

Szénhidrátokon aktív enzimek szerkezete, aktivitása és gátlása (MTA doktori értekezés összefoglaló)

GYÉMÁNT Gyöngyi*

Debreceni Egyetem, Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék, Egyetem tér 1, 4032 Debrecen, Magyarország

1. Bevezetés

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 fel¹. Az élő szervezetek ezt a sokféleséget úgy használják, 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 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 előállítására évezredek óta az árpa csírázása közben termelődő α -amiláz izoenzim részvételével zajlik. Másrészt a keményítő ipari méretű bontásában (maltóz, glükóz szirup előállítás) kulcsszerepet játszanak a hőstabil bakteriális eredetű amilázok. 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 humán α -amiláz enzimek célpontjai lehetnek különböző anyagcsere betegségek (diabétesz, fogszuvasodás, kövérség/elhízás és hiperlipidémia) kezelésének.

Az enzimek működési módjának, aktív hely szerkezetének megismerése alapvető fontosságú az ipari felhasználás, és az enzimek gátlása miatt is. 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. A különböző eredetű amilázok aktív helye eltérést mutat az

alhelyek számában és a kölcsönhatások mértékében. Az aktív helyek szerkezetének felderítéséhez meg kellett oldani a 2-klór-4-nitrofenil (CNP) glükozidokból álló szubsztrát sorozat szintézisét. A ciklodextrinekből kiinduló kémiai módszer² enzim kiegészítésével megvalósítottuk a 3-12 tag-számú szubsztrátok kemoenzimatikus előállítását^{3,4}. Ezen szubsztrátokkal történtek a humán nyál α -amiláz (HSA) és a *Bacillus licheniformis* α -amiláz (BLA) első bontási kép meghatározásai HPLC módszerrel^{5,6}.

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 térkép⁷. Elkészítése során egy olyan diagramot hozunk létre, ami szemléletesen mutatja a kötőhelyek energia eloszlását és így megfoghatóvá teszi az enzim-szubsztrát kapcsolatot. Az alhely térkép 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 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 glikoenzimre gyakorolt gátló hatását is, a későbbi esetleges terápiás felhasználást célozva.

2. Eredmények

2.1. Poliszacharid hidrolázok szerkezetének felderítése

A poliszacharid hidrolázok szerkezetfelderítése során négy eltérő eredetű és hatásmechanizmusú enzimet tanulmányoztam. Az aktív hely energetikai viszonyainak leírásához kifejlesztett SUMA (Subsite Mapping of Amylases) számítógépes program⁸ 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 izoenzim és mutánsaik vizsgálatával az

* Tel.: +36 52 512 900 / 22485; e-mail: gyemant@science.unideb.hu

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 termékeltávolításával jellemeztük. 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 írtuk le a biofilm vázát jelentő poli- β -N-acetil-glükózamin hidrolízisét végző enzim működését.

2.1.1. Árpa AMY1 izoenzim aktív hely és másodlagos kötőhelyen módosított változatainak vizsgálata

Alhely térképekkel igazoltuk az árpa AMY1 izoenzimében a Val47 és Ser 48 aminosavak meghatározó szerepét a szubsztrátok megkötésében és hidrolízisében. Célzott mutációval létrehozott árpa AMY1 enzim variánsokkal oligoszacharid szubsztrátokon mért termékarány adatokból alhely térképeket számítottunk. Kimutattuk, hogy az AMY1 V47D, V47F és S48Y valamint a V47K/S48G és V47G/S48D csere a glikon kötőhely rövidülését és így a specifitás változását okozza. A célzott mutációval létrehozott enzimekkel a tetramer szubsztrát hidrolízise nagyobb sebességgel történik mint a heptameré^{9,10}.

