

# **Opin dehidrogenázok szubsztrátpreferenciájának módosítása**

*Témavezető:*

**Telek András**

*Készítette:*

**Melke Gergő**

Budapest, 2023

# TARTALOM

Bevezetés.....	2
Biokatalízis a gyógyszeriparban .....	2
Szelektivitás .....	2
További előnyök .....	3
Reakciótervezés .....	4
Biokatalizátorok forrásai .....	4
Biokatalizátorok optimalizálása .....	5
Mutagenézis .....	5
Reduktív aminálás .....	6
Opin dehidrogenázok.....	6
Előzmények és célkitűzés.....	7
Kísérletek és eredmények.....	10
Helyspecifikus mutagenézis .....	10
Mutagén PCR reakció .....	10
KLD reakció.....	10
Plazmid szelekció és felnevesztés .....	11
Plazmidtisztítás .....	11
Fehérjetermelés.....	12
Fehérjetisztítás .....	12
Aktivitásteszték és eredmények.....	13
Konklúzió .....	16
Módszerek .....	17
<i>PCR mutagenézis</i> .....	17
<i>Gélelektroforézis (mutagenézis ellenőrzés)</i> .....	17
<i>KLD reakció</i> .....	17
<i>Plazmid transzformálás (plazmid szelekció)</i> .....	18
<i>Plazmidtisztítási protokoll</i> .....	18
<i>Fehérjetermelés</i> .....	19
<i>Fehérjetisztítás</i> .....	19
<i>SDS-PAGE</i> .....	20
<i>Tesztreakciók</i> .....	20
<i>Reakcióanalízis (HPLC, adatanalízis)</i> .....	21
Felhasznált irodalom .....	22

# BEVEZETÉS

A fehér biotechnológia<sup>1</sup> területén a biokatalizátorok alkalmazása egyre elterjedtebb a szerves anyagok szintetizálásával foglalkozó iparágakban. A biokatalizátorként használt enzimek kiváló katalitikus tulajdonságaik révén bizonyos reakciókat gyorsabban, pontosabban és hatékonyabban tudnak lebonyolítani, mint a hagyományos vegyszeti eljárások. A módszer sikeres elterjedéséhez az is nagyban hozzájárul, hogy az enzimek felfedezésére, illetve azok fejlesztésére és optimalizálására használt eszközökkel foglalkozó tudományterületek is gyors ütemben fejlődnek.

## Biokatalízis a gyógyszeriparban

A gyógyszeriparban kiemelt fontosságú, hogy a készítmények előállítása hatékony és gazdaságos legyen. A biokatalizátorok alábbi előnyös tulajdonságai biztosítják széleskörű alkalmazhatóságukat a gyógyszerfejlesztésben:

### Szelektivitás

A biokatalizátorok szelektivitása a szerkezetükkel magyarázható. Az enzim 3D-szerkezete és konformációja, ezen belül aktív helyének elhelyezkedése, valamint struktúrája nagyban befolyásolja, hogy a szubsztrát mely része és milyen irányban tud kapcsolódni hozzá. Az aktív helyen belül aztán a hidrofób-hidrofil és elektrosztatikus kölcsönhatások, továbbá a hidrogénkötések befolyásolják a szubsztrátok molekuláris orientációját. Ezen felül, az aktív helyen elhelyezkedő aszimmetrikus aminosavak tovább segítik a szubsztrátok specifikus, szelektív megkötését.

Az enzimek katalitikus hatásának kifejtéséhez gyakran kofaktorok<sup>2</sup> is szükségesek. A kofaktorok reakcióba lépnek a szubsztrátokkal ezáltal vagy reakcióintermediereket hoznak létre vagy direkt módon a termék keletkezésében játszanak szerepet. A kofaktorok segítségével az enzimek a kémiai reakciók szélesebb skáláját tudják katalizálni, illetve ezen kofaktorok elhelyezkedése az aktív zsebben a lejátszódó reakció szelektivitását is befolyásolhatja.

---

<sup>1</sup> A biotechnológia azon ágazata, melynek célja, hogy a hagyományos ipari termékeket (pl.: műanyag, textil, gyógyszerek) alternatív, környezetkímélőbb módszerekkel, azonos minőségben lehessen előállítani.

<sup>2</sup> Olyan szerves molekula vagy fémion, amely az enzim katalitikus hatásának kifejtéséhez szükséges.

**Stereoszelektivitás** - Számos gyógyszer hatóanyagára jellemző, hogy molekuláik királisak, és míg az egyik enantiomer<sup>3</sup> maga a hatóanyag, addig a másik egy nem kívánt mellékhatásokat okozó vegyület. Ezért elengedhetetlen, hogy az előállított hatóanyag végül nagyrészt csak az egyik enantiomert tartalmazza. Hagyományos kémiai reakciókkal az enantiomer tisztaság a legtöbb esetben nem biztosítható, főleg akkor, amikor a hatóanyagot már ipari mennyiségben kell előállítani. A biokatalitikus enzimek egyik legfőbb tulajdonsága, hogy stereoszelektívek, azaz a reakció során az egyik enantiomert előnyben részesítik a másikkal szemben. Egy jól megtervezett enzimmel így akár 97-98%-os enantiomer tisztaságot is elérni lehet, ezáltal biztosítva a gyógyszer biztonságosságát és mellékhatás mentességét.

**Regioszelektivitás** – Az enzimek meg tudják különböztetni egy adott szubsztráton azt a régiót, ahol szükséges, hogy végbemenjen a kémiai változás. Például bizonyos körülmények között az alkohol-dehidrogenáz<sup>4</sup> – általában NAD<sup>+</sup> kofaktor segítségével – regioszelektív, ezért ha egy kétértékű alkohol szubsztrátot szeretnénk oxidálni, akkor az alkohol-dehidrogenáz a két hidroxilcsoport közül általában csak specifikusan az egyiket oxidálja. A biokatalizátorok a regioszelektivitásnak köszönhetően csökkentik, és adott esetben kizárják a reakció során a melléktermékek keletkezését. Ez gyógyszeripari szempontból gazdaságosabbá teszi egyes hatóanyagok előállítását.

**Kemoszelektivitás** - Az enzimek továbbá képesek különbséget tenni eltérő funkciós csoportok között. Ha vegyészeti eljárásokkal végzünk el egy redukciót, gyakran nem lehetünk biztosak benne, hogy a reakció a molekulának csak azon a funkciós csoportján ment végbe, ahol arra szükség van. Ezzel szemben a biokatalizátorok specifikusan tudják végrehajtani például a redukciót vagy a hidrolízist anélkül, hogy az összes redukcióra/hidrolízisre hajlamos funkciós csoporton is változás történjen.

## További előnyök

**Skálázhatóság** - Míg a hagyományos katalizátorok előállítása költséges és általában a reakcióhoz nagy mennyiségre van szükség belőlük, addig a biokatalizátorok egy olcsóbb és nagyobb volumeneknél hatékonyabban alkalmazható alternatíva.

---

<sup>3</sup> Olyan optikai izomer molekulák, melyek egymásnak tükörképi párjai.

<sup>4</sup> Primer és szekunder alkoholok hidroxilcsoportjának oxidációjához használt enzim, amely az alkoholt aldehidekké vagy ketonokká redukálja a hidroxilcsoport helyétől függően.

**Környezetbarát jelleg** - A biokatalitikus reakciók alacsony hőmérsékleten és nyomáson zajlanak, ami energiahatékonyabbá teszi az eljárásokat, csökkenti a környezeti terhelést és a költségeket. Emellett az enzimek biodegradálható természetes anyagok, így a gyógyszeripari folyamatok környezetbarátabbak lehetnek a hagyományos vegyi eljárásokhoz képest.

