

## VÁLASZ

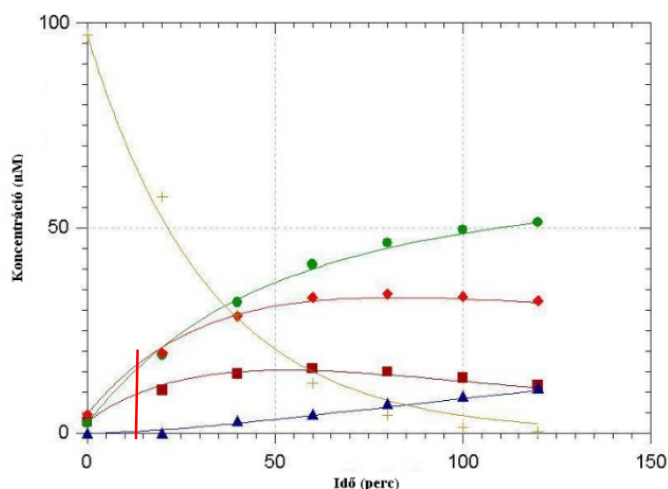
Dr. Martinek Tamásnak

„SZÉNHIDRÁTOKON AKTÍV ENZIMEK SZERKEZETE, AKTIVITÁSA ÉS GÁTLÁSA”  
című

az MTA doktora fokozat elnyerésére benyújtott értekezésem bírálatára

Mindenekelőtt szeretném megköszönni hogy dolgozatom bírálását elvállalta, köszönöm az értékelő megjegyzéseket, valamint támogató véleményét és elgondolkodtató kérdéseit. Az alábbiakban igyekszem ezekre részletes választ adni.

p15: Hosszabb próbaszekvenciáknál nincsenek párhuzamos reakciók? Vagy ezt a SUMA egyidejűleg illeszti a dG additivitás feltételezésével?



VI. ábra CNPG5 szubsztrát LdAmy katalizálta hidrolízisének kinetikai görbéje (CNPG<sub>5</sub>: + CNPG<sub>4</sub>: ■, CNPG<sub>3</sub>: ◆, CNPG<sub>2</sub>: ●, CNPG: ▲)

A bontási kép adatok a kinetikai görbék azon kezdeti, lineáris szakaszáról származnak, ahol még kezdeti sebesség körülmények érvényesek, és nincs másodlagos hasítás (VI. ábra, piros vonal jelöli a kötéshasítási frekvencia meghatározás idejét). Párhuzamos reakciók vannak, hiszen abból adódnak a BCF kötéshasítási frekvencia értékek. Ennek oka, hogy egy adott hosszúságú szubsztrát több olyan pozíciót vehet fel az enzim-szubsztrát komplexben, amelyben van a kötőhelyet átfedő glikozidos kötés (produktív komplex, ld. a dolgozat 5. ábrája). A szubsztrát különböző pozícióban való kötődése eltérően kedvezményezett, ami azt eredményezi, hogy az egyes kötések hasítása eltérő gyakorisággal történik. Annál nagyobb egy adott pozícióban a hasítás valószínűsége, minél nagyobb a betöltött alhelyek összenergiája.

p17 és mindenütt a szövegben: A DP rövidítés definícióját nem találtam a rövidítésjegyzékben. Feltételezem, hogy a polimer kémiában használatos polimerizáció fokra utal. Ez a területen járatlan olvasó számára nem nyilvánvaló. Különösen amiatt zavaró, hogy a “DP N tagszámu” formátumot használja, ami redundáns. Ezt javaslom DP N-re vagy N-tagszámu jelölésre módosítani.

A DP a degree of polymerization – polimerizációfok rövidítése, valóban kimaradt a rövidítésjegyzékből. Módosításra sajnos már nincs lehetőségem.

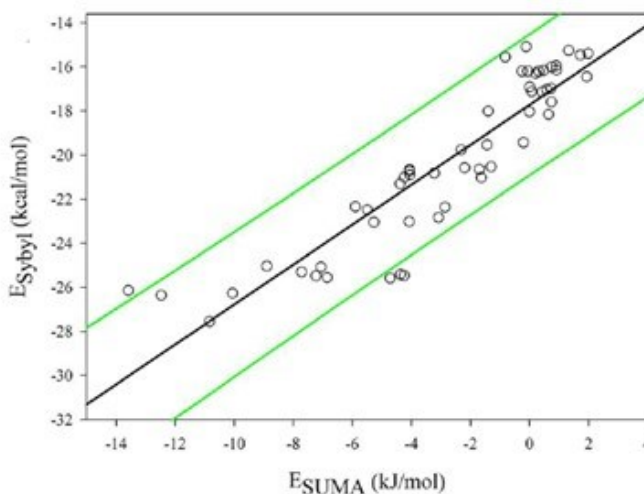
p28: Megdöbentő, hogy egy egyszerű szerkezet minimalizálás ennyire prediktívnek bizonyult. Szerencsés lett volna néhány grafikont bemutatni az adatok illeszkedéséről a statisztikai

adatokon túl, hogy az olvasó kaphasson egy grafikus képet a valós illeszkedésről esetleges kilógó pontokról.

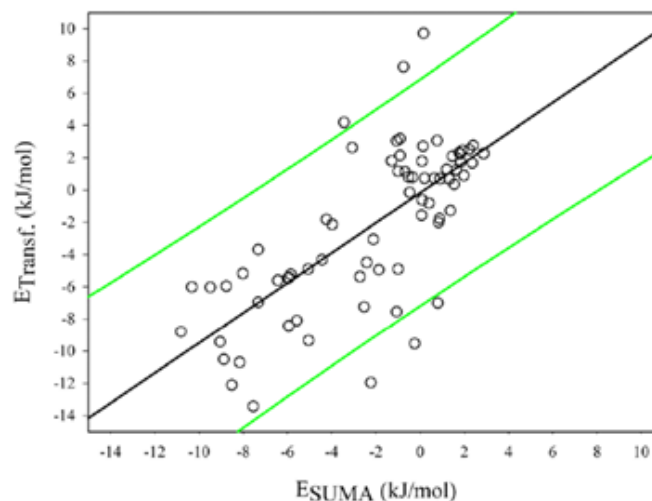
Az alábbi V2. ábra mutatja a vizsgált enzimek esetében a mért ( $E_{SUMA}$ ) és a jóslt ( $E_{SYBYL}$ ) helyi kötési energiák korrelációját. A zöld egyenesek a 95 százalékos predikciós intervallumot jelölik. A regressziós analízist a -1 és +1 helyek energiáinak kihagyásával végeztük, mivel ezek a produktív komplexben mindig betöltöttek, így a SUMA programmal nem számíthatók.

