

Zárójelentés

“A természet szénhidrátkémikusai: enzimatisz glikozilezések”

című OTKA pályázatról

A szénhidrát- és zsírsanyagcsere-zavar, valamint a magas vérnyomás betegség tünetegyüttes metabolikus szindróma néven ismert. A metabolikus szindróma mint kórkép az elmúlt két évtizedben az elhízás járványszerű megjelenésével került egyre inkább a figyelem központjába.

A szénhidrátanyagcsere rendellenességei, mint pl. a cukorbetegség, elhízás, vagy a fogszuvasodás- igen széleskörűen elterjedt betegségeké váltak napjainkra és a népesség egyre nagyobb százalékát érintik. Így feltétlenül indokolt olyan új hatóanyagok vagy gyógymódok bevezetése, melyek hatással vannak a szénhidrátfelvétel fiziológiai szabályozására, a vércukor szintre és a különféle szájbetegségek megelőzésére. A szájbetegségek, köztük a fogszuvasodás, a periodontitis és a fog elvesztése jelentősen befolyásolja egy személy általános egészségi állapotát. A fogszuvasodás egy több tényezős fertőző betegség, melynek kialakulásában a táplálkozás, a diéta és a mikrobiális fertőzések fontos szerepet játszanak.

A humán amilázok, mind a nyál (HSA), mind a pankreász eredetű (HPA) széleskörűen tanulmányozott enzimek klinikai kémiai szempontból, mivel fontos jellemzők a pankreász és nyálmirigy eredetű betegségek diagnosztizálásában. Olyan gyógyszerek tervezésének célpontjai, melyek a cukorbetegség, elhízás és a fogszuvasodás megelőzésére vagy gyógyítására irányulnak.

A nyál amiláz enzime sokféle funkciót lát el a szájüregben. Részt vesz a keményítő kezdeti hidrolízisében, valamint bizonyított, hogy hozzákötődik a fogzománchoz, vagy a hidroxapatithoz és így elősegíti a fogplakkok kialakulását. Továbbá, nagy affinitással kötődik a szájüregben található baktériumokhoz, melyek a keményítő lebontásából felszabaduló glükózt tejsavvá alakítják. Az összegyűlt tejsav a fogzománc feloldásához vezethet, ami egy kritikus lépés a fogszuvasodás kifejlődésében. Joggal merül fel az igény olyan inhibitorok (átmeneti állapot analógok és szubsztrát analóg származékok) tervezésére, melyek megelőzhetik a kellemetlen szájbetegségeket. Új inhibitor molekulák kifejlesztése, melyek nagy affinitással és specifikusan kötődnek az enzim aktív centrumában, és az inhibitor- enzim kötődés tanulmányozása nem könnyű feladat a biokémikus/kémikus számára. A tíz éve megkezdett kutatásainkat ezen célkitűzések motiválták.

Az OTKA által támogatott munkaterv több kutatócsoport közös érdeklődéséből fakadó multidiszciplináris pályázattá alakult. A részt vevő csoportok egymást kiegészítő tapasztalataik és képességeik egyesítésével, a szükséges berendezésekkel és a „know-how” lehetőségekkel együtt jelenleg is gyümölcsöző együttműködést alakítottak ki.

Herczegh Pál és munkatársai (Debreceni Egyetem Gyógyszerészi Kémia Tanszék) egy 2,3-telítetlen hexapiranoz ismétlődő egységből felépülő új típusú poliszacharidot állítottak elő a 3,6-di-O-acetil-D-glükál polikondenzációjával. A dezacetilezett poliszacharid a humán nyál amiláz inhibitora, az inhibíciós állandók mM-os nagyságrendűek (Carbohydr. Polymers, 2005).