## Reakciótervezés

A reakciótervezés során a legfontosabb szempont magának a katalizátornak a kiválasztása és a reakció feltételeinek optimalizálása, hogy a lehető legmagasabb termelékenységet és szelektivitást érjük el. Az enzimek kiválasztása azonban sokszor nem egyszerű feladat, mivel számos tényezőt figyelembe kell venni, mint például az enzim specifikussága, stabilitása, a reakció környezeti feltételei és az előállított termék minősége. A reakciótervezés során számos technikát alkalmaznak a biokatalitikus folyamatok optimalizálására. Az egyik ilyen technika, amikor a katalizált reakciók kinetikai paramétereit tanulmányozzák, hogy jobban megértsék a reakció mechanizmusát és optimalizálják a reakció körülményeit. Az enzim reakciósebességének meghatározása, a szubsztrát koncentráció hatása és a biokatalizátor szelektivitása fontos adatokat szolgáltat a reakciótervezéshez.

## Biokatalizátorok forrásai

A biokatalizátorok egy része teljesen természetes úton keletkezik élő szervezetekben, például mikroorganizmusokban vagy növényekben. Bizonyos penészgombák termelhetnek cellulázt, amely a cellulóz lebontásban vesz részt, hasonlóképp a *Saccharomyces cerevisiae* nevű élesztőgomba termelhet alkohol-dehidrogenázt, amely az alkoholok oxidációját katalizálja.

Egyes biokatalizátorok használata már annyira elterjedt, hogy a tisztított enzimeket egyenesen az erre specializálódott beszállítóktól lehet rendelni. A kereskedelmi forgalomban lévő enzimeket tartalmazó adatbázisokban legtöbbször a folyamat végén elérni kívánt szubsztrátokat használhatjuk szűrőként, hogy megtaláljuk a lehetséges biokatalizátor jelölteket. Így szerezhetőek be az olyan enzimek, mint a liázok, oxidoreduktázok vagy transzferázok.

Amikor azonban specifikusabb enzimekre van szükség, a kutatók nagy része a rekombináns fehérjetermelés alkalmazása mellett dönt az új enzim előállításakor. Ehhez először a célenzim génjét kell meghatározni. Az enzim (és az azt kódoló DNS szekvencia) megtalálásához használt eszközök az olyan adatbázisok, mint például a SciFinder (licenz szükséges), az UniProt vagy a BioCatNet. Miután megtaláltuk a kívánt enzimet kódoló bázissorrendet, azt meg kell rendelni egy génszintézissel foglalkozó cégtől. Ezt követően a gént speciális vektorokba helyezzük, így

lehetővé válik a gén stabil szaporodása és expressziója. A klónozott gén vektorba való beillesztése után a következő lépés a gazdaszervezet kiválasztása. Ez általában egy egyszerű baktériumtörzs, mint az *Escherichia coli*. A gazdaszervezet kiválasztása nagyban függ a végtermék jellegétől és alkalmazásától. Miután kiválasztottuk a gazdaszervezetet, a gént be kell illeszteni a sejtbe. A beillesztett gén expresszióját elősegíthetjük a megfelelő promóterek és más regulátor régiók használatával. Ezek a szabályozóelemek lehetővé teszik az enzim szintézisét a sejtben. Fontos, hogy a gazdaszervezet olyan optimális körülmények között legyen, amelyek elősegítik a gén expresszióját és az enzim termelődését. Miután az enzim felépül a gazdaszervezetben, a tápanyagok és a környezeti feltételek megválasztásával optimalizálni kell a folyamatot, amelynek végén el kell végezni az enzim tisztítását, kinyerését.

## Biokatalizátorok optimalizálása

Az optimalizáció fő célja a reakciósebesség növelése, a termékek mennyiségének maximalizálása, valamint a melléktermékek képződésének minimalizálása. Az enzimek természetes változatainak módosítása azáltal, hogy aminosavakat cserélnek vagy hozzáadnak a szekvenciához, lehetővé teszi a katalitikus tulajdonságok finomhangolását. Az enzim módosításához számos módszer áll rendelkezésre, melyek közül a leghatékonyabb az irányított evolúció. Irányított evolúciónál százezres-milliós nagyságrendű eltérő enzimvariánst hoznak létre, majd ezeket szűrik, hogy megtalálják a jól működő biokatalizátorokat. Ez a módszer rendkívül drága és infrastruktúra igényes, ezért a legtöbb kutató inkább folyamodik a racionális tervezés módszeréhez. Ilyenkor a konkrét szerkezeti információkból kiindulva, helyspecifikus mutációkat előidézve módosítják az enzim szerkezetét és tesztelik az új enzim hatékonyságát. Egy hatékony biokatalizátor megtalálása több, egymást követő tervezés-gyártás-tesztelés ciklusból áll. A tanulmány kísérleti része egy konkrét ilyen ciklust mutat be részletekbe menően.

## Mutagenézis

Az első lépés a polimeráz láncreakció (PCR) alkalmazása. A PCR egy laboratóriumi eljárás, amely lehetővé teszi a DNS amplifikációját, vagyis sokszorosítását. Ebben az esetben a PCR segítségével a kívánt fehérje génjének DNS-szakasza többszörösen másolódik, így lehetővé válik mutációk előállítása. A mutagenézis során bizonyos bázisokat lecserélünk, beillesztünk, vagy kivágunk. Ez lehetővé teszi változatos fehérjevariánsok előállítását. Innentől kezdve a lépések megegyeznek az előző pontban említett eljárással. Az immáron eltérő DNS-t beültetjük

egy gazdaszerkezetbe, amely legyártja a fehérjét. Ezután tisztítási eljárásokkal kinyerhető az eltérő szekvenciájú enzim és megkezdődhet annak vizsgálata, hogy a módosult fehérje mennyivel hatékonyabb biokatalizátor.

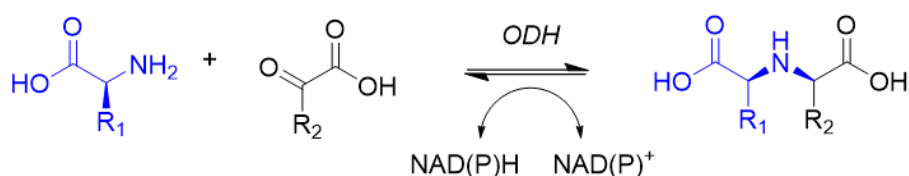
## Reduktív aminálás

A reduktív aminálás olyan kémiai reakció, amely során egy karbonilcsoportot egy köztes imin csoporton keresztül aminná alakítunk. A karbonilcsoportot tartalmazó vegyület lehet keton vagy aldehid. Ezzel a reakcióval olyan királis aminok állíthatók elő, amelyek a gyógyszermolekulák intermedierei lehetnek. A gyógyszeriparban ezért régóta fontos szerepet töltenek be az ilyen királis amin intermedierek előállítására alkalmas enzimek, mint például a transzaminázok, imin reduktázok és monoamin oxidázok. Ezeket az enzimecsoportokat egészíthetik ki a jövőben az opin dehidrogenázok.

## Opin dehidrogenázok

Az opin dehidrogenázok (továbbiakban: ODH-k) előállítása reduktív aminálást katalizáló enzimek segítségével egy egyelőre kevésbé feltérképezett, de annál ígéretesebb terület. Az ODH-k  $\alpha$ -ketosavból és  $\alpha$ -aminosavból opinokat hoznak létre (lásd: 1. ábra). Az opin típusú vegyületek fontos építőkövek egyes gyógyszerek gyártásánál. Az opinok sajátos szerkezete kedvező kiindulási anyaggá teszi őket például egyes peptidomimetikumok előállításához.

