



**Oligoszacharidok előállítása kemoenzimatisz szintézissel
Doktori (Ph.D.) értekezés**

Gálné Remenyik Judit

**Debreceni Egyetem, TEK, TTK
MTA Szénhidrátkémiai Kutatócsoport
Biokémiai Tanszék
Debrecen, 2007.**



**Oligoszacharidok előállítása kemoenzimátikus szintézissel
Doktori (Ph.D.) értekezés**

Készítette:

Gálné Remenyik Judit

Témavezető:

Dr. Kandra Lili
egyetemi docens

**Debreceni Egyetem, TEK, TTK
MTA Szénhidrátkémiai Kutatócsoport
Biokémiai Tanszék
Debrecen, 2007.**

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem TTK Kémia Doktori Iskola K/5 programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem TTK doktori (PhD) fokzatának elnyerése céljából.

Debrecen, 2007.

Gálné Remenyik Judit
doktorjelölt

Tanúsítom, hogy Gálné Remenyik Judit doktorjelölt 2001 – 2005. között a fent megnevezett Doktori Iskola K/5 programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult.
Az értekezés elfogadását javasolom.

Debrecen, 2007. május 22.

Dr. Kandra Lili
témavezető

Gálné Remenyik Judit doktorjelölt és Dr. Kandra Lili témavezető egybehangzóan kijelentjük és aláírásunkkal igazoljuk, hogy az „Oligoszacharidok előállítása kemoenzimatisz szintézissel” című doktori értekezésben leírt és a tézisekben összefoglalt tudományos eredmények nem képezték és nem képezik más doktori (Ph.D.) disszertáció részét.

Debrecen, 2007. május 22.

Dr. Kandra Lili
témavezető

Gálné Remenyik Judit
doktorjelölt

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenek előtt Dr. Kandra Lili tanárnőnek szeretnék köszönetet mondani. Hálás vagyok, amiért még diplomázóként a munkacsoportjának tagja lehettem. Az elmúlt hét év alatt tanultam mellette tudományos igényességet, alkotói módszerességet, türelmet, a feladattal szembeni feltétlen alázatot. Megtiszteltetés volt számomra, hogy bizalmába fogadott. Köszönöm, hogy kutatói pályámat elindította, tudományos munkámban mindvégig értékes szakmai tanácsaival segített és bátorított.

Köszönöm Dr. Lipták András akadémikus úrnak, hogy a kutatócsoportba hívott, az értekezésem elkészítéséhez szükséges kutatási feltételeket maximálisan biztosította, és a dolgozat elkészítésére bízott.

Köszönöm Dr. Kiss László tanár úrnak, hogy a Biokémiai Tanszéken lehetőséget biztosított doktori dolgozatom elkészítéséhez.

Köszönettel tartozom Dr. Gyémánt Gyöngyi adjunktusnak, aki munkámat mindvégig önzetlenül segítette. Hálával tartozom neki, amiért megismertetett jónéhány elválasztástechnikai módszerrel, és megszeretette a HPLC-s technikát.

Köszönettel tartozom Dr. Batta Gyulának professzor úrnak, az NMR analízisekért, valamint Dr. Somsák László professzor úrnak, hogy értékes vegyületeit rendelkezésemre bocsátotta.

Köszönöm az együttműködő kollégáknak a Szénhidrátkémiai Kutatócsoport és a Biokémiai Tanszék valamennyi dolgozójának a segítséget és azt a baráti légkört, amelyben dolgozhattam.

Köszönöm kedves kolleganőmnek Zajác Zsuzsanna-nak az elvégzett kinetikai méréseket.

Végül férjemnek, fiaimnak megköszönöm a nyugodt családi légkört, az állandó biztatást, szeretetet, a megértést és támogatást, ami mindig erőt adott szakmai munkámhoz és ezen értekezés megírásához.

A kutatást anyagilag az Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok (OTKA T018598, T032005, M041829, T047075) és az Oktatási Minisztérium (FKFP 0426/2000) támogatták.

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉS	1
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	4
2.1. Enzimatisz glikozilezések	4
2.2. Az „ α -amiláz család”	6
2.3. Alhely modell – alhely térkép	12
2.4. A humán nyál amiláz (HSA) és inhibitorai	15
2.5. Oligoszacharid inhibitorok	17
3. SAJÁT VIZSGÁLATOK ÉS EREDMÉNYEK.....	21
3.1. Amiláz szubsztrátok kemoenzimatisz szintézise [36, 81]	22
3.1.1. 4-6 tagszámú maltooligomerek előállítása foszforolízissel [81]	23
3.1.2. 8-12 tagszámú szubsztrátok előállítása transzglykizilezéssel [36]	27
3.2. Bontási képek, alhely térképek.....	37
3.2.1. Szerkezet-funkció összefüggés a humán nyál α -amilázban (HSA):.....	37
A tirozin szerepe [45, 148-151]	37
3.2.2. A <i>Bacillus licheniformis</i> hőstabil α -amiláza (BLA) [41, 101].....	42
3.2.3. BSMA – a <i>Bacillus stearothermophilus</i> „maltogenic” α -amiláza	52
3.3. Enzimatisz glikozilezések [120-122].....	55
3.3.1. Transzferáz aktivitás „bevezetése” mutációval a HSA-ba [120-121]	56
3.3.2. PNP-1-tio- β -glykozidok szintézise az Y151M amiláz mutáns enzimmel.....	58
3.4. A <i>Bacillus stearothermophilus</i> „maltogenic” α -amiláza (BSMA) katalizálta	
transzglykizilezések [122]	63
3.4.1. „Maltogenic”– maltózt képző α -amilázok	63
3.4.2. Akarviozinil-izomaltozil-spiro-tiohidantoin (PTS-GTH) szintézise [122].....	64
3.5. Kinetikai mérések	71
4. FELHASZNÁLT ANYAGOK	77
4.1. Enzimek.....	77
4.2. Szubsztrátok, donorok, akceptorok	78
5. MÓDSZEREK.....	79
5.1. G ₄ -CNP-G ₆ -CNP oligomerek előállítása	79
5.2. G ₈ -CNP-G ₁₁ -CNP oligomerek előállítása	79
5.3. Hidrolízis teszt glykoamilázzal	80
5.4. Bontási kép (action pattern) meghatározások	80
5.4.1. CNP maltooligoszacharidok hidrolízise humán nyál amilázzal és a Tyr151Met	
mutánsával	80
5.4.2. CNP-maltooligomerek hidrolízise hőstabil bakteriális α -amilázokkal	81
5.5. A SUMA szoftver: α -amilázok számítógépes alhely térképezése	81
5.6. A natív és mutáns rekombináns fehérje előállítása	84
5.7. A Tyr151Met katalizálta PNP-glykozid akceptor termékek szintézise	85
5.8. Akarviozinil-izomaltozil-spiro-tiohidantoin (PTH-GTH) szintézise	86
5.9. Nagynyomású folyadékromatográfia (HPLC).....	87
5.10. Tömegspektrometriás mérések.....	88
5.11. ¹ H és ¹³ C NMR analízisek	89
5.12. Kinetikai mérések	90
5.12.1. Kinetikai mérések GalG ₂ -CNP szubsztráton	90
5.12.2. Kinetikai mérések amilóz szubsztráton	90
6. AZ ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÖSSZEGZÉSE ÉS ÉRTÉKELÉSE	92
7. SUMMARY	94

9. FÜGGELÉK	108
9.1. Publikációk	108
9.2. Az értekezés témájához kapcsolódó előadások (E) és poszterek (P)	109
9.3. Rövidítések	111

1. BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉS

Az utóbbi két évtizedet a szénhidrátkémia dinamikus előretörése jellemzi. Ezen előretörés egyrészt a szénhidrátokkal kapcsolatos kémiai és biológiai kutatások számottevő fejlődésében, másrészt a szénhidrát eredetű anyagok felhasználásának nagymértékű növekedésében nyilvánul meg. Szükségtelen hangsúlyozni, hogy milyen fontos szerepet játszanak a különféle szénhidrátszármazékok mindennapi életünkben, a táplálkozástól kezdve az élelmiszer-, gyógyszer-, bútór-, papír- és kozmetikai iparokon keresztül egészen az üzemanyag termelés új ágazatáig. A szénhidrátok felhasználása iránti érdeklődés oka a biológiai lebonthatóság, a környezetbarát jelleg, ellentétben a szintetikus anyagok felhasználásából származó környezeti ártalmakkal szemben.

Ismereteink a szénhidrátok biológiai szerepét illetően is ártértékelődtek [1]. Bizonyossá vált, hogy az oligoszacharidok és konjugátumaik az élő sejtek felületén lejátszódó normális és patológiás folyamatok főszereplői. A szénhidrát-szénhidrát, illetve a szénhidrát-fehérje kölcsönhatáson alapuló jelenségekben, mint pl. a sejtadhézióban, az immunválasz kialakulásában, az ivarsejtek egymásra találásában, stb. [2-4] a szénhidrátok a felismeréshez szükséges információk hordozói. Ezen túlmenően a glikozilezett fehérjékben a szénhidrát rész a biológiai funkció betöltéséhez szükséges konformáció kialakulásához vagy a peptidlánc proteázokkal szembeni védelméhez is hozzájárul.

Ilyen bonyolult és kritikus folyamatok megértése nagyrészt attól függ, hogy hogyan tudjuk hatékony módon, időben elfogadhatóan, nagy tisztasággal szintetizálni ezeket a vegyületeket.

A szénhidrátok táplálékaink nélkülözhetetlen összetevői. Hasznosításuk központi anyagcsere útvonal, és az élet legősibb metabolikus útvonala. Így a szénhidrátok hasznosításáért felelős α -amiláz enzimek vizsgálata különös érdeklődésre tart számot.

Az α -amilázok mindenütt jelen vannak az élővilágban. Megtalálhatók baktériumokban, gombákban, rovarokban, magasabbrendű növényekben, állatokban és az emberi szervezetben is.

Az elmúlt tíz éves időszakban (1997-2006) a Biokémiai Tanszék kutatásai egyrészt a különböző eredetű α -amiláz enzimek aktív centrumainak megismerésére, a szubsztrátkötő helyek feltérképezésére (*subsite mapping*) irányultak. Olyan nem-természetes maltooligoszacharid szubsztrátok előállítására törekedtek, melyek minden szempontból megfelelnek az α -amilázok alhely térképeinek elkészítéséhez. Az *alhely térképek* ismerete

hozzájárulhat glikobiológiai kérdések tisztázásához, az α -amilázok működési mechanizmusainak mélyebb megértéséhez és lehetőséget ad szintézisekhez történő felhasználásukhoz.

A különféle inhibitorok humán amilázokon kifejtett hatása különös érdeklődésre tart számot, mivel segít megérteni ezen vegyületek hatásait olyan betegeken, akik akár a *nem inzulinfüggő diabetes mellitustól*, akár az elhízástól vagy akár a fogszuvasodástól szenvednek. Ha az amilázok működését képesek vagyunk szelektív gátlószerekkel hatásosan módosítani, esetleg kiiktatni, akkor gyógyászati vagy biotechnológiai problémák megoldására nyílna lehetőség. Amiláz szubsztrátok és inhibitorok előállítására kémiai és enzimatisz módszereket dolgoztunk ki.

2000-ben kapcsolódtam be a Biokémiai Tanszéken folyó szénhidrátkémiai-biokémia kutatásokba. Feladatom volt az enzimatisz szintézisek elválasztástechnikai, szerkezetigazoló hátterének biztosítása.

A szintézisek követése, a termékarányok meghatározása, sőt gyakran a termékek félpreparatív méretű tisztítása minden esetben új elválasztástechnikai feladatot is jelent az analitikus kromatográfus számára és igen gyakran nem nélkülözheti a HPLC nagy felbontóképességét.

Az α -amilázok aktív centrumának tanulmányozásához kromofor csoportot tartalmazó homológ szubsztrát sorozatokat használtunk. A termékanalízis megoldhatatlan lett volna HPLC technika nélkül, hiszen az amilázok hidrolízisének/transzglikozilezésének eredményeként összetett termékelegyek képződtek. A termékek egymástól és a szubsztráttól valamint a donortól és az akzeptortól való elválasztása, mennyiségi arányaik meghatározása csak HPLC segítségével volt megvalósítható.

A molekulatömeg ismerete is gyakran nélkülözhetetlen egy új molekula azonosításához. A tömegspektrometria a molekulatömeget határozza meg, egyes molekulák mérésére szolgál és fontos eszköze a szénhidrátok analízisének, különösen a kíméletes ionizációs technikák (ESI, MALDI) elterjedése óta. A mérés sikere attól függ, hogy hogyan tudjuk a vizsgálni kívánt molekulákat bomlás nélkül gázfázisba juttatni és töltéssel ellátni – ionizálni. Így a dolgozat egyes témaköreit a HPLC és MALDI analízisek kötik össze.

Ebben az összeállításban bemutatom a megcélzott α -amiláz alhely modelleket, illetve az amiláz inhibitorok és enzimatisz glikozilezéssel kapcsolatos kérdésfelvetéseinket, valamint ezeknek az általunk művelt kémiai/biológiai területen lehetséges megközelítéseit. Együttműködő kollégáinknak köszönhetően tiszta, vad típusú és mutáns enzimekhez,

röntgenkristallográfiás, MALDI és NMR analízisekhez, valamint szintetikus eredetű amiláz inhibitorokhoz is hozzájutottunk.

Doktori dolgozatomban az alábbi kutatási területeket öleli fel.

Célom volt:

- az „ α -amiláz család” jellemzése,
- az ipari szempontból fontos bakteriális α -amilázok; a hőstabil *Bacillus licheniformis* α -amiláz (BLA), a *Bacillus stearothermophilus* „maltózt képző” α -amiláz (BSMA) szubsztrátkötő helyének feltérképezése,
- a diagnosztikai jelentőségű humán nyál α -amiláz (HSA) aktív centrumának megismerése,
- α -amilázok transzferáz aktivitásának tanulmányozása,
- amiláz szubsztrátok és inhibitorok enzimatisz glikozilezéssel történő előállítás, melyek vizsgálata mind az alapkutatás, mind a várható alkalmazás miatt indokolt.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Az oligoszacharidok és glikokonjugátumok szintézise a bioorganikus kémia egyik legdinamikusabban fejlődő területe.

A kémiai szintézis módszerei igen sokat fejlődtek a tökéletesebb glikozil donorok és új szintézis stratégiák kifejlesztésének köszönhetően. A glikobiotechnológia fellendülése olyan új termék megjelenéséhez vezetett, melyek hatásos gyógyszerek, valamint ígéretes vegyületek, gyógyszerek, vakcinák, diagnosztikumok tervezéséhez.

Az intenzív kutatómunka sikerei ellenére sem áll rendelkezésre általánosan használható módszer az oligoszacharidok szintézisére. A szintetikus módszerek a védőcsoport manipulációk komplexitásaitól szenvednek, hogy megoldják a regioszelektivitási problémákat és a sztereoszelektív glikozidos kötések képződésének nehézségeit. A sok hasonló reaktivitású hidroxil csoport jelenléte miatt a kontrollált glikozilezés továbbra is kihívás marad a szerves kémikus számára. Még a jól kidolgozott és még széles körben alkalmazott klasszikus kémiai megközelítések is számos védőcsoport bevezetését, aktiválást, kapcsolást, védőcsoportok eltávolítását igénylik.

Így minden egyes oligoszacharid szintézise új módszer kidolgozását igényli, melyhez a kémikus kreativitására, manualitására és nem utolsó sorban szerencséjére is szükség van.

2.1. Enzimatis glikozilezések

Az utóbbi 15 évben az érdeklődés középpontjába került az enzimek használatának lehetősége az oligoszacharidok szintézisében. Az enzimek alkalmazása egy értékes, alternatív módszer a konvencionális kémiai megközelítés mellett oligoszacharidok előállítására, mivel az enzimek a kívánt típusú és konfigurációjú glikozidos kötést védőcsoportok bevezetése nélkül generálják. Számos példa ismert az irodalomban, amikor is egy megfelelő enzim használata lényegesen leegyszerűsítette az általános szintézist a szükséges lépések számának csökkentésével. Így az enzimek használata kényelmes megközelítés a regio- és sztereoszelektivitás biztosítására a glikozidos kötés kialakításában, összevetve a kémiai módszerekkel, melyek időigényes, fáradságos lépéseket igényelnek.

Az enzimek két osztályát alkalmazzák sikeresen a glikozidos kötések képződésének katalizálására; nevezetesen a EC 2.4. glikozil transzferázokat [5,6] és a EC 3.2. glikozid

hidrolázokat [5-7]. A glikozil transzferázok legvonzóbb tulajdonsága a glikozidos kötések létrehozásában mutatott nagy szelektivitás. Ezen enzimek jó hozammal létesítenek regio- vagy sztereospecifikus kötések az aktivált donor és akceptor között. A donor anomer centrumában lévő aktiváló csoport lehet egy nukleozid difoszfát (Leloir transzferázok) vagy egy egyszerű cukor-foszfát (nem-Leloir transzferázok) [8-9].

A Leloir transzferázok széleskörű használata azonban nem megoldott a korlátozott hozzáférhetőségük és az aktivált szubsztrátok igénye miatt. Elvben ezen hátrányok kiküszöbölhetőek rekombináns glikozil transzferázokkal és a glikozil-nukleotid-difoszfátok *in situ* regenerálásával. Azonban a megfelelő expressziós rendszert és bizonyos mértékig a szubsztrátok és koenzimek hatékony regenerálását is minden egyes alkalomra optimalizálni kell. Így a glikozil transzferázok bevezetése az oligoszacharidok preparatív méretű szintézisében még realizálásra vár.

A glikozil transzferázokkal ellentétben a glikozidázok nagy mennyiségben és viszonylag olcsón beszerezhetők, így a kutatások a glikozid hidrolázok nagy családjára irányulnak. Az anomer konfigurációt megtartó glikozidázok széleskörűen tanulmányozottak oligoszacharidok és glikokonjugátumok szintézisében. Bár ezen enzimek teljesen kontrollálják az anomer konfigurációt, gyakran gyenge regioszelektivitást mutatnak (elsősorban az exo-enzimek) és a hatékony transzglikozilezés eléréséhez az akceptor glikozid nagy fölöslegére van szükség.

Bár a glikozidázok természetes körülmények között a glikozidos kötések hidrolízisét katalizálják, bizonyos körülmények között alkalmasak glikozidos kötések sztereospecifikus létrehozására is. Így kihasználva ezen enzimek reverz hidrolitikus aktivitását (termodinamikailag kontrollált megközelítés), vagy transzglikozilezési képességét (kinetikailag kontrollált megközelítés), hasznosak lehetnek oligoszacharidok szintézisére.

A fordított hidrolízisek eredményeként egy szabad monoszacharid és egy nukleofil reagens közötti reakcióban egy monoszacharid-glikozid keletkezik. A transzglikozilezésekben a glikozil-enzim intermediert egy másik glikozid támadja, s így egy új glikozid (di-vagy oligoszacharid) jön létre.

A szintézisekhez az exo-glikozidázok váltak különösképpen általános, mindennapi eszközzé, mivel egy-lépéses, enyhe körülmények között végbemenő reakciók lehetőségét kínálják, valamint széleskörű specifikitást mutatnak az aglikonnal szemben. Alkohokok, hidroxil-aminosavak, nukleozidok, anyarozs alkaloidok, szívreható glikozidok glikozilezhetők, így sokféle glikokonjugátum szintézise megoldható. Az endo-glikozidázok oligoszacharidokat szintetizáló képességét csak igen ritkán vagy egyáltalán nem próbálták ki.

Az enzimes szintéziseknek is vannak sajátos problémái és korlátai. Mivel a transzglykozilezéssel képződött termék szükségszerűen szubsztrátja az enzimnek, így igen óvatos, körültekintő időzítés szükséges egy elfogadható kitermeléshez. Ezen problémán olyan specifikus glikozidáz mutánsok segíthetnek, melyek glikozidos kötéseket szintetizálnak, de nem képesek azokat hidrolizálni.

A könnyen hozzáférhető és könnyen kezelhető glikozidázokat reverz hidrolitikus reakciókban használják oligoszacharidok és glikozidok szintézisére úgy, hogy a glikozidos hasítás egyensúlyát aktivált szubsztrátokkal, vagy más módszerekkel az ellentétes irányba tolják el. Ennek megfelelően a glikozidáz-katalizálta glikozid szintézisek tipikusan alacsony kitermelésűek. A jó hozamhoz biztosítani kell a termék hidrolízisének minimalizálását.

Ezen problémák ellenére is az oligoszacharidok enzimatisz szintézise a szénhidrátkémia kutatások egyik virágzó területe sok választással és lehetőséggel. Lehetőséget ad glikozidázok transzferázokkal történő kombinálására egymást követő folyamatokban; vagy enzimes és kémiai módszerek használatára az ún. kemoenzimatisz szintézisekben.

Tapasztalataink szerint az endo-glikozidázok által katalizált transzglykozilezési reakciók normál körülmények között igen kedvezőtlenül mennek végbe; rendszerint extrém magas szubsztrát koncentrációt és nem-vizes közeget igényelnek. A PPA, a HSA és a BLA katalizálta szintézisek nem vezettek preparatív méretben alkalmazható eredményre.

Transzglykozidáz aktivitást pontmutációval sikerült bevezetnünk a vad típusú HSA enzimbe a 151 helyzetű tirozin metioninra, valamint az 58-as pozíciójú triptofán leucinra történő cseréjével. Cha és mtsai [10], valamint Kuriki és mtsai [11] kimutatták, hogy a hidrofóbicitás az aktív hely közelében kritikus tényező a transzglykozilezésekhez számos ismeretlen szerkezeti tényező mellett.

2.2. Az „ α -amiláz család”

Az enzimeket egyszerűbb azonosításuk céljából az általuk katalizált reakció jellege szerint a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Nemzetközi Egyesület (International Union of Biochemistry and Molecular Biology, IUBMB) hat osztályba sorolta. A hat osztály mindegyike alosztályokat is tartalmaz, amelyek ugyancsak további csoportokra oszlanak. Az osztályokat, alosztályokat, csoportokat és ezeken belül magukat az egyes enzimeket arab számokkal jelölik. Így egy-egy enzimet négy szám határoz meg, melyet az Enzim Bizottság

(Enzyme Commission, EC) hogy jóvá. Pl.: az α -amiláz (α -1,4-D-glükánhidroláz) enzim azonosító száma EC 3.2.1.1.

Az α -amilázok a keményítő és a keményítővel rokon poli- és oligoszacharidok belső α (1-4) glikozidos kötéseit hidrolizálják. A keményítő élelmiszerként a legelterjedtebben használt poliszacharid; amilóz és amilopektin keveréke. Lebontásában és szintézisében négy különböző típusú enzim vesz részt:

- α -Amiláz (EC 3.2.1.1): α (1-4) glikozidos kötéseket hidrolizál,
- Pullulanáz (EC 3.2.1.41) és izoamiláz (EC 3.2.1.68): α (1-6) glikozidos kötéseket hidrolizálnak,
- Ciklodextrin-glükoziltranszferáz (CGTáz) (EC 2.4.1.19): transzglikozilezéssel alakít ki α (1-4) glikozidos kötéseket,
- Elágazást létrehozó (branching) enzim (EC 2.4.1.18): transzglikozilezéssel hoz létre α (1-6) glikozidos kötéseket.

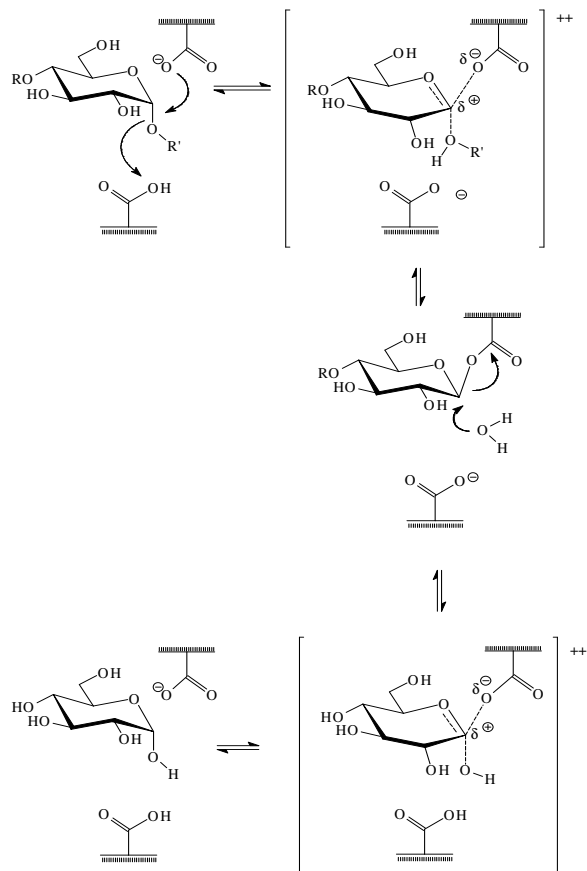
A felsorolt enzimek egy családdhoz tartoznak, az ún. „ α -amiláz család”-hoz. Az α -amiláz család fogalmát Kuriki és Imanaka [12] vezették be az enzimek szerkezete és közös katalitikus mechanizmusa alapján. Az összes glikozid-hidroláz, -transzferáz és -izomeráz szekvencián alapuló osztályozása, a Henrissat félé [13] beosztás alapján, az α -amiláz család a glikozid hidrolázok 13. családjaként vált ismertté.

Az α -amiláz család tagjait a következő tulajdonságok jellemzik:

- α -Glikozidos kötéseket hasítanak és α -anomer konfigurációjú mono- vagy oligoszacharidokat szabadítanak fel (hidrolízis).
Főként α (1-4) vagy α (1-6) glikozidos kötéseket alakítanak ki (transzglikozilezés), vagy mindkét aktivitás kombinációjával jellemezhetők.
- Szerkezetükre a katalitikus oldalláncokat tartalmazó $(\beta/\alpha)_8$ - vagy más néven TIM hordó jellemző.
- Elsődleges aminosav szekvenciájukban négy erősen konzervált régió található. Ezen régiók a katalitikus helyet kialakító, valamint a konzervált $(\beta/\alpha)_8$ hordó topológiájának stabilitásáért felelős aminosavakat tartalmazzák.
- A katalízisben három aminosav oldallánc (1 Glu és 2 Asp) vesz részt.

Az α -amiláz családra általánosan elfogadott katalitikus mechanizmus, az α -anomer konfigurációt megtartó double displacement (kettős helyettesítéses mechanizmus). Az aktív

helyen található katalitikus aminosavak közül a Glu, mint sav/bázis katalizátor, az Asp, mint a nukleofil vesz részt a katalízisben.



1. ábra: α -Amilázok katalitikus mechanizmusa.

A mechanizmus 5 lépésből áll:

1. A szubsztrát bekötődését követően a sav/bázis katalizátor glutaminsav protonálja a hasítandó glikozidos kötés oxigénjét a (-1) és (+1) alhelyek között és a nukleofil aszpartát a glükóz C-1 szén atomját támadja a (-1) alhelyen.
2. Egy oxokarbonium ion jellegű átmeneti állapotban keresztül kovalens intermedier képződik.
3. A protonált glükóz molekula távozik az aktív hely (+1) alhelyéről, miközben egy víz vagy egy glükóz molekula lép be az aktív helyre és támadja a (-1) helyen kötött glükóz molekula és az aszpartát közötti kovalens kötést.
4. Ismételten létrejön egy oxokarbonium ion átmeneti állapot.
5. A bázis katalizátor glutamát a (+1) alhelyen felvesz egy hidrogént a bejövő víztől vagy az újonnan belépett glükóz molekulától. A bejövő víz vagy az újonnan belépett

glükóz molekula oxigénje helyettesíti a glükóz és az aszpartát közötti oxokarbónium kötést, és ezáltal létrehoz a (-1) alhelyen a glükóz C-1 pozíciójánál egy új hidroxil csoportot (hidrolízis) vagy egy új glikozidos kötést a (-1) és (+1) alhelyet elfoglaló glükózok között (transzglikozilezés).

A fent említett Koshland [14] által javasolt kettős helyettesítéses mechanizmusban a három konzervált katalitikus aminosavból csak kettőnek van szerepe. A harmadik konzervált aminosav, a másik aszpartát, a szubsztrát OH-2 és OH-3 csoportjához hidrogén híd kötésekkel kötődik, és a (-1) alhelyet elfoglaló glükóz egység torzulásában játszik fontos szerepet [15]. Egyéb konzervált aminosavak a His, az Arg és a Tyr. Ezek az aminosavak az aktív helyre irányítják és beillesztik oda a szubsztrátot, biztosítják a nukleofil megfelelő orientációját és az átmeneti állapot stabilizálásában játszanak szerepet [15].

A négy konzervált régió mellett Janecek [16] egy ötödik régiót is azonosított az α -amiláz család tagjaiban. Ebben a régióban szintén található egy aszpartát, ami Ca^{2+} ligandként működik.

Bár az α -amiláz család minden enzimére jellemző az α -anomer konfigurációt megtartó mechanizmus, azonban szubsztrát-, és termékspecifitásukban igen nagy változatosságot mutatnak. Ezen eltérések a különböző doméneknek a katalitikus maghoz vagy a katalitikus helyet körülvevő extra cukor-kötő alhelyhez (extra sugar-binding subsite) történő kapcsolódásának tulajdoníthatók. Az A domén a legkonzerváltabb domén, az α -amiláz család minden tagjában megtalálható. Az A domén igen szimmetrikus 8 parallel β redőből áll, melyet 8 α hélix vesz körül, ez a $(\beta/\alpha)_8$ hordó szerkezet [17-18].

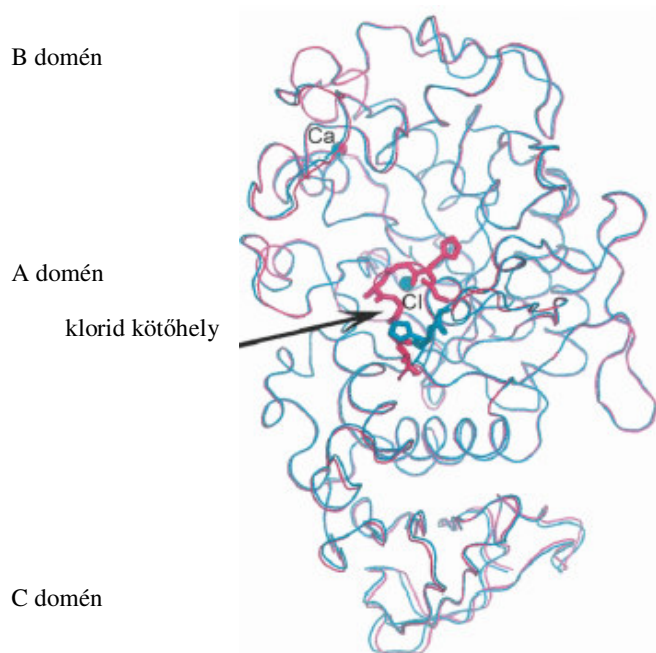


2. ábra: A $(\beta/\alpha)_8$ -hordó szerkezet sematikus ábrázolása.

Ebben a szerkezetben a β -redők és az α -hélixek váltakoznak a polipeptid láncban, így 8 párhuzamos β -redő egy belső hengert képez, amit a 8 hélix vesz körül. Rendszerint egy extra hélix követi a 6. β -redőt. Az alternáló hélixeket és β -redőket hurkok kötik össze és a szubsztrátkötő és aktív helyet a β -redők és a hurkok aminosavai építik fel. A hurkok hossza és aminosav sorrendje változó és ebből származik a különböző enzimek változatossága, ami a specitást és a sajátságokat illeti. Általában a 3. hurok hosszú, de a többi hurok hossza nagyban változatos, és a hurkokon belül is lehetnek extra β -redők és α -hélixek. A katalízisben és a szubsztrát kötésben fontos erősen konzervált aminosavak az A doménben találhatóak, a β -redők C terminálisainak hurkaiban.

Az α -amiláz család minden tagja rendelkezik B doménnel is, ami tulajdonképpen az A domén egy kitüremkedése a 3. β -redő és a 3. α -hélix között, 44-133 aminosavból áll és a szubsztrát vagy Ca^{2+} kötésben van szerepe. A B domén szerkezete rendezetlen és enzimenként változik [19-21].

Az enzim család tagjainak többsége, mint pl. a HSA tartalmaz a katalitikus A domént követően egy C domént is, ami egy antiparalel β -redőkből álló, összehajtogatott struktúra a fehérje N-terminális végén [20]. Feltételezik, hogy a katalitikus domén stabilizálásában vesz részt azáltal, hogy az A domén hidrofób oldalláncait megvédi az oldószerrel szemben, de a szubsztrát kötésben is szerepe lehet [19].



3. ábra: A humán nyál amiláz doménjeinek elhelyezkedése.

A ciklodextrin-glikoziltranszferázok és a *Bacillus stearrowthermophilus* maltogén amiláza további β -redős doméneket is tartalmaz, a C domén után elhelyezkedő D és E domént. A D doménhoz eddig nem párosul semmilyen ismert funkció, viszont az E doménről úgy tartják, hogy szerepet játszik a keményítő szemcsék kötésében [19].



4. ábra: A ciklodextrin-glükóziltranszferáz szalag modellje a különböző domének feltüntetésével

Az α -amilázok egyéb jellegzetes doménjei az N-terminális végen elhelyezkedő F, H vagy G domének, amelyek endoenzimekben vagy elágazó szubsztrátok $\alpha(1-6)$ glikozidos kötéseit hasító enzimeknél fordulnak elő [22].

Minden α -amiláz általános tulajdonsága, hogy legalább egy Ca^{2+} -ion kötődik egy erősen konzervált régióhoz a fehérjében. A Ca^{2+} kötőhely a központi hordó és a B domén között helyezkedik el. Gerinceseknél és a *T. molitor* amilázoknál a kationt nyolc ligand koordinálja: az Asp167 karboxil O atomjai két koordinációs helyet megkötve, az Arg158 és His201 karbonil oxigénjei, az Asn100 OD1 oldallánca és három víz molekula. Az ismert amilázok szerkezetét tekintve ezek a ligandok szigorúan konzerváltak, kivéve a bakteriális AHA-nál (*Alteromonas haloplantis* α -amilázánál) [1].

Amíg a Ca^{2+} -ion kötése teljesen általános, közös tulajdonságnak tekinthető az α -amiláz család különböző specificitású enzimeinél, addig a Cl^- -ion kötése csak néhány α -amiláz jellegzetessége [23]. Ez utóbbi csoport esetében a Cl^- -ion allosztérikus aktivátor szerepét tölti be. Ilyen enzimek a PPA (porcine pancreas amylase, (sertés hasnyálmirigy amiláz), a HPA (humán pancreas amiláz), HSA (human salivary amylase, humán nyál amiláz), AHA, TMA (*Tenebrio molitor* α -amiláz). Ezeknek az enzimeknek a szerkezetéből megállapították, hogy

az Arg 195, Asn298, és Arg/Cys337 aminosav oldalláncok koordinálják a Cl^- -iont. Az Arg195 és Asn298 majdnem minden α -amilázban konzervált, míg a bázikus Arg/Cys337 oldallánc specifikus az eddig ismert 38 potenciális Cl^- -ion függő amilázra. Emiatt ez a csoport lett az anion kötés fő ismérve, mint ahogy azt mutagenézis kísérletek is igazolták.

A Cl^- -ion függő amilázokra jellemző még egy flexibilis hurok, egy proteáz szerű triád és diszulfid hidak jelenléte is.

A szerin proteázok és lipázok aktív centrumát mimikáló triád jelenléte bizonyára a legmegdöbbentőbb jelenség a Cl^- függő amilázoknál. A triád három aminosava a Ser340, His386, Glu27, amelyek szigorúan konzerváltak minden Cl^- függő α -amilázban. Jelenlétük tehát nem véletlen, de funkciójuk a mai napig nem ismert. Csak feltételezik, hogy esetleg a fehérje szerkezet stabilizálásában tölthetnek be szerepet.

Minden Cl^- -ion függő amiláz tartalmaz 8 nagymértékben konzervált Cys aminosavat, melyek diszulfid kötésekkel létesítenek az ismert kristályszerkezetekben. A 28-86, 141-160, 378-384 és 450-462 Cys közötti intramolekuláris keresztkötések szükségesek az enzim megfelelő térszerkezetének kialakításához. A Cys70-115 közötti diszulfid híd, ami összeköti az A és B domént specifikus a gerinces amilázokra. Ennek a kötésnek a szerepét a hőmérséklethez való alkalmazkodásban látják, mivel korlátozza a hő hatására bekövetkező mozgást az aktív centrum körül. Ezen kötés kialakításában részt vevő Cys-ek kizárólag meleg-vérű állatoknál találhatók meg [1].

