

GYÉMÁNT GYÖNGYI

**SZÉNHIDRÁTOKON AKTÍV ENZIMEK SZERKEZETE,
AKTIVITÁSA ÉS GÁTLÁSA**

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Debrecen 2023

Rövidítések jegyzéke

Aa	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
AMY1,	
AMY2	árpa α -amiláz izoenzimek
Amy3D	rizs α -amiláz izoenzim
AR	aldóz redukáz enzim
BAA	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> α -amiláz
BLA	<i>Bacillus licheniformis</i> α -amiláz
BnlG7PNP	4,6-benzilidén- 4-nitrofenil- β -maltoheptaozid
BSMA	<i>Bacillus stearothermophilus</i> maltogén α -amiláz
CGTáz	Ciklodextrin-glikozil-transzferáz enzim
CNP	2-klór-4-nitrofenil
DspB	DispersinB enzim
EC	Enzyme Commission – Nemzetközi Enzim Bizottság
ESI MS	Electrospray ionization mass spectrometry – elektroporlasztásos tömegspektrometria
G	glükóz
G-1-P	glükóz-1-foszfát
GalG2CNP	2-klór-4-nitrofenil galaktopiranozil-maltozid
GF	glikogén foszforiláz
GH	glikozid hidroláz enzimcsalád
GlcNAc	N-acetil-glükózamin
GT	glikoziltranszferáz enzimcsalád
HPLC	High performance liquid chromatography- nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia
HSA	humán nyál α -amiláz
ITC	isotermikus titrálási kalorimetria
LdAmy	<i>Leptinotarsa decemlineata</i> α -amiláz
MALDI	mátrix segített lézer deszorpciós ionizáció
MeCN	acetonitril
MUB	metil-umbelliferril
NAD	nikotinsavamid adenin dinukleotid
NMR	magmágneses rezonancia spektroszkópia
PDB	Protein Data Bank - fehérje szerkezeti adatbázis
Ph	fenil
PNP	4-nitrofenil
PPA	sertés pankréász α -amiláz
PTP1B	protein tirozin foszfatáz enzim
SBS1	másodlagos szubsztrátkötő hely
SBS2	másodlagos szubsztrátkötő hely
SUMA	SUbsite Mapping of Amylases - program alhelytérkép számításához
TAA	<i>Aspergillus oryzae</i> α -amiláz
TIM	trióz-foszfát izomeráz enzim
TOF	Repülési idő analizátor

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés, célkitűzés	3
2. Irodalmi áttekintés, előzmények	5
2.1. Szénhidráton ható enzimek – CAZy (Carbohydrate Active enZyme) adatbázis	5
2.2. Glikozid-hidrolázok, a szénhidráton ható enzimek legnagyobb családja	6
2.3. Szénhidrát átalakító enzimek aktív helyének topológiája	8
2.4. A vizsgált enzimek biológiai funkciója, szerkezete, csoportosítása	10
2.5. Alhely térkép az enzimek aktív hely szerkezetének jellemzésére	14
3. Vizsgálati módszerek	21
4. Tudományos eredmények	22
4.1. Poliszacharid hidrolázok szerkezetének felderítése	22
4.1.1. Árpa amiláz izoenzimek és AMY1 mutánsok	22
4.1.2. Egy rovar eredetű α -amiláz enzim - LdAmy	28
4.1.3. Édesburgonya eredetű β -amiláz enzim	37
4.1.4. Egy oldható β -N-acetil-glükózaminidáz: a DispersinB enzim	43
4.2. Enzim katalizálta szintézisek	53
4.2.1. Transzglikozilezés árpa α -amiláz mutáns enzimekkel	53
4.2.2. Rovar enzim transzferáz aktivitásának vizsgálata	56
4.3. Glikoenzimek új aktivitásmérési módszerei	58
4.3.1. α -Amiláz aktivitásmérés ITC módszerrel	59
4.3.2. Vizsgálatok kék keményítő szubsztráttal	62
4.3.3. Glikogén foszforiláz enzim aktivitásmérése ITC módszerrel	63
4.3.4. HPLC módszer α -amiláz aktivitásmérésre	67
4.4. α -Amilázok gátlásának vizsgálata	68
4.4.1. Tanninok promiszkuitása	69
4.4.2. Természetes amiláz gátlók felkutatása	72
4.4.3. Modellezéssel kiválasztott „drug-like” inhibitorok	76
5. Összefoglalás	83
6. Irodalomjegyzék	86

1. Bevezetés, célkitűzés

A Földön található természetes szerves vegyületek közül a szénhidrátok fordulnak elő legnagyobb mennyiségben, és az elmúlt évtizedek kutatásai rámutattak, hogy kulcsfontosságúak a biológiai folyamatokban. A monoszacharidok nagy sztereokémiai változatosságuk miatt olyan sokféle módon kapcsolódhatnak, hogy egy redukáló hexaszacharidnak már több mint 10^{12} lehetséges izomerje írható fel [1]. Az élő szervezetek ezt a sokféleséget úgy hasznosítják, hogy oligoszacharidokat és poliszacharidokat használnak számos biológiai funkcióhoz, a tárolástól a nagyon specifikus jelátviteli szerepekig. A glikozidos kötések szelektív hidrolízise ezért döntő fontosságú az energiafelvétel, a sejtfal növekedése és lebomlása, valamint a sejtfelszíni antigének felépítése szempontjából. A szacharidok sokféleségének köszönhetően a glikozidos kötések hidrolizáló enzimek, az O-glikozil-hidrolázok (EC 3.2.1.x) között is nagy a változatosság. A szénhidrátok között a cellulóz és a keményítő a két leggyakrabban előforduló poliszacharid. Mindkettő ipari jelentőséggel bír és a metabolizmusukban résztvevő enzimek tanulmányozása egyre nagyobb teret hódít. A poliszacharidokat bontó enzimek sorába tartoznak az α -amilázok, amelyek a keményítő α -(1-4) glikozidos kötéseit képesek hidrolizálni. Megtalálhatók mikroorganizmusokban, növényekben és állati szervezetekben egyaránt és lényeges szerepet töltenek be a szénhidrát anyagcserében. A bakteriális és növényi eredetű amilázok ipari szempontból is fontosak. Egyrészt a sörgyártás egyik kulcslépése, a maláta előállítása évezredek óta az árpa csírázása közben termelődő α -amiláz izoenzimek részvételével zajlik. Másrészt a keményítő ipari méretű bontásában (maltóz, glükóz szirup előállítás) kulcsszerepet játszanak a hőstabil bakteriális eredetű amilázok, köztük a *Bacillus licheniformis* α -amiláz (BLA), melynek vizsgálatával PhD munkámban foglalkoztam. Emlősökben az α -amiláz enzimet külső elválasztású mirigyek termelik (nyál- és hasnyálmirigy) és ezek az enzimek a táplálékban található keményítő és a glikogén emésztésében játszanak szerepet. A nyálmirigyek által termelt humán nyál α -amiláz (HSA) több funkciós enzim, hiszen a keményítő szubsztrát mellett a fogzománchoz és számos szájban előforduló baktériumhoz képes kötődni. Ily módon részt vesz a fogakon képződő biofilm, a plakk kialakításában és fogszuvasodás kifejlődésében is. A humán α -amiláz enzimek célpontjai lehetnek különböző anyagcsere betegségek (diabétesz, kövérség/elhízás és hiperlipémia) kezelésének. Az enzimek működési módjának, aktív hely szerkezetének megismerése alapvető fontosságú akár ipari

felhasználás, akár gátlás a célunk. A keményítő megkötődése az amiláz enzim felületén található aktív helyen történik. A szubsztrátkötő hely több alhelyből áll, amelyek mindegyike kölcsönhatást létesít a szubsztrát glükóz egységeivel. Bár néhány amiláz enzim röntgenkristallográfiás szerkezete régebb óta ismert, de ez a terület kutatásaink kezdetén még nagyrészt feltáratlan volt. A különböző eredetű amilázok aktív helye eltérést mutat az alhelyek számában és a kölcsönhatások mértékében. A több mint huszonöt éve megkezdett kutatás célja ismeretlen kötőhelyű amilázok aktív centrumának jellemzése volt. Az aktív helyek szerkezetének felderítéséhez meg kellett oldani a vizsgálatokhoz nélkülözhetetlen, 2-klór-4-nitrofenil (CNP) glükozidokból álló szubsztrát sorozat szintézisét. Ehhez a a ciklodextrinekből kiinduló kémiai módszer [2] kiegészítésére megvalósítottuk a 3-12 tagszámú szubsztrátok kemoenzimátikus előállítását [3,4]. Ezen szubsztrátokkal történtek a HSA és a BLA első bontási kép meghatározásai HPLC módszerrel, ami PhD dolgozatom központi részét képezte [5,6]. A kutatások folytatása során kapott eredményeket foglalom össze jelen dolgozatomban.

Már a bontási képek alapján is következtetések vonhatók le a kötőhely szerkezetéről, az alhelyek számáról és a kölcsönhatások mértékéről. Az alhely és a szubsztrát monomer egysége közötti kölcsönhatásoknak a számszerűsítése az alhely térkép [7]. Elkészítése során egy olyan diagramot hozunk létre, ami szemléletesen mutatja a kötőhelyek energia eloszlását és így megfoghatóvá teszi az enzim-szubsztrát kapcsolatot. Kiegészíti, vagy helyettesítheti a röntgendiffrakciós méréseket, hiszen a megfelelő szubsztrát sorozat birtokában egyszerűen kivitelezhető, és az alhely-szubsztrát monomer egység közötti kötési energiáról is információt ad. Az értekezésben bemutatom az alhely térképezés folyamatát, a számítások megkönnyítésére készült programot és a különböző eredetű α -amiláz enzimek és mutánsaik vizsgálatával elért eredményeinket. Az *endo* hatásmechanizmusú α -amilázok mellett néhány *exo* enzim aktív helyét is sikerült jellemezni a megfelelő oligoszacharid szubsztrátokon végzett aktivitás mérések és bontási kép vizsgálatok segítségével. Az α -amiláz enzimek vizsgálata nem csak az alhely térképek meghatározására korlátozódott. Kísérleteket végeztünk amiláz enzimek szintézisre való felhasználására és vizsgáltuk számos természetes és szintetikus vegyület glikoenzimekre gyakorolt gátló hatását is, a későbbi esetleges terápiás felhasználást célozva. Ezen a területen elért eredményeinkből PhD fokozatom megszerzése után 36 nemzetközi folyóiratban megjelent közlemény született, amiből a 2006 után megjelent 26 anyaga került be a dolgozatba.

2. Irodalmi áttekintés, előzmények

2.1. Szénhidrátan ható enzimek – CAZy (Carbohydrate Active enZyme) adatbázis

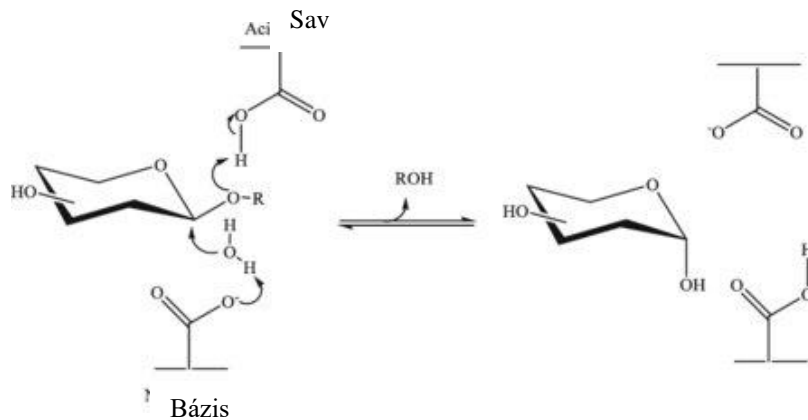
Az ismert enzimek számának exponenciális növekedése szükségszerűen magával hozta az igényt olyan adatbázisok felépítésére, amiben bizonyos rendszer szerint csoportosítva található az enzimek. A CAZy adatbázis eredeti célja az volt, hogy megpróbálja összefoglalni az összes szénhidrát-aktív enzimet és felhasználhatóvá tegye az adatokat a glikotudományok kémiai vagy biológiai részterületein dolgozó kutatók számára [8]. Ehhez alapul olyan csoportosítást választottak, ami a szerkezeti jellemzőket veszi elsősorban figyelembe. A szénhidrátokat lebontó, módosító vagy glikozidos kötéseket létrehozó enzimek katalitikus és szénhidrátkötő moduljainak szerkezetileg rokon családjaikat hozták létre egy dinamikus, on-line elérhető felületen. Az adatbázison belül elkülönülnek a glikozid hidrolázok (GH), a glikozil-transzferázok (GT) a poliszacharid liázok (PLs), a szénhidrát észterázok (CEs) és a kiegészítő aktivitások (AAs). A GH enzimek közé tartozó α -amilázok a GH13 családba tartoznak, együtt néhány, az EC besorolás szerint nem hidroláz enzimmel, mint pl. a trehalóz szintáz (EC 5.4.99.16) vagy a szukróz foszforiláz (EC 2.4.1.7). A GT enzimek közé elsősorban a glikozidos kötéseket létrehozó enzimek kerültek, de itt található a glikogén foszforiláz is (GT35), ami a glikogén lebontásáért felelős a sejtekben. Az enzim a nem-Leloir transzferázokhoz tartozik, hiszen cukor-foszfát donorról helyez át monoszacharid egységet alkoholos hidroxil csoportra egy megfordítható reakcióban. Fiziológiai körülmények között ez a reakció a lebontás irányában zajlik, vagyis a glikogénről lehasadó glükózhoz kötődik szervesen foszfát glükóz-1-foszfátot eredményezve.

Mivel a fehérjék feltekeredése (folding) jobban konzervált, mint a szekvenciáik, néhány családot „klánokba” soroltak, miután kiderült, hogy vannak olyan szekvenciák melyek egynél több családhoz kapcsolódnak, és a szerkezeti meghatározások a különböző családok tagjai közötti hasonlóságot mutattak. A „klán” olyan családok csoportja, amelyek harmadlagos szerkezetükben, katalitikus oldalláncaikban és mechanizmusukban jelentős hasonlóságot mutatnak. Valószínűleg a klánokon belüli családok közös evolúciós felmenőkkel rendelkeznek. Az amilázok a GH-H klánba tartoznak a GH70 és GH77 családba tartozó szukráz és transzferáz enzimekkel együtt. Az adatbázis az enzimek rendszerezésén túl összefoglalja az eddig megismert mechanizmusokat, és az elmúlt években fontos kiindulási pontjává vált a szerkezeti kutatásoknak.

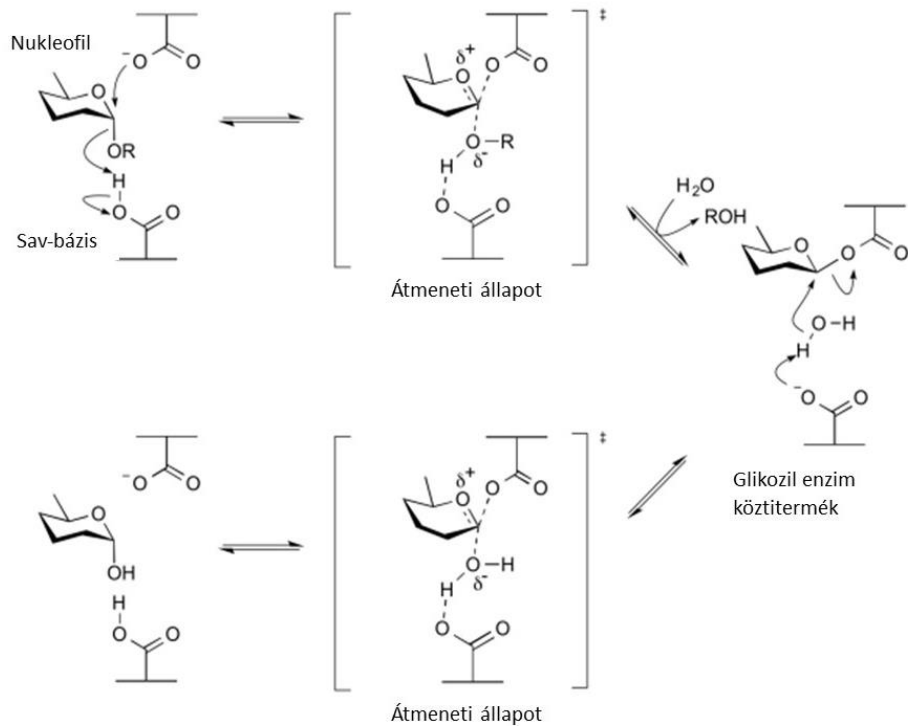
2.2. Glikozid-hidrolázok, a szénhidrátan ható enzimek legnagyobb családja

A poli- és oligoszacharidok szerkezeti sokféleségük miatt központi szerepet töltenek be a tartalék és szerkezeti anyagok felépítésében és hasznosításában, a sejt-sejt jelátvitelben, és a vírusinvázióban. Ennek köszönhetően a glikozid-hidrolázok, a di-, oligo- és poliszacharidok glikozidos kötéseit hidrolizáló enzimek, minden élő szervezetben megtalálhatók [9]. A glikozid-hidrolázok katalizálta hidrolízis cukor-hemiacetál vagy hemiketál és a megfelelő szabad aglikon (ami szintén lehet cukor) képződését eredményezi. A glikozid-hidrolázokat glikozidázoknak, és néha glikozil-hidrolázoknak is nevezik.

A glikozidos kötés enzimátikus hidrolízise általános sav katalízissel történik, amelyhez két kritikus csoport szükséges: egy proton donor és egy nukleofil/bázis. Ez a hidrolízis Koshland szerint két fő mechanizmuson keresztül megy végbe, amelyek az anomer konfiguráció teljes megfordítását-inverzió (1. ábra) vagy megtartását-retenció (2. ábra) eredményezik [10]. Később számos érdekes változatot találtak ezekre a mechanizmusokra vonatkozóan, és az elmúlt években egy alapvetően eltérő mechanizmust is felfedeztek, amely NADH kofaktort használ.

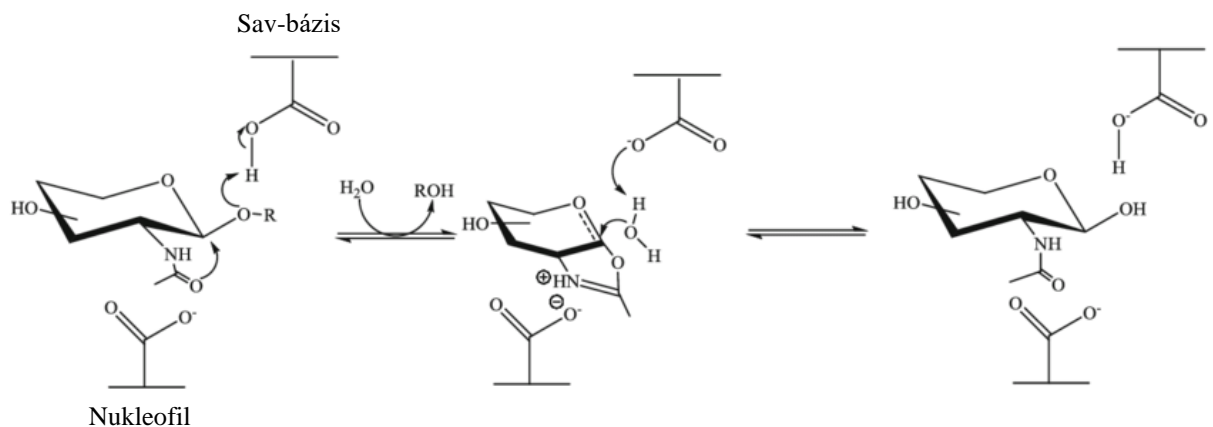


1. **ábra** Béta-glikozidáz enzimek katalizálta hidrolízis az anomer konfiguráció megváltozását eredményező mechanizmusa [11]



2. **ábra** Alfa-glikozidáz enzim katalizálta hidrolízis az anomer konfiguráció megtartását eredményező mechanizmusa [12]

Az anomer konfigurációt megtartó mechanizmus egyik változata a szubsztrát glikozidos kötés melletti csoportjának részvételével zajló katalitikus folyamat. Ebben nem glikozil-enzim átmeneti termék keletkezik, hanem a szubsztrát N-acetil csoportja alakul át oxazolin átmeneti terméké, amiből hidrolízissel keletkezik a végtermék. A karboxil csoport ebben az esetben átmeneti állapot stabilizálóként funkcionál (3. ábra).



3. **ábra** Béta-glikozidáz enzimek katalizálta hidrolízis szomszédcsoporthoz tartozó részvételével zajló, az anomer konfiguráció megtartását eredményező mechanizmusa [13]

A katalitikus mechanizmusban előforduló különbségek mellett a glikozid-hidrolázok más szempontok szerint is csoportosíthatók.

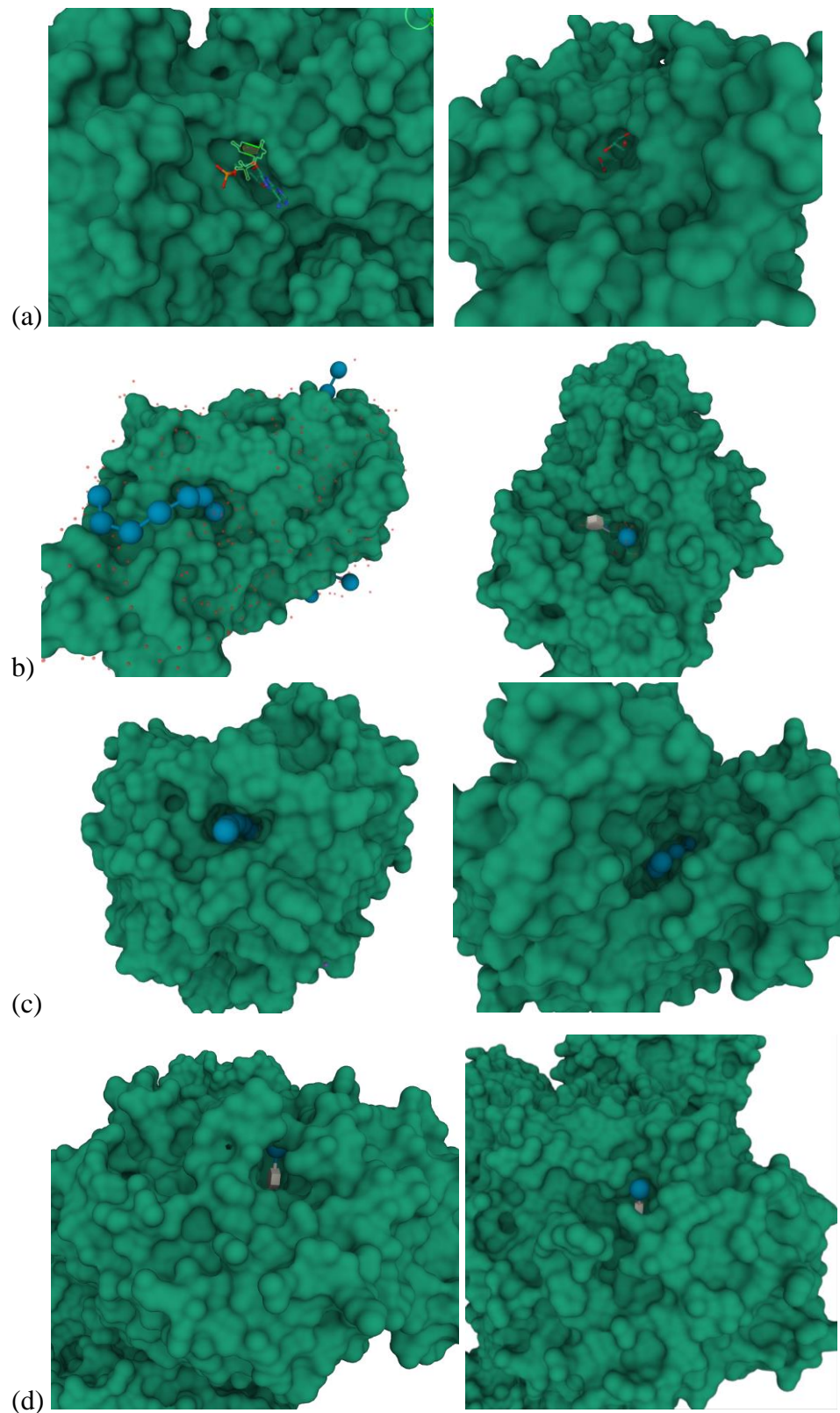
Az enzimek besorolására általánosan használt EC szám egy négyjegyű kód, aminek első számjegye az enzim osztályt jelöli – az enzim által katalizált reakció típusa szerint. A 3. Hidroláz enzimosztály egy alcsoportja a 3.2. a glikozidos kötést hidrolizáló enzimeket foglalja össze, ezen belüli alcsoportok a glikozidos kötés típusa szerinti 3.2.1 O-glikozidázok 3.2.2. N glikozidázok és a 3.2.3. S glikozidázok. A negyedik számjegy jelöli ki a specifikus enzimet szubsztrátspecifitása alapján.

Az *exo*- és *endo*- megjelölés egy glikozid-hidroláz azon képességére utal, hogy egy szubsztrátot a lánc végén (leggyakrabban, de nem mindig a nem redukáló végén) vagy a lánc közben hasítja. Például az α -amiláz *endo*-hatású, míg a β -amiláz *exo*-hatású keményítőt hidrolizáló enzim, ami maltóz egységet hasít a nem redukáló végről.

A szekvencia alapú osztályozás algoritmikus módszereket használ a szekvenciák különféle családokhoz rendelésére. A glikozid-hidrolázokat 180 családba sorolták, ez állandóan elérhető a CAZy adatbázison [14] keresztül. Mindegyik GH család olyan fehérjéket tartalmaz, amelyek szekvenciájuk és az ebből következő harmadlagos szerkezetük szerint hasonlóságot mutatnak. Ez számos hasznos előrejelzést tesz lehetővé, mivel ismert, hogy a glikozidáz családok túlnyomó többségénél az aktív hely katalitikus aminosavai, a molekuláris mechanizmus, valamint a glikozidos kötés körüli geometria konzervált [11]. Általában az alkalmazott mechanizmus (azaz a retenció vagy az inverzió) egy GH családon belül megmarad. Különlegesen a GH4 és GH109 család glikozid-hidrolázai, amelyek NAD⁺-függő hidrolízis mechanizmussal működnek. Ezekben az enzimekben oxidációs-eliminációs-addíciós-redukciós lépésekkel, anionos átmeneti állapotokon keresztül megy végbe a hidrolízis [15]. Ez lehetővé teszi egyetlen enzim számára az α - és β -glikozidok hidrolizálását. Ez a többi hidrolitikus enzimmél kizárt, hiszen a specifitás az anomer konfigurációra kizárólagos.

2.3. Szénhidrát átalakító enzimek aktív helyének topológiája

Az enzimek aktív helyének topológiája három általános formával jellemezhető, függetlenül attól, hogy az enzim milyen mechanizmus szerint működik, és hogy a szekvencia és szerkezet szerint milyen családba sorolható. Ez a három topológia elvileg ugyanarra a doménre építhető, azonos katalitikus oldalláncokkal [16]. A 4. ábrán az általam is vizsgált enzimek aktív hely topológiái szemléltetik a lehetséges variációkat.



4. ábra: Az enzimek aktív helyének típusai. (a) zseb (6GPB glikogén foszforiláz *Oryctolagus cuniculus*) és 1YHT DispersinB *A. actinomycetemcomitans*). (b) árok (1RP8, α -amiláz árpa *H. vulgare* és 1Z32 humán nyál amiláz). (c) alagút elől- és hátulnézet (5CVY GH48 exoglükánáz *B. pumilus*). (d) alagútszerű elől- és felülnézet (1FA2 β -amiláz édesburgonya *Ipomoea batatas*)

A zseb vagy kráter forma (4a. ábra) optimális a nem redukáló végi monoszacharid felismeréséhez, és megtalálható a β -galaktozidázban, a β -glükózidázban, és a szialidázban, valamint az *exo*-poliszacharidázokban, például a glükóamilázban. Az ilyen *exo*-poliszacharidázok olyan szubsztrátokhoz alkalmazkodnak, amelyek nagyszámú elérhető láncvéggel rendelkeznek, mint például a natív keményítőszemcsék, amelyek radiális szerkezete a felületen az összes nem redukáló láncvéget feltárja. Másrészt ezek az enzimek nem túl hatékonyak rostos szubsztrátok, például natív cellulóz esetében, amelynek szinte nincs szabad láncvége.

Az árok vagy hasadék eredményezte „nyitott” szerkezet (4b. ábra) több cukoregység véletlenszerű kötődését teszi lehetővé polimer szubsztrátokban, és általában az *endo*-hatású poliszacharidázokban található meg, például lizozimban, endocellulázokban, kitinázokban, α -amilázokban, xilanázokban, glükánázokban.

Az alagút forma (4c. ábra) a nyitott szerkezetből vezethető le. A fehérje hosszú hurkokat fejleszt ki, amelyek lefedik a hasadék egy részét. Az eddig csak cellobiohidrolázokban található alagút szerkezet lehetővé teszi egy poliszacharid lánc átfűzését [17].

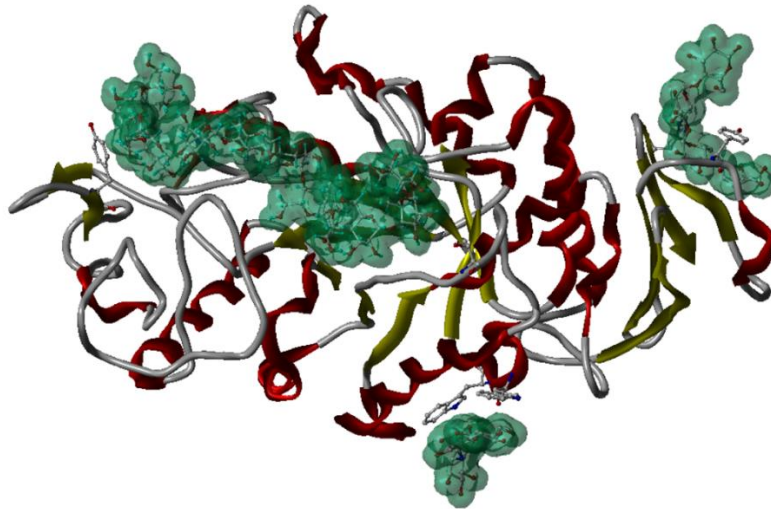
Ez a topológia biztosítja, hogy az enzimekből felszabaduljon a termék, miközben szilárdan kötődnek a poliszacharidlánchoz, ezáltal megteremti a processzivitás feltételeit. A processzivitás valószínűleg kulcstényező az oldhatatlan mikrokristályos cellulóz hatékony enzimatis lebonthatásában. A cellobiohidrolázok a processzíven működő enzimek jellegzetes példái. Amint egy diszacharid termék felszabadul, az enzim a poliszacharid láncához kötve marad a több alhellyel kialakult kölcsönhatásnak köszönhetően. Ilyenkor a „fedél” lezárja az aktív helyet, és az enzim két üres alhelye, és a hurokmozgások lehetővé teszik az enzim mozgását a poliszacharid lánc mentén. A hidrolízis ezután iteratív módon folytatódhat mindaddig, amíg az enzimmozgást sztérikus tényezők meg nem állítják, vagy amíg az aktív helyet lezáró hurkok elmozdulnak és felszabadítják a poliszacharidláncot. A 4d ábrán egy alagútszerű elrendeződés látható, amiben nem záródik teljesen a hurok a szubsztrát felett, de az árok típusú topológiához képest zártabb szerkezet alakult ki. A processzivitás jellemzésére az egy kötődéssel megvalósuló hidrolízis lépések számát használják [18].

2.4. A vizsgált enzimek biológiai funkciója, szerkezete, csoportosítása

Az amilázok $\alpha(1,4)$ glikozidos kötéseket hidrolizálnak és így a keményítő típusú poliszacharidok (amilóz, amilopektin, glikogén) lebontásában van szerepük. Mivel ezeket

a poliszacharidokat elterjedten használják fel különböző élőlények, ezért az amilázok szinte valamennyi élő szervezetben termelődnek. A keményítő jelentős ipari felhasználása és a humán táplálkozásban betöltött szerepe miatt a keményítő átalakításában szerepet játszó enzimek tanulmányozása széles körben folyik, és ezen enzimek négy csoportba sorolhatók. Az első csoport enzimeit az $\alpha(1,4)$ kötések hidrolízisét katalizálják, ide az α - és β -amilázok, valamint a glükamiláz tartozik. Az amilopektinben található $\alpha(1,6)$ kötések hidrolízisét a második csoport enzimeit, a pullulanáz és az izoamiláz katalizálják. A további két csoportba a kötések létrehozó enzimek kerültek, ezen belül a harmadik csoportba a $\alpha(1,4)$ kötést létrehozó ciklodextrin-glikoziltranszferáz (CGTáz), a negyedikbe pedig az $\alpha(1,6)$ elágazást létrehozó enzim. Bár az említett reakciókat főként a felsorolt enzimek katalizálják, de vannak köztük átfedések is. Az α -amilázok transzglykozilezésre is képesek, a CGTáz a hidrolízist is katalizálja, egyik termofil pullulanáz, a neopullulanáz pedig azonos mechanizmussal és azonos aktív centrum részvételével mind a négy reakciót katalizálja [19]. Az $\alpha(1,4)$, vagy $\alpha(1,6)$ kötések retenciós, illetve inverziós mechanizmus szerint hasító enzimek szerkezetileg különböznek egymástól. A retenciós enzimek közé az α -amilázok, a CGTázok és az oligo-(1,6) glükozidázok tartoznak, míg az inverziós enzimek közé sorolhatjuk a β -amilázokat és a glükamilázt. Az α -amiláz és rokon enzimek szekvenciájának összehasonlítása alapján négy erősen konzervált régió található a retenciós keményítóbontó enzimek szerkezetében, amely tartalmazza a katalitikus helyet is. A katalitikus domén mindig $(\beta/\alpha)_8$ hordó és Asp, Glu és Asp aminosavakat tartalmaz a katalitikus régióban. Ebben a szerkezetben a nyolc párhuzamos β -redő képezte belső hengert nyolc α -hélix veszi körül. Az alternáló α -hélixeket és β -redőket hurkok kötik össze, a hurkok hossza és aminosav sorrendje változó és ebből származik a különböző enzimek specificitásában és tulajdonságokban megfigyelhető változatossága. A poliszacharidokra ható enzimek szubsztrát kötőhelye, mint egymást követő alhelyek sorozata írható le, ahol egy-egy alhely a szubsztrát egy-egy monoszacharid egységével lép kölcsönhatásba. Az α -amiláz családban az alhelyeket a hurkok és a kapcsolódó β -redők aminosavai alkotják, így a hurkok hosszában és természetében való variációk okozzák az alhelyek számában és sajátágaiban megjelenő különbségeket. Példaként az árpa amiláz egyik izoenzimének (AMY1) szerkezetét mutatja az 5. ábra. Az enzimben az aktív helyen kívül másodlagos kötőhelyek is találhatóak, melyeknek elsősorban az enzim nagyméretű keményítőszemcséhez való rögzítésben van szerepük. Jól láthatóan a szubsztrát maltooligomer a TIM hordó felületi árkában helyezkedik el, és ugyanennek az A doménnek

a része az egyik másodlagos kötőhely, míg a másik a béta redős szerkezetű C doménon található.



5. ábra Árpa AMY1 izoenzimének szerkezete a felületi árokban található aktív helyen és a két másodlagos kötőhelyen kötődő oligoszacharid szubsztrátokkal.

A biofilm, vagyis a baktériumok egy abiotikus felületen történő rögzített növekedése a kutatások célkeresztjébe került, mikor a közelmúltban felismerték szerepét a baktériumok védelmében és az antibiotikumokkal szembeni rezisztencia növekedésében. A biofilm kialakulásához kritikus a baktériumsejtek felülethez való tapadása és egymáshoz való aggregációja [20]. Az orvosi eszközök felületén képződő biofilmek komoly egészségügyi problémákat okoznak, a kórházi fertőzések közel 80 %-a biofilmekkel kapcsolatos [21]. Ilyenek pl. a fogászati problémák, a beültetett katéterek okozta húgyúti fertőzések, az implantátumok okozta gyulladások és a kórházi eszközök felületén található biofilmek baktériumai által okozott fertőzések. A biofilmben a baktérium védettebb az antibiotikus kezeléssel szemben is, így a góccok nehezen szüntethetők meg. A védelmet egy poliszacharid mátrix biztosítja, ami több patogén faj (pl. *E. coli*, *Staphylococcus*) esetében poli- β -D-(1,6)-N-acetil-glükózamin. Az *Aggregatibacter* (korábban *Actinobacillus*) *actinomycetemcomitans* (*Aa*) egy humán patogén Gram negatív coccus, amely a szájban agresszív fogágybetegséget (parodontitist) okoz [22]. A fogágybetegség az emberiség közel 40 %-át érinti, s ez okozza a fogvesztések több mint 70 százalékát. Az in vitro vizsgálatok kimutatták:

1. a planktonsejtek kitaró tapadását és rögzítését a felülethez [23]
2. az *Aa* növekedését és fejlődését erősen differenciált biofilm telepekké és
3. a planktonsejtek leválását és szétszóródását a biofilm érése során [24].

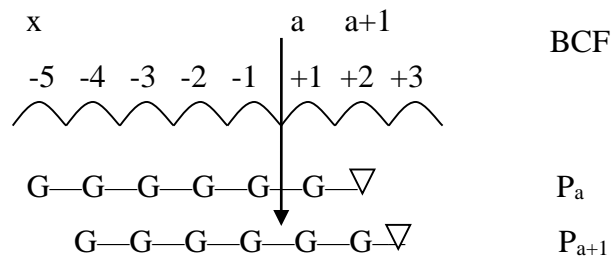
Kiderült, hogy egy oldható β -N-acetil-glükózaminidáz (DispersinB, rövidítve DspB; EC 3.2.1.52) irányítja az Aa biofilmhez való kapcsolódását és az abból való kiszabadulást. Érdekes módon a DspB nemcsak az Aa esetében képes a biofilm oldódását kiváltani, hanem számos baktériumfaj, köztük a Gram-pozitív fajok (*S. epidermidis*) és a Gram-negatív fajok (*A. pleuropneumoniae*; *E. coli*; *Yersinia pestis* és *Pseudomonas fluorescens*) által termelt biofilmek esetében is [25]. A DspB hatékonysága az Aa és más baktériumfajok biofilmképződésének megakadályozásában az abiotikus felületeken egyedülálló lehetőséget teremt az enzim antibiofilm hatóanyagként történő alkalmazására. A DispersinB $\beta(1,6)$ glikozidos kötésre specifikus az N-acetil-hexózaminidázok közé tartozó enzim, és ezzel egyedülálló, hiszen a többi, kitint és hasonló poliszacharidot hidrolizáló hexózaminidáztól eltérő a szubsztrát glikozidos kötésének pozíciója. Az enzimet monoszacharid szubsztrátokon végzett vizsgálatok alapján a GH20 család hexózaminidázai közé sorolták be. Poli-GlcNAc szubsztráton viszont a monomer GlcNAc mellett oligomer termékeket is azonosítottak [25]. A röntgenkristallográfiás szerkezetvizsgálat, melynek eredménye a PDB adatbázisban 1YHT kód alatt található, szerkezeti homológiát mutatott a GH20 család enzimeivel [26]. A fő szerkezeti elem egy TIM hordó, a katalitikus domén Asp183, Glu184 és Glu332 aminosavai a hasítóhely mellett esszenciálisak a szubsztrát kötésben és hasításában. A GH20 családra jellemző módon az Asp183 az acetamido csoporthoz kapcsolódik, ami a korábban tárgyalt szomszédcsoporthoz segített mechanizmus szerint (3. ábra) vesz részt a katalízisben. A GH20 család többi tagjához hasonlóan itt is fontos szerep jut az aromás aminosavak alkotta hidrofób zsebnek, amit mutációs vizsgálatok igazoltak [27]. A Trp237 mutáns inaktív a monomer szubsztráton, bár biofilm elárolító képessége nem szűnik meg teljesen. A Tyr187 és Tyr278 aminosavak mutációja a polimer és monomer szubsztráton is aktivitás csökkenést okozott.

