

VÁLASZ

Dr. Kilár Ferencnek

„SZÉNHYDRÁTOKON AKTÍV ENZIMEK SZERKEZETE, AKTIVITÁSA ÉS GÁTLÁSA”
című

az MTA doktora fokozat elnyerésére benyújtott értekezésem bírálatára

Köszönöm a Prof. Dr. Kilár Ferenc bírálói munkáját, amit dolgozatom áttekintésére és elemzésére fordított és értékelő, elismerő megjegyzéseit. A következőkben a kritikai megjegyzésekre válaszolok.

A bíráló szerint dolgozatom „sajátos szöveges leírását adja az elvégzett munkának”, „összefoglaló jellegű munka, ... valószínűleg könnyebben forgatható lett volna egy különálló, Az eredmények megbeszélése fejezettel, amelynek tartalmát most részleteiben találhatjuk meg a sajátos szerkesztésű, előzményeket és eredményeket felsoroló, valamint az összefoglaló részekben”

Valóban a céloom egy olvasmányos összefoglaló dolgozat összeállítása volt, amiben a saját eredmények is hivatkozásként jelennek meg (hasonlóan az áttekintő jellegű “review” cikkekhez, ahol szintén nem szokatlan a saját eredményekre való hivatkozás). Az eredmények tárgyalása során a fejezetek elején elhelyezett bevezetéseket az indokolja, hogy a területen kevésbé jártas olvasónak ne a dolgozat elejéről kelljen keresgélni a témához a közvetlen előzményeket. Természetesen elfogadom a bíráló kritikáját, és nem gondolom, hogy ez a forma volt a legjobb választás, de reményeim szerint egy lehetséges csoportosítást és összefoglalóját adja az eddig végzett munkának.

Bírálóm hiányolta az ábrák hivatkozásait. Valóban csak akkor használtam hivatkozást, ha valamilyen ábra az adott közleményből változtatás nélkül került átvételre. A legtöbb saját ábra magyar nyelvű feliratokat kapott, így eltér az eredeti közleménytől, melyekre a szövegben minden alkalommal hivatkozás történt.

Ahogy a bíráló is észrevételezte, „az értekezés témájával kapcsolatos tudományos munkájának csak egy részét tartalmazza az értekezés.” Ennek oka, hogy az adott területen PhD dolgozatom beadása után már készült egy MTA doktori értekezés (Kandra 2006), ezért ebben a munkában csak az ezután született eredményeket mutattam be.

A formai megjegyzéseket elfogadom, sajnos sikerült igazolni azt, hogy nincs hibátlan munka. Az elírások magyarázata részben az, hogy egy idő után már nem azt olvassa az ember, amit leírt, hanem amit le akart írni, így átsiklik a hibákon.

Válaszaim a feltett kérdésekre:

1. A jelölt és munkatársai által kidolgozott és alkalmazott SUMA programmal jellemzett (számított) alhelyek száma nagy intervallumban változik az értekezésben is felsorolt enzimek esetében, akár pl. 12 alhelyet is meg lehet különböztetni. Lehet-e a fehérje-mérettel kapcsolatba hozni a lehetséges alhelyek számát és a kiszámítható látszólagos kötési energia-értékek nagyságrendjét?

Az amiláz enzimek igen elterjedtek, gyakorlatilag az élővilág minden rendszertani egységében megjelennek (baktériumok, archeák, és az eukarióták valamennyi országában).

Rendkívül változatosak szekvenciában és méretben is. A szekvencia azonosság extrém alacsony is lehet (akár csak 10 %), a méret pedig tág határok között változik pl. 10 kDa (*Bacillus caldolyticus*) - 210 kDa (*Chloroflexus aurantiacus*) a bakteriális amilázok esetében¹. Erősen konzerváltak viszont az aktív hely katalitikus triád aminosavai (katalitikus nukleofil - Asp,