2.3. Alhely modell – alhely térkép

Az utóbbi években a szénhidrátbontó enzimek tulajdonságait az ún. „alhely modell” (subsite model) alapján értelmezik [24-27]. Az alhely modell szerint az α -amilázok szubsztrát-kötő helye egymást követő alhelyekből épül fel, ahol minden egyes alhely komplementer a szubsztrát monomer egységével, és azzal kölcsönhatást létesít. Az alhelyek méretüket, számukat, a szubsztráttal szemben mutatott affinitásukat, a katalitikus helyhez való térbeli viszonyukat illetően igen heterogének, s ezen tényezők együttesen határozzák meg az enzim specifikitását, kinetikai paramétereit, a hasítási képet. Az alhelyeket a katalitikus helytől kiindulva jelölik; balra negatív számokkal a glikon-kötő helyeket, míg jobbra pozitív számokkal az aglikon-kötő helyeket. Ezt a nomenklaturát Davies és mtsai [28] vezették be, és általánosan elfogadott az alhely modellekre.

Egy oligomer szubsztrát többféle kölcsönhatást létesíthet ezen alhelyekkel. Ha a szubsztrát úgy kötődik az enzimhez, hogy annak a hidrolízisre érzékeny kötése nem fedti át a katalitikus aminosavak helyét, az ún. nem-produktív komplexek képződnek. Ha az oligomer szubsztrát bekötődésekor a hidrolizálendő kötés átéri a katalitikus helyet, az ún. produktív komplexek jönnek létre; következésképpen hasad a kötés és felszabadul a termék. Ezt a szerkezetet Phillips és mtsai [29] vezették be a lizozimra, valamint Schechter és Berger [30] a proteáz papainra még a 70-es években, amely széles körben elterjedt az összes poliszacharid hasító enzimre is [31].

Egyes amilázok alhelyeinek szerveződése és funkciója kísérletileg meghatározható oligoszacharid sorozatok bontási képének (action pattern) analízisével. Az α -amilázok ebből a szempontból kevésbé ismertek, ami elsősorban a megfelelő oligomer szubsztrátok hiányával, valamint a termékek analízisének bonyolultságával magyarázható. Azt az eljárást, amely kvantitatíve írja le az alhely modellt, alhely térképezésnek (subsite mapping) nevezik az irodalomban. Az alhely térképezéshez csak a produktív kötőmódok jönnek számításba.

Az alhely térkép elkészítése egy exo-enzim esetében leegyszerűsödik, mivel csak egyféle produktív kötőmód alakulhat ki az enzim és szubsztrátja között. Azonban az endo-enzimek több produktív kötőmódot létesítenek, ami egy komplex termékeloszlást (product pattern) eredményez. Az egyes termékek képződésének relatív sebességét kötés hasítási gyakoriságnak (bond cleavage frequency = BCF) nevezik, ami információt ad az alhelyek kötési energiáiról. Egy homológ oligomer szubsztrát sorozat esetében az egyes kötések hasításának gyakoriságát meghatározva, kiszámolhatók a látszólagos kötési energiák az enzim kötőrégiójában minden egyes alhelyre, kivéve azt a két alhelyet, amelyek a katalitikus hely szomszédságában helyezkednek el.

Az alhely térkép elkészítésekor a látszólagos kötési energia értékeket hozzárendeljük az egyes alhelyekhez. A negatív energia értékek az alhely és a szubsztrát monomer egysége közötti kedvező kölcsönhatásra, míg a pozitív energia értékek kedvezőtlen kölcsönhatásra utalnak. Egy alhely térkép tehát információt ad az alhelyek számáról, a katalitikus hely pozíciójáról, és megmutatja a látszólagos kötési energiát az alhely és a szubsztrát monomer egysége között.

Az alhely térkép számításához egy számítógépes programot fejlesztettünk ki. A program WINDOWS környezetben működik és a kísérletileg meghatározott kötés-hasítási gyakoriságot használja az energia értékek számításához. A program neve SUMA (Subsite Mapping of α -Amylases) és az interneten hozzáférhető (gyemant@tigris.klte.hu) [26].

Az alhely térkép elkészítéséhez számos feltételt kell kielégíteni:

- Mindenekelőtt jól azonosítható, nagy tisztaságú, vízben jól oldódó kromogén szubsztrátokra van szükség, mert ez teszi lehetővé a termékek és mennyiségének pontos meghatározását.
- A szubsztrát csak megfelelő lánchosszúság esetén képes átfedni az enzim teljes kötőrégióját. Ha ezen feltételnek a szubsztrát nem tesz eleget, az alhely térkép nem lesz megbízható.
- Végül, feltétlenül ki kell zárni az enzim többszörös támadásának (multiple attack) és másodlagos hasításának a lehetőségét a szubsztráton és/vagy a termékeken. Ezen utóbbi reakciók megnehezítik, komplikálhatják nemcsak a kinetikai paraméterek interpretálását, de változást idéznek elő a hasítási képből is. Az alhelyek energiájának kiszámításához szükséges, hogy az enzim aktivitásokat a szubsztrát alacsony koncentrációinál mérjük, mivel alacsony koncentrációknál a mellékreakciók eliminálódnak.

A maltooligoszacharidokat és a redukáló végen kromofor csoporttal jelzett 2-7 tagszámú maltooligoszacharidokat felhasználó hagyományos analíziseket [24, 32-34] tökéletesítettük a hosszabb tagszámú származékok (DP→ 12-ig) bevezetésével a hosszú szubsztrátkötő árokkal rendelkező α -amilázok alhely térképezésére [35-36]. A növényi amilázok és néhány bakteriális α -amiláz tartozik ehhez a kategóriához, 9-11 funkcionális alhellyel [32-33, 37-41]. Az emlős α -amilázok kötő árka 5-7 alhely hosszúságú [42-45], míg bizonyos gomba és bakteriális α -amilázok közepes hosszúságú kötő régióval rendelkeznek [46-47].

A 4-nitrofenil (NP) és a 2-klór-4-nitrofenil (CNP) β -maltooligoszacharidjaink (DP 1-12), mint modell szubsztrátok teljes mértékben eleget tesznek a fenti kívánalmaknak. A β -glikozidos kötés stabil, α -amilázokkal nem bontható; így a redukáló végről felszabaduló hidrolízis termékek mindig tartalmazznak kromofor csoportot, és így könnyen detektálhatók.

2.4. A humán nyál amiláz (HSA) és inhibitorai

Vizsgálataink elsősorban a humán nyál amiláz (HSA) inhibitorainak tanulmányozására irányulnak. A HSA kereskedelmi forgalomban hozzáférhető, nagy tisztaságú enzim, melynek szerkezeti és biokémiai tulajdonságai jól ismertek [45, 48-54].

A HSA 5 izoenzimből áll, melyek két családba **A** és **B** csoportosíthatók. Az **A** család tagjai (1,3,5) kovalensen kötött cukorrészt tartalmazó glikoproteinek, míg a **B** család tagjai (2,4) nem tartalmaznak cukorrészt [55]. Az izoenzimek mindegyike egy polipeptidláncból áll, aktivitásuk, hőstabilitásuk és nagy molekulatömegű szubsztráton mért bontási képük teljesen azonos [52]. Valamennyi izoenzim polipeptidláncát 496 aminosav alkotja, szerkezetükben 170 víz molekula egy Ca^{2+} és egy Cl^- kötőhely található. A Ca^{2+} és Cl^- kötőhely, valamint a szubsztrátkötő hely His és Trp aminosavai szerepet játszanak a szubsztrát glikon és aglikon végének megkülönböztetésében. A Cl^- ion valószínűleg szerkezeti szervező szereppel bír, lecsökkenti a nem kívánatos elektrosztatikus kölcsönhatásokat a bázikus és savas csoportok között. Ezen kívül a hasításban és a szubsztrát kötésben szerepet játszó Glu233 pK értékét is növelheti. A röntgenkristallográfiás analízis szerint [53] a polipeptidlánc 3 doménre hajtogatódik: az **A** domén (1-99 és 169-404 aminosavak), a **B** domén (100-168 aminosavak), **C** domén (405-496 aminosavak). A központi N-terminális $(\beta/\alpha)_8$ szerkezetű **A** doménen, mint egy boltozaton helyezkedik el a két flexibilis domén **B** (bonyolult hurok) és **C** (független domén) [54]. A szubsztrátkötő hely és a katalitikus centrum egy mély árok az **A** és **B** domén határán, 6 alhelyből (4 glikon és 2 aglikon) épül fel. A hasító helyek (-1) és (+1) alhelyek a legtöbb α -amilázban igen jól konzerváltak, míg más alhelyek kevésbé. A katalitikus aminosavak Asp197, Glu233 és Asp300 az árok középső részén, egymáshoz közel találhatóak.

A HSA szerkezetében fontos szerepe van a többi emlős amilázhoz hasonlóan a 304-310 aminosavak alkotta huroknak, melynek része az Asp300 is. A hurok 4 glicint tartalmaz, ami nagy flexibilitást biztosít és karakterisztikus az emlős amilázokra. Szerepe van a szubsztrát kötés és a termék felszabadítás folyamatában. Ha nincs jelen szubsztrát, a hurok rendkívül mozgékony és a HPA, HSA vagy PPA enzimeknél megfigyelt konformációt veszi fel, ezt nyitott pozíciónak nevezik. Ha a szubsztrát bekötődik, ez a szegmens segít a katalitikus helyen tartani a szubsztrátot, a zárt pozíció felvételével, a hidrolízis után ismét nyitott pozícióba kerül és a termék felszabadul [53].

A HSA klinikai kémiai szempontból is alaposan tanulmányozott enzim, hiszen fontos indikátor a nyálmirigyek és a pankreász betegségeinek diagnosztizálásában. Célpontja azon gyógyszerek tervezésének, melyek a fogszuvasodás (caries), a cukorbetegség (diabetes), a kóros elhízás (obesitas) és más cukor metabolizmus rendellenességek kezelésére vagy megelőzésére irányulnak. Végül hasznos lehet oligoszacharidok, glikokonjugátumok enzimatisz szintézisére is.

A HSA fent említett érdekes és fontos biológiai és kémiai folyamatokban betöltött szerepe keltette fel érdeklődésünket ezen funkciók megértéséhez.

A humán nyál amiláza a nyál legnagyobb mennyiségben jelen lévő enzime, multifunkciós enzim, különféle feladatokat lát el a szájüregben. Először, mint hidrolitikus enzim a polimer keményítő molekula kezdeti hidrolízisét katalizálja, amely rövidebb oligomerek, maltóz és glükóz képződéséhez vezet. Ezen kívül, nagy affinitással kötődik a szájüreg viridáns *Streptococcus*aihoz, s így ezen baktériumok eltávolítását és/vagy megkötődését eredményezheti a szájüregben. Érdemes megemlíteni, hogy az α -amilázok között a HSA-nak van a legnagyobb baktériumkötő aktivitása. A baktérium felszínéhez kötött amiláz megőrzi hidrolitikus aktivitását [56], így a keményítőt hidrolizálja. A glükóz táplálékforrás a baktériumok számára és tejsavvá metabolizálódik. A lokálisan felhalmozott tejsav a fogzománc feloldásához vezethet, ami egy kritikus lépés a fogszuvasodás kifejlődéséhez. Továbbá számos bizonyíték igazolja, hogy a fogzománchoz vagy a hidroxipatithoz kötött amiláz szerepet játszhat a fog plakkok képződésében. Így pl. több szerző leírja [57], hogy az α -amiláz jelen van a fogzománc lepedékben és az amiláz, mint egy receptor vesz részt a baktérium megkötésében. Arról is beszámolnak, hogy az amiláz a fog plakkokban megtalálható, és a hidroxipatithoz kötött amiláz kölcsönhatást létesít a szájüregben lévő *Streptococcus*ok számos olyan fájával, melyek a fog plakkokban leggyakrabban előfordulnak. Ezen tapasztalatok arra utalnak, hogy a nyál amiláza kulcs szerepet játszik a fog plakkok képződésében és az azt követő fogszuvasodás kialakulásának és kifejlődésének folyamatában.

A fogszuvasodás következményeiként fellépő betegségek, az ún. „komplex” betegségek előtérbe kerültek napjainkra a világ lakosságának betegségi eloszlásában. Ilyenek pl. a daganatos (pl. szájüregi daganatok) vagy a metabolikus (pl. cukorbetegség) kórképek. Ezek mindegyike sok-komponensű betegség, számos gén és számos környezeti tényező dinamikus változatos kölcsönhatásának eredményeképpen alakul ki. Ilyen komplex betegségek esetében nagy kihívást jelent a kutatók számára, hogy megfelelő megoldást adjanak a betegségek etiológiájára, diagnózisára és kezelésére.

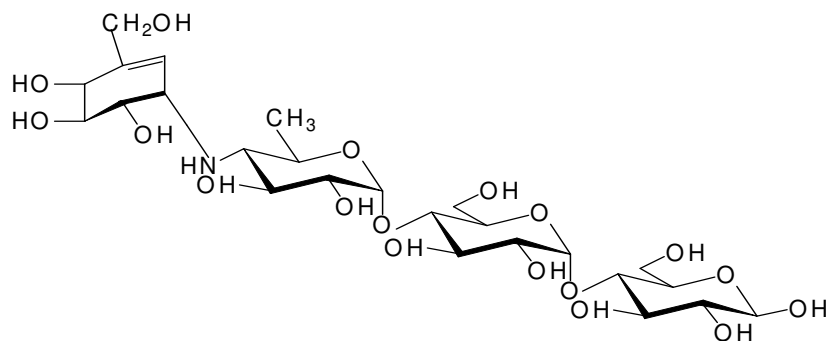
2.5. Oligoszacharid inhibitorok

Oligoszacharid inhibitorok használata igen hasznos módszer a szubsztrát kötődésének vizsgálatára az amilolitikus enzimek esetében. Ezen gátlószerek egyik csoportja a szubsztrát analóg szerkezetű vegyületek, melyek erősebben kötődnek az enzimhez annak természetes szubsztrátjánál. A másik csoport az átmeneti állapot analógok köre, melyek a glikozílium ionnal mutatott szerkezeti hasonlóságuk alapján az előzőekhez hasonló vagy esetenként erősebb kötődésre, és ezáltal hatásosabb gátlásra képesek. A tresztatin család vegyületeit először a *Streptomyces* fajokból izolálták, és a diabetes, valamint más cukor metabolizmus rendellenesség gyógyítására fejlesztették ki [58]. Később ezen vegyületek igen népszerűvé váltak mind gyógyászati szempontból, mind a fehérje–oligoszacharid kölcsönhatások krisztallográfiás analízisében [59-64].

Egy különleges tresztatin-származék, az akarbóz pszeudotetraszacharid került az érdeklődés középpontjába, mivel rendkívül hatékony α -amiláz inhibitornak bizonyult.

Az akarbóz az amiláz enzimek természetes előforduló inhibitora. A baktériumok Actinomycetales (sugárgombák) rendjébe tartozó *Actinoplanes* fajok állítják elő fermentációval. [65], Gram pozitív baktériumok és emberre, állatra patogének.

Az akarbóz inhibitor hatása szokatlan szerkezetének tulajdonítható. Három különböző szerkezeti egységből épül fel. Tartalmaz egy telítetlen ciklitolt (2,3,4-tri-hidroxi-5-hidroximetil-5,6-ciklohexént D-glüko konfigurációban a nem redukáló végen, amely α -(1-4) kötéssel kapcsolódik a 4-amino-4,6-didezoxi-D-glükopiranoz nitrogénjéhez (akarviozin) és ez szintén α -(1-4) kötéssel egy maltóz egységhez. Az akarbóz szerkezetét a 5. ábra mutatja.

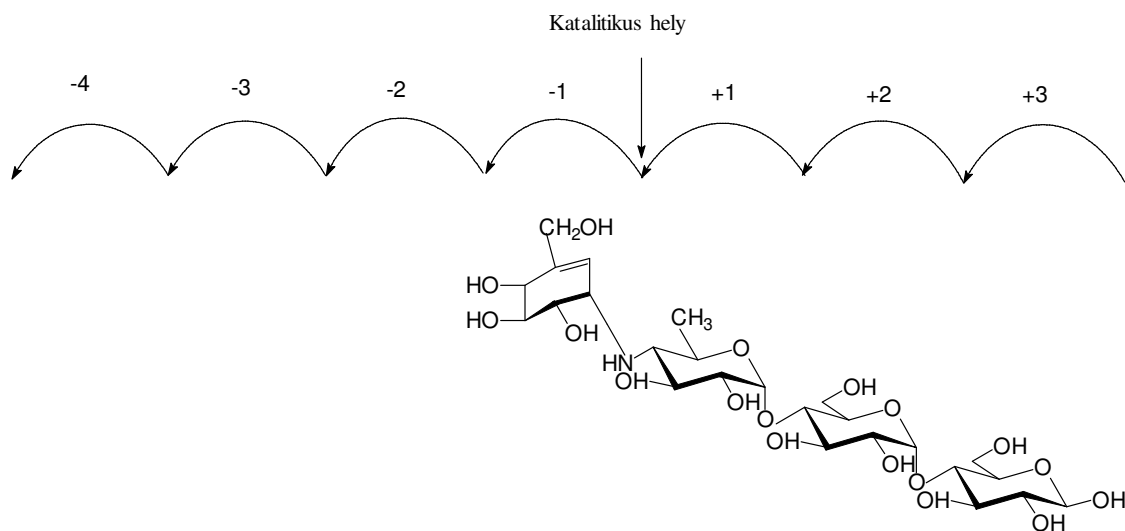


5.ábra:Az akarbóz kémiai szerkezete.

Az akarbóz erős kompetitív inhibitora az α -glükózidázoknak [66-68], α -amilázoknak [63, 65-67], ciklomaltodextrin-glükano-transzferáznak (CGT-áz) [2, 67-69], glükóamiláznak [70-71] és glükán-szukrázoknak [72-73].

A ciklitól egység félszék konformációja a glikozidos kötés enzimatis hasításához szükséges szubsztrát torzulását mimikálja az átmeneti állapotban [64, 74].

Az N-glikozidos kötés az enzimés hidrolízisnek ellenáll. Az akarbóz az átmeneti állapotot mimikáló gyűrűjével általában a (-1) alhelyhez kötődik, ahogyan ezt a 6. ábra mutatja.



6. ábra: Az akarbóz kötődése az α -amilázok aktív centrumában.

Az *Actinoplanes* fajok néhány olyan akarbóz analógot is fermentálnak, melyben az akarbóz redukáló- és/vagy nem redukáló végéhez maltodextrin részek kapcsolódnak. Ezen analógok az α -amiláz és szukráz inhibitorai [66].

Különböző típusú akarbóz analógokat állítottak elő a *Bacillus stearothermophilus* „maltogenic” amiláz (BSMA) által katalizált transzglikozilezési reakcióval az akarbóz mint donor és számos szénhidrát, mint akceptor jelenlétében [67, 75-76].

Kim és mtsai [67] azt tapasztalták, hogy egy glükóz egység eltávolításával kapott akarviozin-glükóz az élesztő α -glükózidázt 430-szor jobban gátolta, mint az akarbóz. Továbbá

a maltóz izo-maltózra történő cseréje a sertés pankreász amiláz gátlásában 15-szörös gátlás fokozódást eredményezett az akarbózhoz képest.

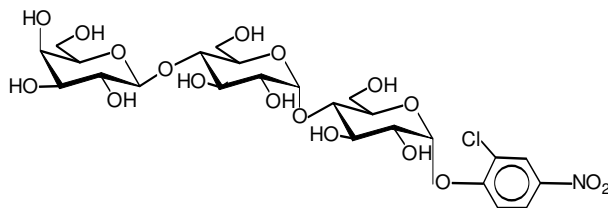
Lee és mtsai [76] az akarbóz maltóz egységét cellobiózzal és laktózzal helyettesítették, s az így előállított akarbóz analóg hatékony inhibitora lett a β -glükózidáznak és β -galaktozidáznak, míg az akarbóz egyáltalán nem mutatott inhibitor aktivitást.

A CGT-ázzal előállított 4-maltohexaozil-és 4-maltododekazoil akarbóz analógok (egy-három nagyságrenddel) hatásosabb inhibitorok, mint az akarbóz [77].

Jól ismert, hogy a cukorbetegség egy anyagcsere rendellenesség, a szénhidrát metabolizmus zavarának következménye. Martin és Montgomery [78] beszámolnak arról, hogy az akarbóz metabolizálódik a vékonybél és a vastagbél hidrolázai által, és akarviozin-glükóz és glükóz keletkezik. A glükóz a vastagbélben a mikrobiális fermentációt követően hasmenést és puffadást okozhat. Azonban az akarviozin-glükóz és a módosított akarbóz transzfer termékek feltehetően rezisztensek a bélben lezajló amilolitikus hidrolízisnek és képesek megtartani az inhibitor kapacitásukat glükóz képződése és az azt követő kellemetlen mellékhatások nélkül.

Célul tűztük ki az általunk művelt klasszikus kémiai/biológiai területek lehetséges eszközeivel olyan inhibitor molekulák felkutatását, tervezését és vizsgálatát, melyek idővel, mint szájon át szedhető gyógyszerek, öblögetők, ecsetelők, fogkrémek, stb. komponensei alkalmasak lehetnek a humán amilázok gátlásával a caries megelőzésére és súlyos következményeinek visszaszorítására.

Az inhibitor jelölt vegyületek inhibitor aktivitását egyrészt amilózon, a HSA természetes szubsztrátján [79], másrészt egy rövid, szintetikus szubsztráton, a 2-klór-4-nitrofenil-4-O- β -D-galaktopiranozil maltozidon (GalG₂-CNP) mértük. A GalG₂-CNP szerkezete a 7. ábrán látható.



7. ábra: 2-klór-4-nitrofenil-4-O- β -D-galaktopiranozil maltozid szerkezete.

A fenti szubsztrát használata egy lépésben eredményezi a kromofor csoport felszabadulását, segédenzimek használata nélkül [80]. A gátlások kinetikáját a klasszikus Lineweaver-Burk és Dixon-féle grafikus ábrázolással tanulmányoztuk. A K_{EI} és K_{ESI}

disszociációs állandókat egyrészt a másodlagos egyenesekből, másrészt nem lineáris regresszióval számoltuk a Grafit program segítségével.

3. SAJÁT VIZSGÁLATOK ÉS EREDMÉNYEK

A bemutatott témákban a kémia szorosan összefonódik a biológiával és rendszerint a biológiai információk adták az ötletet a kémiához. Tanulmányozni kívántuk, hogy az amilolitikus enzimek alkalmasak-e biológiailag aktív molekulák szintéziséhez, vagy kémiai úton nehezen (vagy egyáltalán nem) előállítható vegyületek szintézisére. Sikerrel alkalmaztuk a glikogén foszforilázt, a humán nyál amiláz mutáns enzimeit, valamint a *Bacillus licheniformis* és a *Bacillus stearothermophilus* hőstabil α -amilázát (BLA és a BSMA) enzimatis glikozilezésekhez, oligoszacharidok szintézisére.

Az elért eredményeink nagyban hozzájárultak az α -amilázok (EC 3.2.1.1.) működési mechanizmusának mélyebb megértéséhez, az aktív centrum szubsztrátkötő helyeinek feltérképezéséhez az általunk művelt kémiai/biológiai területek lehetséges megközelítésével.

Kérdéseinket a humán amilázok megismerése motiválta, de vizsgálataink kiterjedtek az ipari szempontból fontos hőstabil bakteriális amilázok területére is.

Az aktív hely vizsgálata különböző módszerekkel lehetséges:

- Igen elegáns módszer egy enzim aktív centrumának és az enzim-szubsztrát kölcsönhatás vizsgálatára az enzim és egy szubsztrát analóg komplexének röntgenkristallográfiás analízise. Jól ismert a HSA 3D szerkezete és együttműködő partnereink készítették el az enzim-akarbóz röntgenkristallográfiás felvételét. Hasonló felvételek és analízisek készültek a BLA-ról, a BSMA-ról.
- Másik hatásos eszköz az enzim és a szubsztrát közötti kölcsönhatás tanulmányozására a módosított szubsztrátok használata, ellentétben a labilis enzim fehérje kémiai módosításával. Módosított maltooligoszacharidok (DP 1-12) szintézisét részben klasszikus kémiai, részben kemoenzimatis úton valósítottuk meg. A homológ maltooligomer sorozatok használata lehetővé tette alhely modellek (subsite-model) és alhely térképek (subsite-map) elkészítését a különféle eredetű α -amilázokra. Az alhely térképezéshez egy számítógépes programot fejlesztettünk ki.
- Az egyes aminosavak szerepét a szubsztrát kötődésében és katalízisben mutációval és a módosítást követő aktivitás mérésekkel, alhely térképezéssel tanulmányoztuk.
- Végül szintetikus inhibitorokkal történő gátlások, a gátlás kinetikájának alapos elemzése révén újabb információkat szereztünk a HSA kötőhelyeiről.

3.1. Amiláz szubsztrátok kemoenzimatisz szintézise [36, 81]

Az α -amiláz enzimek tanulmányozása jól definiált, nagy tisztaságú, vízben jól oldódó szintetikus szubsztrátokat igényel. A Biokémiai Tanszéken korábban ciklodextrinekből kiindulva tisztán kémiai szintézissel oldották meg a 4→8 tagszámú maltooligoszacharidok, valamint a 2-klór-4-nitro-fenil (CNP) β -maltooligoszacharid glikozidok előállítását.

Jelenleg a ciklodextrinekből kiinduló soklépéses kémiai szintézist egy új, kemoenzimatisz módszerrel egészítettük ki. Az itt bemutatott eredmények a diplomadolgozatom készítése során születtek, melyek egyrészt a diplomamunkám témakörét ölelik fel, másrészt közlemény formájában is megjelentek. A kémiai és enzimatisz módszer kombinálása igen előnyösnek bizonyult, mivel a homológ sorozatnak csak egyetlen tagját, a CNP-G₇-t állítottuk elő kémiai úton, s ebből a rövidebb vagy hosszabb tagszámú oligomereket enzimatiszusan nyertük.

Alkalmas enzim felkutatása kulcsfontosságú volt ezen feladat megoldásához.

Korábbi eredmények szerint a humán α -amilázok legjobb szubsztrátjai a 4-6 glükóz egységből felépülő maltooligoszacharidok, míg a bakteriális és növényi eredetű amilázok vizsgálatához ennél hosszabb 5-11 tagszámú szubsztrátok szükségesek. Olyan módszerre volt tehát szükség, melynek segítségével a heptamer glükozid rövidítése és hosszabítása is megoldható. A maltooligoszacharidok glikozidos kötéseinek enzimatisz hasítására két lehetőség van:

- hidrolízis α -glükozidázokkal vagy α -amilázokkal
- foszforolízis foszforilázokkal

Bár ezen enzimek szerepe a glikozidos kötések hasítása, megfelelő reakciókörülmények között glikozidos kötések sztereospecifikus létrehozására is képesek. Az amilázok és a glükozidázok transzglykozilezésre csak igen kis hatásfokkal használhatók.

Választásunk a glykozil transzferázok nem-Leloir csoportjába tartozó glykogén foszforilázra esett. Az enzim fiziológiai szerepe a glykozidos kötések foszforolitikus hasítása, ugyanakkor *in vitro*, reverzibilis reakcióban képes a glykozidos kötések sztereospecifikus létrehozására. Következésképpen a választott enzim kitűnően megfelelt mind a heptamer glykozidnál rövidebb (DP 3→6), mind a hosszabb (DP 8→12) oligomerek enzimatisz szintézisére.

A glykogén foszforiláz, a legintenzívebben tanulmányozott α -glükán foszforiláz. Szervetlen foszfát jelenlétében megfordítható reakcióban katalizálja a glykogén lebontását, a

fordított reakcióban α -D-glükopiranozil-1-foszfát (G-1-P), mint donor jelenlétében viszont képes a lánchosszabbításra.

Foszforiláz enzimeket elterjedten alkalmaznak oligoszacharidok szintézisére [82-84], megvalósították a szacharóz szintézisét szacharóz foszforiláz, és a trehalóz szintézisét trehalóz foszforiláz alkalmazásával [85]. Burgonya foszforiláz enzim segítségével állítottak elő maltóz oligomereket [86-88], lineáris valamint csillag-és fésű alakú polimereket [89]. Foszforiláz enzim katalizálta reakcióval megvalósítható a trehalóz szintézise keményítőtőből [90], és cellodextrinek szintézise is [91].

A glikogén foszforiláz a glikogenolízis első lépését katalizálja az alábbi egyenlet szerint:

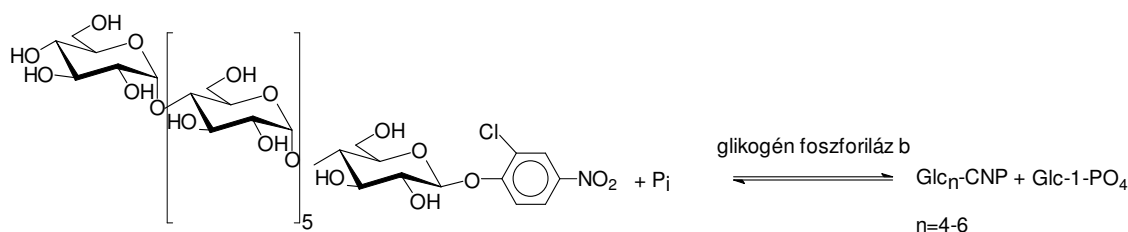


ahol a G_n n tagszámú, α -(1-4) kötésű glükóz polimer, a G-1-P α -D-glükóz-1-foszfát és P_i szervetlen foszfát.

A kemoenzimatisz szintézisekhez a nyúl vázizmából tisztított glikogén foszforiláz b-t használtuk. A glikogén foszforiláz enzim két formában van jelen az izomban. Az inaktív foszforiláz b, amely főleg a nyugalomban lévő izomban található, az AMP szint növelésével, vagy foszforiláz a-vá történő foszforilációval aktiválható. Kísérleteinkben az AMP-vel, mint allosztérikus aktivátorral való aktiválást alkalmaztuk. Az enzim kristályszerkezetét [92] és kötőhelyeit [93] meghatározták, valamint megállapították, hogy a glikogénen kívül az α -(1-4) kötésű oligoszacharidok is erősen kötődnek a glikogénköti helyhez [94].

3.1.1. 4-6 tagszámú maltooligomerek előállítása foszforolízissel [81]

A rövid szubsztrátok előállítására a G_7 -CNP primer enzimatisz foszforolízisét használtuk (8. ábra).



8. ábra: G_7 -CNP foszforolízise glikogén foszforiláz b enzimmal.

Reakciókörülmények optimalizálása

Vizsgáltuk a reakció termékeloszlását az idő függvényében 30 °C hőmérsékleten, szervesen foszfát nagy feleslegét alkalmazva (5 mM primer, 1 M foszfát, pH 6,8), hogy az egyensúly a foszforolízis irányába tolódjon el. Az 1. táblázat a mérési eredményeket mutatja.

30 °C hőmérsékleten 10 perc reakcióidő után a kiindulási anyag teljesen átalakult, a fő termék (77 %) a tetramer glikozid. Hosszabb reakcióidőt alkalmazva trimer és tetramer glikozid képződik 51,3 és 41,4 %-ban. A tetramer glikozid kedvezményezett képződése egybeesik a korábbi megfigyeléssel, mely szerint a glikogén foszforiláz a glikogén láncokat az elágazás előtti negyedik glükóz egységig bontja [95]. A képződött trimer glikozid megjelenése azt mutatja, hogy a CNP csoport helyettesíthet egy glükóz egységet, hasonlóan ahhoz, amit a sertés pankreasz enzim vizsgálatakor leírtak [42]. A kiindulási anyagnál hosszabb termék képződését nem tapasztaltuk.

1. Táblázat

Termékeloszlás a reakcióidő függvényében 30 °C hőmérsékleten^a

Reakció idő (perc)	G ₇ -CNP foszforolízis termékei (%) ^b					Konverzió (%)
	G ₃ -CNP	G ₄ -CNP	G ₅ -CNP	G ₆ -CNP	G ₇ -CNP	
5	1,3	73,7	15	10	0	100
10	2	77	12	9	0	100
60	14	66,2	11,5	8,2	0	100
180	33,8	48,9	11,2	6,0	0	100
300	51,3	41,4	4,4	2,9	0	100

^a Reakciókörülmények: 5 mM G₇-CNP, 1M foszfát puffer pH 6,8, 10 E/ml enzim

^b HPLC-vel meghatározott terület % értékek

A reakciósebesség csökkentése a hosszabb oligomerek képződésének kedvez. Azért, hogy az előállítani kívánt penta- és hexamer mennyiségét növeljük a reakcióelegyen a reakciót alacsonyabb hőmérsékleten vizsgáltuk. A 0 °C hőmérsékleten végzett kísérlet eredményeit a 2. táblázat foglalja össze.

2. Táblázat

Termékeloszlás a reakcióidő függvényében 0 °C hőmérsékleten^a

Reakció idő (perc)	G ₇ -CNP foszforolízis termékei (%) ^b					Konverzió (%)
	G ₃ -CNP	G ₄ -CNP	G ₅ -CNP	G ₆ -CNP	G ₇ -CNP	
10	0	3	8	45	44	56
15	0	9	16	49	25	75
28	0	23	24	39	14	86
42	0	42	23	28	7	93
55	0	48,5	23	22	6	93,5

^a Reakciókörülmények: 5 mM G₇-CNP, 1M foszfát puffer pH 6,8, 10 E/ml enzim

^b HPLC-vel meghatározott terület % értékek

A táblázat adataiból látható, hogy a konverzió lényegesen kisebb, 28 perces inkubációs idő után az előállítani kívánt reakciótermékek G₄-CNP, G₅-CNP, G₆-CNP 23: 24: 39 %-os arányban képződnek. 55 perces reakcióidő alatt fő termékként a G₄-CNP képződik.

Tanulmányoztuk a reakció hőmérsékletfüggését 0-34 °C hőmérséklet tartományban. A kapott termékeloszlásokat 10 perc inkubációs idő után a 3. táblázat mutatja.

A reakciósebesség nő a hőmérséklet növelésével. Átlagosan 5 °C hőmérséklet csökkenés a konverziók 7-9 %-os csökkenését okozza. 0 és 5 °C között ennél jóval nagyobb mértékű (26,2 %) csökkenés tapasztalható. Ennek magyarázata az enzim inaktív tetramer formájának képződése lehet [96]. Azért, hogy elkerüljük a foszforiláz enzim alacsony hőfokon való oligomerizációját 10 °C alatti hőmérsékletet nem alkalmaztunk maltooligomerek előállítására.

Összefoglalva: a G₇-CNP primerből (5 mM) glikogén foszforiláz b enzim segítségével 1 M foszfát pufferben (pH 6,8) 10 °C-on 10 perces inkubálási idő alatt a rövidebb (G₄-CNP, G₅-CNP, G₆-CNP) termékek közel azonos mólarányban (29 : 26,1 : 33,7) képződnek.