Az egyedüli precedens egy ODH használatára biokatalitikus reakcióban, egy, az *Arthrobacter sp. IC* baktériumtörzs által termelt (ArODH) enzim használata, ezért a mi kutatásunkban az ArODH tölti be a referencia enzim szerepét.



1. ábra: Opin dehidrogenázok működésének általános reakcióegyenlete

## ELŐZMÉNYEK ÉS CÉLKITŰZÉS

Témavezetőm Telek András<sup>5</sup> – akinek a kutatásához csatlakoztam – egyik célja, hogy kibővítse az ODH enzimes családot, és találjon ipari biokatalízisre alkalmas ODH-kat. Telek András és csoportja tíz különböző, korábban már dokumentált ODH szekvenciával betanított egy metagenom keresőszoftvert. Majd a felépített modell segítségével két melegvíz forrásból, egy mélytengeri, valamint egy trópusi földmintából származó metagenomban kerestek homológ szekvenciákat. Az így kapott eredmények közül kiszűrték azokat, melyek nem rendelkeztek start- illetve stop kodonnal.

A metagenomban végül tizenegy lehetséges ODH szekvenciát (mODH) találtak. Ezek közül hat új enzim előállítását és tisztítását sikeresen megvalósították. Ezek az enzimek szekvenciái ~40%-ban egyeztek meg a referenciáival (ArODH, UniProt: Q44297), míg egymás között változatos (40-80%) hasonlóságot mutattak. Szerkezeti modellek alapján az mODH-k harmadlagos szerkezete nagyban megegyezik a korábban leírt ODH-kével (lásd 2. ábra).

A következő lépés az mODH-k szubsztrát kiterjedésének meghatározása volt. Ehhez a referenciát és a hat mODH-t kisméretű biokatalitikus reakciókban tesztelték, ahol az aktivitásukat az határozta meg, hogy a szubsztrátok mekkora hányadát alakította át az enzim a kívánt terméké. Kezdetben kiderült, hogy az mODH-k alig vagy egyáltalán nem aktívak a referenciaenzim által preferált kiindulási aminosavak (L-fenilalanin vagy L-norvalin) esetében. Ezt követően az ArODH-t és az mODH-kat poláris (szerin, treonin, aszpargin, glutamin), apoláris (alanin, leucin, valin, methionin) és negatívan töltött oldalláncú (aspartate, glutamát) kiindulási aminosavakkal is tesztelték. A piroszőlősav általában az egyetlen ketosav szubsztrátja az ODH-knak, ezért a ketosavat nem változtatták a reakciók során. Az eredményekből kiderül, hogy míg az ArODH nagy hatékonysággal alakítja át az apoláris szubsztrátokat, addig az mODH-k a negatívan töltött oldalláncú aminosavak esetében mutatnak kiemelkedő aktivitást. A feltételezést, miszerint az aktív zseb elektrosztatikai tulajdonságai miatt van ez az eltérés a szubsztrátpreferenciában, alátámasztja az APBS (Adaptive Poisson-Boltzmann Solver) által kiszámított felületi potenciál az enzimeken. Mind a hat mODH aktív zsebében pozitív töltésfelhalmozódást tapasztaltak. Az ArODH ezzel szemben közel semleges potenciállal rendelkezik az aktív zsebben.

---

<sup>5</sup> Telek András tudományos publikációi az alábbi oldalon érhetők el: <https://orcid.org/0000-0002-1909-8410>



Telek András az enzimek 3D struktúrájából kiindulva a 111-es pozícióban található aminosavat azonosította, mint további lehetséges magyarázat a szubsztrátpreferenciára. Az aktív zseb alján található pozícióban az ArODH esetében alanin, egy apoláris, hosszú oldallánccal nem rendelkező aminosav van, míg az összes mODH esetében ugyanitt arginin, egy poláris, hosszú pozitív oldallánccal rendelkező aminosav található. A szubsztrátpreferencia felderítése fontos információkkal szolgál az enzimek későbbi alkalmazásához, ezért Telek András az ArODH 111-es pozíciójában található alanint helyspecifikus mutáció segítségével argininra cserélte (ArODH A111R), az mODH-582<sup>6</sup> 110-es pozíciójában pedig a mutáció fordított mutációt végzett el (mODH-582 R110A). Az új, mutációval létrehozott enzimek aktivitásának tesztelésének eredménye az lett, hogy mindkét módosított enzim elvesztette eredeti biokatalitikus tulajdonságait és nem szerzett újakat. Egyfelől a kísérlet megmutatta, hogy a 111-es pozíció szerepet játszik a biokatalízisben, másfelől bebizonyította, hogy nem ez az egyetlen oka a szubsztrátpreferenciának. A fehérjék szerkezetének további vizsgálata során felmerült, hogy a 111-es és 198-as pozíciók térbeli közelsége lehet a magyarázat (lásd 3. ábra). Az ArODH 198-as pozíciójában aszparagin, míg az mODH-582 esetében glicin található. Az aszparagin - szemben a glicinnel - hosszú oldallánccal rendelkezik, amely az aktív zseb belseje felé áll. Lehetséges ok a korábbi mutációk kudarcára, hogy mivel az ArODH A111R esetén a zseb aljára került nagy térkitöltésű, az arginin, illetve az aszparagin oldalláncai teljes mértékben elzárták a szubsztrátok előtt az aktív zseb alján található térrészt, drasztikusan lecsökkentve ezzel az enzim aktivitását. A két pozíció térbeli korrelációjának ellenőrzésére az ArODH A111R enzim 198-as pozíciójában lévő aszparagint glicinre kell cserélni (ArODH A111R N198G), míg az mODH-582 R110A esetében az ugyanitt található glicint pedig aszparaginra (mODH-582 R110A G198N).

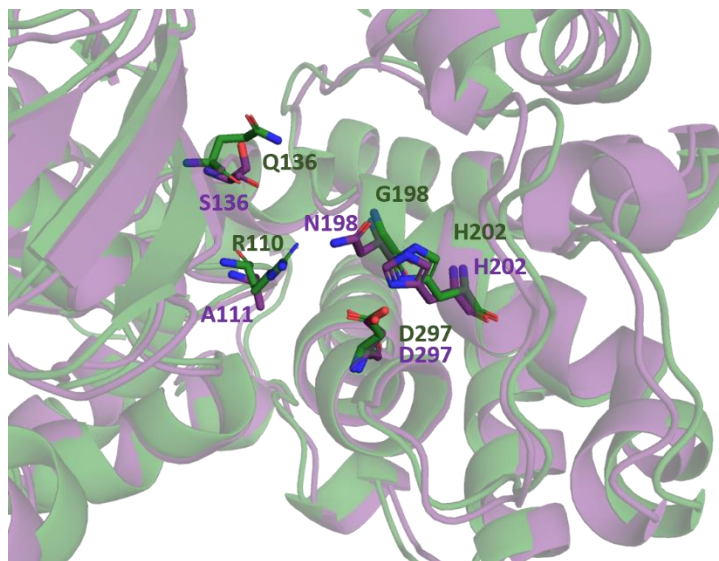
Ezen megfontolások alapján a kutatásom célja az ArODH A111R N198G és az mODH R110A G198N enzimek előállításának és tesztelésének. Ezen keresztül jobb rálátást nyerhetünk az ODH-k szubsztrátpreferenciáját befolyásoló tényezőkre, illetve kísérletet tehetünk a vad típusú enzimek szubsztrátpreferenciájának felcserélésére is.

---

<sup>6</sup> A metagenomban talált ODH-k közül az mODH-582-t sikerült a leghatékonyabban termelni, ezért a szubsztrátpreferencia kutatásához ezt a fehérjét használjuk.