A glikogén foszforiláz (GF; EC 2.4.1.1) a glikogénként tárolt glükóz mobilizálását teszi lehetővé állati szervezetekben: a glikogén lebontásának első, sebességmeghatározó lépését katalizálja. A GF egy *exo*-enzim és a glikogén (donor) nem redukáló végén lévő glükóz molekula transzferét katalizálja foszfátra (akceptor), így az α -(1 \rightarrow 4) glikozidos kötés hasításával egy egységgel rövidebb glükózpolimert és glükóz-1-foszfátot (G-1-P) eredményez [28]. Az enzim tehát egy hexozil transzferáz (GT35), de az aktivált glikozil donorról (G-1-P) történő glikozil transzfert egy alkoholos hidroxil csoportra nem a fiziológiás, hanem a megfordítható reakció szintézis irányában végzi. (A GT enzimek definíció szerint aktivált cukor foszfátot használnak glikozil donorként, miközben glikozil csoport átvitelét végzik egy többnyire alkoholos hidroxil csoportra, mint nukleofilre.)

Bár az enzim fiziológias körülmények között a G-1-P felszabadulásával járó glikogénlebontást végzi, *in vitro* a fordított irányú reakciót is katalizálhatja. Ezt használtuk ki, mikor az amiláz bontási kép vizsgálatokhoz szükséges kromofor tartalmú oligomereket állítottuk elő a GF enzim segítségével [3,4] a PhD dolgozatomban részletezett preparatív reakciókban. A GF két változata az aktív, foszforilált GFa és a katalitikus aktivitással nem rendelkező, foszforilálatlan GFb. A GF inaktív monomer és tetramer [29] formában egyaránt előfordul, *in vivo* azonban többnyire homodimerként van jelen [30]. A dimer enzimen a két alegység találkozásánál helyezkedik el az aktív centrum, a 97 kDa molekulatömegű alegység 842 aminosavból áll. Minden alegység tartalmaz egy kovalensen kötött pridoxál-5'-foszfát prosztetikus csoportot és egy reverzibilisen foszforilálható Ser14 oldalláncot [31]. A GF hét kötőhellyel rendelkezik: egy katalitikus, egy purin nukleotid, egy allostérikus, egy glikogén, egy indol, egy benzimidazol és egy quercetin kötőhellyel [32]. A GF enzim három különböző izoformája (1) az izom GF, mely az izomműködéshez szükséges G-1-P felszabadításáért felelős, (2) a máj GF, ami a vércukorszint szabályozásában játszik szerepet, és (3) az agy GF, amely a hipoglikémiás állapotokban a megfelelő agyműködéshez biztosítja a glükózt [33]. Vizsgálataimhoz nyúlvaázizom-eredetű GFb-t (rmGFb) alkalmaztam.

2.5. Alhely térkép az enzimek aktív hely szerkezetének jellemzésére

Számos depolimeráz enzimen a katalitikus aktivitást a hasított kötéstől ténylegesen távol levő szubsztrátkötő helyek is befolyásolják. Ilyen alhelyrendszerrel nemcsak a glikozil-hidrolázokban találkozunk, hanem a proteázokban, illetve a nukleázok között is. Az alhelyek száma, a kölcsönhatás energiája az egyes alhelyekkel és a hidrolitikus sebességi együtthatók kísérletileg meghatározhatók. Davies és munkatársai 1997-ben javasoltak a szénhidrátot ható enzimek szubsztrátkötő alhelyeinek jelölésére egy olyan általános alhely-nomenklatura rendszert, ami az *exo* és *endo* enzimekhez való szubsztrát kötésre is alkalmazható [34]. Megállapodás szerint a szénhidrát szubsztrátok nem redukáló vége a bal oldalon, a redukáló vége pedig a jobb oldalon van az ábrázolás során. A hasítás helyét nyíl jelzi. Az alhelyek számozása az 6. ábrán látható módon történik, a glikonkötő helyekre egyre negatívabb számokkal (-1, -2, -3 stb.) a hasítási helyétől a nem redukáló vég felé haladva, és egyre pozitívabb számokkal (+1, +2, +3 stb.) a redukáló vég felé az aglikon kötő helyek esetén.



6. ábra Glikozid hidrolázok hely modelljének jelölései. A nyíl a hasítás helyét jelöli, attól jobbra az aglikon kötő helyek, balra a glikon kötő helyek találhatóak rendre pozitív illetve negatív számmal jelölve.

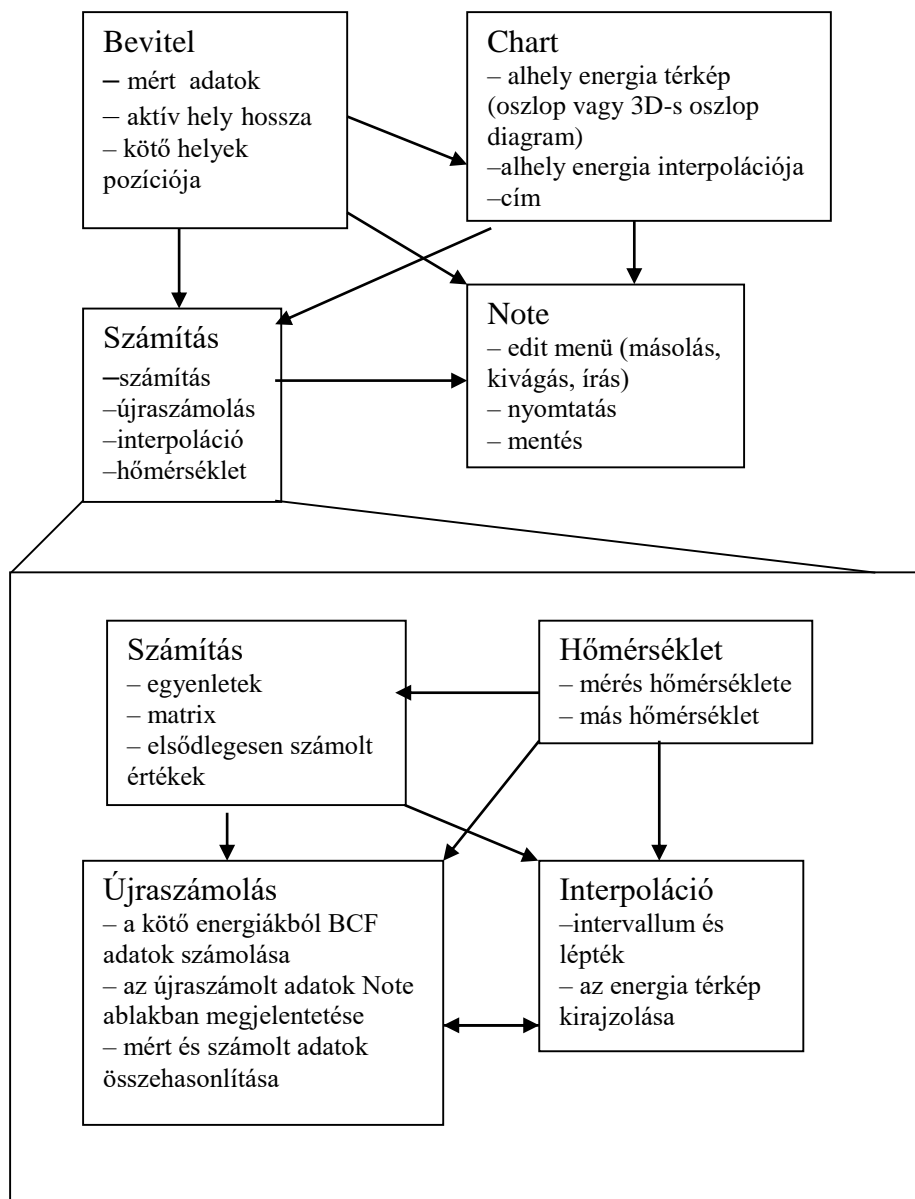
Allen és Thoma termékanalízisen alapuló eljárást fejlesztett ki az endo-amilázok hely térkép számítására [7]. A számítások a következő egyenleten alapulnak:

$$\Delta G_{a+1} - \Delta G_x = -RT \ln P/P_{a+1} \quad (1)$$

ahol a ΔG_{a+1} az $a+1$ -es hely kötési energiája, a ΔG_x az x hely kötési energiája, és a P_a illetve P_{a+1} a termék kötés hasítási frekvenciái, ami abból a kötési módból származik, ahogy a szubsztrát redukáló vége az a illetve $a+1$ alhelyhez kapcsolódik az 6. ábra jelölései szerint.

Számításaink megkönnyítésére egy számítógépes programot terveztünk és fejlesztettünk ki melyben a Thoma elméletén alapuló összefüggéseket kiegészítettük egy iterációs módszerrel, amely segítségével a mért és a kötési energiák alapján visszszámolt kötéshasítási frekvenciák (BCF) a legjobb egyezést adták.

A program WINDOWS alatt fut és a kísérletileg meghatározott BCF értékeket használja a katalitikus hely pozíciójának és az alhelyek számának meghatározásához, illetve az alhelyek kötési energiájának számításához. A program felépítését bemutató blokkdiagram a 7. ábrán látható. A program neve SUMA, (SUBsite Mapping of α -Amylases) és szabadon hozzáférhető kutatási és oktatási célokra [35].



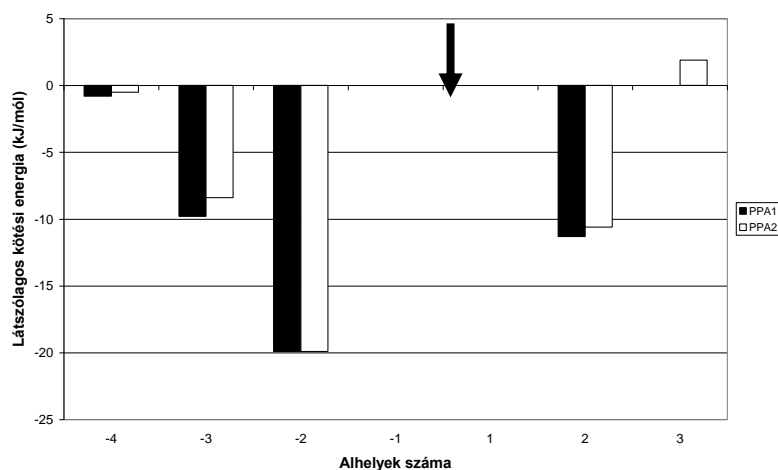
7. ábra A SUMA számítógépes program szerkezetének blokkdiagramja

A program működésének szemléltetésére az alábbi alhely térképeket készítettük el:

- *Sertés pankreász α -amiláz (PPA)*

Bemutattuk és összevetettük az általunk szintetizált, CNP-maltoligomer glikozidokon (DP 4-8) végzett méréseink [36] és az irodalomban leírt radioaktív jelzett maltooligomer bontási képek [37,38] alapján számított alhely térképeket (8. ábra).

A diagramon a negatív kötési energiák kedvező kölcsönhatást jeleznek, míg a pozitív energiák az alhely és a szubsztrát monomer egysége közötti taszítást mutatják. A hasítóhely melletti két alhely energiája nem számítható ezzel a módszerrel, mert ez a két alhely minden produktív komplexben betöltött.

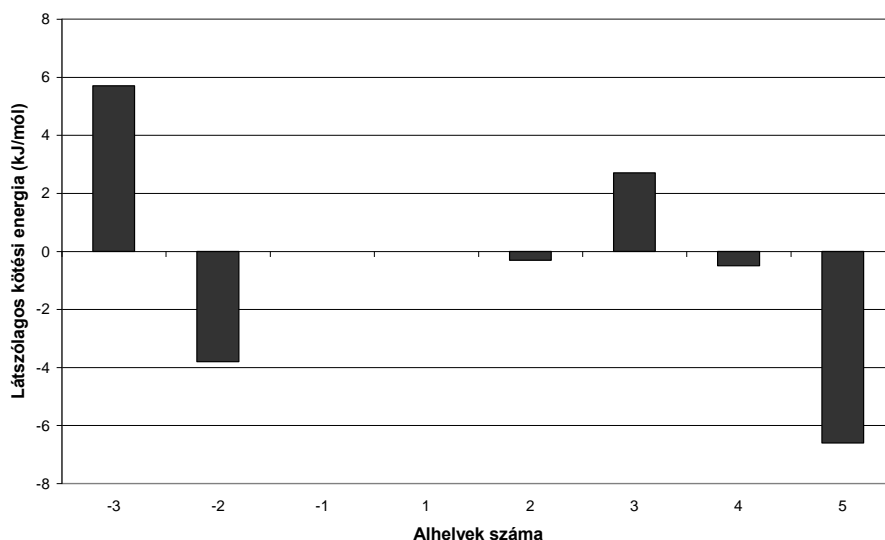


8. ábra A sertés pankréász amiláz enzim (PPA) alhely térképei. ■ CNP-maltoligomereken PPA1 □ radioaktív jelzett szabad maltoligomereken PPA2

A PPA két alhely térképének jó egyezése igazolta, hogy a szubsztrát redukáló végén található CNP csoport nem befolyásolja a bontási képet és az alhely térképet. Ez a megállapítás alapvető fontosságú volt a későbbi alkalmazások szempontjából.

- Rizs α -amiláz (*Amy3D*)

A rizs legalább nyolc amiláz izoenzimet tartalmaz, ezek egyike a mag kifejlődésében és a csírázásban is szerepet játszó *Amy3D* izoenzim [39]. A bontási kép adatokat szabad és alfa glikozidos kötésű PNP aglikont tartalmazó szubsztrátokon (DP2-6) HPLC módszerrel mérték [40]. A számítások szokatlan alhely szerkezetet eredményeztek (9. ábra). Jelentős gát alhelyet látunk a nem redukáló vég felől, a glikon kötő rész rövid, csak két alhelyet tartalmaz, az aglikon kötő helyen belső gát alhely található. Ezek alapján inkább *exo*-, mint *endo*- mechanizmus valószínűsíthető. Meg kell azonban jegyezni, hogy az irodalomból vett példák esetében nem teljesült az a feltétel, hogy az enzim összes alhelyét átfedő szubsztrátokkal is történjenek mérések. Ezért javasoltuk a bontási képek kiegészítését hosszabb szubsztrátok alkalmazásával.

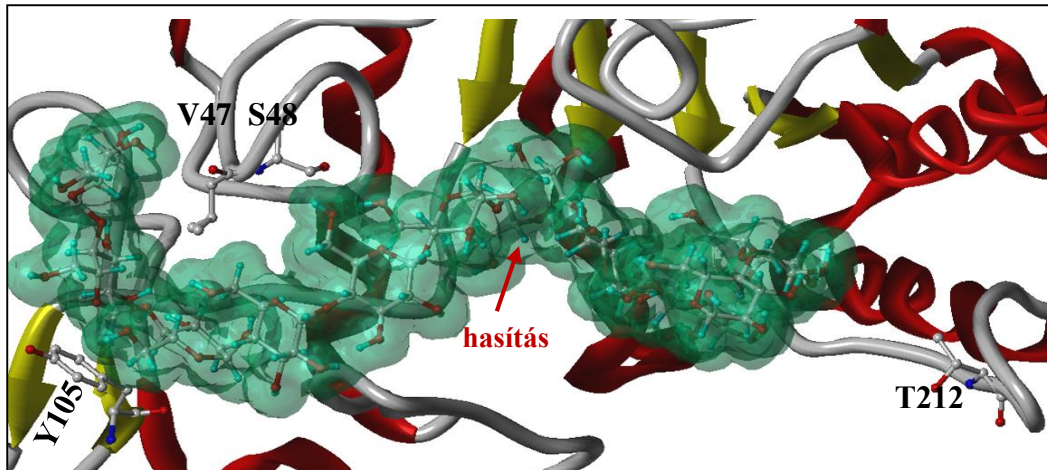


9. ábra Az Amy3D rizs amiláz izoenzim alhely térképe

- Árpa α -amiláz izoenzim (AMY1)

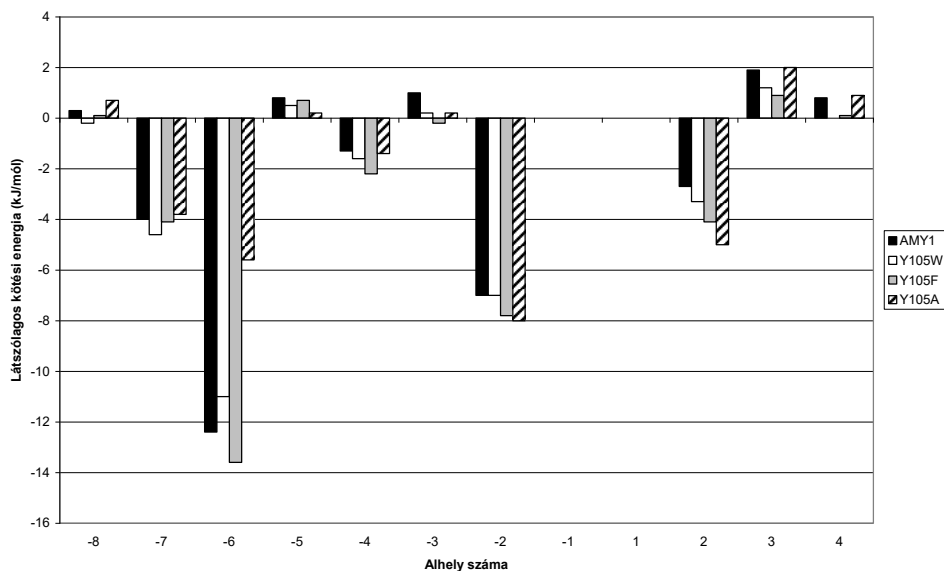
Az árpa csírázása során a keményítő lebontását végző α -amiláz izoenzimek egyike a kis izoelektromos pontú, nagyobb aktivitású AMY1. A számításokat az irodalomban közölt, DP 3-7 tagszámú 1,4-nitrofenil-(PNP)- α -maltozidokon meghatározott bontási képek [41] alapján végeztük. A SUMA programmal számított alhely térkép részben megerősítette a szerzők által javasolt kilenc alhelyet feltételező szerkezetet, amiben a hasítóhelytől számított hatodik glikonkötő alhely fontosságát is megemlítették. Számításunk alapján az AMY1 izoenzim szerkezetére 6+2+1 modellt állítottunk fel, ahol a -6 alhely nagy kötési energiája miatt kiemelt szereppel bír a kötődésben, a +3 alhely nem kötő hanem taszító hatással bíró gát alhely és a glikon kötő helyen is található egy belső gát alhely. Ezután az árpa amiláz enzimek egyik elismert kutatója, a dán Birte Svensson professzor asszony felajánlott egy együttműködést az árpa amiláz enzimek szerkezetének tanulmányozására, amihez az izoenzimeket és mutánsaikat biztosította. 3-12 tagszámú szubsztrát sorozatunk lehetővé tette a vizsgálatot, hiszen a korábbi mérések is legalább 9 alhelyre utaltak. Méréseink és számításaink egyértelmű különbséget jeleztek a két izoenzim között. A 12 alhely feltételezésével kapott modell mindkét izoenzimre a 7+2+1 szerkezetet eredményezett, de az energiaértékekben néhány szignifikáns különbség látszott. Mindkét enzimen a -6 alhely energiája a legnagyobb, de az AMY1 esetén ez jóval magasabb érték, hasonlóan a szintén nagy energiájú -2 alhelyhez (11. ábra). Ezzel ellentétben a +2 alhely energiája az AMY2 izoenzimen nagyobb. Megállapítottuk, hogy az AMY1 a glikon, míg az AMY2 az aglikon kötő részen létesít nagyobb energiájú kapcsolatot a szubsztrát glükóz

egységeivel. Vizsgáltuk az AMY1 enzim néhány mutánsát, amelyeket aromás aminosavak hatásának vizsgálatára hoztak létre. A Tyr105 aminosav a röntgenkristallográfiás eredmények szerint a legnagyobb energiájú -6 alhely környezetében helyezkedik el (10. ábra).



10. ábra Árpa amiláz AMY1 izoenzimének aktív centruma, a vizsgálatainkban módosított aminosavak és egy 11 tagszámú maltooligomer szubsztrát feltüntetésével

A három Y105 mutáns létrehozásával és vizsgálatával azt kívántuk eldönteni, melyik tulajdonság játszik szerepet a glükóz egység kötésében; a hidrofóbicitás (Y105A), a hidroxil csoport által létrehozott H-híd (Y105F), vagy az aromás gyűrűvel kialakuló stacking kölcsönhatás (Y105W).



11. ábra Az árpa AMY1 és három Y105 mutánsának alhely térképei

Eredményeink szerint a legnagyobb energia csökkenés a -6 alhelyen a Tyr-Ala csere hatására következett be (11. ábra). Ez arra utal, hogy a szubsztrát kötésben az aromás gyűrű

szerpe a legfontosabb, hiszen a hidroxil csoport hiánya, illetve másik aromás gyűrű jelenléte alig változtatta meg a kötési energiát. Meghatároztuk az aglikon kötőhely végén módosított T212Y, valamint az Y105A/T212Y kettős mutáns enzimek bontási képét és alhely térképét. A T212Y mutáció csak kismértékű változást okozott a kötőhelyek energia értékében, viszont az aglikon kötő hely végén található gát alhelyek gyakorlatilag megszűntek. A dupla mutánsban inkább az Y105A mutáció hatása érvényesül [42].

Az eddigi eredmények igazolták a SUMA program alkalmazhatóságát amilázok aktív helyének reális leírására. Előnynek bizonyult a korlátlan adatbeviteli lehetőség, az egyszerű használat és a WINDOWS kompatibilitás. A kötési energiákat kiszámolhatjuk és a BCF adatokat újraszámolhatjuk más hőmérsékleten is, mint amit a méréskor alkalmaztunk. A kilistázott eredmény elmenthető, szerkeszthető és nyomtatható számolt adatokat tartalmaz. Grafikus illusztrációk (minimalizáció, alhely térkép) teszik az eredményeket világosabbá. Az alhely térkép birtokában a BCF adatok kiszámolhatók a méréshez használtaknál hosszabb szubsztrátokra is. A SUMA szabadon használható oktatási és kutatási célokra.

3. Vizsgálati módszerek

A dolgozatban összefoglalt eredmények kísérletes munkán alapulnak, amihez a hozzáférhető módszerek széles körét használtuk. A módszerek részletes tárgyalására a dolgozatban terjedelmi okokból nem térek ki, az itt közölt összefoglalón túl az adott fejezetekben történnek utalások az alkalmazott módszerre. Valamennyi megjelent közleményben az alkalmazott technikák és kísérleti körülmények leírásra kerültek.

A kísérletekben használt fehérjék egy részét vásároltuk, másokat (a vad típusú és mutáns változatokat) együttműködő partnereink állították elő és biztosították a kísérletekhez. Egyes esetekben a fehérjék kinyerése és további tisztítása a szokásos elválasztási módszerek alkalmazásával történt (méretkizárási és affinitás kromatográfia, ultraszűrés).

Aktivitás és kinetikai méréseink főként direkt módszerrel, a termék vagy a szubsztrát koncentráció változását követve történtek, folyamatos vagy szakaszos megközelítést alkalmazva. Rutinszerűen használtunk kromofor felszabadulással járó reakció spektrofotometriás követésén alapuló módszereket a Jasco V550 készülék kinetikai mérőprogramja segítségével. Ezt egészítették ki a 4.3. fejezetben részletezett saját fejlesztésű aktivitásmérési módszerek, melyek kromatográfiás (HPLC) és kalorimetriás (ITC) elven működnek.

A szerkezetvizsgálatokhoz és minőségi analitikai feladatok megoldására tömegspekrometriai (MALDI-TOF és ESI) és NMR spektroszkópiai módszereket alkalmaztunk.

Mennyiségi analitikai méréseinket, a bontási kép meghatározásokat általunk beállított, többnyire fordított fázisú HPLC elválasztási módszerekkel, UV detektálást alkalmazva végeztük.

A különböző kísérleti adatok kiértékelésére és értelmezéséhez számos illesztő, kiértékelő és modellező programot használtunk.

4. Tudományos eredmények

4.1. Poliszacharid hidrolázok szerkezetének felderítése

A poliszacharidokat átalakító enzimek jelentősége indokolja a területen folyó széleskörű kutatásokat. Az ipari, vagy a humán gyógyászati jelentőség miatti kutatások más-más célokat tűznek ki, de ezekben közös vonás, hogy az enzimek szerkezetének ismerete fontos a tervezéshez. Míg az ipar esetében a cél többnyire a nagyobb hozam és hatékonyság, amihez az enzim stabilitása és robusztussága szükséges, a gyógyászatban, mezőgazdaságban gyakori feladat az enzim gátlása, ami az enzim aktív helyének ismeretében tervezhető. Az általam végzett szerkezeti vizsgálatok főként amiláz enzimekkel folytak. Az első emlős α -amiláz vizsgálatokat (PPA, HSA) a mikrobiális BLA követte, majd növényi (árpa és édesbugonya) és rovar eredetű amilázt vizsgáltunk. Erre a saját előállítású szubsztrát sorozat, valamint a számítások megkönnyítésére készült saját fejlesztésű SUMA program [35] teremtette meg a lehetőséget. Az elmúlt időszakban számos kérést kaptam külföldi kutatóktól a program használatára, de ezekből eddig közlemények nem születtek. Hasznosnak bizonyult viszont a SUMA program saját kutatásaink szempontjából, hiszen segítségével számos különböző eredetű α -amiláz enzim és mutánsainak szubsztrátkötő helyét sikerült leírni. A bakteriális eredetű, de humán gyógyászati jelentőséggel bíró DispersinB enzim működését más szubsztrátokkal, de hasonló kísérleti metodikával derítettük fel. A következőkben ezeket az eredményeket ismertetem.

4.1.1. Árpa amiláz izoenzimek és AMY1 mutánsok

Az árpa AMY1 izoenzim alhely térképének birtokában az aktív helyen meghatározó pozícióban lévő Ser48 és a Val47 szerepét vizsgáltuk [43], melyek szintén a glikon kötő hely részét képezik (10. ábra), eredményeinket az 1. táblázat tartalmazza.

Mivel a Ser48 aminosav több nagy energiájú alhely létrehozásában is szerepet játszik, mutációja a glikonkötő régió rövidülését eredményezte. A legnagyobb energiájú -6 alhely kötőképessége drasztikusan lecsökkent és a -7 alhely energiája is jóval kisebb lett, miközben újabb belső gát alhely jött létre a -4 pozícióban és az aglikonkötő hely energiája nőtt. Ez együttesen a rövidebb szubsztrátok kötődésének kedvez, ami a CNPG7 és CNPG4 szubsztrátok hidrolízis sebességének változásában is megnyilvánult. Míg a vad típusú enzim a heptamert hidrolizálta nagyobb sebességgel, addig S48Y mutáns a tetramert preferálta, vagyis a mutáció specificitás változást eredményezett. A Val47 mutációi kisebb

mértékű változást okoztak. A valin-alanin csere nem változtatta meg a kötőhely szerkezetet, de az összenergia csökkent.

1. táblázat *Árpa AMY1 és aktív hely mutánsainak számított látszólagos alhely energiái*

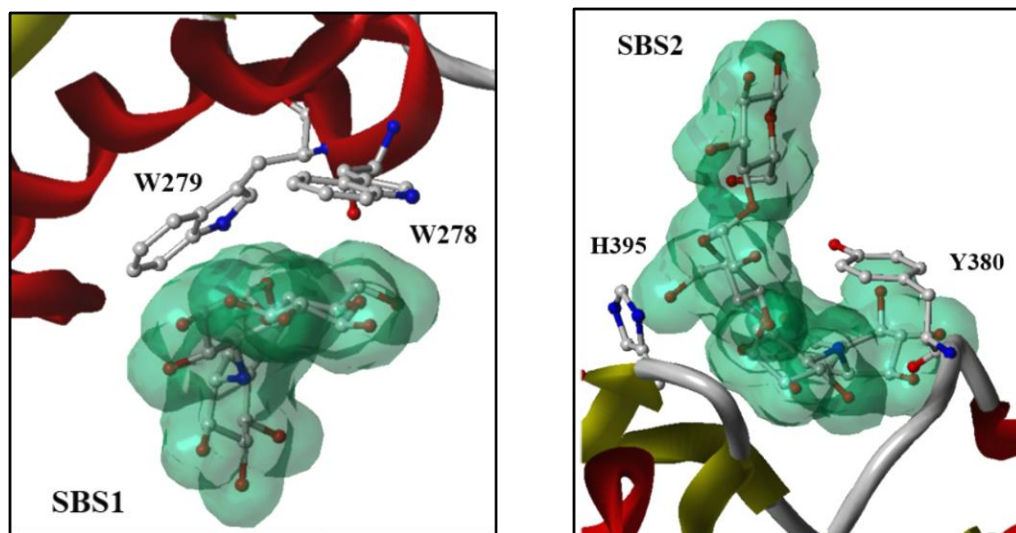
Alhelyek	Látszólagos alhely kötési energiák (kJ/mól)											
	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	+1	+2	+3	+4
AMY1 wt	0,3	-4	-12,4	0,8	-1,3	1	-7			-2,7	1,9	0,8
S48Y	-1,62	-1,91	-1,13	0,18	0,99	0,49	-8,49			-7,65	1,98	-0,4
V47A	0,15	-2,99	-9,42	2,07	-0,91	1,29	-4,97			-2,64	2,96	1
V47F	1,21	-6,88	-4	1,36	-0,43	0,65	-8,61			-5,41	3,03	1,99
V47D	-1,15	-0,32	-8,23	-0,93	-2,58	-1,57	-9,58			-6,67	0,84	-1,27
V47K/S48G	0,21	-2,28	-1,28	0,83	1,9	-0,87	-10,75			-7,96	1,97	0,27
V47G/S48D	1,33	-3,56	-2,29	2,14	-0,19	-0,32	-8,11			-5,53	2,33	0,14
V47L/S48A	1,7	-3,31	-7,88	1,02	-1,14	1,12	-5,02			-4,16	2,89	1,56
V47I/S48I	-0,84	-4,55	-10,84	-0,97	0,39	-1,57	-6,12			-6,98	1,71	1,1

Jelentősebb eltérések kiemelve.

Jelentősebb a V47F csere, ahol a bevezetett aromás aminosav hatására a -7 és +2 alhelyek energiája is nőtt, miközben a -6 energiája lecsökkent. A fenilalanin valószínűleg a Tyr105 aromás gyűrűjével lép kölcsönhatásba (10. ábra), ami a hosszú szubsztrátokra erőteljes horgonyzó hatással bírt a vad típusban. Elmozdulása a maltoheptaóznál rövidebb szubsztrátok kötődésének és hasításának kedvez, így a tetramer hidrolízis sebessége ebben az esetben is közel hússzoros a heptamerhez képest. A V47D mutánsban a -7 alhely megszűnik, miközben a belső gát alhelyek kötő helyé alakulnak és a hasítóhely melletti alhelyek energiája is megnő, a +2 esetében jelentősen. A V47K/S48G mutáció az S48Y-hoz hasonlóan jelentős változást eredményezett, a -6 alhely szinte megszűnik, a -4 alhely gát alhellyé alakul és a hasítóhely mellett nő a kötődés erőssége. Ez eredményezi a 35-szörös hidrolízis sebességet tetramer szubsztrátra a heptamerhez képest. A V47G/S48D kettős mutánsnál az S48D hatás érvényesül, nagyon hasonló alhely térképet kaptunk mint az S48Y esetén. A V47L/S48A mutáció az egyes alhelyek kismértékű csökkenését, de együttesen nagy összenergia csökkenést okozott, míg a V47I/S48I az összenergia jelentősen megnőtt főként a +2 alhely affinitásának növekedése és több a glikonkötő régióban levő gát alhely kötőhelyé válása miatt. Összességében ezek a mutációk jól szemléltetik, hogy a szubsztrátspecificitás hogyan befolyásolható olyan aminosavak kicserélésével, amelyek több alhely kialakításában is részt vesznek. Az aktív helyen kötött

szubsztrát szinte körbeveszi a V47 és S48 aminosavakat (10. ábra), és a V47 az Y105 aminosavval együtt a szubsztrát aktív helyre való belépését is koordinálja [44].

Az árpa amiláz esetében nemcsak a katalízisben részt vevő aktív helyen, hanem ún. másodlagos kötőhelyeken is történhet szubsztrát kötődés, hasonlóan a glikozid-hidrolázok keményítőbontó enzimjeihez (GH13, 14, 15 és 77 családok). A másodlagos szénhidrátkötő helyek a felületen, a katalitikus helytől és a szubsztrátkötő ároktól bizonyos távolságra helyezkednek el (5. ábra). Az AMY1 két ilyen felületi kötőhellyel rendelkezik [45-48], amelyekre a következőkben az SBS1, illetve SBS2 jelölést alkalmazom. Ezeknek a kötő helyeknek szerepe van a keményítő szubsztrát rögzítésben és a termék felszabadításban. Az SBS1 a $(\beta/\alpha)_8$ hordó felépítésű katalitikus domén oldalán, míg az SBS2 a C-terminális domén antiparallel β -lemez oldalán helyezkedik el [45, 49]. Az aromás oldalláncok központi szerepet töltenek be mind az SBS1 mind az SBS2 poliszacharid kötésében [45,47,48,50]. Korábbi eredményeink szerint a szubsztrátkötő hely aminosavainak mutációival lehetséges az enzim oligoszacharidokon mutatott relatív specifitásának megtervezése, beleértve az alhely kötési energiaprofiljainak manipulálását is [42, 51-54]. Felmerült a kérdés, mi a helyzet a másodlagos kötőhelyek aminosavaival? A közelmúltban az emberi nyál α -amilázában számos, másodlagos kötőhelyen azonosított aromás oldalláncot alaninnal helyettesítettek. Arra a következtetésre jutottak, hogy ezek az aromás csoportok részt vesznek a nyers és az oldható keményítő megkötésében és hidrolízisében, valamint a maltopentaózzal és maltoheptaózzal szembeni aktivitásban is [55]. Ennek analógiájára készültek a különböző másodlagos kötőhelyeken módosított, főként aromás aminosavak alaninra történő cseréjével kapott egyszeres és kétszeres mutációt tartalmazó AMY1 variánsok. A módosított aminosavak elhelyezkedését a másodlagos kötőhelyeken a 12. ábra mutatja be.



12. ábra Az árpa AMY1 izoenzim másodlagos kötőhelyei a vizsgált aminosavak feltüntetésével

Ezen mutáns enzimek bontási képének és alhely térképének meghatározása a kötőhelyek illetve a módosított aminosavak pontos szerepének tisztázását célozta. Vizsgálatainkba bevontunk egy, a korábbi aktív hely mutánsok közül a legnagyobb hatást mutató Y105A kettős mutánst is. Eredményeink azt mutatták, hogy bizonyos, a másodlagos kötőhelyen végrehajtott felszíni mutációk nemcsak a keményítő szemcséhez való kötődést befolyásolták, hanem megváltoztatták a DP3-11 CNP-maltooligomerek hidrolízise során keletkező oligoszacharid termékek arányát és így eltérést okoztak az aktív hely alhelyeinek látszólagos kötési energiáiban (2. táblázat).

2. táblázat Másodlagos kötőhelyen történő mutáció hatása az árpa AMY1 izoenzim alhelyeinek kötési energiájára.

Alhelyek	Látszólagos alhely kötési energiák (kJ/mól)											Összeg (kJ/mól)	
	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	+1	+2	+3		+4
AMY1 wt	0,3	-4	-12,4	0,8	-1,3	1	-7			-2,7	1,9	0,8	-22,6
W279A	0,2	-3,9	-10	-0,2	-1,9	0,7	-4,6			-3	2,3	-1,1	-21,5
W278A/Y380A	0,4	-3	-10,6	2,9	-1,1	0,9	-5,1			-2,7	2,4	0,3	-15,63
W279A/Y380A	0,6	-3,9	-11,7	1,7	-0,8	0,8	-5,7			-2,7	2,3	0	-19,55
Y380A	-1	-6,9	-14	-1,9	-2,7	0,2	-8,7			-5,4	2	-1,3	-39,7
H395A	1,3	-3,8	-8	2,6	-0,5	0,9	-5,5			-2,7	2,9	0,2	-12,6
Y380A/H395A	0,8	-4,3	-10,7	0,1	-0,7	0,5	-5,8			-2,5	2,4	-0,2	-20,39
Y105A	0,7	-3,8	-5,6	0,2	-1,1	0,2	-8			-5	2	0,9	-19,80
Y105A/Y380A	0,2	-3,8	-5,4	0,2	-1,6	-0,6	-7,6			-4,8	1,6	0	-21,96

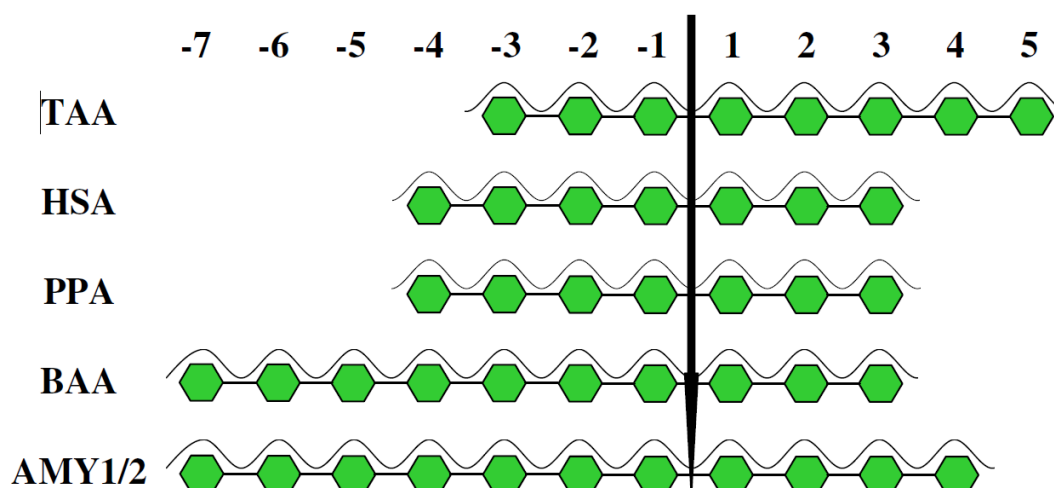
Jelentősebb eltérések kiemelve.

Míg az SBS1 másodlagos kötőhely kulcsfontosságú aromás aminosavainak kicserélésével kapott egyszeres és kétszeres mutánsok nem mutattak számottevő eltérést a vad típusú enzimhez képest, az SBS2 mutánsok számított alhely térképei több esetben eltérnek a vad típusú enzimétől. Az Y380A és a H395A esetén az összegzett alhely kötési energiák -39,7, illetve -12,6 kJ/mol összehasonlítva a vad típusú AMY1 -22,6 kJ/mol értékével (2. táblázat). Az Y380A energianyeresége meglehetősen egyenletesen oszlik el az alhelyeken, és figyelemre méltó a belső és két külső gát alhely (az AMY1-ben pozitív energiaértékű -8, -5 és +4 alhelyek) konverziója kötő helyekké. Ezzel szemben az SBS2 Tyr380 aminosavval ellentétes oldalán található His395 mutációjával kapott H395A alhely térképe az összenergia csökkenését mutatja, ami szintén az egyes alhelyek energia csökkenéséből áll össze. A gyengébb affinitás a két legfontosabb kötő alhely (-6 és -2) esetében a legjelentősebb, és a fehérje kedvezőtlen konformáció változását jelzi. Ugyanakkor a Y380A/H395A kettős mutáns energia értéke szinte megegyezik a vad típusú enzimével, az ellentétes hatások kiegyenlítik egymást. Ezt a kiegyenlítődést az enzim aktivitások értékében is tapasztaltuk, mindkét egyszeres mutáns jelentősen csökkent aktivitású volt, ellentétben a mindkét mutációt tartalmazó enzimmel, ami a vad típusúhoz hasonló aktivitást mutatott. Az aktív helyen és az SBS2 helyen is mutációt tartalmazó Y105A/Y380A fehérje esetében azt tapasztaltuk, hogy az aktív hely tirozinjának mutációja felelős a változásért, a -6 alhely energiájának nagymértékű csökkenését okozva. Ezeket az eredményeket két közleményben összegeztük [56,57]. Az árpa AMY1 enzim vizsgálata során transzglykozilezést tapasztaltunk a vad típus, az aktív hely és a másodlagos kötőhely mutánsok esetében is. A transzfer reakció mértéke azonban eltérő volt; a vad típus esetében csak a tetramer szubsztráton tapasztaltuk, a másodlagos kötőhely mutánsoknál a tetrameren megnőtt a transzfer reakció aránya és néhány esetben a trimer szubsztráton is megfigyelhető volt. Az aktív hely mutánsok többségénél viszont minden szubsztráton a hidrolízis termékek mellett transzfer termékeket is ki tudtunk mutatni. A transzglykozilezés részletei a 4. 2. fejezetben kerültek kifejtésre.