3. Táblázat

Hőmérséklet hatása a termékeloszlásra^a

Hőmérséklet (°C)	G ₇ -CNP foszforolízis termékei (%) ^b					Konverzió (%)
	G ₃ -CNP	G ₄ -CNP	G ₅ -CNP	G ₆ -CNP	G ₇ -CNP	
0	0	3	7,6	44,9	44,5	55,5
5	0	12	22,4	46,8	18,3	81,7
10	0	29	26,1	33,7	11,1	88,9
15	0	68	19,3	11	2,2	97,3
20	0	76	14	10	0	100
30	2	77	12	9	0	100
34	2	89	7	2	0	100

^a Reakciókörmények: 5 mM G₇-CNP, 1M foszfát puffer pH 6,8, 10 E/ml enzim, 10 perc

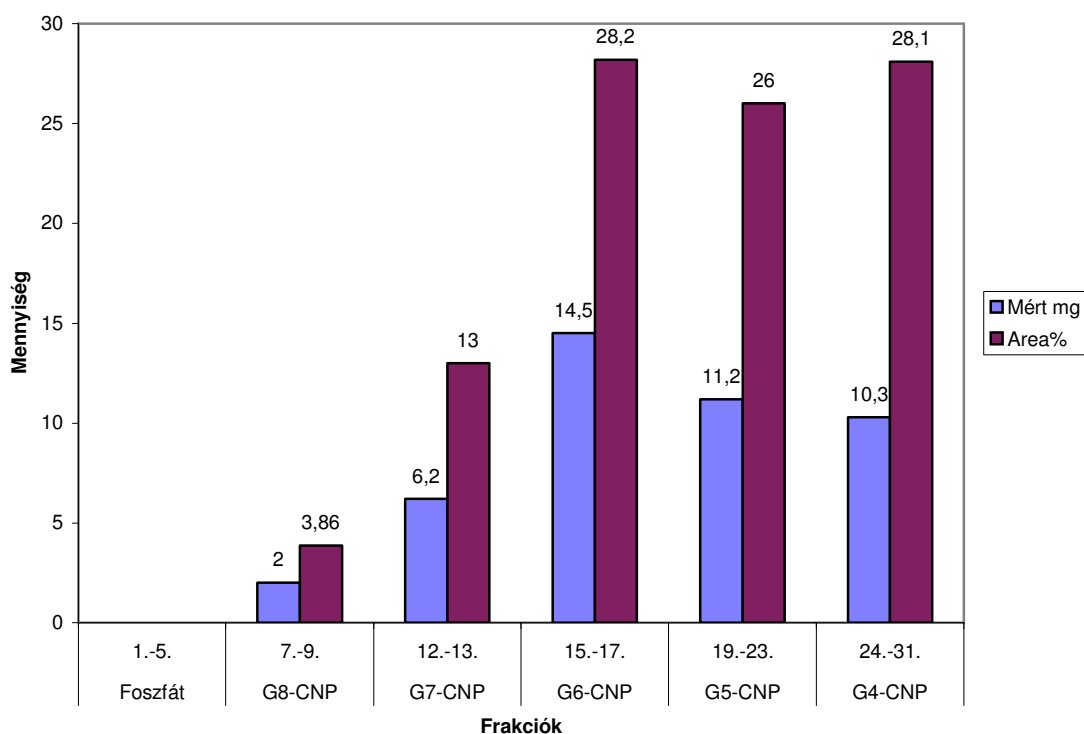
^b HPLC-vel meghatározott terület% értékek

A felhasznált enzimrendszer érdekessége, hogy a foszforiláz enzim által felszabadított G-1-P felhasználódhat a megfordított lánchosszabítási reakcióban, ha a szervesetlen foszfát koncentráció lecsökken. Ezért a foszfát nagy feleslegét (1M) alkalmaztuk a felszabaduló G-1-P-hoz képest (max. 20 mM) az eddigi kísérletekben. A magas só koncentráció azonban a termékek tisztítását nehezíti, ezért megkíséreltük alacsonyabb foszfát koncentráció használatát. Az eredmények azt mutatják, hogy 100, 500 és 1000 mM foszfát koncentráció alkalmazásával szinte azonos termék-eloszlás érhető el, miközben a lánchosszabbítás elhanyagolható. Ennek megfelelően a rövidebb termékek előállítására 100 mM foszfát koncentrációjú pufferben történt.

Reakciótermékek elválasztása

A termékek preparatív méretű elválasztására méret kizárási kromatográfiás technikát alkalmaztunk Toyopearl HW-40F oszloptölteten. Bár ennek a töltet típusnak az elválasztási tartománya 10^2 - 10^4 közé esik fehérjék elválasztásakor, azt tapasztaltuk, hogy a maltooligoszacharidok esetén 1-7 közötti polimerizációfok tartományban megfelelő az elválás, az ennél hosszabb oligomerek nem válnak el. A homológok csökkenő molekulatömeg szerint eluálódnak. A kromatográfiás mátrix másik nagy előnye, hogy mivel a foszfát ionok a

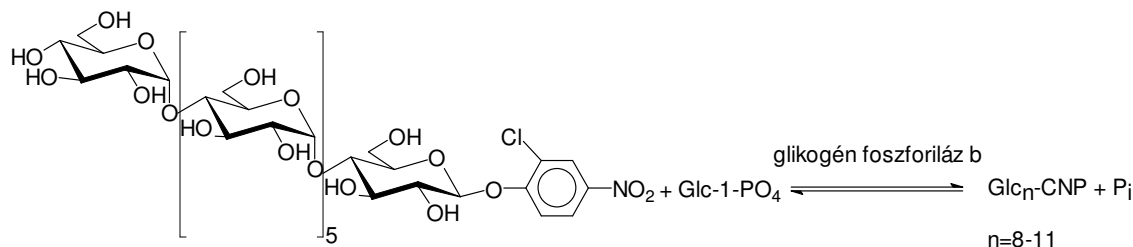
holttérfogattal megjelennek az eluátumban, az elválasztás és a sómentesítés egy lépésben megoldható (9. ábra).



9. ábra A foszforolízis reakciótermékeinek SEC (Mért mg) és HPLC (Terület%) elválasztása
 Körülmények: SEC: oszlop: Toyopearl HW-40F, 180x15 mm, 30-60 μ m, eluens: víz, 1,5 ml/perc, HPLC: kolonna: Amino 250x4 mm, 5 μ m, gradiens elúció: MeCN 70%-ról 20 perc alatt 50%, detektor: DAD 302 nm.

3.1.2. 8-12 tagszámú szubsztrátok előállítása transzglikozilezéssel [36]

Az 7. egyenlet megfordíthatóságát felhasználva G₇-CNP, mint akceptor és G-1-P, mint donor kiindulási anyagokból foszforiláz enzimmal magasabb tagszámú oligomerek is előállíthatók (10. ábra).



10. ábra Szubsztrátok előállítása glikogén foszforiláz b enzim transzglikozilezési reakciójával

A lánchosszabbítási reakcióra hasonló megfontolások érvényesek, mint a láncrövidítésre, így a reakciókörülményeket a G-1-P koncentráció, a hőmérséklet és az enzimkoncentráció változtatásával optimalizáltuk. Mivel foszfát jelenléte a reakciót a foszforolízis irányába tolná el, ezért ezeket a kísérleteket 50 mM koncentrációjú glicerofoszfát pufferben végeztük.

Az enzimatisz szintézis optimalizálása

A szintézis hatékonyságának növelésére az alábbi kísérleti körülményeket tanulmányoztuk:

- a donor-akceptor arányt,
- a reakcióidőt,
- a reakció hőmérsékletét,
- az enzim mennyiségét.

A termék arányok mennyiségi meghatározása minden esetben HPLC-vel történt.

Ahhoz, hogy a reakció a $\text{CNP-G}_8 \rightarrow \text{G}_{12}$ oligomerek képződésének kedvezzen a donort és az akzeptort 10 : 1 arányban kellett alkalmazni. Így a további vizsgálatokhoz 5 mM CNP-G_7 -et és 50 mM G-1-P-t használtunk. Alacsonyabb G-1-P koncentrációk (25 mM, 10 mM) esetében a reakció a bontás irányába is elindult.

A reakció termékeloszlását vizsgáltuk különböző hőmérsékleteken (37, 15 és 10 °C).

37 °C-on olyan mértékű reakciósebesség növelést sikerült elérni, hogy húsznál nagyobb tagszámú termékek is képződtek. Mivel a *Bacillus licheniformis* α -amiláz vizsgálatához 9-10 tagszámú szubsztrátra volt szükség, az ennél nagyobb termékek veszteséget jelentenek. Ezért a láncrövidítésnél tapasztaltaknak megfelelően a reakciósebességet alacsonyabb hőmérséklet alkalmazásával csökkentettük. Korábbi eredményeink szerint a 10 fok alatti hőmérséklet a

foszforiláz enzim oligomerizációját, inaktiválódását okozza, ezért azonos reakciókörülmények mellett, de 10 fokon megismételtük a reakciót (4. táblázat).

4. Táblázat

A reakcióidő hatása az akceptortermékek eloszlásra 10°C-on

Reakció- idő (perc)	A CNP-G ₇ lánchosszabbításának termékei (%)									A hosszabbított termékek teljes kihozatala (%)
	G ₆	G ₇	G ₈	G ₉	G ₁₀	G ₁₁	G ₁₂	G ₁₃	G ₁₄	
10	3,5	41,1	44,5	9,5	1,4	–	–	–	–	55,4
45	2,5	12	46	25	10,5	3,5	1,2	0,5	–	86,7
82	2,1	5,4	29,7	27,9	19,1	10	3,9	1,4	0,4	92

Reakciókörülmények: 5 mM CNP-G₇, 50 mM G-1-P, 25 mM Na-β-glicerofoszfát puffer (pH 7,0) 1000 U ml⁻¹ enzim

Amint látható, 10 perces inkubálás után a CNP-G₇ még 41,1 %-ban van jelen a reakcióelegyben, és nagyobb mennyiségben csak a CNP-G₈ (44,5 %) képződik. 45 perc után a primernek csak 12 %-a marad meg, míg az oktamer mellett (46 %) már számottevő a nanomer (25 %) és a dekamer (10,5 %) mennyisége is. A 82 perces reakcióidő már megfelelő eloszlást eredményez, azaz a célvegyületek közel azonos arányban keletkeznek. Azonban a túl hosszú reakcióidő az enzim denaturálódásához vezethet, ezért magasabb hőmérsékleten, 15 °C-on vizsgáltuk a termékeloszlást. Az eredményeket az 5. táblázat összesíti.

A táblázatból kitűnik, hogy 15 perces reakcióidő után már igen intenzív a lánchosszabbítás, az uralkodó termékek a CNP-G₈ és CNP-G₉ (47,4 % ill. 24,3 %). 30 perces inkubálás a 10 °C-on, 82 perc után kapott termékeloszlást eredményezi (lásd 4. táblázat). Ez kívánalmainknak megfelelő, mivel a magasabb tagszámú termékek nagyobb százalékban képződnek (CNP-G₇ : 3,9 %, CNP-G₈ : 22,3 %, CNP-G₉ : 26,0 %, CNP-G₁₀ : 23,8 %, CNP-G₁₁ : 15,4 %). A reakcióidő további növelése már nem előnyös, mivel további lánchosszabbítással a kívánt termékek kihozatala csökken.

5. Táblázat

A reakcióidő hatása a termék képződésre 15 °C-on

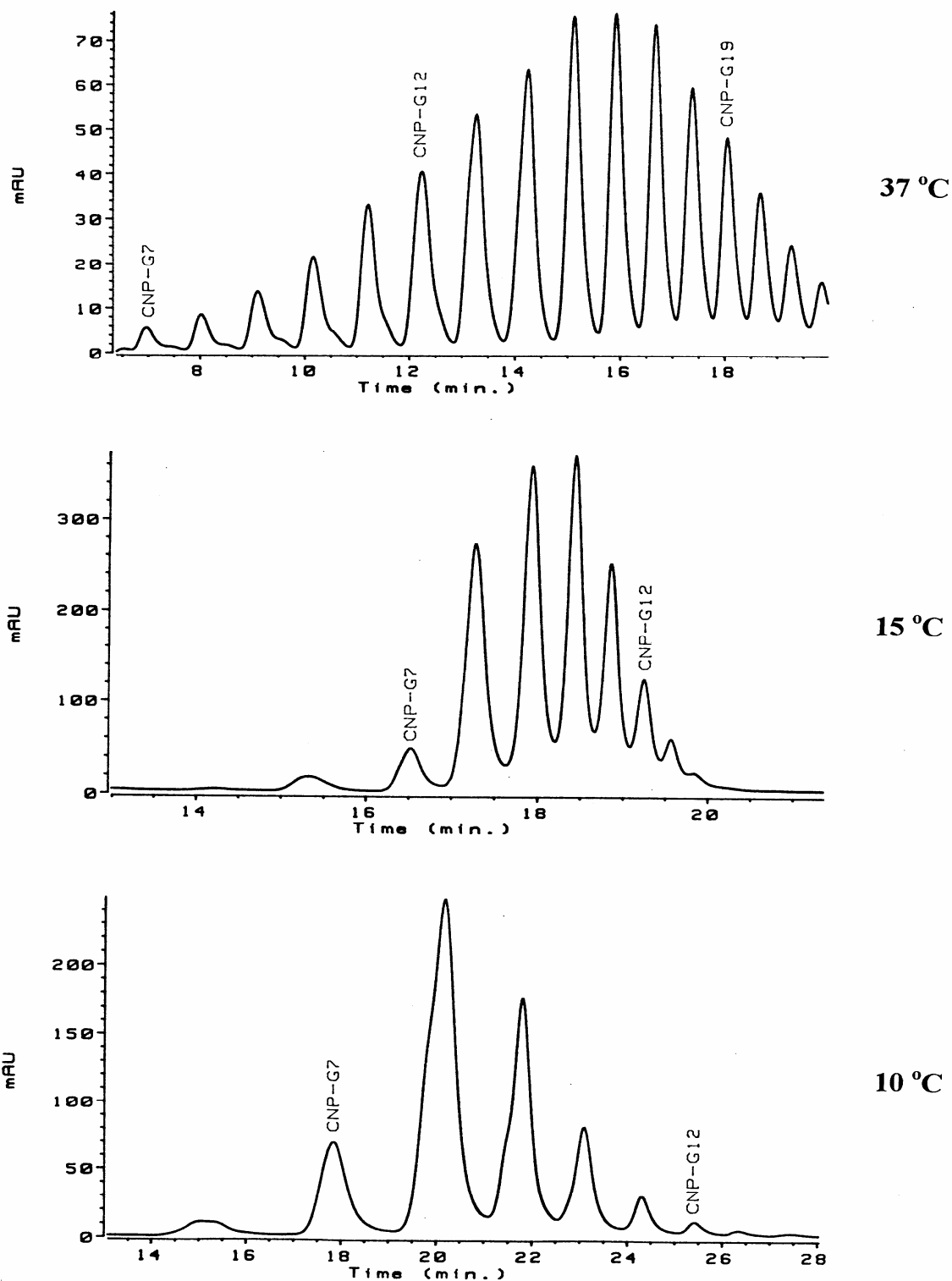
Reakció- idő (perc)	A CNP-G ₇ lánchosszabbításának termékei (%)									A hosszabbított termékek teljes kihozatala (%)
	G ₆	G ₇	G ₈	G ₉	G ₁₀	G ₁₁	G ₁₂	G ₁₃	G ₁₄	
15	–	15,4	47,4	24,3	9,2	2,7	1	–	–	84,6
30	–	3,9	22,3	26	23,8	15,4	6,6	1,99	–	96,09
45	–	2,9	12,1	18,3	21,5	20	13,7	7,7	3,8	97,1

Reakciókörülmények: 5 mM CNP-G₇, 50 mM G-1-P, 25 mM Na-β-glicerofoszfát puffer (pH 7,0) 1000 U ml⁻¹ enzim

A 11. ábra a termékarányokat szemlélteti három különböző hőmérsékleten (10 °C, 15 °C, 37 °C) egy 30 perces reakcióidőt követően. Amint látható, a hőmérséklet növekedésével fokozatosan nő a termékek polimerizációja. A 10 °C-on végbemenő transzglikozilezés a CNP-G₈ glikozid képződésének kedvez. A reakcióelegy összetétele 15 °C-on ideális a célvegyületeink képződéséhez. 37 °C-on a reakciótermékek 8→22 polimerizációs fok között képződnek.

A különböző hőmérsékleteken, azonos inkubációs idő után kapott termékelegyek aminosavak eloszlását vizsgálva különböző gradienseivel készült HPLC kromatogramjai a 11. ábrán láthatóak. A kromatogramokon jól látható a fent leírt termék eloszlás változása.

Eredményeink alapján a preparatív méretű szintézisekhez a 15 °C-on 30 percig tartó reakció a legalkalmasabb.



11. ábra Termékeloszlások különböző hőmérsékleten a G₇-CNP és G-1-P foszforiláz b enzim katalizálta reakciójában. Reakcióköörülmények: 10 µl 10 E/ml enzim, Glc-1-P 50 mM, a CNP-G₇ 5 mM, 37 °C, 30 perc.

Gazdasági szempontból indokolt takarékoskodni az enzim mennyiségével. Ahogyan azt a 6. táblázat mutatja a 100 E/ml aktivitású enzim 37 °C-on hasonló termékeloszlást eredményez, mint az 1000 E/ml aktivitású enzim 15 °C-on.

6. Táblázat

Az enzimkoncentráció és a hőmérséklet hatása a termékeloszlásra

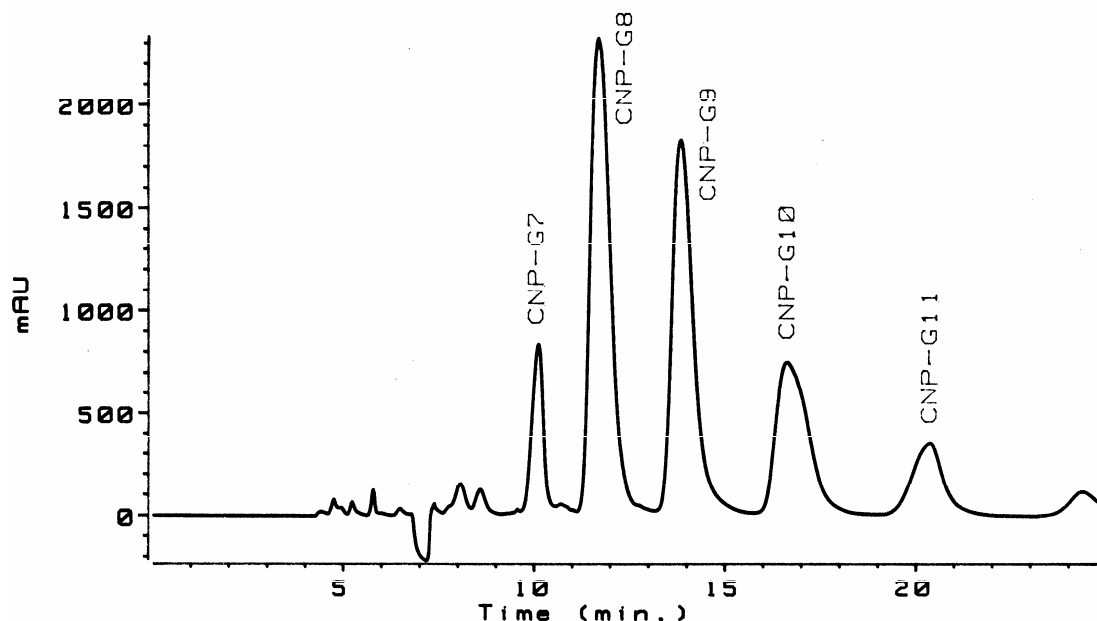
Enzim- aktivitás (E/ml)	Hőmér- séklet (°C)	A CNP- G ₇ lánchosszabbításának termékei (%)								
		G ₇	G ₈	G ₉	G ₁₀	G ₁₁	G ₁₂	G ₁₃	G ₁₄	G ₁₅
100	37	4,5	21,8	26,6	22,2	14,5	6,8	2,4	0,7	0,2
1000	15	3,9	22,3	26	23,8	15,4	6,6	2	–	–

Reakcióköörülmények: 5 mM CNP-G₇, 50 mM G-1-P, 25 mM Na-β-glicerofoszfát puffer (pH 7,0), 30 perc

A transzglykozilezés akceptortermékeinek preparatív méretű elválasztása

A preparatív mennyiségben előállított termékek elválasztása félpreparatív HPLC segítségével történt, az analitikai elválasztásokhoz használt kromatográfiás körülmények mellett, de félpreparatív oszlop és nagyobb áramlási sebesség alkalmazásával.

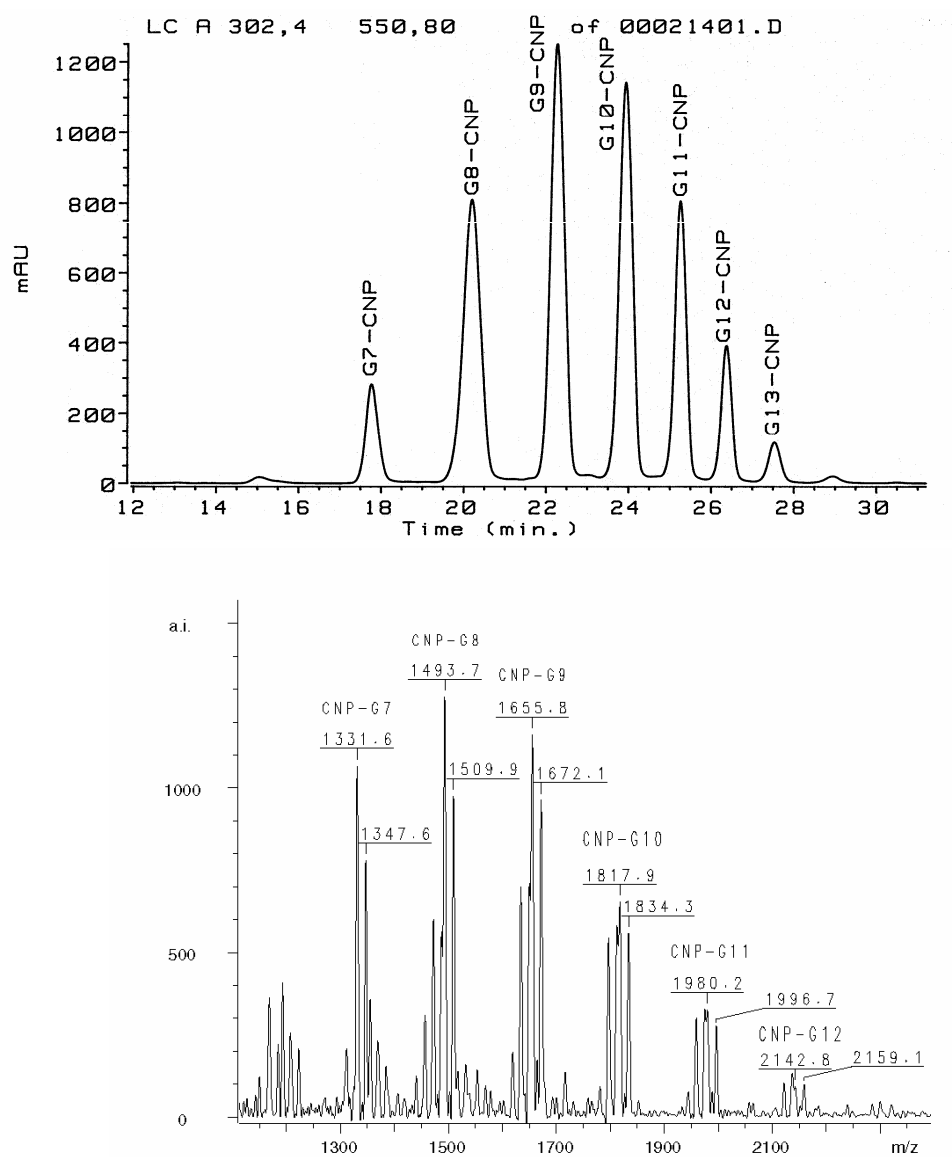
Egy tipikus félpreparatív elválasztást mutat a 12. ábra.



12. ábra A félpreparatív HPLC elválasztás eluációs profilja

70-75 % hozam mellett a kívánt oligomereket a következő mennyiségekben sikerült előállítanunk és megtisztítanunk: 22 mg CNP-G₈, 20 mg CNP-G₉, 14 mg CNP-G₁₀ és 7 mg CNP-G₁₁.

Termékek szerkezetvizsgálata

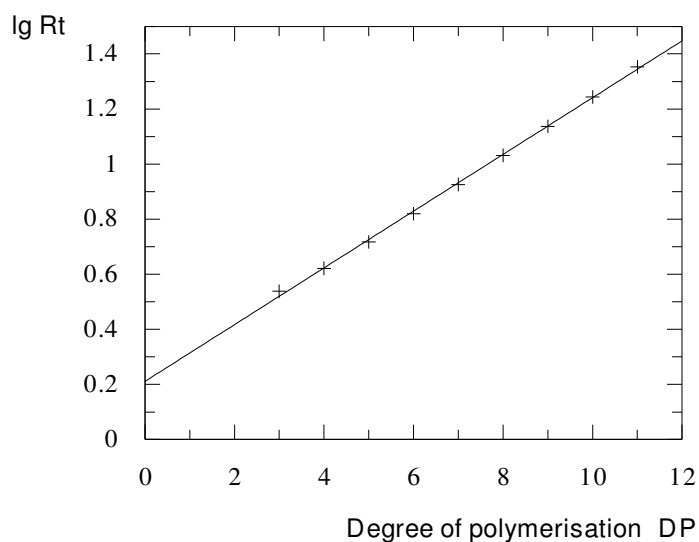


13. ábra Enzimes szintézissel előállított CNP maltooligomer-glikozid elegy HPLC kromatogramja és MALDI-TOF MS spektruma

A termékek azonosítására MALDI-TOF tömegspektrometriát alkalmaztunk. A 13. ábra a termékelegy kromatogramját és MS spektrumát mutatja be.

A MALDI-TOF MS különösen alkalmas elegyek komponenseinek azonosítására, mivel a kíméletes ionizációs módszerrel a fragmentáció elhanyagolható, főként molekulaionok keletkeznek. Oligoszacharidok spektrumában főként az $(M+Na)^+$ és $(M+K)^+$ ionok jelennek meg, amint az a spektrumon is látható $m/z = 16$ különbséggel. A maltooligoszacharidok tagjai közötti egy glükóz egység különbség $m/z = 162$ Da különbséget jelent. A spektrumon a CNP aglikon fragmentációjával képződő komponensek csúcsai is megjelennek. A fragmentáció valószínűleg azért következik be, mert az UV lézer hullámhossza igen közel van a CNP-glikozid 302 nm hullámhossznál levő elnyelési maximumához.

A termékek kötéstípusának igazolására a HPLC retenciós idők analízisét alkalmaztuk. A primernél hosszabb termékek közül csak CNP-G₈ állt rendelkezésünkre, ezért a termékek kötéstípusát egy – az oligoszacharid sorozatokra már korábban leírt, maltooligoszacharid glikozidokra is tanulmányozott – összefüggés alapján azonosítottuk. Az összefüggés szerint, a homológ oligoszacharid sorozatok tagjainak izokratikus körülmények között meghatározott retenciós ideje (R_t) vagy retenciós faktora (k') logaritmikus összefüggésben van az oligoszacharid tagszámával. Vagyis ha az oligoszacharid tagszámának függvényében ábrázoljuk a retenciós ideje, vagy kapacitási faktora logaritmusát, egyenest kapunk. Vizsgálataink szerint az összefüggés diol és amino oszlopon igaz maltooligoszacharid peracetátokra, amino oszlopon maltoligoszacharid glikozidokra (CNP, PNP).



14. ábra CNP- G₇ primerből glikogén foszforiláz b enzim segítségével előállított oligomerek HPLC retenciós idejének logaritmus a tagszám (DP) függvényében

14. ábra a CNP-G₇ foszforiláz enzimmel katalizált reakciójában képződött CNP-G₃ – CNP-G₁₂ termékek retenciós idejének logaritmusát mutatja az oligomer tagszámának függvényében.

A 7 tagszámúnál rövidebb termékek kötéstípusa szükségszerűen $\alpha(1\rightarrow4)$, hiszen ciklodextrinből előállított szubsztrát hasításával képződtek. Mivel a hosszabb termékek lgRt értéke ugyanarra az egyenesre esik, ez valószínűsíti, hogy a képződött termékek is $\alpha(1\rightarrow4)$ kötésűek.

Glükoamilázzal (GA) végzett hidrolízis teszttel igazoltuk az $\alpha(1\rightarrow4)$ glikozidos kötések jelenlétét. A glükoamiláz vagy amiloglikozidáz $\alpha(1\rightarrow4)$ glikozidos kötések hasító exo-enzim. Így a nem redukáló végről glükózegységek felszabadítását katalizálja. A lánchosszabbítással képződött CNP-maltooligomereket glükoamiláz enzimmel bontottuk pH 4,85, Na- β -glicerofoszfát pufferben 37 °C-on. A hidrolízis termékek azonosítása VRK-val történt acetone : víz = 88 : 12 oldószerkeverékben. A hidrolízis eredményeként kizárólag glükózt és CNP-G₁-t tudtunk detektálni. Ez egyértelműen bizonyítja, hogy a hosszabb termékek a donor és akceptor közötti $\alpha(1\rightarrow4)$ glikozidos kötések kialakulásával képződtek.

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy az enzim által katalizált reakció hatékonysága a következő kísérleti körülményektől függ:

- olyan enzim preparátum szükséges, amely kellően nagy foszforolitikus aktivitással rendelkezik, de hidrolitikus aktivitása nincs
- fontos a megfelelő reakciókörülmények választása, hogy a kívánt oligoszacharidok képződjenek
- meg kell oldani a reakciótermékek elválasztását és analízisét, valamint
- a reakciótermékek preparatív méretben történő izolálását

Az első követelménynek megfelelt a Debreceni Egyetem Orvosi Vegytani Intézetében a nyúl vázizomból kivont enzim, hiszen szervesen foszfát nélkül kötéshasítás nem történt.

A reakciókörülmények optimalizálásával a kívánt célvegyületek (CNP-G₄₋₇, CNP-G₈₋₁₂) jó hozammal képződtek. A donor-akceptor arány szignifikánsan befolyásolta a lebontás↔szintézis irányát; a termékeloszlást a pH, a hőmérséklet, a reakcióidő változtatásával sikerült befolyásolni. A reakció követésére, valamint a termékeloszlás kvantitatív meghatározására hatékony HPLC technikát dolgoztunk ki, amino oszlopon, gradiens elúcióval, acetonitril/víz oldószerkeverék alkalmazásával.

Az új, kemoenzimátikus szintézist preparatív méretűvé alakítottuk, és megoldottuk a termékek preparatív méretben történő elválasztását. A rövidebb oligomerek (DP 3→7)

elválasztására sikerrel alkalmaztuk a méret kizárási kromatográfiát (SEC), míg a hosszabb oligomereket félpreparatív HPLC-vel különítettük el.

Az oligoszacharidok szerkezetét kromatográfiás viselkedésük alapján, valamint hidrolízistesttel bizonyítottuk. Molekulatömegük meghatározása MALDI-TOF MS analízissel történt.

Eredményeink igazolták, hogy a CNP-G₇ a glikogén foszforiláz kitűnő szubsztrátja, és a foszforolízis körülmények alkalmas megválasztásával kisebb tagszámú (DP 3→6) oligomerekké hasítható 75 %-os hozammal.

Transzglikozilezésekhez G-1-P-t használtunk donorként. A reakciókörülmények optimalizálásával a transzglikozilezés csaknem 90 %-os hozammal a 8→12 tagszámú oligomerek regio-és sztereospecifikus képződéséhez vezetett. A homológ oligomerek ideális szubsztrátoknak bizonyultak a különböző eredetű vad típusú és mutáns amilázok kötőhelyeinek vizsgálatához.

Bár a különféle foszforilázok használata oligoszacharidok szintézisére ismert az irodalomban, azonban a CNP β -maltooligoszacharidok foszforolízissel és transzglikozilezéssel történő, preparatív méretű, kemoenzimatis előállítás a nyúl vázizom foszforiláz b által katalizált reakciókban *novumnak* tekinthető. Nagyobb tagszámú oligomerek esetében a kromofór csoport bevitele kémiai módszerekkel igen nehézkes vagy nem megvalósítható. Ez is aláhúzza az enzimatis transzglikozilezések szerepét a hosszú láncú, kromoforos maltooligoszacharidok szintézisében. Ilyen szubsztrátok birtokában lehetőség adódik olyan amiláz enzimek vizsgálatára is, melyeknek a szubsztrátkötő helye hosszabb, mint a humán amilázoké.

3.2. Bontási képek, alhely térképek

Az α -amilázok alhely térképeit ezideig kizárólag a DP 3-7 maltooligoszacharidok bontási képéből jósolták meg, ami nem adott lehetőséget a hosszabb kötőárokcal rendelkező amilázok vizsgálatára. Ezt a hiányt pótolja az általunk szintetizált 2-klór-4-nitrofenil- β maltooligomer sorozat (DP 3-12). A hidrolíziseket a vizsgált enzim pH és hőmérséklet optimumán hajtottuk végre. A reakciótermékek mennyiségi meghatározása a hidrolízis korai stádiumában történt, a szubsztrát 10 %-nál alacsonyabb konverziójánál, hogy elkerüljük a szubsztrát másodlagos hasítását. Az UV aktív hidrolízis termékek analízise, azonosítása és mennyiségi meghatározása HPLC technikával történt aminopropil-szilika (APS) kolonnán, diódasoros detektorral, 302 nm-nél. A kötések hasításának gyakoriságát, a keletkező termékek százalékos eloszlását legalább öt mérés átlagából nyertük.

Ebben a fejezetben bemutatom a HSA-nak és Y151M mutánsának, valamint a BLA, BSMA alhely térképeit.

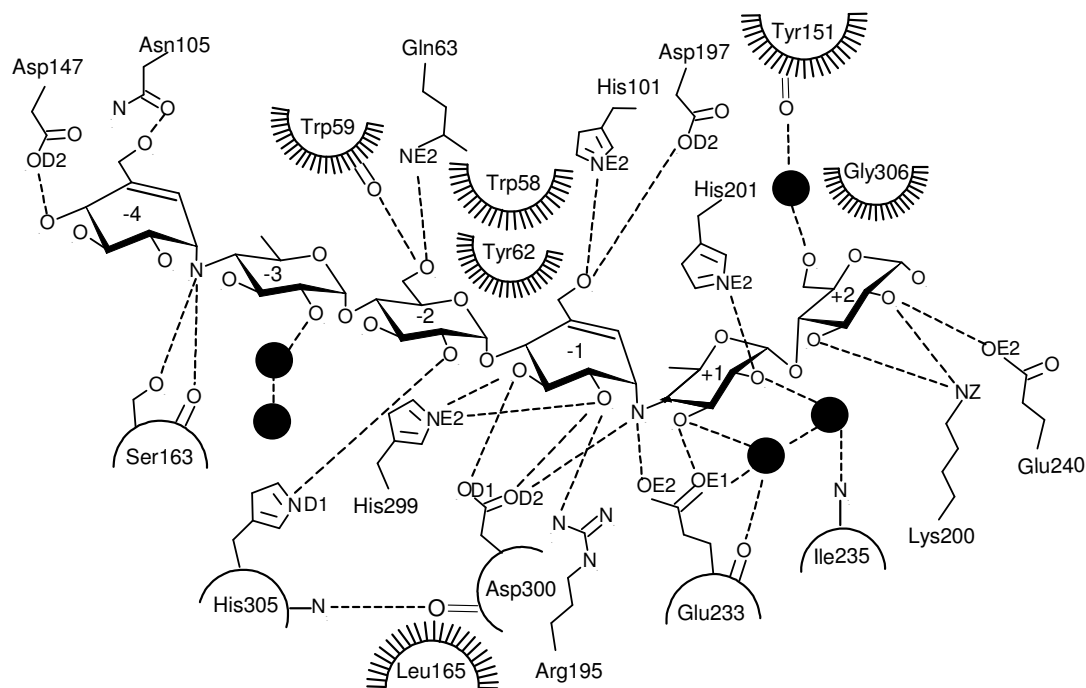
3.2.1. Szerkezet-funkció összefüggés a humán nyál α -amilázban (HSA):

A tirozin szerepe [45, 148-151]

Az α -amiláz a humán nyál legnagyobb mennyiségben előforduló enzime. Az alhelyek számára vonatkozó irodalmi adatok az alkalmazott módszertől függően eltérőek. A kinetikai mérések [97] és a heptamer szubsztrátnál rövidebb oligoszacharidok bontási képe alapján [98] az 5 alhely modellt javasolják, míg a röntgenkristallográfiás analízisek 7 alhelyet feltételeznek a HSA aktív centrumában [99]. A most bemutatott alhely térkép a CNP maltooligomerek (DP 3-10) bontási képe, és az egyes glikozidos kötések hasításának gyakorisága alapján készült. Eredményeink megerősítik, hogy a HSA kötőrégiója hosszabb, mint 5 alhely és legalább 7, 4 glikon és 3 aglikon kötőhelyből áll [45, 148, 149].

Az α -amilázok az α -(1-4) glikozidos kötések hidrolíziséhez 3 katalitikus aminosavat (Glu233, Asp300 és Asp197) használnak, melyek a (-1) és (+1) alhelyet veszik körül. A legtöbb α -amilázban, függetlenül az eredettől, ezen két alhely létesíti a legnagyobb számú kölcsönhatást a kötött szubsztráttal. Azonban a szubsztrát kötődése a két alhelyen önmagában nem elegendő a hidrolízishez, amit a maltóz elhanyagolható bontása is igazol. Így további alhely affinitások szükségesek a produktív kötőmódok létrehozásához. Az α -amilázok

esetében a szubsztrátkötő árok mentén számos aromás aminosav helyezkedik el; mint pl. a Trp58, a Trp59, a Tyr151, a Tyr62, melyek hidrofób (stacking or ring to ring) kölcsönhatást létesítenek egymással és a kötött glükóz molekulával [150-151]. A HSA alhely szerkezetét a 15. ábra mutatja.



15. ábra: A HSA alhely szerkezete. ● :H híd kötésekben résztvevő víz molekulák

A Tyr151 funkciójának vizsgálata alhelytérképezéssel [45, 148-149]

Az emlős amilázok (HPA, HSA) aktív centrumát három aromás aminosav, a Trp59, Tyr62 és a Tyr151 veszi körül, melyek kölcsönhatást létesítenek egymással és a kötött glükóz molekulával. Feltételezték, hogy a Tyr151, amely a (+2) alhelyen helyezkedik el, befolyásolja a távozó csoport méretét. Ezért egy baculovirus expressziós rendszer segítségével létrehozták az Y151M mutánst, melyben a tirozint a 151-es pozícióban metioninra cserélték [98]. Az Y151M specifikus aktivitása, K_m -je, a hidrolízis sebessége, a termékek eloszlása teljesen megváltozott a vad típusú amilázhoz viszonyítva keményítő és oligoszacharid szubsztráton. A hidrolízis paramétereit a 7. táblázat mutatja.