2. ábra: ArODH (zöld) és mODH-582 (piros) enzimek térbeli szerkezeteinek hasonlósága



3. ábra: ArODH (lila), valamint mODH-582 (zöld) enzimek aktív zsebe és a szubsztrátspecifitás alakulásában feltételezhetően fontos szerepet játszó aminosavak

---

# KÍSÉRLETEK ÉS EREDMÉNYEK

## Helyspecifikus mutagenézis

### Mutagén PCR reakció

A kutatás korábbi szakaszából rendelkezésünkre álltak az ArODH A111R, valamint az mODH-582 R110A enzimek kódoló szekvenciáit tartalmazó plazmidok, ezért mindkét szekvencián már csak egy-egy pozícióban kellett végrehajtanunk a mutációt. A NEBaseChanger tool segítségével megterveztük és megrendeltük a PCR reakcióhoz szükséges primereket. Helyspecifikus mutagenézis esetében a két primer (forward és reverse) szinte teljes mértékben a plazmid bázisainak komplementerei. A 10-20 nukleotid hosszú primerek közül csupán az egyik, a mi esetünkben a forward primer középső 3 nukleotidja töri meg a szabályos komplementer sormintát. Ez a 3 nukleotidnyi eltérés fogja eredményezni a mutációt a plazmidban.

A mutagén PCR reakció terméke egyelőre egy nyílt láncú DNS szakasz, amelyet a körbezárás előtt először gélelektroforézissel ellenőriztünk. A sávok nagyjából egyvonalban helyezkedtek el a teszt végére, azaz a termékül kapott láncok hossza nagyságrendileg megegyezik. Az eredmény biztató volt, egy kis szennyeződést leszámítva a reakciót sikeresnek tekintettük.

### KLD reakció

A PCR reakció végtermékeként kapott oldatban a mutációval bevitt változtatásokat tartalmazó nyílt láncú DNS szakaszok mellett továbbra is jelen volt a templátplazmid. Mielőtt a DNS-t transzformálhattuk, a nyílt láncokat újra plazmiddá kellett zárnunk, míg a templáttól meg kellett szabadulni. A New England Biolabs Inc. erre kínál megoldást az egyszerűen alkalmazható KLD mix-el. A KLD mix három enzim keveréke (kináz, ligáz, Dpn1), melyek egy térben, szobahőmérsékleten, 5 perc alatt elvégzik a fent említett folyamatokat. A ligáz felel a nyílt láncú DNS körbezárásáért, azonban ahhoz, hogy ez megtörténhessen a láncok végéhez először egy foszfátcsoportot kell kapcsolni. Ezt a szerepet látja el a kináz. A Dpn1 enzim pedig felismeri és elbontja a metilált<sup>7</sup> plazmidokat. Mivel a templát DNS is baktérium által volt szintetizálva, ezért a Dpn1 csak a templátot bontja el, míg a polimeráz által felépített, szintetikus DNS-sel nem lép kölcsönhatásba.

---

<sup>7</sup> A baktériumok a saját DNS-ük szintetizálása során a szerves bázisokhoz metilcsoportokat kötnek.

## Plazmid szelekció és felnevesztés

A KLD reakciók termékeit, a pET14b vektorban található ArODH A111R N198G (továbbiakban: ArODH 2xmutáns) és mODH-582 R110A G198N (továbbiakban: mODH-582 2xmutáns) enzimeket kódoló plazmidokat ezek után betranszformáltuk az XL1-Blue *E. coli* sejtvonalba és először folyadékkultúrában felnevesztettük, majd szilárd táptalajra helyeztük őket. Mivel kizárólag az általunk előállított plazmidokat tartalmazó sejtekre volt a szükségünk, ezért a táptalajhoz kétféle antibiotikumot is adtunk. Egyrészt tetraciklint, amellyel az XL1-blue sejtvonatra szelektáltunk, mivel ezen *E. coli* sejtek önmagukban rezisztensek a tetraciklinre. Másrészt pedig karbenicillint, amelynek a rezisztenciagénjét a pET14b vektor tartalmazza. A folyadékkultúrában növekedés során azon XL1-Blue sejtekben alakult ki a karbenicillin rezisztencia, amelyek az általunk készített plazmidokat vették fel a transzformáció során. A két antibiotikum tehát együttesen garantálta, hogy csak olyan baktériumsejtek kezdjenek el osztódni a szilárd táptalajon, melyek tartalmazták a kívánt plazmidot. A szilárd táptalajról aztán két-két kolóniát áthelyeztünk antibiotikus folyadékkultúrákba, hogy felszaporítsuk a plazmidokat.

## Plazmidtisztítás

A kisselektált telepekből felszaporítottuk és kitisztítottuk a plazmidokat, amelynek eredményeként négy oldattal rendelkezünk, kettő a pET14b vektorban az ArODH 2xmutáns kódoló információkat, míg a másik kettő szintén ugyanebben a vektorban az mODH-582 2xmutáns szekvenciáját tartalmazta. Mielőtt továbbléptünk volna a fehérjék gyártására, először spektrofotometria segítségével meghatároztuk a plazmidoldatok koncentrációját<sup>8</sup>, majd a négy mintát elküldtük szekvenálásra az [Eurofins Genomics](#)-hoz, hogy megbizonyosodjunk arról, hogy a mutációk helyesen mentek végbe a PCR reakció során.

A szekvenálás eredménye alapján az ArODH 2xmutáns 2-es mintáját elvetettük, mert a mutáció pozíciója után elromlott a reakció és hibás szekvencia jött létre. Azonban a másik három mintánk helyességét a szekvenálás igazolta. Továbbiakban tehát az ArODH 2xmutáns 1-es plazmid mintájával és az mODH-582 2xmutáns 1-es plazmid mintájával haladtunk tovább.

---

<sup>8</sup> Az ArODH 2xmutáns esetében a két koncentráció 125 ng/μL és 250 ng/μL, míg az mODH 2xmutáns plazmidjának oldatai 150 ng/μL, valamint 130 ng/μL koncentrációjúak voltak.

## Fehérjetermelés

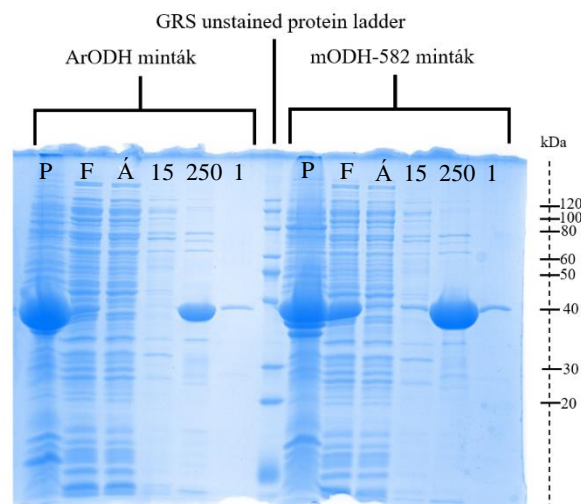
A szekvenált plazmidokat betranszformáltuk *E. coli* BL21 (DE3) sejtvonalba. A fehérjetermeléshez *lac*-operon által szabályozott indukálható fehérje expressziót használtunk. A BL21 (DE3) sejtvonallal különlegessége, hogy a genomjában a saját RNS polimeráza mellett a T7 fág RNS polimerázának génjét is tartalmazza. A T7 fág polimeráza jóval hatékonyabban és gyorsabban végzi el a fehérjeszintézis transzkripció szakaszát, mint az *E. coli* sejtek saját polimeráza. A pET14b vektor a rekombináns fehérjét kódoló szakasz előtt ennek a T7 fág polimerázának a promóter szakaszát tartalmazza, míg operátor szakaszt nem tartalmaz. Azaz a plazmidunkhoz nem kapcsolódik represszor fehérje, ezért az indukált fehérje expresszió ez esetben áttételesen történt. IPTG-vel (izopropil béta-D-1-tiogalaktopiranozid) a T7 fág polimerázának expresszióját indukáljuk (ezt szabályozza *lac*-operon a BL21 saját genomjában). A T7 fág polimerázának indukálása után - mivel a pET14b vektor nem tartalmaz operátort - a T7 polimeráz azonnal hozzá tud kapcsolódni a promóter szakaszokhoz és el tudja kezdeni az ArODH 2xmutáns, illetve mODH-582 2xmutáns transzkripcióját. Az indukció előtt a transzformálási protokoll végén kapott 500 mL-es kultúrákat megfelelő optikai denzitásig növesztettük. Ezt követően egy éjszakán keresztül 18 °C-on hagytuk a sejteket, hogy végbemenjen az expresszió.