Megállapítottuk, hogy az árpa AMY1 másodlagos kötőhely (Secondary Binding Site - SBS) aminosavainak cseréje is hatással lehet a termékarányokra. A vizsgált SBS1 kötőhely mutációk nem befolyásolták az alhelyek kötési energiáját. Ezzel szemben az SBS2 kötőhelyen végrehajtott aromás-alifás csere (Y380A mutáció) jelentős kötési energia növekedést, míg a H395A csere energia csökkenést eredményezett, a kettős mutáns esetén a hatások kiegyenlítődtek, a vad típusú enzimmel megegyező aktivitást és termékarányt eredményezve. Egyidejűleg aktív és másodlagos kötőhelyen is mutációt hordozó variáns (Y105A/Y380A) esetében az aktív hely mutáció módosító hatása érvényesült^{11,12}.

2.1.2. Burgonyabogár (*Leptinotarsa decemlineata*) α -amilázának (LdAmy) szerkezetvizsgálata

Elsőként írtuk le a burgonyabogár szénhidrát emésztésében létfontosságú α -amiláz enzim (LdAmy) alhely szerkezetét¹³. Megállapítottuk, hogy az aktív centrum 4 glikon és 2 aglikon kötő alhelyet tartalmaz, így szerkezete hasonlít az emlős és a *Tenebrio molitor* rovar amilázéhoz. Az alhely energiákban jelentkező különbségeket a fehérjék szekvenencia és szerkezet összevetése alapján értelmeztük. A -2 gli-

konkító hely kisebb energiája az LdAmy-ban azzal magyarázható, hogy az alhely környezetében két savas aszpartát található, ellentétben az emlős amilázok azonos helyzetű bázikus hisztidinjével¹⁴.

2.1.3. Édesburgonya (*Ipomea batatas*) β -amiláz enzim működési mechanizmusának tanulmányozása

Az *exo* hatásmódú édesburgonya β -amiláz enzimre igazoltuk a nem redukáló láncvégi maltóz hasítást és transzfert, valamint a processzív működést¹⁵. A kromofort tartalmazó maltooligoszacharid szubsztrátok lehetővé tették, hogy a páros tagszámú szubsztrátokra is végezzünk számításokat, így a lánchossz növekedésével növekvő processzivitást tudtunk igazolni, hosszú (11 tagú) szubsztrátra 3,3 átlagos processzív lépéssel. Elsőként írtuk le a maltóz transzferét inverziós glikozidáz esetén, mely a reakciók kezdeti szakaszában figyelhető meg valamennyi processzíven bontott szubsztrát esetén¹⁵.

2.1.4. Biofilmeket bontó DispersinB enzim működésének leírása

Szubsztrát sorozatokat terveztünk és szintetizáltunk a DispersinB enzim szisztematikus vizsgálataihoz^{16,17}. A PNP- β -GlcNAc monomer szubsztrát hidrolízisét követve ¹H NMR mérésekkel bizonyítottuk az enzim retenció mechanizmusát. Igazoltuk az aktív hely aromás aminosavainak (Y187 és Y278 és W237) szerepét a hidrolízisben. Az aminosavak alaninra történő cseréje megszüntette (W237A) vagy jelentősen csökkentette az enzim aktivitását¹⁶. MALDI-TOF MS eredményeink alátámasztották, hogy az enzim több produktív kötőmódot tud létesíteni az oligomer szubsztrátokkal, de a teljes hidrolízis egymást követő lépéseket is igényel. Ezek kombinálásával modellt állítottunk fel az enzim működésére¹⁸.

2.2. Enzimes szintézisek

Az enzimek szintézisre való felhasználhatóságát az árpa amiláz mutánsok és a rovar amiláz esetében vizsgáltam. Az aktív hely közelében elvégzett mutációk megnövelik az árpa α -amiláz transzferáz aktivitását, miközben a hidroláz aktivitás lecsökken. A burgonyabogár α -amiláz enzimének transzfer aktivitását a mindkét végen védőcsoportot hordozó maltooligomer szubsztrátokon mutattuk ki.

2.2.1. Fluorofor metil-umbelliferon aglikont tartalmazó α -amiláz szubsztrátok szintézise.

Árpa α -amiláz AMY1 V47F aktív hely mutáns enzim katalízisével valósítottuk meg a szubsztrátok szintézisét. A donor és akceptor koncentráció, a pH és a szerves oldószer koncentráció értékének optimalása után három eltérő hosszúságú maltooligomer (DP 2, 3, 5) preparatív szintézisét valósítottuk meg. A szubsztrátok alkalmasak eltérő hosszúságú glikonkötő hellyel rendelkező amilázok szelektív aktivitásmérésére, amit *Bacillus licheniformis*, humán nyál

és *Bacillus stearothermophilus* eredetű α -amilázokkal történő mérésekkel igazoltunk¹⁹.