7. Táblázat

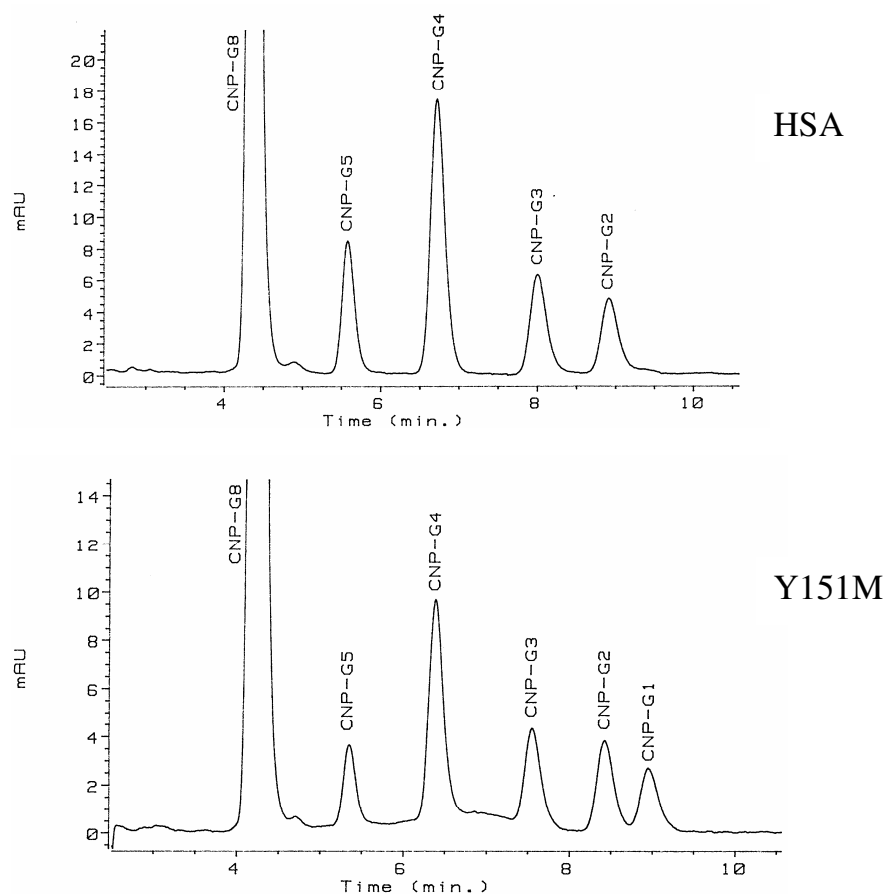
A hidrolízis paraméterei, kinetikai állandók

Enzim	Keményítőn mért specifikus aktivitás (E/mg fehérje)	(CNP-G ₇) heptamer glikozidon mért		
		k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (mM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ mM ⁻¹)
HSA	66212	81	0.24	336
Y151M	17564	14	0.50	29

Jól látható, hogy a mutáció lényegesen csökkentette az amiláz specifikus aktivitását keményítő szubsztráton, és a heptamer oligoszacharidon is. Továbbá a mutáns enzimben tapasztalt K_m növekedése arra utal, hogy megváltozik a szubsztrát bekötődés erőssége, ami az aromás gyűrűk közötti kölcsönhatások csökkenésének vagy hiányának tulajdonítható a (+2) alhelyen. A k_{cat} csökkenése az Y151M-ben az átmeneti állapot destabilizálásának köszönhető.

Meghatároztuk a hidrolízis termékeit mind a vad típusú, mind a mutált enzim katalizálta reakciók esetében CNP-maltooligomer szubsztrátokon.

A vad típusú és az Y151M mutáns amiláz termékanalízisének összehasonlítása azt mutatta, hogy a mutáns enzimben a maltóz, mint minimális távozó csoport glükózra cserélődött. A HSA és az Y151M katalizálta hidrolízis termékek HPLC profilját mutatja a 16.ábra a CNP-G₈ szubsztrát esetében.

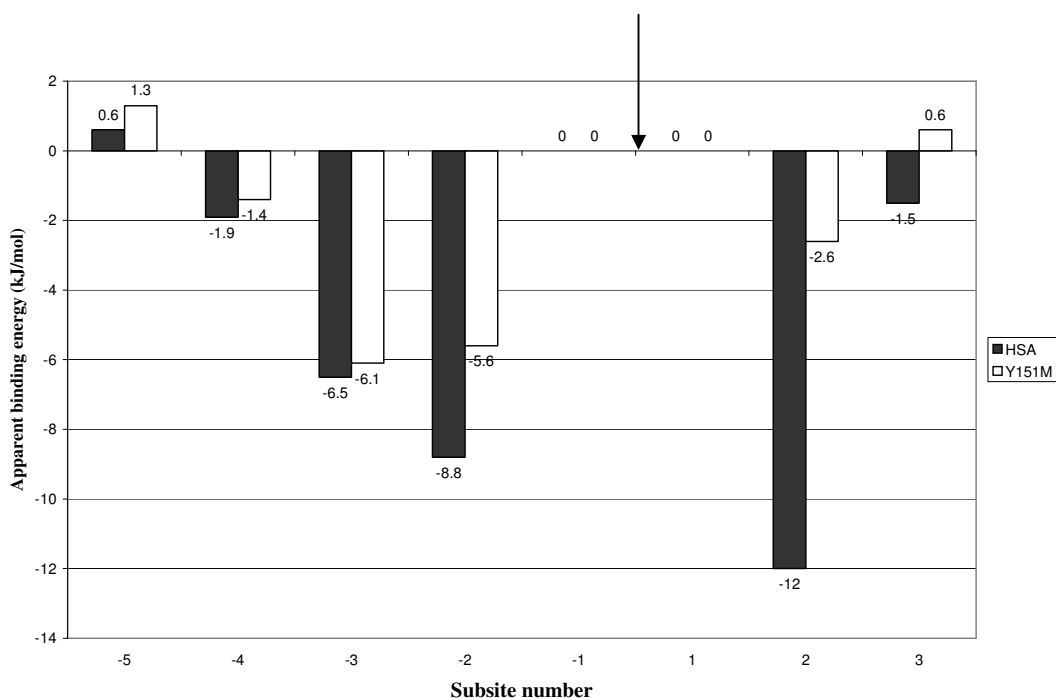


16. ábra A CNP-G₈ HSA és Y151M katalizálta hidrolízisének termékanalízise

A monomer glikozid (CNP-G₁) lett a hidrolízis domináns terméke a rövid szubsztrátok esetében (CNP-G₃, CNP-G₄, CNP-G₅) 77 %, 76 % és 34 %-kal, de szignifikánsan megjelent a hosszabb (CNP-G₆→CNP-G₁₀) oligomerek hidrolízisekor is. A monomer glikozid (CNP-G₁), mint termék azonban nem keletkezett a vad típusú nyál amiláz által katalizált reakcióban [45].

Ezen eredmények a metionin jelenlétével magyarázhatók, ami nem mutat kedvezményezett affinitást a glükózhoz a (+2) kötőhelyen.

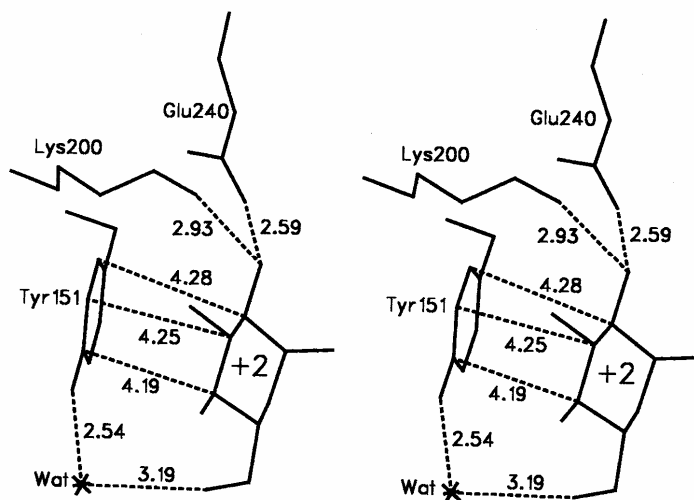
A termékanalízisből és az egyes glikozidos kötések hasításának gyakoriságából létrehoztuk az alhely térképeket (17.ábra).



17. ábra A vad típusú amiláz és az Y151M mutáns alhely térképe

Meglepetésünkre a számított kötés energiája a HSA (+2) alhelyén feltűnően kedvező kölcsönhatást mutatott a glükózzal (-12 kJ/mol), a többi alhely energiájához viszonyítva. A mutánsban az összes kötőhely gyengébb affinitást mutat a glükóz iránt a vad típusú HSA kötőhelyeihez képest. Ez az energia csökkenés összhangban van az alhelyek kooperativitásával. A legfeltűnőbb csökkenés azonban a számított kötés energiákban a (+2) alhelyen jelentkezett (-2,6 kJ/mol a -12,0 kJ/mol helyett), ahol a mutáció történt. Ez a szignifikáns redukció a Met oldallánc jelenlétével magyarázható, amely feltehetően egy olyan konformációt vesz fel, ami részben elfoglalja a glükóz kötődési helyét.

Eredményeink jó összhangban vannak a HSA háromdimenziós szerkezetével [99-100]. A röntgen-kristallográfiás adatok bemutatják a (+2) kötőhely körüli kölcsönhatásokat, ahol a Tyr151 stacking kölcsönhatást létesít a glükóz gyűrűjével és víz molekulán keresztül hidrogén-híd kötéssel stabilizálja a (+2) helyen kötött glükózt. Ilyen kapcsolatok nem alakulnak ki a Met jelenlétében. Továbbá a glükóz hidrogén híd kötésekkel kapcsolódik a Lys200 és a Glu240 oldalláncokkal, melyek a mutáns enzimben is jelen vannak (18. ábra).



18. ábra: A HSA aktív centrumának sztereodiagramja.

Ezen alapos elemzés után arra a következtetésre jutottunk, hogy a Tyr151 kulcsszerepet játszik az oligoszacharidok hidrolízisében nemcsak azért, hogy hatással van a szubsztrátok alap állapotú kötődésére, de befolyásolhatja az átmeneti állapot affinitását is. Az alhely térképek *novum*nak számítottak az irodalomban.

3.2.2. A *Bacillus licheniformis* hőstabil α -amiláza (BLA) [41, 101]

A BLA ipari felhasználása

A mikroorganizmusok széles köre termel és választ ki extracellulárisan olyan amilázokat, amelyek különböző specifitással és érdekes sajátságokkal rendelkeznek. A Gram-pozitív baktériumok és főleg a *Bacillus* család tagjai termékeny amiláz források [102].

A *Bacillus licheniformis* hőstabil α -amiláza (BLA) egyike az iparban legelterjedtebben alkalmazott keményítőbontó enzimeknek. Bár a baktérium maga mezofil, hőstabil α -amilázt is termel. A keményítő ipari méretű hidrolíziséhez hőstabil enzimek használata kulcsfontosságú, mivel ez a poliszacharid csak 100 °C körüli hőmérsékleten oldódik. Az enzimeket felhasználó iparágak közül a mosószer és a keményítő ipar a legnagyobb volumenű, ez a kettő adja az ipari enzimfelhasználás kétharmad részét. Ezen kívül a BLA-t felhasználja az alkohol-, cukor- és söripar [103] éppúgy, mint a textilipar, a sütőipar, gyógyszeripar, valamint alkalmazzák mosószerek előállításához és a szennyvízkezelésben is. A BLA allergiás reakciót válthat ki pékeknél [104] és mosószergyári munkásoknál [105].

A BLA szerkezete

A BLA szerkezetvizsgálatának célja a szerkezet/funkció összefüggések keresése, a termostabilitás okának felderítése, ismeretek szerzése iparban felhasználható enzimek tervezéséhez, és az allergiát okozó régiók felderítése. Röntgendiffrakciós felvételek Ca^{2+} ionok nélküli apoenzimmel [106] és Ca^{2+} iont tartalmazó holoenzimmel készültek [107]. Megállapították, hogy bár a BLA szerkezetében az amilázok általános szerkezeti elemei fellelhetők, néhány jellegzetes eltérést is mutat, ami a hőstabilitással is összefüggésbe hozható. Az enzim 496 aminosavat és 237 víz molekulát tartalmaz, megtalálható benne a jellegzetes központi A domén és a C terminális görög kulcs motívum (C domén). A B domén, ami a katalitikus helyet is magába foglalja, 100 aminosavból áll és bonyolult másodlagos szerkezettel rendelkezik. A katalitikus hely aminosavai azonban a BLA-ban is két Asp és egy Glu. A Cl^- kötőhely a katalitikus hely közelében található, az Arg229, az Asn326 és víz molekulák koordinálnak hozzá. A PPA-ban jelen levő Arg337 itt nem vesz részt a kötésben, helyette víz molekula található. A kevésbé hőstabil *Bacillus amyloliquefaciens* α -amiláz (BAA) szerkezetéhez képest néggyel több ionos kölcsönhatás található benne. Szintén növeli a stabilitást az I. régióban levő hurok a B domén felszínén, ami két aminosavval rövidebb, mint a BAA-ban található, így kevésbé mozgékony.

A legjelentősebb eltérés, amit más amiláznál eddig nem írtak le a $\text{Ca}^{2+} - \text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ szerkezetű triád a szokásos Ca^{2+} kötőhelyen, valamint egy további Ca^{2+} ion az A és C domén között. A Na^+ ion aktiváló hatása régóta ismert, de kötődését az enzimhez nem figyelték meg korábban. Ez a stabilizáló hatás csak mérsékelt, az ion kötőhely flexibilitása elég nagy ahhoz, hogy a Na^+ ion könnyen kidiffundáljon a kötő zsebből. Ca^{2+} ionok távollétében az amilázok inaktívak. Az enzim inaktív formája gyakran rendezetlen régiókat tartalmaz, amelyek kofaktorok (pl. Ca^{2+}) hatására válnak rendezetté. Ez sok, szekréciós enzim esetén így van, talán azért, hogy a sejten belüli nem kívánatos aktivitás elkerülhető legyen.

Kísérletek történtek a hőstabilitásért felelős génszakaszok felderítésére is. Ismert, hogy a BAA termostabilitása századrésze a BLA termostabilitásának. Ezért e két faj génjeinek adott szakaszait cserélték ki egymással, és vizsgálták a képződő enzim termostabilitását [108]. Ilyen kiméra gének előállításával sikerült a vad típusúnál stabilabb enzimet létrehozni. Ebben egy negyedik Ca^{2+} kötő hely található a C doménben, ahol két β -redő között hidat alkot. Akarbóz komplexében dekaszacharidot figyeltek meg, ami csak kétlépéses transzglikozilezéssel képzelhető el [25]. Szerkezeti mutagenezissel is sikerült nagyobb

hőstabilitású enzimet előállítani, ez Asp190 helyett fenilalanint tartalmazott és stabilitása hatszorosára nőtt [109].

A BLA szerkezetére és hőstabilitására vonatkozó mélyreható tanulmányok [109-110], és az irreverzibilis hőinaktiválódással kapcsolatos [111-113] számos irodalmi adat ellenére kevésbé ismertek az enzim biokémiai tulajdonságai.

Bacillus licheniformis α -amiláz szubsztrátkötő helyének vizsgálata

A BLA röntgendiffrakciós felvételét eddig csak szubsztrát és/vagy inhibitor nélkül közölték [106-107], így a szubsztrátkötő helyről csak analógiák alapján vonhatunk le következtetéseket. Bontási képét radioaktív jelzett 1-10 tagszámú maltooligoszacharidokkal, papírkromatográfiás módszerrel vizsgálták [37,38]. A módszer korlátai miatt pontos termékarányokat nem közöltek. Újabb eredmények szerint a BLA katalizálta keményítő hidrolízis termékeloszlása függ a hőmérséklettől [114] és az inkubációs közeghez adott etanol is megváltoztatja a termékek arányát [115]. Mivel az alhelyek számáról és természetéről nem voltak adatok, ezeket az eredményeket nem tudták értelmezni. Ezért tanulmányoztuk a BLA bontási képét CNP-glikozidokon (DP 4-10).

A BLA bontási képe

	-5	-4	-3	-2	-1	+1	+2	+3	%	DP
						G—	∇		37	4
					G—	G—	∇		35	
				G—	G—	G—	∇		28	
			G—	G—	G—	G—	∇		18	5
			G—	G—	G—	G—	∇		34	
			G—	G—	G—	G—	∇		48	
		G—	G—	G—	G—	G—	∇		68	6
		G—	G—	G—	G—	G—	∇		7	
		G—	G—	G—	G—	G—	∇		25	
	G—	G—	G—	G—	G—	G—	∇		5	7
	G—	G—	G—	G—	G—	G—	∇		84	
	G—	G—	G—	G—	G—	G—	∇		11	
	G—	G—	G—	G—	G—	G—	G—	∇	1	8
	G—	G—	G—	G—	G—	G—	G—	∇	9	
	G—	G—	G—	G—	G—	G—	G—	∇	88	
	G—	G—	G—	G—	G—	G—	G—	G—	2	
G—	G—	G—	G—	G—	G—	G—	G—	∇	3	
G—	G—	G—	G—	G—	G—	G—	G—	∇	10	
	G—	G—	G—	G—	G—	G—	G—	∇	83	9
	G—	G—	G—	G—	G—	G—	G—	G—	4	
G—	G—	G—	G—	G—	G—	G—	G—	∇	6	
G—	G—	G—	G—	G—	G—	G—	G—	∇	83	10
	G—	G—	G—	G—	G—	G—	G—	G—	6	
	G—	G—	G—	G—	G—	G—	G—	G—	5	

19. ábra Produktív komplexek és hasítási frekvenciák a CNP-glikozidok BLA katalizálta hidrolízisében. 50 °C-on G: glükóz egység, ∇ : 2-klór-4-nitrofenil csoport, —: glikozidos kötés

A bontási kép szerint a BLA egy különös „kettős termék specifitás”-t mutat. Rövidebb szubsztrátok (DP 6-8) esetében a nem-redukáló vég felőli maltopentaóz (G₅) felszabadítása a kedvezményezett, míg a hosszabb szubsztrátok (DP 8-10) hidrolízise a trimer glikozid (G₃-CNP) domináns felszabadításához vezetett. Ezek az eredmények megegyeznek azzal a kvalitatív képpel, amit a papírkromatográfiás vizsgálat mutatott [38]. A bontási képek alapján feltételezett produktív komplexeket a 19. ábra mutatja be.

Eredményeinkből arra következtettünk, hogy a BLA szubsztrátkötő helye legalább nyolc, öt glikon (-5, -4, -3, -2, -1) és három aglikon (+1, +2, +3) alhellyel rendelkezik.

Ellentétben a korábbi vizsgálatokkal, a BLA a pentamer, sőt a tetramer szubsztrátot is hidrolizálja, bár a reakció sebessége lényegesen kisebb. A G₅-CNP fő hidrolízis terméke G₃-CNP, de G₂-CNP és G₁-CNP is jelentős mennyiségben keletkezik. Látható, hogy ha a szubsztrát hosszúsága lehetővé teszi mind a 8 kötőhely betöltését, akkor a redukáló vég felőli trimer hasítása a legvalószínűbb. Nyolcnál rövidebb szubsztrátok bontásakor a fő hidrolízis termék a nem-redukáló vég felől a maltopentaóz, kivéve a G₅-CNP szubsztrátot, ami a kromofor β -glikozidos kötése miatt nem képezhet olyan produktív komplexet, amelyben mind az 5 glikon kötőhely be van töltve, és a G₄-CNP szubsztrát sem tudja betölteni mind az öt alhelyet.

Ha az enzim és a szubsztrát több olyan kötőmódot tud létrehozni, amiben mind a 8 kötőhely glükóz egységgel betöltött, mindig a G₃-CNP felszabadulás a domináns, sőt a kötéshasítás gyakorisága is állandó (83 %). Ez a jelenség felveti valamilyen energetikai, vagyis sztérikus gát jelenlétének lehetőségét a (+3) kötőhely környezetében.

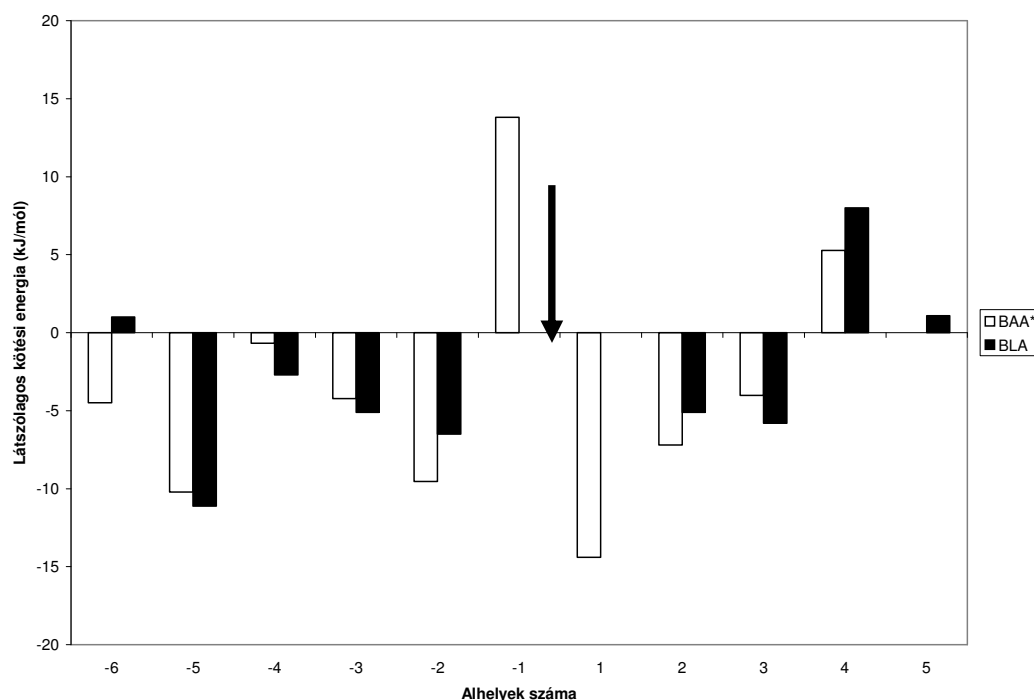
A BLA alhelytérképe

A számított energiák igazolják feltételezésünket, miszerint a BLA 8 alhelyből álló kötőhellyel rendelkezik. A kísérleti hibák miatt az alhely energiákat $\pm 0,6$ kJ/mól pontossággal tudjuk meghatározni, ezért az ennél kisebb értékek nullának tekinthetők, vagyis nem valódi az ilyen energiával rendelkező kötőhely.

A BLA és BAA közeli rokonságát mutatja a kötési energiák hasonlósága. A legszembetűnőbb a (+4) alhely esetén mért pozitív kötési energia, ami a glükóz egység és az alhely kedvezőtlen kölcsönhatását mutatja. Ezt az alhelyet gát alhelynek (barrier subsite) nevezik. Ez az energia gát az oka, hogy a kötőhelynél hosszabb (n>8 BLA és n>9 BAA) szubsztrátok esetén a fő termék G₃ a redukáló vég felől mindkét enzim esetében. A -4 alhely

energiája mindkét esetben kisebb, mint a többi alhelyé. A BLA maltopentaóz, a BAA pedig maltohexaóz termelő enzim, mivel a keményítő hidrolízisekor főként ezek az oligoszacharidok keletkeznek. A glikon kötőhely ezzel összhangban 5 alhelyből áll a BLA és 6 alhelyből a BAA esetében.

Gát alhely hiányában a hosszú szubsztrátokon mért kötőhasítás gyakoriság egyre jobban kiegyenlítődik (ld. HSA). Az alhely térkép grafikus képét a 20. ábra mutatja, amelyen jól látható a két enzim szubsztrátkötő helyének nagyfokú hasonlósága.



20. ábra: A szubsztrátkötő helyek affinitása a BLA és BAA [116] enzimekben.

Az egyes alhelyek látszólagos kötési energia értékei nyolc alhely kedvező affinitását mutatják. A (-6) alhely elhanyagolhatóan alacsony energiája, valamint a (+4) alhely (barrier subsite) igen kedvezőtlen kölcsönhatása kizárja újabb alhelyek jelenlétét. Az alhelyek energia értékeinek, az alhelyek számának megállapítása a SUMA programmal történt.

Összefoglalva: elsőként írtuk le az irodalomban a *Bacillus licheniformis* hőstabil α -amilázának alhely térképét [41]. A BLA enzim aktív centruma 9 alhelyből épül fel, 5 glikon kötő és 3 aglikon kötőhelyből, és tartalmaz egy gát alhelyet. A legjobb szubsztrátja a maltoooktaóz, amely a nyolc kötőhelyet betölti, de a gát alhelyet már nem.

A BLA alhelytérképezésében, amely a szubsztrátok 50 °C-on katalizált hidrolízisének termékanalíziséből készült doktoranduszként vettem részt és eredményeinkből közlemény is született.[41]. Szeretném azonban kiemelni, hogy ezen adatokat Dr.Gyémánt Gyöngyi „A nagyhatékonyságú-folyadékkromatográfia alkalmazása szénhidrátkémiai és szénhidrát-biokémiai kutatásokban” című PhD értekezésében bemutatta.

A hőmérséklet hatása a termék- és energiaeloszlásra a BLA katalizálta hidrolízisben

A BLA kiemelkedő hőstabilitása miatt (80→100 °C) igen elterjedten alkalmazott enzim a különböző iparágakban, ezért indokoltnak tűnt az oligoszacharidok magasabb hőmérsékleten lezajló hidrolízisének tanulmányozására is. A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy befolyásolja-e a magas hőmérséklet a termofil enzim alhely térképét. Méréseinket 80 °C és 100 °C-on hajtottuk végre a 2-klór-4-nitro-fenil- β -maltooligoszacharidokon, mint modell szubsztrátokon és eredményeinket összevetettük az 50 °C-on tapasztaltakkal. A 21. ábra a termékeloszlásokat, a 22. ábra az alhely térképeket szemlélteti 50, 80, és 100 °C-on.

Substrate								T (°C):	BCF (%)			
	<u>-5</u>	<u>-4</u>	<u>-3</u>	<u>-2</u>	<u>-1</u>	<u>+1</u>	<u>+2</u>		<u>+3</u>	50	80	100
G₄				G—G—G—G—CNP						37	50	0
				G—G—G—G—CNP						35	33	79
				G—G—G—G—CNP						28	17	21
G₅			G—G—G—G—G—CNP							18	27	0
			G—G—G—G—G—CNP							34	31	50
			G—G—G—G—G—CNP							48	40	43
			G—G—G—G—G—CNP							0	2	7
G₆		G—G—G—G—G—G—CNP								68	70	0
		G—G—G—G—G—G—CNP								7	11	59
		G—G—G—G—G—G—CNP								25	16	36
		G—G—G—G—G—G—CNP								0	3	5
G₇		G—G—G—G—G—G—G—CNP								5	12	0
		G—G—G—G—G—G—G—CNP								84	68	62
		G—G—G—G—G—G—G—CNP								11	20	25
		G—G—G—G—G—G—G—CNP								0	0	6
		G—G—G—G—G—G—G—CNP								0	0	7
G₈		G—G—G—G—G—G—G—G—CNP								1	1	0
		G—G—G—G—G—G—G—G—CNP								9	9	27
		G—G—G—G—G—G—G—G—CNP								88	88	62
		G—G—G—G—G—G—G—G—CNP								2	2	7
		G—G—G—G—G—G—G—G—CNP								0	0	3
		G—G—G—G—G—G—G—G—CNP								0	0	1
G₉		G—G—G—G—G—G—G—G—G—CNP								3	1	0
		G—G—G—G—G—G—G—G—G—CNP								10	9	19
		G—G—G—G—G—G—G—G—G—CNP								83	75	68
		G—G—G—G—G—G—G—G—G—CNP								4	12	10
		G—G—G—G—G—G—G—G—G—CNP								0	3	2
		G—G—G—G—G—G—G—G—G—CNP								0	0	1
G₁₀		G—G—G—G—G—G—G—G—G—G—CNP								0	3	0
		G—G—G—G—G—G—G—G—G—G—CNP								6	10	17
		G—G—G—G—G—G—G—G—G—G—CNP								83	65	64
		G—G—G—G—G—G—G—G—G—G—CNP								6	15	14
		G—G—G—G—G—G—G—G—G—G—CNP								5	6	4
		G—G—G—G—G—G—G—G—G—G—CNP								0	1	1

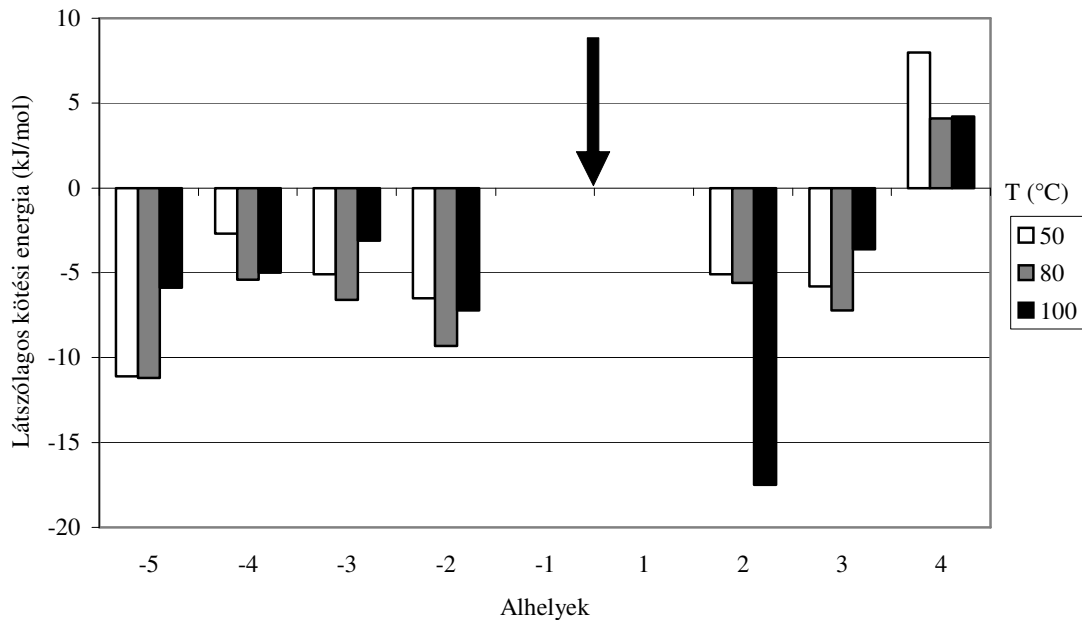
21. ábra: Termékeloszlások 50, 80, 100 °C-on a BLA katalizálta hidrolízisben.

Megállapítható, hogy a 80 °C-on történő hidrolízis nem változtatja meg a termékeloszlást szignifikánsan. Továbbra is a maltopentaóz a hidrolízis fő terméke a rövidebb szubsztrátok (DP 6-8) esetében, míg a hosszabb szubsztrátok (DP 8-10) hidrolízise a trimer glikozid (CNP-G₃) domináns felszabadítását eredményezi. Figyelemreméltó az oktamer glikozid termékeloszlásának tökéletes egyezése 50 és 80 °C-on. A rövidebb szubsztrátok (DP 4-7) esetében a monomer glikozid (CNP-G₁) felszabadítása kifejezettebb 80 °C-on, ahogyan ez a 21. ábrán leolvasható. Ez arra utal, hogy a 2-klór-4-nitro-fenil csoport kedvezményezetten tölti be a (+2) alhelyet, míg a hosszabb szubsztrátok esetében (DP 8-10) kihúzódik a kötőhelyről.

Az egyes kötőhelyek megnövekedett látszólagos energia értékei arra utalnak, hogy 80 °C-on megnő az alhelyek és szubsztrát monomer egységei közötti kölcsönhatás. Feltételeztük, hogy a 80 °C-on mért és számolt adatok hűebben fejezik ki ezen termofil enzim szubsztrátkötő helyének tulajdonságait.

A BLA 100 °C-on is aktív enzim. Azonban a termékek eloszlásában egy szabályos eltolódás mutatkozik (21. ábra) ami az aktív hely szerkezetének lényeges megváltozására utal. 100 °C-on történő hidrolízis során CNP-G₁ sohasem képződik, a (+2) kötőhely nem alkalmas CNP molekula befogadására, kedvezményezett a dimer és a trimer glikozid hasítása. A rövidebb oligomerek olyan produktív kötőmódot létesítenek az enzim aktív centrumával, melyben a CNP-G₂ a távozó csoport (CNP-G₄-ből 79 %, CNP-G₅-ből 50 %, CNP-G₆-ből 59 % és CNP-G₇-ből 62 %); míg a hosszabb oligomerekből a CNP-G₃ képződik elsődlegesen (62 % a CNP-G₈-ből, 68 % a CNP-G₉-ből és 64 % a CNP-G₁₀-ből).

Az egyes alhelyek energia értékének csökkenése (22. ábra) arra utal, hogy gyengül a glükóz molekulák és az alhelyek affinitása 100 °C-on. Kivétel a (+2) kötőhely, melynek nagy energia értéke (-17,5 kJ/mol) a CNP-G₂ jelentős képződésének tulajdonítható.



22. ábra: A BLA alhelytérképe különböző hőmérsékleteken.

Összegzésként: A 80 és 100 °C-on végrehajtott BLA katalizálta hidrolízisek egyértelműen megerősítik korábbi eredményeinket, mely szerint a BLA szubsztrát kötőhely 5 glikon és 3 aglikon kötőhelyből épül fel és nincsenek további kötőhelyek az aktív centrum árkában.

80 és 100 °C-on a gátalhelynek jelentősen csökken az energiája. Az ipari körülmények között 100 °C-on használják a BLA-t a keményítő hidrolízisére.

3.2.3. BSMA – a *Bacillus stearothermophilus* „maltogenic” α -amiláza

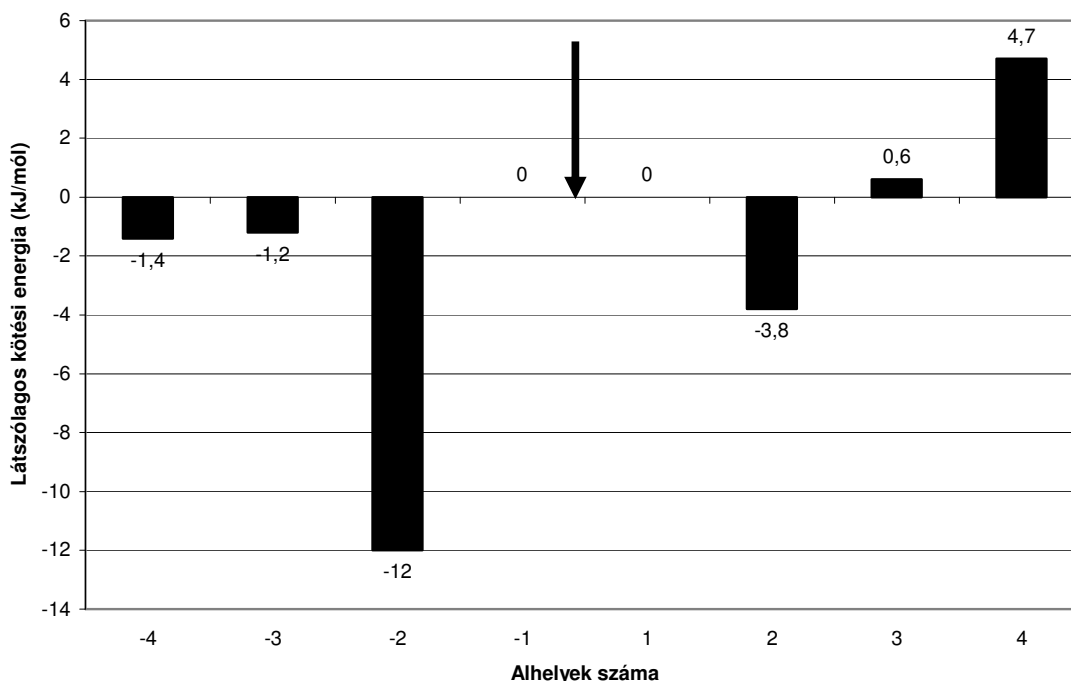
Egy hőstabil maltogén amilázt kódoló gént *Bacillus stearothermophilus*-ból klónoztak és expresszáltak Park és mtsai [10].