## Fehérjetisztítás

Fehérjetisztítási protokoll közben az eljárásokat 4 °C-on vagy lehetőleg jégen végeztük, hogy minél jobban megőrizzük a fehérjék stabilitását. A két kultúrát lecentrifugáltuk, majd lízis pufferben szuszpendáltuk a baktériumsejteket. Ezt követően a kapott keverékeket homogenizáltuk mielőtt elvégeztük a sejteltávolítást. A lizátumokból ezután az oldhatatlan részt újra lecentrifugáltuk és közben előkészítettük a fémion affinitás kromatográfiához szükséges nikkeltartalmú oszlopokat. A fehérjék szétválasztásához az általunk termelt fehérjék azon tulajdonságát használtuk ki, hogy a pET14b vektorban az ArODH 2xmutáns, valamint mODH-582 2xmutáns fehérjék kódját közvetlenül egy hisztidin-tag (His-tag) előzte meg a plazmidban. Ezáltal a fehérjék expressziója során a szerkezet N-terminális végére 6 db hisztidin aminosav került, amelyek a fehérje tisztításához elengedhetetlenek, azonban később a működését nem befolyásolják. A His-tag affinitásának köszönhetően az általunk izolálni kívánt fehérjék hozzákötődnek a gyantában található nikkeltartalmú oszlopokra, míg a többi fehérje átfolyik azon. Miután a felülúszókat rátöltöttük a nikkeltartalmú oszlopokra, növekvő imidazol koncentrációjú

oldatokkal mostuk a gyantát, hogy előbb a szennyezőktől szabaduljunk meg, majd leszorítsuk a megkötött fehérjét, ami így tiszta formában eluálódik.

A fehérje expresszió és tisztítás sikerességéről SDS-PAGE gélelektroforézis szolgáltat információval. Ahogy az a 4. ábrából látszik, mindkét kultúra esetében a pelletben és a felülúszóban is a ~40 kDa-os molekulatömegnél jóval több fehérje van, mint a többiben. A közepen elhelyezett GRS unstained protein ladder segítségével azonosítani tudtuk, hogy ez a molekulatömeg megegyezik az általunk tervezett rekombináns fehérjék tömegével. Jól látszott, hogy az átesőben, valamint a 15 mmol/dm<sup>3</sup>-es imidazolos frakcióban ez a fehérje nincs jelen, az elúció (250 mmol/dm<sup>3</sup>-es imidazol) során viszont az egyetlen nagy mennyiségben jelenlévő fehérje az a ArODH 2xmutáns illetve az mODH-582 2xmutáns.



4. ábra: SDS-PAGE eredménye, minták balról jobbra: pellet, felülúszó, áteső, 15 mmol/dm<sup>3</sup>-es imidazol, 250 mmol/dm<sup>3</sup>-es imidazol, 1 mol/dm<sup>3</sup>-es imidazol

Mivel a fehérjéket hosszútávon nem lehet imidazolos oldatban tárolni, ezért az elúcióval kapott oldatokat egy éjszakán keresztül dializáltuk, majd másnap a stabilitás növelése érdekében glicerint adtunk a hozzájuk. A tisztítás eredményeként 6 mg ArODH 2xmutáns és 18 mg mODH 2xmutáns fehérjéhez jutottunk.

## Aktivitástesztek és eredmények

Az utolsó lépés az elkészített, két pozícióban mutált fehérjék szubsztrátpreferenciájának ellenőrzése volt. Két tesztreakciót állítottunk össze. Mindkét esetben a kiinduló  $\alpha$ -ketosav a piroszőlősav volt, amelyet nátrium-piruvát formában adtunk a reakciókhoz. Az eltérés a kiindulási aminosavban volt. Az 1-es reakcióban ez az L-fenilalanin volt, míg a 2-es reakció

esetében az L-aszparaginsav töltötte be az  $\alpha$ -aminosav szerepét. A reakciókhoz továbbá hozzáadásra került nátrium-foszfát puffer, glükóz, GDH és a megfelelő kofaktor ( $\text{NADP}^+$  vagy  $\text{NAD}^+$ ). Mindkét reakciót ötféleképpen futtattuk le: az ArODH és mODH-582 vad típusú enzimmel, az ArODH és mODH-582 2xmutáns változataival, valamint enzim nélkül (továbbiakban: blank reakció), hogy legyen referenciánk a kiértékeléshez. A minél pontosabb eredmények érdekében az öt-öt reakció mindegyikéből három párhuzamosat állítottunk össze, így összesen harminc reakciót végeztünk.

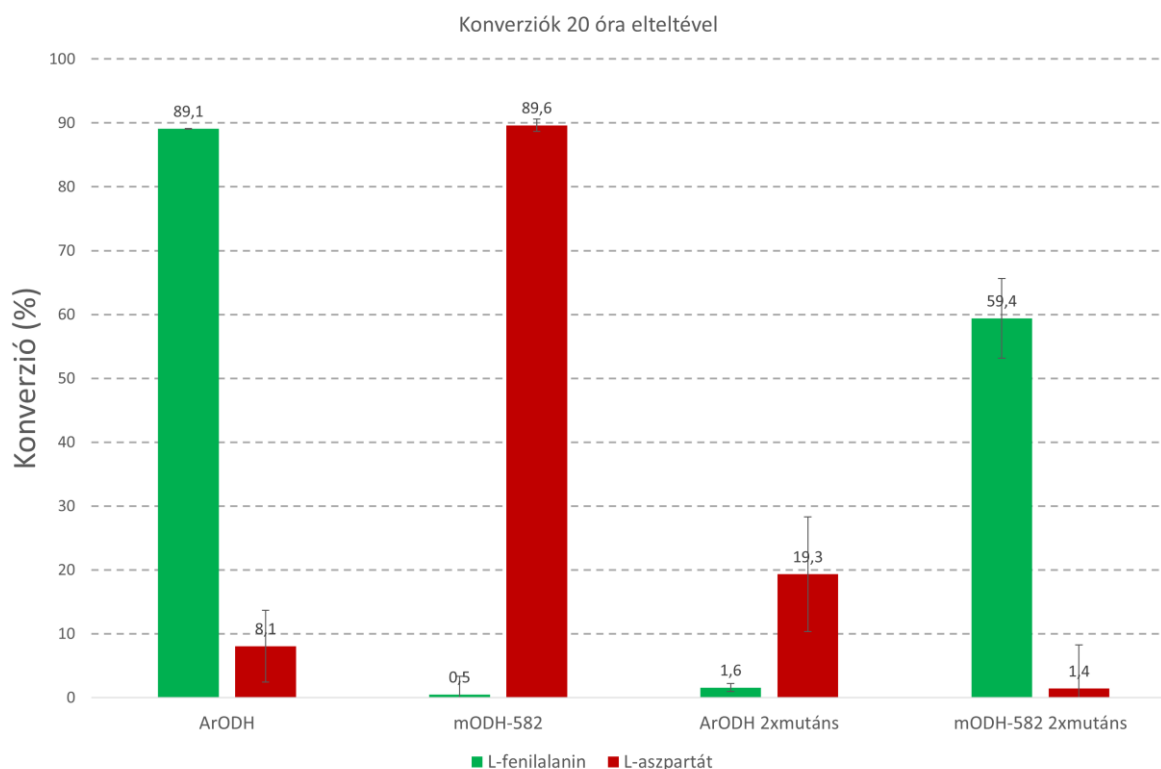
A kofaktort az enzim típusától függően határoztuk meg. Az ArODH vad típusú, valamint ArODH 2xmutáns esetében  $\text{NAD}^+$ -t, míg az mODH-582 és annak mutált változatánál  $\text{NADP}^+$ -t, a blank reakciók pedig mindkét kofaktort tartalmazták. Az enzimek ugyan a kofaktorok redukált változatát használják ( $\text{NADH}$  és  $\text{NADPH}$ ), a reakciókban a GDH enzim és a feleslegben lévő glükóz segítségével beállítható egy folyamatos körforgás, amely az oxidált kofaktorokat folyamatosan visszaalakítja redukált formába (A GDH  $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$  felhasználásával oxidálja a glükózt, így  $\text{NADH-t}/\text{NADPH-t}$  termel). Ez egyrészt azért költséghatékonyabb, mert a kofaktorok oxidált változata olcsóbb, másrészt a sztöchiometrikusnál jelentősen kevesebb kofaktort kell adni a reakcióhoz, hiszen a ciklikus visszaalakulás biztosítja, hogy a reakció során biztosan nem fogy el az ODH-k által használt redukált forma.

