



Humán nyál amiláz inhibitorok vizsgálata

doktori (PhD) értekezés tézisei

Zajác Ágnes

(Témavezető: Dr. Kandra Lili)

The study of human salivary amylase inhibitors

theses of doctoral (PhD) dissertation

Ágnes Zajác

(Supervisor: Dr. Lili Kandra)

Debreceni Egyetem, TEK, TTK

Biokémiai Tanszék

Debrecen, 2007.

1. Az értekezés előzményei és célkitűzései

Az enzimek reakciók specifikus molekulákkal történő gátlása fontos szerepet játszik az enzimek működésének szabályozásában és biológiai rendszerek irányításában, így az inhibitorok segítséget nyújtanak az enzimműködés molekuláris mechanizmusának megértésében. Ezen kívül felhasználhatók az enzimek szubsztrátkötő helyének tanulmányozására, szelektív gátlás esetén izoenzimek meghatározására, gyógyszerek hatásmechanizmusának megismerésére, gyógyszermolekulák tervezésére, anyagcsere-betegségek kezelésére.

Az amiláz inhibitorok gyakorlati jelentőségét a humán gyógyászatban az adja, hogy jelentős vegyületeknek számítanak a diabetes, az obesitas, és a caries kezelésében.

A humán nyál amiláz (HSA) inhibitorai a fogszuvasodás kialakulásának megelőzésében alkalmazhatók eredményesen. A HSA képes hozzákötödni a szájban lévő *Streptococcus* baktériumokhoz, amelyek a keményítő bontásából származó bomlástermékeket anyagcsere-folyamataik során tejsavvá alakítják. A lokálisan keletkező sav pedig a fogzománc károsodásához vezethet, ami kritikus lépés a fogszuvasodás kialakulásában.

Ezek alapján érthető, hogy az α -amiláz inhibitorok kutatásával korábban is sokan foglalkoztak.

A legjobban ismert és a gyakorlatban legáltalánosabban használt amiláz inhibitor az akarbóz, amelynek több származékát (pl: akarviozin-glükóz, izoakarbóz) állították elő jobb hatás elérésének reményében.

A hüvelyesek és gabonafélék magvaiból származó fehérjék is jó α -amiláz inhibitoroknak bizonyultak. Bár többségük rovar amilázokon fejti ki hatását, egyes esetekben humán amiláz gátló hatásról is beszámoltak, viszont mélyebb kinetikai vizsgálatra eddig még nem került sor.

Hasonló a helyzet a szintén növényi eredetű tanninok estében is, amelyek amiláz inhibitor hatása régóta ismert, de a gátlás jellemzőinek részletes vizsgálata még nem történt meg.

Értekezésemben több humán nyál amiláz inhibitor, a kocsányos tölgy (*Quercus robur*) és az aleppói v. más néven kurdisztáni tölgy (*Quercus infectoria Olivier*) eredetű tannin, a pentagalloyl- β -D-glükopiranoz (GGs₅), a búzamazóból származó, fehérje 0,28-inhibitor és több szénhidrát típusú vegyület HSA inhibitor hatását vizsgáltam meg a gátlás kinetikájának szempontjából, a legtöbb esetben két szubsztráton. Az alkalmazott szubsztrátok az amiláz és a 2-klór-4-nitrofenil-4-O- β -D-galaktopiranozil- α -D-maltozid (GalG₂-CNP) voltak.

Célunk volt a gátlások típusának meghatározása, az inhibíciós konstansok és kinetikai állandók megállapítása, az IC₅₀ értékek kiszámítása, a gátlás mechanizmusára vonatkozó információk gyűjtése. A tanninok esetében elvégeztük a természetes keverékek összetételének, az alkotók molekulatömegének, szerkezetének vizsgálatát, gallusz- és ellagisav tartalmuk meghatározását.