A *Bacillus stearothermophilus*-ból izolált maltózt képző α -amiláz (BSMA) vagy Novamyl különleges tulajdonságokkal rendelkezik. A keményítő BSMA katalizálta prolongált hidrolízise maltózt eredményez főtermékként. Ezt úgy magyarázták, hogy a BSMA hasonlóan a β -amilázhoz és glükóamilázhoz egy exo-enzim, és nem-redukáló láncvéget igényel a hasításhoz. Eltérően a β -amiláztól, a képződött maltóz α -konfigurációjú, azaz a BSMA az anomer konfiguráció nettó megtartásával hidrolizáló enzim. Bár maltóz a hidrolízis végső terméke, de a BSMA számos tulajdonsága arra utal, hogy nem igényel láncvégeket a glikozidos kötés hasításához. Így pl. igen aktív ciklodextrineken és terminálisan módosított szubsztrátokon is. Továbbá, az amilóz hidrolízisekor a polimerizáció fokának drámai csökkenése figyelhető meg, ami szintén endo típusú hasításra utal.

A BSMA bontási képe és alhely térképe

Részletesen tanulmányoztuk a hidrolízis termékeit 2-klór-4-nitrofenil- β -maltooligoszacharid szubsztrátokon (DP 3-7). A termékanalízis azt mutatja, hogy a BSMA katalizálja a módosított lineáris oligoszacharidok hidrolízisét. A rövidebb (DP 3-4) szubsztrátok hidrolízise a maltóz nem-redukáló végekről történő felszabadítását eredményezi. A hosszabb (DP 4-7) szubsztrátok hidrolízise a dimer glikozid hasításának kedvez, de szignifikáns a trimer és monomer glikozidok képződése is.

Az egyes glikozidos kötések hasításának gyakoriságából kötési energiákat számoltunk, majd megszerkesztettük az alhely térképet. A 23. ábra a BSMA alhely térképét ábrázolja.



23. ábra: A BSMA alhely térképe.

Nem meglepő, hogy a (-2) és (+2) alhelyek feltűnően jó kölcsönhatást létesítenek a szubsztrát monomer egységeivel, más alhelyekhez képest. Ezen kedvező kölcsönhatás eredményezi egyrészt a szubsztrátok redukáló vége felől történő dimer glikozidok, másrészt a nem-redukáló végekről történő maltóz domináns felszabadulását. A legnagyobb affinitás (-12,0 kJ/mól) a (-2) alhelynél tapasztalható, amely jó összhangban van a BSMA háromdimenziós modelljével. Ezen alhelyen a glükózt H-kötések stabilizálják 6 aminosav oldallánccal.

Érdemes megemlíteni, hogy a (+4) alhely, mely jelentős pozitív energiával (+4,8 kJ/mól) rendelkezik, egy „gáthely” lehet, melynek eredményeképpen trimer glikozidnál hosszabb oligomerek nem jelennek meg a hidrolizátumban.

Ezen eredményeink is megerősítik, hogy a katalízis endo támadás, és nincs szükség polimer láncvégekre a hidrolízishez, összhangban a háromdimenziós szerkezettel [117]. A BSMA aktív helye egy meredek falú nyitott árok az enzim felszínén, hasonlóan az α -amilázok aktív helyéhez, s így nem jelent szerkezeti gátat egy kezdeti endo támadáshoz. Ebben a vonatkozásban a BSMA teljesen különbözik az exo amilolitikus enzimektől, melynek aktív helyei egy zsebben helyezkednek el az enzim felszínén, és így csak a poliszacharid nem-redukáló láncvégeinek bekötődését teszik lehetővé. [118] (Pl.: a glikozid hidrolázok 14.

családjába tartozó β -amiláz és a 15. család glükóamiláz tagja.) Bár maltóz a hasítás főterméke, de a többszörös támadás („multiple attack”) mechanizmusa, melynek során az enzim számos kötés hidrolízisét katalizálja, mielőtt a termék ledisszociál az enzimről, nem zárható ki teljesen.

A röntgenkristallográfiás eredmények arra is rámutatnak, hogy a BSMA a CGT-ázokhoz hasonlóan 5 doménből áll, eltérően a hagyományos α -amilázoktól, a glikozid hidrolázok 13. családjától. A BSMA maltózzal és az inhibitor akarbózzal képzett komplexét is tanulmányozták [117]. A [maltóz-E] komplexben két molekula maltóz található az aktív centrum (-1), (-2) és a (+2) (+3) alhelyein, és még kettő a C és E doménen. A C doménen található maltóz azonos pozíciójű az egyik korábban [119] megfigyelt *Bacillus circulans* CGT-áz szerkezettel; ami arra utal, hogy a C domén valóban szerepet játszik a cukor kötésében. Az akarbóz-eredetű hexaszacharid inhibitor azonban a (-3)-tól a (+3)-ig terjedő alhelyeket tölti be. Az átmeneti állapotot mimikáló pszeudoszacharid a (-1) kötőhelyet foglalja el $^2\text{H}_3$ félszék konformációban.

3.3. Enzimatis glikozilezések [120-122]

A glikomika (glycomics) a genomikát és proteomikát követően az egyik legújabb tagja az „omika” (omics) családnak. Napjainkban óriási érdeklődés tapasztalható a glikomika iránt a bio-gyógyszeriparban.

Az a felismerés, hogy a glikozilezés fontos szerepet játszik a biológiai funkciókban igen jelentős fejlődést hozott azokban a bio-gyógyszergyárakban, ahol a kutatások a szénhidrátalapú gyógyszerfejlesztésre irányulnak. Az analízisben és szintézisben alkalmazott fejlett technológiák tökéletesebb adatokat szolgáltatnak a glikánok szerkezetéről, a kötőspecifitásokról, a szénhidrátokat meghatározó génekről. Ezen túlmenően folyamatosan növekszik azon humán betegségek felfedezése, melyek a szénhidrátokkal, a szénhidrát metabolizmus rendellenességeivel kapcsolatosak. Így vakcinák, új gyógyszerek kifejlesztésére intenzív kutatások folynak szerte a világon.

A géntechnológia előnyei lehetővé teszik sokféle enzim nagy mennyiségben történő előállítását, növelve ezzel a szintézishez felhasználható enzimek számát. Számos komoly erőfeszítéssel találkozhatunk az irodalomban, melyek az anomer konfigurációt megtartó glikozidázok transzglikozilező képességét tanulmányozzák, mint egy alternatív lehetőséget, kromogén oligoszacharidok szintézisére [123-125].

Eneyskaya és mtsai [124] a PNP β -(1-4) xilooligoszacharidok (DP 2-7) regio- és sztereoselektív szintézisét valósították meg az *Aspergillus* eredetű β -D-xilozidáz enzimmal.

Usui és mtsai [125] a *Streptomyces griseus* maltotrióz-képző amilázának vizsgálták a transzferáz reakcióit. Ezen megközelítések egyik lehetséges korlátja az, hogy a transzglikozilezés termékeit az enzim hidrolizálja. Ezt a problémát számos β -[126-127] és α -aril- [128] oligoszacharid szintézise során glikoszintázok és a katalitikus nukleofillel nem rendelkező glikozidáz mutánsok bevezetésével hidalták át, melyek nem hidrolizálják a szubsztrátokat glikozil fluorid donorok jelenlétében. Az enzim szintézise során az exo-glikozidázok transzferáz képességét használják ki, míg az endo-glikozidázok alkalmasságát csak ritkán tanulmányozzák. A glikozidáz enzimek katalizálta szintézisek növekvő száma ellenére sem ismertek azok a szerkezeti követelmények, melyek lehetővé teszik az akceptor enzimhez kötődését, ami lényegesen növelhetné az enzim metodológia szintetikus felhasználhatóságát.

3.3.1. Transzferáz aktivitás „bevezetése” mutációval a HSA-ba [120-121]

A HSA enzim (+2) kötőhelyén található tirozin 151 metioninra történő cseréjének leglényegesebb következményeit a 8. táblázat összegzi.

8. Táblázat

A mutáció hatása a HSA enzimre

Változások	Enzim	
	Vad HSA	Y151M
Aminosav (+2) alhelyen	Tyr151	Met151
Összes kötőaffinitás	–30 kJ/mol	–13,8 kJ/mol
Kötőenergia (+2) alhelyen	–12 kJ/mol	–2,6 kJ/mol
Minimális távozó csoport	Maltóz	Glükóz
k_{cat}/K_M (1/smM)	336	29
Hidroláz: transzferáz aktivitás	100 : 1	2 : 1
Kölcsönhatások	Sok, erős hidrogén híd	Kevés számú kölcsönhatás
Alhely modell	4 + 3	4 + 2

A nyál amiláz Y151M mutánsának alapos elemzése során arra a következtetésre jutottunk, hogy az aglikon kötőhelyen létrehozott szerkezeti változás növelheti a nyál amiláz szintetikus aktivitását, és a PNP-glikozidok jobb akceptorai lesznek az Y151M enzimnek, mint a vad típusú amiláznak. A PNP, mint aglikon használata azért is igen előnyös, mivel a reakciótermékek azonosítását és mennyiségi meghatározását érzékeny és egyszerűvé teszi. Vizsgálataink arra irányultak, hogy tanulmányozzuk ezen új mutált enzim alkalmazhatóságát oligoszacharidok szintézisére.

Maltotetraóz mint donor jelenlétében számos PNP-glikozidot, mint akceptort próbáltunk ki transzglikozilezésre, köztük néhányat említve; PNP α -Glc, PNP β -Glc, PNP 1-S- β -Glc, PNP α -Man, PNP α -Xyl; melyek akceptor termékei jó hozammal képződtek. A transzglikozilezés a donor oligoszacharid egységeinek (maltóz vagy maltotrióz) átvitelével

történt az akceptor glikozidra. Kísérleti körülményeink között a donor donorra történő transzfere (self transfer) nem fordult elő vagy csak minimálisan. Úgy találtuk, hogy a transzglikozilezés aktivitásának pH optimuma nem különbözött a hidrolízis pH optimumától, így a transzglikozilezéseket pH 6.0 pufferben hajtottuk végre.

Az alábbi táblázatban foglalom össze a különféle akzeptortermékek %-os képződését az Y151M katalizálta glikozilezésben:

9. Táblázat

Akzeptortermékek képződése (%-ban) az Y151M reakcióban^a

Akceptor	Akceptor glikozid termékek %-os képződése ^b				Összes kihozatal (%)
	Dimer	Trimer	Tetramer	Pentamer	
PNP α -Glc	30	15	3,8		48,6
PNP β -Glc	29	10	1,0		40,0
PNP 1-tio- β -Glc	30	10	1,0		41,0
PNP β -Xil	15	7,0	5,0	0.8	27,8
PNP β -Man	3,0	2,0			5,0
PNP GlcNAc	—	—	—		0,0

^a Reakció körülmények: 10 mM maltotetraóz és 15 mM PNP-akceptor, 25 mM Na-glicerofoszfát puffer (pH=6,0); Inkubáció: 8 °C, 6 óra.

^b HPLC-vel mért terület%.

A táblázat kitermelési értékei azt mutatják, hogy a glükozidok és a xilozid igen hatásos akceptorok. Ha figyelembe vesszük, hogy az Y151M enzim az akceptorok alacsony koncentrációjánál (15 mM) már transzglikozilez, továbbá hogy a glikozilezés mellett a donor és az akzeptortermékek víz jelenlétében végbemenő hidrolízise is állandóan folyik, a kapott kitermelések igen jó eredménynek számítanak. Ez arra utal, hogy a használt akceptorok viszonylag erősen kötődnek az enzim aglikon kötőhelyéhez. A metionin jelenléte előnyösnek tűnik a nem poláris fenil csoport számára a (+2) kötőhelyen.

Azt tapasztaltuk, hogy az α -glükozid akzeptortermékek jobb kitermeléssel képződtek (48,6 %) mint a megfelelő β -glükozid termékek (40 %). Az Y151M enzim hatékonyabban viszi át a donor oligoszacharid egységet az α -glükozid akceptor 4-OH-jára, mint a megfelelő

β -glükózid 4-OH-jára. Ez feltételezi, hogy a hidrofób PNP-csoport orientációja az akceptorban befolyásolja a transzglykozilezés hatékonyságát. A β -tio-glikozid hasonló kitermelést adott, mint a megfelelő O-glikozid. Így a glikozidos oxigén kénre történő cseréje lényegesen nem változtatja meg a kihozatalt. A β -xilozid is jó akceptornak bizonyult, bár nem volt olyan hatékony, mint a β -glükózid. Ez feltehetően a 6-OH hiányának tulajdonítható, ami fontos a bekötődéshez. A β -mannozid akzeptortermékek kisebb mértékű képződése feltehetően a mannopiranóz axiális OH-jának tulajdonítható, és ez azt jelzi, hogy a mannopiranóz kedvezőtlen kölcsönhatást létesít a (+1) kötőhelyen.

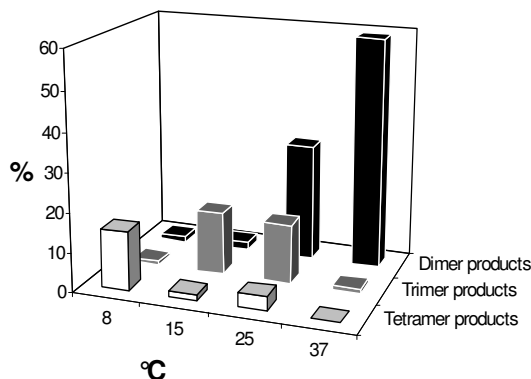
A PNP-N-acetil-glükózaminid, mint akceptor jelenlétében glikozilezett termék nem képződik. Ez is megerősíti az ekvatoriális 2-OH jelenlétének fontosságát a (+1) kötőhelyen.

Ezen eredmények rámutatnak az Y151M mutáns enzimmel katalizált vizes fázisban történő szintézisek változatosságára és sokoldalúságára. Fontos hangsúlyozni, hogy az Y151M katalizálta transzglykozilezések híg oldatban, 10 mM maltotetraóz mint donor, és 15 mM PNP-glikozid, mint akceptor jelenlétében játszódnak le.

3.3.2. PNP-1-tio- β -glikozidok szintézise az Y151M amiláz mutáns enzimmel

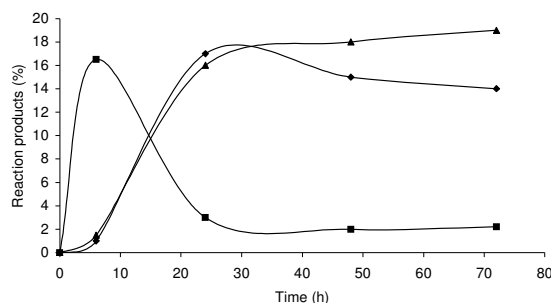
Oligoszacharidok preparatív mértékű szintézisére a PNP 1-S- β -Glc-t választottuk akceptorként, mivel ellenáll az Y151M katalizálta hidrolízisnek, valamint a tioglikozid jó aktivátor lehet az anomer pozícióban a további glikozilezési reakciókban. A tio-glikozidok hatásos glikozilező ágensek specifikus tiofil reagensekkel történő kémiai szintézisekhez.

A szintézis körülményeinek optimalizálása



24. ábra: Termékeloszlás a hőmérséklet függvényében.

A 24. ábra a hőmérséklet hatását mutatja a transzglykozilezésre: Részletes enzimológiai vizsgálatok rámutattak arra, hogy az idő és a hőmérséklet volt a legfontosabb tényező a szintézis irányítására. 37 °C-os hőmérséklet a dimer glikozid (1-S- β -Glc₂) domináns képződését eredményezte. Ez az akzeptortermék feltehetően nem elsődlegesen képződött, de jó kitermeléssel (59 %) a 6 órás inkubáció során. Alacsonyabb hőmérsékleten (25 °C és 15 °C) keletkezett a trimer glikozid (1-S- β -Glc₃) 16 %-nyi mennyiségben, míg a tetramer glikozid (1-S- β -Glc₄) kizárólagos képződésének a 8 °C-on történő inkubáció kedvezett (15%). Bár a teljes konverzió alacsonyabb hőmérsékleteken (15 °C, 8 °C) csak 20 % körüli, de mégis jelentősnek mondható, ha figyelembe vesszük a több lépéses, alacsony kitermelésű kémiai szintézisüket. Így az Y151M mutánssal katalizált enzimátikus szintézis, hatékony, egy lépésben végbemenő alternatív mód az aril β -tioglikozidok (DP 2-4) szintéziséhez. A hosszabb inkubációs idő során sem következik be az 1-S- β -Glc₃ hidrolízise, tehát a trimer glikozid nem jó szubsztrátja a mutált enzimnek. A tetramer glikozid azonban egy hosszabb inkubációs idő után (20 óra) dimer glikoziddá hidrolizálódik, s így a dimer felszaporodik a reakcióelemben (25..ábra).



25. ábra A transzglykozilezés időfüggése 8 °C hőmérsékleten. ■ tetramer, ◆ trimer, ▲ dimer termék

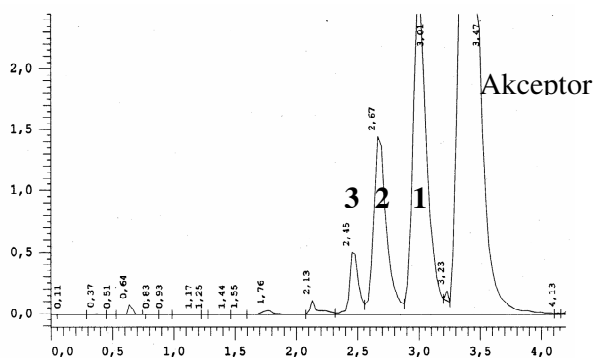
Eredményeink egyértelműen igazolják, hogy az Y151M jól használható aril β -glikozidok (DP 2-4) regio-és sztereospecifikus szintézisére.

Az akzeptortermékek elválasztása és szerkezetvizsgálata

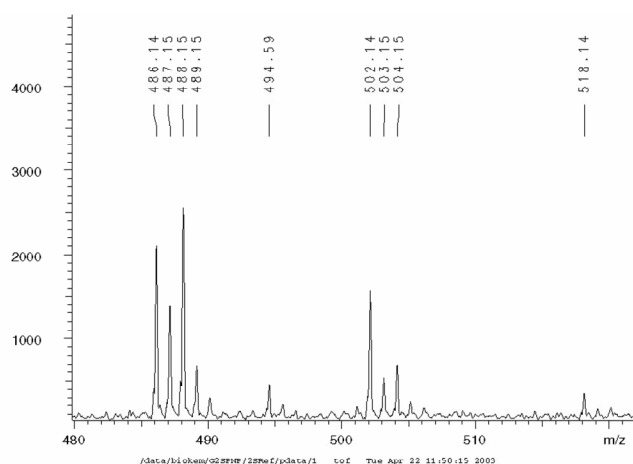
A termékeket preparatív HPLC-vel fordított fázisú oszlopon választottuk szét (26.ábra). A termékek szerkezeti analízisét MALDI-TOF MS adatokkal (27.ábra) és ¹³C illetve ¹H NMR

spektroszkópiával (10. táblázat) valósítottuk meg. A MALDI-TOF MS spektrum igen jó egyezést adott a számított molekula tömegekkel [121].

Az akceptornak és az új akceptortermékeknek egy tipikus HPLC kromatogramja látható a 26. ábrán.



26. ábra A transzfertermékek elválasztása HPLC-vel. **1** dimer, **2** trimer, **3** tetramer.



27. ábra A fő termék **1** PNP-1-S-β-G₂ MALDI-TOF spektruma.

$[M+Na]^+$ C₁₈H₂₅O₁₂NSNa Elméleti Mt: 502,10

Az interglikozidos kötés típusát valamint az anomer konfigurációt egy- és kétdimenziós ¹H és ¹³C NMR spektroszkópiával határoztuk meg. Az NMR adatokat a 10. táblázat összegzi. Az 1D ¹H NMR spektrumban két dublett jelenik meg; az egyik 3,5 Hz, a másik 10,3 Hz *J*_{1,2} csatolási állandóval. A 10,3 Hz érték a β-glikozidos kötésre utal, míg a 3,5 Hz az újonnan képződött α konfigurációt igazolja. Ezek az adatok megerősítik, hogy az Y151M mutáns enzim megtartotta α-sztereoszelektivitását, és nem változtatta meg az akceptor tio-glikozid anomer konfigurációját. Ezt az eredményt a ¹³C NMR spektrumban a C-1 és a C-1' szén

atomok kémiai eltolódás értékei is alátámasztják, melyek 85,14 illetve 99,2 ppm értéknek adódtak.

10. Táblázat

A PNP-1-tio- β -D-maltozid ^1H -NMR és ^{13}C -NMR adatai

C	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	J (Hz)
1	5.02	85.14^a	
2	3.53	71.15	$J_{1,2} = 10.3$
3	3.87	77.25	
4	3.76	78.18 ^a	
5			
6		60.38	
1'	5.36	99.22	
2'	3.6	71.25	$J_{1',2'} = 3.5$
3'	3.71	72.44	
4'	3.45	68.00	
5'			
6'		60.05	

^a A kiemelt és dőlt számmal jelzett értékek magyarázata a szövegben található.

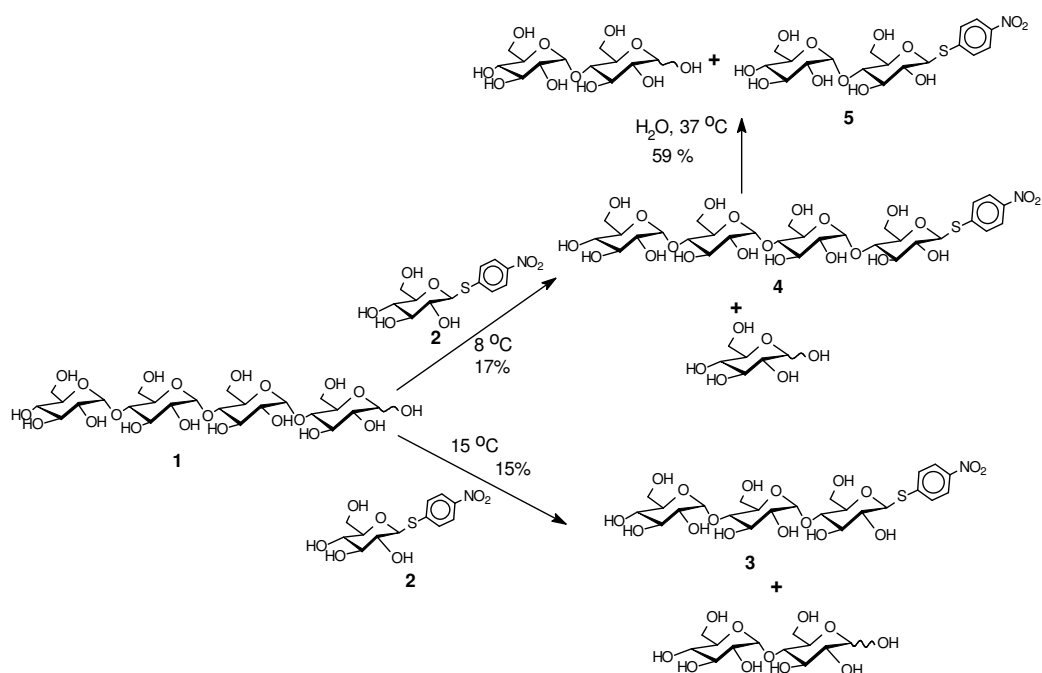
Az interglikozidos kötés típusára vonatkozóan, a C-6 és a C-6' szénatomok kémiai eltolódása alapján megállapítható, hogy a glikozilezésben a C-6 és a C-6' nem vesz részt. A C-4 kémiai eltolódása (78,18 ppm) a legnagyobb a váz szének között, kivéve a két anomer szén kémiai eltolódás értékét. Ez megerősíti az $\alpha(1-4)$ interglikozidos kötések jelenlétét, és arra utal, hogy az Y151M megőrzi nemcsak sztereo-, de regiospecifitását is a glikozilezési reakciókban.

A diszacharid úgy írható le, mint α -D-Glp(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-Glp-(1-S-PNP).

Az Y151M katalizálta transzglikozilezés feltételezett sémáját a 28. ábra mutatja.

Összegezve: mutációval sikerült bevezetni transzferáz aktivitást a vad típusú amilázba, ami lehetővé tette enzimátikus transzglikozilezésekhez történő felhasználását. Az Y151M mutáns enzim képes a donor maltotetraóz nem redukáló végi szegmensének, a maltóznak vagy maltotrióznak alkalmas akceptorra történő átvitelére, ami a trimer és tetramer glikozidok képződéséhez vezetett. A tetramer glikozid enzimátikus hidrolízise eredményezi a dimer mint másodlagos transzfertermék képződését. A kísérleti körülmények optimalizálásával igen kényelmes és elegáns szintézis startégiát sikerült kidolgozni a rövidebb (DP 2-4) kromoforral szubsztituált homológ maltooligomerek előállítására, melyek humán amilázok szubsztrátjai vagy inhibitorai lehetnek. Az Y151M mutáns enzimet elsőként alkalmaztuk sikerrel transzglikozilezésekhez. A 4-nitrofenil 1-tio- β -maltooligoszacharidok (DP 2-4) NMR analízise igazolta, hogy az Y151M megtartotta regio-és sztereoszelektivitását. A glikozilezés

a glikozil akceptor 4-es OH-ján történt és kizárólagosan $\alpha(1-4)$ glikozidos kötéseket eredményezett.



28. ábra: A transzglykozilezés mechanizmusa

Eredményeink igazolják, hogy mutáns enzimek használatával növelhető a transzglykozilezés/hidrolízis aránya, így a glikozilezés hozama. Mutációval létrehozott olyan újabb HSA enzimek tanulmányozását tervezzük, melyek reményt keltőek lehetnek oligoszacharidok szintézisére. A mutáns enzimek előállítása amerikai kutatók közreműködésével történik.

3.4. A *Bacillus stearothermophilus* „maltogenic” α -amiláza (BSMA) katalizálta transzglykozilezések [122]

3.4.1. „Maltogenic”– maltózt képző α -amilázok

Az α -amiláz család új tagjai a maltózt képző, az ún. „maltogenic” amilázok, melyeknek tulajdonságai eltérnek más amilolitikus enzimek tulajdonságaitól. A maltózt képző amilázok multiszubstrát specifitással rendelkeznek; hidrolizálják a keményítő $\alpha(1-4)$ és $\alpha(1-6)$ glikozidos kötéseit, és fő termékként maltózt szabadítanak fel. Innen ered a „maltogenic” elnevezés és az exo-enzim feltételezés. Kedvezményezetten hidrolizálják a ciklodextrineket is, melyek rossz szubsztrátjai más ismert amilolitikus enzimeknek.

Változatos katalitikus tulajdonságaiknak köszönhetően, különösen a transzglykozilezési aktivitásuk miatt, a maltózt képző amilázok és rokon enzimeik az érdeklődés középpontjába kerültek. Katalitikus tulajdonságuk sok tekintetben azonos a CGT-ázok és a neopullulanázok tulajdonságaival és jelentős szekvencia homológiát mutatnak. 3D szerkezetükben különböznek a klasszikus, kisebb molekulatömegű α -amilázoktól abban, hogy egy 120 aminosavból álló extra N-terminális domént tartalmaznak. A homodimer *Thermus* eredetű maltogén amiláz (ThMA) kristály szerkezetének analízise felfedte, hogy szűkebb és mélyebb aktív hely árokkal rendelkezik, mint a kisebb α -amilázok. Egy modell tanulmány szerint a β -CD kényelmesen beilleszkedik az aktív hely árokba, szemben a nagyobb szélességű helikális amilózzal [117].

Jól ismert, hogy az α -amilázok és rokon enzimeik katalitikus „core” doménje $(\beta/\alpha)_8$ -hordó szerkezetű, 4 erősen konzervált régióval. A konzervált régiók szekvencia analízise rámutatott arra, hogy a maltogén amilázokban és rokon enzimeikben (CGT-áz, neopullulanáz) a 332 pozícióban a Glu (E) a konzervált aminosav a második régióban, míg ugyanebben a pozícióban a tipikus α -amilázokban, CGT-ázban és pullulanázban a His (H) a konzervált aminosav, hatékony transzglykozilezés nélkül. A ThMA dimer röntgen analízise felfedte, hogy a Glu332 egy zsebben található, és extra-cukor kötőhelynek nevezik.

A Glu His-nel történő helyettesítése (Glu332His) jelentősen csökkenti a transzglykozilezési aktivitást, míg megnöveli az $\alpha(1-3)$, $\alpha(1-4)$ és $\alpha(1-6)$ glikozidos kötések hidrolitikus hasítását a vad típusú amilázhoz képest. A Glu332Asp mutáns hasonló tulajdonságokat mutat a vad típusúhoz, de a Glu332Gln mutánsban jelentősen csökken a transzglykozilezési aktivitás.

Ezek a mutánsok egyértelműen igazolják, hogy a savas oldallánc, Glu a 332-es helyen fontos szerepet játszik a transzfertermékek képződésében és akkumulációjában azáltal, hogy befolyásolja a hidrolízis és transzglykozilezés relatív arányát. A zsebben elhelyezkedő 332-es helyen lévő savas oldallánc részt vesz az akceptor molekulák elrendezésében, melyek versenyeznek a víz molekulákkal a [glykozil-E] intermedier nukleofil támadásában.

Az a megfigyelés, hogy a konzervált Glu332 a maltózt képző amilázokban megváltoztatja a katalitikus specifitást a hidrolízis és transzglykozilezés között, általános érvényű a legtöbb maltogén amilázra és a különböző akceptorokra.

3.4.2. Akarviozinil-izomaltozil-spiro-tiohidantoin (PTS-GTH) szintézise [122]

Bizonyos hidrolitikus enzimek, pl. a ciklodextrin-glykozil-transzferáz, a β -glükózidázok és maltogén amilázok (MA-ok) alkalmas akceptor molekula jelenlétében a transzglykozilezést katalizálják kinetikailag kontrollált módon. A CGT-áz glükóz egység átvitelét katalizálja egy akceptor molekulára α (1-4) vagy α (1-3) glykozidos kötés kialakításával. A hipertermofil *Sulfolobus sulfataricus* és *Picrococcus furiosus* eredetű termotabil β -glükózidázok inter- és intramolekuláris transzfer reakciókban új β (1-3) és β (1-6) glykozidos kötések létrehozását részesítik előnyben. Míg a MA-ok maltozil vagy glükózil részek átvitelét katalizálják, elsődlegesen α (1-6) glykozidos kötésű akceptorterméket hoznak létre. A maltózt képző amilázok akceptor specifitása igen széles skálájú, mivel nemcsak mono- és diszacharidokra transzferálnak, hanem többféle, szerkezetileg különböző vegyületre is; mint pl. cukoralkoholokra, flavonoidokra és az aszkorbinsavra. A transzglykozilezés számos biológiai és ipari szempontból fontos vegyület módosítására ad lehetőséget, melyek eredményeként azok tulajdonságai (oldékonyság, íz, biológiai aktivitás) előnyösen megváltoztathatók.

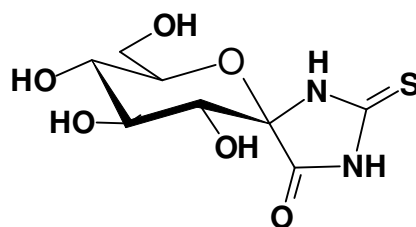
Az enzim

Park és mtsai [10] egy új termotabil maltogén amilázt kódoló gént klónoztak és expresszáltak a *B. stearothermophilus*-ból (BSMA). A szerzők leírják, hogy ez az enzim hidrolizálja a keményítőt, a ciklodextrineket, a pullulánt valamint az akarbózt is. A BSMA úgy kötődik az akarbózhoz, hogy az első glykozidos kötést hasítja, ami egy pszeudotriszacharidot (PTS) eredményez. Ezt követően a BSMA képes transzferálni a PTS-t alkalmas akceptor molekulákra α -(1-6), α -(1-3) vagy α -(1-4) glykozidos kötések

létrehozásával [75, 129]. Ezen eredmények bátorítottak bennünket, hogy kísérletet tegyünk egy új amiláz inhibitor előállítására a BSMA katalizálta glikozilezéssel. Az enzim K. H. Park professzor laboratóriumából (Dél-Korea) származott.

A donor és az akceptor

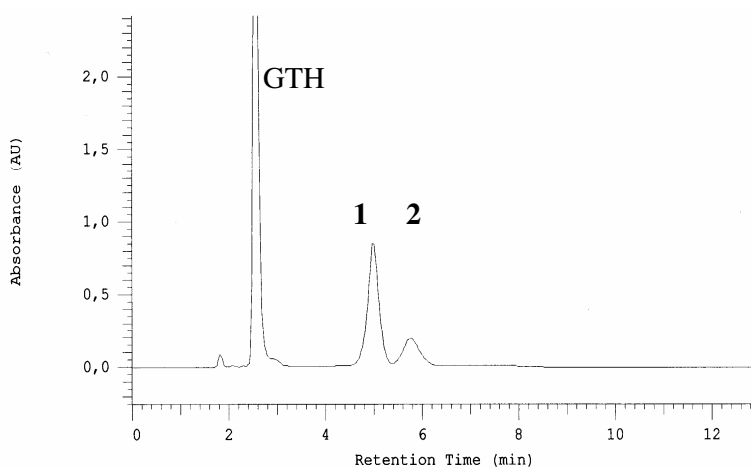
Az enzimes glikozilezés akarbóz donor (5.ábra) és glüko-spiro-tiohidantoin (GTH), mint akceptor jelenlétében történt. Az akarbózt Glucobay tablettából (Bayer) extraháltuk, a GTH-t kémiai szintézissel állították elő [130-135]. A GTH szerkezete a 29.ábrán látható.



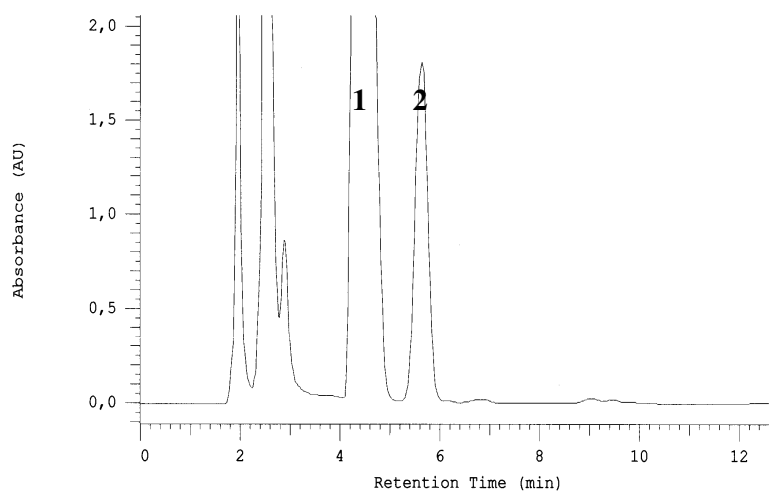
29. ábra: A GTH szerkezete.

A glikozilezés kivitelezése

A reakciót VRK, HPLC és MALDI-TOF analízissel követtük. A VRK igazolta, hogy a BSMA hidrolizálja az akarbózt és glükóz valamint akarviozin-glükóz keletkezik. A GTH akceptor jelenlétében 2 UV-ben detektálható transzfertermék tűnt fel, közülük az egyik kisebb mennyiségben. Az újonnan képződött akceptortermékeket HPLC-vel választottuk el. A HPLC profilok a 30. A és B ábrán láthatók.



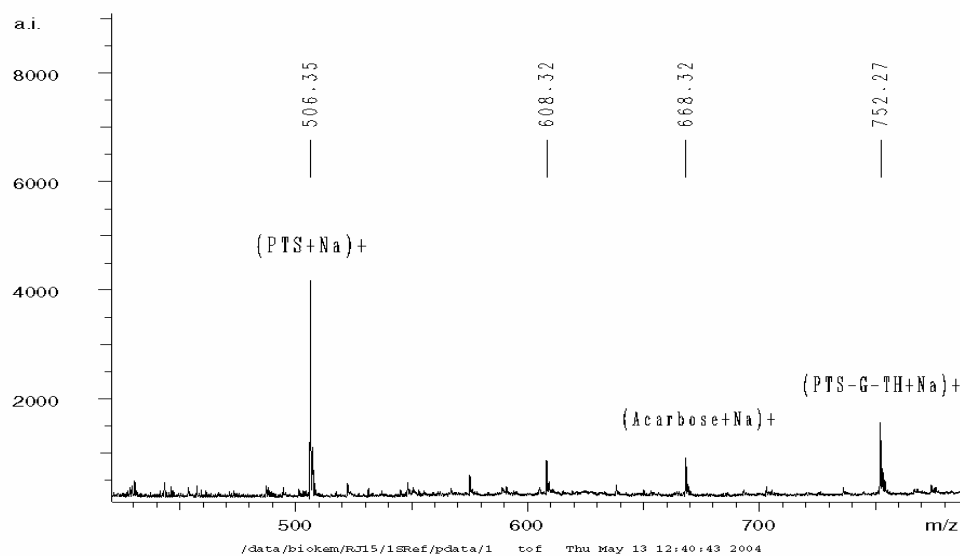
30.A ábra: Az akceptortermékek HPLC kromatogramja. Reakcióidő: 10 óra.



