

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**α -Amilázok termékanalízisen és
molekuláris modellezésen alapuló alhelytérképezése és
transzglikozidáz aktivitásuk vizsgálata**

Mótyán János András

Témavezető: Dr. Bagossi Péter
Dr. Harangi János



DEBRECENI EGYETEM

Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

Debrecen, 2011

**α -Amilázok termékanalízisen és
molekuláris modellezésen alapuló alhelytérképezése és
transzglykozidáz aktivitásuk vizsgálata**

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta:

Mótyán János András

okleveles molekuláris biológus / biokémikus

Készült a

Debreceni Egyetem

Molekuláris Sejt- és Immunbiológia

doktori iskolája keretében

Témavezető: Dr. Bagossi Péter, Ph.D.

Dr. Harangi János, Ph.D.

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Fésüs László, akadémikus

tagok: Prof. Dr. Dombrádi Viktor, az MTA doktora
Dr. Nyitray László, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja:

2011.05.13. 11:00

Az értekezés bírálói:

Dr. Forró Enikő, Ph.D.

Dr. Komáromi István, Ph.D.

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Fésüs László, akadémikus

tagok: Prof. Dr. Dombrádi Viktor, az MTA doktora
Dr. Forró Enikő, Ph.D.
Dr. Komáromi István, Ph.D.
Dr. Nyitray László, az MTA doktora

Az értekezés védésének időpontja:

2011.05. 13. 13:00.

I. sz. Belgyógyászati Klinika tanterme

1. Bevezetés

1.1 α -Amilázok előfordulása és jelentősége

Az α -amilázok széles körben elterjedt enzimek, melyek csaknem minden élő szervezetben megtalálhatóak: *Archea* fajokban, 0 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 α -amilázok jelentőségét széleskörű felhasználásuk is mutatja. A világszerte ipari felhasználás céljából előállított enzimek megközelítőleg 30%-át az α -amilázok teszik ki. Az iparban a keményítő ipari méretű hidrolízisére használnak elsősorban mikrobiális eredetű α -amilázokat. Nélkülözhetetlen enzimek számos, a keményítő felhasználásán alapuló eljárás során az élelmiszeriparban, a papíriparban, a tisztítószer gyártásában, a textiliparban, a szennyvízkezelési eljárásokban és a bioüzemanyagok előállításában. A keményítő hidrolízise révén keletkező termékegyes összetétele nagyban függ az enzim eredetétől, specificitásától, pH és hőmérsékleti optimumától, ezért az utóbbi években számos törekvés irányult az ipari felhasználású enzimek tulajdonságainak és termékmintázatának célzott megváltoztatására. Az árpa (*Hordeum vulgare*) α -amiláz izoenzimek (AMY1 és AMY2) szerepe söripari felhasználásuk miatt jelentős. Az emberi szervezetben a humán nyál α -amiláz (HSA) és a humán pankreász α -amiláz (HPA) enzimek felelősek a táplálékkal felvett szénhidrátok emésztéséért. A szérumban és a vizeletben mérhető α -amiláz szint meghatározása fontos a hasnyálmirigyet és a nyálmirigyeket érintő rendellenességek és bizonyos betegségek diagnosztizálásában. Az α -amilázok gátlása fontos lehet a vércukorszint csökkentésére irányuló diétás étrend kialakításakor. Az emésztőrendszerből felszívódó szénhidrátok mennyiségének csökkentése fontos például a *hyperglycaemia*, a diabetes és az elhízás kezelésében is, amire α -amiláz inhibitorokat is használhatnak, ezért az α -amilázok a gyógyszertervezés célpontjai.

1.2 α -Amilázok működése

Az α -amilázok (α -1,4-glükán-4-glükánhidrolázok; EC 3.2.1.1) a glikozid hidroláz enzimek 13. családjába tartoznak (GH13) és a GH70. és GH77. családokkal együtt alkotják a glikozid hidrolázok H klánját, melyet más néven α -amiláz családnak is neveznek.

Az α -amilázok a keményítő és a keményítővel rokon szerkezetű poli- és oligoszacharidok α -(1 \rightarrow 4) glikozidos kötéseinek hidrolízisét katalizálják az α -anomer

konfigurációt megtartó mechanizmussal. Az *endo* módon történő támadás révén a lánc belsejében lévő glikozidos kötéseket az α -anomer konfiguráció megtartásával hasítják (retenciós mechanizmus), tehát az α -(1 \rightarrow 4) kötések hidrolíziséből α -anomer konfigurációjú mono- vagy oligoszacharidok szabadulnak fel. Katalitikus mechanizmusuk kettős behelyettesítésen alapul („double displacement mechanism”). A glikozidos kötések hidrolízise megfordítható folyamat, így a glikozidázok nemcsak a glikozidos kötések hidrolízisét katalizálhatják, hanem képesek azok létrehozására is. Az utóbbi években számos esetben alkalmaztak α -amiláz enzimeket oligoszacharidok szintézisére, mert a kemoenzimátikus módszerrel, transzglykozilezéssel történő szintézis egyszerű módon teszi lehetővé jól definiált oligoszacharidok előállítását.

Az AMY1 α -amiláz esetében számos 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. A vad típusú és a mutáns AMY1 α -amilázok esetében is tapasztaltak transzglykozilezést, azonban az AMY1 és az AMY2 esetében sem tanulmányozták részletesebben a transzferáz aktivitást és annak felhasználhatóságát enzimátikus szintézisekben.