Az alhelytérképezéshez szükséges BCF kísérleti meghatározása időigényes és költséges eljárás, hiszen kromoforral jelölt oligoszacharidot igényel szubsztrátként és az elválasztás illetve az egyes termékek mennyiségi meghatározása HPLC-módszerrel történik. A röntgenkristallográfiai szerkezetek számítógépes elemzése hatékony módja az enzim-szubsztrát kölcsönhatások vizsgálatának és molekuláris dinamikai számításokkal kiegészítve a kölcsönhatás mennyiségi becslésére is használható. Ezért kísérletet tettünk az aminosav szekvencia illetve röntgenkristallográfiai szerkezetek alapján alhely térképek

jóslására a SUMA programot és a molekulamodellezést kombinálva [58]. Célunk volt egy számítógéppel segített eljárás kidolgozása vad típusú és mutáns α -amilázok feltérképezése céljából a funkcionális jellemzők előrejelzésére és értelmezésére. A vad típusú és mutáns enzimek 3D struktúráinak felépítésére és az energiák számítására a SYBYL programcsomag és az AMBER7_99 erőter alkalmazását találtuk megfelelőnek.

Az enzimek és a szénhidrát szubsztrátok közötti kölcsönhatási energiákat rövid energiainimalizálás után számítottuk ki molekuláris mechanikai programmal. Az eljárás kidolgozásához vad típusú és mutáns α -amilázokból álló oktatókészletet használtunk, melyhez hat különböző eredetű, és eltérő alhely szerkezetű vad típusú enzimet választottunk, az élővilág különböző területeiről (13. ábra). A *Bacillus amyloliquefaciens* α -amiláz (BAA) a bakteriális, az *Aspergillus oryzae* α -amiláz (TAA) a gomba, az árpa AMY1 és AMY2 a növényi, a PPA és a HSA pedig az emlős enzimeket képviseli.



13. ábra. Az oktatókészlethez használt amilázok alhely szerkezete [58]

Ezen enzimek szerkezeti konzervációja sokkal erősebb volt, mint a szekvencia konzerváció, ami reményt adott arra, hogy eljárásunk sikeresen alkalmazható az α -amilázok széles körére. Ezen kívül a mutációk hatásának tanítására két HSA mutáns (Y151M és W58L), valamint öt AMY1 mutáns (Y105A, Y105F, Y105W, T212Y és Y105A/T212Y) ismert, általunk meghatározott kísérleti adatait használtuk fel. A vad típusú enzimeket a kísérleti BCF értékek, valamint az ismert kristályszerkezet alapján választottuk ki, valamennyi mutáns enzim esetében az adatok saját mérésből származtak. Így végül 13 enzim összesen 97 alhely kötési energiáján alapuló modellt állítottunk fel. Bár a kiválasztott

enzimek szekvencia azonossága nagyon eltérő (11-86 %), valamennyi a GH13 családba tartozik és azonos katalitikus mechanizmus szerint működnek.

A szerkezetillesztés során a katalitikus aminosavak és környezetük nagyfokú konzerváltságát és az erősen konzervált régiók jó illeszkedését tapasztaltuk, ami lehetőséget biztosít az eljárás további amilázokra való alkalmazására. A tanító halmazra vonatkozó számítások jó korrelációt mutattak az alhely kötési energiái ($r^2 = 0,827-0,929$) és a kötéshasadási gyakoriságok ($r^2 = 0,727-0,835$) esetében a modellezéssel meghatározott és a mérések alapján számított értékek között.

A módszer teljesítőképeségét további nyolc AMY1 aktív hely mutáns (S48Y, V47A, V47F, V47D, V47K/S48G, V47G/S48D, V47I/S48I és V47L/S48A) általunk meghatározott bontási kép értékei és alhely kötési energiái felhasználásával ellenőriztük. Az alhely kötési energiáinak becslése $r^2 = 0,502$, míg a kötéshasadás gyakoriság becslése $r^2 = 0,538$ korrelációs együtthatót eredményezett. Az eltérések elemzése arra vezetett, hogy különös óvatosságra van szükség, ha az α -amiláz szubsztrátkötő helyén a semleges oldalláncok helyett töltéssel rendelkező aminosav bevezetése történik (és valószínűleg fordítva).

A leírt eljárás segíthet további α -amilázok alhely térképeinek létrehozásában, valamint annak energia értékeit felhasználva a termékeloszlás (BCF értékek) előrejelzésében a SUMA számítógépes program segítségével. A fehérjeszerkezetek jóslását elősegítő programok fejlődésével (AlphaFold) lehetővé vált a szekvencia ismeretében 3D szerkezeteket generálni, amit kombinálva a SUMA programmal alhelytérképek hozhatók létre. További terveim között szerepel ennek a lehetőségnek a vizsgálata a szubsztrátkötő oldalláncok szerepének feltárására, esetleg a fehérjemérnökök igényeinek megfelelő, megváltozott termék összetételt eredményező módosított enzimek tervezésére. Módszerünk kiegészítheti a kísérleti alhelytérképezési eljárást alhelytérképek és bontási képek gyors és olcsó előrejelzésével.

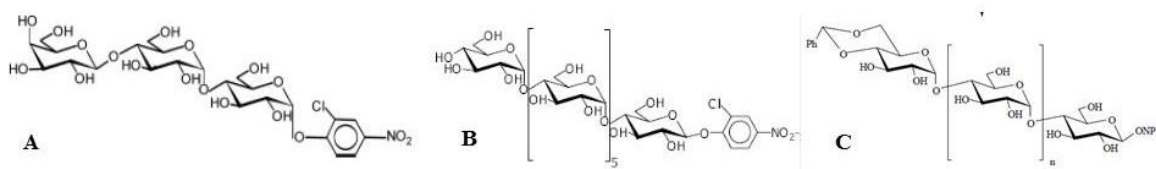
4.1.2. Egy rovar eredetű α -amiláz enzim - LdAmy

A szénhidrátok nélkülözhetetlen energiaforrások a rovarok lárváinak optimális növekedéséhez és többségüknél az imágó életben maradásához is szükségesek. A növényevő rovarok közvetlenül a növényi szövetekből táplálkoznak, sokuk kizárólag keményítő tartalmú magvakkal. A burgonyabogár (*Leptinotarsa decemlineata*, Say) azonban eltérő táplálkozási szokásokkal rendelkezik, mivel az imágók és a lárvák a növények leveleit fogyasztják, és elpusztíthatják a teljes termést. A burgonyabogár gazdasági jelentőségű növényi kártevő, amely kizárólag a *Solanaceae* család tagjait

támadja. Az egyik leginvazívabb növényi kártevő, az ellene való védekezés óriási összegeket igényel. Az amiláz a rovarok emésztésében és szénhidrát-anyagcseréjében részt vevő fő enzim [59]. Néhány rovar α -amiláz szekvenciája ismert, de főként magokat fogyasztó rovarok α -amilázait tanulmányozták, mint például a bab zsizsik (*Zabrotes subfasciatus*) [60], vagy a közönséges lisztbogár (*Tenebrio molitor*) és lárvája a lisztkukac [61]. A *T. molitor* lárva α -amiláz volt sokáig az egyetlen ismert 3D szerkezetű rovar α -amiláz (PDB:1viw [62]), de 2023-ban közöltek egy *Drosophila melanogaster* eredetű rovar α -amiláz szerkezetet is [63].

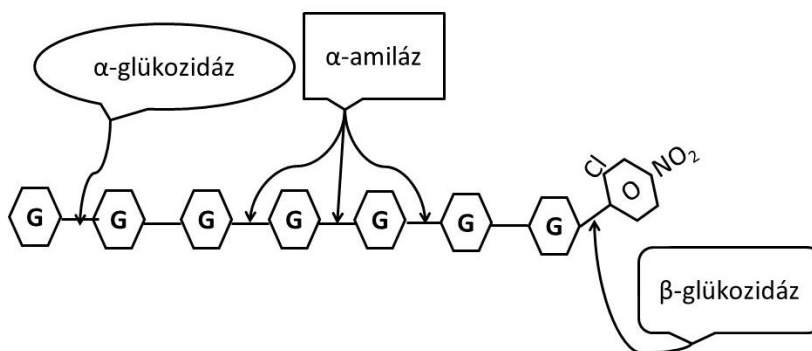
Korábban néhány vizsgálat történt a rovar amilázok *exo/endo* karakterének eldöntésére [64], melyek alapján különböző *Sitophilus* fajokban α -amilázt azonosítottak. A *T. molitor* amiláz enzim bontási kép vizsgálati során dimer-pentamer termékeket mutattak ki [65], míg egy selyemhernyó amiláz termékei dimer-tetramer voltak [66], de részletes kötőhely leírás nem történt ezekre az enzimekre sem. A burgonyabogár α -amilázának néhány tulajdonságát (pl. pH és hőmérséklet optimum) korábban publikálták [67], de az enzimhatás részletei feltáratlanul maradtak.

Célunk az volt, hogy megvizsgáljuk a burgonyabogár bélrendszerében lejátszódó szénhidrát emésztés folyamatát, amihez *in vitro* a rovar fiziológiás sóoldattal készült bélkivonatát és különböző kromofor tartalmú szubsztrátokat használtuk (13. ábra).



13. ábra A rovar amiláz vizsgálatokhoz használt szubsztrátok képletei A) α -(2-klór-4-nitrofenil)- β -1,4-galaktopiranozilmaltozid (GalG2- α -CNP) B) β -2-klór-4-nitrofenil-maltoheptaozid (CNPG7) C) 4,6-O-benzilidén- β -(4-nitrofenil)-maltoheptaozid (BnlG7CNP).

A rovarokból gyűjtött bélkivonat enzimaktivitásainak tesztelésére PNP- α - és PNP- β -glükózid glükózidáz szubsztrátokat, valamint GalG2- α -CNP α -amiláz szubsztrátot és spektrofotometriás aktivitásmérést használtunk. A méréseket kiegészítettük CNPG7 heptamer szubsztráton történő aktivitásméréssel a termékek koncentrációváltozását HPLC módszerrel követve. A bélkivonatban α - és β -glükózidáz és α -amiláz aktivitást azonosítottunk (14. ábra).



14. ábra A burgonyabogár (*L. decemlineata*) bélkivonatban azonosított glikozidázok hatása CNPG7 szubsztráton.

Az burgonyabogár α -amiláz (LdAmy) működésének pontosabb megismeréséhez az oligoszacharid szubsztrátokkal végezett mérések eredményeit a különböző eredetű α -amilázok korábban általunk meghatározott bontási képével vetettük össze (3. táblázat).

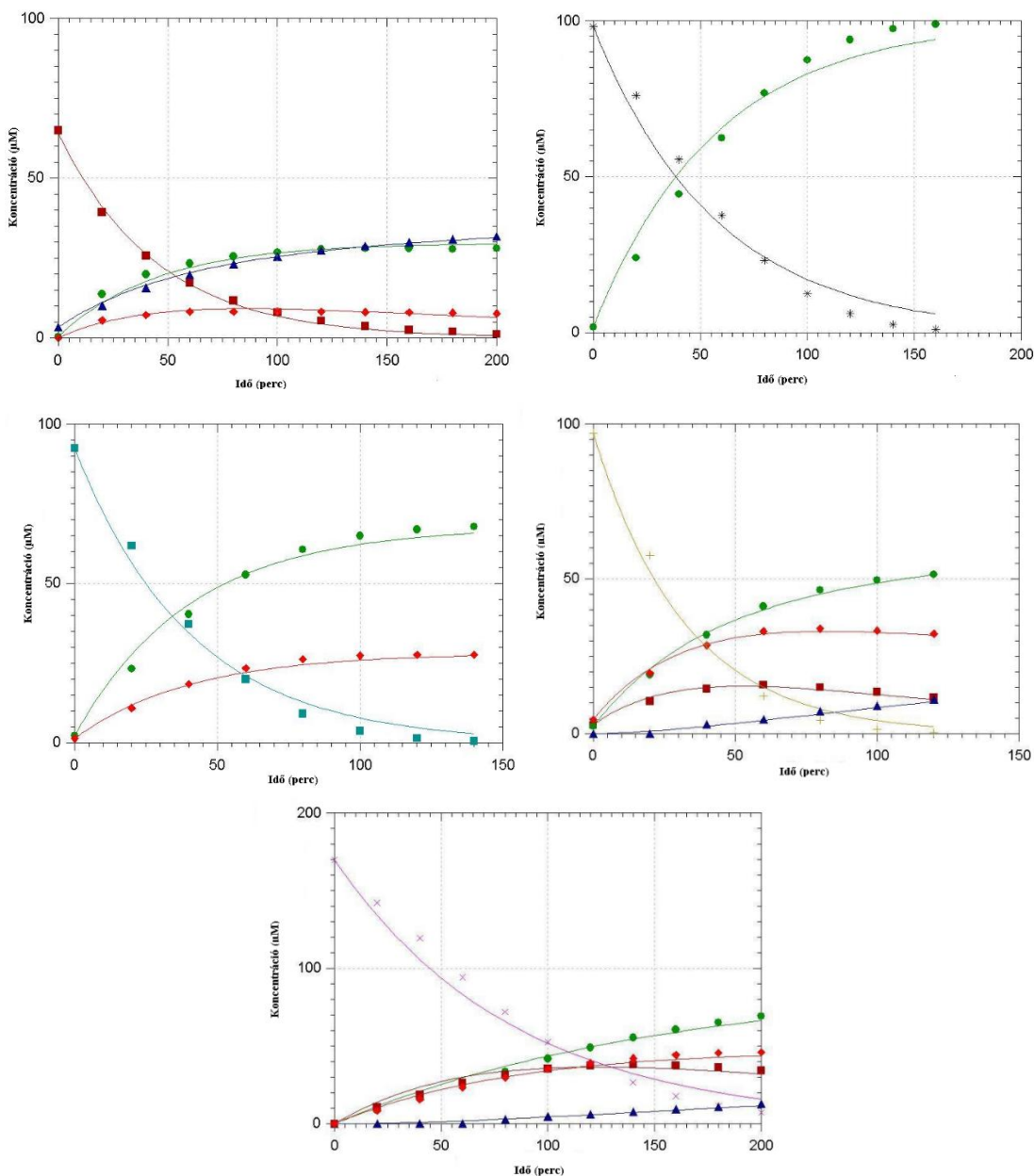
A CNPG7 szubsztrát LdAmy katalizálta hidrolízisének termékarányai a sertés pankréász α -amilázzal kapott arányokkal mutattak legjobb egyezést. A bélkivonatban jelen levő α -glükózidáz hatásának kizárására a méréseket a nem redukáló végén benzilidén csoporttal védett maltoheptaózzal is megismételtük. Ebben az esetben is a PPA bontási képe mutatta a legjobb egyezést [68], ami összhangban volt azzal, hogy a rovar modell enzimnek tekintett a *T. molitor* α -amiláz a PPA-val 50 % szekvencia hasonlóságot mutat és a 3D szerkezetek is hasonlóak [62].

3. táblázat. Maltoheptamer szubsztrátok különböző eredetű α -amilázokkal történő hidrolízisének termékarányai

Szubsztrát	CNPG7				BnlG7CNP7					Hivatkozás
	1	2	3	4	1	2	3	4	5	
Redukáló végi termékek tagszáma										
Enzim										
LDAmy	0	39	36	24	8	26	64	2	0	[68]
PPA	0	41	33	26	0	20	80	0	0	[36]
HSA	0	18	50	32	0	67	12	11	10	[69]
BLA	5	84	11	0	5	67	33	0	0	[6]
árpa AMY1	95	2	2	1	-	-	-	-	-	[42]
árpa AMY2	68	8	12	11	-	-	-	-	-	[42]

A szerkezeti hasonlóság felveti a lehetőséget, hogy az emlős amilázokon már hatásosnak bizonyult inhibitorokat esetleg a rovar elleni védekezésben is alkalmazni lehet. Ebben az esetben még az sem okozna problémát, hogy az így kezelt növény keményítő tartalma nem emésztődik az inhibitor jelenléte miatt, hiszen a rovar és az ember nem ugyanazt a növényi részt fogyasztja.

Az LDAm_y részletes vizsgálatához az enzimet keményítő gélen történő affinitáskromatográfiával tisztítottuk, homogenitását SDS-PAGE módszerrel ellenőriztük és aktivitásmérésekkel igazoltuk, hogy nem tartalmaz α - és β -glükozidázt. Felvettük a 4-8 tagszámú szubsztrátok átalakulásának és a különböző hosszúságú termékek keletkezésének kinetikai görbéit valamennyi oligomeren a reakciót HPLC-vel követve (15. ábra). A görbék kezdeti szakaszából termékarányokat számoltunk az alhelytérkép készítéséhez. Az LdAm_y CNPG2-t redukáló végi terméket hasít a CNPG4-ről, CNPG5-ről és CNPG6-ról 0,47, 1,00 és 0,70 arányban. A lánc hosszának növekedésével a támadás maximális gyakorisága a szubsztrát nem redukáló vége felé tolódik el. A CNPG7 és CNPG8 esetében egyenlőbb eloszlás figyelhető meg a termékarányokban, de nem redukáló végről mindig a maltotetraóz felszabadulása a domináns.



15. ábra A CNP-maltooligomerek LdAmy katalizálta hidrolízise során a szubsztrát és a termékek koncentrációjának időbeni változása, valamint az illesztett kinetikai görbék (CNPG₈: X, CNPG₇: + CNPG₆: ■ CNPG₅: + CNPG₄: ■, CNPG₃: ♦, CNPG₂: ●, CNPG: ▲).

Fontos megjegyezni, hogy a CNPG3 és CNPG4 termékek aránya közel azonos a heptamer szubsztrát hidrolízisének kezdetén. A CNPG3 a legrövidebb tetramer szubsztrát esetén is megjelenik a hidrolízis termékeként. A kísérleti pontokra görbét illesztettünk, párhuzamos és konszekutív reakciók feltételezésével felépített modell alapján. A koncentráció-idő adatpárokat a Scientist® programmal értékeltük ki. A kinetikai állandókat (k) úgy határoztuk meg, hogy első hidrolízis lépésként párhuzamos reakciókat, majd egymást követő reakciókat tételezünk fel az LdAmy-katalizált hidrolízis kinetikai modelljeként. A kapott mérési pontokat és az illesztett görbét a 15. ábra mutatja. Az

összefüggéseket az oktamer hidrolízis példáján mutatom be, a további részletek a hivatkozott közleményben találhatóak. Az oktamer szubsztrát molekula (S8) több módon kötődhet az LdAmy aktív centrumába, így párhuzamos reakciókban tetramer (S4), trimer (S3) és dimer (S2) kromofor jelzett termékek keletkeznek. A párhuzamos lépések látszólagos sebességi állandói k_{nx} , ahol n a monomer egységek (G-glükóz) száma a szubsztrátban, x a G egységek száma a redukáló végi termékben.

A reakciótermékeken további egymást követő hidrolízis lépések történhetnek, amelyek S3-t, S2-t és S-t termelnek a tetramerből, valamint S-t a trimerből. Differenciálegyenletek (2-6 egyenletek) írhatók fel a szubsztrátok és a végtermékek koncentrációinak időbeli változásaira:

$$\frac{d[S_8]}{dt} = -k_{84}[S_8] - k_{83}[S_8] - k_{82}[S_8] \quad (2)$$

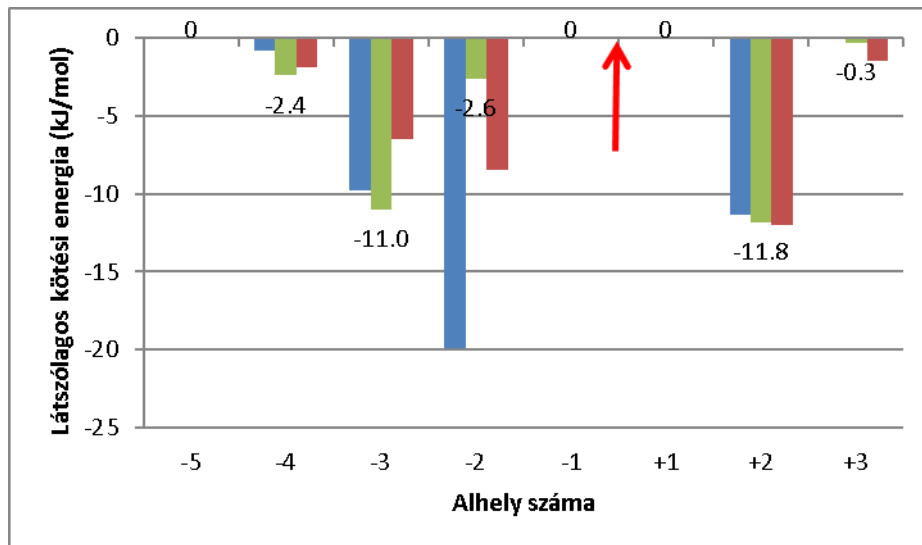
$$\frac{d[S_4]}{dt} = k_{84}[S_8] - k_{43}[S_4] - k_{42}[S_4] - k_{41}[S_4] \quad (3)$$

$$\frac{d[S_3]}{dt} = k_{83}[S_8] + k_{43}[S_4] \quad (4)$$

$$\frac{d[S_2]}{dt} = k_{82}[S_8] + k_{42}[S_4] \quad (5)$$

$$\frac{d[S]}{dt} = k_{41}[S_4] \quad (6)$$

Az első párhuzamos lépésekre kapott sebességi állandókból számított arányok jól egyeznek a kezdeti szakaszból meghatározott termékarányokkal. Az így kapott adatokat használtuk a SUMA program bemeneti BCF értékeiként az alhely térkép számításához. A kapott alhely térképet két emlős α -amilázzal összehasonlítva mutatom be a hasonlóságok és eltérések szemléltetésére (16. ábra).



16. ábra: A rovar és emlős amilázok alhely térképei. LDAMY (zöld), HSA (kék)[68] PPA (piros)[36]. A piros nyíl a hidrolízis helyét jelöli, az LDAMY látszólagos kötési energiáinak értékei feltüntetve (kJ/mól),

Az aglikonkötő régió megegyezik a három enzimben, de lényeges különbség látható a glikon kötő régióban.

Feltételeztük, hogy a különbségek az aminosav szekvencia eltérései miatt jelentkeztek, ezért a *L. decemlineata* alfa-amiláz szerű fehérjéjének aminosav szekvenciáját összehasonlítottuk néhány ismert α -amilázéval, mint a HSA, PPA és a *Tenebrio molitor* α -amiláz. Többszörös szekvencia-illesztést végeztünk a CLUSTAL Omega 1.2.4-es verziójával. A szubsztrátkötésben szerepet játszó aminosavakat a 4. táblázatban foglaltam össze. A szekvencia azonosságok alacsonyok ezek között a fehérjék között, de a hasonlóság sokkal jobb, különösen a konzervált régiókban. A katalitikus aminosavak (Asp197 és Glu233) és az aglikonkötő helyek aminosavai (+1) és (+2) azonosak, de van néhány jelentős különbség a glikonkötő régióban.

4. táblázat: Az LDAm, a HSA, a PPA és a TMA szubsztrát kötődésében részt vevő aminosavai

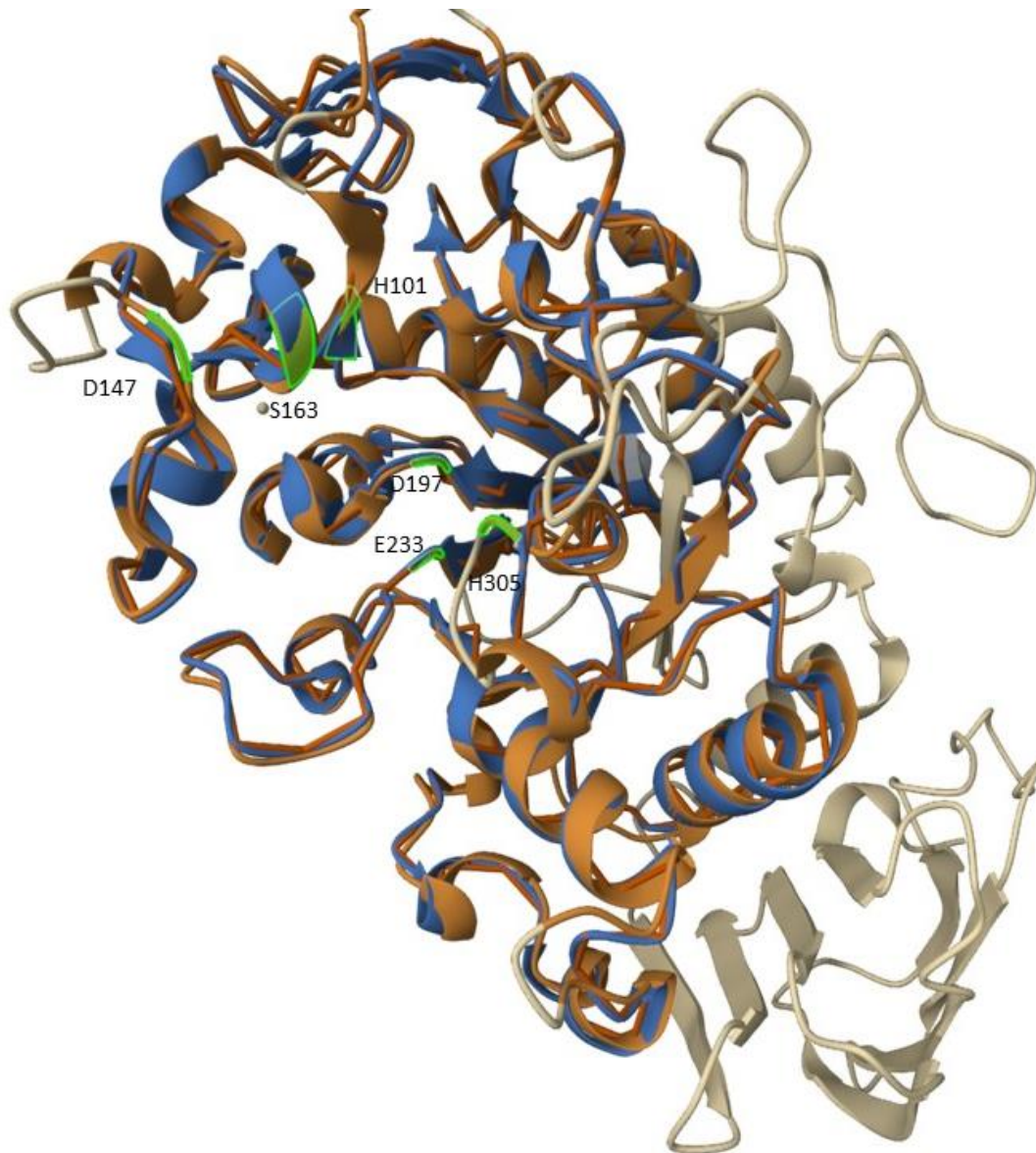
Alhely	Aminosav ^a (az LDAm szekvenciában elfoglalt pozíció)			
	HSA ^b	LDAm	PPA	TMA
-4	Asp147 Asn105	Thr147 (101) Gln105	Gly147 Ser105^c	Glu147 Met105
-3	Ser163 Gln63 Asp356	Val163 (117) Gln63 Asp356	Val163 Gln63 Asp356	Val163 Gln63 Asp356
-2	Trp58 Trp59 Tyr62 His305	Trp58 Trp59 Tyr62 Asp305 (253)	Trp58 Trp59 Tyr62 His305	Trp58 Trp59 Tyr62 Gly305
-1	His101 Arg195 <i>Asp197</i> His299 Asp300	Asp101 (65) Arg195 <i>Asp197(151)</i> His299 Asp300	His101 Arg195 <i>Asp197</i> His299 Asp300	His101 Arg195 <i>Asp197</i> His299 Asp300
+1	His201 <i>Glu233</i> Ile235	His201 <i>Glu233(188)</i> Ile235	His201 <i>Glu233</i> Ile235	His201 <i>Glu233</i> Ile235
+2	Tyr151 Lys200 Glu240	Tyr151 Lys200 Glu240	Tyr151 Lys200 Glu240	Tyr151 Lys200 Glu240

^a A számozás az 1SMD HSA szekvencia alapján történt

^b Az aminosav pozíciója a HSA aktív helyén [70]

^c Az aminosav pozíciója a PPA aktív helyén [71]

Az LDAm-ben a (-4) alhely poláris, de töltetlen aminosavat (Thr) tartalmaz a 147 pozícióban, ahol egy nem poláris (Gly) található a PPA-ban. A HSA és a TMA egyaránt savas aminosavat tartalmaz (Asp) és (Glu) ebben a pozícióban, de a savamid Asn helyett Met van a TMA-ban. Ezek a különbségek indokolhatják azt a csekély eltérést, amely az alhely térképen ezen a helyen jelenik meg. Sokkal nagyobb különbség van a (-2) alhelyet körülvevő aminosavak kötési energiájában és polaritásában. A HSA-ban és PPA-ban jelenlévő pozitív töltésű aminosavat (His305) egy savas, negatív töltésű (Asp) helyettesíti az LDAm-ben és egy apoláris Gly a TMA-ban. Ezenkívül az alhely közelében lévő His101 is Asp-re változik LDAm esetén. Ez jelentős különbség, ami a kötési energiákban is megnyilvánul. Érdekes módon a Val163 apoláris aminosav megtalálható a (-3) alhelyen az összes vizsgált enzimben, kivéve a HSA-t. Az is látható, hogy a TMA és az LDAm között is vannak szekvenciakülönbségek az aktív helyen és összességében a TMA szekvenciája jobban hasonlít az emlős α -amilázokra mint az LDAm [72].



17. ábra Szerkezet összehasonlítás HSA: (barna) 1SMD LdAmy: (kék) AF-A0A0F6TN63-F1 AlfaFold jósolta szerkezet a *L. decemlineata* 1-300 aminosav szekvencia részletére. A szövegben hivatkozott eltérések zölddel kiemelve.

A szekvencia eltérések 3D szerkezetben való elhelyezkedését is ellenőriztem a jelenleg hozzáférhető 300 aminosavat tartalmazó szekvenciárészlet AlfaFold által jósolta szerkezetével és a HSA szerkezet összevetésével. A 17. ábrán zölddel jelölve látható, hogy a kiválasztott aminosavak a 3D szerkezetben pontos fedésben vannak. Kivétel a His305, ami az LdAmy-ből hiányzó glicin gazdag hurok része, ennek közvetlen közelében található az Asp253 az LdAmy szekvenciában.

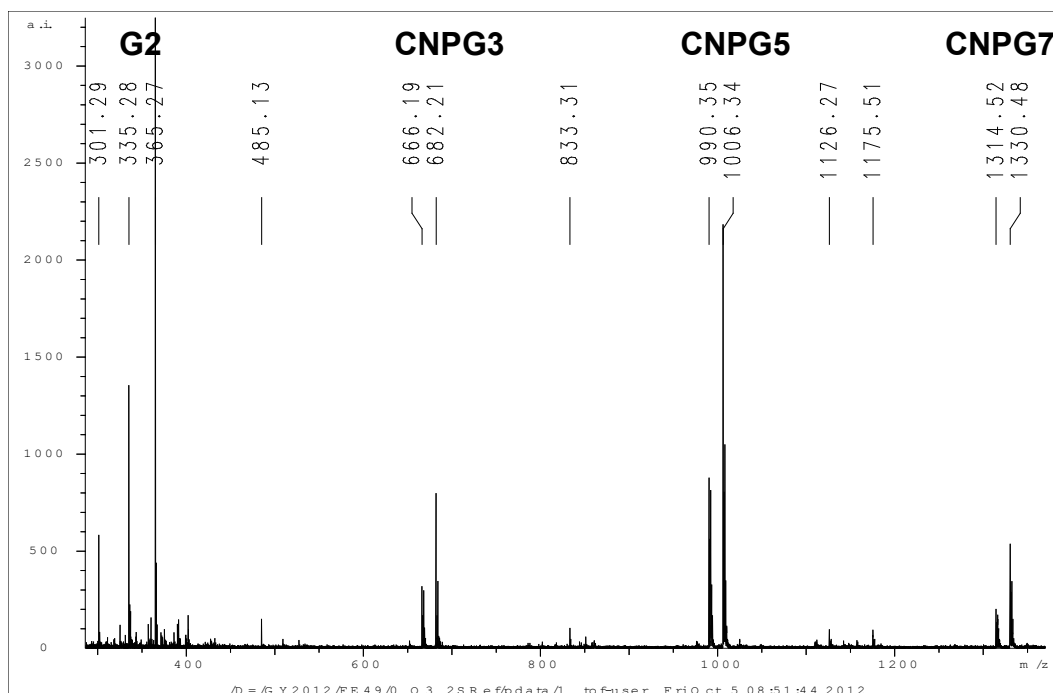
4.1.3. Édesburgonya eredetű β -amiláz enzim

Az édesburgonya eredetű β -amiláz (EC 3.2.1.2) az *exo* hatásmódú enzimek képviselőjeként került kutatási célpontjaim közé. Az β -amilázok modellenzimeként tekinthető, mivel a növény gumójában (*Ipomoea batatas*) az összes oldható fehérje körülbelül 5%-át teszi ki, és könnyen kinyerhető. Más gumós gyökerek csak nyomokban mutatnak β -amiláz aktivitást [73], de magasabb rendű növényekben, például szója- és árpamagban [74], valamint többféle baktériumban és gombában is elterjedtek [75].

Az enzim a keményítő (1,4)- α -D-glikozidos kötéseinek hidrolízisét katalizálja, maltóz egységek hasításával a nem redukáló végekről. Az enzim a glikozid-hidroláz GH14 családjába tartozik, így nemcsak az *exo*, hanem az invertáló mechanizmussal működő glikozidázokra is példa, mivel a hidrolízis termék β -anomer konfigurációjú. Az édesburgonya β -amiláz négy azonos alegységből áll, amelyek a $(\beta/\alpha)_8$ hordós szerkezeten kívül három hosszú hurkot és egy kiterjesztett C-terminális hurkot is tartalmaznak [76]. Az aktív centrum egy 18 Å mély hasadékban található, és tartalmazza a két konzervált Glu katalitikus aminosav oldalláncot. Aminosav szekvenciája 67-68 % azonosságot mutat a szójababból és árpából származó β -amilázokkal [77]. A β -amilázra véletlenszerű kötődési mechanizmust javasoltak, és igazolták a „multiple attack” - többszörös hasítást. Eszerint a szubsztrát bekötődése után egyetlen ES komplexből több maltóz egység hasad egymást követően a szubsztrát disszociációja nélkül [77].

Vizsgálatainkat ebben az esetben is a különböző tagszámú (DP 3-11) CNP-maltooligomerek hidrolízisét HPLC-vel követve végeztük. Először katalitikus hatékonyságot (k_{cat}/K_m) határoztunk meg minden szubsztrátra kis koncentrációjú szubsztrát oldatokon, alacsony konverzió mellett a reakciót a szubsztrátkoncentráció csökkenésével követve. Az ilyen körülmények mellett mért kezdeti sebesség (v_0) lineáris függvénye a szubsztrátkoncentrációnak [S], a meredekség arányos az enzim katalitikus hatékonyságával.

A katalitikus hatékonyság értékek a pentamernél hosszabb szubsztrátokra már nem változtak jelentősen. Ugyanakkor a kromatogramokon már kis konverziónál is több termék jelent meg, ami többszörös hasításra utal. A párhuzamos reakciók lehetőségét MALDI TOF MS méréssel zártuk ki. A 18. ábrán bemutatott spektrum szerint a CNPG7 szubsztrátból CNPG5 és CNPG3 redukáló végi termék keletkezett, szabad oligoszacharidként viszont csak a maltóz volt jelen.



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.

Az édesburgonya β -amiláz többszörös támadási mechanizmusát Monte Carlo szimulációval korábban igazolták a redukáló végen radioaktív jelzett páratlan tagszámú maltooligomerek (DP 7-11) hidrolízis termékeinek papírkromatográfiás analízisével nyert adatok [79] alapján. A páros számú szubsztrátokra nem lehetett számításokat végezni, mivel a termékanalízissel nem tudták megkülönböztetni a redukáló végi és a nem redukáló végi maltóz terméket. A második hasítás valószínűségére 0,6 értéket kaptak a lánchossztól függetlenül [80].

A processzív lépések átlagos számának (n) kiszámításához a (7) egyenletet használtuk, amit nukleinsav motor enzimek processzivitásának jellemzésére vezettek be [18].

$$n = \frac{P}{1-P} (1 - P^N) \quad (7)$$

ahol P a második hasítás valószínűsége az enzim-termék komplex (EP) disszociációja nélkül, $1-P$ a termék disszociációjának valószínűsége, N pedig a lehetséges lépések száma.

Esetünkben a redukáló végi CNP csoport lehetővé tette P számítását páros tagszámú szubsztrátok esetén is a HPLC-vel meghatározott termékarányokból; így a vizsgált szubsztrátokra az 5. táblázatban összefoglalt értékeket kaptuk. Láthatóan a szubsztrát lánchosszának növekedésével nő a lépések átlagos száma is, az összefüggés lineáris és a

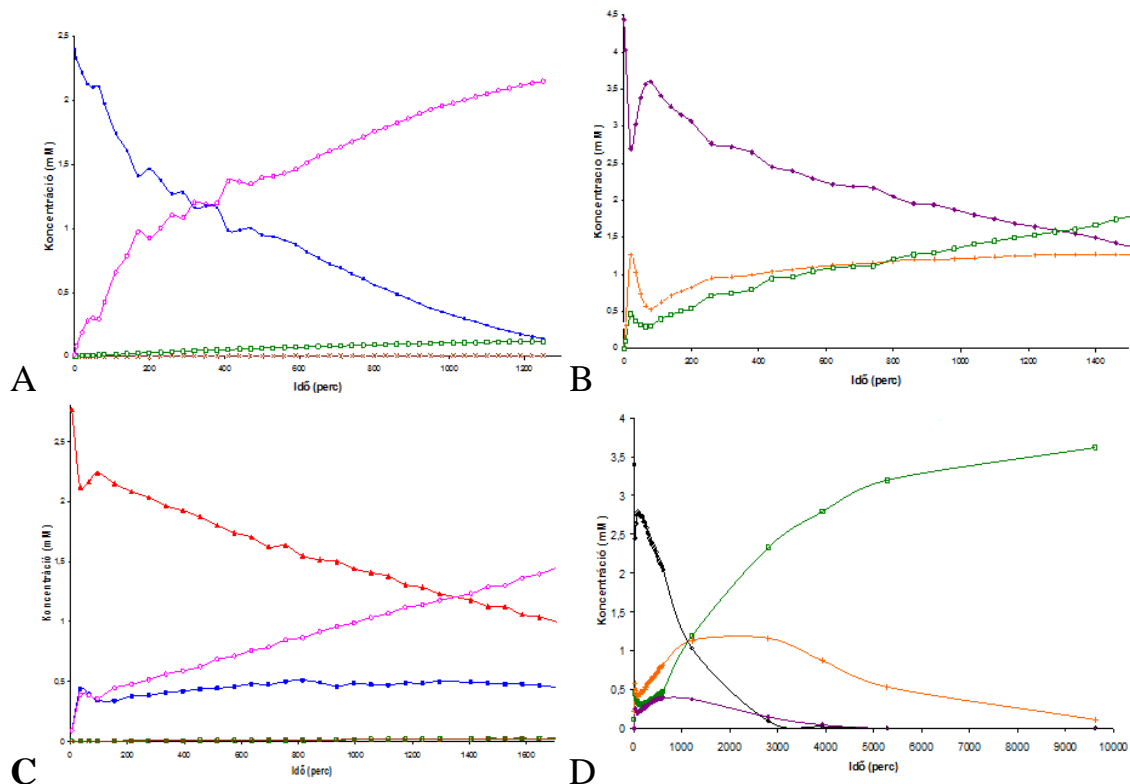
pentamer esetén válik nullává. Ez érthető, hiszen az első hasítás termékeként keletkező trimer hidrolízise már nagyon lassú.