Az optimalizálás során a molekulamechanikai erőter kiválasztása után (Sybyl programcsomag Amber7\_FF99) a dielektromos állandó, nem kötő kölcsönhatások hatótávolsága, iterációk száma és a szubsztrát és a módosított aminosav oldalláncok körüli terület nagysága voltak a változtatott paraméterek.

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



*Az AMY1 ellenőrző csoport értékei  
a lineáris transzformálás után.*



V2. ábra Az AMY1 árpa eredetű  $\alpha$ -amiláz helyi kötési energiák ( $E_{SUMA}$ ) és a jóslt értékek ( $E_{SYBYL}$ ) közötti lineáris regressziós analízis. A regressziós egyenesek fekete színűek, a zöld vonalak a 95% predikciós intervallum határokat jelölik.

Ahhoz, hogy ez a relatíve egyszerű számítási eljárás ilyen pontossággal becsülhesse az energiákat, a fentebb felsorolt paraméterek számos lehetséges kombinációját teszteltük, és a legmegfelelőbbnek ítélt beállításokat választottuk ki további optimalizálásra. Ennek részeként

teszteltük a szénhidrátok számítására optimalizált Glycam06 erőteret is, de meglepő módon ennek az alkalmazása kevésbé bizonyult hatékonynak az AMBER erőterhez képest.

Azt tapasztaltuk, hogy a lineáris regressziós analízis során a rossz korrelációt okozó pontok eloszlása nem egyenletes, a 95 %-os predikciós intervallumon kívül eső pontok többsége V47D, V47K/S48G és V47G/S48D AMY1 mutáns enzimhez tartozik. Ezen enzimek mindegyike tartalmaz olyan mutációt, melyben egy töltés nélküli aminosav oldallánc töltött oldalláncrea van cserélve. A fentebbi grafikonok összképet mutatnak, de az egyes mutánsokra kapott értékeket alhelyenként is érdemes lehet értékelni. Ez alapján azonosíthatók lehetnek azok az alhelyek, ahol a becslés bizonytalanabb. Igaz ugyan, hogy töltött aminosavak bevezetése esetén (V47D, V47K/S48G és V47G/S48D AMY1 mutánsok) néhány alhely esetében a számított érték a 95% predikciós intervallumon kívül esik, azonban a többi alhelyen a becslés pontossága megfelelő.

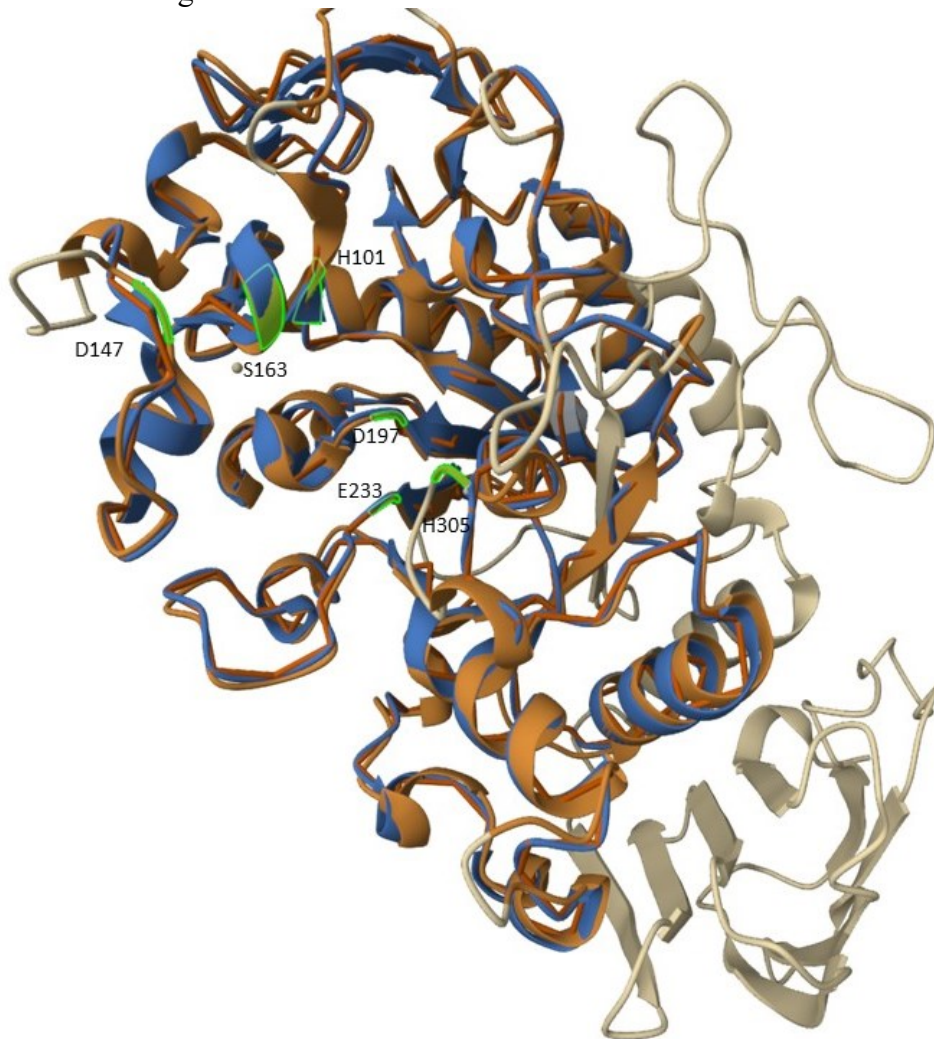
p28: Mi lehet az oka a töltött oldallancok kilógásának a predikcióból? Oldószer modell figyelembevétele javított volna ezen?