Az értekezés témáját a fenti témakörből kapott eredményeim képezik. Olyan kérdésekre kerestünk választ, hogy hogyan befolyásolja az alkalmazott szubsztrát a kinetikai állandókat, a gátlás típusát, valamint vizsgáltuk az enzim-inhibitor kölcsönhatások kialakulását.

2. Alkalmazott vizsgálati módszerek

A tannin inhibitorok szerkezetének felderítése MALDI-TOF MS, MALDI-TOF MS PSD, ESI-MS, ¹H és ¹³C NMR vizsgálatokkal történt, valamint galluszsav és ellagisav tartalmukat is meghatároztuk.

Az enzimreakciókat kétféle módon követtük nyomon. A GalG₂-CNP szubsztrát alkalmazásakor a felszabadult CNP fotométeres mérésével, az amiláz szubsztrát esetén pedig a redukáló érték kimutatásán alapuló dinitro-szalicilsavas módszerrel. Az inhibitor hatás kinetikáját a klasszikus Lineweaver-Burk és Dixon elsődleges és másodlagos ábrázolások elvégzésével tanulmányoztuk.

A pentagalloyl- β -D-glükopiranoz és a HSA közötti kölcsönhatást STD NMR technikával és mutáns HSA enzimek használatával igazoltuk.

3. Az értekezés új tudományos eredményei

3.1. A humán nyál amiláz fehérje inhibitorai

Kísérleti munkám során egyetlen fehérjét, a búza magjából származó, kereskedelmi forgalomban kapható 0,28-inhibítort vizsgáltam a HSA gátlásának szempontjából. Amilóz szubsztáton a fehérje kevert, nem kompetitív gátlást mutatott. A disszociációs állandók nM-os tartományba estek ($K_{EI}=61.5$ nM, $K_{ESI}=142$ nM), ami nagyon erős inhibitor hatást jelent. GalG₂-CNP szubsztráton az IC₅₀ értéke 18.27 nM.

3.2. Szénhidrát típusú nyál amiláz inhibitorok

Sokféle cukor jellegű vegyület inhibitor hatását vizsgáltuk HSA enzim jelenlétében. Mértük a maltóz, a maltooligoszacharidok, a szintetikus előállított, 2,3 telítetlen hexapiranozból felépülő glükál oligoszacharid keverék, a glükopiranozilidén-spiro-tiohidantoin (GTH) és az α -akarviozinil-(1,4)- α -D-glükopiranozil-(1,6)-D-glükopiranozilidén-spirotiohidantoin (PTS-GTH) inhibitorok hatékonyságát. A kapott kinetikai adatokat az 1. táblázatban tüntettem fel.

1. táblázat: A szénhidrát típusú HSA inhibitorok disszociációs állandói és IC₅₀ értékei GalG₂-CNP szubsztráton mérve.

Inhibitor	K_{EI} (μ M)	K_{ESI} (μ M)	IC ₅₀ (μ M)
glükál (DP 2-7)	35200	2700	2010*
GTH	7300	2840	10500
G ₂	-	4000	8000
G ₃	2650	-	3500
G ₅	400	-	800
PTS-GTH	0,19	0,24	0.03
akarbóz	0,70	0,10	0.86

* Mivel a glükál minta egy oligoszacharid keverék, az IC₅₀-et μ M egységben nem lehet megadni, ezért az érték a táblázatban μ g mL⁻¹ mértékegységben szerepel.