2.2.2. Burgonyabogár α -amiláz transzglykozilezési aktivitásának vizsgálata mindkét végén aromás védőcsoportot tartalmazó szubsztrátokkal.

Bár az észlelt jelentős transzfer aktivitás tovább javítható szerves oldószer hozzáadásával, maltooligomer donor és kromofort tartalmazó akceptor jelenlétében így is csak kismértékű a termékképződés. 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 LDAm-ban jelen levő több Phe miatti nagyobb hidrofóbicitás felelősek a transzglykozilezésért. Ezek a megfigyelések felhasználhatók megnövelt szintetikus aktivitású amilázok fehérjemérnökséggel való létrehozására²⁰.

2.3. Glikoenzimek új aktivitásmérési módszerei

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 és a glikogén foszforiláz különböző természetes és szintetikus szubsztrátokon való aktivitásmérését. Sikeresen alkalmaztunk fordított fázisú HPLC módszert α -amiláz enzim aktivitásmérésére.

2.3.1. ITC alkalmazása α -amiláz enzim aktivitásmérésére és gátlásvizsgálatára.

A hőmennyiség változás mérése biztosította univerzális reakciósebesség meghatározást alkalmaztuk emlős α -amilázok szabad maltooligomereken és keményítő szubsztráton történő aktivitás méréseire. Az egyszeres és többszörös titrálás előnyeit kombináló módszerben az enzim kis részletét titráltuk a szubsztrát megfelelő koncentrációjú oldataiba. A készülék maximális mért kitéréséhez tartozó hőmennyiségváltozás arányos a reakciósebességgel²¹. Kék keményítő szubsztráton HSA és sertés pankreasz α -amiláz (PPA) enzimmel is szubsztrátgátlást tapasztaltunk. A módszer alkalmas az amilázok természetes szubsztrátján történő gátlás vizsgálatra akkor is, ha az inhibitor színe nem teszi lehetővé a spektrofotometriás mérést²².

2.3.2. ITC alapú módszer a két szubsztrátos, megfordítható reakciót katalizáló glikogén foszforiláz enzim aktivitásmérésére.

A nyúl vázizom foszforiláz b (rmGPb) és glikogén szubsztrát reakciójának irányát a második szubsztrát (foszfát vagy glükóz-1-foszfát) tízszeres feleslegével biztosítottuk. Az azonos reakciókörülményeket lehetővé tevő módszer alkalmazásával gátlás vizsgálatokat végeztünk ismert kompetitív (glikopiranozilidén-spiro-tiohidantoin) és allostérikus (koffein) gátlószerek jelenlétében. Igazoltuk, hogy a kom-

petitív gátlószerek esetében az IC_{50} megegyezik a reakció mindkét irányában mérve, míg az allostérikus gátlószerek esetében a fiziológiás lebontási irányban kisebb az IC_{50} értéke²³.

2.3.3. Humán nyál α -amiláz aktivitásmérése és gátlásvizsgálata HPLC elválasztás és UV detektálás alkalmazásával.

Az aktivitás méréséhez 2-klór-4-nitrofenil- β -maltoheptaoid szubsztrát HSA katalizálta hidrolízis termékeinek koncentráció változását követve határoztuk meg a kezdeti sebességeket. A szakaszos mérés, és az elválasztástechnika alkalmazása lehetőséget biztosít olyan kivonatok gátlásának vizsgálatára, ami spektrofotometrián nem megvalósítható²⁴.