A tanító halmaz esetében csak irodalmi bontási kép és alhelytérkép adatokat használtunk. A modell kidolgozásánál a tanító halmazban nem voltak töltött aminosavat bevezető mutációk, így ezeknek a változásokra a modell rendszerünk nem volt betanítva. A kutatások időpontjában az akkor rendelkezésre álló összes kísérletes adatot összegyűjtöttük és felhasználtuk a modell tanításához vagy teszteléséhez, így a tesztelést is csak limitált adathalmazon tudtuk elvégezni. Mivel a célunk egy gyors eljárás kidolgozása volt ezért elkerültük a kölcsönhatási energiák nagy mennyiségű oldószermolekula környezetében való számítását. Az ellenőrző halmazba már saját, mutációt tartalmazó enzimeken végzett méréseink kerültek. Ezekben az enzimekben néhány mutáció miatt töltésváltozás is történt, de az eredmények azt mutatják ekkor nem megfelelő a jóslás. A predikció pontosságán feltehetően javítana ha a számításokat oldószermodellben végeztük volna. Ezzel kapcsolatban két megjegyzés: i) A kutatások időpontjában (2011) csupán korlátozott számításos kapacitás állt rendelkezésünkre, így már ezeknek a számításoknak az elvégzése is relatíve sok időt vett igénybe. Napjainkban ezek a számítások oldószer modellben sokkal gyorsabban lennének elvégezhetőek, hiszen rendelkezésre áll Debrecenben is a szuperszámítógép igen nagy kapacitása. ii) A cél egy relatíve gyors és egyszerű becslési eljárás kidolgozása volt, ami nem indokolta bonyolultabb rendszer felépítését (a megfelelő oldószerrel, ionokkal, pH és ionerősség beállításával a módszer kidolgozása még több időt vett volna igénybe).

Bár ez az egyszerű eljárás nem megfelelő minden esetben a több aminosav módosításának hatására bekövetkező, összetett hatások jóslására, sok esetben mégis jól működött, pl. az AMY1 esetében az Y105A és T212Y mutációk esetében a bontási képeket az egyszeres és a dupla mutáns esetében is jó pontossággal sikerült becsülni.

p30: Nagyon érdekes, hogy az oligoszacharid próba hidrolízisének a hasonlósága a LdAmy és PPA fehérjék szerkezetének hasonlóságával is együtt jár. Itt csak a katalitikus felszín a hasonló vagy a teljes fehérje?

Én megfordítanám a kérdést, úgy gondolom, hogy a hasonló szerkezet jár együtt a hasonló termék eloszlással. Az a kérdés viszont jogos, hogy ez a teljes fehérjére, vagy csak a szubsztrátkötő és katalitikus hely környezetére vonatkozik, főleg ha látjuk azt a kis szekvencia azonosságot, ami az amilázok esetében előfordul. A HSA-PPA-LdAmy esetében viszont a szekvencia és szerkezeti hasonlóság is nagy, dolgozatomban is bemutattam (dolgozat 17.ábra) a HSA PDB adatbázisból származó szerkezet és az LdAmy AlfaFold jósolta szerkezet nagymértékű hasonlóságát.



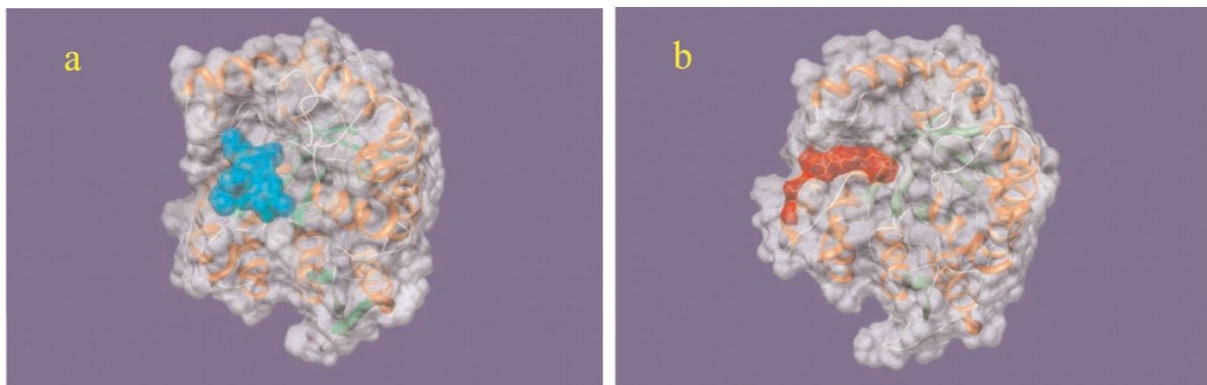
V3. ábra Szerkezet összehasonlítás HSA: (barna) ISMD LdAmy: (kék) AF-A0A0F6TN63-F1 AlfaFold jósolta szerkezet a *L. decemlineata* 1-300 aminosav szekvencia részletére.

p42: A sebességi állandók értékeit nem szemléltette az ábrán, de az látszik, hogy párhuzamos reakcióutak jelen vannak. Mennyire unikális az elméleti modell? Hogyan zárható ki, hogy más modell is illeszkedik a kísérleti adatokra?