Bár a glükálok a szubsztrát átmeneti állapotát mimikálják, gyenge affinitásuk feltehetően az OH csoportok hiányával magyarázható. A kis méretű D-glükál nem inhibitora a nyál amiláznak, de gátolja az *Aspergillus oryzae* eredetű α -amilázt ($IC_{50}=43.5mM$). A D-glükál az α -glükózidázok hatékonyabb inhibitora. A sörélesztő (Brewers yeast Type VI. SIGMA) α -glükózidáza által katalizált PNP α -D-glükopiranozid hidrolízisre számolt $IC_{50}=1.82mM$.

Somsák László és csoportja (Debreceni Egyetem Szerves Kémiai Tanszék) széleskörű kutatásokat folytat a glikogén foszforiláz új glükózanalog inhibitorainak tervezésére és szintézisére. A máj glikogén foszforiláz a glikogén metabolizmus kulcs enzime és közvetlenül felelős a vércukor szint szabályozásáért. Ezen megközelítést számos akadémiai csoport és gyógyszergyár vizsgálja, mint egy elképzelhető új lehetőséget a diabetes terápiában. A szintetizált vegyületek között a glükopiranozilidén-spiro-tio-hidantoin (GTH) igen kedvező hipoglikémiás hatása keltette fel érdeklődésünket, hogy tanulmányozzuk a GTH amilázra kifejtett hatását is. Méréseink szerint (Biochem. Biophys. Res. Commun., 2003) a GTH közepesen jó inhibitora a humán nyál amiláznak. Az inhibíciós állandók mM-os nagyságrendűek: $K_{EI}=7.3mM$, $K_{ESI}=2.8 mM$. A GTH szemben az akarbózzal nem metabolizálódik, ezáltal csökkenti az akarbóz kellemetlen mellékhatásait, és így a cukor metabolizmus rendellenességeinek kezelésére, valamint a fogszuvasodás megelőzésére alkalmas gyógyszerre fejleszhető ígéretes vegyület. A glikogén foszforiláz gátlására tervezett vegyületek közül a diglükozil-biuret, a diglükozil-urea, valamint az N-N'-diglükozil oxálsav amid típusúak a GTH-hoz hasonlóan jó inhibitorai a humán nyál amiláznak is.

A vizsgált molekulák kis méretük miatt többféle produktív komplexet hozhatnak létre az enzim aktív centrumában, ami magyarázhatja a gyengébb inhibitor hatásukat. Úgy gondoltuk, hogy a hosszabb, több alhelyet elfoglaló molekulák hatásosabb enzimgátlók lesznek.

Feltételezésünket a GTH enzimatis transzglykozilezésével bizonyítottuk (Carbohydr. Res., 2005).

Kwan Hwa Park és munkatársai (Seoul National University, Korea) egy termostabil maltogén amilázt kódoló gént klónoztak és expresszáltak a *B. stearothermophilus*-ból. Az enzim (BSMA) hidrolizálja a keményítőt, a ciklodextrineket, a pullulánt valamint az akarbózt is.

A BSMA úgy kötődik az akarbózhoz, hogy a maltóz közötti glikozidos 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) glikozidos kötések létrehozásával. A maltózt képző amilázok akceptor specifitása igen széles skálájú, mivel nemcsak mono- és diszacharidokra transzferálnak, hanem többféle, szerkezetileg különböző vegyületekre 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.

Ezen ismeretek adták az ötletet, hogy kísérletet tegyünk egy új amiláz inhibitor előállítására a BSMA katalizálta glikozilezéssel. Az enzim K. H. Park professzor laboratóriumából (Dél-Korea) származott.

Akarviozinil-izomaltozil-spiro-tiohidantoin (PTS-GTH) szintézise (Carbohydr. Res.,2005)

Az enzimatis glikozilezés akarbóz donor és glüko-spiro-tiohidantoin (GTH), mint akceptor jelenlétében történt. Az akarbózt Glucobay tablettából (Bayer) extraháltuk, a GTH-t kémiai szintézissel állítottuk elő.

