

## VÁLASZ

**Dr. Poppe Lászlónak**

„SZÉNHIDRÁTOKON AKTÍV ENZIMEK SZERKEZETE, AKTIVITÁSA ÉS GÁTLÁSA”  
című

az MTA doktora fokozat elnyerésére benyújtott értekezésem bírálatára

Az értekezéssel kapcsolatban feltett kérdések megválaszolása előtt szeretném megköszönni Prof. Dr. Poppe Lászlónak az értekezésem alapos áttanulmányozását, a bírálat elkészítését és az értekezésben összefoglalt eredmények elismerését.

Apróbb formai észrevételek az értekezéssel kapcsolatban:

Az atomtípusokra utaló rövidítések dőltek: pl. 5. oldal: ... *N*-acetil ..., 6. oldal ... *O*-glikozidázok ...

*N*-glikozidázok ... *S*-glikozidázok ... és későbbi esetek;

Az 1. ábra, 2. ábra esetében saját készítésű, jobb felbontású ábrák elegánsabbak lettek volna, az 1. ábra félig kitakart magyarázata sem elegáns;

Kicsit elnagyolt a hivatkozások formázása, pl. a 45. hivatkozás címében „*A*-Amylase ...”, az „*α*-Amylase ...” helyett.

A bírálónak a dolgozattal kapcsolatos formai kritikai megjegyzéseit elfogadom.

A bírálatban megfogalmazott kérdésekre azok sorrendjében válaszolok.

1. A prokarióta és eukarióta eredetű enzimek közt jelentős eltérést okoz(hat) az eukarióta enzimek nagyobb fokú poszttranszlációs módosulása (pl. nagyobb fokú glikoziláltság). Van-e valamilyen információ erről a vizsgált *α*-amilázok (és további enzimek) esetében? (Ennek lehet jelentősége abban az esetben, ha a vizsgálatokhoz felhasznált enzim rekombináns bakteriális expressziós eredetű).

Az eukarióta eredetű enzimek közül növényi (árpa), rovar (burgonyabogár), és emlős (sertés pankréász, humán nyál) enzimeket vizsgáltunk. Ezeknek az enzimeknek a poszttranszlációs módosításáról (PTM) több információ is elérhető. Árpa eredetű *α*-amiláz enzim esetében már a kilencvenes években vizsgálták a PTM hatását, és proteolitikus hasítást tapasztaltak<sup>1</sup>.

Együttműködő partnereink részletesen vizsgálták a sör és whisky gyártásban alkalmazott, élesztőben kifejezett árpa eredetű *α*-amiláz PTM-t. A szignál peptid hasításán túl, C terminális ArgSer hasítást, Ser-glutationilezést és *O*-glikozilációt (Man<sub>2</sub>) írtak le<sup>2</sup>.

A korábbi szerkezeti vizsgálatok szerint a HPA esetében az N terminális glutamin pirrolidon származékká alakulása stabilizálja az enzimet egyes emésztő enzimekkel szemben<sup>3</sup>.

A humán amiláz enzimek C terminális régiója két potenciális N glikozilezési helyet tartalmaz (N427 és N476). Különböző tenyésztett emlős sejtekben (HEK293, COS-7, CHO és KLM-1) kifejezett HSA és HPA esetében is vizsgálták a glikozilációt<sup>4</sup>. Általánosságban elmondható, hogy a nyál-*α*-amiláz gyakrabban glikozilálódott, mint a hasnyálmirigy-*α*-amiláz. (Ez a humán szervezetben is így van, bár a nyálban található endoglikozidáz enzim (ENGáz) később deglikozilezi a szekretált amiláz egy részét. Ez azt jelenti, hogy az amiláz aktív marad glikozilálatlan formában is.) Azt találták, hogy nem volt jelentős változás a glikozilált molekulák arányában az ugyanazon tenyésztett sejtek által termelt izoenzimek (HSA, HPA) között. Megállapították, hogy az *α*-amiláz glikozilációját inkább az enzimet termelő sejt típusa befolyásolja. Elemezték az N-glikozilációs helyek glikozilációs hatékonyságát, és 3- 50 % glikozilációt figyeltek meg, ami gyakrabban következik be a N476 pozícióban. Emiatt feltételezték, hogy az *α*-amiláz glikoziláció nélkül is megfelelő konformációjú és aktív, amit

később kísérletesen is igazoltak. Bár még mindig nem teljesen tisztázott, mi a glikoziláció célja ezeknél az enzimeknél, összességében úgy tűnik inkább a szekrécióban van szerepe, mint az aktivitásban.