A leggyengébb inhibitornak a glükál jellegű vegyület sorozat bizonyult. Bár a glükálok a szubsztrát átmeneti állapotát mimikálják, a gyenge affinitás a OH csoportok hiányával magyarázható. A szubsztrát analóg GTH molekula kis mérete miatt többféle kötőmódot létesíthet az enzim aktív helyével, ami megmagyarázhatja az alacsony inhibitor aktivitást. A maltóz, a maltotrióz és a maltopentaóz mM-os koncentráció tartományban fejt ki enzim gátlást a humán nyál amilázon. A maltóz esetén a gátlás típusa tisztán nem kompetitív, míg a maltotrióz és a maltopentaóz esetén tisztán kompetitív. Az inhibíciós állandók arra utalnak, hogy a cukor gyűrű tagszámának növekedésével jelentősen nő az inhibitor hatékonyság. Ez a hatás jól érvényesül a GTH – PTS-GTH inhibitorok viszonylatában is. A PTS-GTH-nak négy nagyságrenddel kisebbek a disszociációs állandói, mint a GTH-nak. A kiváló inhibitor hatáshoz hozzájárul, hogy a vegyület szintézisekor akarbózt használtunk donorként, így az átmeneti állapotot mimikáló ciklitol gyűrű és a tiohidantoin gyűrű is jelen van a molekulában. Az akceptor és a donor hidrolízis terméke, a pszeudotriszacharid (PTS) $\alpha(1-6)$ glikozidos kötéssel kapcsolódik egymáshoz. Így az új típusú inhibitor molekula ellenáll a HSA hidrolízisének és építő egységeinek előnyös gátló tulajdonságait ötvözve képes jelentős inhibitor hatást kifejteni.

3.3. Tanninok, mint HSA inhibitorok

Munkám során a kocsányos tölgy, az aleppói tölgy eredetű tanninok és a pentagalloyl- β -D-glükopiranoz (GGs₅) kinetikai analízisét végeztem el. A mérések eredményei a 2. táblázatban láthatók.

A rövid szubsztráton mindkét tannin és a GGs₅ is jobb inhibitornak bizonyult, mint az amilázon. A keverék tanninok esetén legalább két nagyságrendnyi különbség van a K_{EI} és körülbelül egy nagyságrendnyi eltérés van a K_{ESI} értékek között a két szubsztrátot tekintve.

Ennek oka a szubsztrátok jellemzőiben található, ugyanis a GalG₂-CNP az amilózhoz viszonyítva rosszabb szubsztrátja a HSA-nak, amit a számított K_M értékek is jól tükröznek: GalG₂-CNP: 1.29 mM, amilóz: 9.672 mg/ml = 0.096-0.0096 mM. A

GGs₅ inhibitor alkalmazásakor a két szubsztráton mért eredmények között nem mutatkozik olyan nagy különbség.

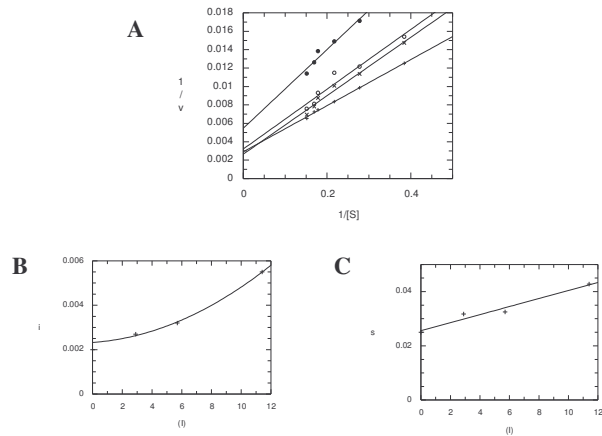
2. táblázat: A vizsgált tanninokra vonatkozó disszociációs állandók.

Inhibitor	GalG ₂ -CNP			Amilóz			
	K _{EI}	K _{ESI}	inhibíció	K _{EI}	K _{ESI}	K _{ESI2}	inhibíció
kocsányos tölgy eredetű tannin	8.27 μg/ml	45.00 μg/ml	k., nk.	1510.56 μg/ml	121.80 μg/ml	-	k., nk.
aleppói tölgy eredetű tannin	0.82 μg/ml	3.32 μg/ml	k., nk.	17.40 μg/ml	14.86 μg/ml	9.64 μg/ml	k., nk.
GGs ₅	2.35 μM	5.02 μM	k., nk.	8.15 μM	14.00 μM	-	k., nk.
	2.21 μg/ml	4.72 μg/ml		7.66 μg/ml	13.16 μg/ml		
akarbóz	0.70 μM	0.10 μM	k., nk.	3.70 μM	1.08 μM	-	k., nk.
	0.45 μg/ml	0.07 μg/ml		2.39 μg/ml	0.70 μg/ml		