5. táblázat Édesburgonya α -amiláz második hasítási lépésének valószínűsége (P) különböző tagszámú (DP) szubsztrátokon és a lépések átlagos száma (n)

DP	P	N	n
5	0	1	0
6	0,26	2	0,33
7	0,50	2	0,75
8	0,80	3	1,95
11	0,93	4	3,34

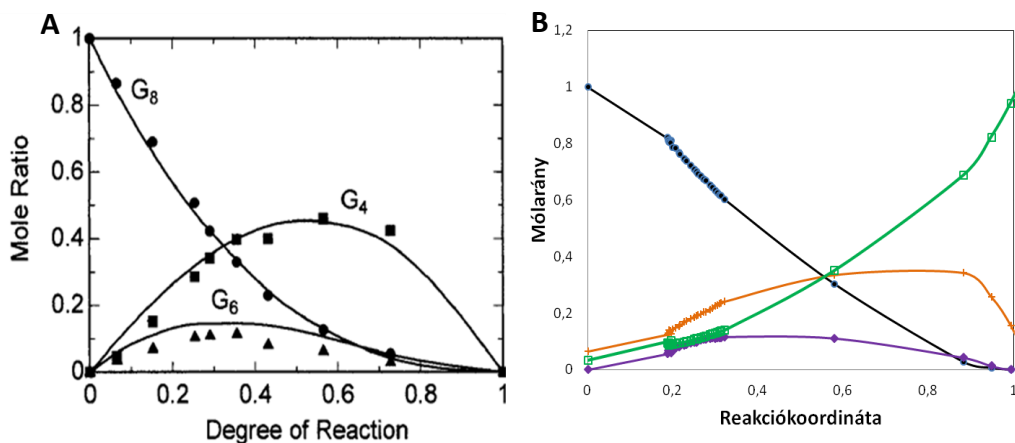
A rendelkezésre álló szubsztrátok 2-4 mM koncentrációjú oldatainak teljes hidrolízisét is végigkövettük szakaszos mintavételt követően HPLC módszerrel, a kapott kinetikai görbék a 19. ábrán láthatóak.

A szubsztrátok hidrolízise minden esetben a nem redukáló végi maltóz egységek hasításával indul. A görbéken jól követhető a már korábban tárgyalt processzív hasítás és néhány új következtetést is levonhattunk. A processzív hasítás eredményezi, hogy a kezdeti gyors szakaszban több termék jelenik meg, és ezek száma és a processzivitás mértéke is nő a lánchossz növelésével. A hexamerből még az elsődleges termék a tetramer keletkezik nagyobb arányban, de a heptamernél már azonos az egy és a két maltóz hasítással keletkező termékek mennyisége, az oktamer esetén pedig a két hasítást igénylő tetramer a fő termék, miközben a három hasítással keletkező dimer aránya azonos az elsődleges hexamer termékével.



19. ábra CNP maltooligomerek (DP 5-8) édesburgonya β -amiláz (30 μ M) katalizálta teljes hidrolízisének kinetikai görbéi. A) ■ CNPG5, B) \diamond CNPG6, C) \blacktriangle CNPG7, D) • CNPG8
x CNPG, \square CNPG2, \circ CNPG3, + CNPG4,

Bár a korábbi eredmények szerint a tetramer hidrolízise olyan lassú, ami meggátolja a páros számú szubsztrátokra a teljes reakciót leíró szimulációt [80], méréseink szerint a teljes hidrolízis végbemegy, igaz, hogy ehhez nagyon hosszú idő szükséges (19D ábra).



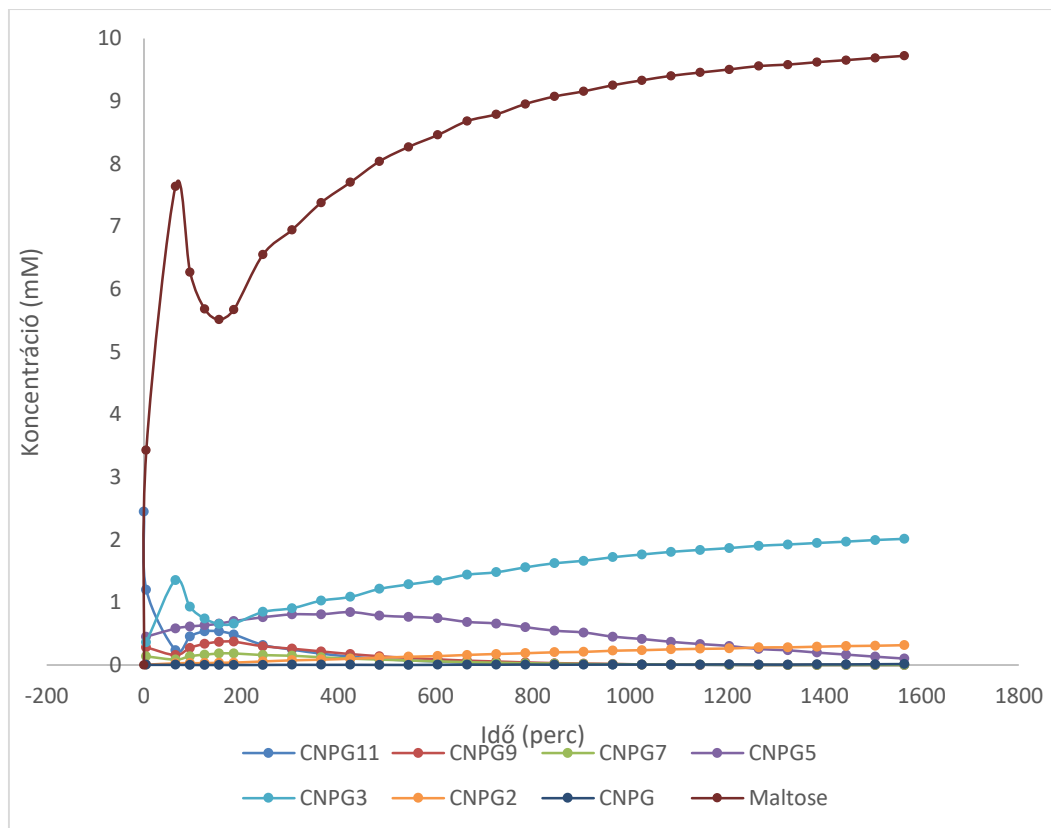
20. ábra: A) Édesburgonya β AMY által katalizált G_8 szubsztrát hidrolízisének VRK mérésekből származó értékei és Monte-Carlo szimulációval a kapott pontokra illesztett görbék [81]
B) Édesburgonya β AMY által katalizált HPLC módszerrel nyomon követett CNPG8 szubsztrát hidrolízis reakciójából számított reakciókoordináták CNPG8 kék, G_6 CNP lila, CNPG4 narancs, CNPG2 zöld.

Összevetve a korábbi, szimulációval kapott görbéket [80] saját méréseinkkel, a 20. ábrán jól látható a különbség, amit a redukáló végi maltóz termék figyelembevétele okoz. A 20B.

ábrán bemutatott mérési pontokra nem történt görbe illesztés, azok csak a szemléletesség érdekében vannak összekötve.

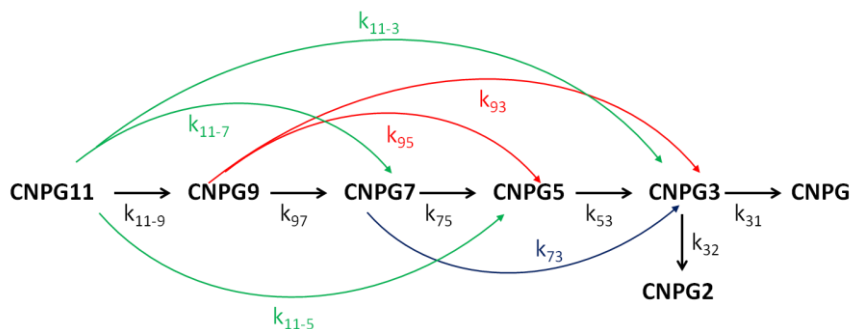
Nemcsak a tetramer, hanem még a trimer is hidrolízist szenved, amit igazol, hogy a pentamer szubsztrát teljes hidrolízise során CNPG2 is keletkezik (19A ábra), ez viszont nem a várt maltóz, hanem glükóz hasítását jelenti a nem redukáló végről [81].

A rendelkezésünkre álló leghosszabb szubsztrát (DP 11) hidrolízisének követésekor bonyolult termékeloszlást kaptunk (21. ábra), aminek értelmezéséhez a processzív lépések mellett transzglykozilezést is feltételeztük. Ez a spontán maltóz transzfer megfigyelhető a hidrolízis korai szakaszában minden szubsztrát esetében, ahol a processzív hasítás lehetséges, de ennél a szubsztrátnál a legkifejezettebb. Az ábrán jól látható, hogy a szubsztrát és a kezdeti gyors hidrolízis lépések termékeinek koncentrációja újra növekszik az első két órában. Ezt maltóz transzferrel értelmeztük, figyelembe véve hogy a maltóz nagy koncentrációban keletkezik már a reakció kezdeti szakaszában (a 21. ábrán feltüntetett maltóz koncentráció értékeket a redukáló végi termékek mért koncentrációiból számoltuk). A retenciós mechanizmussal működő glikozidázok transzglykozilezési reakciói részletesen tanulmányozottak [82-84]. Inverziós glikozidázokra nem jellemző a transzglykozilezés, bár néhány enzimet sikeresen alakítottak át „glikoszintázá” [85-87]. Ez az első példa, hogy maltooligomer hidrolízise során transzglykozilezést tudunk megfigyelni egy inverziós glikozidáz esetében.



21. ábra: CNPG11 (2,45 mM) szubsztrát édesburgonya β -amiláz ($3,2 \times 10^{-8}$ M) katalizálta teljes hidrolízise (pH 5,0). A koncentráció adatokat HPLC termékanalízissel kaptuk, a maltóz mennyiségét számítottuk..

A kísérleti eredmények alapján felállítottunk egy modellt a β -amiláz hidrolízis mechanizmusára és a kezdeti szakasz elhagyásával a modell jó illeszkedést mutatott a mért adatokra. A 22. ábra szemlélteti a feltételezett reakciólépéseket. A pentamer processzív hasítását nem tételeztük fel a korábbi mérésünk alapján, és nagyon kis értéket kaptunk a k_{31} sebességi állandóra összhangban azzal a tapasztalattal, hogy a trimerből inkább a glükóz hasítás kedvezményezett [80].



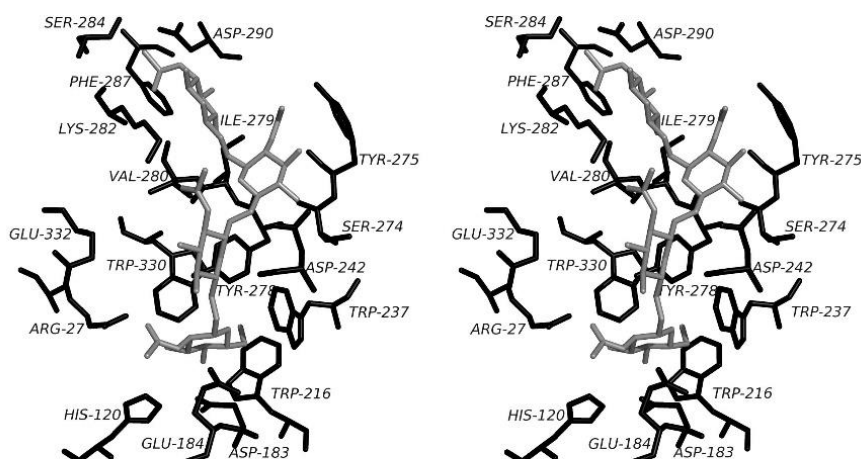
22. ábra: CNPG11 szubsztrát édesburgonya β -amiláz által katalizált teljes hidrolízisének reakciómodellje, párhuzamos és egymást követő reakciólépéseket feltételezve. k_{xy} reakciósebességi állandó az x tagszámú szubsztrát y tagszámú redukáló végi termék eredményező hidrolízis lépésére. Feketével jelölve az elsődleges hidrolízis lépések, zölddel a kiindulási szubsztrát, pirossal az első termék, kézzel a második termék processzív lépései [81].

4.1.4. Egy oldható β -N-acetil-glükózaminidáz: a *DispersinB* enzim

Az *exo*-enzim vizsgálatok másik célenzime a *DispersinB* volt, amely a biofilmet felépítő N-acetil-glükózamin (GlcNAc) egységekből álló poliszacharid lebontásáért felelős, és a szájbán előforduló patogén mikroorganizmus az *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* termeli. Az enzim fontos szerepet tölt be a mikroorganizmus biofilmből való kiszabadulásában.

A DspB szubsztrátspecifitásának felderítése és a DspB aktív helyén található aminosavak azonosítása érdekében molekuláris modellezési vizsgálatok történtek $\beta(1,4)$ és $\beta(1,6)$ -kötésű oligoszacharidok és a DspB enzim között az enzim kristályszerkezetének (PDB 1YHT) [26] felhasználásával. A vizsgálat kimutatta, hogy a $\beta(1-4)$ kötésű oligomerek eltérő, és kevésbé hatékony orientációban kötődnek, mint a $\beta(1-6)$ kapcsolt szubsztrátok. A tetraszacharidok esetében a $\beta(1-6)$ -kötés görbülete lehetővé teszi, hogy további érintkezésbe lépjen a DspB szélesebb kötőhelyével, ami erősebb kötődést eredményez. Az is kiderült, hogy a hidrogénkötés önmagában nem magyarázza nagyobb stabilitást, ehhez a hidrofób (van der Waals) kölcsönhatások is nagymértékben hozzájárulnak.

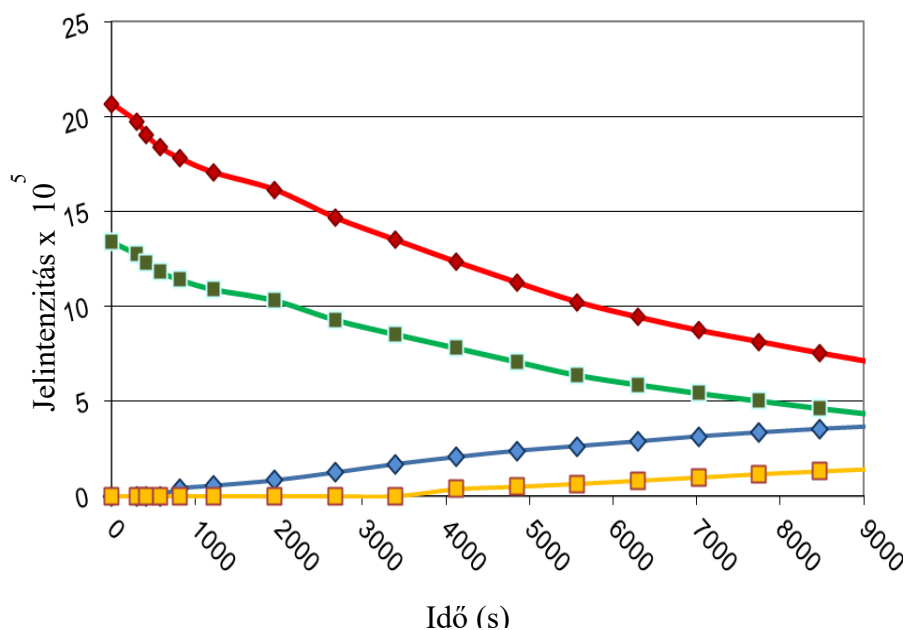
A DspB-tetraszacharid modell aktív hely architektúrájának számos olyan tulajdonsága van, amely a hexózaminidázokra jellemző. Ezek közé tartozik egy Glu jelenléte a glikozidos kötés közelében, valamint három Trp, ami a láncvégi monomer egységet veszi körül [88]. A DspB: $\beta(1,6)$ -tetraszacharid komplex (23. ábra) azt mutatta, hogy számos aminosav alkotja a legalább négy -1 , $+1$, $+2$ és $+3$ alhelyet tartalmazó aktív helyet. Az Arg27, His120, Asp183, Glu184, Trp216, Trp237, Tyr278 és Trp330 aminosavak a -1 alhelyhez tartoznak, amelyet általában egy a szubsztrát nem redukáló végén található GlcNAc tölt be. A legtöbb hexózaminidázban megtalálható His120 szintén a -1 alhely közelében található.



23. ábra A DspB enzim $\beta(1,6)$ kötésű GlcNAc tetraszachariddal alkotott komplexének sztereodiagramja. A fehérjeatomokat feketével, míg a tetraszacharid atomjait szürkével jelöltük. Négy alhely látható, az ábra alján -1 , felül pedig a $+3$. A -1 alhely közvetlen közelében Asp183, Glu184 és Arg27 található ($<3,5$ Å), amelyek kölcsönhatásba lépnek egy GlcNAc egységgel. Számos más 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 [89].

Bár a -1 alhely erősen konzervált a GH20-as enzimcsaládban, jelentős különbségek vannak a kötőhelyek többi részét alkotó aminosavak között. Például humán és bakteriális hexózaminidázokban a Trp685 és Trp408 aminosavak hidrofób kölcsönhatást tesznek lehetővé a $+1$ alhellyel. Az ekvivalens Trp oldalláncok hiánya a DspB esetén összhangban van az ívelt $\beta(1,6)$ kötésű oligomer miatti konformációs különbséggel.

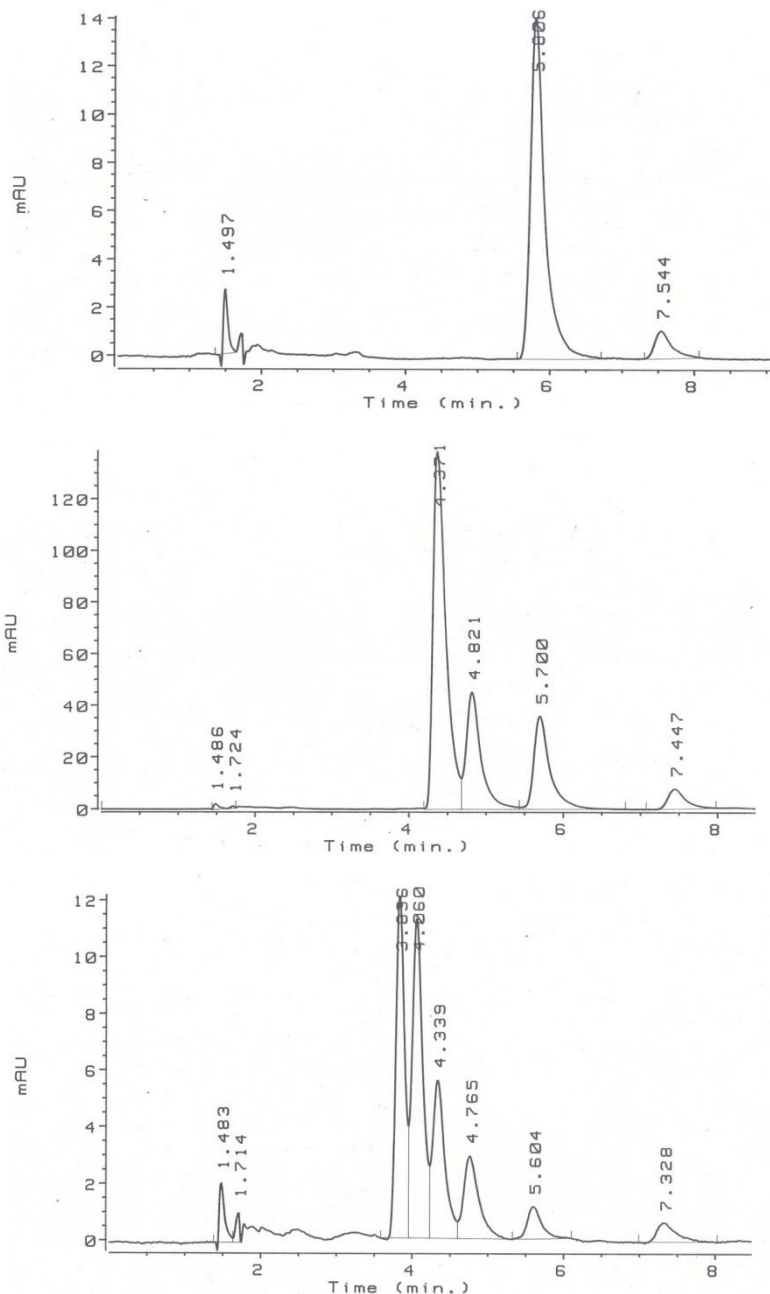
Feltételeztük, hogy az enzim retenciós mechanizmus szerint működik és ennek igazolására $^1\text{H-NMR}$ méréseket végeztünk. A 4-nitrofenil- β -D-N-acetilglükózamin szubsztrát hidrolízisét követve (24. ábra) látható, hogy a PNP-glikozid aromás és β -anomer proton jeleinek intenzitás csökkenésével párhuzamosan nő a szabad PNP aromás jeleinek intenzitása. Az α -anomer jel intenzitás növekedése később indul be, miután az elsődleges β -anomer termék (melynek anomer proton jeleit a vízjel elfedi) egy része mutarotációval α -anomerré alakul.



24. ábra A különböző proton csúcsokhoz tartozó jelintenzitások változása az $^1\text{H-NMR}$ mérés során (\blacklozenge -aromás protonok jele a glikozidban, \blacklozenge -aromás protonok jele a szabad PNP-ben, \blacksquare - β -anomer protonok jele a glikozidban, \blacksquare -szabad monoszacharid α -anomer protonok jele)

Annak eldöntésére, hogy a DspB *endo* vagy *exo* módon ható enzim, a Debreceni Egyetem-MTA Szénhidrátkémiai Kutatócsoportjával együttműködve szubsztrát sorozatot terveztünk. A DP 2,4,6 tagszámú, béta(1-6) glikozidos kötésekkel összekapcsolódó GlcNAc egységeket tartalmazó, a redukáló végen 4-metoxi-fenil (PMP) kromofor csoportot hordozó oligoszacharidok hidrolízis termékeinek HPLC analízise igazolta, hogy az enzim oligomer szubsztrátokon is aktív.

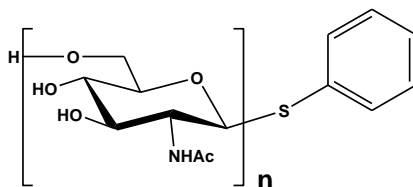
Amint az a 25. ábrán látható mindhárom $\beta(1,6)$ kötésű GlcNAc oligoszacharid esetében megjelentek a $n - 1$ tagszámú oligoszacharidok. Az első hasítás $n-1$ termékei tovább bomlanak, így $n-2$, $n-3$ tagszámú oligoszacharidok keletkeznek.



25. ábra Dimer, tetramer és hexamer szubsztrát DispB enzim katalizálta hidrolízisének HPLC termékanalízise.

A dimerből PMP-GlcNAc keletkezik, de nagyon alacsony monomer intenzitással mivel a béta kötésű p-metoxi-fenol aglikon hasítása is bekövetkezik az enzim hatására. A GlcNAc tetramer szubsztrát enzim hidrolízise trimer (48,5%), dimer (41,4%) és monomer (10,1%) vegyületeket eredményezett. Hasonlóképpen, a hexaszacharid pentamer (45,7%), tetramer (25,6%), trimer (17%), dimer (6%) és monomer (5,7%) termékek képződését eredményezte. Ezzel igazoltuk, hogy az enzim a szubsztrát nem redukáló végéről monomer egységet hasít, ami alapján béta(1-6) kötésekre specifikus *exo* hatásmechanizmusú hexózaminidázként azonosítottuk [89].

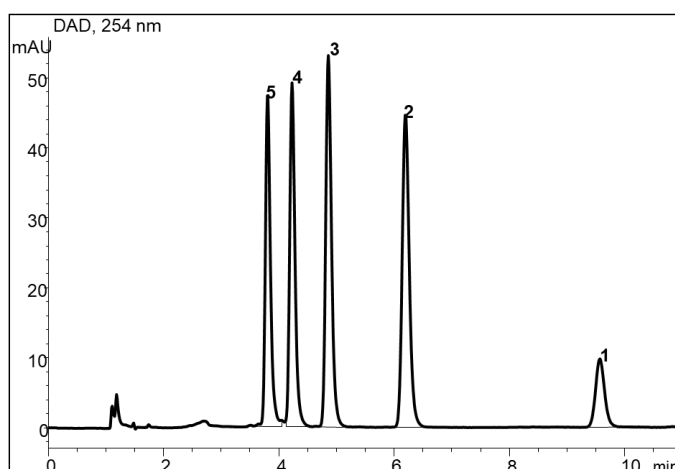
Mivel ezzel a szintézis úttal csak páros számú szubsztrátokat lehetett előállítani, amiben β -glikozidos kötése miatt az aglikon is hasítható a DspB enzimmal, ezért új, tioglikozidos kötésű komofor aglikont tartalmazó szubsztrátokat terveztünk (26. ábra).



26. ábra $\beta(1,6)$ kötésű GlcNAc tiofenil glikozid szubsztrátok szerkezete. $n=2-5$

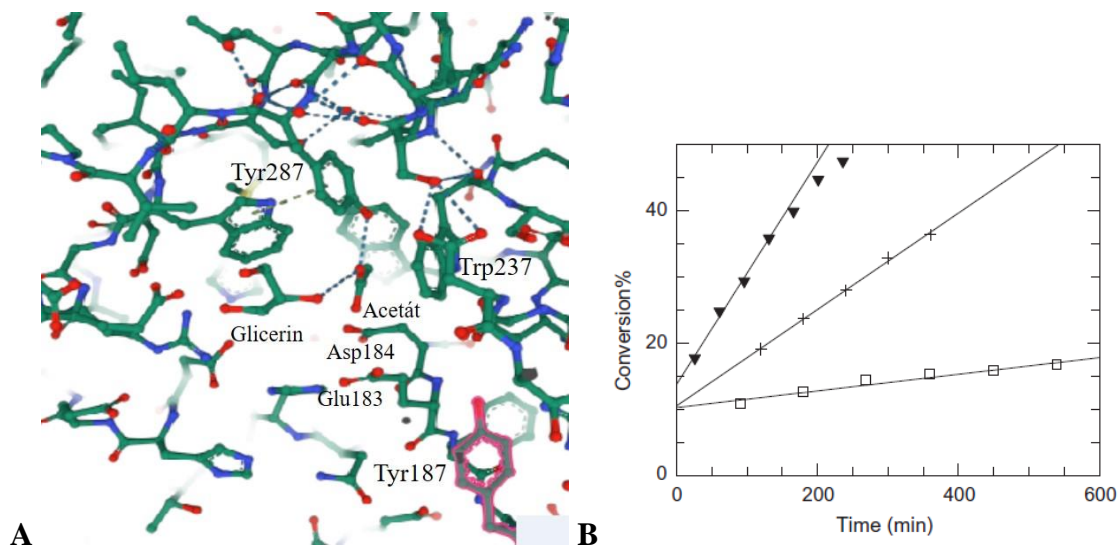
A tioglikozidos kötés hidrolízisét általában nem katalizálják az O-hidrolázok így a tioglikozidok többnyire inhibitorai a glikozidáz enzimeknek. Ezzel a szerkezettel biztosítottuk, hogy a hidrolízis termékek detektálhatók legyenek az enzimes hidrolízisnek ellenálló kötésű aglikon UV elnyelésének köszönhetően. Az oligomer szintézishez 1+2, 2+2, 1+4 kapcsolási stratégiát használtak brómcukrokat alkalmazva glikozil donorként. Az 1,2-transz interglikozidos kötés kialakulását 2-ftalimido védőcsoport biztosította, ezen kívül a 6-hidroxil csoportok védelmére ideiglenes védőcsoportként klór-acetil-csoportot, a többi hidroxilra pedig acetát-észtert használtak. A DP 2-5 tagszámú, tiofenil aglikont tartalmazó szubsztrát sorozat szintézise a Debreceni Egyetem-MTA Szénhidrátkémiai Kutatócsoportban történt.

A DspB szubsztrátspecifitásának vizsgálata során a szintetizált tiofenil-glükozid (Ph-S-GlcNAc_x) szubsztrát sorozat tagjainak hidrolízisét fordított fázisú HPLC módszerrel követtük (27. ábra).



27. ábra Ph-S-GlcNAc_x szubsztrátsorozat fordított fázisú elválasztása a redukáló végi hidrolízis termékek koncentráció változásának követéséhez. Az ábrán a csúcsok jelölései megfelelnek az oligomer tagszámának.

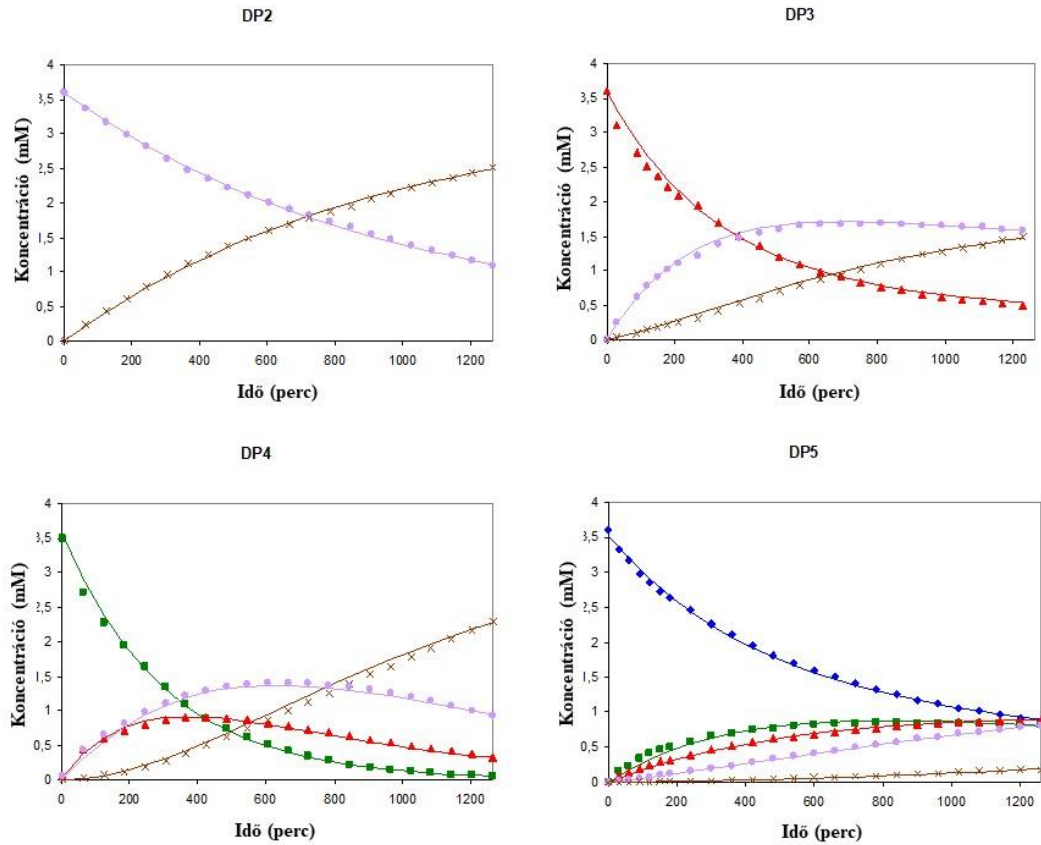
Vizsgáltuk az aromás aminosavak szerepét a DspB enzimben az Y187A és Y278A és W237A pontmutációval létrehozott fehérjék pentamer szubsztráton mért reakciósebességének összevetésével (28. ábra). Összhangban a monomer szubsztráton végzett korábbi mérésekkel, a triptofán kicserélése alaninra megszüntette az enzim aktivitását, míg a tirozinok cseréje az aktivitás csökkenését eredményezte. Ezzel igazoltuk az aktív helyen található aromás aminosavak szerepét és jelentőségét az oligomer szubsztrát hidrolízisében.



28. ábra A módosított aromás aminosavak pozíciója a DspB aktív centrumában (A) és mutációjuk hatása az enzim pentamer szubsztráton mért aktivitására (B). Vad típusú DspB ▼, Y187A +, Y287A □

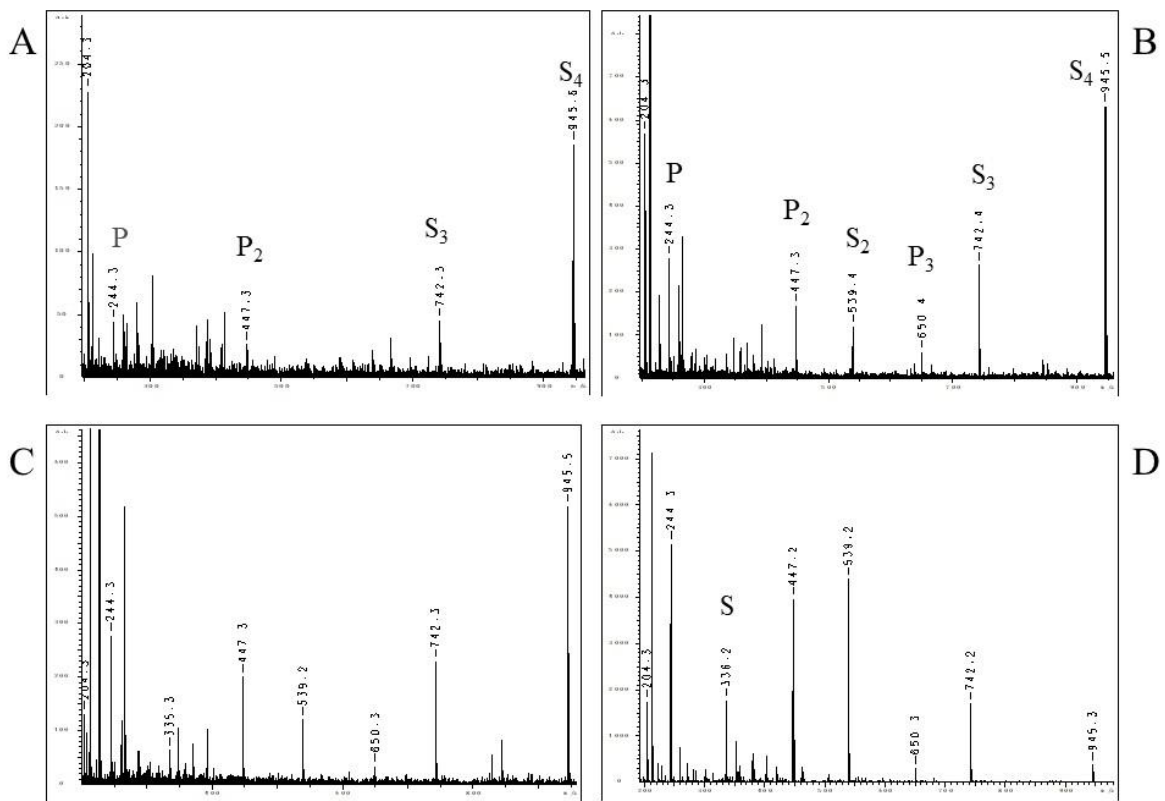
A szubsztrátok fogyása alapján kapott kezdeti sebesség mérések azt mutatták, hogy a tetramer és pentamer szubsztrátok között már nincs jelentős különbség a hidrolízis kezdeti sebességében, így összhangban a korábbi molekulamodellzés eredményeivel négy glikonkötő helyet tételeztünk fel az enzim aktív helyén [90]. Ennek igazolására meghatároztuk a szubsztrátok átalakulásának és a különböző hosszúságú termékek keletkezésének kinetikai görbéit valamennyi oligomeren HPLC termékanalízissel (29. ábra).

A vizsgálatokhoz azonos kiindulási szubsztrát koncentrációt, és minden reakcióban azonos enzim koncentrációt alkalmaztunk így biztosítva a sebesség értékek összehasonlíthatóságát..



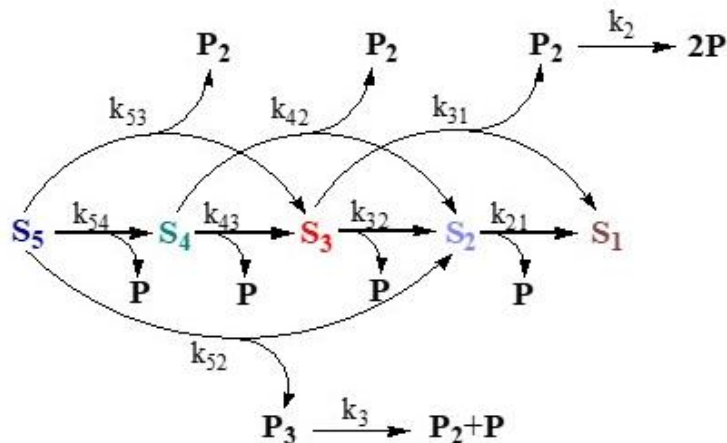
29. ábra Oligomer szubsztrátok DispB által katalizált hidrolízisének időbeli lefutása. A szubsztrátok jelölése: dimer (●), trimer (▲), tetramer (■), pentamer (◆) és a végtermék a monomer (x) tiofenil-glikozid. A szimbólumok mért értékek, a görbéket párhuzamos reakciókat és az azt követő konzekutív lépéseket feltételezve illesztettük.

Mivel a HPLC kromatogramok alapján készült kinetikai görbék csak a redukáló végi, kromofort tartalmazó termékek koncentrációjának változását mutatják, MALDI-TOF MS méréseket végeztünk a nem redukáló végi termékek azonosítására, hogy el tudjuk dönteni az enzim hatásmódját. *Exo* enzim esetén a nem redukáló végi termék mindig azonos mono-, vagy oligoszacharid, míg az *endo* enzimek a véletlenszerű hasítás miatt eltérő hosszúságú nem redukáló végi termékeket eredményeznek.



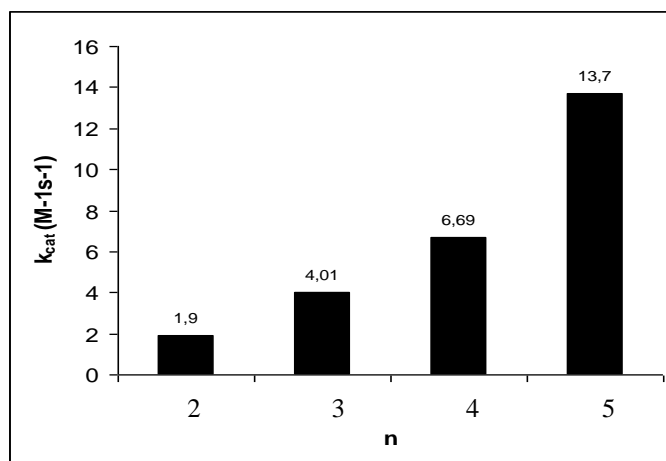
30. ábra MALDI-TOF tömegspektrumok a Ph-S-GlcNAc₅ pentamer szubsztrát DspB katalizálta hidrolízis reakciójának különböző időpontjaiban. A) 10 perc B) 20 perc C) 1 óra D) 1 nap. P a nem-redukáló végi termék S a redukáló végi termék, indexben az oligomer tagszáma.

A 30. ábrán látható, hogy már a reakció kezdeti szakaszában megjelenik nemcsak a monomer (P), hanem a dimer (P₂) szabad oligoszacharid, mint nemredukáló végi termék is. Tehát a trimer redukáló végi termék (S₃) nemcsak a láncvégi GlcNAc két egymást követő lépésben történő lehasadásával képződhet, hanem párhuzamos reakciókban vagy monomer, vagy dimer hasítása történik. A reakció későbbi fázisában megjelent nemredukáló végi termékként a trimer (P₃) is. Ez azt jelenti, hogy az enzim több produktív kötőmódot tud létesíteni az oligomer szubsztrátokkal. Mivel a képződő oligoszacharidok is szubsztrátjai az enzimnek, az elsődleges oligomer termékek további hidrolízisben vesznek részt. Ennek alapján állítottuk fel a pentamer szubsztrát hidrolízisére a következő modellt.



31. ábra Kromofor csoportot tartalmazó pentamer szubsztrát DspB enzimmal történő hidrolízisének kinetikai modellje. S_x szubsztrát és redukáló végi termék, P_x nem redukáló végi termék, k_{xy} reakciósebességi állandó az x tagszámú szubsztrát y tagszámú redukáló végi terméket eredményező hidrolízis lépésére.