2.4. α -Amilázok gátlása

A korábbi emlős α -amiláz vizsgálatokat inhibitor kutatásokkal egészítettük ki, melyekhez természetes eredetű és szintetikus, vegyületkönyvtárakból származó anyagokat is felhasználtunk. Az elhízás és a cukorbetegség megelőzésében és kezelésében felhasználható vegyületek keresése során gyógynövények és fűszerek kivonatai mellett számos szintetikus vegyület esetében igazoltuk az amiláz gátló hatást. Egyes esetekben a kivonatok HSA gátló hatását *in vitro* és molekulamodellézési vizsgálataink is kimutatták, majd azt később *in vivo* humán kísérletben is sikerült megerősíteni.

2.4.1. Táplálék összetevők (gyógynövények, fűszerek, gyümölcsök kivonatai) HSA gátló hatása.

Az aktivitásméréseket a kivonatok tulajdonságaitól függően ITC, HPLC vagy spektrofotometriás módszerrel végeztük. Megerősítettük a zöld tea és a fahéj kivonat hatékonyságát α -amiláz gátlására²⁵. A szamóca, szeder, áfonya levelek kivonatainak gátló hatását állatkísérletben²⁶, a meggy antocianinok nyálban mért HSA aktivitást csökkentő hatását humán kísérletben²⁷ igazoltuk. A malvidin-3,5-diglükozid antocianin jó illeszkedését a HSA aktív centrumába molekulamodellézési vizsgálatok is megerősítették²⁸.

2.4.2. Nem cukor alapú inhibitorok α -amiláz gátló hatásának vizsgálata.

In vitro vizsgálatokkal igazoltuk molekulakönyvtárakból származó, ismert α -amiláz fehérje szerkezetekbe történő modellezéssel kiválasztott vegyületek, úgynevezett „drug-like” molekulák több szakaszban kiválasztott csoportjainak α -amiláz gátló hatását. Sikerült azonosítani több vegyületet az akarviozin-glükóz, a flavonoid és a floroglucin modell használatával, melyek képviselői *in vitro* mikromólos koncentráció tartományban gátolták a HSA enzimet. A hatékony inhibitorokról megállapítottuk, hogy mindegyik tartalmaz aromás csoportot és közöttük több tiazolidin származékot azonosítottunk^{29,30}.

2.4.3. Gallotanninok promiszkuításának vizsgálata

A gallotannin gátol több, teljesen eltérő reakciót katalizáló enzimet, ami felveti a promiszkuítás lehetőségét. A vizsgált gallotannin PPA enzimen meghatározott IC_{50} értéke érzékenynek bizonyult a detergens jelenlétére, az enzim-inhibitor előinkubálásra, valamint az enzimkoncentráció változtatására. A közvetett módszerrel kapott eredményeket, az aggregátumok jelenlétét a fényszórás vizsgálatok is megerősítették. Ezzel igazoltuk a gallotanninok promiszkuítását és aggregáció alapú gátló hatását³¹.

2.4.4. 2-tioxo-4-tiazolidinon származékok α -amiláz gátló hatásának vizsgálata

A több célponton is ható 2-tioxo-4-tiazolidinon vázú vegyületek között azonosítottunk specifikus és aggregáció alapú inhibitorokat is. Bár közvetett módszerrel a vizsgált koncentrációtartományban aggregáció alapúnak találtunk több származékot, ez nem zárja ki, hogy a vegyületek az aldóz reduktáz enzimen specifikusan hatnak, mivel a nagyságrendekkel kisebb koncentrációban nem képződnek aggregátumok³².

3. Kísérleti rész

A dolgozatban összefoglalt eredmények kísérletes munkán alapulnak, melyhez a hozzáférhető módszerek széles körét használtuk. A megjelent, hivatkozott közleményekben az alkalmazott technikák és kísérleti körülmények részletei 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 kinyerését és további tisztítását a szokásos elválasztási módszerek alkalmazásával végeztük (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. Elsősorban kromofor felszabadulással járó reakciók spektrofotometriás követésén alapuló módszereket használtunk, kiegészítve a saját fejlesztésű kromatográfiás (HPLC) és kalorimetriás (ITC) aktivitásmérési módszerekkel. A szerkezetvizsgálatokhoz és minőségi analitikai feladatok megoldására tömegspektrometriai (MALDI-TOF és ESI) és NMR spektroszkópiai módszereket alkalmaztunk. Mennyiségi analitikai méréseinket, és a bontási kép meghatározásokat általunk beállított, többnyire fordított fázisú HPLC elválasztási módszerekkel, UV detektálást alkalmazva végeztük.