proton donor - Glu, átmeneti állapot stabilizáló - Asp), és a harmadlagos szerkezet². A legtöbb ilyen szempontból vizsgált amiláz (β/α)₈ hordó szerkezetű (esetleg hiányos (β/α)₇ hordó) ahol a α -hélixeket és β -redőket összekötő felületi hurkok aminosavai vesznek részt a szubsztrát glükóz egységeinek rögzítésében. Saját eredményeink közül nézve egy példát: a növényi, árpa eredetű amiláz (Amy1) hosszú kötőhellyel rendelkezik (7 glikon+2aglikon+1gát alhely) az emlős, sertés pankreász eredetű amilázhoz (PPA) képest (3 glikon+2 aglikon), pedig a PPA molekulatömege nagyobb (57 kDa) az AMY1 kisebb (48 kDa). Az sem mondható egyértelműen, hogy a hosszabb kötőhely feltétlenül nagyobb látszólagos kötési energiát jelent összességében, hiszen a hosszabb kötőhelyen lehetnek gát alhelyek, amire szintén az AMY1 a jó példa. De a PhD dolgozatom keretében vizsgált *Bacillus licheniformis* α -amiláz (BLA) 9 kötőhelye (5+3+1 alhely szerkezettel) is kisebb kötési energiát jelent, mint a PPA 5 kötőhelye.

2. Lényeges hatással van az enzimek aktivitására és működésére az aminosavak célzott mutációjával létrehozott cseréje. Szeretném megkérdezni, hogy az ilyen cserék esetén az esetlegesen bekövetkező izoelektromos pont-beli változás az elsődleges oka, vagy inkább más tulajdonságokban történő változásokat kell figyelembe venni az enzimek működésében?

A válaszhoz a mutációk izoelektromos pontra gyakorolt hatását az árpa amiláz AMY1 izoenzimén szeretném bemutatni. A mutánsok nagy részénél a cserék nem okoznak izoelektromos pont változást, mert töltés nélküli aminosavak cseréje történt, szintén töltés nélkülire.

Ilyen mutációk a következők:

Y105A, W, F
V47A, F, G, L, I
S48Y, G, A, I

Savas vagy bázikus aminosavak bevezetése izoelektromos pont változást okoz a következő esetekben, de nem ez az aktivitás változás elsődleges oka. Egyrészt a változás kis mértékű (közelítő izoelektromos pont értékek Protein Calculator-ral számítva:

wild type 5,89

Ser48Asp 5,77

Val47Asp 5,77

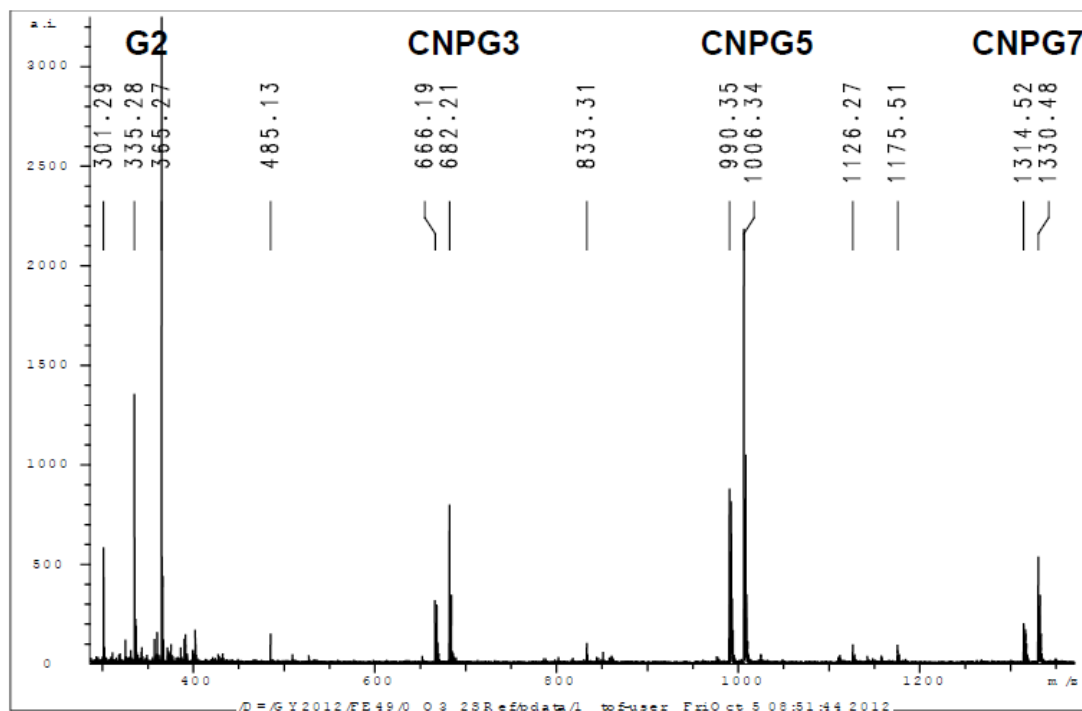
Val47Lys 6,0

H395A 5,79 másodlagos kötőhely mutáns)

Lényegesebb az a különbség, ami az aktív hely környezetében levő aminosavak polaritásában és a H híd, vagy π -stacking kölcsönhatás létrehozására való alkalmasságában van a vad típus és a mutációt hordozó fehérjében. Ilyen pl. az Y105A csere, aminek jelentős hatása volt. A másodlagos kötőhely esetében a fehérje mutáció hatására bekövetkező konformáció változása lehet a fő ok, ami miatt az aktív helytől távoli mutáció is befolyásolja a kötési energiákat és így a bontási képet.

3. Az értekezésben feltüntetett ábrák és ábraalírások, sajnálatos módon, nem mindig adják meg az ábrán megjelenő értékek, jelek, spektrum-komponensek pontos azonosítását. Egy kiragadott, de fontosnak és jellemzőnek mondható ábráról szeretnék kérdezni. Bár a hivatkozott közleményekben általában kideríthetők az utalások és értelmezések, a pontos értelmezés a [11]-es hivatkozásból kiemelt 18. ábrán szükséges lenne a tömegspektrumban megjelenő mindegyik komponens azonosításával. Megköszönöm, ha ezt röviden felvázolná, miután az édesburgonya béta-amiláz enzimének működése tényleg különleges, amelyet a tömegspektrumon is megjelenő komponensek jelenléte igazolhat.

Sajnos a több körös ellenőrzések ellenére is maradtak az ábrák jelölésében, és az ábra aláírásokban hiányosságok.



18. ábra A CNPG7 édesburgonya β -amiláz katalizálta hidrolízisének termékösszetétele MALDI-TOF MS spektrum alapján. Számított m/z értékek: $[\text{CNPG7}+\text{Na}^+]=1330,35$ Da; $[\text{CNPG5}+\text{Na}^+]=1006,242$ Da; $[\text{CNPG3}+\text{Na}^+]=682,132$ Da; $[\text{G2}+\text{Na}^+]=365,106$ Da, $[\text{G4}+\text{Na}^+]=689,3$ Da.

VI. ábra. A kérdésben szereplő 18. ábra a dolgozatból

A spektrum a hét glükóz egységet tartalmazó, redukáló végén kromofor (2-klór-4-nitrofenil CNP) csoporttal jelölt szubsztrát hidrolízisének termékösszetételét mutatja. Az ábra aláírásában is szereplő intenzívebb csúcsok tartoznak a nátrium ionnal ionizált oligomerekhez. Minden CNP tartalmú csúcs mellett 16 Da különbséggel megjelenik egy kisebb csúcs, ami a kromofor csoport UV elnyelése miatti fragmentációval keletkezik (Az UV lézer hullámhossza 377 nm, a CNP-glikozidok elnyelési maximuma 302 nm). Ilyen „mellécsúcs” nincs a szabad maltóz (G2 365,27) mellett. A redukáló végi, CNP tartalmú hidrolízistermékek 324 Da különbséggel jelennek meg a spektrumban, ami megfelel 2 glükóz egységnek.