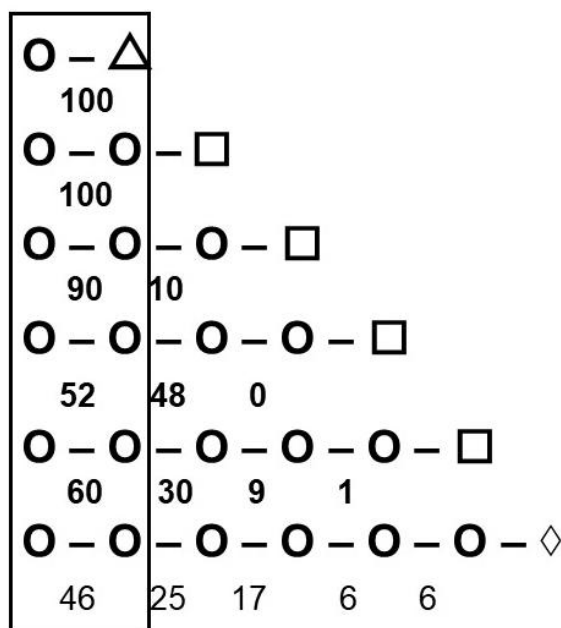
A modell alapján felírt differenciálegyenletek felhasználásával a mérési pontokra Scientist programmal illesztettük görbéket (29. ábra), melyekből megkaptuk a megfelelő reakciósebességi állandókat. A párhuzamos lépésekre kapott reakciósebességi állandók összegzése az adott szubsztrát hidrolízis sebességére jellemző kinetikai állandót adta. Az így kapott állandókat ábrázolva a tagszám függvényében (32. ábra) monoton növekvő tendenciát tapasztaltunk, ami arra utal, hogy a hosszabb szubsztrátok kötődése kedvezőbb, és hidrolízisük nagyobb sebességgel zajlik. Ugyanakkor az is megállapítható, hogy az alhelyek száma lehet ötnél több, amit hosszabb szubsztrátok alkalmazásával lehetne eldönteni [91]



32. ábra DspB enzim oligomer szubsztrátsorozaton mért kinetikai állandóinak változása a tagszám (n) növekedés hatására

Adatainkat Mitchell és munkatársai esettanulmányként használták egy, az enzimek relatív specificitás meghatározásához kidolgozott módszer bemutatására olyan enzimek esetén, amelyek elágazó reakciókat katalizálnak. Az ujjlenyomat módszerrel kapott relatív specificitás értékek kismértékben eltérnek az általunk meghatározottól, de a monoton növekvő tendenciát ezek a számítások is igazolták [92].

A p-metoxifenil aglikonnal rendelkező hexamer szubsztrát hidrolízisének HPLC termékanalízis adatait is felhasználva elkészítettük a DspB enzim bontási képét (33. ábra).



33. ábra DspB enzim oligomer glikozidokon meghatározott bontási képe. ○ GlcNAc egység, △ α kötésű p-nitrofenil aglikon, □ β kötésű tiofenil aglikon, ◇ α kötésű p-metoxifenil aglikon

Az adatokból egyértelmű nem redukáló végi preferencia rajzolódik ki, de több produktív kötőmód lehetséges, ami egy vagy két glikon- és akár 5 aglikonkötőhely jelenlétét mutatja. A termékarányok szerint a modellezés alapján korábban feltételezett 4 kötőhely energiái lehetnek jelentősebbek [91].

4.2. Enzim katalizálta szintézisek

A vizsgált mutációval létrehozott amilázok legtöbbször csökkent hidrolitikus aktivitást mutatnak, ugyanakkor viszont transzglykozilezési aktivitásuk gyakran megnő a vad típusú enzimhez képest. Ez a felismerés inspirálta az amiláz enzimek egy újabb felhasználási lehetőségét, nevezetesen a mutáns enzimek alkalmazását szintézisekhez. Korábban sikerrel alkalmaztuk a HSA Y151M mutánsát különböző maltooligomerek szintézisére [93,94] valamint a *Bacillus stearothermophilus* maltogén amilázát (BSMA) humán nyál amiláz inhibitor szintézisére [95,96].

4.2.1. Transzglykozilezés árpa α -amiláz mutáns enzimekkel

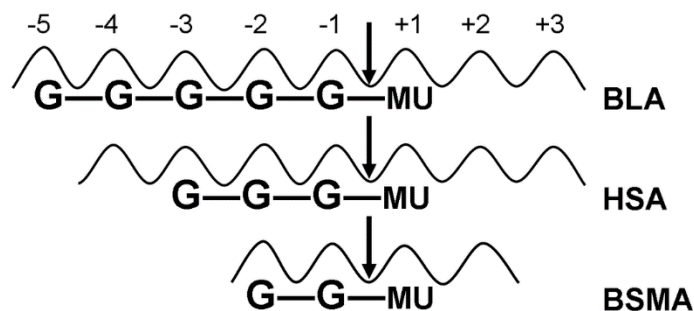
Az árpa AMY1 izoenzim különböző mutánsai között számos enzim kiemelkedő transzglykozilezési aktivitást mutatott a hidrolízis vizsgálatok során. Egyes esetekben, a vad típusú enzimhez hasonlóan, a transzfer aktivitás csak a rövid szubsztrátokon volt megfigyelhető, ahol a hidrolízis sebessége kicsi. Más mutánsok esetében a hidrolízis sebesség minden szubsztráton csökkent és ezzel párhuzamosan a transzfer reakció aránya nőtt (6. táblázat)

6. táblázat Transzfer termékek százalékos aránya CNP-maltooligomer szubsztrátok árpa AMY1 és mutációval módosított változatai katalizálta reakciókban

Szubsztrátok Enzim*	Termékarányok (%)				
	CNPG3	CNPG4	CNPG5	CNPG6	CNPG7
AMY1	0	8	0	0	0
Y380A	0	20	0	0	0
H395A	6	12	0	0	0
W278A/Y380A	5	24	0	0	0
H395A/Y380A	14	17	0	0	0
Y105A/Y380A	12	13	8	4	4
Y105A	4	10	3	0	0
Y105A/T212Y	10	25	7	0	0
V47F	20	35	23	7	0
S48Y	15	32	26	16	25
V47K/S48G	10	33	26	16	18
V47G/S48D	21	43	35	24	20

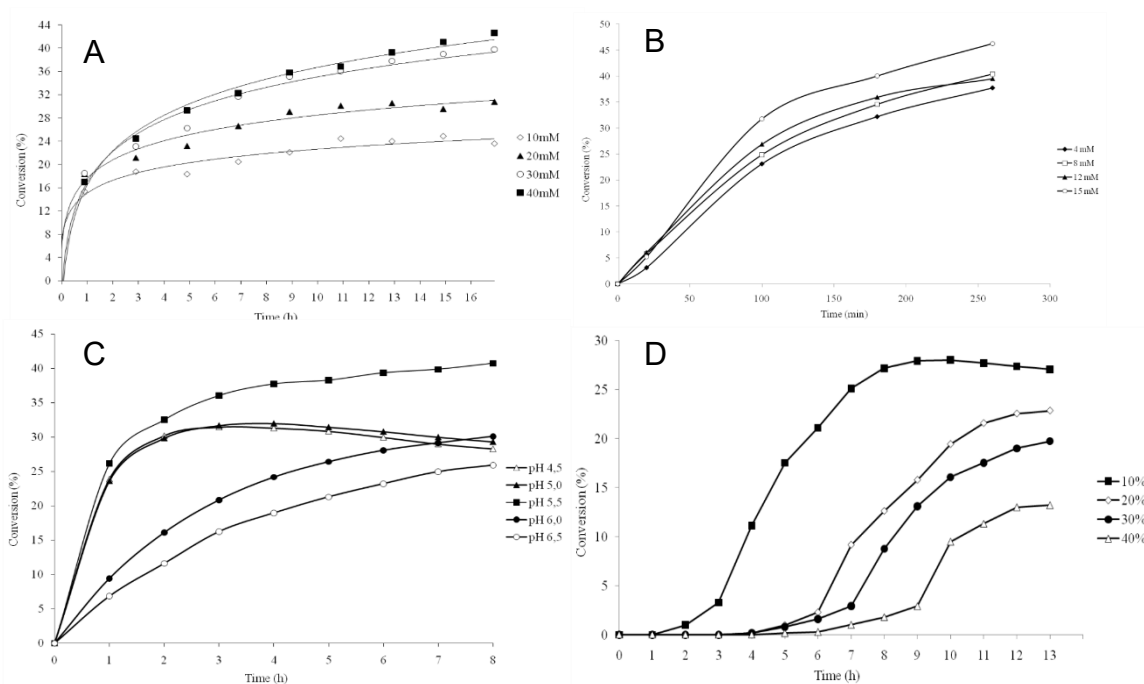
*Mutáció az **aktív helyen** illetve *másodlagos kötőhelyen*

Ezért részletesen vizsgáltuk a mutánsok transzfer aktivitását [97]. Megállapítottuk, hogy az akceptor molekulaként olyan cukorszarmazékok használhatók, ahol a 4-OH ekvatoriális helyzetű. Az aglikon anomer konfigurációja nem, de minősége befolyásolja a transzfer hatékonyságát. Donorként 4-7 tagszámú maltooligomerek alkalmasak, amilóz jelenlétében nem történik transzglykozilezés. Az előzetes vizsgálatok alapján a V47F mutánst választottuk fluorofor aglikont tartalmazó maltooligomerek előállítására preparatív transzglykozilezési reakcióval. A fluorimetriás aktivitásmérés érzékeny és elterjedten használják glikozidáz enzimek vizsgálatára. Kereskedelmi forgalomban csak monoszacharid szubsztrátok érhetőek el α - vagy β -metil-umbelliferil (MUB) aglikonnal. α -Amiláz enzimek közvetlen fluorimetriás aktivitásmérésére olyan oligoszacharidok használhatók, melyek illeszkednek az enzim glikon-kötő helyére és alfa anomer konfigurációjú MUB aglikont tartalmaznak. A korábbi alhely térkép meghatározások alapján látható, hogy a különböző eredetű α -amilázok glikon-kötő helye eltérő hosszúságú lehet, két alhelytől akár hét alhelyig is terjedhet, attól függően, hogy az enzim milyen termékspecifitással rendelkezik. Néhány amilázra a 34. ábra foglalja össze az aktív hely szerkezetét és a kromofor hasításhoz megfelelő pozícióban illeszkedő szubsztrátok méretét. Maltóz fő terméket ad például a *Bacillus stearothermophilus* α -amiláza (BSMA) [98], a HSA aktivitása triszacharid szubsztráttal mérhető [99], míg a BLA-ra öt alhelyes glikonkötő régiót határoztunk meg [6].



34. ábra. A tervezett MUB- α -G5, MUB--G3 and MUB-G2 illeszkedése különböző kötőhely szerkezetű amilázok aktív helyére. A glikonkötő helyeket negatív, az aglikonkötő helyeket pozitív számok, a hasítás helyét nyíl jelzi.

A transzfer reakció optimalálása során az olcsóbb MUB- β -Glc akceptort használtuk, és vizsgáltuk az akceptor koncentráció, a pH, a donor tagszáma, és koncentrációja valamint a szerves oldószer (DMSO) koncentráció hatását (35. ábra).



35. ábra MUB- β -Glc akceptor konverziói a reakciókörülmények optimalást célzó kísérletekben A) az akceptor koncentráció, B) a G7 donor koncentráció C) a pH D) és a DMSO koncentráció hatása.

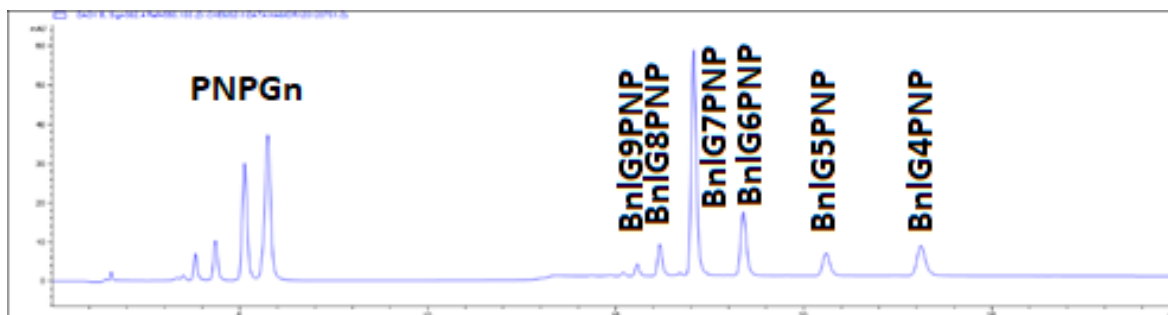
Az optimált körülmények között 2-5 tagszámú alfa-MUB aglikont tartalmazó termékeket állítottunk elő, melyeket preparatív HPLC-vel történő tisztítás után NMR és MS módszerrel jellemeztünk. Az így kapott vegyületeket BSMA, HSA és BLA aktivitásmérésére használtuk, a meghatározott enzimkinetikai paramétereket a 7. táblázat foglalja össze.

7. táblázat Fluoreszcens oligoszacharid szubsztrátok különböző eredetű α -amiláz enzimeken mért kinetikai állandói

Enzim	Szubsztrát	K_M (mM)	k_{cat} (perc ⁻¹)	k_{cat}/K_M ($\mu\text{M}^{-1}\text{perc}^{-1}$)
BSMA	MUB- α -G2	1,0	81	0,08
HSA	MUB- α -G3	1,4	111	0,08
BLA	MUB- α -G5	2,3	33	0,014

4.2.2. Rovar enzim transzferáz aktivitásának vizsgálata

Szintetikus aktivitást tapasztaltunk az LdAmy rovar amiláz vizsgálatok során is [72]. A mindkét végen védőcsoportot hordozó (BnIG_xPNP) szubsztrátok hidrolízis termékei mellett jelentős mennyiségű transzfer termék jelent meg a kromatogramokon (36. ábra).



36. ábra: Az LdAmy szintézis irányú reakciója BnIG₇PNP szubsztráton négy napos inkubációt követően fordított fázisú folyadékkromatográfiás módszerrel vizsgálva

A folyamat részletes tanulmányozása során [100] megállapítottuk, hogy donorként a maltóz, valamint nagyobb tagszámú maltooligoszacharidok alkalmasak, kivéve a maltotriózt, mely gátolja a transzglykozilezett termékek keletkezését. A reakció pH optimuma pH=6, savasabb pH a termékarány változását eredményezte az össztermék mennyiségének csökkenése mellett, míg a semleges és lúgos tartományban megszűnt a transzfer reakció. A termékarány megváltozott szerves oldószer hatására is, 20% MeCN jelenlétében kaptunk legjobb szintézis/hidrolízis arányt. Ugyanakkor az átmeneti fémionok csak kismértékű hatást gyakoroltak a reakcióra. G5-G7 maltooligoszacharid donor jelenlétében akceptorként csak a CNP-β-D-glükopiranozid és a PNP-β-D-xilopiranozid jelenlétében keletkeztek termékek, a többi monoszacharid nem alkalmas akceptornak, ami arra utal, hogy az enzim szigorúan a glükózra specifikus. Összességében ezekben a reakciókban csak kis mennyiségű (1-2 %) termék keletkezett.

Azért hogy magyarázatot találjunk a BnIG_xPNP szubsztrátokon megfigyelt megnövekedett transzferáz aktivitásra összevetettük emlős és rovar amilázok szekvenciáját (37. ábra). Az összevetésbe bevontuk azt az amilázszerűnek tekintett rovar eredetű enzimet (AMYR_DROME), amely az ecetmuslicából származik és amelyről a közelmúltban közöltek transzglykozidáz aktivitást és ennek magyarázatát a szekvencia eltérésére vezették vissza [101].

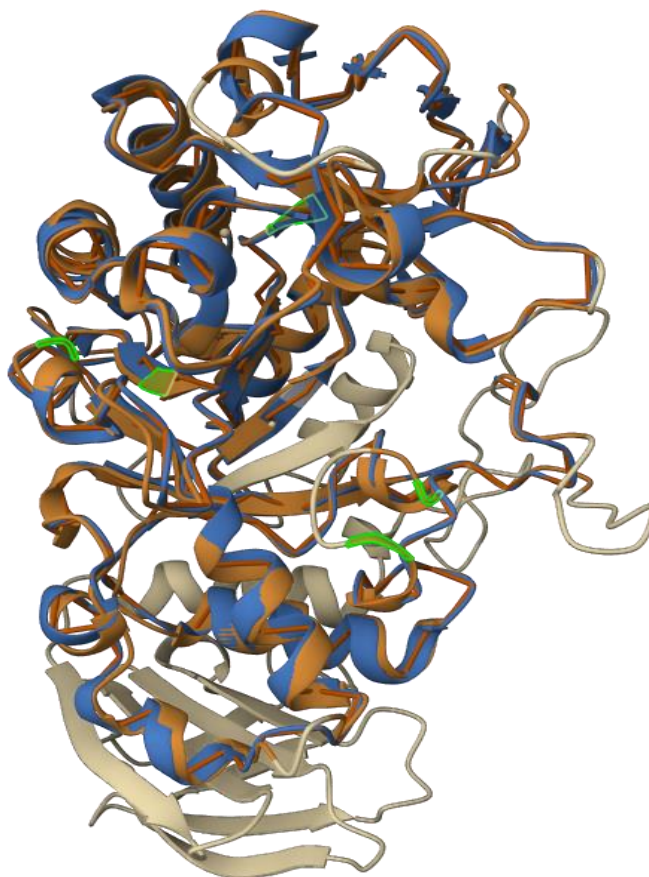
```

1SMD_1      WGEWGFMPDRALVFVDNHDNQRGHGAGGASILTFWDARLYKMAVGFMLAHPYGFTRVM 339
AMY_PIG     WGEWGFMPDRALVFVDNHDNQRGHGAGGASILTFWDARLYKVAVGFMLAHPYGFTRVM 354
AMYR_DROME  WGTDWGFLPSGQALTFVDNHDNQRDA---G-AVLNYKSPRQYKMATAFHLAYPYGISRVM 344
lviw       WGPEWGLLEGLDAVVFVDNHDNQRTG---GSQILTYKNPKPYKMAIAFMLAHPYGTTRIM 323
XP_023015287.1 WGPGWGLLESGDAVVFIDNHDNQRGD---DNRILTYKNPKPYKAAIAYMLAHPYLYTTRIM 342
          **  ***:. .  *:.:***** .  :*:. .  : ** * .:  ***:  :*:

```

37. ábra: A HSA (1SMD), PPA (AMY_PIG), az Amyrel, a TMA (lviw) és az LDAm (XP_023015287.) aminosavszekvenciájának összehasonlítása a HSA mobilis hurok régiójában. A flexibilis hurok régió pirossal kiemelve, a konzervált régió a HSA szekvenciában aláhúzva.

A legfeltűnőbb eltérés a rugalmas, glicin gazdag hurok (³⁰⁴GHGAGGA³¹⁰), hiánya, ami emlős amilázokban részt vesz a szubsztrát rögzítésében és a termékek felszabadulásában az aktív centrumból [102].



38. ábra Szerkezet összehasonlítás HSA: (barna) 1SMD LdAmy: (kék) AF-A0A0F6TN63-F1 AlfaFold jósolta szerkezet a *L. decemlineata* 1-300 aminosav szekvencia részletére. A szövegben hivatkozott eltérések zölddel kiemelve.

A bogár eredetű enzimeknél szinte általános ennek a hurok régióknak a hiánya, csak néhány fajban van jelen [103]. A hártácsszárnyúaknál viszont a két gén kódolta α -amilázok egyike tartalmazza a hurok régiót, mint például a legújabb, 2023-ban közölt *D. melangoster* α -amiláz (PDB kód: 8OR6), míg a másik gén terméke (AMYR_DROME) nem [63]. A hiányzó hurok régió jól látható a 38. ábrán bemutatott 3D szerkezet összevetésben is. Az irodalmi adatok alapján a His235Glu szubsztitúció az aktív hely közelében olyan transzferáz aktivitást hozott létre a *Bacillus licheniformis* α -amilázban, ami a vad típusú enzimben nem volt jelen [104]. A szekvencia illesztés szerint az LDAmY fragmens Asp65 aminosava megfelel a HSA -1 alhelyén található His101-nek, így ez a különbség is okozhatja a megfigyelt transzferáz aktivitás növekedést. Az LDAmY szekvenciában is megtalálható Trp58 aminosav több alhelyen bekövetkező koordináló szerepét a HSA enzimben korábban igazoltuk. A Trp58Leu mutáció csökkentette az összes alhely energiáját és fokozott transzglykozilációs aktivitást eredményezett, pl. CNPG₄ szubsztráton közel 0,5 transzglykozilezés/hidrolízis arányt találtunk [105]. Ezenkívül az aglikonkötő régióban néhány poláris aminosavat (pl. Tyr232, és Asn250 a HSA-ban) Phe (186, és 205) helyettesít az LDAmY-ban. A poláris aminosavak az aktív hely környezetében vízmegkötőként funkcionálnak a hidrolízishez, míg a Phe oldallánc felelős lehet a transzglykozilációért [106]. Az eltérések a 38. ábrán zöld színnel kiemelve láthatók. Ezek az eredmények felvetik annak lehetőségét, hogy a rovar α -amilázok transzferáz aktivitása gyakoribb lehet, mint azt korábban gondolták.

4.3. Glikoenzimek új aktivitásmérési módszerei

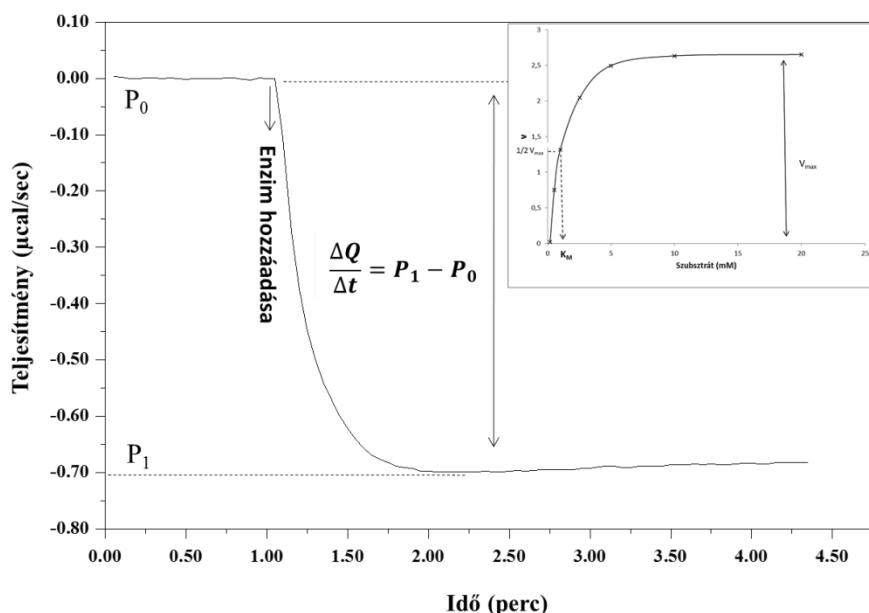
Bár a glikoenzimek aktivitásmérésére széleskörű elterjedtségük és többirányú fontosságuk miatt számos módszer ismert, gyakran merülnek fel olyan feladatok, melyekhez új módszerekre van szükség. Különösen hasznosak azok a módszerek, amelyek lehetővé teszik a természetes szubsztráton és körülmények között való mérést a folyamatba való beavatkozás nélkül. Ezeknek kritériumoknak megfelel az izotermikus titrációs kalorimetria (ITC), amely a hőváltozás, mint univerzális szignál mérésével lehetővé teszi közvetlenül a reakciósebesség meghatározását. A módszer a „label-free” technikák közé tartozik, tehát a természetes szubsztrát(ok) módosítás nélkül alkalmazhatók és mérés technikailag nem ideális rendszerekben is elvégezhető a mérés. Az ITC módszereket elterjedten használják kötődési vizsgálatokra, de enzimkinetikai mérésekre kevesebb példa van. Ennek egyik oka, hogy mindkét szokásos technika (az egyszeres titrálás és a többszörös titrálás) hosszadalmas optimálást igényel az enzim és a szubsztrát megfelelő

koncentrációjának kiválasztásához. Egyes esetekben, ha a K_m érték nagy az adott enzim-szubsztrát párra, előfordulhat, hogy a szubsztrát rossz oldékonysága gátat szab a többszörös titrálás alkalmazásának. Az ITC alkalmazása enzim gátlások vizsgálatára még ritkább, és nem rég kezdődött Bennini és munkatársai 2014-ben megjelent közleményével, amiben fluorid ionok ureáz gátló hatását igazolták [107].

4.3.1. α -Amiláz aktivitásmérés ITC módszerrel

Az amiláz enzimek aktivitásának keményítő szubsztráton való méréséhez általánosan használják a keletkező új redukáló aldehyd csoportok színreakció utáni spektrofotometriás mennyiségi meghatározását. A hosszadalmas, sok hibalehetőséggel terhelt módszer helyett dolgoztunk ki kalorimetriás aktivitásmérési módszert, melyet gátlásvizsgálatokra is alkalmaztunk [108].

Az általunk alkalmazott módszer alapjai megjelennek D'Amico *Pseudoalteromonas haloplanktis* α -amiláz és PPA összevetéséről szóló 2004-ben közölt cikkében [109], de a mérések részleteiről és teljesítményéről nem közöltek adatokat. A mérések során az enzim oldatát injektáljuk a szubsztrátot tartalmazó mérőcellába, majd mérjük a hőváltozás értékét. Így ITC módszerrel közvetlenül tudunk sebességet detektálni, mert a maximális hőváltozás (teljesítmény változás) érték az adott szubsztrát koncentrációhoz tartozó reakciósebességgel arányos mennyiség (39. ábra).



39. ábra Enzimreakció sebességének meghatározása ITC termogram alapján. A belső kép a HSA-maltoheptaóz reakcióra kapott mérési adatokra illesztett Michaelis görbét mutatja a K_m meghatározáshoz.

Az alábbi összefüggés lehetővé teszi a reakciósebesség számítását, de közvetlenül a mért dQ/dt értékek is használhatók, hiszen egy mérésoron belül az adott kísérleti összeállításban az arányossági tényező ($\Delta H \times V$) állandó.

$$\frac{\Delta Q}{\Delta t} = \Delta H \times V \times \frac{\Delta P}{\Delta t}$$

ahol a $\Delta Q/\Delta t$ a mért hőmennyiségváltozás, ΔH a kísérletesen meghatározott szabadentalpia változás, V a mérőcellában található oldat térfogata, P a keletkező termék koncentrációja.

A módszer alkalmazásakor a szubsztrát oldata illetve a szubsztrát és inhibitor keveréke található a mérőcellában, az injektor tartalmazza az enzimet. Ez az elrendezés biztosítja, hogy akár a szubsztrát oldékonysága által lehetővé tett legnagyobb koncentrációt is használhassuk, és a hígulási effektus se zavarja a mérést. A különböző szubsztrát/inhibitor koncentráció mellett végzett titrálások gyorsan elvégezhetők, hiszen nem kell megvárni a teljes hidrolízist, mint az egyszeres titrálás esetében. A módszer egyszerűbben optimálható, mint a többszörös titrálás, ahol jól beállított koncentrációkra és injektálási időtartamokra van szükség, hogy kiértékelhető legyen a mérés és a szubsztrát fogyás se legyen jelentős két injektálás között (<10%). Módszerünk esetén elegendő a megfelelő enzimkoncentrációt meghatározni, hogy az enzimreakció ne legyen túl gyors, de még kis szubsztrát koncentráció esetén is mérhető jelet kapjunk. Ehhez a mérést a legnagyobb elérhető koncentrációjú szubsztrát oldattal kezdjük, így ideális esetben telítjük az enzimet. A K_m meghatározás során egyre hígabb szubsztrátoldatokkal végezzük el a mérést, egészen addig, amíg jel intenzitása mérhető. Méréseink során az enzimreakció által okozott hőváltozáshoz viszonyítva a hígulási effektus és a szubsztrát enzimhez való kötődéséből származó hőváltozás elhanyagolható volt. Az ITC mérés időtartama alatt (2-5 perc) elhanyagolható mértékű (<2%) a szubsztrát átalakulás, amit kromofor tartalmú maltoheptaóz szubsztráton HPLC módszerrel igazoltunk. Ennek megfelelően a sebesség értékek kezdeti sebességnek tekinthetők, ami feltétele a Michaelis –Menten összefüggés alkalmazhatóságának.

Az α -amiláz természetes szubsztrátja a keményítő, a klinikai diagnosztikában és a kutatási feladatokhoz azonban gyakran maltooligomereket, vagy azok kromofor csoporttal módosított változatát használják az enzim aktivitásának vagy gátlásának vizsgálatához. A szubsztrát hossza és az aromás csoportok jelenléte befolyásolják a kinetikai paramétereket. Ezek az eltérések jól vizsgálhatók ITC módszerrel, ami aktivitásmérési alternatívát jelenthet az eddig alkalmazott módszerek mellett.

8. táblázat: A különböző szubsztrátok HSA-katalizálta hidrolízis reakcióinak ITC módszerrel meghatározott K_M értékei

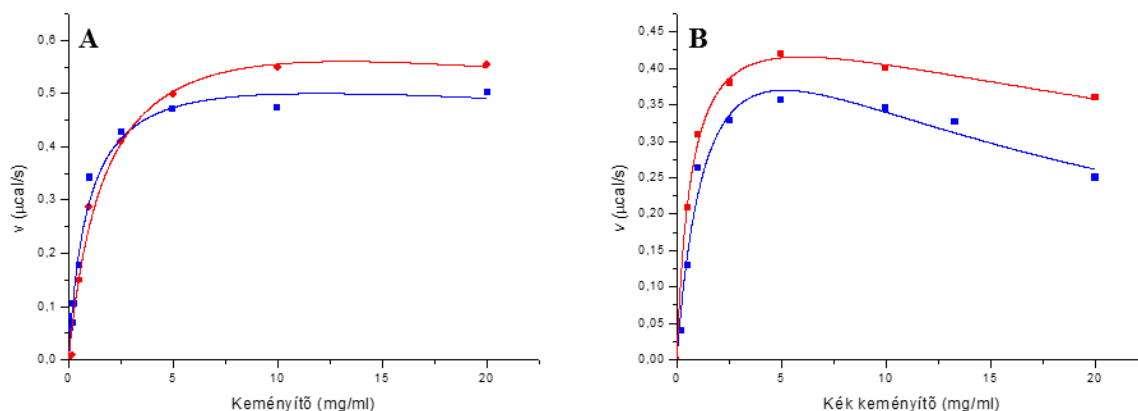
Szabad oligomerek	G3	G4	G5	G6	G7	G8	Amilóz	Keményítő
K_M (mM)	3,4	2,4	0,9	1,4	1,2	1,1		
K_M (mg/ml)	1,7	1,6	0,75	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4
Oligomerek aromás csoporttal	GalG2 CNP	CNPG4		CNPG6	CNPG7	CNPG8		Kék keményítő
K_M (mM)	2,9	2,0		1,0	0,6	0,6		
K_M (mg/ml)	1,9	1,6		1,1	0,8	0,9		0,7

A fent említett befolyásoló tényezők hatását a HSA katalizálta reakcióban szabad- és kromofor csoportot tartalmazó szubsztrát sorozaton vizsgáltuk. Az egyes szubsztrátok hidrolízis reakcióinak K_M értékét a 8. táblázat összegzi. Csökkenő tendenciát találtunk K_M értékére az oligomer tagszám növekedésével, ami arra utal, hogy a hosszabb oligomerek kötődése kedvezőbb. A szabad oligoszacharidok esetében az értékek a maltoheptaóztól kezdve állandósulnak, ami arra utal, hogy kinetikailag a maltoheptaóz a természetes szubsztráthoz hasonlóan tekinthető. A maltopentaóz esetében jelentősen kisebb K_M értékeket kaptunk, amit az oligomer mérete és az enzim aktív hely szerkezete közötti pontos megfeleléssel magyarázhatunk. A termékarányok alapján készített alhelytérkép és a 3D szerkezet szerint a HSA enzimnek legalább hét alhelye van, ami indokolja a K_M maltoheptaóztól állandósuló értékeit, a két szélső alhely energiái viszont lényegesen kisebbek, mint a többi 5 alhelyé. A HSA aktív helyén található aromás aminosavak szubsztrát kötődésben és a katalízisben játszott szerepét korábban igazoltuk [110]. Ezek jelenléte okozhatja az aromás kromofor csoportot tartalmazó szubsztrátok rendre kisebb K_M értékeit a szabad oligomerekhez viszonyítva. A GalG₂CNP esetében kapott nagy K_M érték jelzi, hogy ez a szubsztrát csak tájékoztató gátlási vizsgálatokra alkalmazható, mivel kompetíció esetén a természetes szubsztráthoz képest akár nagyságrenddel nagyobb gátlást tapasztalhatunk.

4.3.2. Vizsgálatok kék keményítő szubsztráttal

Amiláz aktivitásmérésre régóta ismert és alkalmazott módszer az oldhatatlan „Blue-starch” szubsztrát alkalmazása. Ennek ellenére azt találtuk, hogy az úgynevezett „kék keményítő” szubsztrátot alkalmazó módszerek esetében ahány irodalmi hivatkozás, annyi kísérleti összeállítás, vagyis a mérési módszer nincs standardizálva, ami nyilván az eredmények összevethetőségét kérdőjelezi meg. A kék keményítő a glükóz egységek hidroxil csoportjain reaktív antrakinon festékkel (Remazol Brilliant Blue) kovalensen módosított, vízben rosszul oldódó keményítő. Az amiláz enzim hatására oldható oligomerek keletkeznek, az oldat színének megváltozását okozva [111].

Kalorimetriás méréseket végeztünk az oldhatatlan kék keményítőt szubsztrátként alkalmazva, hogy megvizsgáljuk szilárd anyag jelenlétében is alkalmazható-e az ITC módszer aktivitásmérésre [112]. Miután fotometriás vizsgálatokkal igazoltuk, hogy a kék keményítő szubsztrát hidrolízise is lényegesen hatékonyabb, ha előzetesen a keményítő szubsztrátnál alkalmazott hőkezelést használjuk, a további méréseket így végeztük el. Mivel az ITC-vel történő aktivitásmérés lehetővé tette azonos körülmények alkalmazását, összevetettük a természetes keményítő és a kék keményítő szubsztrát két emlős α -amiláz (PPA, HSA) katalizálta hidrolízisét. A kék keményítő esetében mindkét enzimen szubsztrát gátlást tapasztaltunk, ami 5 mg/ml koncentráció felett jelentkezett (40. ábra). Az illesztésekből meghatározott K_m értékek alapján az aromás csoportok a HSA enzim esetében egyértelműen kedvezőek a hidrolízis szempontjából, a maximális sebesség felének eléréséhez kisebb szubsztrát koncentráció elegendő (8. táblázat). A kísérletek igazolták az ITC módszer alkalmazhatóságát szilárd szubsztrát jelenlétében.

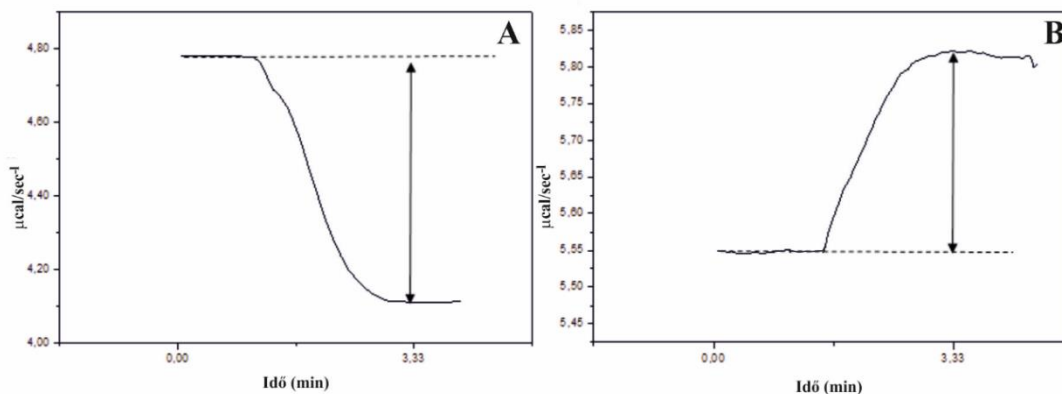


40. ábra: A HSA (piros) és PPA (kék) katalizálta hidrolízis reakció sebességének szubsztrát koncentráció függése keményítő (A) és kék keményítő (B) szubsztrát esetén. A görbék illesztése a Michaelis-Menten és a Haldane egyenletek alapján történt

4.3.3. Glikogén foszforiláz enzim aktivitásmérése ITC módszerrel

Újabb mérés technikai és elvi problémákkal szembesültünk, mikor az ITC módszert megfordítható reakciót katalizáló enzim (nyúl vázizom eredetű glikogén foszforiláz, rmGFb) esetében alkalmaztuk aktivitásmérésre és gátlás vizsgálatra [113]. Bár számos GF inhibitor jellemezték [114-117], a gátlások irodalmi adatai nem mindig összevethetők. A gátlást jellemző paramétereket (IC_{50} , K_i) leggyakrabban a biológiai szempontból nem releváns glikogénszintézis irányában határozták meg (legtöbbször a P_i színreakciójának spektrofotometriás mérésével) [118]. Ha a glikogénlebontást vizsgálták, az enzimaktivitás mérését többnyire kapcsolt enzimrendszerrel valósították meg [119]. A mindkét irányban végrehajtott aktivitásmérések meglehetősen ritkák [120], és az ellentétes irányokban kapott gátlási állandók (K_i) gyakran jelentősen eltérnek egymástól. Mivel feltételeztük, hogy a különböző értékek az egyes mérések eltérő reakciókörülményeiből is adódhatnak, egy olyan aktivitásmérési módszert kerestünk, mely lehetővé teszi mind a foszforolitikus, mind a szintetikus folyamat követését azonos reakciókörülmények között.

Az ITC mérések során kapott termogrammok alapján, a glikogénszintézis exoterm, míg a lebontás endoterm folyamat, amit a 41. ábra szemléltet.

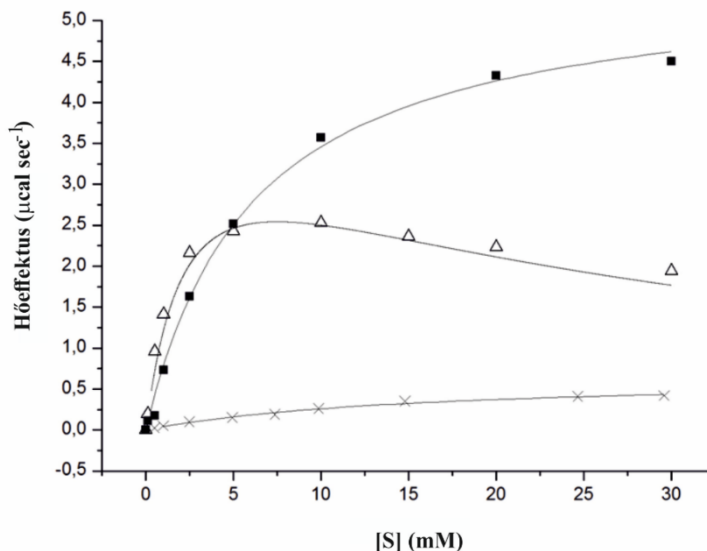


41. ábra: 0,5% glikogén rmGFb katalizált lánchosszabbításának (A) és foszforolízisének (B) ITC vizsgálata során kapott termogrammok. A nyilak a mért hőáramot (dQ/dt) mutatják.

Az ITC kísérleteket egyszeres injektálási módszerrel végeztük, az injektorban lévő GFb oldat kis részletét (5 μL) titrálva a mérőcellában található szubsztrátoldathoz (5 mg/mL glikogén), és a reakciósebességgel arányos dQ/dt értéket határoztuk meg. Mivel a rmGFb a foszforilálatlan inaktív forma, ezért allostérikus aktiválására AMP-t használtunk. Az AMP félhatásos aktivátorkoncentrációját (EC_{50}) és telítési értékét is ITC mérésekkel határoztuk meg a reakció mindkét irányában, és ezek alapján 1 mM AMP jelenlétében végeztük a méréseket. Vizsgáltuk az enzim szubsztrátspecifitását a fiziológiás glikogén

lebontás irányában (1M foszfátot és 1 mM AMP-t tartalmazó pH 6,8 pufferben) maltopentaóz (G5), maltoheptaóz (G7), glikogén és CNPG7 szubsztrátokon.

Az aromás csoporttal jelzett szubsztrát CNPG7 GPb katalizálta foszforolitikus reakciójában szubsztrátgátlást észleltünk (42. ábra).



42. ábra: Az rmGFb enzim aktivitásának [G7] és [CNPG7] függése ITC mérések alapján. A görbék nemlineáris regresszióval a Michaelis-Menten egyenlettel illesztettük a G7 foszforolízise (■) és a CNPG7 szintézis irányú (x) reakciója során kapott adatokra. A CNPG7 foszforolízise (Δ) esetén a Haldane-egyenlet felhasználásával történt a görbeillesztés.