(Megjegyzés: k., nk.= kevert, nem kompetitív)

Az aleppói tölgy tannin esetén a két szubsztrát közötti különbség abban is megnyilvánul, hogy a GalG₂-CNP-n első, az amilózon pedig másodrendű (1. ábra) kinetikát tapasztaltunk. Ez nagy valószínűséggel, azzal magyarázható, hogy a tannin képes hozzákötödni az amilóz szubsztráthoz, így nemcsak az ESI, hanem az ESI₂ komplex is létrejöhet, azaz az inhibitor nem csak az enzimhez, hanem a szubsztráthoz is hozzákötődik. A másodrendű kinetikát a kocsányos tölgy eredetű tannin esetében nem tapasztaltuk.

Ez a tanninok közötti szerkezeti különbségből adódik. A MALDI-TOF MS PSD mérések szerint a kocsányos tölgy eredetű tannin inkább elnyújtott szerkezetű, melyben főleg galluszsav trimer, dimer és kisebb mennyiségben monomer egységek kötődnek a kinasav poliolhoz. Az aleppó tannin inkább egy kompakt struktúrát képvisel, amelyben a központi glükóz poliolt galluszsav monomerek (esetleg dimerek) veszik körül.



1. ábra: Az aleppói tölgy tanninnál tapasztalt másodfokú kinetika. Lineweaver-Burk elsődleges (A) és másodlagos (B, C) ábrázolás az amilóz szubsztráton kivitelezett mérés esetén. $[S]=\text{mg mL}^{-1}$. $[I]$: $+$, 0 $\mu\text{g mL}^{-1}$; \times , 2.9 $\mu\text{g mL}^{-1}$; \circ , 5.7 $\mu\text{g mL}^{-1}$; \bullet , 11.4 $\mu\text{g mL}^{-1}$. $[1/v]=\text{min}\mu\text{M}^{-1}$.

A két tannin közül az aleppói tölgy tannin bizonyult jobb inhibitornak mindkét szubsztrát esetén, amit szintén a galluszsavak elrendeződésében lévő különbségekkel magyarázunk. A K_{EI} értékeket tekintve az aleppó tannin mind a GalG₂-CNP, mind az amilóz szubsztráton két nagyságrenddel kisebb értékeket mutat, mint a kocsányos tölgy tannin.

A GG₅ nagyjából olyan hatásos inhibitora a HSA-nak, mint az aleppói tölgy tannin, ami nem meglepő eredmény, tekintve, hogy a GG₅ az aleppói tölgy tannin egyik komponense. Meg kell említenünk, hogy a kompetitív tagok között kb. kétszeres különbség van az aleppói tölgy tannin javára. Ennek oka az lehet, hogy ez az inhibitor egy keverék, ami hexagalloyl-glükózt is tartalmaz, ami valószínűleg jobb inhibitor a GG₅-nál. A több galluszsav jelenléte miatt több kölcsönhatást tudnak kialakítani, s ezáltal erősebben kötődnek az enzimhez, mint a GG₅.

Az inhibíció típusa minden esetben kevert, nem kompetitív. A kocsányos tölgy tannin esetén az amilóz szubsztráton a kompetitív tag értéke a nagyobb, azaz az inhibitor szívesebben kötődik az enzim-szubsztrát komplexhez, mint a szabad

enzimhez. Ez a különbség annyira kifejezett, hogy az ábrázolás képe teljesen unkompetitív jelleget mutat. A GalG₂-CNP szubsztráton az unkompetitív tag lett a nagyobb. A GG_{s5} disszociációs állandói közül mindkét szubsztráton az unkompetitív tag bizonyult nagyobbak, ebből következően a gátlás típusa inkább kompetitív. A GG_{s5} tehát szívesebben kötődik a szabad enzimhez, mint az enzim-szubsztrát komplexhez. Az aleppói tölgy tannin a rövid szubsztráton inkább kompetitív jelleget mutat, az amilózon pedig a korábban már taglalt másodrendű kinetikát tapasztaltuk.

