és Rakshit, S. K. (2003). "Developments in industrially important thermostable enzymes: a review." *Bioresour Technol* **89**(1): 17-34.
- Henrissat, B. (1991). "A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities." *Biochem J* **280** ( Pt 2): 309-316.
- Henrissat, B. és Bairoch, A. (1993). "New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities." *Biochem J* **293** ( Pt 3): 781-788.
- Henrissat, B. és Bairoch, A. (1996). "Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases." *Biochem J* **316** ( Pt 2): 695-696.
- Hiromi, K. (1970). "Interpretation of dependency of rate parameters on the degree of polymerization of substrate in enzyme-catalyzed reactions. Evaluation of subsite affinities of exo-enzyme." *Biochem Biophys Res Commun* **40**(1): 1-6.

- Humphrey, W., Dalke, A. és Schulten, K. (1996). "VMD: visual molecular dynamics." J Mol Graph **14**(1): 33-38, 27-38.
- Hunt, J. J., Cameron, R. és Williams, M. A. (2006). "On the simulation of enzymatic digest patterns: the fragmentation of oligomeric and polymeric galacturonides by endo-polygalacturonase II." Biochim Biophys Acta **1760**(11): 1696-1703.
- Janeček, S. (1992). "New conserved amino acid region of alpha-amylases in the third loop of their (beta/alpha)8-barrel domains." Biochem J **288** ( Pt 3): 1069-1070.
- Janeček, S. (1994). "Sequence similarities and evolutionary relationships of microbial, plant and animal alpha-amylases." Eur J Biochem **224**(2): 519-524.
- Janeček, S. (1995). "Close evolutionary relatedness among functionally distantly related members of the (alpha/beta)8-barrel glycosyl hydrolases suggested by the similarity of their fifth conserved sequence region." FEBS Lett **377**(1): 6-8.
- Janeček, S. (2002). "How many conserved sequence regions are there in the alpha-amylase family?" Biologia - Section Cellular and Molecular Biology **57**(SUPPL. 11): 29-41.
- Janeček, S. (2009). "Amylolytic enzymes - focus on the alpha-amylases from archaea and plants. ." Nova Biotechnologica **9**(1): 5 - 25.
- Janeček, S., Leveque, E., Belarbi, A. és Haye, B. (1999). "Close evolutionary relatedness of alpha-amylases from Archaea and plants." J Mol Evol **48**(4): 421-426.
- Janeček, S., Svensson, B. és Henrissat, B. (1997). "Domain evolution in the alpha-amylase family." J Mol Evol **45**(3): 322-331.
- Janeček, S., Svensson, B. és MacGregor, E. A. (2003). "Relation between domain evolution, specificity, and taxonomy of the alpha-amylase family members containing a C-terminal starch-binding domain." Eur J Biochem **270**(4): 635-645.
- Jespersen, H. M., MacGregor, E. A., Sierks, M. R. és Svensson, B. (1991). "Comparison of the domain-level organization of starch hydrolases and related enzymes." Biochem J **280** ( Pt 1): 51-55.
- Kadziola, A., Sogaard, M., Svensson, B. és Haser, R. (1998). "Molecular structure of a barley alpha-amylase-inhibitor complex: Implications for starch binding and catalysis." Journal of Molecular Biology **278**(1): 205-217.
- Kandra, L., Gyémánt, G. és Lipták, A. (1999). "Chemoenzymatic preparation of 2-chloro-4-nitrophenyl beta-maltooligosaccharide glycosides using glycogen phosphorylase b." Carbohydrate Research **315**(1-2): 180-186.
- Kandra, L., Gyémánt, G. és Lipták, A. (2002a). "Action pattern of alpha-amylases on modified maltooligosaccharides." Biologia **57**: 171-180.
- Kandra, L., Gyémánt, G., Pál, M., Petró, M., Remenyik, J. és Lipták, A. (2001). "Chemoenzymatic synthesis of 2-chloro-4-nitrophenyl beta-maltoheptaoside acceptor-products using glycogen phosphorylase b." Carbohydrate Research **333**(2): 129-136.
- Kandra, L., Gyémánt, G., Remenyik, J., Hovánszki, G. és Lipták, A. (2002b). "Action pattern and subsite mapping of Bacillus licheniformis alpha-amylase (BLA) with modified maltooligosaccharide substrates." FEBS Lett **518**(1-3): 79-82.
- Kandra, L., Gyémánt, G., Remenyik, J., Rangunath, C. és Ramasubbu, N. (2003). "Subsite mapping of human salivary alpha-amylase and the mutant Y151M." FEBS Lett **544**(1-3): 194-198.
- Kandra, L., Gyémánt, G., Remenyik, J., Rangunath, C. és Ramasubbu, N. (2005a). "Transglycosylations catalysed by Y151M mutant of human salivary  $\alpha$ -amylase (HSA)." Biologia - Section Cellular and Molecular Biology **60**(SUPPL. 16): 57-64.
- Kandra, L., Gyémánt, G., Zajác, Á. és Batta, G. (2004). "Inhibitory effects of tannin on human salivary [alpha]-amylase." Biochemical and Biophysical Research Communications **319**(4): 1265-1271.