A mérési pontokat a modell alapján felépített differenciál egyenleteket felhasználva Scientist programmal illesztettük minden szubsztrát esetében. Így ugyanarra a lépésre több szubsztráton végzett mérésből is kaptunk sebességi állandókat. Az így kapott sebességi állandók egyezése nem minden esetben volt megfelelő, amit azzal magyaráztunk, hogy ez a modell nem tartalmazza a kezdeti szakaszban tapasztalt transzglykozilezést. Másrészt így a processzív

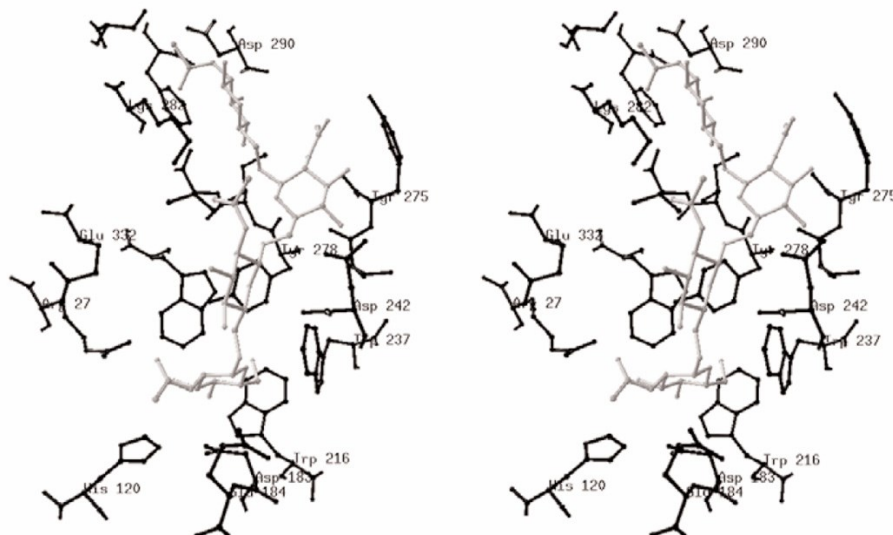
lépéseket egy sebességi állandóval jellemezzük, ami tartalmazza az egyes részlépések sebességét és a szubsztrát áthelyeződését is. Ez elhanyagolásokat jelent, így nem is értelmeztük ezeket az értékeket. Több modellt próbáltunk ki, a bemutatott mutatta a legjobb illeszkedést, de csak a kezdeti pontok elhagyásával. Nem zárható ki, hogy más modell is működhetne a folyamat leírására.

p43: “Az is kiderült, hogy a hidrogénkötés önmagában nem magyarázza nagyobb stabilitást, ehhez a hidrofób (van der Waals) kölcsönhatások is nagymértékben hozzájárulnak.” Vizes közegben hatékony kötődés soha sem lehetséges kizárólag hidrogén kötésekkel, a hidrofób kölcsönhatások és azok kooperatív H-kötés árnyékoló hatása nélkülözhetetlen. Hogyan érvényesült ez a modellezett DspB komplexnél?



V4. ábra  $\beta(1,4)$ -oligoszacharid (a) és  $\beta(1,6)$ -oligoszacharid (b) illeszkedése a DspB aktív helyére (89 hivatkozás a dolgozatban)

A modellezés alapján a  $\beta(1,6)$  kötésű oligomer hajlott struktúrája sokkal jobb illeszkedést tesz lehetővé az aktív hely felületi árokban, mint a kitin szerkezetének megfelelő  $\beta(1,4)$  kötésű oligomer.



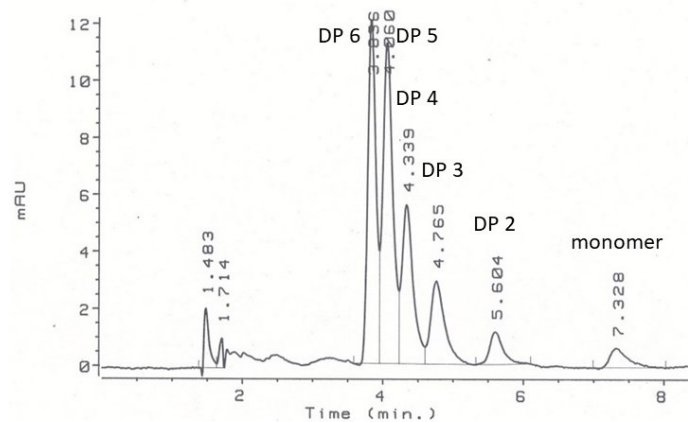
V5. ábra A DspB enzim  $\beta(1,6)$  kötésű GlcNAc tetraszachariddal alkotott komplexének sztereodiagramja. A fehérjeatomokat feketével, míg a tetraszacharid atomjait szürkével jelöltem. Négy alhely látható, az ábra alján  $-1$ , felül pedig  $+3$ .

Számos aminosav, köztük a Trp216, Trp237, Tyr278 és Trp330 aromás csoportok hidrofób stacking kölcsönhatásokat biztosítanak a megkötött monoszacharid egységekkel. Ezek az aminosavak jól konzerváltak a GH20 hexózaminidáz családban.



p46, 25. ábra: A HPLC kromatogramokat annotáció nélkül ábrázolja, ami nehezíti a megértést. Az elegyek összetétele alapján megállapítja, hogy a DspB enzimet *exo* mechanizmusú enzimként azonosították. Ez a megfogalmazás kizárólagosságot sugall. Ugyanakkor az eredmény nem zár ki egy párhuzamos *endo* folyamatot. Ezt a következő lépésekben be is mutatja a korábbi megállapítással ellentétben. Javaslom az említett szöveg finomítását, elkerülendő az olvasó nem kívánt irányba történő terelését.

Valóban az ábráról lemaradtak a csúcsok azonosítását jelző számok, amiért elnézést kérek. Bár a szövegben szereplő számadatokból, amelyek a csúcsterületek arányait mutatják megfeleltethetők a csúcsok a komponenseknek, de nyilván jelölni kellett volna az ábrán is ezeket. A fordított fázisú elválasztás miatt az oligomerek fordított sorrendben jelennek meg a kromatogramon, a lepolárisabb hexamer szubsztrát eluálódik legkorábban, ezt követik csökkenő méret szerinti sorban rövidebb termékek, ahogy az alábbi kiegészített V6. ábrán látható.