A reakciót TLC, HPLC és MALDI-TOF analízissel követtük. A TLC 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 detektáltuk. A két termék képződését 10 óra után észleltük, majd 48 óra elteltével mennyiségük szignifikánsan növekedett. A reakcióelegy MALDI-TOF analízise azonban csak egy olyan csúcsot eredményezett, melynek m/z értéke nagyobb volt, mint az akarbózé, s ez izomer termékek keletkezésére utalt. Azonosítottuk a spektrumban az akarbóz, az akarviozin-glükóz és az újonnan képződött akceptortermék $[M+Na^+]$ ionizált csúcsait, 669, 506 és 752 m/z értékkel.

A HPLC analízis fő termékét izoláltuk és félpreparatív HPLC-vel tisztítottuk, majd szerkezetét NMR-rel igazoltuk. Az, hogy az újonnan képződött termék a PTS és GTH közötti transzglykozilezés eredménye, a számított (752.22) és mért (752.27) molekulatömegek közötti igen jó egyezés bizonyította. A proton és szén NMR spektrumok teljes jelhozzárendelését a COSY, TOCSY, ROESY, HSQC és HMBC módszerekkel végeztük el és ennek alapján igazoltuk a fő akceptortermék szerkezetét. A HMBC spektrum valamennyi interglykozidos és köztük az újonnan képződött C1→O-D₆ kötést egyértelműen igazolja. A glykozilezés helyét, azaz az 1-6 interglykozidos kötést (67,5 ppm) a D₆ szén kémiai eltolódása is megerősíti. A gyűrűk kapcsolódását, vagyis az interglykozidos kötésben részt vevő hidrogének téren át ható kölcsönhatását a ROESY spektrum alapján is igazoltuk.

Az α -amilázokhoz hasonlóan az anomer konfigurációt megtartó enzimek mechanizmusa egy kétlépéses reakció. Első lépésben a glykozil-enzim intermedier képződik, majd ezt követi a víz vagy az akceptor molekula támadása, ami a hidrolízis termékeket (PTS + Glükóz) vagy a transzglykozilezés 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 α (1-4) kötésű, de az 1-3 kötés képződése sincs kizárva.

Narayanan Ramasubbu és munkatársai (University of Medicine and Dentistry, New Jersey, USA) a humán nyál amiláz és mutánsaik szerkezeti és kinetikai tulajdonságát vizsgálják krisztallográfiás és enzimkinetikai módszerekkel. Igazolták, hogy az aktív hely konzervált aminosavai szerepet játszanak az átmeneti állapot stabilizálásában, valamint tisztázták a hidrolízis mechanizmusát is. A keményítő szubsztrát megkötődése az amiláz felületén található aktív helyen történik. A röntgenkrisztallográfiás vizsgálatokat az általunk kifejlesztett alhely térképezés (subsite mapping) eredményei egyértelműen megerősítették. A nyál amiláz (HSA) aktív centrumában 4 glikon és 3 aglikon kötőhelyet azonosítottunk, amely alapja lett az inhibitorok tervezésének. A fehérje szerkezetvizsgálata felfedte az aromás aminosavak jelentőségét a szubsztrát kötődésben és hidrolízisben. Az alhely térképezés az egyes kötőhelyek specifitásáról és kötési energiáiról nyújtott információt. A (-3), (-2) és (+2) alhelyek nagy energia értékei igazolták ezen kötőhelyek fontosságát a szubsztrát kötődésben. (FEBS Letters, 2003 és Theochem.,2003).

A humán nyál amiláz aktív centrumát három aromás aminosav Trp58, Trp59 és Tyr151 veszi körül, melyek kölcsönhatást létesítenek egymással (stacking or ring to ring interaction) és a kötött glükóz molekulával. Bizonyítottuk, hogy a Tyr151 a (+2) aglikon kötőhelyen található és befolyásolja a távozó csoport méretét. Azért, hogy megvizsgáljuk a (+2) kötőhely szerepét a szubsztrátok terminális egységének felismerésében, egy olyan mutánst hoztunk létre, ahol a tirozint a 151 pozícióban metioninra cseréltük ki.