1.3 α -Amilázok szerkezete

Az α -amilázok egyetlen polipeptidláncból álló enzimfehérjék. Harmadlagos szerkezetük alapját a $(\beta/\alpha)_8$ -hordó szerkezetű katalitikus domén (A domén) képezi. A B domén az A doménbe illeszkedik és a $(\beta/\alpha)_8$ -hordó szerkezet β 3-redője és α 3-hélice közötti hurokrégióban helyezkedik el. Az A és B domén közötti árokban található szubsztrátkötő helyeket a hordó szerkezetet alkotó β -redőket és α -héliceket összekötő hurokrégiókban elhelyezkedő aminosav oldalláncok alakítják ki. A katalitikus aminosavak szintén ezekben a hurokrégiókban helyezkednek el. Az enzimek specifitása közötti különbségek a szubsztráttal való kölcsönhatások kialakításáért felelős hurokrégiókon belüli eltérésekből és a B domén hosszúságának, szekvenciájának és másodlagos szerkezetének eltéréseiből is adódnak. A fehérje C terminális részén helyezkedik el a C domén, közvetlenül az A domént követően. A C domén önálló katalitikus aktivitással nem rendelkezik, de fontos szerepe van a fehérjeszerkezet stabilitásának kialakításában és foldingjában, továbbá az enzim-szubsztrát kölcsönhatások kialakításában.

1.4 α -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, Davies és munkatársai által bevezetett nevezéktan szerint 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. A szubsztrátkötő hely kialakításáért felelős hurokrégiók nagymértékű változatosságot mutatnak az α -amilázok között, a szubsztrátkötő árok szerkezete, a szubsztrátkötő alhelyek száma és azok felépítése az egyes enzimekre jellemző tulajdonság. 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 megfelelő szubsztrátokra van szükség. Ilyenek a 2-klór-4-nitrofenil maltooligoszacharidok (CNP- β -D-MOS) is, melyek vízben jól oldódó, kis molekulatömegű, jól azonosítható, kromogén molekulák. A hasítási terméket adó, azaz produktív kötőmódban kötődő oligomer szubsztrátok valamely α -glikozidos kötése átfedi a hasítási helyet, ami a kötés hidrolíziséhez vezet. Az *endo* módon ható enzimek esetében a láncon belüli kötések hasítása, a különböző kötési módoknak köszönhetően összetett termékmintázatot eredményez. A bontási kép alapján meghatározható a különböző produktív komplexek kötéshasítási gyakorisága, mely felhasználható lehet az alhelyek kötési energiáinak meghatározására. A SUMA („Subsite mapping of α -amylases”) szoftver az oligomer szubsztrátok kötéshasítási frekvenciáit használja az alhelytérképek számításához, mely az Allen és Thoma által kidolgozott termékmintázat-elemzésen alapuló módszerre épül. Megadja az alhelyek számát, a hasítóhely pozícióját és az egyes szubsztrátkötő alhelyek látszólagos kötési energia értékeit. 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 változik a termékmintázat, ezért a megváltozott bontási képekből számolt energiaértékek eltérnek a vad típusú enzimétől, tehát az aminosavcserék az enzim alhelytérképének megváltozását is okozzák. A kötéshasítási frekvenciákon alapuló alhelytérképezés módszerét számos vad típusú és mutáns α -amiláz enzim esetében alkalmazták már sikeresen.

1.5 Az AMY1 szubsztrátkötő helyei

Az AMY1 fehérje felszínén elhelyezkedő hosszú szubsztrátkötő árok 8 glikon és 4 aglikon-kötő helyet tartalmaz a 12 alhelyből álló alhelymodellnek megfelelően. A szubsztrátkötő árok végein a glikon és az aglikon-kötő helyeket gátalhelyek szegélyezik (-8) (+3) (+4), további belső gátalhelyek találhatók a -5 és a -3 alhelyeken. A nagy affinitású -6 alhelyen (-12,4 kJ/mol) a 105 oldallánc hidrofób kölcsönhatás révén rögzíti a szubsztrát glükóz gyűrűjét, míg a T212 a +4 alhely kialakításáért felelős. A V47 és Y105 aminosavak együttesen koordinálják a szubsztrát aktív helyre történő belépését. A szubsztrát oligomer itt mintegy félkör-alakban veszi körül a V47 és az S48 aminosavakat, ezért mindkét aminosav több glikonkötő alhely kialakításában is szerepel.

Az amilolitikus enzimek nemcsak a szubsztrátkötő árokban, hanem az aktív helytől távolabb, az enzimmolekula felszínén elhelyezkedő másodlagos kötőhelyeken is létesíthetnek kölcsönhatást a szubsztráttal. Az AMY1 aktív helyétől távol további szénhidrátkötő helyek találhatók: a keményítő szemcse-kötő hely („starch granule binding site”) és a cukorcspesz („a pair of sugar tongs”). Ezek önálló katalitikus aktivitással nem rendelkeznek, de a szubsztráttal kialakított többszörös kölcsönhatások révén fontos szerepük van az enzim működésében. A keményítő szemcse-kötő helyen a szubsztráttal való „stacking” kölcsönhatások kialakításáért a W278 és W279 aminosavak felelősek, míg a cukorcspesz kötőhelyen a Y380 és a H395 aminosavak kulcsfontosságúak.

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 kovalens módosításokkal történő megváltoztatása. A módosítást követően elvégzett aktivitás- és kinetikai mérések információt adnak a módosított aminosavak enzimműködésben betöltött szerepéről. Az aktív centrum térképezés módszere az egyes módosítások kötőhelyesítési frekvenciákra vagy kötési energiákra gyakorolt hatásának kimutatására alkalmas. További hatékony módszer az enzim szubsztráttal vagy inhibitorral kristályosított komplexéről készült kristályszerkezeti adatok elemzése. Az enzimfehérjék háromdimenziós (3D) szerkezetének molekuláris modellezéssel történő analízise lehetőséget biztosít a szubsztrát kötésében szereplő aminosavak felderítésére és az enzim és a szubsztrát közötti kölcsönhatások vizsgálatára. Számos esetben használtak bioinformatikai módszereket az α -amilázok vizsgálatára, azonban nem ismert olyan eljárás, mely a röntgenkristallográfias szerkezeteik vagy a homológ modelljeik felhasználásával tenné lehetővé az enzim-szubsztrát kölcsönhatások kvantitatív meghatározását.