Köszönetnyilvánítás

Hálásan gondolok tanárainkra az egri Gárdonyi Géza Gimnáziumban majd a Kossuth Lajos Tudományegyetemen (Debrecen), akiktől nemcsak a szakmát, hanem oktatói stílust és kutatói szemléletet is elsajátíthattam. Hálával gondolok

lok Lipták András† professzorra, aki 1994-ben a Biokémiai Tanszékre hívott és bevezetett a szénhidrátok bonyolult világába. 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. Szerencsém volt több kiváló PhD hallgatóval együtt dolgozni, 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.

Hivatkozások

- Laine, R. A. *Glycobiology* **1994**, *4* (6), 759–767. <https://doi.org/10.1093/glycob/4.6.759>
- Farkas, E.; Jánossy, L.; Harangi, J.; Kandra, L.; Lipták, A. *Carbohydr. Res.* **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)
- Kandra, L.; Gyémánt, G.; Lipták, A. *Carbohydr. Res.* **1999**, *315*, 180–186. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(98\)00324-3](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(98)00324-3)
- Kandra, L.; Gyémánt, G.; Pál, M.; Petró, M.; Remenyik, J.; Lipták, A. *Carbohydr. Res.* **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)
- Kandra, L.; Gyémánt, G. *Carbohydr. Res.* **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)
- Kandra, L.; Gyémánt, G.; Remenyik, J.; Hovánszki, G.; Lipták, A. *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)
- Allen, J. D.; Thoma, J. A. *Biochem. J.* **1976**, *159* (1), 121–132. <https://doi.org/10.1042/bj1590121>
- Gyémánt G., Hovánszki G., Kandra L., *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 5157–5162. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03212.x>
- Nielsen, M.M.; Seo, E.S.; Dilokpimol, A.; Andersen, J.; Abou Hachem, M.; Naested, H.; Willemoes, M.; Bozonnet, B.; Kandra, L.; Gyémánt, G.; Haser, R.; Aghajari, N.; Svensson, B., *Biocatal. Biotransfor.*, **2008**, *26*, 59–67. <https://doi.org/10.1080/10242420701789528>
- E.-S. Seo, J. M. Andersen, M. M. Nielsen, M. B. Vester-Christensen, C. Christiansen, J. M. Jensen, J. A. Mótyán, M. A. Glaring, A. Blennow, L. Kandra, G. Gyémánt, Š. Janeček, R. Haser, N. Aghajari, M. A. Hachem and B. Svensson, *J. Appl. Glycoscience*, **2010**, *57*, 157–162. <https://doi.org/10.5458/jag.57.157>
- Mótyán, J. A.; Gyémánt, G.; Harangi, J.; Bagossi, P. *Carbohydr. Res.* **2011**, *346*(3)410–415. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2010.12.002>
- Nielsen, M. M.; Bozonnet, S.; Seo, E.-S.; Mótyán, J. A.; Andersen, J. M.; Dilokpimol, A.; Hachem, M. A.; Gyémánt, G.; Naested, H.; Kandra, L.; Sigurskjold, B. W.; Svensson, B., *Biochemistry*, **2009**, *48*, 7686–7697. <https://doi.org/10.1021/bi900795a>