A kristályszerkezeti és aktivitás vizsgálatokhoz *Pichia pastoris*-ban kifejezett, tisztított HPA enzimet a vizsgálatok előtt endoglikozidáz F enzimmel deglikozilezték<sup>5</sup>. Ezzel a protokollal állították elő a PDB adatbázisban elérhető legtöbb  $\alpha$ -amilázt a szerkezetvizsgálathoz, kihasználva a glikozilálatlan fehérjék jobb kristályosodási hajlamát.

## 2. Mennyire stabilak ezek az enzimek a termékeloszlási vizsgálatok során? Befolyásolhatja-e az eredményeket inaktíválódott, ám kötésre még képes formák jelenléte?

Az  $\alpha$ -amiláz enzimek egyik nagy előnye, hogy kellően robusztusak, stabilak így hosszú ideig nem veszítik el aktivitásukat szobahőn sem, de az oldatban való tárolás 5 °C hőmérsékleten akár hetekig is aktivitás csökkenés nélkül megvalósítható. Jól tűrik a fagyasztás felolvasztás ciklusokat is, így az enzim oldat hosszabb ideig használható. A bontási képet nem befolyásolja, ha inaktív, de a szubsztrátot megkötő forma van jelen, hiszen a produktív ES komplexek termékarányát határozzuk meg és ilyen szempontból mindegy, hogy a komplex azért inaktív mert a szubsztrát kötődéskor nem fedi át az aktív, hasító helyet, vagy azért, mert az enzim maga nem aktív.

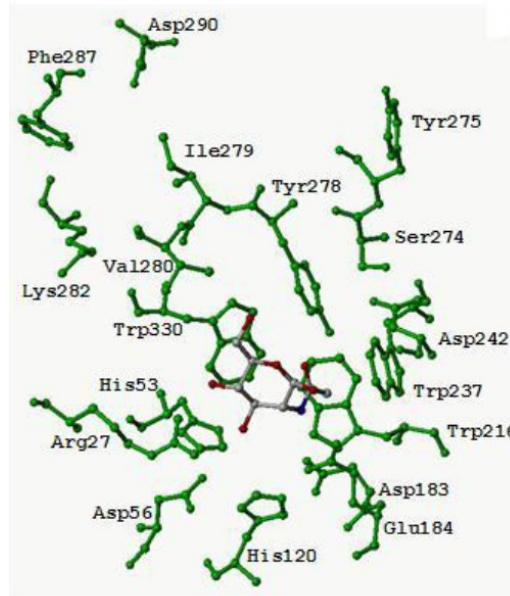
A Dispersin B enzimről idén jelent meg egy összefoglaló jellegű munka<sup>6</sup>, ami az enzim 2003-ban történt leírása óta elvégzett kutatásokat és a kapott eredményeket összegzi. (Ebben három közleményünket hivatkozzák.) Már a kezdeti vizsgálatok során kiderült, hogy a vad típusú és a *E. coli*-ban kifejezett rekombináns, hexahisztidin jelölt tartalmazó enzim is stabil szilárd és oldat formában is. Újabb vizsgálatok szerint az enzim szilárd fázishoz rögzítése még növelheti is a stabilitást és az aktivitást. Ez teszi lehetővé alkalmazását bakteriális biofilmek eltávolítására gyógyászati eszközökről, illetve használatát olyan felületek kialakítására beépített eszközökön, melyeken nem képződik biofilm. Poliuretán és teflon katétereken kialakított bevonatok 4 °C-on egy hónapos tárolás után is aktívak maradtak.

## 3. A saját munkák harmadik alfejezetében először bemutatja, hogy a 2-klór-4-nitrofenil (CNP) jelölő funkció a nyúl vázizom eredetű glikogén foszforiláz (rmGFb) vizsgálatához felhasznált oligomer szubsztrátok esetében szubsztrát gátlást okozhat. Ezek után ismerteti a CNP jelölő funkcióval ellátott oligomerek felhasználását $\alpha$ -amiláz HPLC-alapú aktivitásmérésen alapuló kinetikai és gátlási vizsgálatokra. Itt nem számít a módosító? Mennyire vizsgálták?