2. Célkitűzések

A doktori munka során az alábbi célokat fogalmaztuk meg:

- I.) Az árpa α -amiláz 1 (AMY1) felszínén, az aktív helytől távol elhelyezkedő másodlagos szubsztrátkötő helyek kulcsfontosságú aminosavait (W278, W279, Y380 és H395) érintő mutációk hatásának vizsgálata kísérletes módszerrel történő alhelytérképezéssel.
- II.) Az AMY1 aktív centrumában található V47 és S48 aminosavak mutációját tartalmazó mutáns enzimek 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 α -amiláz enzimek fluorometriás 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.

3. Anyagok és módszerek

3.1 Felhasznált anyagok

A kísérletek során használt maltooligoszacharid (MOS) és akceptor molekulák nagy részét a SIGMA-tól vásároltuk, másik részét együttműködő partnereink bocsátották rendelkezésünkre. A 2-klór-4-nitrofenil- β -D-maltooligoszacharid (CNP- β -D-MOS) szubsztrát-sorozatot kemoenzimatiszintézissel állítottam elő glikogén foszforiláz *b* által katalizált reakcióval, a korábban publikált eljárások alapján. A 4-metil-umbelliferil-maltooligoszacharidokat (MU- α - és β -D-MOS) az értekezésben bemutatott eljárás alapján állítottuk elő kemoenzimatiszintézissel. A vad típusú és valamennyi mutáns árpa α -amiláz 1 izoenzimet (AMY1) Prof. Birte Svensson (Enzyme and Protein Chemistry, Department of Systems Biology, Technical University of Denmark) bocsátotta rendelkezésünkre: AMY1, Y105A, Y380A, Y105A/Y380M, H395A, Y380A/H395A, W279A, W278A/Y380A, W279A/Y380A, V47A, V47F, V47D, S48Y, V47K/S48G, V47G/S48D, V47L/S48A és V47I/S48I. A *Bacillus licheniformis* α -amilázt (BLA) és a humán nyál α -amiláz (HSA) a SIGMA-tól vásároltuk. A *Bacillus stearothermophilus* hőstabil maltózképző α -amilázt (BSMA) együttműködő partnerük bocsátotta rendelkezésünkre.

3.2 Módszerek

3.2.1 CNP csoporttal jelölt maltooligoszacharid szubsztrátsorozat előállítás

A CNP-MOS szubsztrátok szintézise glikogén foszforiláz *b* által katalizált enzimatiszintézissel történt a korábban publikált eljárások alapján. A foszforolízis reakcióval előállított 3–6 tagszámú maltooligomerek folyadékromatográfiával (Hewlett-Packard 1090 Series II HPLC) történő elválasztásához és tisztításához Supelcosil LC-18 félpreparatív oszlopot (5 μ m, 250*10 mm), a transzglykozilációval előállított 8–12 tagszámú szubsztrátok elválasztásához és tisztításához Hypersil NH₂ aminopropil-szilika félpreparatív oszlopot (5 μ m, 250*10 mm) használtam. A CNP-glikozidok detektálása 302 nm hullámhosszon történt.

3.2.2 Bontási képek meghatározása

A bontási képeket a 3–11 tagszámú CNP- β -D-MOS szubsztrátok megfelelő konverziója mellett mért termékarányok segítségével határoztuk meg. A hidrolízissel és transzglykozilációval keletkező CNP-glikozidokat HPLC technikával, ZORBAX Eclipse XDB-

C18 fordított fázisú oszlop (5 μm , 150*4,6 mm) segítségével választottuk el. A keletkezett termékek hidrolízissel vagy transzglykozilezéssel történő átalakításának elkerülésére a bontási képeket a szubsztrát $\leq 10\%$ konverziója mellett határoztuk meg. A termékek egymáshoz viszonyított arányát a kromatogramok csúcs alatti terület értékei alapján határoztuk meg.

3.2.3 Számítások a SUMA számítógépes programmal

Az alhelytérképek és a bontási képek számítását a SUMA szoftver segítségével végeztem el, Windows operációs rendszeren, egységes paraméterbeállítások mellett. Az alhelyek látszólagos kötési energiájának (E_{SUMA}) számítása a bontási képek alapján történt. A bontási képek számítása során az alhelykötési energiaértékek képezték a beviteli adatot.

3.2.4 Transzglykozilezés reakciók

A transzglykozilezéssel történő enzimatiszintézis reakció paramétereinek optimalizálása során különböző akceptor és donor molekulákat is teszteltünk. Az enzimreakció során felszabaduló termékek HPLC elválasztása ZORBAX Eclipse XDB-C18 oszlop (5 μm , 150*4,6 mm) és/vagy Supelcosil C18 oszlop (3 μm , 150*4,6 mm) segítségével történt. A transzglykozilezés mértékének megállapítására az akceptor konverziójának értékét használtuk. A 4-nitrofenil-glikozidok detektálása 302 nm, a MU-glikozidok detektálása 317 nm hullámhosszon történt.

3.2.5 MU csoporttal jelölt maltooligoszacharid szubsztrátsorozat előállítása

A MU- α -D-MOS oligomerek preparatív méretű enzimatiszintézisét MU- α -D-G1 akceptor és G7 jelenlétében, a V47F AMY1 mutáns által katalizált reakcióval végeztük. A MU- α -D-MOS sorozat tagjait YMC-Pack Polyamine II. kolonna (5 μm , 250*4,6 mm) használatával választottuk el és tisztítottuk.