A mutáció lényegesen lecsökkentette a HSA specifikus aktivitását, valamint a szubsztrát bekötődés erősségét, ami az aromás gyűrűk közötti kölcsönhatások csökkenésével vagy hiányával magyarázható a (+2) alhelyen. A vad típusú és az Y151M mutáns amiláz által katalizált hidrolízisek termékanalízise azt mutatta, hogy a mutáns enzimben a maltóz, mint minimális távozó csoport glükózra cserélődött. A monomer glükozid CNP-G1 lett a hidrolízis domináns terméke a rövid szubsztrátok (DP 3-5) esetében, de szignifikánsan megjelent a hosszabb (DP 6-10) oligomerek hidrolízisekor is, azonban nem keletkezett a vad típusú amiláz katalizálta reakcióban. Ez a metionin jelenlétével magyarázható, mivel nem mutat kedvezményezett affinitást a glükózhoz a (+2) kötőhelyen. A mutáció lecsökkentette a kötőhelyek glükóz iránti affinitását, de a legfeltűnőbb csökkenés a számított kötési energiákban a (+2) alhelyen (-2,6 kJ/mol a -12,0 kJ/mol helyett), a mutáció helyén történt. Ez a szignifikáns redukció a Met oldallánc jelenlétével magyarázható, amely feltehetően egy olyan konformációt vesz fel, ami részben elfoglalja a glükóz kötődési helyét. Végül, a Tyr Met-ra történő cseréje jelentősen megnövelte a mutáns enzim transzferáz aktivitását, és így lehetővé tette az enzimátikus transzglykozilezésekhez történő felhasználását.

Az Y151M mutáns enzimet elsőként alkalmaztuk sikerrel transzglykozilezésekhez .

A szubsztrátkötő árok nem-redukáló végén két aromás aminosav, a Trp58 és a Trp59 található, melyek a katalitikus (β/α)₈ hordó β 2- α 2 hurok részei. A két aromás oldallánc különböző mértékű kapcsolatot alakít ki a kötött akarbózzal. A Trp59 stacking kölcsönhatást létesít a 4-amino-4,6-didezoxi-glükóz molekulával a (-3) kötőhelyen és a glükóz molekulával a (-2) kötőhelyen, továbbá a glükózhoz hidrogén kötéssel is kapcsolódik. Ezzel ellentétben a Trp58 nem létesít stacking kölcsönhatásokat az említett kötőhelyeken. A Trp58 úgy helyezkedik el a Trp59 mellett, hogy számos aminosavval alakít ki kapcsolatot mind kötetlen, mind komplex szerkezetekben a HSA-ban és más emlős amilázban is. Így pl. hidrofób kapcsolatokat létesít a Trp59, His299 és His305 aminosavakkal és hidrogén kötést az Asp356-tal, melyek dominánsak a Trp58 környezetében. Mivel a Trp58 a (-2) alhely közelében helyezkedik el, s ezen alhelynek a legnagyobb a kötőaffinitása a glikon kötőhelyek között,