A rövid szubsztrát esetén mindegyik tannin és a GG_{s5} is inkább kompetitív jellegű gátlást mutat. Az amilóz szubsztráton az inhibíciók jellege azonban változó. Ezt azzal magyarázzuk, hogy az amilóz esetén a szubsztrát és az inhibitor közötti kölcsönhatások is befolyásolják a gátlást, míg ezzel a GalG₂-CNP szubsztrát használatakor nem kell számolni.

Az aleppói tölgy tannin a GalG₂-CNP szubsztráton megközelíti az akarbóz inhibitor hatását. A kocsányos tölgy tannin és a GG_{s5} kb. egy nagyságrenddel gyengébb inhibitor, mint az akarbóz. Amilóz szubsztráton a kocsányos tölgy tannin sokkal rosszabb inhibitornak bizonyult, az aleppói tölgy tannin és a GG_{s5} viszont csak egy nagyságrenddel rosszabb hatékonyságú, mint az akarbóz.

3.3.1. A tanninok kötődése a HSA-hoz

A tanninok HSA-hoz való kötődését STD NMR és mutáns HSA enzimekkel kivitelezett gátlás vizsgálatokkal tanulmányoztuk pentagalloil- β -D-glükopiranoz jelenlétében.

Az STD mérések eredményei azt mutatták, hogy a GG_{s5} hozzákötődik a HSA-hoz és feltehetően a fehérje hidrofób régióival lép kölcsönhatásba. A HSA aktív centrumával kapcsolatos ismereteink alapján feltételezhető, hogy a (-3/-2), (-1/+1) és a (+2) alhelyek közelében lévő Trp59, Tyr62 és Tyr151 aromás aminosavak a galluszsavak aromás gyűrűivel stacking kölcsönhatást létesítenek. Valószínűnek tartjuk, hogy a fehérje és az inhibitor között H-hidak is kialakulnak, de az STD mérés alapján erre vonatkozó információkat nem lehet levonni. Úgy tűnik, hogy az aleppói

tannin kompakt szerkezete kedvezőbb a HSA-val való kapcsolat létesítése szempontjából, mint az elnyújtott alakú tölgy tannin komponenseké.

A humán nyál amiláz enzim mutánsaival végeztünk inhibíciós vizsgálatot GG_s jelenlétében. A mutáció során az egyik enzimmél a vad típusú HSA (-2) alhelynél elhelyezkedő Trp58-at helyettesítették Leu-al, míg a másikonál a (+2) alhelynél található Tyr151-es aminosavat cserélték le Met-ra. Az aromás csoportok hiányában az enzim a mutációval átalakított helyeken stacking kölcsönhatások kialakítására nem képes. Mindkét mutáns enzim esetén csökkent gátlást tapasztaltunk. Ez bizonyítja, hogy a (-2) és (+2) alhelyeken található aromás aminosavak milyen fontos szerepet töltenek be a GG_s megkötésében.

4. Összefoglalás

Vizsgálataim eredményeiből megállapítottam, hogy az inhibitor hatás szempontjából előnyös:

- ha az inhibitor molekula viszonylag hosszú
- szénhidrát típusú inhibitorok esetén jó, ha több monoszacharid egységből áll, így több alhellyel is kölcsönhatásba léphet az enzim aktív centrumában
- ha a molekula sok OH csoportot tartalmaz, ami lehetővé teszi hidrogénhidak kialakítását az enzimmal
- ha az inhibitor a glikozidos kötés átmeneti állapotát mimikáló telítetlen ciklohexén gyűrűt (akarbóz, glükál), vagy poláris kölcsönhatások kialakítására képes spiro-tiohidantoin gyűrűt (PTS-GTH) tartalmaz
- ha stacking kölcsönhatás kialakítására alkalmas molekularészlet van jelen az inhibitorban