Az általunk összeállított reakciókban az erősen poláris termék keletkezését nehéz kvantifikálható módon kimutatni HPLC-vel, a szubsztrátok fogyása pedig alacsony UV elnyelésükből fakadóan nehezen követhető. Ezért a reakciók analizéséhez a kiindulási aminosavak Fmoc-kloriddal való derivatizáltjának fogyását mértük a jobb UV detektálás érdekében. Emellett bizonyos reakcióknál a HPLC eljárás mellett tömegspektrometriával megmértük a HPLC oszlopon eluálódó anyagok tömegét, hogy megbizonyosodjunk róla, hogy valóban azoknak az anyagoknak az UV elnyelését mértük a HPLC eljárás során, amelyek számunkra a kiindulási aminosavak fogyását jelzik.

A reakciókban meghatároztuk a derivatizált aminosavakhoz tartozó kromatográfiás csúcs alatti területet. A konverzió mértékét az egyes reakciókban úgy határoztuk meg, hogy ezen területeket összehasonlítottuk az enzimeket tartalmazó és nem tartalmazó (blank) reakciók között. A párhuzamos reakcióknak köszönhetően pedig a Gauss-féle hibaterjedés képletét használva meg tudtuk határozni a kapott konverzió értékek hibáját.

Az 1-es reakció esetében a korábbi teszteknek megfelelően, az ArODH vad típusú enzim nagy arányban ( $\sim 89,1 \pm 0,1\%$ ) alakította át az L-fenilalanint, míg az mODH-582 vad típusú enzim nem mutatott aktivitást. A 2-es, L-aszparaginsavat tartalmazó reakciónál a vad típusú enzimek

épp ellenkezőleg viselkedtek. Az mODH-582 a kiindulási aminosavat  $\sim 89,6 \pm 0,9\%$ -át átalakította, ezzel szemben az ArODH csak  $\sim 8,1 \pm 5,6\%$ -os konverziót mutatott. A vad típusú enzimeken elvégzett mutációk hatására azt vártuk, hogy az enzimek szubsztrátpreferenciája felcserélődik és az ArODH 2xmutáns a 2-es reakció esetében fog jobb konverziót mutatni, míg az mODH-582 2xmutáns az 1-es reakcióban található L-fenilalanint fogja nagyobb arányban átalakítani 20 óra elteltével. Ahogy ez az 5. ábrán is látszik, kiértékelést követően egyértelműen kimondható, hogy a mutációk hatására valóban megváltozott az enzimek szubsztrátpreferenciája. Az mODH-582 2xmutánsal elért  $59,4 \pm 6,2\%$ -os konverzió az 1-es reakcióban és az ArODH 2xmutánsal elért  $19,4 \pm 9\%$ -os konverzió a 2-es reakcióban egyértelműen bizonyítja a 110/111-es és 198-as pozícióban található aminosavak kulcsfontosságú szerepét a kutatott ODH-k szubsztrátpreferenciájának alakulásában.



5. ábra: Szubsztrátpreferencia felcserélődése a két pozícióban mutált enzimek esetében



## KONKLÚZIÓ

Kutatásom során sikeresen előállítottam az ArODH és mODH-582 enzimeket kódoló plazmidok két pozícióban mutált verzióját. A mutációkat tartalmazó plazmidok felszaporítását és tisztítását követően, azok megfelelő *E. coli* sejtvonalba való transzformálásával és tisztításával sikeresen hozzájutottam az enzimek 2xmutáns változatához. A vad típusú enzimek konzulensem által korábban meghatározott szubsztrátpreferenciájából kiindulva, tesztreakciókkal ellenőriztem a mutációk által megváltoztatott enzimek katalitikus tulajdonságait. Az eredmények kiértékelése igazolta, hogy az általam elkészített enzimek esetében valóban felcserélődik a vad típusú enzimek szubsztrátpreferenciája. A 2xmutánsok konverziójának mértéke ugyan még nem közelíti meg a vad típusú enzimek által mutatott ~90%-os hatékonyságot, azonban a jövőben a fent említett két pozícióban található aminosavak változtatása jó kiindulópont lehet ezen enzimek optimalizálásában.

## MÓDSZEREK

### *PCR mutagenézis*

A PCR reakcióhoz használt primereket a [NEBaseChanger tool](#) segítségével terveztük meg. 25 µL reakcióhoz 30 ng DNS templátot, 1,25 µL 10 µmol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú forward és reverse primert, valamint 12,5 µL Q5 master mix-et használunk. A végül kapott 25 µL reakciót elfeleztük, mert szerettünk volna kipróbálni két-két letapadási hőmérsékletet mind az ArODH, mind az mODH-582 esetében. A reakciót először 98 °C-on denaturáltuk, majd a négy minta esetén különböző letapadási hőmérsékletre hűtöttük (ArODH: 62/63 °C, mODH: 57/58 °C), aztán 72 °C-ra melegítve végbement a szintézis. Ez a ciklus 25-ször került ismétlésre, hogy felszaporodjon a mutált DNS.

ArODH N198G és mODH G198N mutáláshoz használt primerek ( $T_m$ : olvadási hőmérséklet,  $T_a$ : ajánlott letapadási hőmérséklet):

Név	Szekvencia	$T_m$ [°C]	$T_a$ [°C]
N198G_fwd	gaccaacgtgggcgcggttatgc	64	63
N198G_rev	aggctggtgtgcag	62	63
G198N_fwd	ggataaacatcaacgcggtgtccac	58	58
G198N_rev	aggctggttccag	57	58

### *Gélelektroforézis (mutagenézis ellenőrzés)*

30mL ~1 m/m %-os agaróz gélhez (0,3g agaróz, 30 mL TAE puffer) GelRed festéket adtunk, amelynek segítségével az elválasztott nukleinsavak UV fény alatt vizualizálhatóak. A mintákhoz 5:1 arányban purple loading dye-t adtunk (6 µL-es minták), illetve a gélbe a minták mellé egy markert is betöltöttünk, majd 100V-on, 0,1A-al, 30 percig futtattuk.