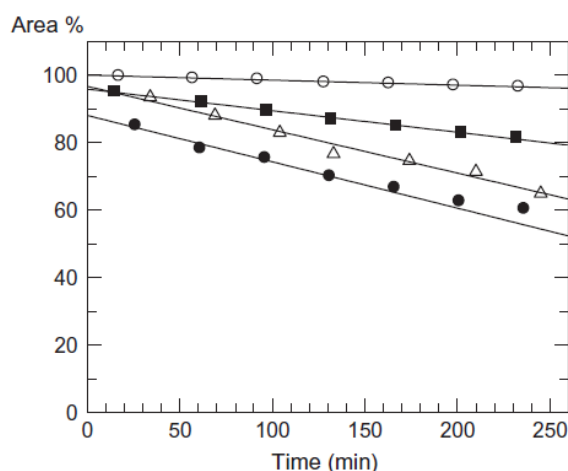


V6 ábra Hexamer szubsztrát DspB enzim katalizálta hidrolízisének fordított fázisú HPLC termékanalízise

Az adott hivatkozott közleményben [89] a termékanalízis alapján az *exo* azonosítás szerepel, amit a másik szubsztrát sorozaton végzett későbbi méréseink után változtattunk meg. Azzal egyetértünk, hogy így olyan megállapítás szerepel a dolgozatban, ami azóta helytelennek bizonyult, de módosítani a dolgozaton már nincs lehetőségem.

p49, 29. ábra: “A szubsztrátok fogyása alapján kapott kezdeti sebesség mérések azt mutatták, hogy a tetramer és pentamer szubsztrátok között már nincs jelentős különbség a hidrolízis kezdeti sebességében.” Az ábrán észrevehetően a DP5 kisebb bomlási sebességet mutat. Mi lehet erre a magyarázat?

A fenti megállapítás nem a dolgozatban közölt kinetikai görbék alapján történt, hanem a hivatkozott [90] közleményben közölt adatokra alapozva. Itt a kezdeti sebesség mérések kis (0,4 mM) szubsztrát koncentrációknál történtek HPLC módszerrel (ld. a cikk ábrája alább). Ezen egyértelműen látszik, hogy a tertamer és a pentamer szubsztrát kinetikai görbék meredeksége egyforma.



V7. ábra. Tiofenil glikozidok DspB katalizálta hidrolízisének kinetikai görbéi.  $[S] = 0,4 \text{ mM}$ ,  $\text{pH} = 5,9$ ,  $T = 25 \text{ oC}$  ○ dimer ■ trimer △ tetramer ● pentamer glikozid szubsztrátok területarányai a HPLC kromatogramokon (90. hivatkozás a dolgozatban)

A dolgozatban bemutatott teljes hidrolízis kinetikai görbék 3.5 mM kiindulási szubsztrát koncentrációval készültek. A dolgozat 31. ábráján bemutatott modell szerint látható, hogy már a reakció kezdeti szakaszán számos olyan termék képződhet, ami szubsztrátja az enzimnek és így kötődve csökkentheti a pentamer kötődésére és hidrolízisére rendelkezésre álló enzim koncentrációját. Ez eredményezheti a kismértékű sebesség csökkenést. Az enzimm koncentráció 0,2  $\mu\text{M}$  volt ezeknél a méréseknél.

p52, 30. ábra: Az ábra aláírás nem definiálja, mit jelentenek a számok az ábrán. Reakciósebességre vonatkoznak? Relatív specificitás? Ha igen, akkor ennek a mennyiségnek mi a definíciója?

A BCF jelölés sajnos lemaradt az ábráról, a számok a kötőhasítási frekvencia százalékos értékei, ami a reakció kezdeti szakaszán a termékek arányát jelenti. Az ábra megjelenik a hivatkozott [91] közleményünkben, ahol szerepel a BCF jelölés, bár tudom ez nem mentség a hiányos jelölésre. A bontási kép meghatározás korábban már többször szerepelt más enzimek termékeloszlásának vizsgálatokor, és ez a termékek arányának mérését jelent, amit számszerűen százalékosan szoktunk kifejezni

Ahogy a közleményben is szerepel, ezek az arányok az adott szubsztráttal lejátszódó párhuzamos reakciókat tartalmazó modell alapján illesztéssel (Scientist) kapott reakciósebességi állandók arányával jó egyezést mutattak.

p53: Általános az az összefüggés, hogy ha nincs jelen hosszú oligo, akkor a rövidekkel transzglykozilezés történik? Elég rontani a hosszúak kötődését mutációval?

Nem csak a szubsztrátok mérete számít, sokkal inkább a reakció sebessége. A mutációk általában akkor növelik a transzglykozilezés mértékét, ha a hidrolízis sebessége csökken. Ilyenkor egyrészt hosszabb élettartamú lehet az glikozil-enzim átmeneti termék, ami megteremti a lehetőséget az akceptor támadásra a víz helyett. Másrészt a kisebb hidrolízis sebesség miatt kisebb a termékek hidrolízisének esélye.

p55, 35. ábra: Az ábra minősége, értelmezhetősége és a feliratok olvashatósága nem megfelelő.

Sajnos a Word fájlban még elfogadható ábra minősége a pdf konvertálás során valóban tovább romlott.

Az ábrák a dolgozat [97] hivatkozásából lettek egybe szerkesztve, részletes értelmezésük nem került be a dolgozatba, amit most pótolok. A donor és akceptor koncentrációk növelése a vártnak megfelelően növelte az elérhető konverziót, itt a korlátot a vegyületek oldhatósága jelentette. A pH esetében egyértelmű optimumot állapítottunk meg a pH=5,5 értékénél, míg az akceptor oldószereként használt DMSO 10 %-nál nagyobb koncentrációi már gátolták az enzim működését. Így a preparatív szintézist 40 mM DMSO-ban oldott MUB- $\alpha$ -Glc akceptor és 25 mM pH=5,5 acetát pufferben oldott maltoheptaóz donor (1:9) arányú elegyében, 0,5 nM V47F árpa AMY1 mutáns enzim jelenlétében 25 °C hőmérsékleten végbemenő 12 órás reakcióval végeztük el. Így a DMSO koncentráció 10 % volt a reakcióelegyben. Itt kiemelném, hogy az optimalizálás az olcsóbb MUB- $\beta$ -Glc akceptorról történt.

p58: Az ITC mérési eredményeket így vezeti fel: "...módszerek, amelyek lehetővé teszik a természetes szubsztráton és körülmények között való mérést a folyamatba való beavatkozás nélkül." Igaz ugyan, hogy a komponensek viselkedését nem befolyásoljuk kémiai jelöléssel, de az ITC tisztított komponenseket és optimalizált körülményeket igényel (pH, puffer, hőmérséklet) a megfelelő  $\Delta H$  előidézéséhez. Emiatt az ITC minden előnyével együtt sem tekinthető általánosan beavatkozás-mentes módszernek.