30.B ábra: Az akzeptortermékek HPLC kromatogramja. Reakcióidő: 48 óra.

A két termék képződését 10 óra után észleltük majd 48 óra elteltével mennyiségük szignifikánsan növekedett.

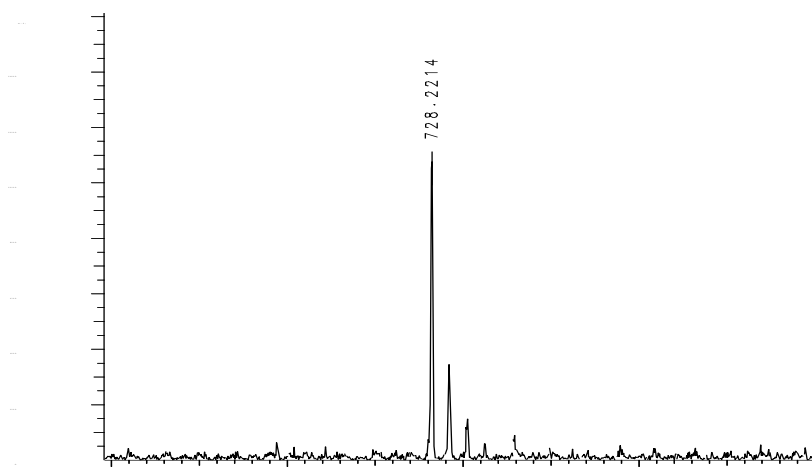
A reakcióelegy összetételét MALDI-TOF MS-sel is vizsgáltuk. (Lásd 31. ábra)



31. ábra: A reakcióelegy MALDI-TOF MS spektruma. PTS: 506,35 Da; akarbóz 668,32 Da; akzeptortermék 752,27 Da.

Amint a spektrumon látható, a reakcióelegy analízise csak egy olyan csúcsot eredményezett, melynek az m/z értéke nagyobb volt, mint az akarbózé, s ez izomer termékek keletkezésére utalt. Azonosíthatók a spektrumban az akarbóz, az akarviozin-glükóz és az újonnan képződött akceptortermék nátrium ionnal ionizálódott csúcsai, $[M+Na]^+$: 669, 506 és 752 m/z értékkel.

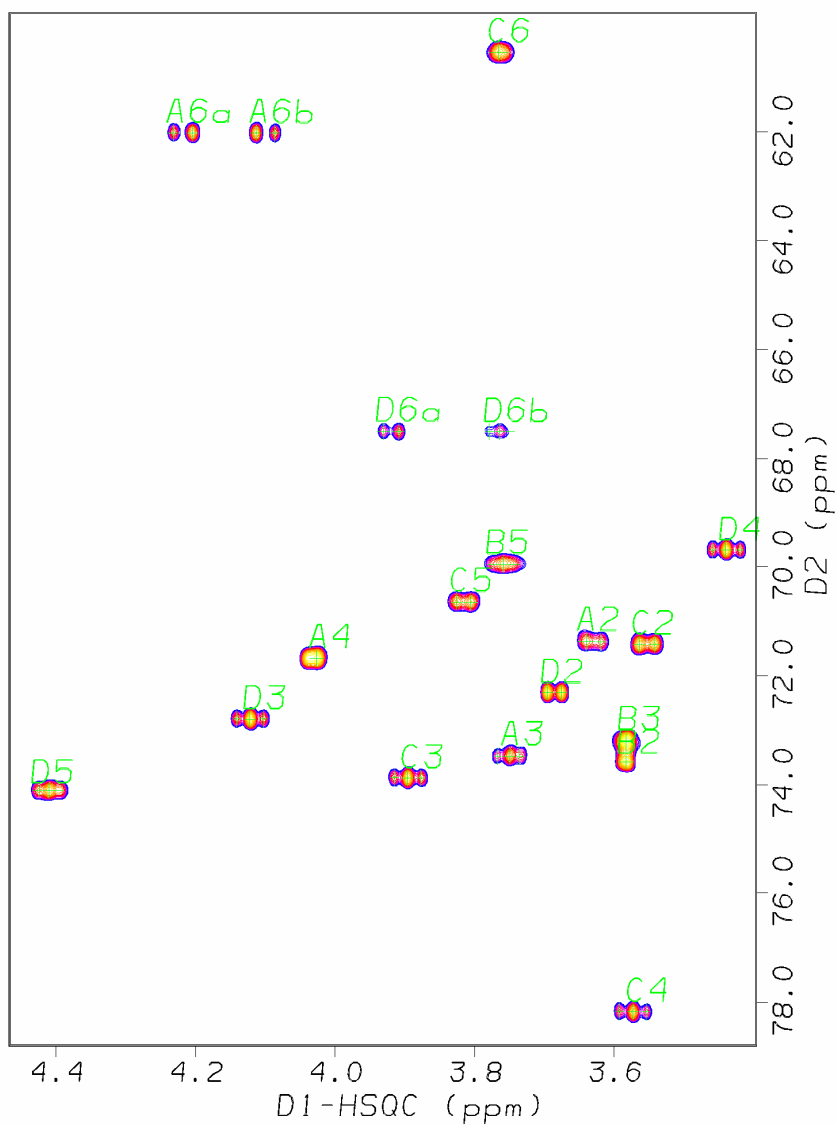
A HPLC analízis fő termékét izoláltuk és félpreparatív HPLC-vel tisztítottuk, majd molekulatömegét ESI MS-val határoztuk meg és szerkezetét NMR-rel igazoltuk. A 32. ábrán látható ESI-MS spektrum, amely a tisztított termék $[M-H]^-$ csúcsának izotóp eloszlását mutatja. Az, hogy az újonnan képződött termék a PTS és GTH közötti reakció eredménye, a számított (728,2184) és mért (728,2214) molekulatömegek közötti igen jó egyezés bizonyította.



32. ábra: A főtermék ESI-TOF MS spektruma.

A PTS-GTH szerkezetvizsgálata:

A proton és szén NMR spektrumok teljes jelhozzárendelését a COSY, TOCSY, ROESY, HSQC (32.ábra) és HMBC módszerekkel végeztük el és ennek alapján igazoltuk a fő akceptortermék szerkezetét. A HMBC spektrum valamennyi interglikozidos és köztük az újonnan képződött $C1 \rightarrow O-D_6$ kötést egyértelműen igazolja. A glikozilezés helyét, azaz az 1-6 interglikozidos kötést (67,5 ppm) a D_6 szén kémiai eltolódása is megerősíti. A gyűrűk kapcsolódását, vagyis az interglikozidos kötésben részt vevő hidrogének téren át ható kölcsönhatását a ROESY spektrum alapján is igazoltuk. (Az akarbóz származék egységeit A, B, C, D, E betűkkel jelöltük a 34. ábrán látható módon.)



33. ábra: Kétdimenziós HSQC spektrum.

A Bock és Pedersen [136] által az akarbózra leírt asszignációval történő összehasonlítás elfogadható egyezést adott az A, B és C gyűrűkre. Az E gyűrű hidantoin része jellemző ^{13}C eltolódásokat adott a karbonil (185.74 ppm) és tiokarbonil (174.79 ppm) csoportokra.

A 11.táblázat összegzi az NMR adatokat.

11. Táblázat

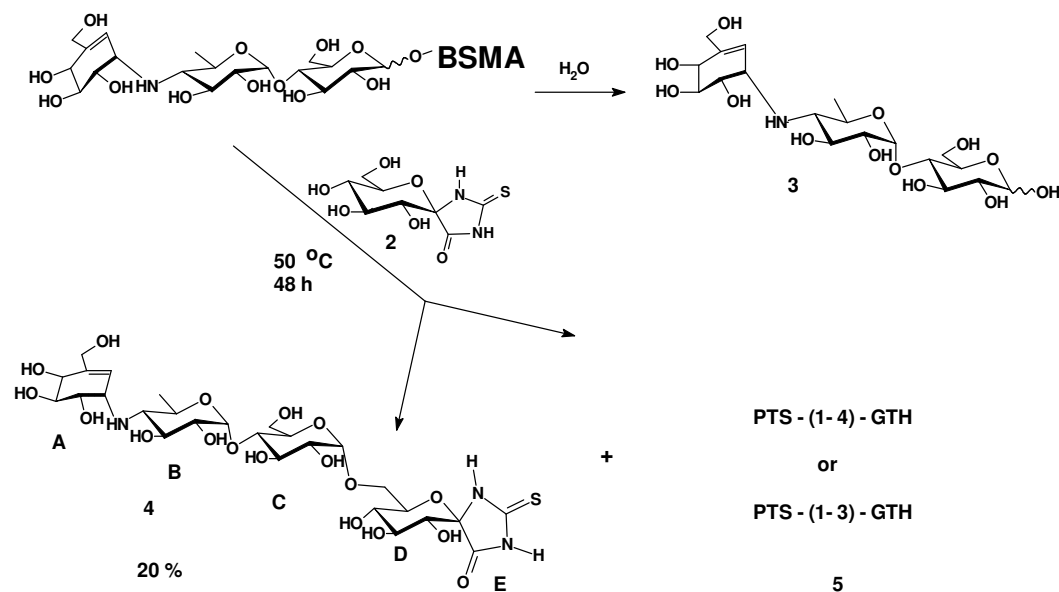
¹H és ¹³C jelhozzárendelések, proton-proton csatolási állandók és téren át ható ROESY kölcsönhatások

Jelhozzárendelések	CH _n	¹³ C (ppm)	¹ H (ppm)	¹ H	³ J _{HH} (Hz)	¹ H ROE kölcsönhatások
A1	CH	56.6	3.531		J ₁₂ = 5.1	A2, A7, B4, B6
A2	CH	71.35	3.63		J ₂₃ = 9.5	
A3	CH	73.49	3.743		J ₃₄ = 7.5	
A4	CH	71.69	4.031			
A5	C	139.68				
A6	CH ₂	62.02	4.232(a)	4.114(b)		A7
A7	CH	123.97	5.909			B4(w), B6
B1	CH	100.74	5.22		J ₁₂ = 3.1	C4, C6
B2	CH	73.57	3.582			
B3	CH	73.21	3.582			B5
B4	CH	65.67	2.443		J ₄₅ = 8.5	B2/B3, B5, B6
B5	CH	69.93	3.758			B6
B6	CH ₃	17.81	1.328			
C1	CH	98.23	4.897		J ₁₂ = 3.8	C2, D6a, D6b
C2	CH	71.42	3.563			D6a
C3	CH	73.89	3.896		J ₃₄ = 9.9	
C4	CH	78.2	3.582		J ₄₅ ~ 10	C5
C5	CH	70.65	3.826			
C6	CH ₂	61.42	3.765			
D1	C	89.52				
D2	CH	72.31	3.695		J ₂₃ = 9.8	D3
D3	CH	72.79	4.122		J ₃₄ = 9.7	
D4	CH	69.67	3.439		J ₄₅ = 9.7	
D5	CH	74.17	4.425			D3, D4, D6a
D6	CH ₂	67.5	3.931(a)	3.779(b)		
E1	C=O	185.74				
E2	C=S	174.79				

A fontos téren át ható interglikozidos ROE kölcsönhatások kiemelve

A proton-proton vicinális csatolási állandók alapján megállapítható, hogy az „A” , „B” és „C” gyűrűk konformációja lényegében azonos az akarbózzal. Az „A” gyűrűnek ²H₅ félszék, a „B”, „C” és „D” gyűrűknek ⁴C₁ szék konformációja van. Ezen túlmenően megállapítható, hogy a ROESY spektrum jó egyezést mutat a Bock és Pedersen [136] féle NOE korrelációs spektrumhoz. A PTS-GTH inhibitor aktivitását a nyál amilázon, valamint a gátlás hatékonyságát és paramétereit a következő fejezetben mutatom be.

Összefoglalásként az alábbi sémát javasoljuk a BSMA katalizálta glikozilezésre (34.ábra):



34. ábra: A glikozilezés feltételezett sémája.

A BSMA egyaránt rendelkezik hidroláz és transzferáz aktivitással. A BSMA képes az akarbóz hidrolízisére vagy a nem-redukáló végi PTS-nek a GTH-ra való átvitelére.

Az α -amilázokhoz hasonlóan az anomer konfigurációt megtartó enzimek mechanizmusa egy kétlépéses reakció. Első lépésben a glikozil–enzim intermedier képződik, majd ezt követi a víz vagy az akceptor molekula támadása, ami a hidrolízis termékeket (PTS + Glükóz) vagy a transzglikozilezés termékeit eredményezi. A GTH akceptor jelenlétében a PTS a C6-OH-ra tevődik át, ami az akarviozinil-izomaltozil-spiro-tiohidantoin képződéséhez vezet. A másik, minor komponens feltehetően $\alpha(1-4)$ kötésű, de az 1-3 kötés képződése sincs kizárva.

3.5. Kinetikai mérések

Számos szénhidráttípusú vegyület inhibitor aktivitását már korábban tanulmányozták a humán nyál amilázon; így a maltóz, maltotrióz, maltopentaóz, akarbóz és a GTH.

A GTH-t Somsák és munkatársai tervezték és szintetizálták [130-135] a glikogén foszforiláz, a glikogén metabolizmus kulcsenzimének gátlására. A GTH glükopiranoz része standard hidrogén híd kötések, míg a mozdulatlan tiohidantoin gyűrű a kedvező elektrosztatikus környezetben további poláris kölcsönhatásokat létesít az enzim fehérjével [135]. A GTH igen hatásos kompetitív inhibitora a máj és a vázizom eredetű glikogén foszforiláznak [130, 133-135], s így a ma már népbetegségnek számító *diabetes mellitus* potenciális gyógyszere lehet. Úgy gondoltuk, hogy a jó kitermeléssel, grammos tételben szintetizált GTH alkalmas lesz, az emlős amilázok gátlására is. A GTH szerkezetét már korábban a 31. ábrán bemutattam.

Eredményeink azt mutatták, hogy a GTH a nyál amiláz gyenge inhibitora (K_{EI} : 7,3 mM; K_{ESI} : 2,84 mM), és a gátlás kevert nem-kompetitív típusú. A gyenge inhibitor hatás feltételezhető oka az, hogy a kisméretű inhibitor molekula többféle kötőmódban helyezkedhet el a HSA viszonylag hosszú szubsztrátkötő helyén. Úgy gondoltuk, hogy a hosszabb, több alhelyet betöltő molekula hatékonyabb gátlást eredményezhet.

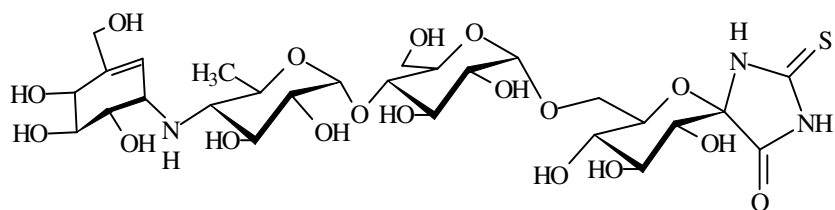
A vad típusú amilázok által katalizált transzglikozilezések azonban normál körülmények között igen kedvezőtlenül mennek végbe, rendszerint extrém magas szubsztrát koncentrációt és nem vizes közeget igényelnek. A PPA, a BLA és a humán amilázok által katalizált transzglikozilezések nem vezettek eredményre.

A szintézist egy új típusú α -amilázzal a *Bacillus stearothermophilus* „maltózt képző” amilázával sikerült megoldani [10, 75].

HSA gátlása az akarviozinil-izomaltozil-spiro-tiohidantoinnal (PTS-GTH) [137]

Kemoenzimatis transzformációval a BSMA katalizálta reakcióban sikerült egy hosszabb GTH analógot szintetizálni. A BSMA akarbóz donorról katalizálta az akarviozin-glükóz átvitelét GTH-ra, mint akceptorra. A BSMA megtartotta sztereoszelektivitását, de a glikozilezés elsődlegesen a C-6-on történt és az α -akarviozinil (1-4) α -D-glükopiranozil-(1-6)-D-glükopiranozilidén-spiro-tiohidantoin (PTS-GTH) képződését eredményezte.

Az inhibitor szerkezete a 33. ábrán látható.



35. ábra: α -Akarviozinil (1-4) α -D-glükopiranozil-(1-6)-D-glükopiranozilidén-spiro-tiohidantoin szerkezete.

Az új típusú, pentaszacharid-szerű vegyületben mind az átmeneti állapot analogonok, mind a szubsztrát analóg inhibitorok szerkezeti tulajdonságai fellelhetők. Az új vegyület inhibitor aktivitását egyrészt a GalG₂-CNP-n, másrészt amilózon tanulmányoztuk. A kinetikai paramétereket a Lineweaver-Burk és Dixon-féle grafikus ábrázolással, valamint nem-lineáris regresszióval a Grafit enzim kinetikai programmal számítottuk.

A kinetikai analízishez az alábbi általános érvényű egyenletet használtuk:

$$v_0 = \frac{v_{\max} [S]}{K_M \left(1 + \frac{1}{K_{EI}} [I] \right) + [S] \left(1 + \frac{1}{K_{ESI}} [I] \right)}$$

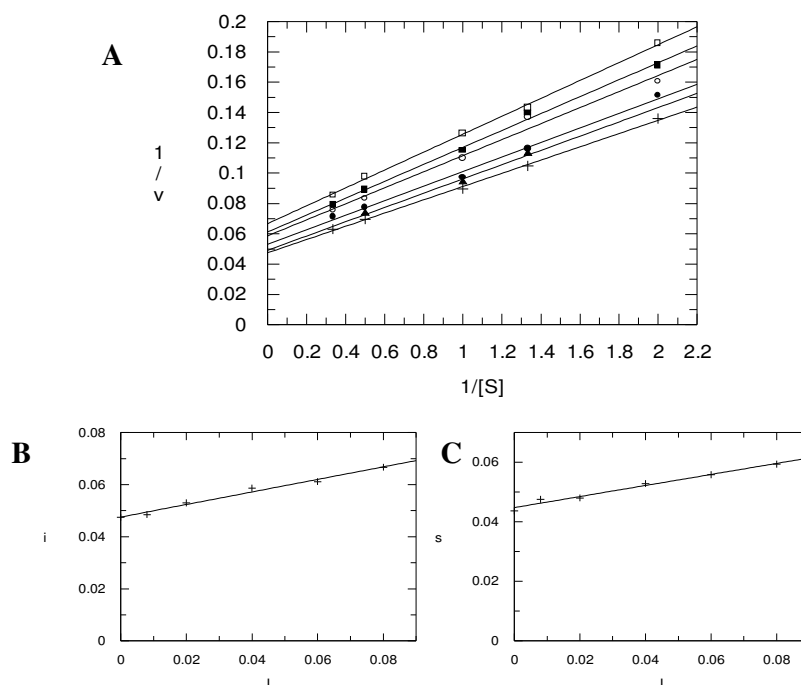
v_0 : a kezdeti sebesség az inhibitor jelenlétében és jelenléte nélkül

$v_{\max}$: a limitált maximális sebesség

[S] és [I]: a szubsztrát és az inhibitor koncentrációk

K_{EI} és K_{ESI} : az inhibitor tartalmazó komplexek disszociációs konstansai

Ezen egyenletet alkalmaztuk nem-lineáris regresszióra a Grafit program teljes nem-kompetitív és a kevert (Duggleby) modellek felhasználásakor, és az inhibíciós konstansoknak a másodlagos ábrázolásból történő meghatározásaihoz.



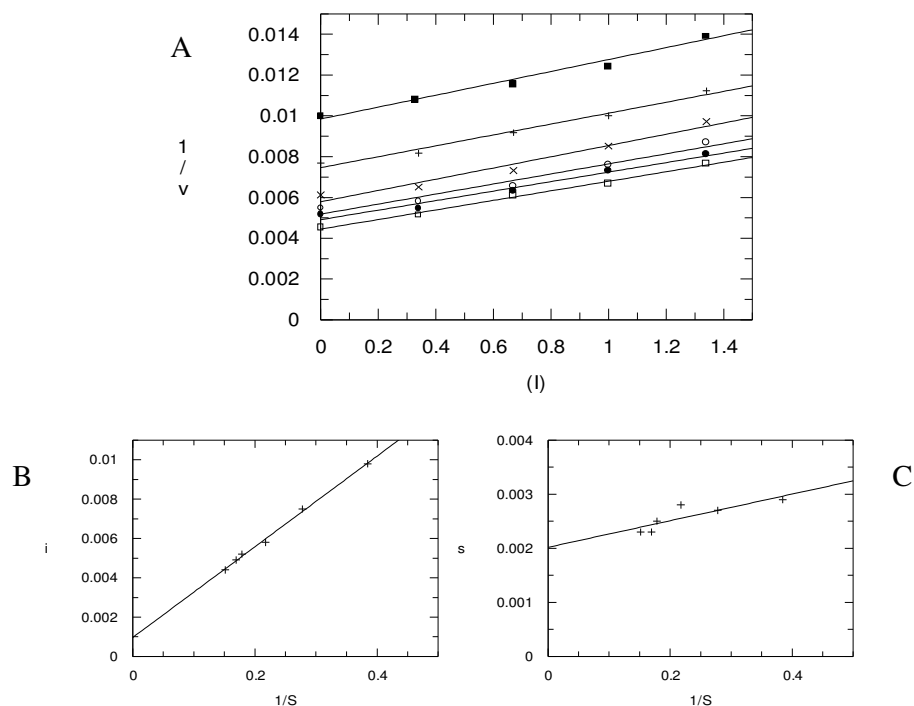
36. ábra Lineweaver-Burk-féle ábrázolás (A) és másodlagos analízisek. (B: függőleges tengelymetszet (i) vs $[I]$, C: meredekség (s) vs $[I]$, +, 0; ▲, 8 nM; ●, 20 nM; ○, 40 nM; ■, 60 nM; □, 80 nM.

A gátlás típusát a Lineweaver-Burk egyenesekből valamint a másodlagos ábrázolásokból határoztuk meg.

A 36. ábra a PTS-GTH-val gátolt HSA elsődleges egyenseit, valamint az egyenesek meredeksége (s) és függőleges tengelymetszete (i) inhibitor koncentráció függvényében ábrázolt egyeneseket mutatja Lineweaver-Burk szerint. A gátlás típusa kevert nem kompetitív és egy molekula inhibitor kötődik mind a szabad enzimhez, mind az ES komplexhez. Eredményeinket a Dixon szerinti ábrázolás is igazolja, melyeket nem mutatok be.

Az amilóz gyenge oldékonysága miatt, a szubsztrát koncentrációt nem állíthattuk be 0.5 és $5 K_M$ közé, ezért a nem-lineáris regresszió nem használható a kinetikai paraméterek számítására.

A 37. ábra a Dixon-féle ábrázolást mutatja, ahol a kezdeti sebesség reciproka ábrázolva az inhibitor koncentráció függvényében egyeneseket ad. Ezen túlmenően mind a meredekségek mind a tengelymetszetek a szubsztrát koncentráció reciprokának függvényében szintén lineárisak (37. B és C ábra).



37. ábra Dixon-féle egyenesek (A) és a másodlagos egyenesek. (B: tengelymetszet vs $[I]$; C: meredekség vs $[I]$, amilóz koncentrációk: $\square$, 6,6 mg/ml; $\bullet$, 5,9 mg/ml ; $\circ$, 5,6 mg/ml ; $\times$, 4,6 mg/ml ; $+$, 3,6 mg/ml ; $\blacksquare$, 2,6 mg/ml.

Hasonlóan a rövid szubsztráthoz az amilóz esetében is egy molekula PTS-GTH kötődik mind az enzimhez, mind az enzim–szubsztrát komplexhez. A Lineweaver-Burk egyenesek (az ábrázolás nincs közölve) megerősítik a kevert nem-kompetitív gátlást.

A rövid szubsztráton és az amilózon számított kinetikai paramétereket a HSA katalizálta reakcióban a PTS-GTH inhibitor jelenlétében a 12. táblázat mutatja.

12. Táblázat

HSA katalizálta GalG₂CNP és amilóz hidrolízis kinetikai paraméterei PTS-GTH inhibitorral és anélkül.

Kinetikai paraméterek	Szubsztrátok			
	GalG ₂ -CNP		Amilóz	
	Nem-lineáris regresszió	Másodlagos ábrázolás Lineweaver-Burk	Másodlagos ábrázolás Lineweaver-Burk	Másodlagos ábrázolás Dixon
K _M	0.9 mM	0.94 mM	22.8 mg/ml	23.1 mg/ml
v _{max} (μmol/perc)	20.3	21.0	983	954
K _{EI} (μM)	0.21	0.19	8.45	9.28
K _{ESI} (μM)	0.22	0.24	0.5	0.5

A PTS-GTH kevert nem-kompetitív inhibitora a HSA-nak mindkét szubsztrát esetében, tehát a glikozilezéssel előállított GTH analóg gátlás típusa nem változik meg. Az inhibíciós konstansok K_{EI} és K_{ESI} a rövid szubsztrát esetében gyakorlatilag azonosak (0,19 ill. 0,24), ami arra utal, hogy az EI és ESI komplexek hasonló stabilitásúak. Azonban amilóz szubsztrát használata során a K_{ESI} sokkal alacsonyabb értéke az ESI komplex nagyobb stabilitására, kedvezőbb képződésére utal, összevetve az EI komplexszel, így a gátlás típusa sokkal inkább unkompetitív, mint kompetitív. A K_{ESI} közel azonos értékei (0,24 ill. 0,5 μM) a két szubsztrátra az ESI komplexek hasonló stabilitását feltételezik. Az inhibitor bekötődése feltehetően ugyanazon a másodlagos kötőhelyen történik, és a használt szubsztrát jelentősen nem befolyásolja. Úgy tűnik, hogy a PTS-GTH inhibitor hatása erősebb a hasonló méretű rövid szubsztrát jelenlétében, mint a hosszú láncú amilóz esetében, összehasonlítva a K_{EI} értékeit (0,19 és 8,45 μM).

A 13. táblázat a szénhidrát típusú inhibitorok hatását foglalja össze a nyál amilázon. A kis méretű szubsztrát analóg GTH többféle kötőmódot létesíthet az enzim aktív helyével, ami felelős lehet az alacsony inhibitor aktivitásért.

13. Táblázat

A szénhidrát típusú inhibitorok disszociációs állandói a GalG₂-CNP nyál amiláz katalizálta hidrolízisekor

Inhibitor	K _{EI} (μM)	K _{ESI} (μM)
GTH	7300	2840
G ₂	-	4000
G ₅	400	-
PTS-GTH	0,19	0,24
akarbóz	0,70	0,1

Érdemes megemlíteni, hogy a GTH gátolja a nyál amilázt a rövid szubsztráton, de nem inhibitora az amilóz hidrolízisének. A maltózra és maltopentaózra kapott inibíciós állandók arra utalnak, hogy a cukor gyűrűk számának növekedésével jelentősen (egy nagyságrenddel) nő az inhibitor hatékonyság. Ez a hatás egyértelműen érvényesül a GTH vs PTS-GTH vonatkozásában is. A PTS-GTH-nak négy nagyságrenddel kisebbek a K_{EI} és K_{ESI} állandói a GTH-hoz viszonyítva. A PTS-GTH az akarbózhhoz hasonlóan igen hatékony inhibitora a nyál amiláznak. A kitűnő inhibitor hatáshoz az is hozzájárul, hogy a szintéziséhez az akarbózt használtuk donorként, így az átmeneti állapotot mimikáló ciklitól gyűrű kötődésének, az újonnan képződött α(1-6) glikozidos kötés jelenlétének, valamint a tiohidantoin gyűrűnek a szerepe is kulcsfontosságú lehet. A tiohidantoin funkciós csoportot megelőző új (1-6) interglikozidos kötés elegendő konformációs teret nyújt ahhoz, hogy a célfehérje nyújtott kötőhelyére a PTS-GTH molekula beilleszkedjen. A vizsgált inhibitorok kevert-nem-kompetitív gátlószerek, a maltooligoszacharidok kivételével. A maltóz tisztán nem-kompetitív, a maltopentaóz tisztán kompetitív inhibitor. A kevert típusú inhibitorok stabilabb komplexet létesítenek az ES komplexszel, mint magával az enzim fehérjével, ami különösen kifejezett a GTH-nál, de érvényes az akarbózra is.

Ezen méréseink azt sugallják, hogy a hosszabb, egyidejűleg több alhellyel kölcsönhatást létesítő gátlószerek hatékonyabb inhibitorok, mint a kis méretű inhibitorok.

4. FELHASZNÁLT ANYAGOK

Kísérleteinkhez analitikai tisztaságú vegyszereket, a HPLC analízisekhez HPLC gradiens tisztaságú oldószereket használtunk.

4.1. Enzimek

- Glikogén foszforiláz b (EC 2.4.1.1)
Aktivitás 1000 E/ml, fehérje tartalom 62 mg/ml. A kristályos enzim glicerines szuszpenzióját használtuk, melyet a nyúl vázizomból izoláltak és tisztítottak a Debreceni Egyetem Orvosi Vegytani Intézetében.
- Glükoamiláz (EC 3.2.1.3).
(SIGMA)
- Humán nyál α -amiláz (EC 3.2.1.1)
(SIGMA). Az enzim SDS-PAGE-sel egyetlen sávot adott és nem mutatott α - és β -glükozidáz aktivitást.
- A humán nyál amiláz Y151M mutánsa
Az enzim előállítása és tisztítása az Egyesült Államokban történt Mishra és munkatársai által. [98].
- *Bacillus licheniformis* α -amiláz (EC 3.2.1.1) Típus XII-A.
(SIGMA).
- *Bacillus stearothermophilus* „maltogenic” α -amiláza (EC 3.2.1.133)
A hőstabil maltogén amilázt kódoló gént K. H. Park és munkatársai [10] klónozták és expresszálták Dél Koreában.

4.2. Szubsztrátok, donorok, akceptorok

- Maltooligoszacharidok (DP 3-8)
Ciklodextrinek acetolízisével, majd dezacetilezésével készültek a DE TTK Biokémiai Tanszéken.
- 2-klór-4-nitrofenil (CNP) β -maltooligoszacharidok (DP 3-12)
Kémiai és kemoenzimatiszintézissel állítottuk elő a DE TTK Biokémiai Tanszéken
- 4-nitrofenil-glikozidok
PNP α -Glc, PNP β -Glc, PNP 1-S— β -Glc, PNP α -Man, PNP α -Xyl. (SIGMA)
- Akarbóz
Glucobay tablettából (BAYER) extraháltuk és szerkezetét MALDI-TOF és NMR analízisekkel igazoltuk.
- Glüko-spiro-tiohidantoin (GTH)
A DE TTK Szerves Kémiai Tanszékén állították elő Dr. Somsák László egyetemi tanár és munkatársai [130-135].
- 2-klór-4-nitrofenil-4-O- β -D-galaktopiranozil- α -D-maltozid, (GalG₂-CNP)
(TOYOBO Co Ltd./SORACHIM S.A.)
- Amilóz
(GENAY)

5. MÓDSZEREK

5.1. G₄-CNP-G₆-CNP oligomerek előállítása

G₇-CNP (6,5 mg, 5 mM) foszfát pufferrel (1 ml 1 M, pH 6,8, 10 mM β-merkaptotanol, 2 mM EDTA, 4 mM AMP) készült oldatához 10 μl 1000 E/ml glikogén foszforiláz b enzimet adtunk. Az elegyet a megfelelő hőfokon adott ideig inkubáltuk, majd az enzim reakciót az elegy 1 perces forralásával állítottuk le. Hűtés után a kicsapódott enzimet 0,2 μm-es pórusméretű Millipore fecskendőszűrővel kiszűrtük és 20 μl-t injektáltunk a HPLC oszlopra. A preparatív méretű szintézis a következő körülmények között történt. 65 mg G₇-CNP primert 10 ml pufferben oldottuk, 100 μl enzimet adtunk hozzá és 10 °C hőmérsékleten 10 percig inkubáltuk, majd felforraltuk. Hűtés után a kicsapódott enzimet kiszűrtük, az oldatot liofilizáltuk, majd 1 ml vízben való oldás után Toyopearl HW-40F (30-60 μm, 180 * 15 mm) oszlopon víz eluenssel (1,5 ml/perc) elválasztottuk. A frakciók összetételét VRK-val ellenőriztük Kieselgel 60 F₂₅₄ rétegen, acetone : víz = 9 : 1 eluenssel, UV detektálással. A megfelelő frakciókat egyesítve liofileztük és az így kapott termékek azonosságát és tisztaságát HPLC-vel és ¹H NMR vizsgálattal ellenőriztük.

5.2. G₈-CNP-G₁₁-CNP oligomerek előállítása

G₇-CNP (6,5 mg, 5 mM) és G-1-P (16,8 mg, 50 mM) glicerofoszfát pufferrel (1 ml 25 mM, pH 7,0, 10mM β-merkaptotanol, 2 mM EDTA, 4 mM AMP) készült oldatához 10 μl 1000 E/ml glikogén foszforiláz b enzimet adtunk. Az elegyet a megfelelő hőfokon adott ideig inkubáltuk, majd az enzim reakciót az elegy 1 perces forralásával állítottuk le. Hűtés után a kicsapódott enzimet 0,2 μm-es pórusméretű Millipore fecskendőszűrővel kiszűrtük és 20 μl-t injektáltunk a HPLC oszlopra.

A preparatív méretű szintézis a következő körülmények között történt. 65 mg G₇-CNP primert és 168 mg G-1-P 10 ml pufferben oldottuk, 100 μl 1000 E/ml aktivitású enzimet adtunk hozzá és 15 °C hőmérsékleten 30 percig inkubáltuk, majd felforraltuk. Hűtés után a kicsapódott enzimet kiszűrtük, az oldatot liofilizáltuk, majd 1 ml vízben való oldás után félpreparatív HPLC-vel tisztítottuk. Az elválasztáshoz amino oszlopot (250 * 10 mm, 5 μm) és

acetonitril : víz = 7 : 3 eluent alkalmaztunk 3 ml/perc áramlási sebességgel. A detektálás diódasoros detektorral 302 nm hullámhosszon történt. A megfelelő frakciókat egyesítve liofileztük és az így kapott termékek azonosságát és tisztaságát HPLC-vel és MALDI-TOF MS vizsgálattal ellenőriztük.

5.3. Hidrolízis teszt glükoamilázzal

A glükoamiláz (EC 3.2.1.1.) vagy amiloglikozidáz α -(1-4) glikozidos kötéseket hasító exoenzim. Így a nem redukáló végről a glükózegységek felszabadítását katalizálja. A lánchosszabbítással képződött CNP-maltooligomereket glükoamiláz enzimmal kezeltük pH 4,85 Na- β -glicerofoszfát pufferben 37 °C-on. A hidrolízis termékek azonosítása VRK-val történt acetone : víz = 88 : 12 oldószerkeverékben. A hidrolízis eredményeként kizárólag glükózt és CNP-G₁-t tudtunk detektálni. Ez egyértelműen bizonyítja, hogy a hosszabb termékek a donor és akceptor közötti α -(1-4) glikozidos kötések kialakulásával képződtek.

5.4. Bontási kép (action pattern) meghatározások

5.4.1. CNP maltooligoszacharidok hidrolízise humán nyál amilázzal és a Tyr151Met mutánsával

A humán α -amilázok katalizálta hidrolíziseket 37 °C-on hajtottuk végre 5 mM Ca(OAc)₂-t és 50 mM NaCl-t tartalmazó 25 mM, pH 7,0 glicerofoszfát pufferben. A reakciót az enzim hozzáadásával indítottuk; a reakcióelegy 1 mM szubsztátot (DP 3-10) tartalmazott. A vad típusú HSA-t 1,85 nM, míg a Tyr151Met mutánsát 18,8 nM végső koncentrációban használtuk. A reakciót 2, 5, 7 és 10 perces inkubációs idő után 20 μ l minta HPLC oszlopra történő injektálásával állítottuk le. A termékelegyet amino- és C18 oszlopon választottuk el acetonitril: víz grádiens elúcióval. A bontási képet a kromatogramon megjelenő csúcsok standard anyagok segítségével történő beazonosítása után a számított területarányok alapján adtuk meg. Mivel a UV detektálás mól szelektív, az így kapott arányok megegyeznek a mól arányokkal.

5.4.2.CNP-maltooligomerek hidrolízise hőstabil bakteriális α -amilázokkal

CNP-oligoszacharidok (DP 3-8) BSMA katalizálta hidrolízisét 50 °C-on, míg a BLA enzimmel felszabadított termékek analízisét 50, 80 és 100 °C-on vizsgáltuk a (DP 4-10) szubsztrátokon a humán amilázokra leírt körülmények között.