tanulmányoztuk a HSA aktivitásában betöltött szerepét. Trp58Ala, Trp58Leu és Trp58Tyr mutánsokat állítottunk elő és kinetikai tulajdonságaikat összevetettük a vad típusú enzimével. Az Ala és Leu helyettesítésekkel a Trp nagy hely igényének csökkentését céloztuk meg, míg a Tyr csere az aromás karakter egy részének megtartására irányult. A mutáns enzimek keményítő szubsztráton mért specifikus aktivitásaik 150-180-szorosára csökkentek a vad típusú amilázhoz képest. A k_{cat} értékek jelentős csökkenését tapasztaltuk a rövidebb oligoszacharidok esetében is. A k_{cat}/K_m érték jóllehet alacsonyabb a W58Y mutánsnál a vad típushoz képest, de tízszer nagyobb a W58L vagy a W58A-ra kapott értékeknél, ami arra utal, hogy egy aromás aminosavra szükség van ebben a pozícióban. A triptofán-leucin csere lecsökkentette az összes hely energia értékét, azonban a legjelentősebb csökkenés a számított kötési energiákban a (-3) alhelyen jelentkezett, ahol a mutáció történt. Érdekes, hogy az egyes helyek energia csökkenése nagyobb mértékű mint az Y151M mutáns esetében, ami arra utal, hogy a W58 aminosavnak több alhelyre kiterjedő koordináló szerepe lehet. Eredményeink azt a hipotézist támogatják, hogy az aktív centrum aromás aminosavai egy olyan vázat alakítanak ki, mely lehetővé teszi a szubsztrát befogadását, majd további stabilizáló kölcsönhatások létrejöttét. Ezen megállapításaink novumnak számítanak az irodalomban, melyeket a mutánsok hely térképeivel együtt elsőként publikáltunk. (Eur. J. Biochem., 2004). A triptofán leucinra történő cseréje megnövelte a HSA transzferáz aktivitását. Már alacsony szubsztrát koncentrációknál is a hidrolízis mellett transzglykozilezés is végbemegy.

Transzferáz aktivitás „bevezetése” mutációval a HSA-ba [Organic Letters, 2003 és Biologia Bratislava, 2005]

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 mutáns enzim alkalmazhatóságát oligoszacharidok szintézisére.

Maltotetraóz mint donor jelenlétében számos PNP-glikozidot, mint akceptort próbáltunk ki transzglykozilezésre, köztük néhányat említve; PNP α -Glc, PNP β -Glc, PNP 1-S- β -Glc, PNP α -Man, PNP α -Xyl; melyek akceptortermékei jó hozammal képződtek. A transzglykozilezés 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 és a transzglykozilezés aktivitásának pH optimuma nem különbözött az Y151M által katalizált reakció pH optimumától.

Megállapítottuk, hogy a glükozidok és a xilozid igen hatásos akceptorok a kitermelést illetően. Ha figyelembe vesszük, hogy az Y151M enzim az akceptorok alacsony koncentrációjánál (15 mM) már transzglykozilez, továbbá, hogy a glykozilezés mellett a donor és az akceptortermékek víz jelenlétében végbemenő hidrolízise is állandóan jelen van, 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 akceptortermékek 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 -glükozid 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 glykozidos oxigén kénre történő cseréje lényegesen nem változtatja meg a kihozatalt. A β -xilozid is jó akceptornak bizonyult (27,8%), bár nem volt olyan hatékony, mint a β -glükozid. Ez feltehetően a 6-OH hiányának tulajdonítható, ami fontos a bekötődéshez. A β -mannozid akceptortermékek kisebb mértékű képződése (5%) 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 glykozilezett 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.

Oligoszacharidok preparatív mértékű szintézisére a PNP 1-S- β -Glc-t választottuk akceptorként, mivel ellenáll az Y151M katalizálta hidrolízisnek, valamint jó aktivátor az anomer pozícióban az egymást követő glykozilezési reakciókban. A tio-glikozidok hatásos glykozilező ágensek specifikus tiofil reagensekkel történő kémiai szintézisekhez. Részletes enzimológiai vizsgálatok rámutattak arra, hogy az idő és a hőmérséklet a legfontosabb

tényező a szintézis irányítására. A termékeket preparatív HPLC-vel fordított fázisú oszlopon választottuk szét. A termékek szerkezeti analízisét MALDI-TOF MS adatokkal és ^{13}C illetve ^1H NMR spektroszkópiával valósítottuk meg. A MALDI-TOF MS spektrum igen jó egyezést adott a mért és a számított molekula tömegekkel.

Az interglikozidos kötés típusát valamint az anomer konfigurációt egy- és kétdimenziós ^1H és ^{13}C NMR spektroszkópiával határoztuk meg: 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 ^{13}C 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.