Ezzel a megállapítással vitatkoznék. Természetesen minden mérés beavatkozást jelent, de az általánosan használt enzim aktivitásmérésekhez képest, amikor gyakran módosított szintetikus szubsztrátokat használnak, vagy egyes esetekben kapcsolt enzim reakciókat az enzim működésének követésére az ITC mindenképpen több lehetőséget nyújt. Nincs szükség feltétlenül tisztított komponensekre, szuszpenzióban, nem oldható polimer szubsztrát jelenlétében, immobilizált enzimekre is alkalmazható. Nem zavar az inhibíciós méréseknél ha az inhibitor színes, ami a mi méréseinknél okozott problémát a fotometriás aktivitásmérés esetén. A legnagyobb előny, hogy közvetlenül a reakciósebességet mérjük, nem koncentrációt az idő függvényében. Természetesen ez a módszer sem mindenható, bizonyos reakciók túl kis entalpiaváltozással rendelkeznek a kalorimetriás méréshez, mint pl, az izomerázok, másoknál mellékreakciók zavarhatják az egyértelmű méréseket.

(Hagedoorn, Peter-Leon Isothermal titration calorimetry, Biocatalysis, enzyme kinetics, enzyme inhibition, Reaction enthalpy Frontiers in Catalysis, 2, (2022) 2673-7841. DOI:10.3389/fctls.2022.906668)

p60: A  $\Delta Q/\Delta t$  kifejezés véges differencia hányadosát jelöl. A leírt ITC mérésben a cellában termelődő/elnyelődő hőteljesítményt mérjük, amit matematikailag differenciálhányados  $dQ/dt$  helyesebben ragad meg. A szövegben így is találjuk.

A megjegyzéssel egyetértek, a  $dQ/dt$  jelölés lett volna helyes.

p61, 8. tabl.: A  $K_m$  értékek becsült kísérleti hibái hiányoznak a táblázatból, ami ITC mérések esetében jellemzően nem elhanyagolható. Így a  $K_m$  értékek alapján tett megállapításokat óvatosan kell kezelnünk.

A  $K_m$  értékek hibáját nem gondolom nagyobbak ITC mérések alapján meghatározva, mint egyéb módszerekkel. A szubsztrátkoncentráció függésének kiértékelése helyesen nem lineáris illesztéssel történik. Nagyobb hibát jelenthet a közleményekben még mindig gyakran látható linearizálással való kiértékelés ( $1/v = f(1/[S])$ ), vagy az aktivitásmérés körülményeinek nem megfelelő megtervezése, pl. nem a kezdeti sebesség tartományban való mérés, vagy a nem elég nagy szubsztrát koncentráció tartomány.

p69, 10. tabl.: Az inhibíciós állandókat nem egységes mértékegységgel adja meg. Javasolom a moláris koncentrációk megadását minden esetben. A táblázatban levő adatoknál nincs feltüntetve, hogy melyek irodalmi eredmények.

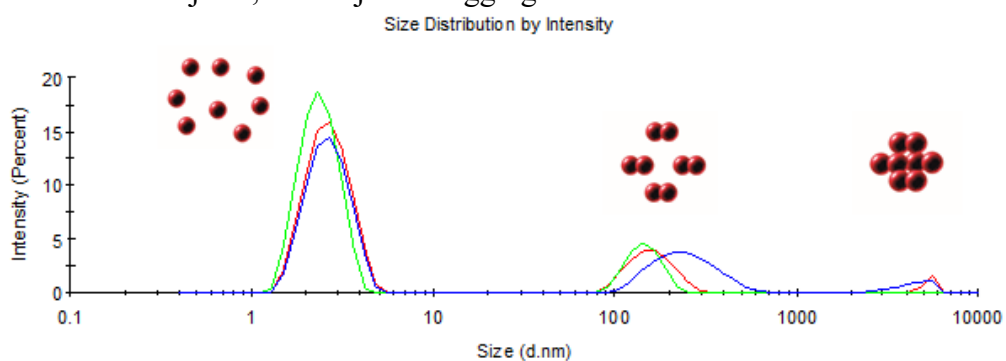
A táblázat utolsó oszlopa mutatja a hivatkozásokat, melyből kiderül, hogy csak a PPA adat saját mérési eredmény. A táblázat adatai olyan mértékegységgel szerepelnek, ahogy az a hivatkozott