- Kandra, L., Hachem, M. A., Gyémánt, G., Kramhoft, B. és Svensson, B. (2006). "Mapping of barley alpha-amylases and outer subsite mutants reveals dynamic high-affinity subsites and barriers in the long substrate binding cleft." *FEBS Lett* **580**(21): 5049-5053.
- Kandra, L., Remenyik, J., Batta, G., Somsák, L., Gyémánt, G. és Park, K. H. (2005b). "Enzymatic synthesis of a new inhibitor of alpha-amylases: acarviosinyl-isomaltosyl-spiro-thiohydantoin." *Carbohydr Res* **340**(7): 1311-1317.
- Kelly, R. M., Dijkhuizen, L. és Leemhuis, H. (2009). "Starch and alpha-glucan acting enzymes, modulating their properties by directed evolution." *J Biotechnol* **140**(3-4): 184-193.
- Kirschner, K. N., Yongye, A. B., Tschampel, S. M., Gonzalez-Outeirino, J., Daniels, C. R., Foley, B. L. és Woods, R. J. (2008). "GLYCAM06: a generalizable biomolecular force field. Carbohydrates." *J Comput Chem* **29**(4): 622-655.
- Koshland, D. E. (1953). "Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions." *Biological Reviews* **28**(4): 416-436.
- Kramhoft, B., Bak-Jensen, K. S., Mori, H., Juge, N., Nohr, J. és Svensson, B. (2005). "Involvement of individual subsites and secondary substrate binding sites in multiple attack on amylose by barley alpha-amylase." *Biochemistry* **44**(6): 1824-1832.
- Kumar, V. (2010). "Analysis of the key active subsites of glycoside hydrolase 13 family members." *Carbohydrate Research* **345**(7): 893-898.
- Kuriki, T. és Imanaka, T. (1999). "The concept of the alpha-amylase family: structural similarity and common catalytic mechanism." *J Biosci Bioeng* **87**(5): 557-565.
- Li, D., Park, S. H., Shim, J. H., Lee, H. S., Tang, S. Y., Park, C. S. és Park, K. H. (2004). "In vitro enzymatic modification of puerarin to puerarin glycosides by maltogenic amylase." *Carbohydr Res* **339**(17): 2789-2797.
- Macgregor, A. W., Morgan, J. E. és Macgregor, E. A. (1992). "The action of germinated barley alpha-amylases on linear maltodextrins." *Carbohydrate Research* **227**: 301-313.
- MacGregor, E. A., Janecek, S. és Svensson, B. (2001). "Relationship of sequence and structure to specificity in the alpha-amylase family of enzymes." *Biochim Biophys Acta* **1546**(1): 1-20.
- MacGregor, E. A. és MacGregor, A. W. (1985). "A model for the action of cereal alpha amylases on amylose." *Carbohydrate Research* **142**(2): 223-236.
- Machius, M., Vertesy, L., Huber, R. és Wiegand, G. (1996). "Carbohydrate and protein-based inhibitors of porcine pancreatic alpha-amylase: Structure analysis and comparison of their binding characteristics." *Journal of Molecular Biology* **260**(3): 409-421.
- Machovic, M. és Janecek, S. (2003). "The invariant residues in the alpha-amylase family: Just the catalytic triad." *Biologia - Section Cellular and Molecular Biology* **58**(6): 1127-1132.
- Matsui, I. és Svensson, B. (1997). "Improved activity and modulated action pattern obtained by random mutagenesis at the fourth beta-alpha loop involved in substrate binding to the catalytic (beta/alpha)8-barrel domain of barley alpha-amylase 1." *J Biol Chem* **272**(36): 22456-22463.
- Matsuura, Y., Kusunoki, M., Harada, W. és Kakudo, M. (1984). "Structure and possible catalytic residues of Taka-amylase A." *Journal of Biochemistry* **95**(3): 697-702.
- Maurus, R., Begum, A., Kuo, H. H., Racaza, A., Numao, S., Andersen, C., Tams, J. W., Vind, J., Overall, C. M., Withers, S. G. és Brayer, G. D. (2005). "Structural and mechanistic studies of chloride induced activation of human pancreatic alpha-amylase." *Protein Sci* **14**(3): 743-755.
- Maurus, R., Begum, A., Williams, L. K., Fredriksen, J. R., Zhang, R., Withers, S. G. és Brayer, G. D. (2008). "Alternative catalytic anions differentially modulate human alpha-amylase activity and specificity." *Biochemistry* **47**(11): 3332-3344.