A kis intenzitással jelen levő csúcsok közül a 1175 Da megfelel egy szabad maltoheptaóznak (G7), ami a reakcióelegyben kis mennyiségben jelen van a CNPG7 mellett, és természetesen szintén szubsztrátja az enzimnek. Hidrolízistermékei kis intenzitással láthatók 850 Da és 500 Da körül. A 335 Da és 301 Da m/z értéknél megjelenő csúcsok mátrix vagy puffer komponensek lehetnek. A többi kis intenzitású csúcsot nem azonosítottuk.

A spektrum igazolja, hogy a hasítás nem játszódhat le párhuzamos reakcióban, mikor az enzim vagy 2 vagy 4 glükózegységet hasít a 7 tagú szubsztrát nem redukáló végéről és így 5 és 3 tagszámú CNP-glikozid termék keletkezik, mert akkor a nem redukáló végről lehasadó tetramer $[G_4+Na^+]$ csúcsának meg kellene jelenni 689 Da-nál, ahol jól láthatóan semmi nincs a spektrumban.

4. Az értekezésben bemutatott munka egyik legfontosabb eredménye, amely újabb lehetőségeket nyit a területen, a különböző enzim-gátló folyamatok követésének és jellemzésének jövőbeni kifejtése. Az alkalmazott és kidolgozott folyadékkromatográfiai eljárások, valamint az izotermikus titrálási kalorimetria ebben a munkában elsősorban a glikoenzimek vizsgálatára irányultak. Véleménye szerint az enzim-inhibitorok kutatásában, másfajta enzimek működési területein lehetséges-e ezen technikának az alkalmazása?

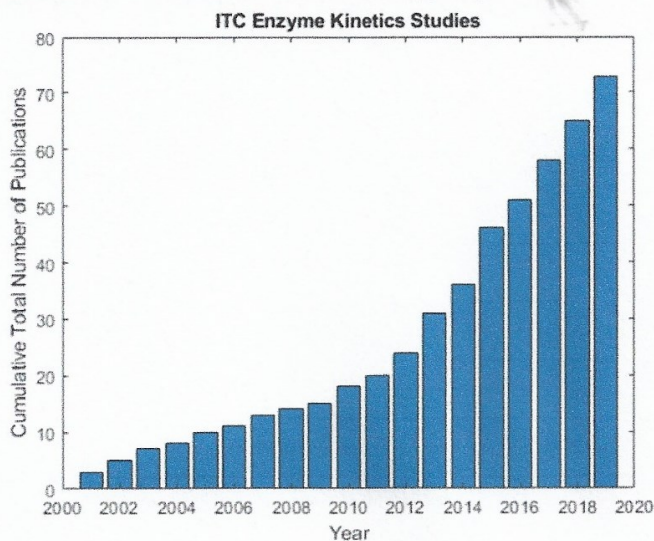
Az enzimaktivitás méréshez számos enzim esetében használnak folyadékkromatográfiai méréseket. Ez minden olyan esetben célravezető lehet, ahol a szubsztrát és a termék(ek) spektrális tulajdonságai nem különböznek, vagyis spektrofotometriával a szubsztrát és/vagy a termék koncentrációváltozása nem követhető. Ilyenkor szükséges lehet a reakcióelegy komponenseinek elválasztása. Már egy 1994-ben készült összefoglaló közel 80 enzimre írja le a HPLC-s aktivitásmérést, köztük az amilázra is maltoheptaóz szubsztráton refraktív index detektorral³. A leggyakrabban fordított fázist használták, és ha szükséges, elválasztás előtti, vagy utáni származékképzést a detektálás elősegítésére. A HPLC módszer hátránya idő- és eszközigényesége mellett, hogy kinetika esetén csak szakaszos mérésre használható. Ehhez vagy kinetikai görbét kell felvenni, több időpontban meghatározva a változást, vagy pl. gátlásvizsgálat esetén már elegendő azonos inkubációs idő után összehasonlítani az inhibitor nélkül és jelenlétében történő átalakulás mértékét.

Bár az ITC méréseket régóta használják kötődési energiák mérésére és így enzim gátlások vizsgálatára is, az enzim kinetikai mérésekre való alkalmazása a kétezres évek elején az érzékeny, kis térfogatú mikrokalorimetriás ITC készülékek megjelenésével és Todd és Gomez úttörő munkája után kezdett elterjedni⁴.