3.2.6 Kinetikai mérések MU-MOS szubsztrátokkal

A HSA fluorometriás aktivitásmérése során MU- α -D-G3, a BLA esetében MU- α -D-G5 és a BSMA esetében MU- α -D-G2 szubsztrátokat használtunk. A felszabaduló fluorofor csoport detektálása 355 nm gerjesztési és 460 nm kisugárzási hullámhossz használatával, Wallac VICTOR² 1420 fluoriméter-luminométer (PerkinElmer Inc.) készüléken történt. A kinetikai paraméterek meghatározásához a GRAFIT (Erithacus Software Ltd.) szoftvert használtuk.

3.2.7 ^1H és ^{13}C NMR analízisek

Az MU-MOS molekulák vizsgálata, az anomer konfiguráció valamint az interglikozidos kötés típusának megállapítása NMR spektroszkópia segítségével történt, Bruker DRX-500 spektrométerrel. A ^1H és ^{13}C NMR méréseket és a spektrumok kiértékelését Prof. Batta Gyula végezte a DE TEK TTK Szerves Kémiai Tanszékén.

3.2.8 Tömegspektrometriás mérések (MALDI-TOF MS)

Az MU-MOS molekulák molekulatömeg szerinti azonosítását Bruker Biflex III MALDI-TOF tömegspektrometrométerrel végeztük a DE TEK TTK Alkalmazott Kémiai Tanszékén végeztük.

3.2.9 Alhelytérképezés molekuláris modellezéssel

Az enzim és a szubsztrát közötti kölcsönhatási energiák számításához alkalmas 3D modelleket a vad típusú és/vagy módosított α -amiláz enzimekről készült kristályszerkezeti adatokból kiindulva építettük fel. A fehérjékre vonatkozó adatokat a Fehérje adatbázisból („Protein Data Bank”) és a UniProt adatbázisból töltöttük le. A kötési energia számításokhoz használt 3D szerkezetek felépítése a Sybyl programcsomag (Tripos International) segítségével történt. A számításokat és a modellek megjelenítését Silicon Graphics Fuel munkaállomáson végeztük (Silicon Graphics International). Az ábrák készítéséhez a Sybyl és a VMD („Visual Molecular Dynamics”) szoftvereket használtuk.

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

A *maltooligoszacharid szubsztrátmolekula modelljének felépítése* (1. lépés) során az enzim természetes szubsztrátjával azonos szerkezetű, α -(1 \rightarrow 4) glikozidos kötéseket tartalmazó maltooligoszacharid molekulát építettünk fel és a felépített szerkezetet rövid energia-minimalizálással finomítottuk (Powell iterációk száma: 20, dielektromos állandó: 1, AMBER7_FF99 erőtér („force field”). Az *enzim-szubsztrát komplexek létrehozása* (2. lépés) során a szubsztrátot beillesztettük az enzim szubsztrátkötő zsebébe. A mutáns enzimek homológ modelljeinek létrehozása során a vad típusú enzim megfelelő aminosav oldalláncait módosítottuk. A megfelelő módosítások elvégzését és egy rövid minimalizációs procedúrát követően (Powell iterációk száma: 100, dielektromos állandó: 1, erőtér: AMBER7_FF99, csak a módosított oldalláncok és a szubsztrát molekula 8 Å környezetén belüli atomok minimalizálása) az *enzim-szubsztrát közötti kölcsönhatási energiáinak számítása* (3. lépés) a

teljes molekula minimalizálásával történt (Powell iterációk száma: 100, dielektromos állandó: 1, erőtér: AMBER7_FF99, nem-kötő kölcsönhatások határtávolság értéke: 8 Å („cutoff”)). A minimalizálás után minden szubsztrátkötő alhely esetében kiszámítottuk az egyes glükóz monomer egységek és az enzim közötti kölcsönhatási energiákat (E_{SYBYL}). Az *adatok feldolgozása* során (4. lépés) elvégeztük a kísérletesen meghatározott bontási képből a SUMA programmal számolt látszólagos kötési energia értékek (E_{SUMA}) és a Sybyl programmal molekuláris modellezéssel számolt enzim-szubsztrát kölcsönhatási energia értékek (E_{SYBYL}) közötti lineáris regressziós analízist. A jóslott értékek pontosságának megállapítására a pontokra illesztett regressziós egyenes korreláció koefficiens (r^2) értékét használtuk. Az E_{SYBYL} értékeket lineáris transzformációval az E_{SUMA} értékekkel (kJ/mol) azonos nagyságrendű energiákká ($E_{\text{Transf.}}$) alakítottuk. 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 enzimek modelljeinek összehasonlítását a Sybyl program segítségével végeztük el, Silicon Graphics Fuel munkaállomáson.

4. Eredmények és megbeszélés

4.1 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 termékanalízis módszerével megállapítható a hidrolízissel valamint a transzglykozilezéssel felszabadított termékek mennyiségének változása és kiszámítható a mutáció alhelykötési energiákra gyakorolt hatása is. Ezért az aktív centrum térképezés módszere alkalmas a másodlagos kötőhelyeket érintő mutációk hatásának kimutatására.