- Mori, H., Bak-Jensen, K. S., Gottschalk, T. E., Motawia, M. S., Damager, I., Moller, B. L. és Svensson, B. (2001). "Modulation of activity and substrate binding modes by mutation of single and double subsites +1/+2 and -5/-6 of barley alpha-amylase 1." Eur J Biochem **268**(24): 6545-6558.
- Mori, H., Bak-Jensen, K. S. és Svensson, B. (2002). "Barley alpha-amylase Met53 situated at the high-affinity subsite -2 belongs to a substrate binding motif in the beta-->alpha loop 2 of the catalytic (beta/alpha)<sub>8</sub>-barrel and is critical for activity and substrate specificity." Eur J Biochem **269**(22): 5377-5390.
- Mótyán, J. A., Fazekas, E., Mori, H., Svensson, B., Bagossi, P., Kandra, L. és Gyémánt, G. (*J. Mol. Catal., B Enzym.* folyóirathoz beküldve ). "Transglycosylation by barley  $\alpha$ -amylase 1." Beküldve a *Journal of molecular catalysis. B, Enzymatic* folyóirathoz 2010.12.09-én, jelenleg a bírálókat válaszáinak előkészítése folyamatban van.
- Mótyán, J. A., Gyémánt, G., Harangi, J. és Bagossi, P. (2011). "Computer-aided subsite mapping of alpha-amylases." Carbohydr Res **346**(3): 410-415.
- Nielsen, J. E. és Borchert, T. V. (2000). "Protein engineering of bacterial alpha-amylases." Biochim Biophys Acta **1543**(2): 253-274.
- Nielsen, M. M., Bozonnet, S., Seo, E. S., Mótyán, J. A., Andersen, J. M., Dilokpimol, A., Abou Hachem, M., Gyémánt, G., Naested, H., Kandra, L., Sigurskjold, B. W. és Svensson, B. (2009). "Two secondary carbohydrate binding sites on the surface of barley alpha-amylase 1 have distinct functions and display synergy in hydrolysis of starch granules." Biochemistry **48**(32): 7686-7697.
- Nielsen, M. M., Seo, E. S., Bozonnet, S., Aghajari, N., Robert, X., Haser, R. és Svensson, B. (2008a). "Multi-site substrate binding and interplay in barley alpha-amylase 1." FEBS Lett **582**(17): 2567-2571.
- Nielsen, M. M., Seo, E. S., Dilokpimol, A., Andersen, J., Abou Hachem, M., Naested, H., Willemoes, M., Bozonnet, S., Kandra, L., Gyémánt, G., Haser, R., Aghajari, N. és Svensson, B. (2008b). "Roles of multiple surface sites, long substrate binding clefts, and carbohydrate binding modules in the action of amylolytic enzymes on polysaccharide substrates." Biocatalysis and Biotransformation **26**(1-2): 59-67.
- Palcic, M. M. (1999). "Biocatalytic synthesis of oligosaccharides." Curr Opin Biotechnol **10**(6): 616-624.
- Pollet, A., Lagaert, S., Eneyskaya, E., Kulminkaya, A., Delcour, J. A. és Courtin, C. M. (2010). "Mutagenesis and subsite mapping underpin the importance for substrate specificity of the aglycon subsites of glycoside hydrolase family 11 xylanases." Biochim Biophys Acta **1804**(4): 977-985.
- Prakash, O. és Jaiswal, N. (2010). "Alpha-amylase: an ideal representative of thermostable enzymes." Appl Biochem Biotechnol **160**(8): 2401-2414.
- Pujadas, G. és Palau, J. (2001). "Evolution of alpha-amylases: architectural features and key residues in the stabilization of the (beta/alpha)<sub>8</sub> scaffold." Mol Biol Evol **18**(1): 38-54.
- Pujadas, G. és Palau, J. (2002). "Independent folding of the A and B domains in the alpha-amylase family." Biologia **57**(11): 43-57.
- Ramasubbu, N., Ragunath, C. és Mishra, P. J. (2003). "Probing the role of a mobile loop in substrate binding and enzyme activity of human salivary amylase." Journal of Molecular Biology **325**(5): 1061-1076.
- Ramasubbu, N., Ragunath, C., Mishra, P. J., Thomas, L. M., Gyémánt, G. és Kandra, L. (2004). "Human salivary alpha-amylase Trp58 situated at subsite -2 is critical for enzyme activity." Eur J Biochem **271**(12): 2517-2529.