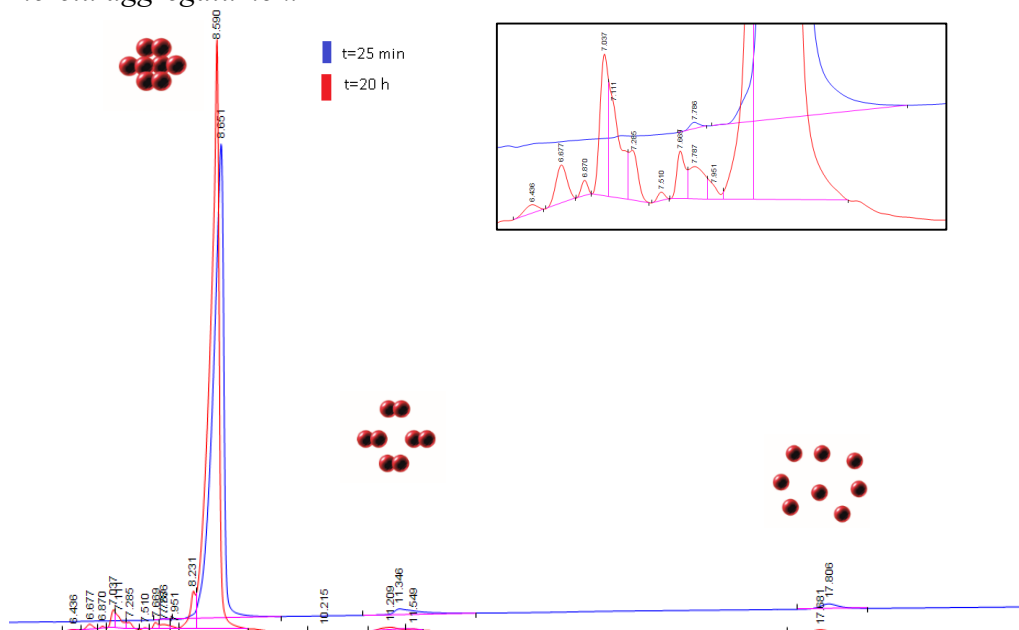
cikkben meg volt adva. Átszámításuk moláris koncentrációvá csak a molekulatömeg ismeretében lehetséges, ez pedig a tannin esetében, ami nem egy vegyület, hanem egy elegy, nem mindig ismert.

p70: Megállapítja, hogy detergens hatására nőtt az inhibíciós állandó, amit a tannin fehérje aggregációt növelő hatásával magyaráz. Történtek-e kiegészítő részecskeméret mérések az aggregáció alátámasztására hasonlóan a 82. oldalon bemutatott mérésekhez (pl. méretkizárásos kromatográfia, dinamikus fényszóras, diffuzios NMR)? Hogyan zárták ki a közvetlen detergens-enzim kölcsönhatást, mint az egyik lehetséges, nem aggregáció-alapú magyarázatot a 47. ábrán bemutatott eredményekre?

DLS és SEC mérésekkel igazoltuk a tannin aggregációt, az alábbi V8. és V9. ábrák a [130] közlemény Supplementjében szerepelnek, és mutatják a tannin aggregátumok méretét (150 nm és 5000 nm) és az eloszlás időbeli változását. Igazoltuk, hogy a tannin aggregátumok lépnek kölcsönhatásba a fehérjével, a fehérje nem aggregálódik.

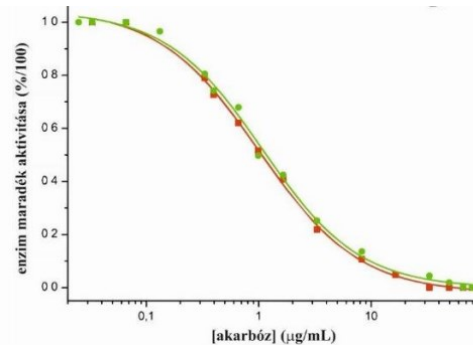


V8. ábra Gallotanninok részecskeméretének változása időben követve DLS módszerrel (zöld- 5 perc, piros 10 perc, kék 60 perc). Az első csúcs a monomer a második és harmadik eltérő méretű aggregátumok.



V9. ábra Gallotannin SEC-HPLC analízise 25 perccel (kék) és 20 órával (piros) a feloldás után. A kezdeti 6-9 perc közötti régió nagyított képen jól láthatók a nagyobb aggregátumok jelenléte.

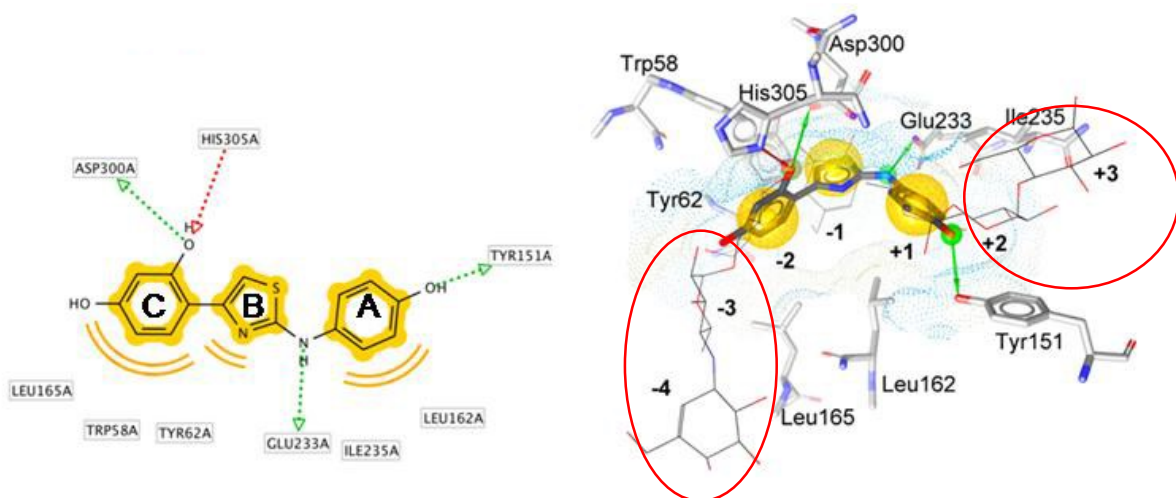
A detergens –enzim kölcsönhatást kontroll kísérletben vizsgáltuk. Negatív kontrollként akarbózt használtunk, mint az  $\alpha$ -amiláz ismert, nem aggregáció alapú gátlószerét. A detergens jelenlétében elvégzett akarbóz gátlásvizsgálat adatai nem mutatnak eltérést az alábbi V10. ábrán látható módon.