13. Szilágyi, E.; Hámori, C.; Bíró-Molnár, P.; Kandra, L.; Remenyik, J.; Gyémánt, G., *B. Entomol. Res.*, **2019**, 1-6.
<https://doi.org/10.1017/S0007485319000099>
14. Hámori, C.; Remenyik, J.; Kandra, L.; Gyémánt, G., *Int. J. Biol. Macromol.*, **2021**, *168*, 350–355.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.071>
15. Fazekas, E.; Szabó, K.; Kandra, L.; Gyémánt, G. *BBA - Proteins Proteom.*, **2013**, *1834*, 1976-1981.
<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.06.017>
16. Kerrigan, J. E.; Rangunath, C.; Kandra, L.; Gyémánt, G.; Lipták, A.; Jánossy L.; Kaplan, J. B.; Ramasubbu, N., *Acta Biol. Hung.*, **2008**, *56*, 439-451.
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2012.09.016>
17. Fekete, A.; Borbás, A.; Gyémánt, G.; Kandra, L.; Fazekas, E.; Ramasubbu, N.; Antus, S., *Carbohydr. Res.*, **2011**, *346*, 1445-1453.
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2011.03.029>
18. Fazekas, E.; Kandra, L.; Gyémánt, G., *Carbohydr. Res.* **2012**, *363*, 7-13.
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2012.09.016>
19. Mótyán, J.; A. Fazekas, E.; Mori H.; Svensson, B.; Bagossi, P.; Kandra, L.; Gyémánt G., *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **2011**, *72*, 229-237.
<https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.06.010>
20. Hámori, C.; Kandra, L.; Gyémánt, G., *Biocatal. Biotransfor.* **2022**, *41*, 2, 153–160.
<https://doi.org/10.1080/10242422.2022.2050707>
21. Lehoczki, G. Szabó, K. Takács, I. Kandra, L. Gyémánt, G. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **2016**, *31*(6) 1648-1653.
<https://doi.org/10.3109/14756366.2016.1161619>
22. Lehoczki, G.; Kandra, L.; Gyémánt, G., *Carbohydr. Polymers*, **2018**, *183*, 263-266.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.037>
23. Szabó, K.; Kandra, L.; Gyémánt, G., *Carbohydr. Res.*, **2019**, *477*, 58-65.
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2019.03.014>
24. Takács, I.; Takács, Á.; Pósa, A.; Gyémánt, G., *Acta Biol. Hung.*, **2017**, *68*(2) 127-136.
<https://doi.org/10.1556/018.68.2017.2.1>
25. Lehoczki, G.; Szabó, K.; Kandra, L.; Gyémánt, G., *Amylase*, *2*(1) (2018).
<https://doi.org/10.1515/amyase-2018-0002>
26. Takács, I.; Szekeres, A.; Takács, Á.; Rakk, D.; Mézes, M., Polyák, Á.; Lakatos, L.; Gyémánt, G.; Csupor, D.; Kovács, K. J.; Ferenczi, S., *Planta Med.* **2020**, *86*(11) 790–799.
<https://doi.org/10.1055/a-1164-8152>
27. Homoki, J.; Gyémánt, G.; Balogh, P.; Stündl, L.; Bíró-Molnár, P.; Paholcsek, M.; Váradi, J.; Fenyvesi, F.; Kelentey, B.; Nemes, J., *Food & function*, **2018** *9*, 74008-4016,
<https://doi.org/10.1039/C8FO00064F>
28. Homoki, J. R.; Nemes, A.; Fazekas, E.; Gyémánt, G.; Balogh, P.; Gál, F.; Al-Asri, J.; Mortier, J.; Wolber, G.; Babinszky L.; Remenyik, J., *Food Chemistry*, **2016**, *194*, 222-229.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.130>
29. Al-Asri, J.; Fazekas, E.; Lehoczki, G.; Perdih, A.; Görick, C.; Melzig, M. F.; Gyémánt, G.; Wolber, G.; Mortier, J., *Bioorgan. Med. Chem.* **2015** *23*, 6725-6732.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.09.007>
30. Al-Asri, J.; Gyémánt, G.; Fazekas, E.; Lehoczki, G.; Melzig, M. F.; Wolber, G.; Mortier J., *ChemMedChem* **2016**, *11*, 1-7.
<https://doi.org/10.1002/cmdc.201600427>
31. Szabó, K.; Hámori, C.; Gyémánt, G., *CHEMICAL BIOLOGY & DRUG DESIGN*, **2021** *97*(2) 349–357.
<https://doi.org/10.1111/cbdd.13787>
32. Szabó, K. Maccari, R. Ottanà, R. and Gyémánt, G. *Carbohydr. Res.*, **2021**, *499*, 1-9.
<https://doi.org/10.3390/molecules26020330>