- Remenyik, J., Rangunath, C., Ramasubbu, N., Gyémánt, G., Lipták, A. és Kandra, L. (2003). "Introducing transglycosylation activity into human salivary alpha-amylase (HSA)." Organic Letters **5**(25): 4895-4898.
- Robert, X., Haser, R., Gottschalk, T. E., Ratajczak, F., Driguez, H., Svensson, B. és Aghajari, N. (2003). "The structure of barley alpha-amylase isozyme 1 reveals a novel role of domain C in substrate recognition and binding: a pair of sugar tongs." Structure **11**(8): 973-984.
- Robert, X., Haser, R., Mori, H., Svensson, B. és Aghajari, N. (2005). "Oligosaccharide binding to barley alpha-amylase 1." Journal of Biological Chemistry **280**(38): 32968-32978.
- Roby, J. F. és French, D. (1967). "Multiple attach hypothesis of alpha-amylase action: action of porcine pancreatic, human salivary, and *Aspergillus oryzae* alpha-amylases." Arch Biochem Biophys **122**(1): 8-16.
- Rohleder, N. és Nater, U. M. (2009). "Determinants of salivary alpha-amylase in humans and methodological considerations." Psychoneuroendocrinology **34**(4): 469-485.
- Scannapieco, F. A., Torres, G. és Levine, M. J. (1993). "Salivary alpha-amylase: role in dental plaque and caries formation." Crit Rev Oral Biol Med **4**(3-4): 301-307.
- Silicon Graphics International "Silicon Graphics International, 46600 Landing Parkway Fremont, CA 94538, USA." [www.sgi.com](http://www.sgi.com).
- Sogaard, M., Kadziola, A., Haser, R. és Svensson, B. (1993). "Site-directed mutagenesis of histidine-93, aspartic acid-180, glutamic acid-205, histidine-290, and aspartic acid-291 at the active-site and tryptophan-279 at the raw starch binding-site in barley alpha-amylase 1." Journal of Biological Chemistry **268**(30): 22480-22484.
- Suganuma, T., Matsuno, R., Ohnishi, M. és Hiromi, K. (1978). "A study of the mechanism of action of Taka-amylase A1 on linear oligosaccharides by product analysis and computer simulation." J Biochem **84**(2): 293-316.
- Svensson, B. (1994). "Protein engineering in the alpha-amylase family: catalytic mechanism, substrate specificity, and stability." Plant Mol Biol **25**(2): 141-157.
- Svensson, B., Tovborg Jensen, M., Mori, H., Bak-Jensen, K. S., Bonsager, B., Nielsen, P. K., Kramhoft, B., Praetorius-Ibba, M., Nohr, J., Juge, N., Greffe, L., Williamson, G. és Driguez, H. (2002). "Fascinating facets of function and structure of amylolytic enzymes of glycoside hydrolase family 13." Biologia - Section Cellular and Molecular Biology **57**(SUPPL. 11): 5-19.
- Terashima, M., Hayashi, N., Thomas, B. R., Rodriguez, R. L. és Katoh, S. (1996). "Kinetic parameters of two rice alpha-amylase isozymes for oligosaccharide degradation." Plant Science **116**(1): 9-14.
- Tierney, L. M., McPhee, S. J. és Papadakis, M. A., Eds. (2004). Current Medical Diagnosis & Treatment.
- Tripos International "Tripos International SYBYL 7.0, 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Missouri, 63144, USA." [www.tripos.com](http://www.tripos.com).
- UniProtConsortium (2010). "The Universal Protein Resource (UniProt) in 2010." Nucleic Acids Research **38**: D142-D148.
- van der Maarel, M. J., van der Veen, B., Uitdehaag, J. C., Leemhuis, H. és Dijkhuizen, L. (2002). "Properties and applications of starch-converting enzymes of the alpha-amylase family." J Biotechnol **94**(2): 137-155.
- Vujcic-Zagar, A. és Dijkstra, B. W. (2006). "Monoclinic crystal form of *Aspergillus niger* alpha-amylase in complex with maltose at 1.8 Å resolution." Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Communications **62**: 716-721.
- Winn-Deen, E. S., David, H., Sigler, G. és Chavez, R. (1988). "Development of a direct assay for alpha-amylase." Clin Chem **34**(10): 2005-2008.