### *KLD reakció*

A PCR reakció termékeként kapott oldatban a templátpalzmid elbontásához, valamint a mutációkat tartalmazó nyílt DNS láncok körbezárásához a KLD reakciót alkalmaztuk. 1 µL PCR termékhez 5 µL KLD puffert, 1 µL KLD enzim mix-et (kináz, ligáz, Dpn1) és 3 µL nukleázmentes vizet adtunk majd 5 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk.

## *Plazmid transzformálás (plazmid szelekció)*

Jégen ~5 perc alatt kiolvasztottuk a baktériumsejteket majd hozzájuk adtuk a 10 µL KLD reakciókat. A plazmid hozzáadását követően 20 percet vártunk, mielőtt 42 °C-on 1 percig hősokkoltuk a sejteket, hogy felvegyék a plazmidot. A hősokkot követően a baktériumokat 5 percre visszaraktuk jégre, majd 200 µL LB tápoldatba helyeztük, ahol 37 °C-on 1 óráig keresztük növekedtek, eközben pedig agart tartalmazó szilárd LB táptalajokat készítettünk elő. A szilárd táptalaj 8,75 µg/mL koncentrációban tartalmazott tetraciklint és 50 µg/mL koncentrációban karbenicillint. Ezután a 200 µL-es kultúrákat áthelyeztük a táptalajokra. Itt 37 °C-on növekedtek egy éjszakán keresztül. Ezt követően a táptalajokról kiválasztottunk két-két kolóniát és áthelyeztük őket 5 mL-es folyadékkultúrákba, amelyek 50 µg/mL koncentrációjú karbenicillint és 12,5 µg/mL koncentrációjú tetraciklint tartalmaztak. Az 5 mL-es kultúrák további egy napon keresztül növekedtek 37 °C-on.

## *Plazmidtisztítási protokoll*

A plazmidtisztítást a NucleoSpin 5.2-es kit protokollja szerint végeztük. Az 5 mL telített kultúrákat 30 mp-ig 11000 rpm-el centrifugáltuk, majd a letapadt baktériumsejtek fölül eltávolítottuk a felülúszót. Ezt követően 500 µL A1 puffer oldattal újra felfuszpendáltuk a sejteket, mielőtt hozzáadtunk és elkevertünk benne 500 µL A2 pufferoldatot (0,5-1% NaOH oldat). Az A2 hozzáadását követően 5 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk az oldatot, majd hozzáadtuk az A3-as puffert (36-50% GdnHCl oldat) is és addig kevertük, amíg ki nem csapódott az összes fehérje, valamint a kromoszómális DNS. Az oldatokat újra centrifugáltuk ezúttal 10 percig 11000 rpm-el. A centrifugálás során keletkezett felülúszót 700 µL-enként egy szűrővel ellátott gyűjtőoszlopba helyeztük és centrifuga segítségével átpréseltük a szűrőn. Az átesőt minden centrifugálás után kiürítettük a gyűjtőoszlopból. Miután az összes felülúszót betöltöttük, 600 µL A4-es puffer segítségével átmostuk az oszlopot. Végül pedig a szűrőn megkötött plazmidunkat 50 µL víz hozzáadása után 2 percig 70 °C-on inkubáltuk, majd 1 percig 11000 rpm-el történő centrifugálással eluáltuk. Az eluált plazmid koncentrációját Nanodrop spektrofotométer segítségével határoztuk meg.

## *Fehérjetermelés*

A kiolvadt baktérium sejtekhez 1  $\mu\text{L}$  (125 ng illetve 150 ng) plazmidot adtunk, majd 20 percig hagytuk állni, mielőtt 1 percig 42 °C-on hősokkoltuk. A hősokk után a baktériumokat 5 percre visszahelyeztük jégre, mielőtt egy órán keresztül 37 °C-on 200  $\mu\text{L}$  LB tápoldatban növesztettük volna. Ez idő alatt a pET14b vektornak köszönhetően az ArODH 2xmutáns és mODH-582 2xmutáns plazmidjait tartalmazó sejtekben kialakult a karbenicillin-rezisztencia, ezért amikor a 200  $\mu\text{L}$ -t áthelyeztük 5 mL-es LB tápoldatba, a tápoldat 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  koncentrációban tartalmazott karbenicillint.

Az 5 mL-ben egy éjszakán át növekedtek a sejtek (előkultúra). Ezt követően a 2 darab 5mL-s kultúrából 2-2 mL-t áthelyeztünk 500 mL-es LB tápoldatokba, ahol 0,6-os optikai denzitásig növesztettük majd 250  $\mu\text{L}$  1  $\text{mol}/\text{dm}^3$  koncentrációjú IPTG-vel indukáltuk a célfehérje expresszióját. Az indukció után egy éjszakán keresztül 18 °C-on inkubáltuk a kultúrákat.

## *Fehérjetisztítás*

A fehérjetisztításhoz használt, lízis puffer oldat összetétele a következő: a puffer alapja 50  $\text{mmol}/\text{dm}^3$  koncentrációjú Tris-HCl oldat (a HCl mennyisége úgy van meghatározva, hogy az oldat 8,5-ös pH-ra legyen beállítva), az oldatban továbbá 300  $\text{mmol}/\text{dm}^3$  a NaCl koncentráció. A két kultúra tisztításához szükséges 50 mL lízis pufferhez hozzáadásra még került két proteázgátló: 100  $\mu\text{L}$  0,5  $\text{mol}/\text{dm}^3$  koncentrációjú benzamidin és 1 mL 0,1  $\text{mol}/\text{dm}^3$  koncentrációjú PMSF, valamint 100  $\mu\text{L}$  0,5  $\text{mol}/\text{dm}^3$  koncentrációjú TCEP redukálószer, valamint DNáz enzim.

A tisztítást azzal kezdtük, hogy a két 500 mL-es kultúrát lecentrifugáltuk 20 percig, 4 °C-on, 4000 rpm-el és az így keletkezett felülúszót eltávolítottuk a tároló aljához tapadt baktériumsejtekről, majd 25-25 mL lízis pufferben szuszpendáltuk azokat. A szuszpendálás során keletkezett keveréket Potter-homogenizátorban homogenizáltuk. A sejtfeltárást ultraszonikálással (kultúránként: 5x1perc, 1 pulzus/mp) hajtottuk végre. Ezt követően a 25 mL-es lizátumokat ismét lecentrifugáltuk 30 percig 4 °C-on 11000 rpm-el, hogy az oldhatatlan komponensek leülepedjenek. A későbbi SDS-PAGE analízishez a centrifugálás után mind a pelletekből, mind a felülúszókból mintát vettünk. A fehérjék szétválasztásához fémion affinitás kromatográfiát használtunk. Az ehhez szükséges nikkel gyantát tartalmazó oszlopokat először desztillált vízzel mostuk át, majd lízis pufferrel ekvilibráltuk. Az oszlopokból lejövvő oldatokat folyamatosan Bradford esszével teszteltük (20  $\mu\text{L}$  vízzel