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 eltolódásának 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. Az izolált diszacharid úgy írható le, mint $\alpha\text{-D-Glp}(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-D-Glp}(1\text{-S-PNP})$.

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 kötések eredményezett.

Eredményeink igazolják, hogy mutáns enzimek használatával növelhető a transzglikozilezés/hidrolízis aránya, így a glikozilezés hozama. Ezen tapasztalatok

bátorítottak arra, hogy olyan újabb HSA mutánsok transzferáz aktivitását vizsgáljuk, melyek reményt keltőek lehetnek oligoszacharidok szintézisére.

N. Ramasubbu laboratóriumában (UMD New Jersey, USA) egy új, *exo*-enzimet izoláltak, amely a biofilmet felépítő N-acetil-glükózamin (GlcNAc) egységekből álló poliszacharid lebontásáért felelős, és a szájban előforduló patogén mikroorganizmus az *Actinobacillus actinomicetemcomitans* termeli. Az enzim fontos szerepet tölt be a mikroorganizmus biofilmből való kiszabadulásában (diszperziójában), ezért a diszperzinB nevet kapta. Az enzim vizsgálatához szubsztrát sorozatokat terveztünk, melyeket a Debreceni Egyetem-MTA Szénhidrátkémiai Kutatócsoportjában *Lipták András munkatársai* szintetizáltak. A DP 2,4,6 tagszámú, $\beta(1-6)$ glikozidos kötésekkel összekapcsolódó GlcNAc egységeket tartalmazó, a redukáló végen 4-metoxi-fenil (PMP) kromofor csoporttal jelzett oligoszacharidok hidrolízis termékeinek HPLC analízise azt mutatja, hogy az enzim a szubsztrát nem redukáló végéről monomer egységet hasít.

Megállapítottuk, hogy diszperzinB enzim egy $\beta(1-6)$ kötésekre specifikus *exo* hatásmechanizmusú hexózaminidáz. Az aktív hely feltérképezéséhez mutáns fehérjék és egy DP 2-5 tagszámú, tiofenil aglikont tartalmazó szubsztrát sorozat áll rendelkezésünkre. Eddigi eredményeinket két szénhidrátkémiai konferencián mutattuk be (Mátrafüred 2007, 2008) és egy közleményben foglaltuk össze (Acta Biologica Hungarica, 2008).

Birte Svensson és kutatócsoportja (BioCentrum-DTU, Dánia) az ipari szempontból fontos árpa amilázokat tanulmányozza. A hosszú szubsztrátkötő árokkal rendelkező izoenzimek (AMY1 és AMY2) aktív centrumának feltérképezését a DP 3-12 tagszámú szubsztrát sorozatunk tette lehetővé. Elsőként közöltük az izoenzimek alhely térképeit (FEBS Letters, 2006). Bár mindkét izoenzim aktív centruma a „7+2+1” alhely modellel írható le, azonban az egyes alhelyek energiaértékében szignifikás különbségek adódtak. Az alhely térképek a külső és belső gáthelyek jelenlétét is felfedték. A rendelkezésünkre álló aktív hely mutánsok vizsgálatával igazoltuk, hogy a (-6) alhely közelében elhelyezkedő Tyr105 aromás gyűrűje kulcsfontosságú a szubsztrát kötésében. Az árpa amilázokban a szubsztrát kötődése nemcsak a katalízisben részt vevő aktív helyen, hanem ún. másodlagos kötőhelyeken is végbemehet. Jelenleg az aktív hely és a másodlagos kötőhelyek mutáns fehérjéit vizsgáljuk a kötőhelyek ill. a módosított aminosavak szerepének tisztázása céljából.