- Withers, S. G. (2001). "Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolases." Carbohydrate Polymers **44**(4): 325-337.
- Yoon, S.-H. és Robyt, J. F. (2003). "Study of the inhibition of four alpha amylases by acarbose and its 4IV-[alpha]-maltohexaosyl and 4IV-[alpha]-maltododecaosyl analogues." Carbohydrate Research **338**(19): 1969-1980.
- Zajácz, Á., Gyémánt, G., Vittori, N. és Kandra, L. (2007). "Aleppo tannin: structural analysis and salivary amylase inhibition." Carbohydrate Research **342**(5): 717-723.

## **8.2 Az értekezés alapjául szolgáló közlemények**

### ***8.2.1 Elfogadott közlemények***

- Nielsen M. M., Bozonnet S., Seo E. S., **Mótyán J. A.**, Andersen J. M., Dilokpimol A., Abou Hachem M., Gyémánt G., Næsted H., Kandra L., Sigurskjold B. W., Svensson B. (2009) „Two secondary carbohydrate binding sites on the surface of barley alpha-amylase 1 have distinct functions and display synergy in hydrolysis of starch granules” Biochemistry **48** (32) 7686-7697.  
IF 3.226 (2009)
- Mótyán, J.A.**, Gyémánt, G., Harangi, J., Bagossi, P. (2011) „Computer-aided subsite mapping of  $\alpha$ -amylases” Carbohydrate Research **346** (3): 410-415.  
IF 2.025 (2009)

### ***8.2.2 Beküldött közlemények***

- Mótyán, J. A.**, Fazekas, E., Mori, H., Svensson, B., **Bagossi, P.**, Kandra, L., Gyémánt, G. „Transglycosylation by barley  $\alpha$ -amylase 1”  
Beküldve a Journal of Molecular Catalysis B - Enzymatic folyóirathoz 2010.12.09-én, jelenleg a bírálatok válaszainak előkészítése folyamatban van  
IF 2.4 (2009)