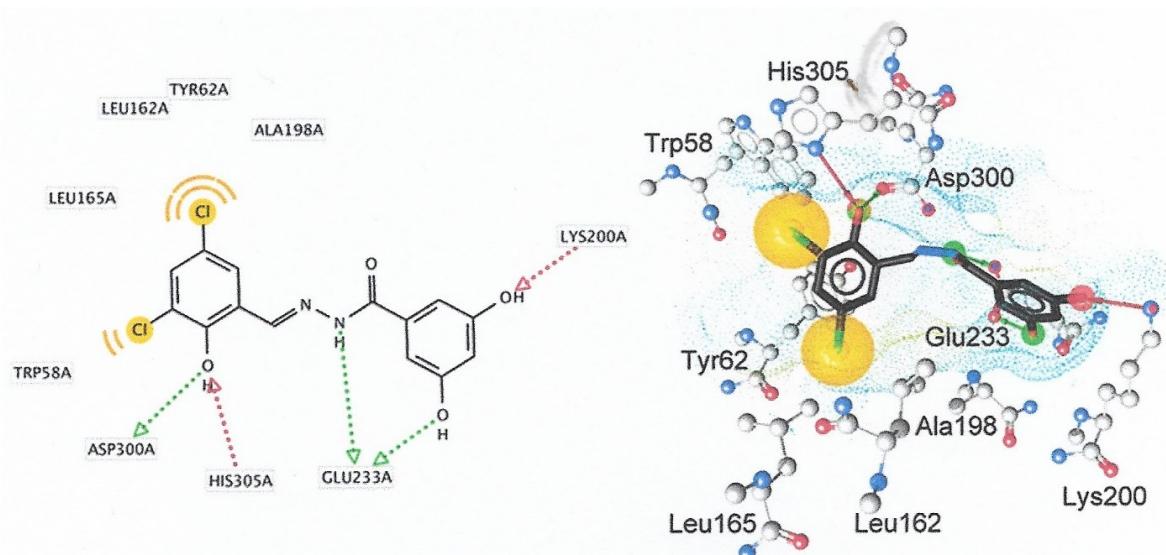


V10. ábra Akarbóz gátló hatásának koncentrációfüggése PPAenzim és GalG<sub>2</sub>CNP szubsztrát reakciójában 0,01% TritonX-100 nem ionos detergens jelenlétében (zöld) és távollétében (piros).

p79, 14. tabl.: A gyógyszerkémiai tesztek a kismolekulás találatok és keményítő esetén magas mikromólos IC<sub>50</sub>-et mutattak, ami sajnos nem ad jó kiindulópontokat egy kismolekulás fejlesztéshez. Egyrészt a korábbi vizsgálataik azt mutatták, hogy több alkotóhely együttes működése képes kialakítani a megfelelő kölcsönhatást az enzimekkel. Ezzel összhangban a referencia akarbóz is nagyobb molekula. Valószínűsíthető, hogy az enzim nagyfelületre kiterjedő, de sekély kötőhellyel rendelkezik. Lehetséges az, hogy a talált kismolekulák különböző alkotóhelyekkel hatnak kölcsön és fragmens-alapu ligálásuk jó inhibitorhoz vezetne?

Az inhibitorok bizonyuló kismolekulák közül néhányal végeztek dokkolási kísérleteket, például a dolgozat 53. ábráján látható **2** és az 54. ábra **12** vegyületével, amelyek méréseink szerint kompetitív gátlószerrek. Ezzel összhangban a dokkolás az aktív helyen való kötődést megerősítette. Ezek az inhibitorok az aktív hely –2 –1 +1 régiójában a katalitikus aminosavak (Glu 233 és Asp300) mellett főként aromás (Tyr151 és Trp58 vagy Trp59) és alifás apoláris aminosav oldalláncokkal alakítanak ki kölcsönhatást, amint az alábbi ábrán látható (V11. ábra).





V11. ábra A dolgozatban található 2 (felül) és 12 (alul) vegyületek illeszkedése a HPA (PDB 3OLE) aktív centrumába. A nyilak hidrogén híd, a sárga körök hidrofób kölcsönhatásokat jeleznek. (hivatkozás a dolgozatban 145,146).

Valamennyi vizsgált kismolekula úgy lett kiválasztva, hogy az enzim modell aktív centrumába való illeszkedését vizsgálták, tehát a molekulák részletei azonos alhelyek környezetével tudnak kölcsönhatásba lépni. Az ábra alapján szerintem nem a kismolekulák fragmens alapú ligálása eredményezhet jobb inhibítort, hanem inkább ezeknek a molekuláknak a “hosszabbítása” cukor egységekkel. Erre a molekulákon található hidroxil csoportok lehetőséget biztosítanak. Az elnyújtott árok jellegű aktív hely további glikon (-3 -4) és aglikon (+2 +3) alhelyein ugyanis a glükóz egységek bizonyítottan jól kötődnek (ld. a V11. ábrán a piros jelölést). Így akár a 2 vegyület C gyűrűjének hidroxil csoportját maltózzal glikozilezve, vagy az A gyűrűn levő hidroxilhoz maltózt kapcsolva várhatóan hatékonyabb inhibítort kapnánk. Bár az aromás gyűrű elektronszívó hatása miatt a fenolos OH-t nem könnyű glikozilezni, de számos példa található ilyen típusú szintézisekre (pl. Márten Jacobsson, Jesper Malmberg, Ulf Ellervik, Aromatic O-glycosylation, Carbohydr. Res., 341, (2006) 1266-1281.).

Korábban tettünk kísérletet arra, hogy az  $\alpha$ -amilázon gyenge inhibitornak bizonyuló glükopiranozilidén-spiro-tiohodantoin (GTH) vegyülethez pseudo-oligoszacharid egységet kapcsolva jobb inhibítort állítsunk elő enzimatisz szintézissel (95 hivatkozás a dolgozatban). Donorként akarbózt használtunk. A keletkező vegyület jobb inhibitor lett, mint a kiindulási GTH - tehát a kötődése javult az aktív helyhez, de rosszabb, mint az akarbóz. Tulajdonképpen az akarbóz gátló hatását sikerült lerontani a glükóz GTH-ra való cserélésével.

Debrecen, 2025. 01.08.

*Gyémánt Gyöngyi*  
Dr. Gyémánt Gyöngyi