A természetben gyakran megfigyelhető szubsztrátgátlás a metabolikus folyamatok feedback mechanizmussal történő szabályozásának egyik lehetősége [121]. A szubsztrátgátlás jelzi, hogy az enzim rendelkezik egy másodlagos szubsztrátkötőhellyel is, és így két szubsztrát molekula egyidejű kötődése is megvalósulhat, ami konformációváltozást eredményez a fehérjén. A CNP-G7 foszforolitikus reakciója során kapott kísérleti adatok mutatják, hogy a szubsztrát koncentráció növelésével a reakciósebesség nem maradt állandó, hanem csökkenni kezdett, ami a második szubsztrát bekötődésének tulajdonítható. A kísérleti pontokra a Haldane-egyenlettel illesztettünk görbét, ami alapján az inhibíciós állandó (K_i) tízszerese a Michaelis állandónak.

A CNP gátló hatását G7 és foszfát szubsztrát reakciójában ITC módszerrel vizsgálva 9 mM IC_{50} értéket kaptunk. Ezek alapján esetünkben a szubsztrátgátlás allosztérikus gátlásnak tekinthető, mely azt a kötőhelyet érinti, ahová a szabad CNP kapcsolódik. A CNPG7 szintézis irányú reakcióban mutatott nagy K_M értéke miatt a szubsztrátgátlást nem tudtuk a lánchosszabbítási reakcióban vizsgálni. A további mérések során legfeljebb 2,5 mM CNP-G7 koncentrációt alkalmaztunk, hogy a szubsztrát gátló hatását elkerüljük. Az ITC mérések alapján számított kinetikai paramétereket és az irodalmi adatokat a 9.

táblázatban foglaltam össze. Mivel a CNPG7 lánchosszabbítási reakciójára nem volt fellelhető kinetikai adat, ezért CNPG7 szubsztráttal a szintézis irányában is végeztünk ITC méréseket. A megfelelő irányú reakció lejátszódását a 35 mM β -glicerofoszfát puffer (pH 6,8) 50 mM G-1-P tartalma biztosította.

9. táblázat: Az *rmGFb* enzim kinetikai paramétereit különböző szubsztrátokon.

Szubsztrát	Nemredukáló végek száma	ITC-vel mért adat*		Irodalmi adat [122]	
		Foszforolízis		Foszforolízis	Szintézis
		K_M (mM)	k_{cat}/K_M ($s^{-1}M^{-1}$) 1)	K_M (mM)	K_M (mM)
G5	1	20,2 \pm 0,3	3,6*10 ³	9,1	38
G7	1	6,0 \pm 0,6	4,6*10 ³	7,1	31
CNPG7	1	2,3 \pm 0,6[†]	10,1*10³	n.a. **	15,2 \pm2,2^a
Glikogén	~200	1,5 \pm 0,1 ^{††}	6,3*10 ⁶	0,15	0,6

*: Az eredmények átlagérték \pm illesztési hiba formában vannak feltüntetve.

** : nincs adat

^a: saját mérési eredmény

[†]: $[S]/0,5$, mivel a CNP-G7 reakció nem követi a Michaelis-Menten kinetikát.

^{††}: A glikogén esetében feltüntetett K_M érték mg/mL-ben van megadva.

Összevetve a G7 és a CNPG7 esetében meghatározott kinetikai paramétereket látható, hogy a CNP kromoforcsoport hatására a specificitás mértéke jelentősen megnőtt (9. táblázat).

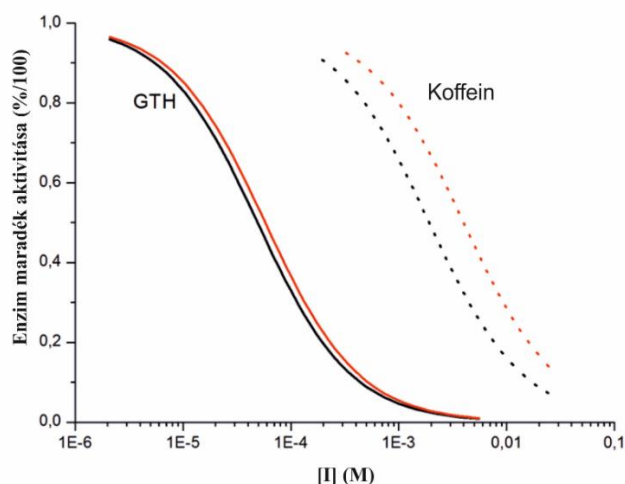
Bár a *rmGF* alaposan tanulmányozott enzim, csupán egyetlen közlemény [122] tartalmazta különböző hosszúságú maltooligomerek K_M adatait a reverzibilis reakció mindkét irányában mérve. Ezek azt mutatják, hogy a maximális reakciósebesség felének eléréséhez a foszforolitikus reakcióban kisebb szubsztrátkoncentrációra van szükség, mint a szintézis irányában. Ez megfigyelhető a CNPG7 szubsztrát esetében is. Másrészt az egyes szubsztrátok ITC-vel meghatározott K_M értékei nagyságrendileg ugyan megegyeznek az említett publikáció ugyanazon szubsztrátra feltüntetett adataival, azonban a különbségek nem elhanyagolhatók. Az eltérések magyarázhatóak a két kísérletsorozat eltérő AMP és foszfát koncentrációjával. Az 9. táblázatból az is kiderül, hogy a lineáris szubsztrátokra az enzim katalitikus hatékonysága (k_{cat}/K_M) nagyságrendi hasonlóságot mutat, de a számtalan nem redukáló véget tartalmazó glikogén nagyságrendekkel jobb szubsztrát.

Gátlásvizsgálatokat végeztünk két, korábban már hatékonyan bizonyult GF inhibitor felhasználásával a katalizált reakció mindkét irányában a reakciósebességeket ugyanazon ITC módszerrel meghatározva. Az egyik gátlószer a koffein volt, mely a GF purin nukleotid kötőhelyéhez kapcsolódva stabilizálja az enzim inaktív, katalitikus aktivitással nem rendelkező konformációját. A másik inhibitor a szubsztrátra nézve kompetitív glükózanalóg vegyület, a glükopiranozilidén-spiro-tiohodantoin (GTH) volt, melyet a Debreceni Egyetem Szerves Kémiai Tanszékén Somsák László és kutatócsoportja szintetizáltak [123, 124].

A reakciókörülmények optimalizálását CNPG7 szubsztráttal végeztük, a kromofor csoport miatt a reakció HPLC-vel követhető. A reakció irányát az elegyhez adott másik szubsztrát határozza meg, esetünkben a G-1-P a szintézis irányú, a P_i a foszforolitikus reakciót teszi lehetővé. A G-1-P/ P_i arány szisztematikus változtatásával HPLC előkísérletekkel meghatároztuk a megfelelő szubsztrát koncentrációkat és igazoltuk a két kiválasztott inhibitor gátló hatását mindkét reakcióirányban.

Az ITC mérésekhez a GP természetes szubsztrátját a glikogént alkalmaztuk, a többi körülmény megegyezett az előkísérletével. Koncentráció-hatás görbéket vettünk fel, különböző inhibitor koncentrációk mellett és a kapott adatokat a Greco-Hakala egyenlettel illesztettük a látszólagos gátlási állandók meghatározásához.

A mérések eredményei a 43. ábrán láthatók, ami jól mutatja, hogy a kompetitív gátlószer inhibíciós állandója mindkét irányban megegyezik, míg a nemkompetitív gátlószernél különbség van a reakció két irányában meghatározott adatok között.



43. ábra: Az rmGFb enzim glikogénon mért gátlása GTH-val és koffeinnel. A szintézis (piros) és lebontás (fekete) irányú reakciók ITC módszerrel kapott adataira illesztett görbék.

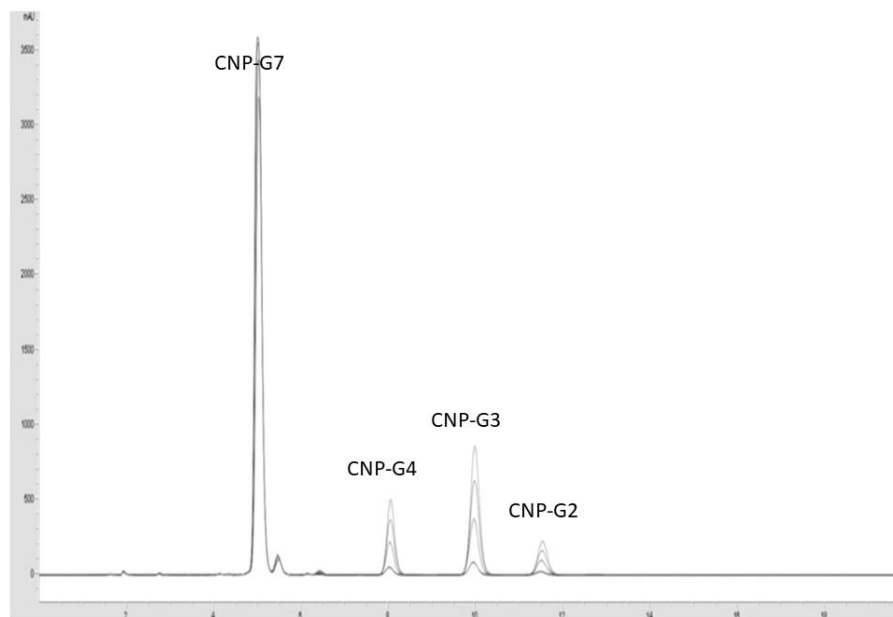
A kompetitív gátlásnál egy enzim-inhibitor (EI) komplex jön létre, ami egyetlen, jól-definiált K_{EI} állandóval jellemezhető. A vegyes típusú gátlásnál viszont EI és ESI komplex

is keletkezhet és az, hogy a két irányban eltérő szubsztrátok a komplex részei, magyarázhatja a kapott eltérő inhibíciós állandókat.

Az itt bemutatott eljárás más reverzibilis reakciókat katalizáló enzimek vizsgálatára is alkalmas lehet.

4.3.4. HPLC módszer α -amiláz aktivitásmérésre

A bontási kép vizsgálatokhoz és kiegészítő mérésekhez rendszeresen HPLC módszert használtunk a kromofort tartalmazó szubsztrátok hidrolízisének követésére. Kézenfekvőnek tűnt, hogy ezt a módszert is kipróbáljuk aktivitásmérésre és gátlás vizsgálatokra is. Ehhez egy maltooligomer szubsztrát, a CNPG7 HSA katalizálta hidrolízisének kezdeti sebességét határoztuk meg, a termékek fordított fázisú HPLC elválasztás utáni csúcsterületének időbeni követésével (44. ábra). Ezzel a módszerrel a CNPG7 HSA enzimen mért Michaelis állandója $K_m=1,2$ mM így az aktivitásmérésekhez a telítési szubsztrátkoncentrációhoz közeli 4 mM CNPG7 koncentrációt találtuk optimálisnak [125]

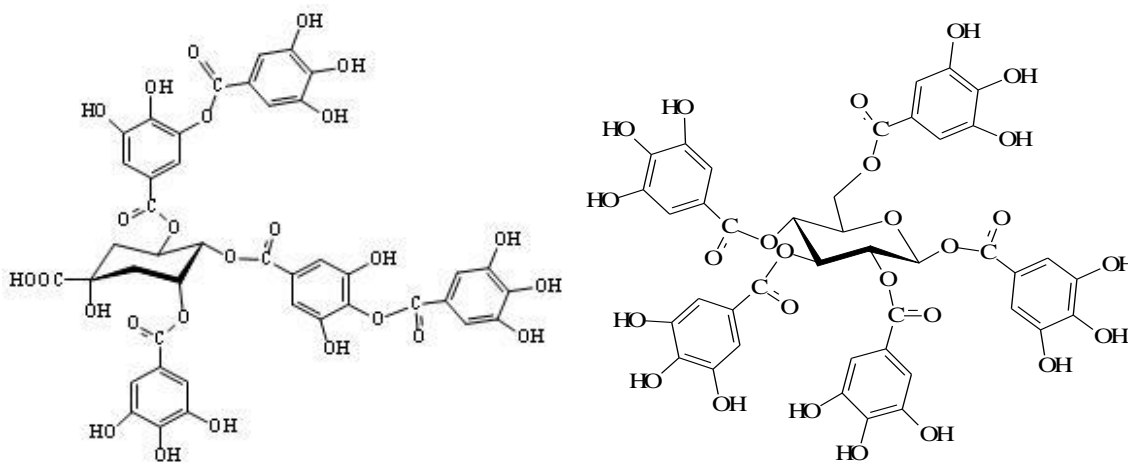


44. ábra CNP-G7 szubsztrát HSA katalizálta hidrolízisének követése fordított fázisú HPLC elválasztással. Körülmények: Genesis C18 oszlop, MeCN/H₂O=15:85 eluens, 0,8 ml/perc áramlási sebesség, detektálás: DAD 302 nm.

A módszert gyógynövény kivonatok gátlásának vizsgálatára alkalmaztuk [126], melynek eredményeit a gátásvizsgálatokkal foglalkozó következő fejezetben részleteztem. A szakaszos mérés, és az elválasztástechnika alkalmazása lehetőséget biztosít olyan kivonatok gátlásának vizsgálatára, ami spektrofotometriásan nem megvalósítható.

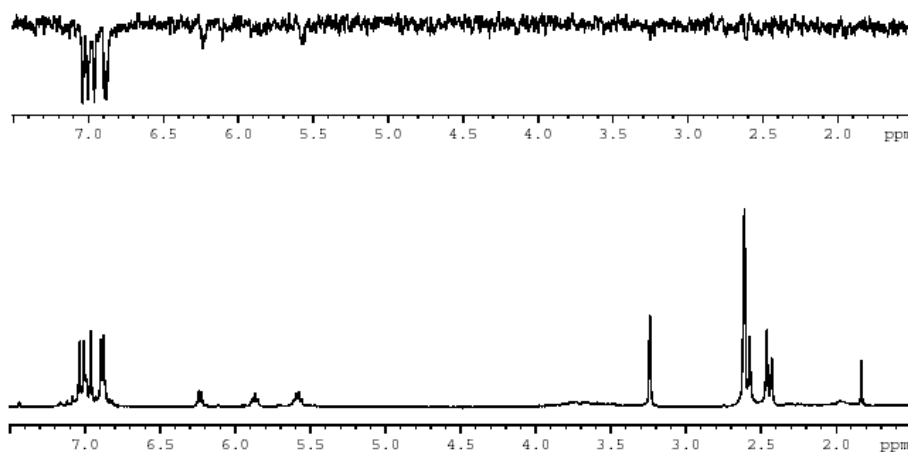
4.4. α -Amilázok gátlásának vizsgálata

Eredményeket értünk el új humán nyál amiláz inhibitorok felkutatásában, és vizsgálatában. Korábban természetes eredetű amiláz inhibitorok keresése során különböző eredetű tanninok inhibitor hatását elemeztük. Az inhibitorok kinetikai vizsgálata mellett a komponensek azonosítását is elvégeztük. Mindkét általunk vizsgált tannin gallotanninnak bizonyult, a fő különbség a két minta között a központi molekula minősége és a kapcsolódó galluszsavak eloszlása, térbeli elrendeződése volt (45. ábra), amit MALDI fragmentációs mérésekkel igazoltam [127,128].



45. ábra Pentagalloil-kinasav (A) és pentagalloil glükóz (B) feltételezett szerkezete

Az enzim-inhibitor kapcsolat mélyebb elemzése céljából az aleppói tannin egyik fő komponensének a pentagalloil-glükóznak (PGG) kötődési sajátságait vizsgáltuk kinetikai analízissel, felületi plazmarezonanciás (SPR) kötődési vizsgálattal és telítés átviteli különbség mérésen (STD) alapuló NMR mérésekkel [129].



46. ábra A PGG inhibitor és a HSA enzim ^1H NMR és differencia spektruma [129]

Az STD mérések alapján a kötődés a PGG aromás csoportjain keresztül történik, mivel a differencia spektrumon az aromás protonok jelei jelennek meg, amint az a 46. ábrán látható. A hipotézist a HSA aktív helyén található aromás aminosavak módosításával létrehozott Y105M és W58L enzimekkel PGG jelenlétében végezett aktivitásmérések is igazolták.

4.4.1. Tanninok promiszkuitása

Mivel a tanninok sokféle fehérjével képesek kölcsönhatásba lépni, felmerült a nem specifikus gátlás lehetősége. Ez az inhibitor promiszkuitásnak is nevezett jelenség az elmúlt évtizedekben került az érdeklődés középpontjába a gyógyszeriparban előre törő polifarmakológiai megközelítés kapcsán, melyben a komplex betegségek kezelésére több célpontra ható (multitarget) vegyületekre van szükség. A promiszkuitás maga tehát akár hasznos is lehet, de sajnos az esetek többségében a gátlás aggregáció miatt következik be. A tannin aggregáció alapú gátlásának eldöntésére méréseket végeztünk [130] az irodalomban javasolt közvetett módszereket [131,132] alkalmazva:

- Promiszkuitásra irányuló biokémiai vizsgálatok
- Detergenssel szembeni érzékenység vizsgálata
- Enzim-inhibitor előinkubálás hatásának vizsgálata
- Enzimkoncentráció-változtatás hatásának vizsgálata
- Centrifugálás hatásának vizsgálata

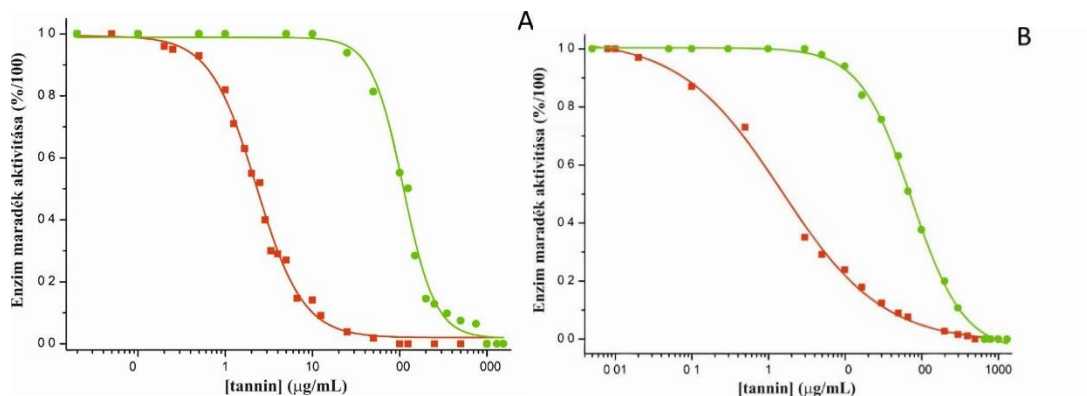
Tannin promiszkuitásának igazolására saját eredményeinket irodalmi adatokkal kiegészítve a 10. táblázatban foglaltam össze.

10. táblázat: A tanninok különféle enzimeken kifejtett aktivitáscsökkentő hatása

Enzim megnevezése	EC szám	Gátlási paraméterek	Hivatkozás
HSA	3.2.1.1	$K_i = 9 \mu\text{g/mL}$	128
PPA	3.2.1.1	$IC_{50} = 2,3 \mu\text{g/mL}$	saját
Tirozináz	1.10.3.1	$K_i = 87 \mu\text{g/mL}$	133
Lipáz	3.1.1.3	$K_i = 330 \mu\text{g/mL}$	134
Tripszin	3.4.21.4	$K_i = 3 \text{ mM}$	135
Invertáz	3.2.1.26	$K_i = 130 \text{ mM}$	136
Protein foszfatáz-1	3.1.3.16	$IC_{50} = 0,2 \mu\text{M}$	137

Bár a tannin szerkezete hasonló egy korábban már aggregátornak tekintett vegülethez [138] és számított $\log P$ értéke is magas (2,8), de ezek az értékek nem haladták meg az aggregáció alapú inhibitorokra meghatározott határértéket ($\log P > 3$; *Tanimoto-index* $> 0,85$). Ezért a tannin aggregációalapú gátló mechanizmusának vizsgálata fontos volt, hogy egyértelműen eldönthessük a tanninok nonspecifikus jellegét. A méréseket két független mérésorban, spektrofotometriával és a korábban kidolgozott kalorimetriás módszerrel, ITC-vel végeztük PPA-t használva α -amiláz modell enzimként.

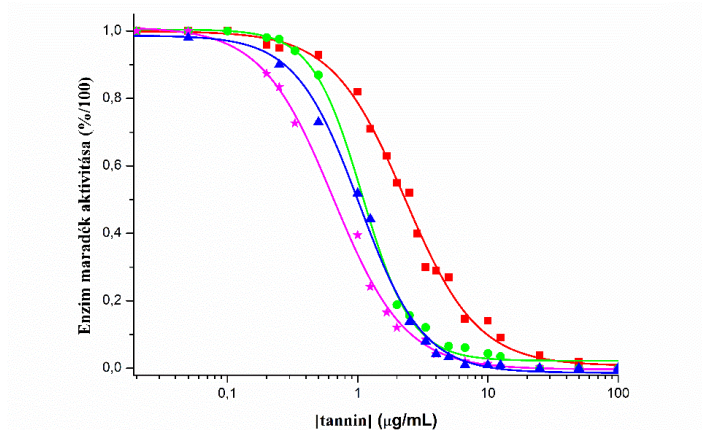
A detergens jelenlétében végzett vizsgálatok eredménye egyértelműen mutatta, hogy a gátló hatás csökken, ami aggregáció alapú hatásra utal.



47. ábra: Tannin gátló hatásának vizsgálata PPA enzim és GalG₂CNP szubsztrát felhasználásával spektrofotometriás (A) és ITC (B) módszerrel, 0,01% Triton X-100 nemionos detergens jelenlétében (●), illetve annak távollétében (■).

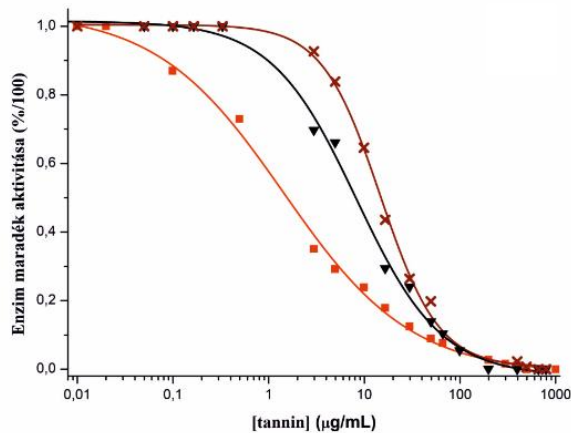
A detergens nélkül végzett aktivitásmérés piros színű koncentráció-hatás görbéjéhez képest a TritonX jelenlétében mért adatokra illesztett görbe jelentősen jobbra tolódott (47. ábra). A fotometriásan meghatározott IC_{50} érték 2,27 $\mu\text{g/mL}$ -ről 110 $\mu\text{g/mL}$ -re emelkedett, ami 50-szeres növekedést jelent, hasonlóan az ITC kísérletekből kapott közel 50-szeres gátlásromláshoz.

Az előinkubálás hatását vizsgálva 5 perces előinkubálást követően az IC_{50} érték több mint a felére csökkent, 30 perc után pedig már megközelítőleg a negyede lett (48. ábra).



48. ábra: Tannin időfüggő gátló hatásának spektrofotometriás vizsgálata. A PPA és tannin 0 min (■), 5 min (●), 10 min (▲) és 30 min (*) ideig volt inkubálva a reakció indítása előtt.

A tannin gátló hatása –az előzetes feltevéseknek megfelelően– érzékenynek bizonyult a célenzím koncentrációjával szemben. Az ITC kísérletek alapján az IC_{50} értékekben 10- és 25-szörös PPA koncentráció esetén nagyságrendi különbség mutatkozott a kiindulási értékhez képest, amit az illesztett görbék nagyfokú jobbra tolódása is jól demonstrál (49. ábra).



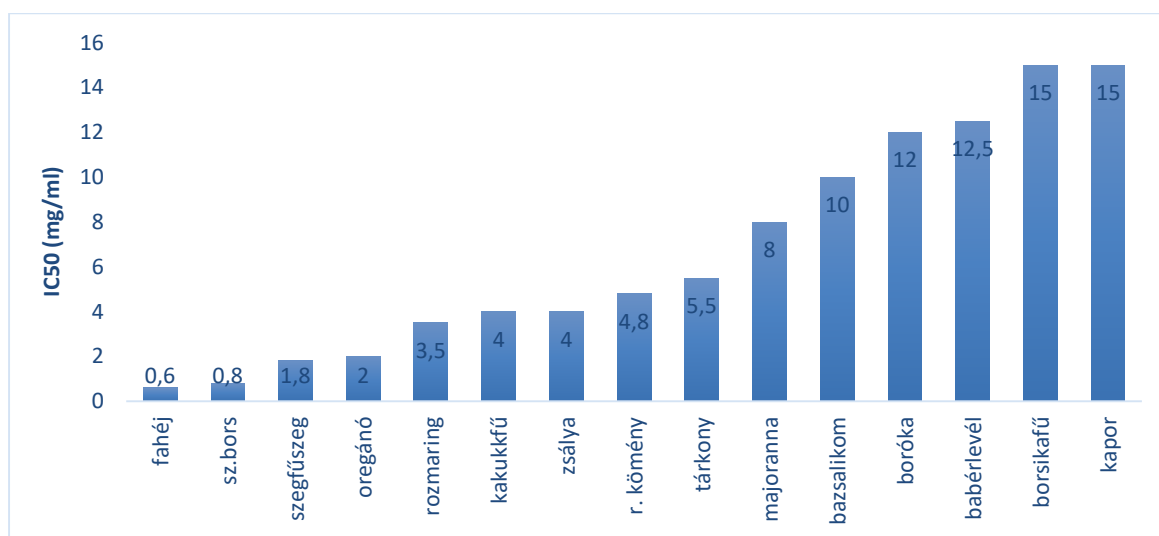
49. ábra: Tannin enzimm koncentrációval szembeni érzékenységének vizsgálata ITC módszerrel. PPA koncentráció 0,56 µg/mL (■), 5,6 µg/mL (▼), 14 µg/mL (X).

Összességében vizsgálataink igazolták, hogy a tanninok nem-specifikus gátlószerek, melyek aggregáción keresztül fejtik ki hatásukat.

A tanninok mellett más természetes eredetű inhibitorokat megvizsgáltunk az általunk kidolgozott aktivitásmérési módszerekkel.

4.4.2. Természetes amiláz gátlók felkutatása

Kihasználva az ITC aktivitásmérés kedvező tulajdonságait számos olyan vizes növényi kivonat gátló hatását vizsgáltuk, melyek fizikai jellemzői (pl. szín, rossz oldékonyság) lehetetlenné teszik a szokásos spektrofotometriás módszerek alkalmazását [139]. Így lehetővé vált a táplálékkal bevitt anyagok (fűszerek, gyógynövények) gátló hatásának meghatározása az amiláz természetes szubsztrátján a keményítőn. A vizsgált 25 fűszernövény közül 22 gátolta a HSA enzimet, ebből 15 esetben tudtunk IC₅₀ értéket is meghatározni (50. ábra)

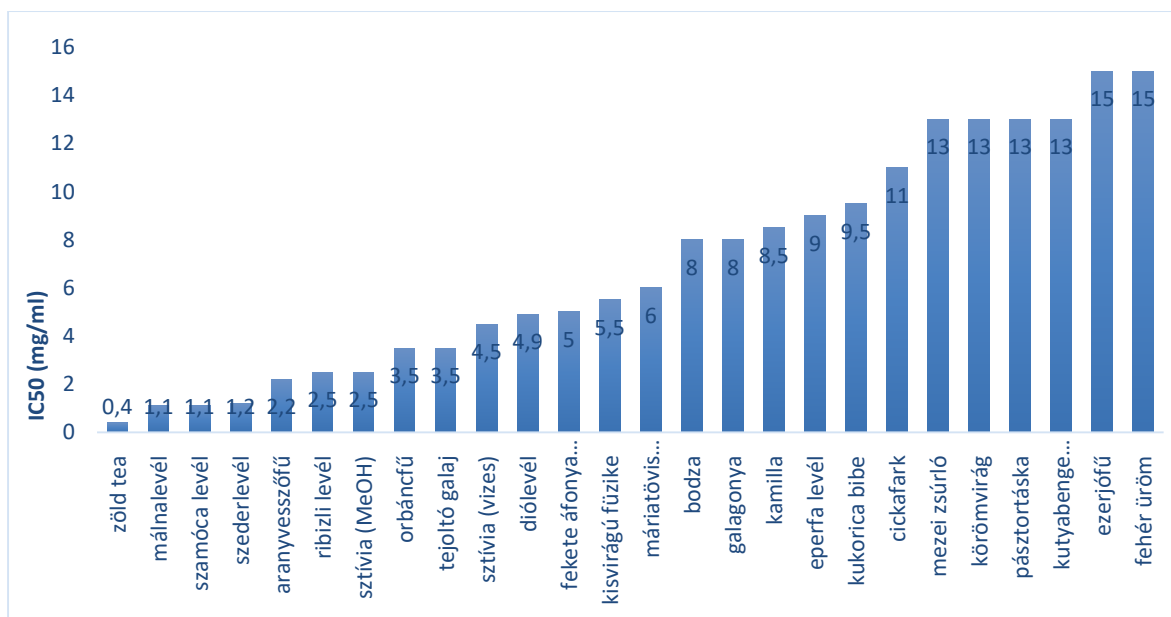


50. ábra: A HSA katalizált keményítő hidrolízis gátlása fűszernövény kivonatokkal IC₅₀ értékek

A fahéj és a szegfűbors kimagaslóan jó gátlást mutattak, de a szegfűszeg és az oregánó kivonattal is sikerült 90 % feletti gátlást elérni.

A vizsgált 33 gyógynövény kivonat mindegyike csökkentette a HSA aktivitását, 26 esetén IC₅₀ értéket is meg tudtunk határozni (51. ábra). Leghatékonyabb gátlószerek a zöld tea és a különböző bogyós gyümölcsök (málna, szeder, szamóca, ribizli) leveleinek kivonatai bizonyultak. Ezekon kívül az orbáncfű kivonattal tudtunk 90 % feletti gátlást elérni.

Valamennyi hatékonyan bizonyult gyógynövény kivonatról MALDI-TOF MS felvételek készültek fő komponensek és az aktív hatóanyagok azonosítása céljából. A bogyós gyümölcsök levelében több vegyületet azonosítottunk (quercetin, kampferol, delphinidin, petunidin és ezek glikozidjai, valamint az ellagi sav, katechin és galluszsav), melyek korábbi mérések szerint is HSA gátló hatással rendelkeznek [140].



51. ábra: A HSA katalizált keményítő hidrolízis gátlása gyógynövény kivonatokkal IC₅₀ értékek

A szamóca, szeder és áfonya levelek kivonatainak hatását in vivo állatkísérletben is sikerült igazolni [127]. Először az erdei szamóca (*Fragaria vesca*), a szeder (*Rubus fruticosus*) és az európai áfonya (*Vaccinium myrtillus*) levélkivonatainak in vitro gátló hatását igazoltuk az α -glükózidáz és HSA enzimeken is. Az amiláz gátlás vizsgálatához a korábban leírt (3.3.1. fejezet) HPLC aktivitásmérést alkalmaztuk. Az étkezés utáni hiperglikémia megelőzésében kifejtett hatást in vivo vizsgálták normál (nem cukorbeteg), prediabetészes (HFHS diéta által kiváltott) és diabéteszes (STZ-vel kezelt) egereken. A vizsgálatok a növényi kivonatokkal egyenként és egy mindhárom kivonatot tartalmazó eleggyel is megtörténtek. A *F. vesca* levélkivonat és a bogyólevél-kivonat kombinált (1:1:1) keveréke (BLE) jelentősen gátolta a keményítő által kiváltott vércukorszint emelkedést a 30 és 60 perces mintavételnél is, míg a *R. fruticosus* és a *V. myrtillus* levélkivonat a 30 perces mintavételnél mutatott ilyen hatást. A vércukorszintre gyakorolt hatékonyság hasonló volt a pozitív kontrollként használt akarbózához. A H9c2 patkány embrionális szívizomsejteken végzett toxikológiai tesztek kimutatták, hogy a bogyólevél kivonatoknak nincs citotoxikus hatása. A vizsgált növényi kivonatokban HPLC MS mérések is igazolták kvercetin, apigenin, luteolin és származékaik, valamint katechin, epikatechin, gallokatechin jelenlétét. Az eredmények alapján a BLE ígéretes jelölt lehet humán klinikai vizsgálatokra is a diabetesz kezelésben való alkalmazhatóság eldöntésére.

A növényi színanyagok HSA gátló hatásának vizsgálatát magyarországi megyfajták kivonataival és az azokban azonosított antocianin vegyületekkel végeztük el [141]. Az enzimaktivitás mérésére ezekben az esetekben a 2000-ben bevezetett [142] és korábban

már általunk is alkalmazott [129,130] GalG2CNP szubsztrátot és spektrofotometriás módszert használtunk. A meggy extraktumokban MALDI-TOF MS mérésekkel kimutatott antocianinokat a 11. táblázat foglalja össze.

11. táblázat Meggy extraktumban található antocianinok MALDI-TOF MS azonosítása

Antocianinok neve	Összegképlet	Számított tömeg (Da)	Mért m/z érték (Da)		
			M+	[M-H+Na] ⁺	[M-H+K] ⁺
Delphinidin-glucoside	C21H21O12	465.38	465.4	487.4	503.3
Cyanidin-glucosyl-rutinoside	C33H41O20	757.66	757.5	779.4	–
Malvidin-diglucoside	C29H35O17	655.58	655.5	677.5	693.5
Cyanidin-glucoside	C21H21O11	449.38	450.3	471.9	–
Cyanidin-rutinoside	C27H31O15	595.52	595.9	617.5	–
Petunidin-glucoside	C22H23O12	479.41	479.4	501.3	517.3
Malvidin-glucoside	C23H25O12	493.44	493.3	515.4	531.3
Peonidin-rutinoside	C28H33O15	609.55	609.2	631.2	–
Malvidin-rutinoside	C29H35O16	639.57	639.3	661.3	677.4

Valamennyi meggy extraktum és a rendelkezésünkre álló antocianinok (cianidin és malvidin glikozidok) kompetitív gátlást okoztak mikromólos IC₅₀ értéket mutatva. A meggykivonatok antocianin tartalma és gátló hatásának mértéke között egyértelmű összefüggést találtunk.

12. táblázat Meggy extraktumok és antocianinok félhatásos gátló koncentrációja (IC₅₀)

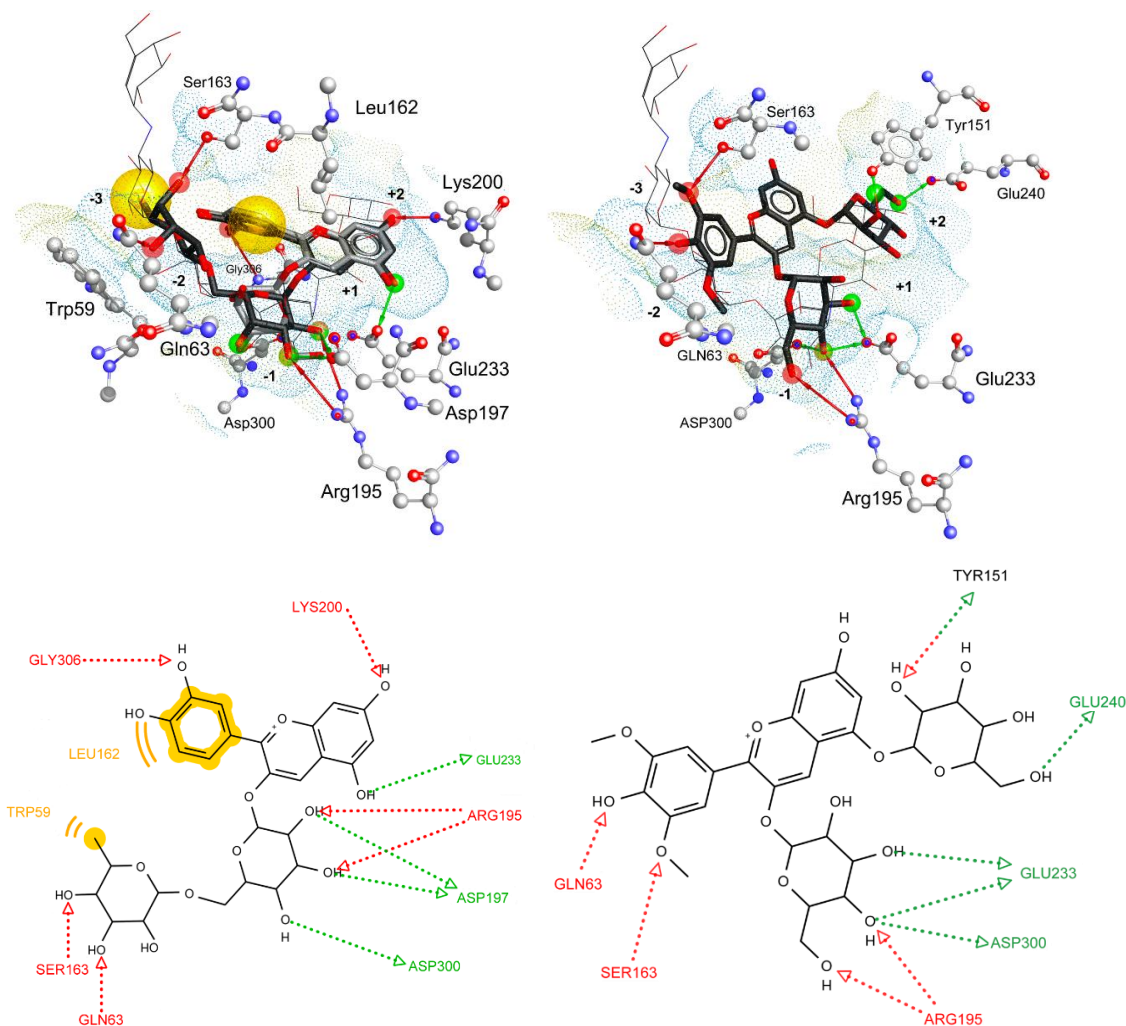
Inhibitor	Gátlás típusa	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μg/ml)	Számított IC ₅₀ (μg/ml)
C59	Kompetitív	nd	330 ± 45	377
Db	Kompetitív	nd	370 ± 42	1028
VN1	Kompetitív	nd	610 ± 50	525
A	Kompetitív	nd	790 ± 55	836
Kj	Kompetitív	nd	892 ± 62	1096
Cy-3-O-glc	Kompetitív	180 ± 20	84 ± 10	
Cy-3-rut	Kompetitív	200 ± 24	126 ± 15	
Mv-3-O-glc	Kompetitív	675 ± 73	356 ± 39	
Mv-3,5-O-diglc	Kompetitív	80 ± 10	55 ± 7	

nd, nincs adat.

A táblázat számított IC₅₀ adatait a különböző meggykivonatok HPLC méréssel meghatározott antocianin összetételének ismeretében kalkuláltuk, és a Db jelű minta

kivételével jó egyezést kaptunk a mért értékekkel. Ennél a mintánál más, gátló hatású vegyületek jelenlétét tételeztük fel a kivonatban.

Bár a malvidin-3-glükózid kisebb hatékonyságúnak bizonyult a cianidin-3-glükózidnál, a malvidin-diglükózid nagyságrenddel jobb gátlást mutatott a szintén két cukor egységet tartalmazó cianidin-rutinozidnál. Ennek megértéséhez molekulamodellelési számításokat végeztünk. A HSA PDB adatbázisban elérhető szerkezete (1MFV) alapján felépített modell akarbózzal alkotott komplexét tekintettük kiindulásnak a cianidin-3-glükózid és -rutinozid, valamint a malvidin-3,5-diglükózid dokkolási vizsgálataihoz.