A keményítő szemcse-kötő hely és a cukorcipesz kulcsfontosságú aminosavainak mutációit tartalmazó W279A, W278A/Y380A, W279A/Y380A, Y380A, H395A, H395A/Y380A és Y105A/Y380M egyszeres és kétszeres AMY1 mutánsok vizsgálata során az alhelytérképeket a bontási képek alapján számítottuk ki, a 8 glikon és 4 aglikon-kötő helyből álló alhelymodell megtartásával. A bontási képek nem mutattak jelentős különbséget a vad típus és mutánsai között. Az Y105A/Y380M mutáns esetében tapasztalt jelentős változások arra utalnak, hogy a Y105-t érintő mutáció hatása érvényesül az Y380M mutáció hatásával szemben. Irodalmi adatokból ismert volt, hogy az AMY1 képes transzglykozilezésre. A CNP-G4 szubsztráton mért reakcióban, a szubsztrát $\leq 10\%$ konverziója mellett is tapasztaltuk transzfer termékek felszabadulását, a termékek 8%-a keletkezett transzglykozilezéssel. A bontási képek meghatározásakor minden mutáns enzim esetében tapasztaltuk a transzglykozilezés mértékének növekedését, a kisebb és a nagyobb tagszámú szubsztrátok esetében is tapasztaltuk transzfer termékek felszabadulását. A cukorcipesz mutánsok alhelytérképei esetében tapasztaltuk a legnagyobb mértékű változásokat. Az egyes kötési energiák kismértékű változásának együttes hatásaként az Y380A 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). A keményítő szemcse-kötő hely mutánsok (W279A, W278A/Y380A és W279A/Y380A) alhelytérképe és bontási képe is a vad típusú enziméhez hasonlóan adódott.

Munkánk során a CNP- β -D-MOS szubsztrátok termékanalízisének alapul szolgáló alhelytérképezés módszerét használtuk az AMY1 aktív helyétől távol elhelyezkedő aminosavakat érintő mutációk hatásának kimutatására. Elvégeztük a W279A, W278A/Y380A, W279A/Y380A, Y380A, H395A, H395A/Y380A és Y105A/Y380M AMY1 másodlagos kötőhely-mutánsok aktív centrumának térképezését.

4.2 Az AMY1 aktív hely mutánsainak vizsgálata

Az S48Y, V47A, V47F, V47D, V47K/S48G, V47G/S48D, V47I/S48I és V47L/S48A AMY1 aktív hely mutánsokat Prof. Birte Svensson és munkatársai állították elő random mutagenézissel a V47 és S48 aminosavak szerepének tanulmányozása céljából. Munkánk során ezen AMY1 mutánsok aktív centrumának térképezését végeztük el, melynek során a bontási képekből kiszámítottuk az alhelytérképeket a 12 alhelyből álló modellnek megfelelően.

A mutációk hatására a preferált kötési módok jelentős mértékű megváltozását tapasztaltuk, ami az alhelykötési energiák megváltozásával magyarázható. Az alhelyek energiaváltozásai együttesen a termékmintázat, azaz a rövidebb és a hosszabb termékek egymáshoz viszonyított arányának megváltozását okozták. A bontási képek meghatározása során, a szubsztrátok $\leq 10\%$ konverziója mellett is tapasztaltunk transzglikozilezést. A módosított enzimek mindegyike nagyobb mennyiségű transzfer terméket szabadított fel a CNP-G4 szubsztráttal végzett reakciók során, mint a vad típusú enzim, valamint a kisebb és nagyobb tagszámú oligomer szubsztrátok esetében is tapasztaltuk transzfer termékek felszabadulását.

Az aktív hely mutánsok esetében az egyes alhelyek energiáinak és az összenergia értékének nagymértékű változását tapasztaltuk. Csaknem minden mutáns enzim esetében tapasztalható a -7 és a nagy energiájú -6 alhely energiájának kisebb vagy nagyobb mértékű csökkenése. Az AMY1 nagy energiájú -6 alhelye ($-12,40$ kJ/mol) az S48Y esetében gyakorlatilag megszűnik ($-1,13$ kJ/mol). Ugyancsak általánosan megfigyelhető a hasítóhely melletti $+2$ és -2 alhelyek energiájának növekedése is. Ezek a hatások csaknem minden mutáns enzim esetében a szubsztrátspecifititás megváltozását okozták. Az aktív centrum nagy és alacsony affinitású alhelyeinek, valamint a gátalhelyeknek az eloszlása határozza meg a produktív komplexek kialakulásának és ezáltal a különböző tagszámú szubsztrátok hidrolízisének sebességét. A -6 alhely nagy affinitása révén erőteljes horgonyzó hatást gyakorol a szubsztrát oligomerre és ezzel koordinálja a hosszabb szubsztrátok bekötődését, a hasítóhely melletti -2 és $+2$ alhelyek nagy affinitása pedig a rövidebb szubsztrátok kötéséért felelős. Míg a vad típus esetében a hosszabb szubsztrátok bekötődését a nagy energiájú -6 és $+2$ alhelyek koordinálják, addig a mutánsok esetében a horgonyzó hatás (-6 alhely) gyengülése vagy megszűnése miatt változik a különböző tagszámú szubsztrátok hidrolízisének sebessége. Míg a vad típus esetében a CNP-G7 hidrolíziséhez szükséges reakcióidő igen rövid, addig a rövidebb szubsztrátok átalakításához hosszabb időre van szükség ($v_{\text{CNP-G4}}/v_{\text{CNP-G7}} = 0,08$). A preferált kötőmódok megváltozása miatt a mutánsok esetében a rövidebb szubsztrátok

hidrolízise gyorsabb, a V47F esetében a CNP-G4 iránti affinitás növekedését tapasztaltuk ($v_{\text{CNP-G4}}/v_{\text{CNP-G7}} = 22$).

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. Továbbá a V47 kiemelkedő szerepet tölt be a glikon-kötő alhelyeken, ugyanis az Y105 aminosavval együtt a szubsztrát aktív helyre történő belépését koordinálja.

Munkánk során elvégeztük 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 fontos információkkal szolgálnak a szerkezet-funkció összefüggések vizsgálatában. Adatainkat felhasználtuk az AMY1 enzimek transzferáz aktivitásának tanulmányozása során és a molekuláris modellezésen alapuló számítógépes eljárás ellenőrzéséhez szükséges ellenőrző halmaz létrehozásához is.