Megfigyeltem, hogy az egyes tulajdonságok önmagukban nem elegendőek a kiváló inhibitor hatás eléréséhez. Az akarbóz és a PTS-GTH az ideális inhibitor minden korábban felsorolt jellemzőjével rendelkeznek, így ezek bizonyultak a HSA legjobb inhibitorainak a szénhidrát típusú vegyületek közül.

A megfelelő hosszúság és a kellő számú OH csoport jelenléte mellett a polifenolos vegyületek közé tartozó tanninok rendelkeznek még azzal az inhibíció szempontjából előnyös tulajdonsággal, hogy galluszsav csoportjaik révén stacking kölcsönhatást hozhatnak létre a HSA kötő alhelyeinek aromás aminosavaival, amely révén az aleppó tannin megközelíti az akarbóz és a PTS-GTH gátló hatását. A GG_S inhibitor hatása nem sokkal marad el az aleppó tanninétól. A különbség oka, hogy az aleppó tannin hexagalloil-glükózt is tartalmaz, ami valószínűleg jobb inhibitor a GG_S-nál. A kocsányos tölgy eredetű tannin kevésbé jó gátló hatását elnyúlt szerkezetével magyarázzuk, ami a HSA-val való kölcsönhatás kialakítása szempontjából kedvezőtlenebb, mint a kompakt struktúra.

Megfigyeltem, hogy az aleppó tannin amilózon végzett kinetikai vizsgálata során egy inhibitor molekula kötődik a szabad enzimhez és két molekula inhibitor az ES-komplexhez. Ennek oka, hogy az aleppó tannin nem csak az enzimhez, hanem az amilózhoz is képes kötődni. A többi inhibitor esetén mindig első rendű kinetikát tapasztaltam, ami azt jelenti, hogy egy molekula inhibitor kötődik az enzimhez és az ES-komplexhez.

Az aleppó tannin esetén az ESI₂ komplex képződése azzal magyarázható, hogy az amilóz hidrofób árkokat tartalmazó másodlagos szerkezete polifenolokkal erős kölcsönhatást képes kialakítani. A kocsányos tölgy tannin esetén valószínűleg az elnyújtott szerkezet miatt nem volt tapasztalható a másodrendű kinetika.

Az inhibitorok közül a búzamazóból származó fehérje, a 0,28-inhibitor bizonyult a legjobbnak a HSA gátlásakor az IC₅₀ értékek alapján. Ennek oka, hogy a protein nagy méretéből adódóan nem csak az aktív centrumhoz kapcsolódhat, hanem attól távol lévő enzim területekkel is kölcsönhatást alakít ki.

5. Publikációk

Az értekezés témakörében megjelent közlemények

1. Lili Kandra, Gyöngyi Gyémánt, **Ágnes Zajác**z and Gyula Batta
Inhibitory effects of tannin on human salivary α -amylase
Biochem. Biophys. Res. Commun. **319** (2004) 1265-1271.
Impakt faktor: 2.836
2. Lili Kandra, Judit Remenyik, Gyöngyi Gyémánt, **Ágnes Zajác**z and Gyula Batta
Synthesis of a novel inhibitor specific for human α -amylases,
In: Rare Sugars, Creating a Novel Bio-World with Rare Sugars, p. 289-294
Proceedings of the Second Symposium of International Society of Rare Sugars,
Takamatsu, Kagawa, Japan, May 27-29, 2004.
3. Lili Kandra, Judit Remenyik, **Ágnes Zajác**z, Gyöngyi Gyémánt
Kinetic investigation of a new inhibitor for Human Salivary α -Amylase
Biochem. Biophys. Res. Commun. **334** (2005) 824-828.
Impakt faktor: 2.836
4. Sándor Kéki, Gyula Batta, Ilona Bereczki, Zsolt Fejes, Lajos Nagy, **Ágnes Zajác**z, Lili Kandra, Imre Kiricsi, György Deák, Miklós Zsuga, Pál Herczegh
New types of α -amylase enzyme inhibitory polysaccharides from D-glucal,
Carbohydr. Polym. **63** (2006) 136-140.
Impakt faktor: 1.71
5. **Ágnes Zajác**z, Gyöngyi Gyémánt, Natale Vittori and Lili Kandra
Aleppo tannin: structural analysis and salivary amylase inhibition
Carbohydr. Res. **342** (2007) 717-723.
Impakt faktor: 1.703