A bontási kép meghatározások során gondosan ügyeltünk arra, hogy kizárjuk a termékek másodlagos hasítását. A termékarányokat mindig a hidrolízis korai szakaszából számoltuk, ahol a szubsztrát konverziója 10-20 % körüli érték volt.

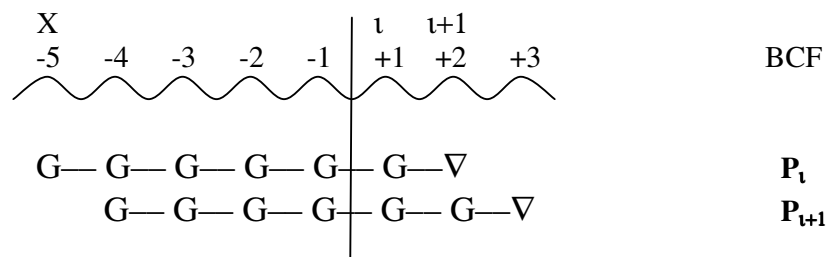
5.5. A SUMA szoftver: α -amilázok számítógépes alhely térképezése

Csak néhány alhely térkép található az irodalomban az amilázokra, ezért volt szükséges az alhely térképezés fejlesztése és tanulmányozása [5, 7-9].

A DE Biokémiai Tanszéken egy számítógépes programot fejlesztettek ki, ami a depolimerizációk számításából alhely térképet készít. A program WINDOWS alatt fut és kísérletileg meghatározott kötésasítási frekvenciákat (BCF) használ a katalitikus hely pozíciójának és alhelyek számának meghatározásához, illetve az alhelyek kötési energiájának számításához. A program neve SUMA (SUBsite Mapping of α -Amylases), ennek segítségével készítettük el az α -amilázok alhely térképeit [26].

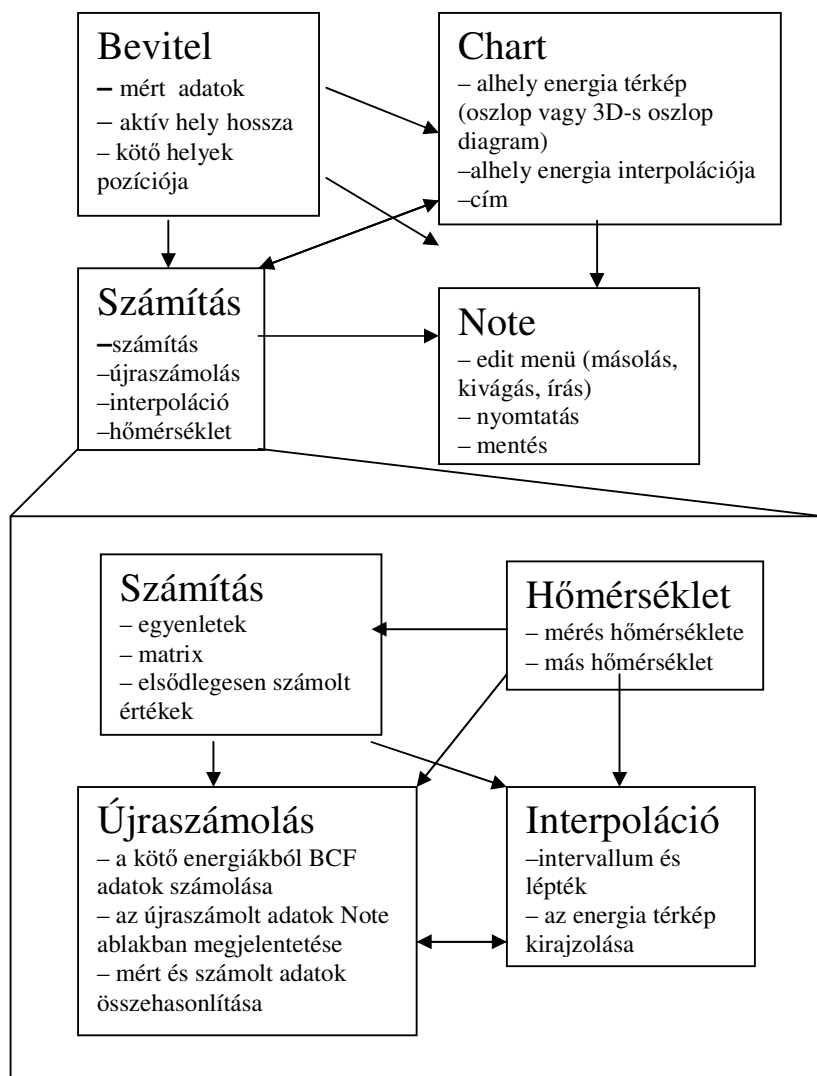
Ez a szoftver kötési energiákat számol a mért kötésasítási frekvenciákból kiindulva.

A számolások a következő egyenleten alapulnak:



$$\Delta G_{1+1} - \Delta G_X = -RT \ln P_1 / P_{1+1} ,$$

ahol a ΔG_{l+1} az $l+1$ -es hely kötési energiája, a ΔG_x az x hely kötési energiája, és a P_l illetve P_{l+1} a termék kötés hasítási frekvenciái, ami abból a kötési módból származik, ahogy a szubsztrát redukáló vége az l illetve $l+1$ helyhez kapcsolódik.



38. ábra: SUMA számítógépes program struktúrája.

Az alhelyek feltételezett száma és a hasítási helyek pozíciója a számítások szerint különbözhet. Az elsődlegesen számolt hely energia értékeken finomíthatunk iterációval, a mérttel legjobban egyező BCF adatok újraszámolásával. Az iteráció során a mért és a számolt adatok közötti különbség, a differencia lehetséges legkisebb értékét keressük. Az iteráció grafikus ábrázolása a „Chart” ablakban a Line chart-ra kattintva jelenik meg. Az alhely

energiát, mint energia térképet látjuk eredetileg a Chart ablakban (oszlop vagy 3D-s oszlop diagram formájában), az adatok és számolások kilistázása a „Note” ablakban történik. A kötési energiákat kiszámolhatjuk és a BCF adatokat újraszámolhatjuk más hőmérsékleten is, mint amit a méréskor alkalmaztunk.

A SUMA előnyei:

- korlátlan adatbeviteli lehetőség
- egyszerű használat
- WINDOWS alatti működés, segítség a menüben.

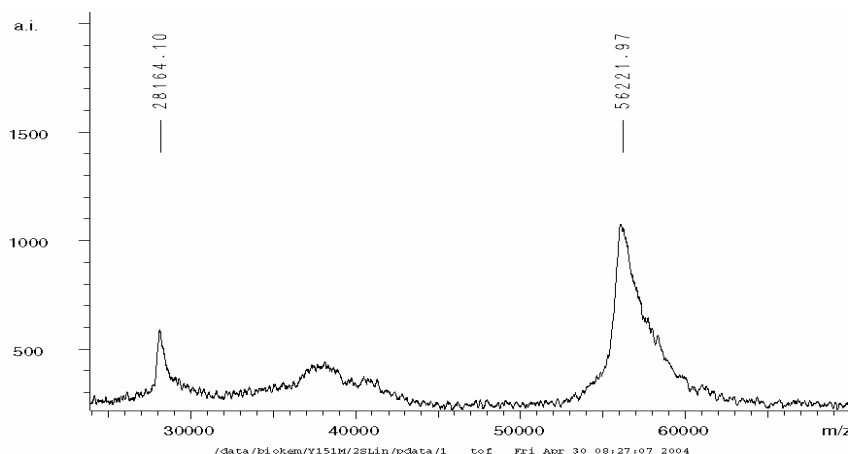
A Note lista elmenthető, szerkeszthető és nyomtatható számolt adatokat tartalmaz. Grafikus illusztrációk (minimalizáció, alhely térkép) teszik az eredményeket világosabbá. A BCF adatok számolhatók a méréshez használatnál rövidebb és hosszabb szubsztrátokra is. A SUMA szabadon használható oktatási és kutatási célokra is [26].

5.6. A natív és mutáns rekombináns fehérje előállítása

A vad típusú és mutáns enzimeket Mishra és munkatársai [98] állították elő.

Az Y151M mutánt ioncserélő kromatográfiával és a részecskék méret szerinti gélikromatográfiás elválasztásával (SEC) tisztították meg. (Az eljárást itt nem mutatjuk be.)

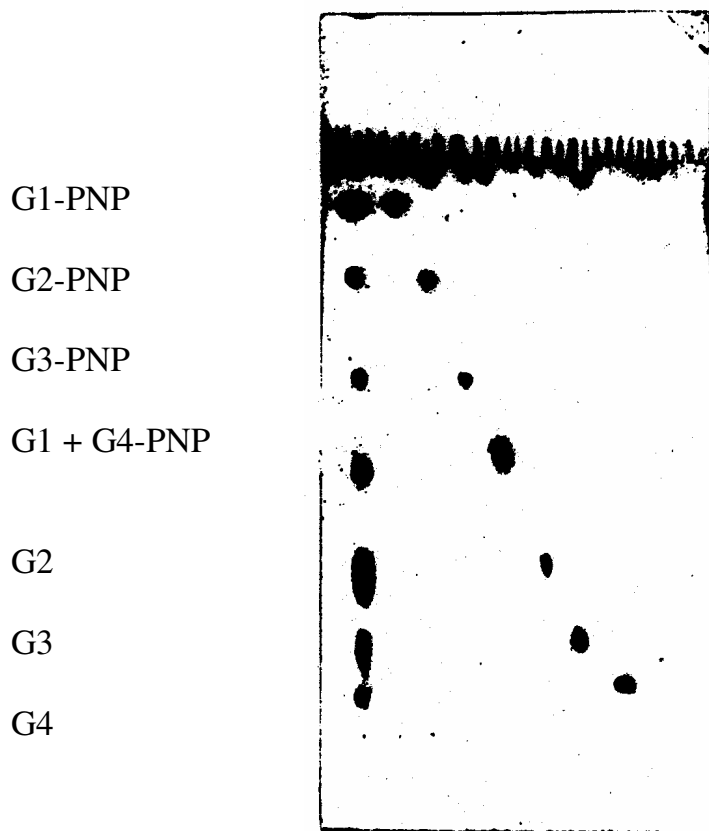
Az SDS-PAGE és Western blot analízis, hasonlóan a rekombináns enzimhez, a tenyészetben egy igen intenzív kb. 55 kDa tömegnek megfelelő sávot adott. A vad típusú enzim expressziójához hasonlóan az aminosav analízis során hexózaminokat nem detektáltak az aminosav analízis során, ami arra utal, hogy az expresszált fehérje nem glikozilezett. 1 liter tenyészetből kb. 5 mg fehérjét nyertek ki. A mutáns molekulatömege 56,22 kDa, ami megfelel a nem glikozilezett enzimnek. Az Y151M amiláz mutáns MALDI-TOF spektrumát a 39.ábra mutatja.



39.ábra: Az Y151M amiláz mutáns MALDI-TOF spektruma.

5.7. A Tyr151Met katalizálta PNP-glikozid akceptor termékek szintézise

10 mM maltotetraózt és 15 mM aril-glikozidot 1 mM $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ -t és 50 mM NaCl-t tartalmazó 25 mM, pH 6,0 nátrium-glicerofoszfát pufferben (500 μl) inkubáltunk 8, 15, 37 °C-on, 0, 8, 24, 48 és 72 órán át. A reakciót 20 U Y151M enzim hozzáadásával indítottuk, majd a jelzett inkubálási idők után a reakcióelegyet 5 percig forraltuk. A kicsapódott enzimet hűtés után 0,2 μm pórusméretű Millipore fecskendőszűrővel kiszűrtük. A reakcióelegyet VRK, HPLC és MALDI-TOF MS analízisekkel követtük nyomon. A reakcióelegy egy tipikus VRK-ja a 40. ábrán látható.



40.ábra: Az Y151M katalizálta reakciókeverék VRK képe maltotetraóz donor és PNP-glükozid akceptor jelenlétében.

Futtatószer: $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} : \text{H}_2\text{O} = 8 : 5 : 1$

Szilikagél (Merck, aluminium hordozón szilikagél 60 F₂₅₄ 0,2 mm) lemezen kromatografáltunk CHCl₃ : MeOH : H₂O = 8 : 5 : 1 oldószerrendszerben. A kromofóros vegyületeket UV lámpa alatt detektáltuk, a maltotetraóz átalakulását víz-kénsav 50 %-os oldatával történő bepermetezés után 120 °C-ra történő melegítéssel követtük nyomon.

A tisztítás HPLC-vel történt analitikai Spherisorb ODS2 oszlopon (250 x 4,0 mm, 5 µm), acetonitril : víz = 13 : 87 eluenssel, 40 °C-on, 1 ml/perc áramlási sebességgel. Az eluens CNP glikozidjait 302 nm-nél detektáltuk és azonosítottuk standardok segítségével.

5.8. Akarviozinil-izomaltozil-spiro-tiohidantoin (PTH-GTH) szintézise

10 mM (20 mg) GTH-t és 3 mM (15 mg) akarbózt 200 ml nátrium-citrát pufferben (50mM, pH 6,0) 50 °C-on inkubáltuk. A reakciót 20 E BSMA enzim hozzáadásával indítottuk, majd 48 óra után 5 percig tartó forralással állítottuk le. A kicsapódott enzimet hűtés után 0,2 µm pórusméretű Millipore fecskendőszűrővel kiszűrtük. A tisztítás HPLC-vel történt: félpreparatív Discovery RP Amid C16 oszlopon (250 x 10 mm, 0,5 µm), acetonitril : víz = 3 : 97 eluenssel, 3 ml/perc áramlási sebességgel.

Liofilezés után 11,8 mg (20 % kitermelés) fehér, porszerű terméket kaptunk.

¹H és ¹³C NMR és ROESY spektrumok igazolták, hogy a fő termékként izolált vegyület α-akarviozinil-(1-4)-α-D-glükopiranozil-(1-6)-D-glükopiranozilidien-spiro-tiohidantoin.

Az NMR adatok az EREDMÉNYEK és ÉRTÉKELÉSEK c. fejezetben láthatók.

A mért és a számított tömegspektrometriás adatok kitűnő egyezést adtak.

A C₂₇H₄₃O₁₈N₃SNa összegképletnek megfelelő molekulatömeg (752,22) és a MALDI-TOF MS [M + Na]⁺ mért m/z érték (752,27) igen jó egyezést mutat.

Hasonlóan a C₂₇H₄₂O₁₈N₃S összegképletnek megfelelő molekulatömeg (728,2179) nagy pontossággal azonos a mért 728,2214 m/z értékkel.

A fő termék ESI-TOF spektruma a 30. ábrán látható. [α]²⁰_D : 100,5 (C 0,1 , H₂O)

5.9. Nagynyomású folyadékkromatográfia (HPLC)

A HPLC elválasztásokat részben Hewlett-Packard 1090 Series II, valamint Merck-Hitachi LaChrom folyadékkromatográfokkal végeztük. A készülékek számítógép vezérlésű (ChemStation), beépített diódasoros (DAD) és refraktív index (RID) detektorral felszereltek. Folyadékszállító rendszerük lineáris gradiens képzésére alkalmas, az injektálás változtatható térfogatú (1-25 ml és 10-250 ml) automata injektorral történik.

Az elválasztáshoz a következő kolonnákat használtam:

14.Táblázat

Az elválasztás során használt állófázisok

Az állófázis jellege	Az elválasztás jellege	
	Analitikai	Preparatív
Fordított fázis	Spherisorb ODS2 5 µm, (250 x 4 mm)	LiChrosorb C18 7 µm, (250 x 10 mm)
Amino	LiChrospher 100 NH ₂ 5 µm, (250 x 4 mm)	Hypersil NH ₂ (APS) 5 µm, (250 x 10 mm)
Módosított amino	APS Hypersil 5 µm, (100 x 4,6 mm)	
Amid	Discovery RP amid C16 5 µm 150 x 4.6 mm	Discovery RP amid C16 5 µm 250 x 10 mm

5.10. Tömegspektrometriás mérések

A Koichi Tanaka által kidolgozott MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization- Time Of Flight) nagy előnye más tömegspektrometriás módszerekkel szemben, hogy megfelelő mátrix használatával elsősorban molekulaionok keletkeznek, így a spektrumok értékelése egyszerűbb, nagy molekulák és elegyek is vizsgálhatók [21].

A mátrix segíti a nem illékony molekulákat gáz fázisba juttatni úgy, hogy a lézer impulzusszerűen besugározza a mátrix-minta kristályokat, a mátrix molekulái elnyelik a lézer energiáját, kristályból gázfázisba kerülnek miközben magukkal ragadják a velük együtt kristályosodó molekulákat, megvédik őket a fragmentációtól, valamint ionizációs ágensként is működnek. Az így gázfázisba jutott molekulák molekulatömegét a TOF repülési idő alapján méri. Egy gyorsító feszültség hatására a töltéssel rendelkező részecskék egy adott sebességgel kezdenek repülni. A nagyobb tömegű molekulák lassabban, míg a kisebb tömegűek gyorsabban repülnek, így eltérő idő után csapódnak a detektorba, ahol elektromos jelet hoznak létre. A repülési idő adott gyorsító feszültség mellett csak a tömeg/töltés hányadosától függ, megfelelő kalibrálás után így a molekulatömeg meghatározható.

A vizsgálatainkhoz használt MALDI-TOF analízisekből néhányat a dolgozatomban is bemutatok. Méréseinkhez Bruker Biflex III reflektronnal és „delayed extraction”-nal felszerelt tömegspektrométert használtunk, 2,5-dihidroxibenzoésav (DHB), vagy 2,3,6-trihidroxiacetofenon (THAP) mátrix alkalmazásával, pozitív-ion módban. A minták gáz fázisba juttatása és ionizálása nitrogén lézer, 3 ns impulzusidő alkalmazásával történt. Többszöri, általában 100 impulzust alkalmaztunk 19 kV gyorsító és 20 kV reflektoron feszültség mellett. A készüléket maltooligoszacharidok (DP 3-7) és maltopentaóz-peracetát $[M+Na]^+$ ionjainak m/z értékeire: (527,15; 689,21; 851,26; 1013,31; 1175,36 és 2142,84 Da) vagy ciklodextrin (DP 6-8) $[M+Na]^+$ ionjainak m/z értékeire: (995; 1157 és 1319 Da) kalibráltuk külső kalibrációt alkalmazva.

John B. Fenn dolgozta ki az electrospray technikát, melynek lényege az, hogy a minta híg ($\sim 10^{-6}$ – 10^{-10} M) oldatát (néhány μ l/perc sebességgel) elektromos feszültséggel ellátott kapillárison keresztül egy fűtött inert gázt tartalmazó térbe porlasztják. A képződött cseppek töltéssel rendelkeznek, és ahogy az oldószer párolog, csökken a felület, a felületi töltés pedig növekszik. Az oldatban lévő ionok egy adott felületi töltés értéknél kilökődnek a cseppből, gáz fázisú ionok jönnek létre és jutnak be a vákuum rendszerbe, ahol tömeg/ töltés arányuk szerint szeparálódnak [138]. A lényeges különbség a MALDI-hoz képest, hogy ebben a

folyamatban többszörösen töltött ionok képződnek, így mivel m/z értékeket mérünk, a nagy molekulatömegű ionok is 5000 alatti m/z értéket érhetnek el. Másrészt, mivel ugyanazon molekulából több különböző töltésű ion képződik, minden egyes mérés több párhuzamos mérést jelent, s ez a mérés pontosságát javítja.

Az electrospray tömegspektrometria (ESI-TOF) igen elegáns, érzékeny és a legkíméletesebb ionizálási technika napjainkban, mely leginkább tükrözi az oldatbeli viszonyokat. Méréseinkhez ezt a technikát is használtuk.

Az ESI-TOF MS spektrumok Bruker Bio Tof electrospray tömegspektrométerrel készültek negatív-ion módban.

A készüléket nátrium-trifluor-acetát $[M-H]^-$ klaszter ionjainak m/z értékeire kalibráltuk 200-1200 Da tartományban külső kalibrációval. A mérések felbontóképessége jobb, mint 6500, a mért tömeg pontossága 5 ppm alatti. A mintákat metanol : víz = 1 : 1 –ben oldottuk és 10 μ M koncentrációban használtuk.

A kémiai Nobel díjat 2002-ben John B. Fenn és Koichi Tanaka kapták a biológiai makromolekulák NMR vizsgálatával foglalkozó Kurt Wüthrich-el megosztva.

5.11. ^1H és ^{13}C NMR analízisek

Az anomer konfiguráció valamint az interglikozidos kötés típusának megállapításához NMR spektroszkópiát használtunk.

A ^1H (500,13 MHz) és ^{13}C NMR (125,76 MHz) spektrumok Bruker DRX-500 spektrométerrel készültek D_2O -ban.

A kémiai eltolódásokat a külső kalibrációra használt DSS-hez viszonyítva számítottuk.

A proton és szén NMR spektrumok teljes jelhozzárendelését a COSY, TOCSY, ROESY, HSQC és HMBC módszerekkel végeztük el.

5.12. Kinetikai mérések

5.12.1. Kinetikai mérések GalG₂-CNP szubsztráton

A rövid, kromoforral ellátott szubsztráton való méréseket 37 °C-on, pH 6,5 , mM Ca(OAc)₂-ot, 51,5 mM NaCl-ot és 152 mM NaN₃-ot tartalmazó, 50 mM-os MES-pufferben végeztük. A szubsztrátot (0,5-3 mM) és az inhibitort összekevertük, a reakciót pedig a HSA (2 nM) inkubációs elegyhez való hozzáadásával indítottuk. A reakcióelegy össztérfogata minden esetben 500 µl volt. A HSA által felszabadított CNP által okozott abszorbancia növekedést Jasco V550 spektrofotométer Paralell Kinetics Analysis programjával követtük nyomon folyamatosan 405 nm-nél. A kezdeti sebességet a kinetikai görbék lineáris szakasza alapján számítottuk. Minden mérést 3-4-szer ismételtünk.

5.12.2. Kinetikai mérések amilóz szubsztráton

Amilóz szubsztrát esetén a kinetikai méréseket 37 °C-on, 48,6 mM Na₂HPO₄-ot, 38,8 mM KH₂PO₄-ot és 50 mM NaCl-ot tartalmazó, pH 7,0 foszfát pufferben végeztük. A szubsztrátot (2,6-6,6 mgml⁻¹) és az inhibitort összekevertük, majd a reakciót a HSA (6,5 nM) hozzáadásával indítottuk. A reakcióelegy össztérfogata minden esetben 150 µl volt. 10 perces reakcióidő letelte után a reakciót 1 ml dinitro-szalicilsav (DNS) reagens (1 % 3,5-dinitro-szalicilsav, 0,2 % fenol, 0,1 % Na₂ SO₃, 1 % NaOH vizes oldatban) hozzáadásával állítottuk le. Az elegyet foszfát pufferrel 2 ml-re egészítettük ki. A lefedett kémcsöveket 15 percen át 100 °C-on főztük, míg a várt sárgás-barna szín meg nem jelent. Ezután 300 µl 40 %-os kálium-nátrium-tartarát (Rochelle só) oldatot adtunk a reakcióelegyhez a szín stabilizálásának érdekében. A csöveket hideg vizes fürdőben lehűtöttük, majd a Jasco V550 spektrofotométer Fixed Wavelength Measurement programja segítségével 540 nm-nél mértük az abszorbanciát.

A kinetikai paramétereket a Lineweaver-Burk, Dixon és a GalG₂-CNP szubsztrát esetén nem lineáris regresszióval is meghatároztuk a Grafit, enzimkinetikai program (2.1 verzió, Erithacus Software) segítségével. Az inhibíció típusát a Lineweaver-Burk egyenesek és az

ezek alapján ábrázolt másodlagos egyenesekből (a meredekség illetve a tengelymetszet vs inhibitor koncentráció grafikonok egyeneseiből) állapítottuk meg.

6. AZ ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÖSSZEGZÉSE ÉS ÉRTÉKELÉSE

Doktori disszertációm összefoglalja a DE TTK Biokémiai Tanszéken folyó (2000-2005) szénhidrátkémiai és szénhidrát-biokémiai kutatásokhoz kapcsolódó enzimatisz glikozilezések eredményeit. Megvizsgáltuk, hogy az amilolitikus enzimek alkalmasak-e kémiai úton nehezen (vagy egyáltalán nem) előállítható, biológiailag aktív molekulák szintézisére.

Sikerrel alkalmaztuk a nyúl vázizom glikogén foszforiláz b enzimét homológ maltooligomer sorozatok előállítására (DP 3-12), a humán nyál α -amiláz Tyr151M mutáns enzimét, valamint a *Bacillus stearothermophilus* (BSMA) hőstabil α -amilázát enzimatisz glikozilezésekhez, oligoszacharidok szintézisére.

Új kemoenzimatisz szintézis stratégiát dolgoztunk ki a kémiai úton igen nehezen, vagy egyáltalán nem előállítható több tagszámú (DP 8-12) β -maltooligomer glikozidok preparatív méretű előállítására. A glikogén foszforiláz katalizálta glikozilezéshez CNP-G₇ akzeptort és glükóz-1-foszfát donort használtunk. Eljárásunk novum; a módszer alkalmazása ismeretlen az irodalomban. A kromóforral jelzett szubsztrátok kereskedelmi forgalomban nem kaphatók. A sorozat tagjai NP és CNP β -glikozidok; a β -glikozidos kötés ellenáll az α -amiláz hidrolízisének, így a termékek HPLC-vel jól detektálható β -glikozidok.

A maltooligoszacharid sorozatok birtokában megújítottuk és továbbfejlesztettük az α -amilázok alhely térképezésének módszerét. Egy alhely térkép megmutatja az alhelyek számát a kötőrégióban, a hasítás helyét és az egyes alhelyek látszólagos kötési energia értékét. Elsőként közöltük a *Bacillus licheniformis* (BLA), a *Bacillus stearothermophilus* (BSMA), a humán nyál amiláz és Y151M mutánsának alhely térképét. Az alhely térképek nagy affinitású, és kedvezőtlen kölcsönhatású specifikus alhelyek jelenlétét fedték fel. Kedvezőtlen kötőaffinitású alhelyeket az aktív centrum külső régióiban találtunk. Ezek az úgynevezett gát alhelyek (barriers) meghatározó szerepet töltenek be a termékeloszlást befolyásoló rövid és hosszú szubsztrátok megkülönböztetésében.

Az egyszerű pontmutációk megváltoztathatják az affinitási profilokat és a szubsztrát - kötőárok közötti dinamikus kölcsönhatást. „Engineered” enzimekkel növelhető az α -amilázok szintetikus aktivitása. Mutációval sikerült bevezetni transzferáz aktivitást a vad típusú nyál amilázba. Az Y151M mutáns enzimét elsőként alkalmaztuk transzglikozilezéshez, aril- β -glikozidok (DP 2-4) regio- és sztereospecifikus szintéziseihez. Az enzimatisz szintézisek előnyét

használtuk fel a *Bacillus stearothermophilus* (BSMA) maltogén α -amiláz katalizálta glikozilezésekhez. A BSMA akceptor specifitása igen széles skálájú, mivel nemcsak mono- és diszacharidokra viszi át a donor szegmenseit, hanem többféle, szerkezetileg különböző vegyületre is. A BSMA transzferálta az akarbóz nem-redukáló végi pszeudotriszacharid (PTS) szegmensét a GTH-ra és főtermékként akarviozinil-izomaltozil-spiro-tiohidantoin képződését eredményezte. A glikozilezéssel a GTH inhibitor aktivitását négy nagyságrenddel megnöveltük.

A kémiai szintézissel előállított GTH és származéka (PTS-GTH) lehetővé tették a HSA szénhidrát típusú inhibitorokkal történő gátlásának részletes vizsgálatát és a gátlás kialakulásáért felelős szerkezeti tényezők megismerését. Jóllehet még az adatgyűjtés fázisában vagyunk, az már bizonyított, hogy az átmeneti állapotot mimikáló inhibitorok hatékonyabbak, mint a szubsztrát analóg inhibitorok, valamint a cukor gyűrű számának növelésével fokozható az inhibitor hatékonyság. A PTS-GTH négy nagyságrenddel jobb inhibitora a HSA-nak, mint a GTH. A kitűnő inhibitor hatáshoz az is hozzájárul, hogy a tiohidantoin funkciós csoportot megelőző új $\alpha(1-6)$ interglikozidos kötés elegendő konformációs teret biztosít ahhoz, hogy a célfehérje nyújtott kötőhelyére a PTS-GTH molekula beilleszkedjen. A hosszabb, több alhellyel kölcsönhatást létesítő molekulák hatékonyabb inhibitorok, mint a kisméretű, vagy hidrogén híd kötések kialakítására nem képes molekulák.

Információink közelebb visznek jó inhibitor aktivitással rendelkező molekulák tervezéséhez és kifejlesztéséhez, mely célmolekulák hozzájárulhatnak a ma már népbetegségnek számító diabetes, obesitas és caries gyógyításához és megelőzéséhez.

7. SUMMARY

The goal of our work was to develop enzymatic methods for the synthesis of oligosaccharides. Enzyme catalysed synthesis of oligosaccharides is a very attractive method because it allows the formation of well defined oligosaccharides selectively without using any protection of hydroxyl groups. In addition, on the basis of the advances in genetic engineering, it is becoming possible to produce a wider range of enzymes on a large scale, expanding the number of enzymes available for synthetic reactions. In our laboratory considerable effort has been made to study the application of transglycosylation ability of retaining glycosidases, first of all α -amylases as an alternative approach for the synthesis of chromogenic oligosaccharide substrates. Another motivation of our research was to design and synthesise novel, efficient human α -amylase inhibitors. However, our effort using wild type of amylases (PPA, HSA, BLA) was unsuccessful.

The great majority of the syntheses published in the literature are catalysed by exo-acting glycosidases. The ability of endo-acting enzymes to synthesize novel oligosaccharides has rarely been tested. One potential limitation of this approach, however, is that the products of transglycosylation may themselves hydrolysed by the enzyme during the course of reaction.

Despite the increasing work carried out with glycosidases, little is known about the structural requirements for the binding of a sugar acceptor to the enzyme, which is essential to improve the synthetic utility of this methodology.

The application of homologous oligomeric substrates is an effective way to explore the nature of the binding site and the process of catalysis for α -amylases. Although the overall structure and the tertiary folding of the polypeptide chains of different α -amylases have been determined, less is known about the differences in the action of α -amylases on the homologous maltooligosaccharide series and the role of subsites is poorly understood.

In our laboratory the use of β -CNP maltooligosaccharides for subsite mapping has been successful. We described a new chemoenzymatic procedure for the synthesis of CNP-maltooligosides as a promising alternative to their multistep chemical synthesis using rabbit skeletal muscle glycogen phosphorylase b (EC 2.4.1.1). The primer in the enzymatic reaction was 2-chloro-4-nitrophenyl β -maltoheptaoside (G₇-CNP), synthesized from β -cyclodextrin using a convenient chemical method. CNP-maltooligosaccharides of longer chain length, in

the range of DP 8-11, were obtained by a transglycosylation reaction using α -D-glucopyranosyl-phosphate (G-1-P) as a donor. Detailed enzymological studies revealed that the conversion of G₇-CNP was highly dependent on the conditions of transglycosylation. More than 90 % conversion of G₇-CNP was achieved through a 10 : 1 donor/acceptor ratio. Transglycosylation at 37 °C for 30 min with 10 U enzyme resulted in G_{8→12}-CNP oligomers in the ratio of 22.8, 26.6, 23.2, 16.5 and 6.8 %, respectively. The reaction pattern was investigated using an HPLC system. The preparative scale isolation of G_{8→11}-CNP glycosides was achieved on semipreparative HPLC column. The productivity of the synthesis was improved by yields up to 70-75 %. The structures of the oligomers were confirmed by their chromatographic behaviors and MALDI-TOF MS data.

The active site of α -amylases is described by the subsite model. The amylase subsite model depicts the substrate binding region of the enzyme to be a tandem array of subsites. Each subsite is complementary to, and interacts with a substrate monomer unit. There are a number of different ways in which an oligomer substrate can interact with these subsites. For subsite mapping only the productive binding modes are considered, in which cases a susceptible bond extends over the catalytic site and the bond is cleaved. Analysis of the hydrolysis products reveals which subsites are occupied in a given binding mode. The relative rate of formation of each product is called bond cleavage frequency (BCF), which gives information about subsite binding energy. The process which quantifies the subsite model is referred to as subsite mapping.

A subsite map shows the number of subsites, the position of the catalytic site and the apparent binding energies between subsite-substrate monomer unit. For subsite map calculation a computer program was developed in our laboratory. The program runs in Windows and uses the experimentally determined BCF data. The program called SUMA and is freely available via internet for research and educational purposes.

α -Amylases and related amylolytic enzymes are among the most important enzymes and of great significance in the present day biotechnology. The spectrum of amylase application has widened in many fields, such as clinical, medicinal and analytical chemistry; as well as their widespread application in starch saccharification and in the textile, food, brewing and distilling industries. Enzymatic hydrolysis of starch has now replaced acid hydrolysis in over 75 % of starch hydrolysing process due to many advantages, not least its higher yields. Hydrolysis of starch gives rise to small maltooligosaccharides and glucose. The price of pure maltooligosaccharides is extremely high because of the difficulties encountered in their

production. These facts support that novel α -amylases which can produce desired products in an one-step reaction from starch are needed.

Bacillus licheniformis is a mesophilic bacterium, but produces a highly thermostable α -amylase BLA. It is widely used in alcohol, sugar and brewing industries for the initial hydrolysis of starch to dextrans, which are then converted to glucose by glucoamylases. However, its function on starch and oligosaccharides is poorly understood. Therefore, we were encouraged to study this amylase and it turned out that it was an attractive model enzyme for active centre investigation.

BLA exhibited an unique pattern of action on CNP-maltooligosaccharides by cleaving maltopentaose units as main products; 68, 84 and 88 % from the non-reducing end of CNP-G₆, CNP-G₇ and CNP-G₈, respectively, and leaving CNP-glycosides. As the chain length increases, the maximum frequency of attack shifts toward the reducing end of the chain and CNP-G₃ becomes the major product; 88, 83 and 83 % from CNP-G₈, CNP-G₉ and CNP-G₁₀ respectively. This favourable release of CNP-G₃ was also observed for the pentamer glycoside (CNP-G₅). In this case the substrate was too short to occupy all the subsites and three glycosyl residues from the reducing end were bound in subsites (+1, +2, +3) and led to the formation of CNP-G₃ in 48 %.

Our results strongly suggest the presence of at least eight subsites in BLA, five glycone sites (-5, -4, -3, -2, -1) and three aglycone sites (+1, +2, +3) and the catalytic site is located between subsites (-1) and (+1). The subsites are labelled from the catalytic site, with negative numbers for subsites to the left (non-reducing end side) and positive numbers to the right (reducing end side). For all the substrates the chromogenic aglycon (CNP), which was in β -glycosidic linkage, could interact with subsites (+2) and (+3), but less favourable than a glucose residue. In the ideal arrangement subsite (+3) was filled by a glucopyranosyl unit and the aglycone sites (-5, -4, -3, -2, -1) were also occupied by glucose residues which resulted in an interesting dual product specificity for the dominant formation of CNP-G₃ and maltopentaose.

BCFs were evaluated for chain length of 4-10 of CNP β -maltooligosides and these quantitative data were used to calculate the subsite map for BLA. Primarily calculated binding energies were optimised to give an optimum fit of BCFs to the experimentally measured values. The subsites (-6) and (-5) of BLA have +1.0 and +1.1 kJ/mol free-energy, respectively. We can suggest that these subsites are not real subsites for BLA. Subsite (+4) has positive free-energy of binding and will be referred to as „barrier subsite”. This barrier

subsite resulted in the dual product specificity of BLA. Results confirm that the eight subsites originally assumed for our experimental data are correct and BCFs are predicted correctly within experimental error. The subsite map of BLA on modified homologous oligosaccharides provided further insight into the structure and function of BLA.

The stability and catalytic activity of enzymes are highly effected by temperature. To elucidate how temperature effects subsite map of BLA, comparative studies were performed at 50 °C, 80 °C and 100 °C. Subsite map at 80 °C indicates more favourable bindings compared to the hydrolysis at 50 °C. Hydrolysis at 100 °C resulted in a clear shift in the product pattern and suggests significant differences in the active site architecture. Two preferred cleavage modes were seen for all substrates in which subsite (+2) and (+3) were dominant, but CNP-G₁ was never formed. In the preferred binding mode of shorter oligomers, CNP-G₂ serves as the leaving group (79 %, 50 %, 59 % and 62 % from CNP-G₄, CNP-G₅, CNP-G₆ and CNP-G₇, respectively), while CNP-G₃ is the dominant hydrolysis product from CNP-G₈, CNP-G₉ and CNP-G₁₀ (62 %, 68 % and 64 %, respectively). The high binding energy value (-17 kJ/mol) found at subsite (+2) is consistent with the significant formation of CNP-G₂. Subsite mapping at 80 °C and 100 °C confirms that there are no further binding sites despite the presence of longer products.