4.3 Vad típusú és mutáns AMY1 enzimek transzferáz aktivitásának vizsgálata

Az AMY1 mutánsok a bontási képek meghatározása során a transzglykozidáz aktivitás megnövekedését mutatták. A korábban, más α -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. Ezért az aktív helyen módosított AMY1 enzimeket metil-umbelliferil csoporttal jelölt maltooligomerek transzglykozilezéssel történő szintézisére használtuk fel. Az előállított molekulákat szubsztrátként alkalmaztuk különböző α -amilázok fluoreszcens módszerrel történő enzimkinetikai méréseiben.

4.3.1 A szubsztrátkötő alhelyek mutációjának hatása az AMY1 transzferáz aktivitására

Annak érdekében, hogy megállapítsuk az AMY1 és aktív hely mutánsainak enzimatis transzglykozilezésekben való felhasználhatóságát, a transzglykozidáz aktivitását szisztematikusan vizsgáltuk, különböző körülmények változtatásával. Elvégeztük a transzglykozilezésben felhasználható donor és akceptor molekulák ellenőrzését. Megállapítottuk, hogy csak az ekvatoriális pozíciójú 4-OH csoportot tartalmazó molekulák alkalmasak akceptornak, valamint, hogy a β - és az α -glikozidos kötéssel kapcsolt kromofor csoportot tartalmazó glikozidok egyaránt jól felhasználhatóak akceptorként. A maltotetraóz (G3),

maltopentaóz (G5) és maltoheptaóz (G7) molekulák is jó donoroknak bizonyultak a vizsgált enzimek számára (AMY1, Y105A, V47F, S48Y, V47K/S48G és V47G/S48D). A mutációk hatására az azonos reakciókörülmények között végzett reakcióban a transzglykozilezéssel keletkezett termékek mennyiségének növekedését és a termékmintázat megváltozását is tapasztaltuk.

4.3.2 Transzglykozilezés a V47F AMY1 enzimmel - a reakciókörülmények optimalizálása

A MU-MOS molekulák potenciálisan jó szubsztrájai az α -amiláz enzimeknek. Elérhetőségük korlátozott, kereskedelmi forgalomban csak a MU- α - és β -D-glükopiranozid kapható, ezért szükség volt a MU- α -D-MOS szubsztrátok előállítására és a transzferáz reakció paramétereinek optimalizálására.

A szintézis reakció körülményeinek optimalizálásához a MU- β -D-G1 akceptort választottuk, mivel az α -amilázok nem képesek a β -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- β -D-MOS szubsztrátokkal végzett hidrolitikus reakciókban a mutáns enzimek transzferáz aktivitásának nagymértékű növekedését tapasztaltunk a vad típusú enzimhez képest, azonban a transzferáz reakciók tanulmányozásakor, a megfelelő akceptor molekula jelenlétében nem tapasztaltunk ugyanilyen mértékű különbségeket az enzimek között. Az enzimatis szintézist a V47F AMY1 mutáns által katalizált transzglykozilezés reakcióval végeztük el. Az optimalizálás során a MU- β -D-G1 akceptort (4, 8, 12 és 15 mM) és a G7 donor molekulákat (10–40 mM) különböző koncentrációkban teszteltük, ellenőriztük a pH (pH 4,5–6,5) és a DMSO koncentráció (10–40 %) változtatásának transzglykozilezési reakcióra gyakorolt hatását. NMR vizsgálatok segítségével megállapítottuk, hogy a módosított AMY1 enzim a mutációt követően is megőrizte sztereo- és regioszelektivitását.

4.3.3 Transzglykozilezés a V47F AMY1 enzimmel - a preparatív méretű szintézis

A MU- α -D-MOS molekulák preparatív méretű szintézisét V47F AMY1 által katalizált transzglykozilezéssel végeztük el. A reakcióban 2–6 tagszámú MU- α -D-MOS termékek keletkeztek, melyeket félpreparatív HPLC segítségével választottunk el és tisztítottunk. A szintézis reakció eredményeként fő terméként MU- α -D-G2 szabadult fel (64,1 %), mely feltehetően a transzferáz reakció mellett a hosszabb transzfer termékek másodlagos támadása révén hidrolízissel is keletkezett. A legnagyobb tagszámú termék (MU- α -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 molekulatömegek segítségével sikeresen azonosítottuk. Az enzimátikus szintézis reakció eredményeként a 2–5 tagszámú MU- α -D-maltooligoszacharidok tiszta frakcióit sikerült előállítani. A MU-maltooligoszacharidok nem kaphatóak kereskedelmi forgalomban, ezért a bemutatott eljárás alkalmazható lehet ezen molekulák előállítására és megoldást jelenthet elérhetőségükre.

4.3.4 Kinetikai mérések fluoreszcens szubsztrátokkal

Az enzimátikus transzglikozilezéssel előállított MU- α -D-MOS szubsztrátokat a BSMA, HSA és a BLA α -amilázok aktivitásméréséhez használtuk fel. A módszer az egyes enzimek alhelytérképei alapján kiválasztott szubsztrátok használatán alapul. A szubsztrátok bekötődését az aktív hely nagy energiájú alhelyei koordinálják, így az enzim a megfelelő tagszámú szubsztrátot olyan módon köti, hogy a szubsztrát metil-umbelliferil csoportját rögzítő α -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 4-metil-umbelliferonnal végzett kalibráció során a mérhető fluoreszcens jel nagysága és a felszabaduló MU csoport mennyisége közötti erős korrelációt tapasztaltunk ($r^2 = 0,999$), ami alapján megállapítottuk, hogy a módszer alkalmas a MU- α -D-MOS szubsztrátok hidrolízisével felszabadított fluorofor csoport mennyiségének meghatározására. Megállapítottuk, hogy az enzimek csak a MU csoportot hasítják le a szubsztrátról, HPLC-vel történő ellenőrzéssel nem észlelhető más termék felszabadulása a reakcióban és a felszabaduló metil-umbelliferon mennyisége arányos volt a szubsztrát koncentrációjával. 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 paramétereit. A fluoreszcens módszer nagyszámú minta egyszerű és gyors vizsgálatát teszi lehetővé és széles körben alkalmazható lehet α -amiláz enzimek fluorometriás aktivitásméréséhez.