1:4 arányban hígított Bradford reagenshez adtunk a frakciókból 5  $\mu\text{L}$ -eket), hogy követni tudjuk az éppen lejövő fehérjék mennyiségét. Miután rátöltöttük a felülúszót, az oszlopokra először 10 mL 15 mmol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú imidazol oldatot töltöttünk, hogy a gyantából kimossuk a kis affinitással rendelkező, aspecifikusan kötődő fehérjéket. Amikor a 15 mmol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú imidazol oldat Bradford esszéje már halvány kék színt mutatott (azaz a minta kevés fehérjét tartalmazott), áttértünk 250 mmol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú imidazol oldatra, amellyel eluáltuk a kikötődött rekombináns fehérjét. Az elúció az ArODH 2xmutáns esetében 5+2 mL imidazol oldattal történt, míg az mODH 2xmutánsnál 5+2+1 mL-re volt szükség. Az eltérő mennyiségeket a folyamatos Bradford esszével való ellenőrzés indokolta, az mODH esetében még az első 7 mL után is jelentős mennyiségű fehérje jött át. Végül az oszlopokat 5 mL-nyi 1 mmol/dm<sup>3</sup>-es imidazol oldattal kimostuk. A négy frakcióból (Áteső, 15 mmol/dm<sup>3</sup> imidazol, 250 mmol/dm<sup>3</sup> imidazol, 1 mol/dm<sup>3</sup> imidazol) szintén mintát vettünk az SDS-PAGE-hez, így összesen 6 frakció állt rendelkezésünkre (pellet, felülúszó, négy oszlopon keletkezett frakció). A tisztítást követően az eluált fehérjéket tartalmazó oldatokat egy éjszakán át 2 liter 50 mmol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú Tris-HCl oldatban dializáltuk, majd 1:9 arányban glicerint adtunk hozzájuk.

## *SDS-PAGE*

A tisztítás során keletkezett frakciókból vett 20  $\mu\text{L}$  mintákhoz 5  $\mu\text{L}$  mintakotélt adtunk, majd a fehérjéket denaturáltuk öt percre 98 °C-on történő inkubálással. Ezekből az elegyekből 5-5  $\mu\text{L}$ -t töltöttünk 12 m/m %-os poliakrilamid gélbe. A mintákat 200V-on 45 percre futtattuk. Ezután a gélt vízzel mostuk, majd egy órán keresztül PageBlue festékkel vizualizáltuk.

## *Tesztreakciók*

Egy 0,5 mL-es reakció az alábbiakat tartalmazta: 25 mmol/dm<sup>3</sup>  $\alpha$ -aminosav, 75 mmol/dm<sup>3</sup> Na-piruvát, 15  $\mu\text{g}$  ODH enzim, 0,4 mmol/dm<sup>3</sup> NAD(P)<sup>+</sup>, 0,06 mg GDH, 62,5 mmol/dm<sup>3</sup> glükóz, 0,1 mol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú nátrium-foszfát puffer (pH=8.0). Az  $\alpha$ -aminosav az egyik tizenöt reakció esetében L-fenilalanin (1-es reakció) volt, míg a másik tizenöt esetében L-aszparaginsav (2-es reakció). Az 1-es és 2-es reakciót is elvégeztük négyféle enzimmal (ArODH, ArODH 2xmutáns, mODH-582, mODH-582 2xmutáns), valamint enzim nélkül is. Minden reakcióból három párhuzamosat állítottunk össze. A reakciók pH-ja 8-ra volt beállítva. A reakciókat 40 °C-on rázás közben ~20 óráig inkubáltuk.

## Reakcióanalízis (HPLC, adatanalízis)

Derivatizált aminosav készítése: 100 µL-es mintákat vettünk kettő, valamint húsz óra után. Ezeket 1:1 arányban 300 mmol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú nátrium-borát oldattal hígítottuk, majd hozzáadtunk 200 µL 25 mmol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú Fmoc-klorid oldatot és 10 percig 30 °C-on ráztuk őket. Ezt követően hozzáadásra került 300 mmol/dm<sup>3</sup>-es amantadin hidroklorid. Az így keletkezett fehér csapadékot 5 perc alatt lecentrifugáltuk és a felülúszót elemeztük HPLC-vel.

HPLC eljárás: az „A” oldat összetétele 95 v/v % víz, amely 5 mmol/dm<sup>3</sup> koncentrációban ammónium-bikarbonátot tartalmaz és 5 v/v % acetonitril. A „B” oldat összetétele 100% acetonitril.

A használt HPLC grádiens:

Idő [perc]	A [%]	B [%]	Áramlási sebesség [mL/perc]
0:00	100	0	0,8
4:00	20	80	0,8
5:00	20	80	0,8
5:20	100	0	0,8
7:00	100	0	0,8

A grádiens elején 0,5 µL-es minták kerültek injektálásra.

A szubsztrát aminosav derivatizáltjai UV csúcsainak a területeit feljegyeztük, ezzel követve azoknak a fogyását a reakcióban. A konverziót az alábbi képlet szerint számoltuk:

$100 - \frac{\overline{A_{enzim}}}{\overline{A_{blank}}} \times 100$ . A hibát pedig a Gauss-féle hibaterjedés képlete szerint számoltuk:

$$D \times \sqrt{\left(\frac{\sigma_{enzim}}{\overline{A_{enzim}}}\right)^2 + \left(\frac{\sigma_{blank}}{\overline{A_{blank}}}\right)^2}, \text{ ahol } D = \frac{\overline{A_{enzim}}}{\overline{A_{blank}}} \times 100.$$

A kutatás során a kísérletek az ELKH TTK Enzimológiai Intézetben, valamint a Servier Gyógyszerkémiai Kutatóintézetében kerültek elvégzésre.

## FELHASZNÁLT IRODALOM

Az ELTE Biokémia Tanszék munkaközössége: Géntechnológia és fehérjemérnökség. Szerkesztette: Nyitrai László, 2013. <https://ttk.elte.hu/dstore/document/865/book.pdf> (letöltés ideje: 2023. június 23.)

Elizabeth L. Bell, William Finnigan, Scott P. France és munkatársaik: Biocatalysis. Nature reviews, Methods primers, Article citation ID: (2021) 1:46. <https://www.nature.com/articles/s43586-021-00044-z> (letöltés ideje: 2023. május 30.)

Dr. Hans-Joachim Degen, Dr. Anette Deufel és munkatársaik (szerk.): PCR Applications Manual, 3. kiadás. Roche Diagnostics, 2006. <https://www.gene-quantification.de/ras-pcr-application-manual-3rd-ed.pdf> (letöltés ideje: 2023. június 9.)

Magnus Johansson, Martin Lovmar and Måns Ehrenberg: Rate and accuracy of bacterial protein synthesis revisited. Current Opinion in Microbiology, 2008. [www.doi.org/10.1016/j.mib.2008.02.015](http://www.doi.org/10.1016/j.mib.2008.02.015) (letöltés ideje: 2023. június 9.)

Sérgio F. Sousa: Special Issue on “Enzymes as Biocatalysts: Current Research Trends and Applications”. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23, 16209. <https://doi.org/10.3390/ijms232416209>. (letöltés ideje: 2023. június 11.)

Shuke Wu, Radka Snajdrova, Jeffrey C. Moore, Kai Baldenius, és Uwe T. Bornscheuer: Biocatalysis: Enzymatic Synthesis for Industrial Applications. Angewandte Chemie, International Edition, 2020. [www.doi.org/10.1002/anie.202006648](http://www.doi.org/10.1002/anie.202006648) (letöltés ideje: 2023. június 9.)

Sunil Kulkarni: Enzymes as Biocatalysts: Review on Investigations on Synthesis, Mechanism, Kinetics, Applications and Potential. In: Letters in Applied NanoBioScience, Platinum Open Access Journal (ISSN: 2284-6808), Volume 11, Issue 1, 2022. <https://nanobioletters.com/wp-content/uploads/2021/06/22846808111.30493064.pdf> (letöltés ideje: 2023. június 9.)

Telek András, Molnár Zsófia, Takács Kristóf, Varga Bálint, Grolmusz Vince, Tasnádi Gábor, Vértessy G. Beáta: Discovery and biocatalytic characterization of opine dehydrogenases by metagenome mining. 2023, megjelenés előtt.