52. ábra Antocianinok kötődése a HSA (PDB kód 1MFV) aktív centrumába. 3D térszerkezet (fent) az alhelyek jelölésével (-3 - +2). A referencia inhibitorként használt akarbóz szerkezete vonalas ábrával jelenik meg, a bal oldali ábrán a cianidin-glükózid (szürke) és cianidin-rutinozid (fekete), jobb oldalin a malvidin-diglükózid, jelölve a feltételezett másodlagos kötéseket. 2D szerkezetek (lent) a valószínűsíthető másodlagos kötésekkkel: a sárga körök a hidrofób kölcsönhatásokat, a zöld és piros nyilak a donor és akceptor H-híd kapcsolatokat jelzik [141]

Ezek a számítások igazolták, hogy a cianidin-glikozidok hasonló kötési móddal rendelkeznek és főként H-híd kötéseket alakítanak ki az aktív hely His305, Asp300, His299

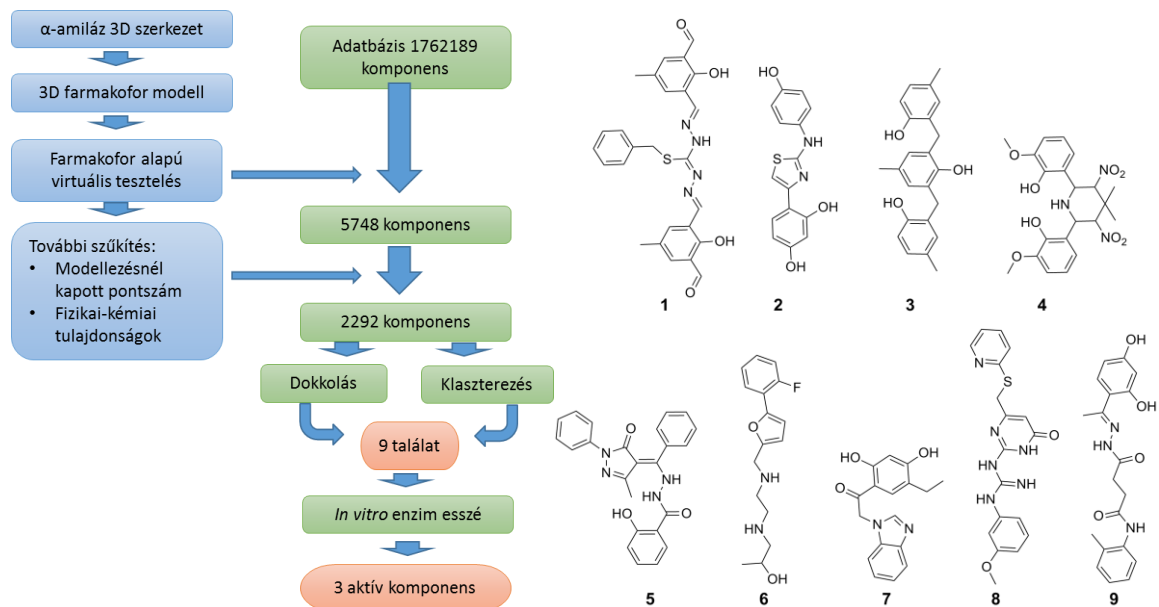
és Arg195 aminosavaival, de a cianidin *B* gyűrűje általi hidrofób kölcsönhatások is szerepet játszanak a kötődésben (52. ábra). Ehhez képest a malvidin-diglükózid közel 60 fokkal elforgatva kapcsolódik az aktív helyhez és így lehetőség adódik a *B* gyűrű eltérő orientációjára a -2 és -3 alhelyek betöltésével. Ennek eredményeként a *B* gyűrű OH csoportja H-híd kötést tud kialakítani a -2 alhely Gln63 aminosavával, ami csak a cianidin-rutinozid esetén játszik szerepet a cukor rész kötésében. Ezen kívül, a cukorgyűrűk pozíciója is kedvezőbbé válik: a *C* gyűrűhöz kapcsolódó glükóz egység OH csoportjai a -1 alhely Glu233, Asp300 és Arg195 aminosavaival lépnek kapcsolatba, míg az *A* gyűrűhöz kötött glükóz 2OH és 6OH csoportjai a +2 alhely Tyr151 és Glu240 aminosavaival alakítanak ki H-híd kötést. A számítások rámutattak, hogy a *B* gyűrű -2 és -3 alhelyre történő kötődése lényeges szerepet játszik a gátló hatás kialakulásában.

A nyálban található α -amiláz a fogszuvasodás elleni beavatkozások biológiai célpontja lehet, mivel a plakk képző *Streptococcus* amiláz kötő proteinjével kapcsolódva a fogakon keletkező biofilm fontos komponense [143]. A meggy kivonatok gátló hatásának felhasználhatóságát a fogszuvasodás elleni védelemben kis létszámú humán klinikai kísérletben vizsgáltuk [144]. Igazoltuk, hogy az antocianin tartalmú meggykivonat gátolja az emberi nyál α -amiláz enzimét, ami késlelteti a keményítő lebomlását a szájüregben. Eredményeink szerint a rágás mechanikai hatása, a nyál mosó hatása és az antocianinok kémiai gátló hatása kiegészítik egymást, és a hatékonyság növekedését eredményezik. Az α -amilázok ismert szerkezete és a modern kemoinformatikai eszközök lehetővé teszik számos természetben előforduló, vagy szintetikusán előállított vegyület inhibitor potenciáljának *in silico* tesztelését, gátlásvizsgálataink ilyen irányban is folytatódnak.

4.4.3. Modellezéssel kiválasztott „drug-like” inhibitorok

Míg az előző esetben a meggy antocianinok kísérletesen tapasztalt gátló hatását sikerült igazolni modellezési, ligand dokkolási számításokkal, addig a következőkben bemutatott eredményeknél ellentétes stratégiát követtünk. Német együttműködő partnereink által több α -amiláz szerkezet felhasználásával felépített 3D farmakofór modellt felhasználásával vegyületkönyvtárakból kiválasztott „drug-like” molekulákat teszteltünk α -amiláz gátlás szempontjából. A modell létrehozásához a PDB adatbázisban megtalálható HPA, HSA, és PPA szerkezeteket (3OLD, 3OLE, 3OLG, 3OLI, 3IJ9, 3IJ7, 2QV4,3BAJ, 3BAY, 1XH2, 1XD0, 1XD1, 1XH0, 1XCX, 1XCW, 1CPU, 1MFV, and 1OSE) használták fel. A vegyületek kiválasztásának sémája az 53. ábrán látható a tesztelés főbb adataival. Ilyen módon a nagyszámú, adatbázisban elérhető vegyületből kiválasztott kilenc vegyületet

vetettük alá gátlás vizsgálatoknak [145]. A teszteléshez a rövid GalG2CNP szubsztrátot és spektrofotometriás módszert használtuk, pozitív kontrollként az ismert α -amiláz gátlószert az akarbózt alkalmaztuk.



53. ábra A tesztelt vegyületek vegyületkönyvtárakból való kiválasztásának folyamata és képleteik

Az **1** jelű vegyülettel rossz oldékonysága miatt nem tudtunk gátló hatást elérni, a többi vegyületre kapott IC_{50} adatokat a 13. táblázat tartalmazza. A legjobb hatású, $300 \mu\text{M}$ -nál kisebb félhatásos koncentrációt mutató **2**, **3** és **4** vegyületek kompetitív gátlószerek bizonyultak. Bár az IC_{50} értékek nem érték el az akarbózra kapott nagyságrendet, a (8) egyenlet szerint számított ligand hatékonyság (LE) értékek szerint azzal összevethető, vagy jobb gátlószerek lehetnek kisebb molekulatömegüknek köszönhetően.

$$LE = \frac{1,37}{HA} * pIC_{50} \quad (8)$$

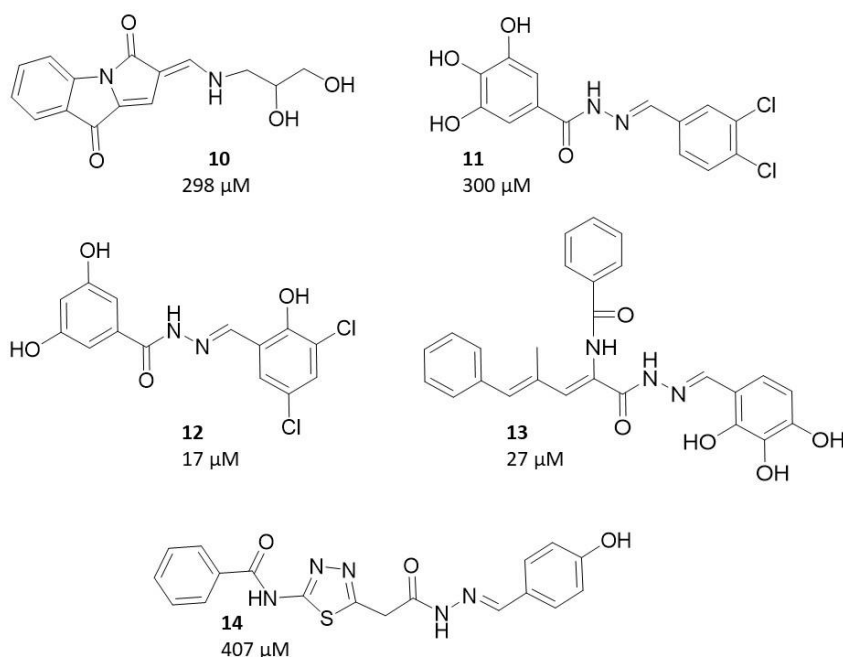
ahol HA a nehéz atomok száma és pIC_{50} a félhatásos gátló koncentráció negatív logaritmus.

13. táblázat A vegyületkönyvtárakból kiválasztott anyagok gátlási és ligand hatékonysági adatai

Vegyület	Molekula -tömeg	HA	GalG2CNP, HSA	
			IC ₅₀ (μM)	LE
Akarbóz*	645.6	44	0.5	0.19
1	489.56	35	NT	-
2	300.33	21	138	0.25
3	348.43	26	200	0.19
4	447.43	32	300	0.15
5	413.44	31	inaktív	-
6	294.36	21	1000	0.19
7	296.32	22	ND	-
8	382.44	27	326	0.18
9	355.38	26	850	0.16

HA: nehéz atomok száma

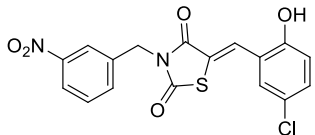
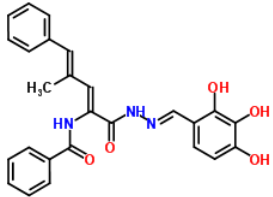
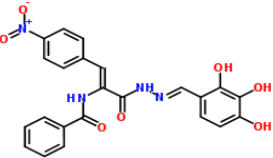
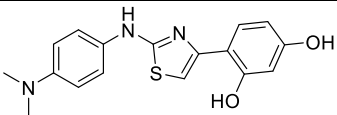
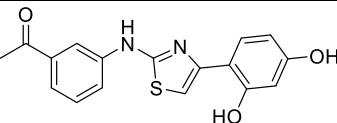
A kiválasztás módját finomítva ismert amiláz gátló vegyületek szerkezete alapján kialakított hat csoportnak megfelelő külön farmakofor modelleket hoztak létre. További szűrések történtek a potenciálisan nem stabil, reaktív és toxikus molekulákra, valamint igazoltan nem gátló szerkezetek felhasználásával. Végül az 1346275 vegyületből így kapott 299 került dokkolásra a humán pankreász amiláz (HPA PDB: 3OLE) szerkezetébe. Így kaptuk azt a hét vegyületet, amit α -amiláz gátlásra megvizsgáltunk. Az 54. ábrán bemutatott öt vegyület esetében kaptunk μM nagyságrendű gátlási állandókat HSA enzim és GalG2CNP szubsztrát alkalmazásával.

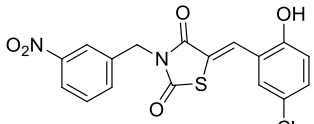
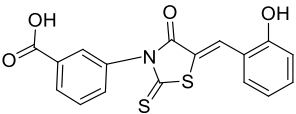
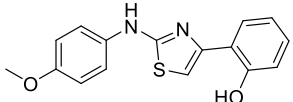
54. ábra A modellezéssel kiválasztott és amiláz gátlást mutató vegyületek szerkezete és IC₅₀ értékei HSA enzimen.

A **10** vegyület az akarviozin-glükóz modell használatával lett kiválasztva (bár nem szénhidrát alapú), a **11** és **13** vegyületek a flavonoid (mircetin) modell, míg a **12** és **14** vegyületek a floroglucin modell csoportba tartozóak voltak. A két legjobb gátlást mutató vegyület közül a **12** nem-kompetitív, míg a **13** kompetitív módon gátolta a HSA-t [146].

A hatékonynak talált vegyületek további származékait vizsgáltuk egy következő kísérletsorozatban a rövid GalG2CNP szubsztráton spektrofotometriával majd keményítő szubsztráton (az *in vivo* körülményekhez jobban hasonlító paraméterek mellett). Több vizsgált inhibitor sárga színe, vagy csapadékképződés akadályozta a spektrofotometriás mérést, amit ITC módszer alkalmazásával sikerült kiküszöbölni. Az ITC mérések során viszont a rossz oldékonyság miatt használt oldószer (DMSO) jelentett problémát. A vizsgált 54 vegyület közül a GalG2CNP szubsztráton legjobb gátlást ($IC_{50} < 100 \mu M$) mutatók eredményei láthatók a 14. táblázatban. A keményítőn mért IC_{50} értékek közel egy nagyságrenddel nagyobbak, aminek oka, hogy a GalG₂CNP túl rövid szubsztrát a HSA számára, így a hidrolízis gátlása kisebb inhibitor koncentrációval is elérhető.

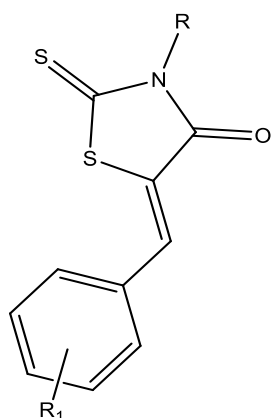
14. táblázat: A spektrofotometriás vizsgálatok során legjobb gátlást mutató inhibitorok ($IC_{50} \leq 100 \mu M$) GalG₂CNP és keményítő szubsztráton mért IC_{50} értékei

Kód	Szerkezet	GalG2CNP IC_{50} (μM)	LE	Keményítő - ITC IC_{50} (μM)
15		85	0,21	650
16		70	0,17	400
17		100	0,16	na.
18		100	0,24	800
19		100	0,24	100

Kód	Szerkezet	GalG2CNP IC50 (μM)	LE	Keményítő - ITC IC50 (μM)
20		50	0,23	300
21		62	0,24	400
22		40	0,30	400

Ezek az eredmények rámutatnak, hogy a rövid szubsztrát szkrínelési vizsgálatokra jól alkalmazható, de a hatékonyan talált gátlók hatását mindig ellenőrizni kell keményítő szubsztráton is.

Az általunk is vizsgált és jó gátlást mutató tiazolidin, tiazolidin-dion, és rodanin alapvázú vegyületeket korábban már hatékonyan találták több célponton ható gátlószerekként [147-149]. Ezen származékok gátló hatását Maccari és munkatársai igazolták aldóz redukáz (AR) és protein tirozin foszfatáz (PTP1B) enzimekre. Felmerült a kérdés, vajon gátolják-e ezek a molekulák az α -amilázt is, ezért megvizsgáltuk az 55. ábrán látható hét vegyület hatását [150].



Vegyület száma	R	R ₁
23	CH ₂ COOH	3-OCH ₂ CONH ₂
24	CH ₂ COOH	4-OCH ₂ CONH ₂
25	CH ₂ COOH	3-OCH ₃ , 4-OCH ₂ CONH ₂
26	CH ₂ COOH	4-OCH ₃ , 3-OCH ₂ CONH ₂
27	CH ₂ COOH	4-OCH ₂ C ₆ H ₅
28	CH ₂ COOH	3-OCH ₂ C ₆ H ₅
29	H	4-OC ₆ H ₅

55. ábra: A vizsgált hét (5-aryliden-4-oxo-2-tioxotiazolidin-3-il)ecetsavszármazék szerkezete

A vizsgálatokba a PPA mellett az α -glükózidázt, mint a humán szénhidrát emésztésben szintén fontos enzimet is bevontuk. Az aktivitásmérések α -amiláz esetén GalG2CNP, az α -

glükózidáz esetén PNP- α -glükózid szubsztráton történtek. A spektrofotometriás gátlásvizsgálatok során kapott IC_{50} értékeket és az irodalmi adatokat az 15. táblázat mutatja. Amint azt a táblázat adatai szemléltetik, valamennyi vegyület gátolta mindkét glükózidáz enzimet, de a gátlás mértéke eltérő és minden esetben elmaradt az aldóz-reduktázon tapasztalt gátlástól. A legapolárisabb **24** vegyület rossz oldékonysága miatt nem tudtuk IC_{50} értéket meghatározni, a többi esetben 100 μ M körüli értékeket kaptunk. A több enzimen hatásos vegyületek felvetik a promiszkuitás lehetőségét, ezért a 4.4.1. fejezetben részletezett módon vizsgáltuk, vajon aggregáció alapú-e a gátlás. A mérésekhez a specifikus α -glükózidáz gátló gyógyszerként is forgalmazott akarbózt használtuk negatív kontrollként.

A közvetett módszerek alkalmazásakor a gátlásvizsgálatokat megismételtük:

- 0,01% Triton X-100 nemionos detergens jelenlétében,
- enzim-inhibitor előinkubálást alkalmazva,
- a PPA koncentrációját módosítva, és
- az inhibitor oldatának centrifugálását követően.

15. táblázat: Az **23-29** tiazolidinszármazékok eltérő specifitású enzimeken mért gátló hatása.

Vegyület száma	R	R ₁	IC_{50} (μ M)*			
			PPA	α -glükózidáz	AR [151]	PTP1B [151]
23	CH ₂ COOH	3-OCH ₂ CONH ₂	194 \pm 3	208 \pm 3	0,06	717
24	CH ₂ COOH	4-OCH ₂ CONH ₂	96,4	89,6 \pm 2,0	0,2	10%
25	CH ₂ COOH	3-OCH ₃ , 4-OCH ₂ CONH ₂	96,9	100 \pm 2	0,2	378
26	CH ₂ COOH	4-OCH ₃ , 3-OCH ₂ CONH ₂	$\frac{\pm 1}{66,2}$ $\pm 0,3$	62,1 \pm 1,2	0,1	679
27	CH ₂ COOH	4-OCH ₂ C ₆ H ₅	294 \pm 5	21% [†]	0,05	56
28	CH ₂ COOH	3-OCH ₂ C ₆ H ₅	23% ^{††}	141 \pm 5	0,05	43,1
29	H	4-OC ₆ H ₅	r.v. ^{**}	25% ^{†††}	0,06	63,9

*: átlag \pm illesztési hiba.

** : Rendellenes viselkedés

[†]: Max.gátlás 102 μ M [I] mellett

^{††}: Max.gátlás 193 μ M [I] mellett

^{†††}: Max.gátlás 211 μ M [I] mellett

A közvetett módszerek mellett dinamikus fényszórás (DLS) méréseket is végeztünk az aggregálódott molekulák kimutatására. A várakozásnak megfelelően az akarbóz (negatív kontrol) gátló hatása nem változott a reakciókörülmények fenti változtatása miatt. Változatlan IC_{50} értékeket kaptunk az **23**, **25** és **26** tiazolidinszármazék esetében is, és a DLS mérések is alátámasztották, hogy aggregátumok nem keletkeztek. Így ezeket a vegyületeket, mint specifikus, de több enzimen ható „multitarget” inhibitorokat azonosítottuk. A többi vizsgált vegyületnél a közvetett és közvetlen módszerrel végzett vizsgálatok is változást mutattak, igazoltuk a **24**, **27**, **28**, **29** vegyületek detergenssel, a célenzim koncentrációjának változtatásával és centrifugálással szembeni érzékenységet, valamint időfüggő gátló hatását. Az aggregátumok jelenlétét a DLS mérések is megerősítették, így megállapítottuk, hogy ezek a vegyületek a vizsgált koncentrációtartományban gátló hatásukat aggregátumok képzésével fejtik ki. Ugyanakkor az aldóz reduktáz enzim esetében a nagyságrendekkel kisebb hatékony koncentráció miatt a gátlás specifikusnak tekinthető.

5. Összefoglalás

Tudományos pályafutásom közel 30 éve során a szénhidrátokon ható enzimek szerkezetének és működésének minél alaposabb megismerése volt a célom. Bár munkám nagy része alapkutatás, az általam tanulmányozott enzimek mezőgazdasági, ipari vagy humán gyógyászati jelentőséggel is bírnak. A dolgozatban összefoglalt, 2007-2022 között végzett kutatások során elért eredményeim négy nagyobb témakörre bonthatók.

1. A poliszacharid hidrolázok szerkezetfelderítése témakörön belül négy eltérő eredetű és működésmódú enzimet tanulmányoztam. Az aktív hely energetikai viszonyainak leírásához kifejlesztett SUMA számítógépes program alkalmazásával *endo* enzimek alhely térképeinek számítása vált lehetővé. Ehhez a korábban szintetizált kromofor csoportot tartalmazó oligoszacharid szubsztrátok hidrolízisekor keletkező termékek eloszlását határoztuk meg HPLC módszerrel. Az ipari jelentőségű árpa α -amiláz izoenzimek és mutánsaik vizsgálatával az aktív hely aminosavainak szerepe mellett a másodlagos kötőhelyek hidrolízisre, azon belül a termékeloszlásra gyakorolt hatását is leírtuk. Emellett elvégeztük egy mezőgazdasági szempontból fontos rovar, a burgonyabogár α -amiláz enzimének részletes vizsgálatát, elkészítettük az alhely térképét, rámutattunk az emlős amilázokkal való hasonlóságokra és különbségekre. Az *exo* hatásmódú enzimek közül az édesburgonya β -amiláz működését is a különböző hosszúságú szubsztrátok termékeloszlásával jellemeztük. Meghatároztuk a processzivitás mértékét és leírtuk a hidrolízis reakció kezdeti szakaszán lejátszódó transzglykozilezést. A patogén kórokozók elleni védekezést megnehezítő bakteriális biofilm terjedésében és eltávolításában fontos szerepet játszó DispersinB enzim hatásmódját az általunk tervezett N-acetil-glükózamin oligomer szubsztrát sorozaton történő HPLC termékanalízissel vizsgáltuk. Az ezt kiegészítő NMR, MALDI-TOF MS mérések és kinetikai számítások alapján az enzim retenciós mechanizmussal, párhuzamos és egymást követő reakciólépésekkel végzi a biofilm vázát jelentő poli- β -N-acetil-glükózamin hidrolízisét.
2. Az enzimek szintézisre való felhasználhatóságát az árpa amiláz mutánsok és a rovar amiláz esetében vizsgáltam. Kiderült, hogy az aktív hely közelében elvégzett mutációk az árpa α -amiláz esetében megnövelik a transzferáz aktivitást, miközben a hidroláz aktivitás lecsökken. Az árpa AMY1 izoenzim V47F variánsával sikeresen szintetizáltunk amiláz enzimek specifikus fluorimetriás aktivitásmérését lehetővé tevő

kettő, három és öt glükóz egységet tartalmazó metil-umbelliferil oligoszacharid szubsztrátokat. A burgonyabogár α -amiláz enzimének transzfer aktivitását a mindkét végen védőcsoportot hordozó maltooligomer szubsztrátokon mutattuk ki. A szekvencia és szerkezet analízisek alapján a rovar amilázokból hiányzó 304-310 pozíciójú glicin gazdag hurok, a His101Asp csere, valamint az aglikonkötő régió poláris aminosavai helyett az LDAm₁-ban jelen levő több Phe azok a szerkezeti elemek, amelyek felelősek a transzglykozilezésért. Ezek a megfigyelések felhasználhatók megnövelt szintetikus aktivitású amilázok fehérjemérnökséggel való létrehozására.

3. Az enzimek és gátlásuk lehetőségeinek tanulmányozásához több saját fejlesztésű aktivitásmérést alkalmaztunk a rutinszerűen használt egyszerűbb fotometriás mérések kiegészítésére. Az izotermikus titrációs kalorimetria (ITC) biztosította általános detektálást kihasználva megvalósítottuk az α -amiláz maltooligomer és keményítő szubsztrátokon való aktivitásmérését. A kék keményítő szubsztrát alkalmazásakor szubsztrátgátlást tapasztaltunk. Kidolgoztuk a megfordítható, két szubsztrátos reakciót katalizáló glikogén foszforiláz b enzim ITC aktivitásmérését a reakció mindkét irányában. A mérésekhez a természetes szubsztrátok (foszfát, glükóz-1-foszfát és glikogén) mellett maltooligomereket és származékait is használtunk. Sikeresen alkalmaztunk fordított fázisú HPLC módszert α -amiláz enzim 2-klór-4-nitrofenil β -D-maltoheptaóz szubsztráton történő aktivitásmérésére.
4. A korábbi emlős α -amiláz vizsgálatokat inhibitor kutatások egészítették ki, melyekhez természetes eredetű és szintetikus, vegyületkönyvtárakból származó anyagokat is felhasználtunk. Az elhízás és a cukorbetegség megelőzésében és kezelésében felhasználható természetes vegyületek keresése során gyógynövények és fűszerek kivonatai között azonosítottunk hatékony amiláz gátlószereket. Igazoltuk a cukorbetegség kezelésére tradicionális népi gyógyászatban ajánlott zöld tea és fahéj gátló hatását HSA enzimre. Kimutattuk bogyós gyümölcsök (áfonya, szamóca, szeder) leveleiből készült vizes kivonatok hatékony HSA gátló tulajdonságát. A meggy színanyagát adó antocianinok (főként cianidin és malvidin glikozidok) HSA gátló hatását *in vitro* és molekulamodellizációs vizsgálataink is kimutatták, majd azt később *in vivo* humán kísérletben is sikerült megerősíteni. Irodalmi és saját mérések adatai alapján felvetettük a galloylációt, valamint közvetett módszereket felhasználva az ezt okozó aggregáció alapú gátlási mechanizmust is igazoltuk.

Vegyületkönyvtárak adatainak és a PDB fehérje adatbázisban elérhető amiláz szerkezeteknek a felhasználásával potenciális α -amiláz gátló vegyületeket azonosítottuk. A vegyületek *in vitro* aktivitásmérése igazolta több, az akarviozín-glükóz, a flavonoid és a floroglucin modell alapján kiválasztott molekula mikromólos koncentrációtartományba eső hatékonyságát. Az α -amiláz mellett az aldóz redukáz, α -glükozidáz és protein foszfatáz is gátló, multitarget inhibitorként azonosított tiazolidin származékok közül a **23**, **25** és **26** vegyületek esetében specifikus, míg több esetben aggregáció alapú gátlást tapasztaltunk a közvetett és fényszórás alapú módszerek alkalmazásával.

6. Irodalomjegyzék

1. Laine, R. A. Invited Commentary: A Calculation of All Possible Oligosaccharide Isomers Both Branched and Linear Yields 1.05×10^{12} Structures for a Reducing Hexasaccharide: The *Isomer Barrier* to Development of Single-Method Saccharide Sequencing or Synthesis Systems. *Glycobiology* **1994**, 4 (6), 759–767. <https://doi.org/10.1093/glycob/4.6.759>.
2. Farkas, E.; Jánossy, L.; Harangi, J.; Kandra, L.; Lipták, A. Synthesis of Chromogenic Substrates of α -Amylases on a Cyclodextrin Basis. *Carbohydrate Research* **1997**, 303 (4), 407–415. [https://doi.org/10.1016/s0008-6215\(97\)00187-0](https://doi.org/10.1016/s0008-6215(97)00187-0).
3. Kandra, L.; Gyémánt, G.; Lipták, A. Chemoenzymatic Preparation of 2-Chloro-4-Nitrophenyl β -Maltooligosaccharide Glycosides Using Glycogen Phosphorylase b. *Carbohydrate Research* **1999**. [https://doi.org/10.1016/s0008-6215\(98\)00324-3](https://doi.org/10.1016/s0008-6215(98)00324-3).
4. Kandra, L.; Gyémánt, G.; Pál, M.; Petró, M.; Remenyik, J.; Lipták, A. Chemoenzymatic Synthesis of 2-Chloro-4-Nitrophenyl β -Maltoheptaoside Acceptor-Products Using Glycogen Phosphorylase b. *Carbohydrate Research* **2001**, 333 (2), 129–136. [https://doi.org/10.1016/s0008-6215\(01\)00138-0](https://doi.org/10.1016/s0008-6215(01)00138-0).
5. Kandra, L.; Gyémánt, G. Examination of the Active Sites of Human Salivary α -Amylase (HSA). *Carbohydrate Research* **2000**, 329 (3), 579–585. [https://doi.org/10.1016/s0008-6215\(00\)00221-4](https://doi.org/10.1016/s0008-6215(00)00221-4).
6. Kandra, L.; Gyémánt, G.; Remenyik, J.; Hovánszki, G.; Lipták, A. Action Pattern and Subsite Mapping of *Bacillus Licheniformis* α -Amylase (BLA) with Modified Maltooligosaccharide Substrates. *FEBS Letters* **2002**, 518 (1–3), 79–82. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(02\)02649-2](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(02)02649-2).
7. Allen, J. D.; Thoma, J. A. Subsite Mapping of Enzymes. Application of the Depolymerase Computer Model to Two α -Amylases. *Biochemical Journal* **1976**, 159 (1), 121–132. <https://doi.org/10.1042/bj1590121>.
8. Drula, E.; Garron, M.-L.; Doğan, S.; Lombard, V.; Henrissat, B.; Terrapon, N. The Carbohydrate-Active Enzyme Database: Functions and Literature. *Nucleic Acids Research* **2021**, 50 (D1), D571–D577. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1045>.
9. Henrissat, B.; Davies, G. J. Structural and Sequence-Based Classification of Glycoside Hydrolases. *Current Opinion in Structural Biology* **1997**, 7 (5), 637–644. [https://doi.org/10.1016/s0959-440x\(97\)80072-3](https://doi.org/10.1016/s0959-440x(97)80072-3).
10. Koshland, D. E. STEREOCHEMISTRY AND THE MECHANISM OF ENZYMATIC REACTIONS. *Biological Reviews* **1953**, 28 (4), 416–436. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185x.1953.tb01386.x>.
11. McCarter, J. D.; Withers, G. Mechanisms of Enzymatic Glycoside Hydrolysis. *Current Opinion in Structural Biology* **1994**, 4 (6), 885–892. [https://doi.org/10.1016/0959-440x\(94\)90271-2](https://doi.org/10.1016/0959-440x(94)90271-2).
12. McIntosh, L. P.; Hand, G.; Johnson, P. E.; Joshi, M. D.; Körner, M.; Plesniak, L. A.; Ziser, L.; Wakarchuk, W. W.; Withers, S. G. The pK_a of the General Acid/Base Carboxyl Group of a Glycosidase Cycles during Catalysis: A ^{13}C -NMR Study of *Bacillus Circulans* Xylanase. *Biochemistry* **1996**, 35 (31), 9958–9966. <https://doi.org/10.1021/bi9613234>.
13. Van Scheltinga, A. C. T.; Armand, S.; Kalk, K. H.; Isogai, A.; Henrissat, B.; Dijkstra, B. W. Stereochemistry of Chitin Hydrolysis by a Plant Chitinase/Lysozyme and x-Ray Structure of a Complex with Allosamidin Evidence for Substrate Assisted

- Catalysis. *Biochemistry* **1995**, *34* (48), 15619–15623. <https://doi.org/10.1021/bi00048a003>.
14. Cantarel, B. L.; Coutinho, P. M.; Rancurel, C.; Bernard, T.; Lombard, V.; Henrissat, B. The Carbohydrate-Active EnZymes Database (CAZy): An Expert Resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Research* **2009**, *37* (Database), D233–D238. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn663>.
 15. Rajan, S. S.; Yang, X.; Collart, F.; Yip, V. L. Y.; Withers, S. G.; Varrot, A.; Thompson, J. F.; Davies, G. J.; Anderson, W. F. Novel Catalytic Mechanism of Glycoside Hydrolysis Based on the Structure of an NAD⁺/Mn²⁺-Dependent Phospho- α -Glucosidase from *Bacillus Subtilis*. *Structure* **2004**, *12* (9), 1619–1629. <https://doi.org/10.1016/j.str.2004.06.020>.
 16. Davies, G. J.; Henrissat, B. Structures and Mechanisms of Glycosyl Hydrolases. *Structure* **1995**, *3* (9), 853–859. [https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(01\)00220-9](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(01)00220-9).
 17. Rouvinen, J.; Bergfors, T.; Teeri, T. T.; Knowles, J.; Jones, T. A. Three-Dimensional Structure of Cellobiohydrolase II from *Trichoderma Reesei*. *Science* **1990**, *249* (4967), 380–386. <https://doi.org/10.1126/science.2377893>.
 18. Gyimesi, M.; Sarlós, K.; Derényi, I.; Kovács, M. Streamlined Determination of Processive Run Length and Mechanochemical Coupling of Nucleic Acid Motor Activities. *Nucleic Acids Research* **2010**, *38* (7), e102. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq014>.
 19. Kuriki, T.; Imanaka, T. The Concept of the α -Amylase Family: Structural Similarity and Common Catalytic Mechanism. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **1999**, *87* (5), 557–565. [https://doi.org/10.1016/s1389-1723\(99\)80114-5](https://doi.org/10.1016/s1389-1723(99)80114-5).
 20. Donlan, R. M.; Costerton, J. W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* **2002**, *15* (2), 167–193. <https://doi.org/10.1128/cmr.15.2.167-193.2002>.
 21. Harro, J. M.; Peters, B. M.; O'May, G. A.; Archer, N. K.; Kerns, P.; Prabhakara, R.; Shirliff, M. E. Vaccine Development in *Staphylococcus Aureus*: Taking the Biofilm Phenotype into Consideration. *Fems Immunology and Medical Microbiology* **2010**, *59* (3), 306–323. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695x.2010.00708.x>.
 22. Zambon, J. J. Actinobacillus Actinomycetemcomitans in Human Periodontal Disease. *Journal of Clinical Periodontology* **1985**, *12* (1), 1–20. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1985.tb01348.x>.
 23. Fine, D. H.; Furgang, D.; Kaplan, J. B.; Charlesworth, J.; Figurski, D. H. Tenacious Adhesion of Actinobacillus Actinomycetemcomitans Strain CU1000 to Salivary-Coated Hydroxyapatite. *Archives of Oral Biology* **1999**, *44* (12), 1063–1076. [https://doi.org/10.1016/s0003-9969\(99\)00089-8](https://doi.org/10.1016/s0003-9969(99)00089-8).
 24. Kaplan, J. B.; Rangunath, C.; Ramasubbu, N.; Fine, D. H. Detachment of *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* Biofilm Cells by an Endogenous β -Hexosaminidase Activity. *Journal of Bacteriology* **2003**, *185* (16), 4693–4698. <https://doi.org/10.1128/jb.185.16.4693-4698.2003>.
 25. Itoh, Y.; Wang, X.; Hinnebusch, B. J.; Preston, J. F.; Romeo, T. Depolymerization of β -1,6- *N*-Acetyl- d -Glucosamine Disrupts the Integrity of Diverse Bacterial

- Biofilms. *Journal of Bacteriology* **2005**, *187* (1), 382–387. <https://doi.org/10.1128/jb.187.1.382-387.2005>.
26. Ramasubbu, N.; Thomas, L. M.; Ragunath, C.; Kaplan, J. B. Structural Analysis of Dispersin B, a Biofilm-Releasing Glycoside Hydrolase from the Periodontopathogen *Actinobacillus Actinomycetemcomitans*. *Journal of Molecular Biology* **2005**, *349* (3), 475–486. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.03.082>.
27. Manuel, S. G. A.; Ragunath, C.; Sait, H. B. R.; Izano, E. A.; Kaplan, J. B.; Ramasubbu, N. Role of Active-Site Residues of Dispersin B, a Biofilm-Releasing Beta-Hexosaminidase from a Periodontal Pathogen, in Substrate Hydrolysis. *FEBS Journal* **2007**, *274* (22), 5987–5999. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.06121.x>.
28. Newgard, C. B.; Hwang, P. K.; Fletterick, R. J. The Family of Glycogen Phosphorylases: Structure and Function. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **1989**, *24* (1), 69–99. <https://doi.org/10.3109/10409238909082552>.
29. Livanova, N. B.; Chebotareva, N. A.; Eronina, T. B.; Bi, K. Pyridoxal 5"-Phosphate as a Catalytic and Conformational Cofactor of Muscle Glycogen Phosphorylase b. *Biokhimiya* **2002**, *67* (10), 1089–1098. <https://doi.org/10.1023/a:1020978825802>.
30. Nadeau, O. W.; Fontes, J. D.; Carlson, G. M. The Regulation of Glycogenolysis in the Brain. *Journal of Biological Chemistry* **2018**, *293* (19), 7099–7107. <https://doi.org/10.1074/jbc.r117.803023>.
31. Fletterick, R. J.; Sprang, S. R. Glycogen Phosphorylase Structures and Function. *Accounts of Chemical Research* **1982**, *15* (11), 361–369. <https://doi.org/10.1021/ar00083a004>.
32. Kyriakis, E.; Stravodimos, G. A.; Kantsadi, A. L.; Chatzileontiadou, D. S. M.; Skamnaki, V. T.; Leonidas, D. D. Natural Flavonoids as Antidiabetic Agents. The Binding of Gallic and Ellagic Acids to Glycogen Phosphorylase b. *FEBS Letters* **2015**, *589* (15), 1787–1794. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.05.013>.
33. McCormack, J. G.; Westergaard, N.; Kristiansen, M.; Brand, C.; Lau, J. Pharmacological Approaches to Inhibit Endogenous Glucose Production as a Means of Anti-Diabetic Therapy. *Current Pharmaceutical Design* **2001**, *7* (14), 1451–1474. <https://doi.org/10.2174/1381612013397393>.
34. Davies, G. J.; Wilson, K. S.; Henrissat, B. Nomenclature for Sugar-Binding Subsites in Glycosyl Hydrolases. *Biochemical Journal* **1997**, *321* (2), 557–559. <https://doi.org/10.1042/bj3210557>.
35. Gyémánt, G.; Hovánszki, G.; Kandra, L. Subsite Mapping of the Binding Region of α -Amylases with a Computer Program. *European Journal of Biochemistry* **2002**, *269* (21), 5157–5162. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03212.x>.
36. Kandra, L.; Gyémánt, G.; Farkas, E.; Lipták, A. Action Pattern of Porcine Pancreatic Alpha-Amylase on Three Different Series of β -Maltooligosaccharide Glycosides. *Carbohydrate Research* **1997**, *298* (3), 237–242. [https://doi.org/10.1016/s0008-6215\(96\)00310-2](https://doi.org/10.1016/s0008-6215(96)00310-2).
37. Robyt JF, French D. The action pattern of porcine pancreatic alpha-amylase in relationship to the substrate binding site of the enzyme. *Journal of Biological Chemistry* **1970**, *245*(15), 3917-3927.
38. Brayer, G. D.; Sidhu, G.; Maurus, R.; Rydberg, E. H.; Braun, C.; Wang, Y.; Nguyen, N. T.; Overall, C. M.; Withers, S. G. Subsite Mapping of the Human Pancreatic α -

- Amylase Active Site through Structural, Kinetic, and Mutagenesis Techniques. *Biochemistry* **2000**, *39* (16), 4778–4791. <https://doi.org/10.1021/bi9921182>.
39. Damaris, R. N.; Lin, Z.; Yang, P.; He, D. The Rice Alpha-Amylase, Conserved Regulator of Seed Maturation and Germination. *International Journal of Molecular Sciences* **2019**, *20* (2), 450. <https://doi.org/10.3390/ijms20020450>.
 40. Terashima, M.; Hayashi, N.; Thomas, B. R.; Rodriguez, R. L.; Katoh, S. Kinetic Parameters of Two Rice α -Amylase Isozymes for Oligosaccharide Degradation. *Plant Science* **1996**. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(96\)04373-7](https://doi.org/10.1016/0168-9452(96)04373-7).
 41. MacGregor, A. W.; Morgan, J. E.; MacGregor, E. A. The Action of Germinated Barley Alpha-Amylases on Linear Maltodextrins. *Carbohydrate Research* **1992**, *227*, 301–313. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(92\)85080-j](https://doi.org/10.1016/0008-6215(92)85080-j).
 42. Kandra, L.; Hachem, M. A.; Gyémánt, G.; Kramhøft, B.; Svensson, B. Mapping of Barley α -Amylases and Outer Subsite Mutants Reveals Dynamic High-Affinity Subsites and Barriers in the Long Substrate Binding Cleft. *FEBS Letters* **2006**, *580* (21), 5049–5053. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.08.028>.
 43. Nielsen, M.; Seo, E.-J.; Dilokpimol, A.; Andersen, J. M.; Hachem, M. A.; Næsted, H.; Willemoës, M.; Bozonnet, S.; Kandra, L.; Gyémánt, G.; Haser, R.; Aghajari, N.; Svensson, B. Roles of Multiple Surface Sites, Long Substrate Binding Clefts, and Carbohydrate Binding Modules in the Action of Amylolytic Enzymes on Polysaccharide Substrates. *Biocatalysis and Biotransformation* **2008**, *26* (1–2), 59–67. <https://doi.org/10.1080/10242420701789528>.
 44. Robert, X.; Haser, R.; Mori, H.; Svensson, B.; Aghajari, N. Oligosaccharide Binding to Barley A-Amylase 1. *Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280* (38), 32968–32978. <https://doi.org/10.1074/jbc.m505515200>.
 45. Robert, X.; Haser, R.; Gottschalk, T. E.; Ratajczak, F.; Driguez, H.; Svensson, B.; Aghajari, N. The Structure of Barley A-Amylase Isozyme 1 Reveals a Novel Role of Domain C in Substrate Recognition and Binding. *Structure* **2003**, *11* (8), 973–984. [https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(03\)00151-5](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(03)00151-5).
 46. Nielsen, M.; Seo, E.-S.; Bozonnet, S.; Aghajari, N.; Robert, X.; Haser, R.; Svensson, B. Multi-Site Substrate Binding and Interplay in Barley α -Amylase 1. *FEBS Letters* **2008**, *582* (17), 2567–2571. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.06.027>.
 47. Bozonnet, S.; Jensen, M. G.; Nielsen, M.; Aghajari, N.; Jensen, M.; Kramhøft, B.; Willemoës, M.; Tranier, S.; Haser, R.; Svensson, B. The ‘Pair of Sugar Tongs’ Site on the Non-Catalytic Domain C of Barley α -Amylase Participates in Substrate Binding and Activity. *FEBS Journal* **2007**, *274* (19), 5055–5067. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.06024.x>.
 48. Tranier, S., Deville, K., Robert, X., Bozonnet, S., Haser, R., Svensson, B., and Aghajari, N. (2005) Insights into the “Pair of Sugar Tongs” Surface Binding Site in Barley α -Amylase Isozymes and Crystallization of Appropriate Sugar Tongs Mutants. *Biologia* **2005**, *60*, 37–46.
 49. Kadziola, A.; Abe, J.-I.; Svensson, B.; Haser, R. Crystal and Molecular Structure of Barley A-Amylase. *Journal of Molecular Biology* **1994**, *239* (1), 104–121. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1354>.
 50. Kadziola, A.; Søgaard, M.; Svensson, B.; Haser, R. Molecular Structure of a Barley α -Amylase-Inhibitor Complex: Implications for Starch Binding and Catalysis. *Journal of Molecular Biology* **1998**, *278* (1), 205–217. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.1683>.