Az AMY1 és izoenzimeinek figyelemreméltó tulajdonsága, hogy a hidrolitikus aktivitás mellett transzferáz aktivitással is rendelkeznek, vagyis a hidrolízis termékek mellett a szubsztrátnál hosszabb transzfertermékek is képződnek. Míg a hidrolízis/transzfer arány a vad típusú enzimben 8%, ez az arány 10 és 18 %-ra nő az Y105A ill. T212Y egyszeres mutánsokban, és tovább nő az Y105A/T212Y, valamint a V47K/S48G és a V47G/S48D kettős mutánsokban 20, 32 ill. 43%-ig. A mutáns enzimek transzferáz aktivitását enzimatisz glikozilezésekhez használjuk.

Árpa amilázok, a „természet szénhidrátkémikusai”

Az árpa amilázok transzferáz aktivitásának felismerése igen öröndetes, mert lehetővé teszi biotechnológiai alkalmazásukat különféle szintézisekhez.

Jelenlegi kutatásaink a mutáns enzimek akceptor és donor specifitásainak tanulmányozására irányulnak. Maltopentaóz mint donor és PNP α - és β -Glc mint akceptor jelenlétében maltooligoszacharid glükozidok sorozatát állítottuk elő preparatív méretben. Jó hozamú transzglikozilezésre azonban a PNP β -GlcNAc, β -Xyl, α -Man és a szalicin is alkalmasnak bizonyult, ami lehetőséget ad heterooligoszacharidok enzimatisz szintézisére. Az izolált vegyületek szerkezetvizsgálata folyamatban van.

Nyál amiláz inhibitorok tanulmányozása (BBRC 2004,2005, CR 2006, BBA 2008)

A pályázati periódusban számos különböző szerkezetű szénhidrát, fehérje és polifenol típusú, köztük természetes eredetű, szintetikus és félszintetikus úton előállított vegyület inhibitor sajátosságait vizsgáltuk. A természetes eredetű tanninok, valamint a kemoenzimatisz szintézissel nyert PTS-GTH szerkezetét MALDI-TOF MS, MALDI-TOF PSD MS, ESI MS, proton és szén NMR módszerekkel határoztuk meg. Megállapítottuk, hogy a kocsányos tölgy eredetű tanninban a központi kinasavhoz galluszsav dimer és trimer egységek kapcsolódnak, míg az allepói tölgy eredetű tanninban a glükózt monomer galluszsavak észteresítik, ami az allepói tanninnak egy kompaktabb struktúrát ad igen kedvező enzim-inhibitor kölcsönhatással. A kellő számú OH csoport jelenléte lehetővé teszi a hidrogén hidak kialakulását az enzimmel, míg a galluszsav csoportok stacking kölcsönhatást létesítenek a HSA aromás aminosavaival, melynek eredményeként az allepói tannin kitűnő inhibitora a humán nyál amiláznak, az akarbóz és a PTS-GTH-hoz hasonló inhibíciós állandóval.

A fehérje-inhibitor kölcsönhatás létrejöttét a pentagalloil-glükózzal (PGG), mint modell vegyülettel STD NMR és SPR módszerekkel igazoltuk. A PGG hozzákötődik a fehérje hidrofób régióihoz, feltehetően az aktív centrumot felépítő aromás aminosavak (Tyr151, Trp58, Trp59, Tyr62) a galluszsavak aromás gyűrűivel stacking kölcsönhatásokat létesítenek. A mutációt követően az aromás aminosavak környezetében domináló hidrofób kölcsönhatások és hidrogén híd kötések megszűnnek, így a PGG gátló hatása minimálisra csökken a Tyr151Met és Trp58Leu mutánsokban a vad típusú enzimhez képest. Eredményeink egyértelműen igazolják, hogy a gátlási mechanizmus egyrészt az aktív centrum közvetlen blokkolásán keresztül történik a (+2) és (-2) alhelyeknél, valamint a hidrofób kölcsönhatások és a hidrogénkötés hálózat kialakítása igen fontos tényező az inhibitor hatás létrejöttéért.

Eredményeink feltehetően megadják az esélyt a lehető legjobb amiláz inhibitor vegyület kifejlesztésére, ami áldásos következményekkel járhat a diabetes, obesitas és fogszuvasodás megelőzésére és gyógyítására.