A dolgozat 8. ábrája mutatja a szabad és PNP-glikozid maltooligomerek bontási képe alapján készült  $\alpha$ -amiláz alhely térképet (ezek a mérések még a PhD dolgozatomban szerepeltek), ami alapján látható, hogy nincs eltérés az alhely szerkezetben, és a bontási képben a kromofor csoport jelenléte miatt. A szubsztrát gátlás a rmGP esetében 7 mM szubsztrát koncentráció felett jelentkezik (42. ábra a dolgozatban), illetve 5 mg/ml koncentráció felett HSA és PPA enzimeken a kék keményítő esetén (40. ábra). Bontási kép és kinetikai méréseinket 1 mM vagy még kisebb (0,1 mM) koncentráció mellett végeztük, ahol a szubsztrát gátlás nem játszik szerepet.

Bár a Dispersin B enzim esetében is történtek vizsgálatok kromofort nem tartalmazó szubsztráttal, ebben az esetben csak a polimer hasításának termékeit azonosították. Az *E. coli*-ban túltermeltetett poli-N-acetil-glükózamint (PNG) tisztították és használták szubsztrátként. 16 órás hidrolízis után VRK-val és MALDI-TOF MS módszerrel azonosították a termékeket.

Ezek alapján monomer, dimer termékek is kimutathatók voltak, de oligomer (9-23 tagszámú) termékeket is azonosítottak, így nem lehetett eldönteni, hogy *endo*-, vagy *exo*- hatásmódú enzimről van szó. Természetesen ebben az esetben nem tudtuk azt megállapítani, hogy van-e hatása a bontásra a szubsztráton levő kromofor csoportnak. Ismerve a DspB aktív hely szerkezetét, amiben számos aromás aminosav található (ld VI. ábra), nem lenne meglepő, ha lehetne ilyen hatást kimutatni.



VI. ábra Aromás aminosavak elhelyezkedése a DispersinB aktív centrumában (1YHT szerkezet alapján)

4. A gátlószerek vizsgálataiban során több esetben is alkalmaztak nagyméretű, viszonylag flexibilis ligandumokat. Mennyire érvényesül a Koschland féle indukált illeszkedés ezeknél az enzimeknél és hogyan kezelték az enzimet a dokkolások során? Saját tapasztalat alapján nagyobb konformációs teret fed le nagy és flexibilis ligandumok dokkolása esetén az eljárás, ha több kiinduló konformációból, több dokkolási sorozat készül. Az értekezésben bemutatott esetekben hogyan jártak el (ez inkább az értelmező munka, mint a virtuális szűrés esetén fontos)?

A dolgozatban szereplő kutatások közül két olyan téma volt, ahol a kísérletes munkát számításokkal egészítettük ki. Az egyik esetében a berlini egyetem (Freie University of Berlin) Jeremier Mortier vezette kutatócsoportja *in silico* számításokkal választotta ki a tesztelésre érdemesnek vélt molekulákat. A biológiai hatásvizsgálat után ellenőrizték a hatékonyság bizonyult molekulák illeszkedését a HPA szerkezetébe (PDB kód 3OLE) GOLD 5.1 alkalmazásával, amiben az acarviostatin II03 inhibitor aktív helyen való elhelyezkedését is felhasználták. A tesztelés során a konformációkat minimalizálási művelet után (LigandScut 3.1 MMFF94 erőter) analizálták, minden vegyülethez 100 dokkoló pozíciót generáltak.

A másik esetben az  $\alpha$ -amilázok alhely térkép számításait szerettük volna modellezéssel megvalósítani a kísérletes bontási kép adatok helyett, felhasználva az ismert kristályszerkezeti adatokat és saját korábbi alhely térképeinket (PPA, HSA, BLA, AMY1). Ebben az esetben az enzim-szubsztrát komplexek felépítéséhez, azaz a szubsztrát aktív helyre történő illesztéséhez nem dokkolási eljárásokat alkalmaztunk, hanem a kutatások időpontjában elérhető kristályszerkezeti adatokat használtuk fel. A maltooligoszacharid szubsztrát szerkezetét és illeszkedését szubsztrát és inhibitor (akarbóz) molekulák ismert szerkezete alapján modelleztük, egy katalitikusan inaktív AMY1 enzim maltoheptaózzal alkotott komplex