4.4 α -Amiláz enzimek alhelytérképezése molekuláris modellezéssel

Olyan számítógépes eljárást dolgoztunk ki, mely az általunk is használt kísérletes alhelytérképezési vizsgálatok támogatása révén segíthet bennünket az α -amilázok szerkezet-funkció összefüggéseinek megértésében. A módszer azon az elven alapul, miszerint az enzim-szubsztrát kölcsönhatások kvantitatív módon meghatározhatóak az enzim-szubsztrát komplexek homológ modelljeinek felhasználásával, azaz az alhelyek szubsztrátkötési energiái egyszerű molekulamechanikai számításokkal megjósolhatóak a Sybyl programmal számolt

enzim-szubsztrát kölcsönhatási energiákból és a bontási képek, azaz az alhelytérképezés elsődleges kísérletes adatai a SUMA program segítségével meghatározhatóak.

4.4.1 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 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 a számítógépes módszer ellenőrzésére olyan értékek felhasználásával hoztuk létre, melyeket a kísérletes alhelytérképezés módszerével határoztunk meg.

A tanító halmazba olyan enzimek adatait csoportosítottuk, melyek esetében rendelkezésre álltak mind kristályszerkezeti adatok, mind a kísérletesen meghatározott bontási képek. A halmazon belül a vad típusú enzimeken alapuló osztályozás szerint olyan csoportokat hoztunk létre, melyekbe az adott vad típusú enzim és annak mutánsai tartoznak. A *Bacillus amyloliquefaciens* α -amiláz (BAA), *Aspergillus oryzae* α -amiláz (TAA), AMY2 és sertés (*Sus scrofa*) pankreász α -amiláz (PPA) csoportokba a vad típusú enzimek adatait soroltuk, a HSA csoportba az Y151M és W58L mutánsok, az AMY1 csoportba az Y105A, Y105F, Y105W, T212Y és Y105A/T212Y mutánsok adatai is beletartoztak. Az eljárás egységesítése végett a publikált bontási képekből újraszámoltuk az alhelytérképeket, hogy a molekuláris modellezéssel meghatározott alhelymodellel azonos számú alhelyre tudjunk energiákat számolni. A publikált és az újraszámolt alhelytérképek közötti lineáris regressziós analízis eredményeként minden esetben nagyon jó korrelációt kaptunk ($r^2 = 0,942-0,999$). A tanító halmaz 13 (vad típusú és mutáns) enzim összesen 97 alhelykötési energiáját tartalmazta.

Az ellenőrző halmazt az S48Y, V47A, V47D, V47F, V47I/S48I, V47K/S48G, V47G/S48D és V47L/S48A AMY1 aktív hely mutánsainak bontási kép értékeiből és alhelykötési energiáiból hoztuk létre. Az ellenőrző halmaz 8 mutáns enzim összesen 73 alhelykötési energiaértékét tartalmazta.

4.4.2 Szerkezetillesztés és szekvenciaelemzés

Elvégeztük a vizsgált vad típusú enzimek modelljeinek illesztését és a szekvenciák összehasonlítását. A vad típusú enzimek szekvenciáinak összehasonlítása során a szekvenciák közötti igen változó mértékű hasonlóságot tapasztaltunk: 11–86 % közötti tartományba estek

az értékek, az azonos aminosavak százalékában kifejezve. A szerkezetillesztés során a hordó szerkezetet alkotó β -redők, a konzervált katalitikus aminosavak 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 α -amilázok vagy más glikozidáz enzimek esetében is alkalmazhassuk.

4.4.3 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_{SYBYL}) számítását. Ezeket az E_{SYBYL} értékeket lineáris regressziós analízissel összehasonlítottuk a kísérletesen meghatározott bontási képekből számolt E_{SUMA} értékekkel. A jobb korreláció elérése érdekében az energia-minimalizálási eljárás paramétereit optimalizáltuk. Az optimalizálás során a Kollman_All_Atom, Amber95, Amber7_FF99 és Glycam06 erőterek („force field”) közül a Sybyl programcsomagban szereplő Amber7_FF99 erőter alkalmazásával végzett számítások adták a legjobb eredményt. Teszteltük a kezdeti minimalizálás során a különböző dielektromos állandó (1, 2, 3, 4, 6 és 8) és a nem-kötő kölcsönhatások határtávolság („cutoff”) értékeket (8, 10 és 12 Å), az iterációk számát (20–1000 iteráció) továbbá a szubsztrát és a módosított aminosav oldalláncok körül minimalizált terület nagyságát (távolság értéke: 1–12 Å). Célunk volt egy gyors eljárás kidolgozása, ezért elkerültük a kölcsönhatási energiák nagy mennyiségű oldószermolekula környezetében történő számítását illetve a hosszadalmas minimalizálási lépéseket. A lineáris transzformálást követően elvégeztük az E_{SUMA} és $E_{\text{Transf.}}$ értékei közötti lineáris regressziós analízist. A tanító halmaz esetében a lineáris regressziós analízis a bontási képekből számolt és a jószolt energiaértékek közötti jó egyezést mutatta ($r^2 = 0,827\text{--}0,929$). Az AMY1 ellenőrző csoport esetében a korrelációs koefficiens értéke kisebb volt ($r^2 = 0,502$), mint az AMY1 tanító csoportjának megfelelő értéke ($r^2 = 0,827$), 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 határokra kívül eső pontok többsége a V47D, V47K/S48G és V47G/S48D AMY1 mutáns enzimekhez tartozik. Ezen enzimek mindegyike olyan mutációt tartalmaz, melyben egy töltés nélküli aminosav oldallánc töltött oldallánccra van cserélve. Ha a lineáris regressziós analízis során ezen enzimek értékeit kihagytuk, az ellenőrző csoport esetében kapott korrelációs koefficiens értéke 0,638-ra emelkedett. Tapasztalataink azt mutatják, hogy az általunk kidolgozott egyszerű eljárás nem elégséges minden esetben a