## **8.3 Az értekezéshez kapcsolódó konferencia prezentációk**

### ***8.3.1 Angol nyelvű előadások***

- Kandra, L., **Mótyán, J. A.**, Farkas, E., Svensson, B., Gyémánt, G. „Mapping of barley amylases - Effect of mutation on subsite maps and activities” *Carbohydrate research in Hungary Conference 2008 - Annual Meeting of the Working Group for Carbohydrate Chemistry of the Hungarian Academy of Sciences*, Mátrafüred, Hungary, 2008.05.29–30.
- Mótyán, J.A.**, Gyémánt, G., Kandra, L., Bagossi, P., Harangi, J. „Examination of the substrate binding sites of  $\alpha$ -amylase enzymes” *2nd Molecular Cell and Immune Biology Winter School*, Krompachy, Slovakia, 2009.01.06–09.
- Mótyán, J.A.**, Fazekas, E., Svensson, B., Kandra, L., Gyémánt, G. „Transglycosylations by modified barley amylase 1 enzymes - Enzymatic synthesis of 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-maltooligosaccharides” *Carbohydrate research in Hungary Conference 2009 - Annual Meeting of the Working Group for Carbohydrate Chemistry of the Hungarian Academy of Sciences*, Mátrafüred, Hungary, 2009.05.28–29.

**Mótyán, J. A.**, Gyémánt, G., Kandra, L., Harangi, J., Bagossi, P. „Examination of the substrate binding sites of  $\alpha$ -amylase enzymes” *3rd Molecular Cell and Immune Biology Winter School*, Mariazell, Austria, 2010.01.07–10.

**Svensson, B.**, Andersen, J. M., Vester-Christensen, M. B., Jensen, J. M., Seo, E.S., Nielsen, M. M., **Mótyán, J. A.**, Kandra, L., Gyémánt, G., Haser, R., Aghajari, N., Hachem, M. A. „New insights into structure/function relationships in plant  $\alpha$ -amylase family GH13 members” *Annual Meeting of the Japanese Society of Applied Glycoscience and 17th Symposium on Amylases and Related Enzymes 2009*, (*J. Appl. Glycosci.*, Vol. 56, Suppl., 2009)

**Mótyán, J. A.**, Fazekas, E., Harangi, J., Bagossi, P., Svensson, B., Kandra, L., Gyémánt, G. „Transglycosylations by modified barley amylase 1 enzymes - Enzymatic synthesis of 4-methylumbelliferyl group-containing maltooligosaccharides as new substrates for  $\alpha$ -amylases” *Carbohydrate research in Hungary Conference 2010 - Annual Meeting of the Working Group for Carbohydrate Chemistry of the Hungarian Academy of Sciences*, Mátrafüred, Hungary, 2010.05.27–28.

**Mótyán, J. A.**, Gyémánt, G., Kandra, L., Harangi, J., Bagossi, P. „In vitro and in silico studies on  $\alpha$ -amylase enzymes” *4th Molecular Cell and Immune Biology Winter School*, Galyatető, Hungary, 2011.01.11–14.

### 8.3.2 Poszterek

**Mótyán, J. A.**, Bagossi, P., Harangi, J. „Amiláz enzimek szubsztrátkötő alhelyeinek vizsgálata molekuláris modellezéssel”, *Magyar Biokémiai Egyesület Vándorgyűlése 2007*, Debrecen, Magyarország, 2007.08.26–29.

**Mótyán, J. A.**, Fazekas, E., Harangi, J., Bagossi, P., Svensson, B., Kandra, L., Gyémánt, G. „Másodlagos szubsztrátkötő-helyek vizsgálata az árpa amilázban (AMY1)” *Magyar Biokémiai Egyesület Vándorgyűlése 2008*, Szeged, Magyarország, 2008.08.31–09.03.

**Mótyán, J. A.**, Gyémánt, G., Bagossi, P., Harangi, J. „Subsite mapping of  $\alpha$ -amylase enzymes with molecular modeling & Examination of the substrate binding sites of  $\alpha$ -amylase enzymes with molecular modeling” *4th Central European Conference "Chemistry towards Biology"*, Dobogókő, Hungary, 2008.09.08–11.

**Svensson, B.**, Vester-Christensen, M. B., Andersen, J. M., Jensen, J. M., Seo, E. S., Nielsen, M. M., **Mótyán, J. A.**, Kandra, L., Gyémánt, G., Haser, R., Aghajari, N., Henriksen, A., Hachem, M. A. „New insights in structure/function relationships involving calcium ions, proteinaceous inhibitors, and multiple surface sites in glycoside hydrolase family 13” *8th Carbohydrate Bioengineering Meeting*, Ischia, Naples, Italy, 2009.05.10–13.