Részletes összefoglaló közlemény jelent meg 2020-ban az ITC enzimkinetikai alkalmazásairól⁵, amiben túlnyomórészt hidroláz enzimekre való alkalmazások találhatók, ezen belül is sok glikozidáz (itt két közleményünket is hivatkozzák), de ezeken kívül észterázok, proteázok reakcióit is vizsgálták. A transzferázok közül kinázok és glikozil transzferázok (egyedülként a glikogén foszforiláz a mi közleményünk) szerepelnek, de liáz, izomeráz és ligáz enzimek vizsgálatára is használtak ITC módszert. A hidrolázok felülreprezentáltságát ezekben a vizsgálatokban nem gondolom véletlennek. A hidrolízis esetében ugyanis, bár megfordítható reakcióról van szó, a víz nagy koncentrációja biztosítja, hogy gyakorlatilag egyirányú reakció történjen. Ezen kívül ez *pszeudo* egy szubsztrátos reakciónak tekinthető, ellentétben több enzimosztály reakcióival, ahol koenzim, vagy másik szubsztrát is kell a reakcióhoz. A cikk Supplementjében szemléletes grafikon (V2. ábra) mutatja az ilyen tárgyú közlemények számát 2000 és 2020 között. Az emelkedés 2010-ig egyenletes, majd 2011-ben változik a meredeksége és intenzívebb növekedési szakasz kezdődik.

Egy újabb kiterjesztését jelentik a kalorimetriás méréseknek a 2D ITC kísérletek⁶, amiben két szubsztrátos enzimreakciók kinetikai jellemzését végzik el egy mindkét szubsztrát koncentrációját szisztematikusan változtató kísérletsor segítségével. A reakciósebesség

mindkét szubsztrát koncentrációjától való függését bemutató felület kiértékelésével kinyerhetők a kinetikai állandók és a mechanizmus is megállapítható.



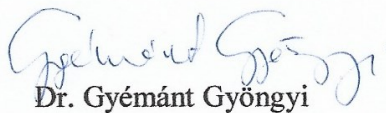
Supplemental Figure 1. Cumulative graph of ITC enzyme kinetics studies by year.

V2. Az ITC enzim kinetikai alkalmazásaival foglalkozó közlemények számának alakulása [5].

Hivatkozások:

- 1.Mehta D and SatyanarayanaT Bacterial and Archaeal α -Amylases: Diversity and Amelioration of the Desirable Characteristics for Industrial Applications. *Front.Microbiol.*7 (2016) 1129.doi.org/10.3389/fmicb.2016.01129
- 2.Janeček Š, Svensson B, MacGregor EA. α -Amylase: an enzyme specificity found in various families of glycoside hydrolases. *Cell Mol Life Sci.* 71 (2014) 1149-70. [doi: 10.1007/s00018-013-1388-z](https://doi.org/10.1007/s00018-013-1388-z)
- 3.Gjalt W. Welling, Albert Jan Scheffer, Sytske Welling-Wester, Determination of enzyme activity by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 659, (1994) Pages 209-225.
- 4.Todd MJ, Gomez J. Enzyme kinetics determined using calorimetry: a general assay for enzyme activity? *Anal Biochem.* 296 (2001) 179–87.
- 5.Wang Y, Wang G, Moitessier N, Mittermaier AK. Enzyme Kinetics by Isothermal Titration Calorimetry: Allostery, Inhibition, and Dynamics. *Front Mol Biosci.* 19 (2020) 583826. [doi: 10.3389/fmolb.2020.583826](https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.583826).
6. Wang Y, Mittermaier AK. Characterizing Bi-substrate Enzyme Kinetics at High Resolution by 2D-ITC. *Anal Chem.* 93 (2021) 12723-12732. [doi: 10.1021/acs.analchem.1c02705](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c02705).

Debrecen, 2025. 01.08.


Dr. Gyémánt Gyöngyi