kiemelkedően fontos aminosavak módosításával járó összetett hatások jóslására. Továbbá 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. A kulcsfontosságú aminosavak és a töltött aminosavak módosításának kezelése tehát nagyobb körütekintést igényel, egyedi módosítások vagy paraméter-beállítások alkalmazását teheti szükségessé. A kidolgozott eljárás egyszerű molekulamechanikai számításokon alapul, ezért nem alkalmas arra, hogy az aktív helytől távol eső mutációk hatását kimutassa és ezért nem használható fel a másodlagos szubsztrátkötő helyek vizsgálatára.

4.4.4 Bontási képek jóslása

A bontási képek jóslását az $E_{\text{Transf.}}$ értékek felhasználásával végeztük el. A kísérletesen meghatározott és az E_{SUMA} értékekből visszszámolt bontási képek közötti lineáris regressziós analízis során jó korrelációt kaptunk ($r^2 = 0,852-0,996$), így igazoltuk, hogy a SUMA program alkalmas az elsődleges kísérletes adatok (bontási képek) kötési energiákból történő számítására is. A bontási képek jóslása során az $E_{\text{Transf.}}$ értékből számolt bontási képeket a kísérletesen meghatározott értékekkel korreláltattuk. A lineáris regressziós analízis eredményeként jó korrelációs koefficiens értékeket kaptunk a tanító halmaz esetében ($r^2 = 0,727-0,835$). Az AMY1 tanító csoportjához képest az AMY1 ellenőrző csoport esetében kapott korrelációs koefficiens értéke a várakozásoknak megfelelően alacsonyabb volt ($r^2 = 0,538$). A V47D, V47K/S47G és V47G/S48D mutánsok értékeinek kihagyásával azonban a korrelációs koefficiens értéke 0,728-ra emelkedett. A kidolgozott számítógépes eljárást sikeresen alkalmaztuk bakteriális, gomba, növényi, állati és humán eredetű α -amiláz enzimek esetében. Módszerünk segítséget nyújthat az α -amilázok szerkezet-funkció összefüggéseinek vizsgálatában úgy, hogy a molekuláris model-lezéssel történő alhelytérképezés révén lehetővé teszi a 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. A módszer felhasználható lehet a termékanalízisen alapuló alhelytérképezéses vizsgálatok támogatására, az enzim-szubsztrát kötötti kölcsönhatások vizsgálata során a szubsztrátkötő alhelyeket felépítő aminosavak szerepének vizsgálatában. A bontási kép megváltoztatására irányuló munkálatokban is hatékony segítség lehet a mutációk tervezésében és az előzetes vizsgálatok támogatásában.

5. 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 α -amiláz 1 (AMY1) mutánsok alhelytérképezését. A megbízható alhelytérképek elkészítéséhez szükséges bontási képeket 3–11 tagszámú 2-klór-4-nitrofenil- β -D-maltooligoszacharid (CNP- β -D-MOS) szubsztrátsorozat segítségével határoztuk meg. Az alhelytérképek számításához a SUMA (Subsite mapping of α -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- α -D-maltooligoszacharidok (MU- α -D-MOS) enzimatiszintézisét a V47F AMY1 mutáns által katalizált transzglykozilezés reakcióban. A 2–5 tagszámú MU- α -D-MOS szubsztrátokat sikeresen alkalmaztuk egy gyors és egyszerű fluorimetriás eljárásban, a *Bacillus stearothermophilus* maltózképző α -amiláz, a *Bacillus licheniformis* α -amiláz és a humán nyál α -amiláz kinetikai paramétereinek meghatározásában. A kidolgozott eljárás megoldást jelenthet a fluoreszcens α -amiláz szubsztrátok előállítására, melyek nem érhetők el kereskedelmi forgalomban.

Egy olyan számítógépes eljárást dolgoztunk ki az α -amilázok vizsgálatára, mely az alhelytérképek molekuláris modellezéssel történő számításán alapul. A módszer kidolgozásához a különböző α -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 α -amilázok szerkezet-funkció összefüggéseinek megértésében és a módosított fehérjék előállítására irányuló vizsgálatok támogatásában.

6. Publikációk

6.1 Az értekezés témájául szolgáló közlemények

6.1.1 Megjelent 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

Mótyán, J.A., Gyémánt, G., Harangi, J., Bagossi, P. (2011) „Computer-aided subsite mapping of α -amylases” *Carbohydrate Research* **346** (3): 410-415.
IF 2.025 (2009)

6.1.2 Beküldött közlemény

Mótyán, J. A., Fazekas, E., Mori, H., Svensson, B., **Bagossi, P.**, Kandra, L., Gyémánt, G. „Transglycosylation by barley α -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)

6.2 Az értekezéshez kapcsolódó konferencia prezentációk

6.2.1 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 α -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- β -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 α -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 α -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 α -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 α -amylase enzymes” *4th Molecular Cell and Immune Biology Winter School*, Galyatető, Hungary, 2011.01.11–14.

6.2.2 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 α -amylase enzymes with molecular modeling & Examination of the substrate binding sites of α -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 α -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.

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