Structure, Catalytic Mechanism, and Inhibition of Carbohydrate-Active Enzymes

Carbohydrates constitute the most abundant class of organic molecules on Earth and play crucial roles in a broad spectrum of biological processes, ranging from energy storage to molecular recognition and signal transduction. Their exceptional stereochemical diversity gives rise to an equally diverse set of enzymes—carbohydrate-active glycoside hydrolases—capable of selectively cleaving glycosidic bonds. Among these, α -amylases occupy a central role in the hydrolysis of α -(1 \rightarrow 4) linkages in starch and related polysaccharides. A detailed understanding of their catalytic mechanisms and structure–function relationships is fundamental for both industrial biocatalysis and the rational design of therapeutic agents targeting metabolic disorders such as diabetes and obesity.

The present research focused on elucidating the structural and mechanistic features of various α -amylases and other glycoenzymes through the kinetic and thermodynamic analyses, and inhibition studies. Some series of chromophore-labelled oligosaccharide substrates were synthesized using classical carbohydrate chemistry and chemoenzymatic approach, enabling precise monitoring of hydrolytic activity applying high-performance liquid chromatography (HPLC). The resulting product distributions allowed the construction of quantitative subsite binding energy maps, providing detailed insight into enzyme–substrate interactions. This methodology offers a versatile alternative for characterizing enzyme specificity.

Comprehensive investigations were performed on enzymes of distinct biological origin and catalytic mode. In barley α -amylase (AMY1), site-directed mutagenesis established the critical roles of Val47 and Ser48 in substrate binding and catalytic efficiency. Mutations in secondary binding sites (SBS1 and SBS2) were shown to modulate both product distribution and binding energetics. The α -amylase from the Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*, LdAmy) was characterized for the first time; its subsite architecture revealed notable similarities but also some electrostatic differences compared with mammalian α -amylases. Studies on the exo-acting β -amylase from sweet potato (*Ipomoea batatas*) confirmed its processive cleavage of maltose units from the non-reducing chain end and revealed a previously unrecognized maltose-transfer mechanism in this inverting glycosidase.

Furthermore, mechanistic elucidation of the biofilm-degrading enzyme DispersinB was achieved using a series of tailor-made *N*-acetyl-glucosamine oligomers combined with NMR, MALDI-TOF MS, and kinetic analyses. These studies confirmed a retention-based catalytic mechanism and identified the essential roles of key aromatic residues within the active site.

Beyond hydrolytic catalysis, several α -amylases (LdAmy, barley AMY1) exhibited transglycosylation potential. Engineered AMY1 variants facilitated the preparative synthesis of fluorophore-conjugated methyl-umbelliferril oligosaccharid glycosides, expanding the toolkit for selective amylase assays.

To enhance the precision and versatility of activity and inhibition assays, novel analytical methodologies were developed. Isothermal titration calorimetry (ITC) was adapted as a universal, label-free technique for monitoring α -amylase and glycogen phosphorylase reactions and inhibition kinetics. A complementary reversed-phase HPLC-based assay provided the opportunity for kinetic analysis even in complex or colored inhibitors from natural origin.

Extensive inhibition studies identified both natural and synthetic α -amylase inhibitors. Plant-derived extracts from tea, cinnamon, and various berries exhibited potent inhibitory effects, corroborated by *in vitro*, *in vivo*, and molecular modelling studies. In parallel, a series of “drug-like” synthetic molecules—including thiazolidinone derivatives—were identified as efficient amylase inhibitors within the micromolar concentration range. The promiscuous, aggregation-based inhibition of gallotannins was also demonstrated, highlighting the necessity of distinguishing specific binding interactions from nonspecific aggregation effects during inhibitor characterization.

In summary, this research integrates synthetic organic chemistry, enzymology, and molecular modelling to advance the structural and mechanistic understanding of carbohydrate-active enzymes. The findings provide fundamental insights into enzyme specificity, catalysis, and inhibition, thereby contributing to the development of improved biocatalysts for industrial processes and novel inhibitors for therapeutic applications.