A dolgozat témakörében bemutatott előadások és poszterek

Előadások:

1. Bereczki Ilona, Kéki Sándor, Batta Gyula, Fejes Zsolt, Deák György, Nagy Lajos, Kiricsi Imre, **ZajácZ Ágnes**, Kandra Lili, Zsuga Miklós, Herczegh Pál
Új típusú poliszacharidok szintézise glükál-származékok poli-Ferrier-reakciójával
Munkabizottsági ülés, Debrecen, 2004. 10. 05.
2. **ZajácZ Ágnes**, Kandra Lili, Gyémánt Gyöngyi, Batta Gyula
Tannin - a humán nyál amiláz (HSA) inhibitora
Kémiai Előadói Napok, Szeged, 2004. 10. 25-27.
3. Bereczki Ilona, Herczegh Pál, Kéki Sándor, Batta Gyula, Fejes Zsolt, Zsuga Miklós, Deák György, Nagy Lajos, **ZajácZ Ágnes**, Kandra Lili, Kiricsi Imre
Új típusú polikondenzációs reakció Ferrier-átrendeződéssel: Új poliszacharidok szintézise glükál származékok polikondenzációjával
X. Nemzetközi Vegyészkonferencia, Kolozsvár, 2004. 11. 12-14.
4. **Ágnes ZajácZ**, Lili Kandra, Gyöngyi Gyémánt, Gyula Batta
Effect of quinic acid based gallotannin on HSA
2nd Austrian-Hungarian Carbohydrate Conference, Somogyaszaló, 2005. 05. 24-26.
5. **ZajácZ Ágnes**, Kandra Lili
 α -Amiláz inhibitorok vizsgálata
Tudomány Napja, Debrecen, 2005. 11. 16.
6. Kandra Lili, Gyémánt Gyöngyi, Batta Gyula, **ZajácZ Ágnes**
Fehérje-ligand kölcsönhatás tanulmányozása a humán nyál amiláz (HSA) hatásmechanizmusának felderítésére
Centenárium Vegyészkonferencia, Sopron, 2007. 05. 29-06. 01.

Poszterek:

1. **Zajác Ágnes**, Kandra Lili, Gyémánt Gyöngyi, Natale Vittori
Az aleppói tölgy gubacsából izolált tannin inhibitor hatása a humán nyál
amilázon
Vegyész konferencia, Hajdúszoboszló, 2005. 06. 26-30.
2. **Ágnes Zajác**, Gyöngyi Gyémánt, Gyula Batta, Lili Kandra
Tannins of great inhibitor activity on Human Salivary Amylase (HSA)
Summer Course Glycosciences, Wageningen (The Netherlands), 2006. 06. 06-
09.
3. Lili Kandra, Gyöngyi Gyémánt, Narayanan Ramasubbu, Gyula Batta, **Ágnes
Zajác**
Structure-function correlation studies on human salivary amylase (HSA) using
tannins as inhibitors
3rd Symposium on the Alpha-Amylase Family, Smolenice, 2007. 09. 23-27.