In humans, α -amylase is one of the major secretory products of the pancreas and salivary glands, playing a role in digestion of starch and related oligosaccharides. Human amylases of both salivary (HSA) and pancreatic origin (HPA) have been extensively studied from the viewpoint of clinical chemistry, because they are important as indicators of pancreatic and salivary glands disorders. Our interest was focused on salivary amylase, which is multifactorial enzyme involved in distinct biological functions. It has been shown that it may play a significant role in dental plaque formation and subsequent process of dental caries formation and progression. Furthermore, α -amylases are used as targets for drug design in attempts to treat diabetes, obesity and hyperlipemia. Diabetes mellitus is the most common serious metabolic disease in the world; it effects hundreds of millions.

The widening interest in the treatment of sugar metabolic disorders has stimulated our work to search for new and efficient drugs and apply them as inhibitors of amylolytic enzymes.

We thought that human salivary amylase (HSA), one of the intensively studied α -amylases, should be the enzyme of choice to meet these particular needs. Therefore, we started biochemical studies involving small substrates and substrate-like inhibitors to gain a better understanding of HSA function in obesity, diabetes and attempts to manipulate the

biological activity of HSA giving rise to ideal microbial ecology in the oral cavity. The active site of human amylases harbors three aromatic residues Trp59, Tyr62 and Tyr151, which provide stacking interactions to the bound glucose moieties. It has been shown that Tyr151 occurs at subsite (+2) and may influence the size of the leaving group. To study the role of subsite (+2) in recognition of terminal residue of substrate a mutant Y151M was generated in which the tyrosine at position 151 of HSA was replaced by a methionine. The product distribution for Y151M mutant, on the same oligosaccharide series, was very interesting and markedly different from that of the HSA. The moiety CNP-G₁ is the major product of hydrolysis when CNP-G₃ and CNP-G₄ were used as substrates and was significantly released in the hydrolysis of longer oligomers (DP 6-10) as well whereas this monomer glycoside was not recognisable as a product in the hydrolysis of the corresponding substrates by HSA. These results can be explained by the presence of methionine at subsite (+2) which is not advantageous to the polar glucose residues.

Subsite map shows that four glycone and three aglycone binding sites are present in HSA. Surprisingly, the calculated binding energy at subsite (+2) indicates a remarkably good interaction with the bond monomer unit of the substrate, compared with the other subsite energies. In the mutant, all of the subsites exhibit a lower affinity for a glucose residue compared to the corresponding subsites of HSA. The most remarkable decrease in the calculated binding energies can be found at subsite (+2), where the mutation has occurred (-2.6 kJ/mol vs -12.0 kJ/mol).

The product distribution revealed that in the mutant maltose changed to glucose as the minimal leaving group due to the presence of Met at subsite (+2) which is not advantageous to polar glucose residue. The binding region of the mutant was found to be shorter with one aglycone binding site. The Met at position 151 would not provide the stacking interaction and the water-mediated hydrogen-bonding interaction provided by the tyrosine residue of the wild type enzyme. In addition, the mutant showed a significant reduction in its hydrolytic efficiency and a remarkably good increase in its transglycosylase activity. It was envisaged that the structural change at the aglycone binding site could improve the synthetic activity of HSA and PNP-glycosides would be better acceptors for the mutant than for the wild type enzyme.

Taking advantage of the transferase activity of the mutant we developed an enzymatic strategy for the synthesis of PNP-glycosides with DP from 2 to 4. Y151M was capable of transferring maltose and maltotriose residue from maltotetraose as donor onto different PNP-

glycosides. This reaction can be characterized by 3 stages: The first is the hydrolysis of donor. In the absence of acceptor G₄ is cleaved to maltose (80 %) and maltotriose (20%).

The second is the transglycosylation at 8 °C with maltotriose leading to the formation of the tetramer glycosides or transglycosylation at 15 °C with maltose resulted in the synthesis of trimer glycosides – which was followed by the third one at 37 °C, the secondary hydrolysis of the accumulated products. NMR studies revealed that the mutant retained its regio- and stereoselectivity, in this way the donor fragments were linked to the acceptor by α -1,4 glycosidic linkages, exclusively. Therefore the longer oligomers can be readily hydrolysed and the dimer was accumulated. The utilisation of the mutant of HSA for transglycosylation clearly shows that we could introduce transferase activity to a hydrolytic enzyme by point-mutation.

Many α -amylase inhibitors have been obtained from microbial and plant origins and have also been found in synthetic substances. Acarbose is a natural product produced by *Actinoplanes* sp. fermentation and a highly effective inhibitor of several carbohydrases; such as α -glucosidase, α -amylase, CGT-ase, glucoamylase. It is in clinical use for the treatment of diabetes and very popular in crystallographic analysis of protein-oligosaccharide interaction.

The mechanism of inhibition has been postulated to be due to the unsaturated cyclohexene ring and the glycosidic nitrogen linkage that mimics the transition state for the enzymatic cleavage of glycosidic linkages. It has been shown that acarbose is metabolised by intestinal carbohydrases. When these degradation products arrive in the large intestine the microbial fermentation of glucose may cause inconvenient diarrhoea. Therefore, there is an obvious need for novel agents that could act without these side effects. We thought that glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin (GTH), the very efficient inhibitor of glycogen phosphorylase should be the inhibitor of choice to meet our needs. However, we found that it was a weak inhibitor of HSA with the inhibition constants in mM range. Since GTH is a small molecule the long enough active site facilitates accommodating in different binding modes. This might be the reason for its weak activity. It was envisaged that the longer spiro-thiohydantoin analogues should be more efficient inhibitors than GTH.

Recently a new thermostable maltogenic amylase from *Bacillus stearothermophilus* (BSMA) has been isolated and characterized. K. H. Park and coworkers cloned the BSMA gene and expressed the protein. BSMA exhibits both hydrolytic and transglycosylation activity. It is able to hydrolyse the potent inhibitor acarbose and transfer the product to a sugar acceptor molecule. BSMA binds acarbose to cleave the first glycosidic linkage to give

acarviosine-glucose (PTS). In the presence of carbohydrate acceptors PTS is primarily transferred to the C6 position of the acceptor. When D-glucose is the acceptor, isoacarbose is formed. This observation encouraged us for the production of a novel inhibitor specific for human amylases. It was thought that GTH would be a good acceptor for BSMA leading to the synthesis of the acarbose derived transglycosylated product.

The BSMA catalysed transglycosylation reaction using acarbose as a donor and GTH as an acceptor was followed by TLC, HPLC and MALDI-TOF analysis. Two UV detectable products were separated by HPLC on a reverse phase column. The two newly formed transglycosylated products appeared after 10 hours incubation time and their amounts were significantly increased after 48 hours. Interestingly, the MALDI-TOF spectrum of the reaction mixture resulted in a single peak with an m/z higher than that the acarbose, pointing that the products being isomer compounds. Since α -amylases are retaining enzymes, the products should be α -glycosidic bonded regioisomers. Based on the good agreement between the calculated (752.22) and measured (752.27) molecular masses the isolated products were identified to be transglycosylation compounds between PTS and GTH. The main product was analysed by NMR spectroscopy. ^1H and ^{13}C NMR studies revealed that the BSMA reserved its stereoselectivity. Glycosylation took place mainly at C-6 resulting in α -acarviosinyl-(1,4)- α -D-glucopyranosyl-(1,6)-D-glycopyranosylidene-spiro-thiohydantoin. This compound was found to be a much more efficient salivary amylase inhibitor than GTH.

Kinetic investigations were carried out on a synthetic and the natural substrate of HSA. The inhibition is a mixed-noncompetitive type on both substrates and only one molecule of inhibitor binds to the enzyme. Kinetic constants calculated from secondary plots are in micromolar range.

The widening interest in the treatment and prevention of sugar metabolic disorders stimulates our work further to study the protein-ligand interaction and design new and efficient drugs as amylase inhibitors.

8. IRODALOMJEGYZÉK

1. Lehmann, J., *Kohlenhydrate – Chemie und Biologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1996**.
2. Varki, A., *Glycobiology* **1993**, 3, 97-130.
3. Dwek, R. A., *Biochem. Soc. Trans.* **1995**, 23, 1-25.
4. Dwek, R. A., *Chem. Rev.* **1996**, 96, 683-720.
5. Cote G. L., and Tao, B. Y., *Glycoconjugate J.* **1990**, 7, 145-162.
6. Murata, T., and Usui, T., *Biosci. Biotech. Biochem.* **1997**, 61, 1059-1066.
7. Bucke, C. J., *Chem. Tech. Biotechnol.* **1996**, 67, 217-220.
8. Evers, B., and Thiem, J., *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, 5, 857-863.
9. Derensy-Dron, D., Krzewinski, F., Brassart, C., and Bouquelet, S., *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1999**, 29, 3-10.
10. Cha, H. J., Yoon, H. G., Kim, Y. W., Lee, H. S., Kim, J. W., Kweon, K. S., Oh, B. H., and Park, K. H., *Eur. J. Biochem.* **1998**, 253, 251-262.
11. Kuriki, T., Kaneko, H., Yanase, M., Takata, H., Shimada, J., Hanada, S., Takada, T., Umeyama, H., and Okada, S., *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 17321-17329.
12. Kuriki, T., and Imanaka, T., *J. Biosci. Bioeng.* **1999**, 87, 557-565.
13. Henrissat, B., *Biochem. J.* **1991**, 280, 309-316.
14. Koshland, D.E., *Biol. Rev.* **1953**, 28, 416-436.
15. Vitdehaag, J. C. M., Mosi, R., Kalk, K. H., van der Veen, B. A., Dijkhuizen, L., Withers, S. G., and Dijkstra, B. W., *Nature Struct. Biol.* **1999**, 6, 432-436.
16. Janecek, S., *FEBS Lett.* **1995**, 377, 6-8.
17. 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., and Waley, S. G., *Nature* **1975**, 225, 609-614.
18. Svensson, B., and Sogaard, M., *Biochem. Soc. Trans.* **1991**, 20, 34-42.
19. Musser, J. H., Fügedi, P., and Anderson, M. B., in *Burger's Medical Chemistry and Drug Discovery*, Vol. 1 (Szerk.: Wolff M. E.), John Wiley & Sons, New York, **1995**, pp. 901-947.
20. Bols, M., *Carbohydrate Building Blocks*, John Wiley & Sons, New York, **1996**.
21. Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., and Yoshida, T., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1998**, 2, 151-153.

22. Hanessian, S., *Total Synthesis of Natural Products: The Chiron Approach*, Pergamon, New York, **1983**.
23. Collins, P. M., and Ferrier, R. J., *Monosaccharides- Their Chemistry and Their Roles in Natural Products*, John Wiley & Sons, Chichester, **1995**.
24. Robyt, J. F., and French, D., *J. Biol. Chem.* **1970**, 245, 3917-3927.
25. Brzozowski, A. M., Lawson, D. M., Turkenburg, J. P., Bisgaard-Frantzen, H., Svendsen, A., Torben, V., Borchert, T. V., Dauter, Z., Wilson, K. S., Gideon, J., and Davis, G. J., *Biochemistry* **2000**, 39, 9099-9107.
26. Gyémánt, G., Hovánszki, G., and Kandra, L., *Eur. J. Biochem.* **2002**, 269, 5157-5162.
27. Robert, X., Haser, R., Mori, H., Svensson, B., and Aghajari, N., *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 32968-32978.
28. Davies, G. J., Wilson, K. S., and Henrissat, B., *Biochem. J.* **1997**, 321, 557-559.
29. Phillips, D., *Sci. Am.* **1996**, 215, 78-90.
30. Schechter, I., and Berger, A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1967**, 27, 157-162.
31. Henrissat, B., and Bairoch, A., *Biochem. J.* **1996**, 316, 695-696.
32. Ajandouz, E. H., Abe, J., Svensson, B., and Marchis-Mouren, G., *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, 1159, 193-202.
33. MacGregor, A. W., Morgan, J. E., and MacGregor, E. A., *Carbohydr. Res.* **1992**, 227, 301-313.
34. Terashima, M., Hayashi, N., Thomas, B. R., Rodriguez, R. L., and Katoh, S., *Plant Sci.* **1996**, 116, 9-14.
35. Farkas, E., Jánossy, L., Harangi, J., Kandra, L. and Lipták, A., *Carbohydr. Res.* **1997**, 303, 407-415.
36. Kandra, L., Gyémánt, G., Pál, M., Petró, M., Remenyik, J., and Lipták, A., *Carbohydr. Res.* **2001**, 333, 129-136.
37. Saito, N., *Arch. Biochem. Biophys.* **1973**, 155, 290-298.
38. Nakakuki, T., Azuma, K., and Kainuma, K., *Carbohydr. Res.* **1984**, 128, 297-310.
39. MacGregor, E. A., MacGregor, A. W., Macri, L. J., and Morgan, J. E., *Carbohydr. Res.* **1994**, 257, 249-268.
40. Bak-Jensen, K. S., André, G., Gottschalk, T. E., Paës, G., Tran, V., and Svensson, B., *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 10093-10102.
41. Kandra, L., Gyémánt, G., Remenyik, J., Hovánszki, G., and Lipták, A., *FESB Lett.* **2002**, 518, 79-82.

42. Kandra, L., Gyémánt, G., Farkas, E., and Lipták, A., *Carbohydr. Res.* **1997**, 298, 237-242.
43. Kandra, L., and Gyémánt, G., *Carbohydr. Res.* **2000**, 329, 579-585.
44. Brayer, G. D., Sidhu, G., Maurus, R., Rydberg, E. H., Braun, C., Wong, Y., Nguyen, N. T., Overall, C. M., and Withers, S. G., *Biochemistry* **2000**, 39, 4778-4791.
45. Kandra, L., Gyémánt, G., Remenyik, J., Ragunath, C., and Ramasubbu, N., *FEBS Lett.* **2003**, 544, 194-198.
46. Seigner, C., Prodanov, E., and Marchis-Mouren, G., *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, 913, 200-209.
47. Matsui, I., Ishikawa, K., Matsui, E., Miyairi, S., Fukui, S., and Honda, K., *J. Biochem.* **1991**, 109, 566-569.
48. Kandra, L., Gyémánt, G., and Lipták, A., *Biologia, Bratislava* **2002**, 57 / Suppl. 11, 171-180.
49. Kandra, L., *J. Mol. Structure (Theochem)* **2003**, 666-667, 487-498.
50. Ramasubbu, N., Ragunath, C., Mishra, P. J., Thomas, L. M., Gyémánt, G., and Kandra, L., *Eur. J. Biochem.* **2004**, 271, 2517-2529.
51. Ramasubbu, N., Ragunath, C., Sundar, K., Mishra, P. J., Gyémánt, G., and Kandra, L., *Biologia, Bratislava* **2005**, 60 / Suppl. 16, 47-56.
52. Keller, P. J., Kauffman, D. L., Allan, B. J., and Williams, B. L., *Biochemistry* **1971**, 4867.
53. Ramasubbu, N., Paloth, V., Luo, Y., Brayer, G. D., and Levine, M. J., *Acta Cryst.* **1996**, D52, 435-446.
54. Farber, G. K., and Petsko, G. A., *Trends Biochem. Sci.* **1990**, 15, 228-234.
55. Karn, R. C., *Adv. Comp. Physiol. Biochem.* **1978**, 7, 1-103.
56. Douglas, C. W. J., Heath, J., and Gwynn, J. P., *FEMS Microbiol. Lett.* **1992**, 71, 193-197.
57. DiPaola, C., Herrera, M. S., and Mandel, I. D., *Arch. Oral Biol.* **1984**, 29, 161-163.
58. Schmidt, D. D., Frommer, W., Junge., Muller, L., Wingender, W., and Truscheit, E., in *First international symposium on acarbose* (Creutzfeldt, W., Ed.) **1981**, 5-15.
59. Aleshin, A. E., Firsov, L. M., and Honzatko, R. B., *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 15631-15639.
60. Gilles, C., Astier, J.-P., Marchis-Mouren, G., Cambillau, C., and Payan, F., *Eur. J. Biochem.* **1996**, 238, 561-569.

61. Qian, M., Haser, R., Buisson, G., Duée, E., and Payan, F., *Biochemistry*, **1994**, 33, 6284-6294.
62. Stoffer, B., Aleshin, A. E., Firsov, L. M., Svensson, B., and Honzatko, R. B., *FEBS Lett.* **1995**, 358, 57-61.
63. Strokopytov, B., Penninga, D., Roseboom, H. J., Kalk, K. H., Dijkhuizen, L., and Dijkstra, B. W., *Biochemistry*, **1995**, 34, 2234-2240.
64. Strokopytov, B., Knegtel, R. M. A., Penninga, D., Rozeboom, H. J., Kalk, K. H., Dijkhuizen, L., and Dijkstra, B. W., *Biochemistry*, **1996**, 35, 4241-4249.
65. Truscheit, E., Frommer, W., Junge, B., Muller, L., Schmidt, D., and Wingender, W., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1981**, 20, 744-761.
66. Muller, L., Junge, B., Frommer, W., Schmidt, D., and Truscheit, E., in *Enzyme Inhibitors*; Brodbeck, U., Ed., Verlag Chemie: Weinheim, **1980**, 109-122.
67. Kim, M. J., Lee, S. B., Lee, H. S., Lee, S. Y., Beak, J. S., Kim, D., Moon, T. W., Robyt, J. F., and Park, K. H., *Arch. Biochem. Biophys.* **1999**, 371, 277-283.
68. Alkazaz, M. A., Desseaux, V., Marchis-Mouren, G., Prodanov, E., and Santimone, M., *Eur. J. Biochem.* **1998**, 252, 100-107.
69. Mosi, R., Sham, H., Uitdehaag, J. C. M., Ruiterkamp, R., Dijkstra, B. W., and Withers, S. G., *Biochemistry*, **1998**, 37, 17192-17198.
70. Breitmeier, D., Gunther, S., and Heymann, H., *Arch. Biochem. Biophys.* **1997**, 346, 7-14.
71. Kim, D., Park, K. H., and Robyt, J. F., *J. Microbiol. Tech.* **1998**, 8, 287-290.
72. Devulapalle, K., and Mooser, G., *J. Carbohydr. Chem.* **2000**, 19, 1285-1290.
73. Hillebrand, J., and Berchtold, P., in *Enzyme Inhibitors*; Brodbeck, U., Ed., Verlag Chemie: Weinheim, **1980**, 154-162.
74. Junge, B., Boshagen, H., Stoltefuss, J., and Muller, L., in *Enzyme Inhibitors*, Brodbeck, U., Ed., Verlag Chemie: Weinheim, **1980**, 123-137.
75. Park, K. H., Kim, M. J., Lee, H. S., Han, N. S., Kim, D., and Robyt, J. F., *Carbohydr. Res.* **1998**, 313, 235-246.
76. Lee, S. B., Park, K. H., and Robyt, J. F., *Carbohydr. Res.* **2001**, 331, 13-18.
77. Yoon, S. H., and Robyt, J. F., *Carbohydr. Res.* **2003**, 338, 1969-1980.
78. Martin, A. E., and Montgomery, P. A., *Am. J. Health Syst. Pharm.* **1996**, 53, 2277-2290.
79. Miller, G. L., *Anal. Chem.* **1959**, 31, 426-428.
80. Morishita, Y., Iinuma, Y., Nakoshima, N., Majima, K., Mizuguchi, K., and Kawamura, Y., *Clin. Chem.* **2000**, 46, 928-933.

81. Kandra, L., Gyémánt, G., and Lipták, A., *Carbohydr. Res.* **1999**, 315, 180-186.
82. Perey, A., Ono, H., and Hayashi, K., *Carbohydr. Res.* **1998**, 308, 423-429.
83. Aisaka, K., Masuda-Kato, T., Chikamune, T., Kamitori, K., Uosaki, Y., and Saito, Y., *J. Biosci. Bioeng.* **2000**, 90, 208-213.
84. Chaen, H., Nishimoto, T., Nakada, T., Fukuda, S., Kurimoto, M., and Tsujisaka, Y., *J. Biosci. Bioeng.* **2001**, 92, 173-176.
85. Hayne, S. L., and Whitesides, G. M., *Appl. Biochem. Biotech.* **1990**, 23, 155-170.
86. Pfannemüller, B., *Stärke*, **1968**, 11, 341.
87. Niemann, C., Nuck, R., Pfannemüller, B., and Saenger W., *Carbohydr. Res.* **1990**, 197, 187-196.
88. Waldmann, H., Gypax, D., Bednarski, M. D., Shangraw, W. R., and Whitesides, G. M., *Carbohydr. Res.* **1986**, 157, C4-C7.
89. Ziegast, G., and Pfannemüller, B., *Carbohydr. Res.* **1987**, 160, 185-204.
90. Yoshida, M., Nakamura, N., and Horikoshi, K., *Starch* **1997**, 49, 21-26.
91. Samain, E., Lancelon-Pin, C., Férido, F., Moreau, V., Chanzy, H., Heyraud, A., and Driguez, H., *Carbohydr. Res.* **1995**, 271, 217-226.
92. Titani, K., Koide, A., Hermann, J., Ericsson, L. H., Kumar, S., Wade, R. D., Walsh, K. A., Neurath, H., and Fischer, E. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, 74, 4762-4777.
93. Hajdu, J., Acharya, K. R., Stuart, D. J., McLaughlin, P. J., Barford, D., Oikonomakos, N. G. O., Klein, H., and Johnson, L. N., *EMBO J.* **1987**, 6, 539-546.
94. Johnson, L. N., Stura, E. A., Sansom, M. S. P., and Babu, Y. S., *Biochem. Soc. Trans.* **1983**, 11, 142.
95. Brown, D. H., and Cori, C. F., *The Enzymes*, Academic Press, London **1961**, 5, 207.
96. Dombrádi, V., *Int. J. Biochem.* **1980**, 13, 125-139.
97. Omichi, K., Hase, S., and Ikenaka, T., *J. Biochem. (Tokyo)* **1992**, 111, 4-7.
98. Mishra, P. J., Ragunath, C., Ramasubbu, N., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, 292, 468-473.
99. Ramasubbu, N., Paloth, V., Luo, Y., Brayer, G. D., and Levine, M. J., *Acta Crystallogr.* **1996**, D52, 435-446.
100. Ramasubbu, N., Ragunath, C., and Mishra, P. J., *J. Mol. Biol.* **2003**, 325, 1061-1076.
101. Kandra, L., Remenyik, J., Gyémánt, G., and Lipták, A., *Acta Biol. Hung.* **2006**, 57(3), 367-375.
102. Fogarty, W. M., Kelly, C. T., *Microbial Enzymes and Biotechnology*, Elsevier, **1990**.

103. Guzman-Maldonado, H., and Paredes-Lopez, O., *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* **1995**, 35, 373-403.
104. Morren, M. A., Jansens, V., Dooms-Gossens, A., Van Hoeyveld, E., Cornelius, A., De Wolf-Peeters, C., and Haremans, A., *J. Am. Acad. Dermatol.* **1993**, 29, 723-728.
105. Hole, A. M., Draper, A., Joliffe, G., Cullinan, P., Jones, M., and Taylor, A. J. N., *Occupational and environmental medicine* **2000**, 57, 840.
106. Machius, M., Wiegand, G., and Huber, R., *J. Mol. Biol.* **1995**, 246, 545-559.
107. Machius, M., Declerck, N., Huber, R., and Wiegand, G., *Structure* **1998**, 6, 281-292.
108. Suzuki, Y., Ito, N., Yuuki, T., Yamagada, H., and Udaka, S., *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 18933-18938.
109. Decleck, N., Machius, M., Wiegand, G., Huber, R., and Gaillardin, C., *J. Mol. Biol.* **2000**, 301, 1041-1057.
110. Nielsen, J. E., Beier, L., Otzen, D., Borchert, T. H., Frantzen, H. B., Andersen, K. V., and Svendsen, A., *Eur. J. Biochem.* **1999**, 264, 816-824.
111. Tomazic, S. J., and Klibanov, A. M., *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 3086-3091.
112. Violet, M., and Meunier, J.-C., *Biochem. J.* **1989**, 263, 665-670.
113. Brosnan, M. P., Kelly, C. T., and Fogarty, W. M., *Eur. J. Biochem.* **1992**, 203, 225-231.
114. Marchal, L. M., van de Laar, A. M. J., Goether, E., Shimmelpennik, E. B., Bergsma, J., Beeftink, H. H., and Tramper, J., *Biotechnology and Bioengineering* **1999**, 63, 344-355.
115. Blakeney, A. B., and Stone, B. A., *FEBS Lett.* **1985**, 186, 229-232.
116. Allen, J. D., and Thoma, J. A., *Biochem. J.* **1976**, 159, 105-121.
117. Dauter, Z., Dauter, M., Brzozowski, A. M., Christensen, S., Borchert, T. V., Beier, L., Wilson, K. S., and Davies, G. J., *Biochemistry* **1999**, 38, 8385-8392.
118. Davies, G., and Henrissat, B., *Structure* **1995**, 3, 853-859.
119. Lawson, C. L., Montfort, R., Strokopytov, B., Rozeboom, H. J., Kalk, K. H., de Vries, G. E., Penninga, D., Dijkhuizen, L., and Dijkstra, B. W., *J. Mol. Biol.* **1994**, 236, 590-600.
120. Remenyik, J., Ragunath, C., Ramasubbu, N., Gyémánt, G., Lipták, A., and Kandra, L., *Organic Letters* **2003**, 5, 4895-4898.
121. Kandra, L., Gyémánt, G., Remenyik, J., Ragunath, C., and Ramasubbu, N., *Biologia, Bratislava* **2005**, 57 (Suppl. 11): 171-180.
122. Kandra, L., Remenyik, J., Batta, G., Somsák, L., Gyémánt, G., and Park, K. W., *Carbohydr. Res.* **2005**, 340, 1311-1317.

123. Zeng, X., Yoshino, R., Murata, T., Ajisaka, K., and Usui, T., *Carbohydr. Res.* **2000**, 325, 120-131.
124. Eneyskaya, E. V., Brumer, H., Backinowsky, L. V., Ivanen, D. R., Kulminskaya, A. A., Shabalin, K. A., and Neustroev, K. N., *Carbohydr. Res.* **2003**, 338, 313-325.
125. Usui, T., Murata, T., Yabuuchi, Y., and Ogawa, K., *Carbohydr. Res.* **1993**, 250, 57-66.
126. Williams, S. J., and Withers, S. G., *Aust. J. Chem.* **2002**, 55, 3-12.
127. Jakeman, D. L., and Withers, S. G., *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2002**, 14, 13-15.
128. Okuyama, M., Mori, H., Watanabe, K., Kimura, A., and Chiba, S., *Biocsi. Biotechnol. Biochem.* **2002**, 66, 928-933.
129. Baek, J. S., Kim, H. Y., Yoo, S. S., Cheong, T. K., Kim, M. J., Lee, S. B., Abbott, T. P., Song, H. J., Rhyu, M. R., Oh, B. H., and Park, K. H., *Ind. Crops Prod.* **2000**, 12, 173-182.
130. Somsák, L., Kovács, L., Tóth, M., Ösz, E., Szilágyi, L., Györgydeák, Z., Dinya, Z., Docsa, T., Tóth, B., and Gergely, P., *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 2843-2848.
131. Somsák, L., and Nagy, V., *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, 11, 1719-1727. Corrigendum 2247.
132. Oikonomakos, N. G., Skamnaki, V. T., Ösz, E., Szilágyi, L., Somsák, L., Docsa, T., Tóth, B., and Gergely, P., *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, 10, 261-268.
133. Ösz, E., Somsák, L., Szilágyi, L., Kovács, L., Docsa, T., Tóth, B., and Gergely, P., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, 9, 1385-1390.
134. Somsák, L., Nagy, V., Docsa, T., Tóth, B., and Gergely, P., *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, 11, 261-268.
135. Somsák, L., Nagy, V., Hadady, Z., Docsa, T., and Gergely, P., *Curr. Pharm. Des.* **2003**, 9, 1177-1189.
136. Bock, K., and Pederson, H., *Carbohydr. Res.* **1984**, 132, 142-149.
137. Kandra, L., Zajácz, Á., Remenyik, J., and Gyémánt, G., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, 334, 824-828.
138. Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., and Whitehouse, C. M., *Science*, **1989**, 246, 64.

9. FÜGGELÉK

9.1. Publikációk

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. L., Kandra, **J., Remenyik**, Gy., Gyémánt, A., Lipták
Effect of temperature on subsite map of *Bacillus licheniformis* alpha amylase
Acta Biologica Hungarica (2006) 57 367-375
2. L., Kandra, Gy., Gyémánt, **J., Remenyik**, C., Ragunath, N.,
Ramasubbu
Transglycosylations catalysed by Y151M mutant of human salivary alpha-amylase
(HSA)
Biologia, Bratislava (2005) 60:57-64 Impakt: 0.208
3. L., Kandra, **J., Remenyik**, Gy., Batta, L., Somsák, Gy., Gyémánt,
Kwan Hwa Park
Enzymatic synthesis of a new inhibitor of alpha-amylases: acarviosinyl-isomaltosyl-
spirothiohidantoin
Carbohydrate. Research (2005) 340:1311-1317 Impakt: 1.533
4. **J., Remenyik**^a, C., Ragunath^b, N., Ramasubbu^b, Gyöngyi.,
Gyémánt^c, A., Lipták^a, L., Kandra^c
Introducing transglycosylation activity to human salivary α -amylase (HSA)
Organic. Letters. (2003) 5:4895-4898 Impact: 3.715
5. L., Kandra^{a*}, Gy., Gyémánt^a, **J., Remenyik**^b, C., Ragunath^c and
N., Ramasubbu^c
Subsite mapping of human salivary α -amylase and the mutant Y151M
Febs Letters, (2003) 544:194-198. Impakt: 3.64

6. Kandra L, Gyemant G, **Remenyik J**, Hovánszki G., Lipták A.
Action pattern and subsite mapping of Bacillus licheniformis alpha-amylase (BLA) with modified maltooligosaccharide substrates
Febs Letters 518 (1-3): 79-82 (**2002**) Impakt: 3.64

Egyéb közlemény

1. L., Kandra, Á., Zajác, **J.**, **Remenyik**, Gy., Gyémánt
Kinetic investigation of a new inhibitor for human salivary α -amylase
Biochemical and Biophysical Research Communications (**2005**) 334 824-828
Impakt:2.830
2. Tóth A., **Remenyik J.** Bajza I., Lipták A.
Synthesis of the methyl ethers of methyl 6-deoxy-3-C-methyl- α -L-talopyranoside and - α -L-mannopyranoside. Examination of the conformation and chromatographic properties of the compounds.
Arkivoc **2003** (V) 28-45.
3. Kandra L, Gyemant G, Pal M, Petró M. **Remenyik J.**, Lipták A.
Chemoenzymatic synthesis of 2-chloro-4-nitrophenyl beta-maltoheptaoside acceptor-products using glycogen phosphorylase b
Carbohydrate. Research (**2001**) 333 (2): 129-136 Impakt: 1.606

9.2. Az értekezés témájához kapcsolódó előadások (E) és poszterek (P)

1. L. Kandra, G. Gyémánt, **J. Remenyik**
Subsite mapping of α -amylases
MTA Szénhidrátkémiai Munkabizottság Előadóülése 2002. Mátrafüred (E)

2. Kandra L., Gyémánt Gy., **Remenyik J.**,
 α -Amilázok kötőhelyeinek térképezése
 Debreceni Tudományos Napok 2002, Debrecen (E)

3. **Remenyik J.**, Gyémánt Gy., Kandra L., Lipták A.
 A *Bacillus licheniformis* α -amiláz kötőhelyének vizsgálata
 Magyar Biokémiai Társaság előadói ülése, Tihany, 2003 12-15. (P)

4. **J. Remenyik**, G. Gyémánt, L. Kandra, A. Lipták
 Introduction of transglycosidase activity into the human salivary α -amylase
 1st Austrian Hungarian Carbohydrate Conference, Burg Schlaining, Austria, 2003.09.4-6.(E)

5. **J. Remenyik**, L. Kandra, Gy. Gyémánt, A. Lipták
 Akarbozanalógok szintézise *Bacillus stearothermophilus* maltogén amilázzal
 MTA Szénhidrát kémiai Munkabizottság Előadói ülése 2004.10.05.(E)

6. **J. Remenyik**, L. Kandra
 Oligoszacharidok szintézise a humán nyál amiláz (HSA) Y151M mutáns enzimével
 Kémiai Előadói Napok, Szeged, 2004. okt. 25-27.(E)

7. **J. Remenyik**, L. Kandra, Gy. Gyémánt, L. Somsák, A. Lipták
 Towards the enzymatic synthesis of alpha-amylase inhibitors
 2nd Austrian Hungarian Carbohydrate Conference, Somogyaszaló, 2005.05.24-26.(E)

8. **Remenyik J.** , Kandra L. , Gyémánt Gy. , Somsák L. , Batta Gy. , Kwan Park, Lipták A.
Bacillus stearothermophilus maltogén amiláz (BSMA) katalizálta glikozilezések
 Vegyészkonferencia, Hajdúszoboszló, 2005. 06. 25-27(E)

9.3. Rövidítések

AHA	<i>Alteromonas haloplanctis</i> α -amiláz
AMP	Adenozin monofoszfát
Arg	Arginin
Asp	Aszpariginsav
BAA	<i>Bacillus amiloliquephaciens</i> amiláz
BCF	Bond cleavage frequency
BLA	<i>Bacillus licheniformis</i> α -amiláz
BSMA	<i>Bacillus stearothermophilus</i> maltózt képző amiláz
CGT-áz	Ciklodextrin-glükoziltranszferáz
CNP	2-klór-4-nitrofenil/ol
COSY	Correlated Spectroscopy
Cys	Cisztein
DHB	2,5-dihidroxibenzoesav
DNS	Dinitro-szalicilsav
EC	Enzyme Commission
ESI-MS	Elektrospray ionizációs tömegspektrometria
G-1-P	Glükóz-1-foszfát
G ₃₋₁₁ -CNP	2-klór-4-nitrofenil-4-O- β -D-maltooligomerek
GalG ₂ -CNP	2-klór-4-nitrofenil-4-O- β -D-galaktopiranozil maltozid
Glu	Glutaminsav
GTH	Glüko-spiro-tiohidantoin
His	Hisztidin
HMBC	Multiple Bond CH Correlation
HPA	Humán pankreász amiláz
HSA	Humán nyál amiláz
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
IUBMB	International Union of Biochemistry and Molecular Biology
K _{EI}	Enzim-inhibitor komplex disszociációs állandója
K _{ESI}	Enzim-szubsztrát-inhibitor komplex disszociációs állandója

MALDI-TOF MS	Mátrixszal segített lézer deszorpció, ionizáció, repülési idő detektoros tömegspektrometria
NP	4-nitrofenil/ol
PNP	4-(p)-nitrofenil/o
PNP 1-S- β -Glc	4-(p)-nitrofenil 1-tio- β -glükopiranoz
PNP α -Glc	4-(p)-nitrofenil α -glükopiranoz
PNP α -Man	4-(p)-nitrofenil α -mannopiranoz
PNP α -Xyl	4-(p)-nitrofenil α -xylopiranoz
PNP β -Glc	4-(p)-nitrofenil β -glükopiranoz
PPA	Sertés pankréasz amiláz
PTS	Pszeudotriszacharid
PTS-GTH	α -Akarviozinil (1-4) α -D-glükopiranozil-(1-6)-D- glükopiranozilidén-spiro-tiohidantoin
ROESY	Rotating Frame Overhouse Effect Spectroscopy
SDS-PAGE	Nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis
Ser	Szerin
SUMA	Subsite mapping of α -amylases
THAP	2,3,6-trihidrox-acetofenon
TIM	Trióz-foszfát-izomeráz
TMA	<i>Tenebrio molitor</i> α -amiláz
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
Trp	Triptofán
Tyr	Tirozin
Y151M	Tirozin151methionin mutáns amiláz

Oligoszacharidok előállítása kemoenzimatisz szintézissel

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

Írta: Gálné Remenyik Judit
okleveles vegyész, kémia tanár

Készült a Debreceni Egyetem KÉMIA doktori programja
(K/5 alprogramja) keretében
Témavezető: Dr. Kandra Lili

A doktori szigorlati bizottság:

Elnök: Dr. Sztaricskai Ferenc

Tagok: Dr. Hoschke Ágoston

Dr. Lázár István

A doktori szigorlat időpontja: 2006. június 20.

Az értekezés bírálói:

Dr. Forró Enikő

Dr. Pelyvás István

A bírálóbizottság:

Elnök: Dr. Antus Sándor

Tagok: Dr. Hajkó János

Dr. Bakó Éva

Dr. Bozó Éva

Az értekezés védésének időpontja: 2007.