**Svensson, B.**, Seo, E. S., Andersen, J. M., Nielsen, M. M., **Mótyán, J. A.**, Kandra, L., Gyémánt, G., Hachem, M. A. „Multiple surface sites and active site cross-talk in  $\alpha$ -amylase” *VIII. European Symposium of The Protein Society*, Zürich, Switzerland, 2009.06.14–18.

**Mótyán, J. A.**, Gyémánt, G., Bagossi, P., Harangi, J. „Alfa-amiláz enzimek szubsztrátkötő zsebének alhelytérképezése molekuláris modellezéssel” *Magyar Biokémiai Egyesület Vándorgyűlése 2009*, Budapest, Magyarország, 2009.08.23–26.

## **9. Tárgyszavak**

### **9.1 Tárgyszavak**

$\alpha$ -amiláz; alhelytérképezés; bontási kép; kötésasítási frekvencia; transzglikozilezés; metil-umbelliferil-glikozidok; kemoenzimátikus szintézis;  $\alpha$ -amiláz aktivitás mérés; molekuláris modellezés

### **9.2 Keywords**

$\alpha$ -amylase; subsite mapping; action pattern; bond cleavage frequency; transglycosylation; methylumbelliferyl-glycosides; chemoenzymatic synthesis;  $\alpha$ -amylase assay; molecular modeling

## 10. Rövidítések

AMY1, árpa (*Hordeum vulgare*)  $\alpha$ -amiláz 1 izoenzim;  
AMY2, árpa (*Hordeum vulgare*)  $\alpha$ -amiláz 2 izoenzim;  
BCF, „bond cleavage frequency”, kötéshasítási frekvencia;  
BAA, *Bacillus amyloliquefaciens*  $\alpha$ -amiláz;  
BLA, *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amiláz;  
BSMA, *Bacillus strearothermophilus* maltózképző („maltogenic”)  $\alpha$ -amiláz;  
CBM, „carbohydrate binding module”, szénhidrát-kötő modul;  
CNP, 2-klór-4-nitrofenil;  
DMSO, dimetil-szulfoxid;  
DP, „degree of polymerization”, polimerizáltság mértéke (oligomer tagszáma);  
 $E_{\text{SUMA}}$ , a kísérletesen meghatározott bontási képből a SUMA programmal számolt látszólagos kötési energia érték (kJ/mol);  
 $E_{\text{SYBYL}}$ , a Sybyl programmal, molekuláris modellezéssel számolt enzim-szubsztrát kölcsönhatási energia érték (kcal/mol);  
 $E_{\text{Transf}}$ , az  $E_{\text{SYBYL}}$  értékek lineáris transzformálása révén számolt kötési energia érték (kJ/mol);  
GH, „glycoside hydrolase”, glikozid hidroláz;  
 $G_n$ ,  $n$  számú glükopiranozid egységből álló maltooligoszacharid;  
G-1-P, glükóz-1-foszfát;  
HSA, „human salivary  $\alpha$ -amylase”, humán nyál  $\alpha$ -amiláz;  
HPA, „human pancreatic  $\alpha$ -amylase”, humán hasnyálmirigy  $\alpha$ -amiláz;  
MES, 2-(N-morfolin) etánszulfonsav  
MOS, maltooligoszacharid;  
MU, 4-metil-umbelliferil;  
 $\text{NaN}_3$ , nátrium-azid;  
PNP, 4-nitrofenil;  
PPA, „porcine pancreatic amylase”, sertés (*Sus scrofa*) hasnyálmirigy  $\alpha$ -amiláz;  
SUMA, „Subsite mapping of  $\alpha$ -amylases”;  
TAA, „TAKA  $\alpha$ -amylase A”, *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -amiláz;  
 $\lambda_{\text{ex}}$ , „excitation wavelength”, gerjesztési hullámhossz;  
 $\lambda_{\text{em}}$ , „emission wavelength”, fluoreszcencia kisugárzási hullámhossz.