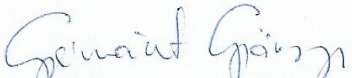
kristályszerkezete alapján (1RP8.pdb). A kísérletes módszerekkel meghatározott kötődési mód alapján történő modell-építést megbízhatóbbnak ítéltük, mint dokkolási módszerek használatát. Azért is alkalmaztunk minimalizálási eljárást, hogy a felépített szubsztrát esetében az esetlegesen kedvezőtlen konformációs állapotokat finomítsuk. Az enzim esetében a mutációk bevezetése után is végeztünk minimalizálást az oldalláncok konformációjának optimalizálása érdekében. Ezt megkötésekkel végeztük (a mutáció környezetére korlátozva), azonban a későbbi számítások során ezeket a megkötéseket már nem alkalmaztuk. Bár az indukált illeszkedés modellt használják inhibitor jelöltek dokkolásánál, de mi ilyen jellegű modelleket nem vettünk figyelembe. Ezekben a számításokban egy modell rendszert hoztunk létre, abban az értelemben, hogy az enzimek egy oligoszachariddal alkotnak komplexet, holott az alfa-amilázok természetes szubsztrátjai általában ennél hosszabb poliszacharidok. A vizsgálatainkat az aktív helyvel közvetlenül kölcsönható glükóz egységekre korlátoztuk, hiszen ezek vizsgálatára alkalmas a SUMA program is. Természetesen nem zárható ki, hogy a hosszabb szubsztrátokkal végzett számítások esetében a szubsztrát flexibilitása miatti konformációváltozások hatással lehetnek a glükóz egységek kötődésére az aktív hely „szélső” alhelyein (pl. az AMY1 esetében a felszín felé nyitottabb -7 és -6 glikon kötőhelyeken). A jelentősebb konformációváltozások ilyen jellegű vizsgálatához az általunk is használt számítási rendszer már nem lenne elegendő, nagyobb kapacitások és molekuladinamikai számítások alkalmazását tenné szükségessé. A kutatások időpontjában (2011) csupán korlátozott számításos kapacitás állt rendelkezésünkre, így már ezeknek az egyszerűbb számításoknak az elvégzése is relatíve sok időt vett igénybe.

A hosszabb szubsztrátokkal alkotott komplexek vizsgálata választ adhat további kérdésekre is. Például kideríthető lenne, hogy a másodlagos kötőhelyek hogyan járulnak hozzá a szubsztrát flexibilitásának csökkentéséhez, és ezt a szerepüket hogyan befolyásolják a másodlagos kötőhelyet érintő mutációk. A hosszabb molekuladinamikai szimulációk pedig lehetőséget adnának annak meghatározására, hogy a másodlagos kötőhely-mutációknak van-e olyan távoli hatása, amely hatással lehet az aktív helyen lévő alhelyekre.

#### Hivatkozások

1. Sticher L, Jones RL. alpha-Amylase Isoforms are Posttranslationally Modified in the Endomembrane System of the Barley Aleurone Layer. *Plant Physiol.* 98 (1992) 1080-6. doi: 10.1104/pp.98.3.1080.
2. Søgaard, M., Andersen, J., Roepstorff, P. *et al.* Electrospray Mass Spectrometry Characterization of Post-Translational Modifications of Barley  $\alpha$ -Amylase 1 Produced in Yeast. *Nat Biotechnol* 11, (1993) 1162–1165. <https://doi.org/10.1038/nbt1093-1162>
3. Brayer GD, Luo Y, Withers SG. The structure of human pancreatic alpha-amylase at 1.8 Å resolution and comparisons with related enzymes. *Protein Sci.* 4 (1995) 1730-42. doi: 10.1002/pro.5560040908.
4. Takashima, S. and Amano, J. Glycosylation and secretion of human  $\alpha$ -amylases. *Advances in Biological Chemistry*, 2 (2012) 10-19. doi: 10.4236/abc.2012.21002.
5. Brayer, G. D., Sidhu, G., Maurus, R., Rydberg, E. H., Braun, C., Wang, Y., ... Withers, S. G.). Subsite Mapping of the Human Pancreatic  $\alpha$ -Amylase Active Site through Structural, Kinetic, and Mutagenesis Techniques. *Biochemistry*, 39 (2000), 4778–4791. doi:10.1021/bi9921182
6. Kaplan, J.B.; Sukhishvili, S.A.; Sailer, M.; Kridin, K.; Ramasubbu, N. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Dispersin B: The Quintessential Antibiofilm Enzyme. *Pathogens*, 13 (2024) 668. <https://doi.org/10.3390/pathogens13080668>

Debrecen, 2025. 01.08.

  
Dr. Gyémánt Gyöngyi