51. Bak-Jensen, K. S.; André, G.; Gottschalk, T. E.; Paës, G.; Tran, V. H.; Svensson, B. Tyrosine 105 and Threonine 212 at Outermost Substrate Binding Subsites –6 and +4 Control Substrate Specificity, Oligosaccharide Cleavage Patterns, and Multiple Binding Modes of Barley A-Amylase 1. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, 279 (11), 10093–10102. <https://doi.org/10.1074/jbc.m312825200>.
52. Kramhøft, B.; Bak-Jensen, K. S.; Mori, H.; Juge, N.; Nøhr, J.; Svensson, B. Involvement of Individual Subsites and Secondary Substrate Binding Sites in Multiple Attack on Amylose by Barley A-Amylase. *Biochemistry* **2005**, 44 (6), 1824–1832. <https://doi.org/10.1021/bi048100v>.
53. Mori, H.; Bak-Jensen, K. S.; Gottschalk, T. E.; Motawia, M. S.; Damager, I.; Møller, B. L.; Svensson, B. Modulation of Activity and Substrate Binding Modes by Mutation of Single and Double Subsites +1/+2 and –5/–6 of Barley α -Amylase 1. *European Journal of Biochemistry* **2001**, 268 (24), 6545–6558. <https://doi.org/10.1046/j.0014-2956.2001.02609.x>.
54. Mori, H.; Bak-Jensen, K. S.; Svensson, B. Barley α -Amylase Met53 Situated at the High-Affinity Subsite –2 Belongs to a Substrate Binding Motif in the B \rightarrow α Loop 2 of the Catalytic (β/α)₈-Barrel and Is Critical for Activity and Substrate Specificity. *European Journal of Biochemistry* **2002**, 269 (22), 5377–5390. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03185.x>.
55. Rangunath, C.; Manuel, S. G. A.; Venkataraman, V.; Sait, H. B. R.; Kasinathan, C.; Ramasubbu, N. Probing the Role of Aromatic Residues at the Secondary Saccharide-Binding Sites of Human Salivary A-Amylase in Substrate Hydrolysis and Bacterial Binding. *Journal of Molecular Biology* **2008**, 384 (5), 1232–248. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.09.089>.
56. Nielsen, M.; Bozonnet, S.; Seo, E.-S.; Mótýán, J. A.; Andersen, J. M.; Dilokpimol, A.; Hachem, M. A.; Gyémánt, G.; Næsted, H.; Kandra, L.; Sigurskjold, B. W.; Svensson, B. Two Secondary Carbohydrate Binding Sites on the Surface of Barley A-Amylase 1 Have Distinct Functions and Display Synergy in Hydrolysis of Starch Granules. *Biochemistry* **2009**, 48 (32), 7686–7697. <https://doi.org/10.1021/bi900795a>.
57. Seo, E.-S.; Andersen, J. M.; Nielsen, M.; Vester-Christensen, M. B.; Christiansen, C.; Jensen, J. D.; Mótýán, J. A.; Glaring, M. A.; Blennow, A.; Kandra, L.; Gyémánt, G.; Janeček, Š.; Haser, R.; Aghajari, N.; Hachem, M. A.; Svensson, B. New Insight into Structure/Function Relationships in Plant α -Amylase Family GH13 Members. *Journal of Applied Glycoscience* **2010**, 57 (2), 157–162. <https://doi.org/10.5458/jag.57.157>.
58. Mótýán, J. A.; Gyémánt, G.; Harangi, J.; Bagossi, P. Computer-Aided Subsite Mapping of α -Amylases. *Carbohydrate Research* **2011**, 346 (3), 410–415. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2010.12.002>.
59. Horie, Y.; Watanabe, K. Daily Utilization and Consumption of Dry Matter in Food by the Silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera : Bombycidae). *Applied Entomology and Zoology* **1983**, 18 (1), 70–80. <https://doi.org/10.1303/aez.18.70>.
60. Grossi-De-Sa, M. F.; Chrispeels, M. J. Molecular Cloning of Bruchid (*Zabrotes Subfasciatus*) α -Amylase cDNA and Interactions of the Expressed Enzyme with Bean Amylase Inhibitors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **1997**, 27 (4), 271–281. [https://doi.org/10.1016/s0965-1748\(96\)00093-8](https://doi.org/10.1016/s0965-1748(96)00093-8).

61. Buonocore; Poerio, E.; Silano; Tomasi, M. Physical and Catalytic Properties of α -Amylase from *Tenebrio molitor* L. Larvae. *Biochemical Journal* **1976**, *153* (3), 621–625. <https://doi.org/10.1042/bj1530621>.
62. Nahoum, V.; Farisei, F.; Le-Berre-Anton, V.; Egloff, M.-P.; Rougé, P.; Poerio, E.; Payan, F. A Plant-Seed Inhibitor of Two Classes of α -Amylases: X-Ray Analysis of *Tenebrio molitor* Larvae α -Amylase in Complex with the Bean *Phaseolus Vulgaris* Inhibitor. *Acta Crystallographica Section D-biological Crystallography* **1999**, *55* (1), 360–362. <https://doi.org/10.1107/s0907444998010701>.
63. Rhimi, M.; Da Lage, J.-L.; Haser, R.; Feller, G.; Aghajari, N. Structural and Functional Characterization of *Drosophila melanogaster* α -Amylase. *Molecules* **2023**, *28* (14), 5327. <https://doi.org/10.3390/molecules28145327>.
64. Baker, J. E. Properties of Amylases from Midguts of Larvae of *Sitophilus zeamais* and *Sitophilus granarius*. *Insect Biochemistry* **1983**, *13* (4), 421–428. [https://doi.org/10.1016/0020-1790\(83\)90026-4](https://doi.org/10.1016/0020-1790(83)90026-4).
65. Applebaum, S. W. The Action Pattern and Physiological Role of *Tenebrio* Larval Amylase. *Journal of Insect Physiology* **1964**, *10* (6), 897–906. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(64\)90080-0](https://doi.org/10.1016/0022-1910(64)90080-0).
66. Nagaraju, J.; Abraham, E. G. Purification and Characterization of Digestive Amylase from the Tasar Silkworm, *Antheraea mylitta* (Lepidoptera: Saturniidae). *Comparative Biochemistry and Physiology B* **1995**, *110* (1), 201–209. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(94\)00121-a](https://doi.org/10.1016/0305-0491(94)00121-a).
67. Khorram, M. S.; Abad, R. F. P.; Yazdaniyan, M.; Jafarnia, S. Digestive α -Amylase from *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae); Response to PH, Temperature and Some Mineral Compounds. *Adv. Environ. Biol.* **2010**, *4*, 101–107.
68. Szilágyi, E.; Hámori, C.; Bíró-Molnár, P.; Kandra, L.; Remenyik, J.; Gyémánt, G. Cooperation of Enzymes Involved in Carbohydrate Digestion of Colorado Potato Beetle (*Leptinotarsa decemlineata*, Say). *Bulletin of Entomological Research* **2019**, *109* (05), 695–700. <https://doi.org/10.1017/s0007485319000099>.
69. Kandra, L.; Gyémánt, G.; Remenyik, J.; Rangunath, C.; Ramasubbu, N. Subsite Mapping of Human Salivary α -Amylase and the Mutant Y151M. *FEBS Letters* **2003**, *544* (1–3), 194–198. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(03\)00495-2](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(03)00495-2).
70. Ramasubbu, N.; Venugopalan, P.; Luo, Y.; Brayer, G. D.; Levine, M. Structure of Human Salivary α -Amylase at 1.6 Å Resolution: Implications for Its Role in the Oral Cavity. *Acta Crystallographica Section D-biological Crystallography* **1996**, *52* (3), 435–446. <https://doi.org/10.1107/s0907444995014119>.
71. Gilles, C.; Astier, J.-P.; Marchis-Mouren, G.; Cambillau, C.; Payan, F. Crystal Structure of Pig Pancreatic Alpha-Amylase Isoenzyme II, in Complex with the Carbohydrate Inhibitor Acarbose. *European Journal of Biochemistry* **1996**, *238* (2), 561–569. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.0561z.x>.
72. Hámori, C.; Remenyik, J.; Kandra, L.; Gyémánt, G. Colorado Potato Beetle Alpha-Amylase: Purification, Action Pattern and Subsite Mapping for Exploration of Active Centre. *International Journal of Biological Macromolecules* **2021**, *168*, 350–355. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.071>.
73. Nakamura, K.; Ohto, M.-A.; Yoshida, N.; Nakamura, K. Sucrose-Induced Accumulation of Beta-Amylase Occurs Concomitant with the Accumulation of

- Starch and Sporamin in Leaf-Petiole Cuttings of Sweet Potato. *Plant Physiology* **1991**. <https://doi.org/10.1104/pp.96.3.902>.
74. French, D., Boyer, P.D., Lardy, H., Myrbäck, K., beta-Amylases, The Enzymes 2nd Edition, Academic Press New York (1960) pp. 345-368.
 75. Ray, R. R. β -Amylases from Various Fungal Strains. *Acta Microbiologica Et Immunologica Hungarica (Print)* **2004**, *51* (1–2), 85–95. <https://doi.org/10.1556/amicr.51.2004.1-2.6>.
 76. Cheong, C. G.; Eom, S. H.; Chang, C.; Shin, D.; Song, H. K.; Min, K. S.; Moon, J. H.; Kim, K. K.; Hwang, K. Y.; Suh, S. W. Crystallization, Molecular Replacement Solution, and Refinement of Tetrameric β -Amylase from Sweet Potato. *Proteins* **1995**, *21* (2), 105–117. <https://doi.org/10.1002/prot.340210204>.
 77. Yoshida, N.; Nakamura, K. Molecular Cloning and Expression in Escherichia Coli of cDNA Encoding the Subunit of Sweet Potato BAmylase1. *Journal of Biochemistry* **1991**, *110* (2), 196–201. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a123556>.
 78. Adachi, M.; Mikami, B.; Katsube, T.; Utsumi, S. Crystal Structure of Recombinant Soybean β -Amylase Complexed with β -Cyclodextrin. *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273* (31), 19859–19865. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.31.19859>.
 79. French, D.; Youngquist, R. W. Die Wirkungsweise von β -Amylase Auf Stärkeoligosaccharide. *Starch-starke* **1963**, *15* (12), 425–431. <https://doi.org/10.1002/star.19630151202>.
 80. Nakatani, H. Monte Carlo Simulation of Multiple Attack Mechanism of β -Amylase-Catalyzed Reaction. *Biopolymers* **1997**, *42*, 831–836.
 81. Fazekas, E.; Szabó, K.; Kandra, L.; Gyémánt, G. Unexpected Mode of Action of Sweet Potato β -Amylase on Maltooligomer Substrates. *Biochimica Et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* **2013**, *1834* (10), 1976–1981. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.06.017>.
 82. Bojarová-Fialová, P.; Křen, V. Enzymatic Approaches to O-Glycoside Introduction: Glycosidases. In *Elsevier eBooks*; 2007; pp 453–487. <https://doi.org/10.1016/b978-044451967-2/00013-1>.
 83. Cobucci-Ponzano, B.; Strazzulli, A.; Rossi, M.; Moracci, M. Glycosynthases in Biocatalysis. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2011**, *353* (13), 2284–2300. <https://doi.org/10.1002/adsc.201100461>.
 84. Romero-Téllez, S.; Lluch, J. M.; González-Lafont, À.; Masgrau, L. Comparing Hydrolysis and Transglycosylation Reactions Catalyzed by Thermus Thermophilus β -Glycosidase. A Combined MD and QM/MM Study. *Frontiers in Chemistry* **2019**, *7*. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00200>.
 85. Honda, Y.; Kitaoka, M. The First Glycosynthase Derived from an Inverting Glycoside Hydrolase. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281* (3), 1426–1431. <https://doi.org/10.1074/jbc.m511202200>.
 86. Wada, J.; Honda, Y.; Nagae, M.; Kato, R.; Wakatsuki, S.; Katayama, T.; Taniguchi, H.; Kumagai, H.; Kitaoka, M.; Yamamoto, K. 1,2- α -l-Fucosynthase: A Glycosynthase Derived from an Inverting α -Glycosidase with an Unusual Reaction Mechanism. *FEBS Letters* **2008**, *582* (27), 3739–3743. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.09.054>.
 87. Honda, Y.; Fushinobu, S.; Hidaka, M.; Wakagi, T.; Shoun, H.; Taniguchi, H.; Kitaoka, M. Alternative Strategy for Converting an Inverting Glycoside Hydrolase

- into a Glycosynthase. *Glycobiology* **2008**, *18* (4), 325–330. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwn011>.
88. Maier, T.; Sträter, N.; Schuette, C. G.; Klingenstein, R.; Sandhoff, K.; Saenger, W. The X-Ray Crystal Structure of Human β -Hexosaminidase B Provides New Insights into Sandhoff Disease. *Journal of Molecular Biology* **2003**, *328* (3), 669–681. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(03\)00311-5](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(03)00311-5).
 89. Kerrigan, J. E.; Ragunath, C.; Kandra, L.; Gyémánt, G.; Lipták, A.; Jánossy, L.; Kaplan, J. B.; Ramasubbu, N. Modeling and Biochemical Analysis of the Activity of Antibiofilm Agent Dispersin B. *Acta Biologica Hungarica* **2008**, *59* (4), 439–451. <https://doi.org/10.1556/abiol.59.2008.4.5>.
 90. Fekete, A.; Borbás, A.; Gyémánt, G.; Kandra, L.; Fazekas, E.; Ramasubbu, N.; Antus, S. Synthesis of β -(1→6)-Linked N-Acetyl-d-Glucosamine Oligosaccharide Substrates and Their Hydrolysis by Dispersin B. *Carbohydrate Research* **2011**, *346* (12), 1445–1453. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2011.03.029>.
 91. Fazekas, E.; Kandra, L.; Gyémánt, G. Model for β -1,6-N-Acetylglucosamine Oligomer Hydrolysis Catalysed by DispersinB, a Biofilm Degrading Enzyme. *Carbohydrate Research* **2012**, *363*, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2012.09.016>.
 92. Pereira, A. B.; Krieger, N.; Mitchell, D. A. Fingerprinting of Oligosaccharide-Hydrolyzing Enzymes That Catalyze Branched Reaction Schemes. *Biochemical Engineering Journal* **2016**, *113*, 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.05.012>.
 93. Remenyik, J.; Ragunath, C.; Ramasubbu, N.; Gyémánt, G.; Lipták, A. A.; Kandra, L. Introducing Transglycosylation Activity into Human Salivary α -Amylase (HSA)†. *Organic Letters* **2003**, *5* (25), 4895–4898. <https://doi.org/10.1021/ol035999k>.
 94. Kandra, L.; Gyémánt, G.; Remenyik, J.; Ragunath, N.; Ramasubbu, N. Transglycosylations Catalysed by Y151M Mutant of Human Salivary Alpha-Amylase (HSA). *Biologia, Bratislava* **2005**, *60*, 57–64.
 95. Kandra, L.; Remenyik, J.; Batta, G.; Somsák, L.; Gyémánt, G.; Park, K. H. Enzymatic Synthesis of a New Inhibitor of α -Amylases: Acarviosinyl-Isomaltosyl-Spiro-Thiohydantoin. *Carbohydrate Research* **2005**. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2005.03.003>.
 96. Kandra, L.; Remenyik, J.; Gyémánt, G.; Zajác, G. and Batta, G. Synthesis of a Novel Inhibitor Specific for Human α -Amylases. *Rare Sugars, Creating a Novel Bio-word With Rare Sugars* **2004**, 289–293.
 97. Mótóyán, J. A.; Fazekas, E.; Mori, H.; Svensson, B.; Bagossi, P.; Kandra, L.; Gyémánt, G. Transglycosylation by Barley α -Amylase 1. *Journal of Molecular Catalysis B-enzymatic* **2011**, *72* (3–4), 229–237. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.06.010>.
 98. Cha, H.; Yoon, H.-E.; Kim, Y.-W.; Lee, H.-S.; Kim, J.-W.; Kweon, K.-S.; Oh, B.-H.; Park, K.-H. Molecular and Enzymatic Characterization of a Maltogenic Amylase That Hydrolyzes and Transglycosylates Acarbose. *European Journal of Biochemistry* **1998**, *253* (1), 251–262. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2530251.x>.
 99. Morishita, Y.; Iinuma, Y.; Nakashima, N.; Majima, K.; Mizuguchi, K.; Kawamura, Y. Total and Pancreatic Amylase Measured with 2-Chloro-4-Nitrophenyl-4-O- β -d-Galactopyranosylmaltoside. *Clinical Chemistry* **2000**, *46* (7), 928–933. <https://doi.org/10.1093/clinchem/46.7.928>.

100. Hámori, C.; Kandra, L.; Gyémánt, G. LDAm α , an α -Amylase from Colorado Potato Beetle (*Leptinotarsa Decemlineata*) with Transglycosylation Activity. *Biocatalysis and Biotransformation* **2022**, *41* (2), 153–160. <https://doi.org/10.1080/10242422.2022.2050707>.
101. Feller, G.; Bonneau, M.; Da Lage, J.-L. Amyrel, a Novel Glucose-Forming α -Amylase from *Drosophila* with 4- α -Glucanotransferase Activity by Disproportionation and Hydrolysis of Maltooligosaccharides. *Glycobiology* **2021**, *31* (9), 1134–1144. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwab036>.
102. Ramasubbu, N.; Ragunath, C.; Mishra, P. J. Probing the Role of a Mobile Loop in Substrate Binding and Enzyme Activity of Human Salivary Amylase. *Journal of Molecular Biology* **2003**, *325* (5), 1061–1076. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(02\)01326-8](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(02)01326-8).
103. Da Lage, J.-L.; van Wormhoudt, A.; Cariou M.-L. Diversity and evolution of the alpha-amylase genes in animals. *Biologia, Bratislava* **2002**, *57* 181–189.
104. Tran, P. L.; Cha, H.; Lee, J.-S.; Park, S.; Woo, E.-J.; Park, K.-H. Introducing Transglycosylation Activity in *Bacillus Licheniformis* α -Amylase by Replacement of His235 with Glu. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2014**, *451* (4), 541–547. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.08.019>.
105. Ramasubbu, N.; Ragunath, C.; Mishra, P. J.; Thomas, L. M.; Gyémánt, G.; Kandra, L. Human Salivary Alpha-Amylase Trp58 Situated at Subsite -2 Is Critical for Enzyme Activity. *European Journal of Biochemistry* **2004**, *271* (12), 2517–2529. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04182.x>.
106. Bissaro, B.; Monsan, P.; Fauré, R.; O'Donohue, M. Glycosynthesis in a Waterworld: New Insight into the Molecular Basis of Transglycosylation in Retaining Glycoside Hydrolases. *Biochemical Journal* **2015**, *467* (1), 17–35. <https://doi.org/10.1042/bj20141412>.
107. Benini, S.; Cianci, M.; Mazzei, L.; Ciurli, S. Fluoride Inhibition of *Sporosarcina Pasteurii* Urease: Structure and Thermodynamics. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2014**, *19* (8), 1243–1261. <https://doi.org/10.1007/s00775-014-1182-x>.
108. Lehoczki, G.; Szabó, K.; Takács, I.; Kandra, L.; Gyémánt, G. Simple ITC Method for Activity and Inhibition Studies on Human Salivary α -Amylase. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2016**, *31* (6), 1648–1653. <https://doi.org/10.3109/14756366.2016.1161619>.
109. D'Amico, S.; Sohier, J.; Feller, G. Kinetics and Energetics of Ligand Binding Determined by Microcalorimetry: Insights into Active Site Mobility in a Psychrophilic α -Amylase. *Journal of Molecular Biology* **2006**, *358* (5), 1296–1304. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.03.004>.
110. Ramasubbu, N.; Ragunath, C.; Sundar, K.; Mishra, P. J.; Gyémánt, G. & Kandra, L. Structure-Function Relationships in Human Salivary α -Amylase: Role of Aromatic Residues. *Biologia, Bratislava* **2005**, *60*, 47–56.
111. Rinderknecht, H.; Wilding, P.; Haverback, B. J. A New Method for the Determination of α -Amylase. *Experientia* **1967**, *23* (10), 805. <https://doi.org/10.1007/bf02146851>.
112. Lehoczki, G.; Kandra, L.; Gyémánt, G. The Use of Starch Azure for Measurement of Alpha-Amylase Activity. *Carbohydrate Polymers* **2018**, *183*, 263–266. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.037>.

113. Szabó, K.; Kandra, L.; Gyémánt, G. Studies on the Reversible Enzyme Reaction of Rabbit Muscle Glycogen Phosphorylase b Using Isothermal Titration Calorimetry. *Carbohydrate Research* **2019**, *477*, 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2019.03.014>.
114. Watson, K. A.; Mitchell, E. P.; Johnson, L. N.; Cruciani, G.; Son, J. C.; Bichard, C. J. F.; Fleet, G. W. J.; Oikonomakos, N. G.; Kontou, M.; Zographos, S. E. Glucose Analogue Inhibitors of Glycogen Phosphorylase: From Crystallographic Analysis to Drug Prediction Using GRID Force-Field and GOLPE Variable Selection. *Acta Crystallographica Section D-biological Crystallography* **1995**, *51* (4), 458–472. <https://doi.org/10.1107/s090744499401348x>.
115. Gergely, P. Effect of Glucopyranosylidene-Spiro-Thiohydantoin on Glycogen Metabolism in Liver Tissues of Streptozotocin-Induced and Obese Diabetic Rats. *Molecular Medicine Reports* **2011**. <https://doi.org/10.3892/mmr.2011.464>.
116. Ekstrom, J. L.; Pauly, T. A.; Carty, M. D.; Soeller, W. C.; Culp, J.; Danley, D. E.; Hoover, D. J.; Treadway, J. L.; Gibbs, E. M.; Fletterick, R. J.; Day, Y. S. N.; Myszk, D. G.; Rath, V. L. Structure-Activity Analysis of the Purine Binding Site of Human Liver Glycogen Phosphorylase. *Chemistry & Biology* **2002**, *9* (8), 915–924. [https://doi.org/10.1016/s1074-5521\(02\)00186-2](https://doi.org/10.1016/s1074-5521(02)00186-2).
117. Serrano, F. S. J.; Sánchez, J. L.; Martin, L. Caffeine Inhibition of Glycogen Phosphorylase from *Mytilus Galloprovincialis* Mantle Tissue. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **1995**. [https://doi.org/10.1016/1357-2725\(95\)00058-w](https://doi.org/10.1016/1357-2725(95)00058-w).
118. Fiske, C. H.; Subbarow, Y. THE COLORIMETRIC DETERMINATION OF PHOSPHORUS. *Journal of Biological Chemistry* **1925**, *66* (2), 375–400. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)84756-1](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)84756-1).
119. Schreiber, W. E.; Bowling, S. An Automated Assay of Glycogen Phosphorylase in the Direction of Phosphorolysis. *Annals of Clinical Biochemistry* **1990**, *27* (2), 129–132. <https://doi.org/10.1177/000456329002700207>.
120. Somsák, L.; Nagy, V.; Hadady, Z.; Docsa, T.; Gergely, P. Glucose Analog Inhibitors of Glycogen Phosphorylases as Potential Antidiabetic Agents: Recent Developments. *Current Pharmaceutical Design* **2003**, *9* (15), 1177–1189. <https://doi.org/10.2174/1381612033454919>.
121. Reed, M. C.; Lieb, A.; Nijhout, H. F. The Biological Significance of Substrate Inhibition: A Mechanism with Diverse Functions. *BioEssays* **2010**, *32* (5), 422–429. <https://doi.org/10.1002/bies.200900167>.
122. Tanabe, S.; Kobayashi, M.; Matsuda, K. Yeast Glycogen Phosphorylase: Kinetic Properties Compared with Muscle and Potato Enzymes. *Agricultural and Biological Chemistry* **1988**, *52* (3), 757–764. <https://doi.org/10.1080/00021369.1988.10868723>.
123. Somsák, L.; Nagy, V. A New, Scalable Preparation of a Glucopyranosylidene-Spiro-Thiohydantoin: One of the Best Inhibitors of Glycogen Phosphorylases. *Tetrahedron-asymmetry* **2000**, *11* (8), 1719–1727. [https://doi.org/10.1016/s0957-4166\(00\)00107-5](https://doi.org/10.1016/s0957-4166(00)00107-5).
124. Somsák, L.; Nagy, V.; Docsa, T.; Tóth, B.; Gergely, P. Gram-Scale Synthesis of a Glucopyranosylidene-Spiro-Thiohydantoin and Its Effect on Hepatic Glycogen Metabolism Studied in Vitro and in Vivo. *Tetrahedron-asymmetry* **2000**, *11* (2), 405–408. [https://doi.org/10.1016/s0957-4166\(99\)00486-3](https://doi.org/10.1016/s0957-4166(99)00486-3).

125. Takács, I.; Takács, Á.; Pósa, A.; Gyémánt, G. HPLC Method for Measurement of Human Salivary α -Amylase Inhibition by Aqueous Plant Extracts. *Acta Biologica Hungarica* **2017**, *68* (2), 127–136. <https://doi.org/10.1556/018.68.2017.2.1>.
126. Takács, I.; Szekeres, A.; Takács, Á.; Rakk, D.; Mézes, M.; Polyák, A.; Lakatos, L.; Gyémánt, G.; Csupor, D.; Kovács, K.; Ferenczi, S. Wild Strawberry, Blackberry, and Blueberry Leaf Extracts Alleviate Starch-Induced Hyperglycemia in Prediabetic and Diabetic Mice. *Planta Medica* **2020**, *86* (11), 790–799. <https://doi.org/10.1055/a-1164-8152>.
127. Kandra, L.; Gyémánt, G.; Zajácz, Á.; Batta, G. Inhibitory Effects of Tannin on Human Salivary α -Amylase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2004**, *319* (4), 1265–1271. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.05.122>.
128. Zajácz, Á.; Gyémánt, G.; Vittori, N.; Kandra, L. Aleppo Tannin: Structural Analysis and Salivary Amylase Inhibition. *Carbohydrate Research* **2007**, *342* (5), 717–723. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2006.12.016>.
129. Gyémánt, G.; Zajácz, Á.; Bécsi, B.; Ragunath, C.; Ramasubbu, N.; Erdődi, F.; Batta, G.; Kandra, L. Evidence for Pentagalloyl Glucose Binding to Human Salivary α -Amylase through Aromatic Amino Acid Residues. *Biochimica Et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* **2009**, *1794* (2), 291–296. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.10.012>.
130. Szabó, K.; Hámori, C.; Gyémánt, G. Gallotannins Are Non-specific Inhibitors of α -amylase: Aggregates Are the Active Species Taking Part in Inhibition. *Chemical Biology & Drug Design* **2020**, *97* (2), 349–357. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13787>.
131. Seidler, J. A.; McGovern, S. L.; Doman, T. N.; Shoichet, B. K. Identification and Prediction of Promiscuous Aggregating Inhibitors among Known Drugs. *Journal of Medicinal Chemistry* **2003**, *46* (21), 4477–4486. <https://doi.org/10.1021/jm030191r>.
132. Feng, B. Y.; Shoichet, B. K. A Detergent-Based Assay for the Detection of Promiscuous Inhibitors. *Nature Protocols* **2006**, *1* (2), 550–553. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.77>.
133. Chen, X.; Shi, Y.; Chai, W.-M.; Feng, H. A.; Zhuang, J.; Chen, Q.-X. Condensed Tannins from *Ficus Virens* as Tyrosinase Inhibitors: Structure, Inhibitory Activity and Molecular Mechanism. *PLOS ONE* **2014**, *9* (3), e91809. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091809>.
134. Oliveira, R. F.; Gonçalves, G. A.; Inácio, F. D.; Koehnlein, E. A.; De Souza, C. G. M.; Bracht, A. Inhibition of Pancreatic Lipase and Triacylglycerol Intestinal Absorption by a Pinhão Coat (*Araucaria Angustifolia*) Extract Rich in Condensed Tannin. *Nutrients* **2015**, *7* (7), 5601–5614. <https://doi.org/10.3390/nu7075242>.
135. Gonçalves, R.; Mateus, N.; Pianet, I.; Laguerre, M. S.; De Freitas, V. Mechanisms of Tannin-Induced Trypsin Inhibition: A Molecular Approach. *Langmuir* **2011**, *27* (21), 13122–13129. <https://doi.org/10.1021/la202280c>.
136. Gianfreda, L.; Rao, M. A.; Violante, A. Interactions of Invertase with Tannic Acid, Hydroxy-Aluminium (OH-A1) Species or Montmorillonite. *Soil Biology & Biochemistry* **1993**, *25* (6), 671–677. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(93\)90106-1](https://doi.org/10.1016/0038-0717(93)90106-1).
137. Kónya, Z.; Bécsi, B.; Kiss, A.; Horváth, D.; Raics, M.; Kövér, K. E.; Lontay, B.; Erdődi, F. Inhibition of Protein Phosphatase-1 and -2A by Ellagitannins: Structure-Inhibitory Potency Relationships and Influences on Cellular Systems. *Journal of*

- Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2019**, *34* (1), 500–509. <https://doi.org/10.1080/14756366.2018.1557653>.
138. Ferreira, R. S.; Simeonov, A.; Jadhav, A.; Eidam, O.; Mott, B. T.; Keiser, M. J.; McKerrow, J. H.; Maloney, D. J.; Irwin, J. J.; Shoichet, B. K. Complementarity between a Docking and a High-ThroughPut Screen in Discovering New Cruzain Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, *53* (13), 4891–4905. <https://doi.org/10.1021/jm100488w>.
139. Gyémánt, G.; Lehoczki, G.; Szabó, K.; Kandra, L. Inhibition Studies on α -Amylase Using Isothermal Titration Calorimetry. *Amylase* **2018**, *2* (1), 11–16. <https://doi.org/10.1515/amylase-2018-0002>.
140. Lo Piparo, E.; Scheib, H.; Frei, N.; Williamson, G.; Grigorov, M.; Chou, C. J. Flavonoids for Controlling Starch Digestion: Structural Requirements for Inhibiting Human A-Amylase. *Journal of Medicinal Chemistry* **2008**, *51* (12), 3555–3561. <https://doi.org/10.1021/jm800115x>.
141. Homoki, J.; Nemes, A.; Fazekas, E.; Gyémánt, G.; Balogh, P.; Gál, F.; Al-Asri, J.; Mortier, J.; Wolber, G.; Babinszky, L.; Remenyik, J. Anthocyanin Composition, Antioxidant Efficiency, and α -Amylase Inhibitor Activity of Different Hungarian Sour Cherry Varieties (*Prunus Cerasus* L.). *Food Chemistry* **2016**, *194*, 222–229. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.130>.
142. Morishita, Y.; Iinuma, Y.; Nakashima, N.; Majima, K.; Mizuguchi, K.; Kawamura, Y. Total and Pancreatic Amylase Measured with 2-Chloro-4-Nitrophenyl-4-O- β -d-Galactopyranosylmaltoside. *Clinical Chemistry* **2000**, *46* (7), 928–933. <https://doi.org/10.1093/clinchem/46.7.928>.
143. Lahiri, D.; Nag, M.; Banerjee, R.; Mukherjee, D.; Garai, S.; Sarkar, T.; Dey, A.; Sheikh, H. I.; Pathak, S. K.; Edinur, H. A.; Pati, S.; Ray, R. R. Amylases: Biofilm Inducer or Biofilm Inhibitor? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **2021**, *11*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.660048>.
144. Homoki, J.; Gyémánt, G.; Balogh, P.; Stündl, L.; Bíró-Molnár, P.; Paholcsek, M.; Váradi, J.; Fenyvesi, F.; Kelentey, B.; Nemes, J.; Remenyik, J. Sour Cherry Extract Inhibits Human Salivary α -Amylase and Growth of *Streptococcus Mutans* (a Pilot Clinical Study). *Food & Function* **2018**, *9* (7), 4008–4016. <https://doi.org/10.1039/c8fo00064f>.
145. Al-Asri, J.; Fazekas, E.; Lehoczki, G.; Perdih, A.; Görick, C.; Melzig, M. F.; Gyémánt, G.; Wolber, G.; Mortier, J. From Carbohydrates to Drug-like Fragments: Rational Development of Novel α -Amylase Inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2015**, *23* (20), 6725–6732. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.09.007>.
146. Al-Asri, J.; Gyémánt, G.; Fazekas, E.; Lehoczki, G.; Melzig, M. F.; Wolber, G.; Mortier, J. A-Amylase Modulation: Discovery of Inhibitors Using a Multi-Pharmacophore Approach for Virtual Screening. *ChemMedChem* **2016**, *11* (21), 2372–2377. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201600427>.
147. Ottanà, R.; Maccari, R.; Ciurleo, R.; Paoli, P.; Jacomelli, M.; Manao, G.; Camici, G. G.; Laggner, C.; Langer, T. 5-Arylidene-2-Phenylimino-4-Thiazolidinones as PTP1B and LMW-PTP Inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2009**, *17* (5), 1928–1937. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.01.044>.
148. Maccari, R.; Paoli, P.; Ottanà, R.; Jacomelli, M.; Ciurleo, R.; Manao, G.; Steindl, T. M.; Langer, T.; Vigorita, M. G.; Camici, G. G. 5-Arylidene-2,4-Thiazolidinediones

- as Inhibitors of Protein Tyrosine Phosphatases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2007**, *15* (15), 5137–5149. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.05.027>.
149. Bruno, G.; Costantino, L.; Curinga, C.; Maccari, R.; Monforte, F.; Nicolò, F.; Ottanà, R.; Vigorita, M. G. Synthesis and Aldose Reductase Inhibitory Activity of 5-Arylidene-2,4-Thiazolidinediones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2002**, *10* (4), 1077–1084. [https://doi.org/10.1016/s0968-0896\(01\)00366-2](https://doi.org/10.1016/s0968-0896(01)00366-2).
150. Szabó, K.; Maccari, R.; Ottanà, R.; Gyémánt, G. Extending the Investigation of 4-Thiazolidinone Derivatives as Potential Multi-Target Ligands of Enzymes Involved in Diabetes Mellitus and Its Long-Term Complications: A Study with Pancreatic α -Amylase. *Carbohydrate Research* **2021**, *499*, 108220. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2020.108220>.
151. Maccari, R.; Del Corso, A.; Paoli, P.; Adornato, I.; Lori, G.; Balestri, F.; Cappiello, M.; Naß, A.; Wolber, G.; Ottanà, R. An Investigation on 4-Thiazolidinone Derivatives as Dual Inhibitors of Aldose Reductase and Protein Tyrosine Phosphatase 1B, in the Search for Potential Agents for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus and Its Complications. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2018**, *28* (23–24), 3712–3720. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.10.024>.

Köszönetnyilvánítás

Szerencsésnek mondhatom magam, hogy tanulmányaim, pályafutásom során több kiváló tanárom és kollégám, kutatótársam volt, akik meghatározták, formálták tudományos pályámat. Mindenekelőtt, az egri Gárdonyi Géza Gimnázium kitűnő tanárainak tartozom hálával, akiktől erős alapokat kaptam a későbbi tanulmányokhoz. Külön kiemelném Dr. Szőkefalvi Nagy Zoltánnét†, akitől a kémia szeretetét, az alapos munka igényét és analitikus gondolkodást tanulhattam. A Kossuth Lajos Tudományegyetem (Debrecen) vegyész szakos hallgatójaként is számos nagy formátumú tanárom volt, akiktől nemcsak a szakmát, hanem oktatói stílust és kutatói szemléletet sajátíthattam el. Kiemelném Prof. Bányai István témavezetőmet, akitől az első kutatási feladatot kaptam és ráébresztett az önálló kutatás szépségére. Nagyon hálás vagyok Dr. Kovácsné Dr. Hadady Katalinnak†, aki a BIOGAL Gyógyszergyárban főnökömként és mentoromként a gyógyszeranalitika minden területével, köztük a kromatográfiával megismertetett, és az egyetemre való visszatérésemet is elősegítette. Hálával gondolok Dr. Lipták András† professzorra, aki 1994-ben a Biokémiai Tanszékre hívott és bevezetett a szénhidrátok bonyolult világába. Szívesen emlékszem a tanszéken töltött évekre, akkori kollégáimra az inspiráló, jó munkahelyi légkör és az oktatóvá, kutatóvá váláshoz kapott támogatás miatt. Rendkívül sokat köszönhetek Dr. Kandra Lili PhD témavezetőmnek, munkatársamnak, aki az enzimekkel való munka szépségeivel és nehézségeivel ismertetett meg. Köszönöm a csaknem harminc év közös munka együtt töltött óráit a laborban, a támogatást, a szakmai és személyes beszélgetéseket és azt, hogy barátomnak tekinthetem. Szeretném megköszönni Prof. Dr. Fábíán Istvánnak, hogy a Biokémiai Tanszék megszűnése után a Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékre hívott, ahol ismét jó kollektívába kerültem és folytathattam addigi saját kutatásaimat. Köszönöm Prof. Dr. Gáspár Attilának, hogy megosztotta velem laborját és bekapcsolódhattam az általa vezetett Bioanalitika kutatócsoport munkájába, valamint hogy később tanszékvezetőként is támogatta előrehaladásomat. Szerencsém volt olyan kiváló hallgatókkal együtt dolgozni, mint Fazekas Erika, Lehoczki Gábor, Nagy-Szabó Kármén és Hátori Csaba, akiknek lelkiismeretes és szorgalmas munkája nagyban hozzájárult a dolgozatban összefoglalt eredményekhez. Köszönöm valamennyi kollégám, munkatársam, szerzőtársam közreműködését az eredmények és közlemények létrehozásában.

Köszönöm az anyagi támogatást a számos OTKA pályázatnak, melyben vezetőként, vagy közreműködőként részt vehettem, valamint a *TÁMOP* 4.2.1./B-09/1/KONV-2010-0007, 4.2.2/B-10/1-2010-0024 és *GINOP*-2.3.2-15-2016-00008 pályázatoknak.

Hálásan köszönöm családom, férjem és gyermekeim megértését és támogató szeretetét.