## 11. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni Prof. Fésüs Lászlónak, hogy lehetővé tette, hogy munkámat a DE OEC Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézetében végezzem és Prof. Tózsér Józsefnek, hogy kutatócsoportjában, a Retrovirális Biokémiai Laboratóiumban dolgozhattam! Köszönettel tartozom Dr. Bagossi Péter témavezetőmnek, hogy lehetővé tette, hogy csatlakozzak a Szerkezeti Biológiai és Bioinformatikai Csoporthoz és mindenben támogatott, segítette és irányította munkámat!

Köszönettel tartozom Dr. Harangi János témavezetőmnek, hogy lehetővé tette, hogy munkámat a DE TEK TTK Biokémiai Tanszékén végezzem és mindenben támogatott! Köszönet illeti Dr. Gyémánt Gyöngyit és Dr. Kandra Lilit, akik támogattak, az  $\alpha$ -amilázok vizsgálatával kapcsolatos kísérletes vizsgálatokat irányították és mindenben segítettek munkámat! Köszönettel tartozom Fazekas Erikának a kísérletes munkában nyújtott segítségéért!

Köszönet a Retrovirális Biokémiai Laboratóium valamint a Biokémiai Tanszék minden dolgozójának segítőkész munkájukért és a nyugodt, kellemes légkörért, amiben dolgozhattam!

Köszönettel tartozom továbbá az együttműködő kollégáknak a munka elvégzéséhez nyújtott segítségért: Dr. Jánossy Lórántnak a maltoooligomerekért, Prof. Somsák Lászlónak az akceptor molekulákért, a Dr. Dombrádi Viktornak a glikogén foszforiláz *b* enzimért, Dr. Kwan-Hwa Parknak a *Bacillus stearothermophilus*  $\alpha$ -amilázért, Prof. Birte Svenssonnak az AMY1 mutánsokért és a közös munkákban nyújtott segítségért és Prof. Batta Gyulának az NMR vizsgálatok elvégzéséért!

Köszönöm a támogatást Barátaimnak!

Köszönöm Barátnőmnek, Szüleimnek, Nagyszüleimnek és Testvéreimnek azt a rengeteg segítséget, biztatást, megértést, türelmet, szeretetet és támogatást, amit kaptam Tőlük, és ami nélkül ez a dolgozat nem születhetett volna meg!

## 12. Függelék

### 12.1 A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár által hitelesített publikációs lista

#### 12.2 Az értekezés alapjául szolgáló közlemények különlenyomatai

Nielsen M. M., Bozonnet S., Seo E. S., **Mótyán J. A.**, Andersen J. M., Dilokpimol A., Abou Hachem M., Gyémánt G., Næsted H., Kandra L., Sigurskjold B. W., Svensson B. (2009) „Two secondary carbohydrate binding sites on the surface of barley alpha-amylase 1 have distinct functions and display synergy in hydrolysis of starch granules” Biochemistry **48** (32) 7686-7697.

IF 3.226 (2009)

**Mótyán, J.A.**, Gyémánt, G., Harangi, J., Bagossi, P. (2011) „Computer-aided subsite mapping of  $\alpha$ -amylases” Carbohydrate Research **346** (3): 410-415.

IF 2.025 (2009)

Jelölt: Mótyán János András

Neptun kód: C1WOPZ

Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológiai Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Mótyán, J.A.**, Gyémánt, G., Harangi, J., Bagossi, P.: Computer-aided subsite mapping of alpha-amylases.  
*Carbohydr. Res.* 346 (3), 410-415, 2011.  
IF:2.025 (2009)  
DOI: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.carres.2010.12.002>
2. Nielsen, M.M., Bozonnet, S., Seo, E.S., **Mótyán, J.A.**, Andersen, J.M., Dilokpimol, A., Abou Hachem, M., Gyémánt, G., Naested, H., Kandra, L., Sigurskjold, B.W., Svensson, B.: Two Secondary Carbohydrate Binding Sites on the Surface of Barley alpha-Amylase 1 Have Distinct Functions and Display Synergy in Hydrolysis of Starch Granules.  
*Biochemistry.* 48 (32), 7686-7697, 2009.  
IF:3.226  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/bi900795a>

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2011.02.24