1. Introduction

The inhibition of enzyme reactions by specific molecules plays a crucial role in the regulation of enzyme function and in the control of biological systems, so inhibitors can help to understand the molecular mechanism of enzyme activity. Besides, they can be used for the investigation of enzymes' substrate binding site, for determination of isoenzymes (in the case of selective inhibition), for examining the mechanism of action of medicals, for designing medicines and for the treatment of metabolic diseases.

Amylase inhibitors have a practical significance in human medicine. They are reckoned among the important compounds treating diabetes, obesity and caries.

Inhibitors of human salivary amylase (HSA) can be used for preventing the formation of caries. HSA is capable of binding oral *Streptococci* and the tooth enamel, it can also hydrolyze starch. Degradation products derived from the breakdown of starch can be used as a food source by the bacteria and they are metabolized to lactic acid. The local acid production can lead to the dissolution of tooth enamel, which is a critical step in dental caries development.

So it is to understand that several investigations have been made on α -amylase inhibitors.

The most well-known and most commonly used amylase inhibitor is acarbose. Many acarbose derivatives (e.g. acarviosine-glucose, isoacarbose) were synthesized expecting better inhibitory effect.

Proteins derived from the seeds of leguminous plants and cereals proved to be good α -amylase inhibitors. Most of them have an effect on insect amylases, but in some cases human amylase inhibitory effect was also detected. Detailed kinetic measurements upon this subject have not been carried out yet.

The amylase inhibitor effect of plant derived tannins has been well known for a long time, but the properties of the inhibition have not been studied until now.

I have investigated the effect of several human salivary amylase inhibitors – tannins originated from pendunculate oak (*Quercus robur*) and aleppo oak (*Quercus infectoria Olivier*), pentagalloyl- β -D-glucopyranose (GGs₅), the proteinaceous 0,28-inhibitor from wheat seed, and different carbohydrate type compounds - on HSA activity from the viewpoint of enzyme kinetics. In most cases the measurements were carried out on two substrates: 2-chloro-4-nitrophenyl-4-O- β -D-galactopyranosyl- α -D-maltoside (GalG₂-CNP) and amylose.

The main aim of this work was to determine the type of the experienced inhibitions, to establish the kinetic constants, to calculate the IC₅₀ values, to gain information about the mechanism of inhibitor action. For tannins it was necessary to verify the components of the natural mixtures and the molecular weights of the compounds, to study their structure and to determine their gallic acid and ellagic acid content.

We were interested in the influence of the substrate's type on kinetic constants and the type of inhibition. Enzyme-inhibitor interactions were also studied. This thesis includes the results of the above mentioned topics.

2. Applied methods

MALDI-TOF MS, MALDI-TOF MS PSD, ESI-MS, ¹H and ¹³C NMR measurements were carried out for the characterization of the structure of tannin inhibitors. In addition, gallic acid and ellagic acid determinations were also done.

Enzyme reactions were executed in two different manners. When GalG₂-CNP was the substrate, the liberation of the CNP chromophore was detected spectrophotometrically. When amylose was used as substrate, the initial velocity of the reaction was measured with the dinitro-salicylic acid method, which is based on determining reducing value. The inhibition kinetics were studied by using the classical Lineweaver-Burk, Dixon plots and secondary plots.

Interactions between pentagalloyl- β -D-glucopyranose and HSA were demonstrated with STD NMR method and with measurements using mutated HSA enzymes.

3. New scientific results

3.1. Protein inhibitors of human salivary amylase

One commercially available, wheat seed originated, proteinaceous inhibitor, the so called 0,28-inhibitor was studied during my Ph.D. work. On amylose substrate a mixed non-competitive inhibition was observed. The dissociation constants are in nanomolar range ($K_{EI}=61.5$ nM, $K_{ESI}=142$ nM), which means a very strong inhibitory effect. The IC_{50} value in the case of using GalG₂-CNP substrate is 18.27 nM.

3.2. Carbohydrate-like salivary amylase inhibitors

Many carbohydrate type compounds were tested if they were HSA inhibitors. The kinetic constants and IC_{50} values of maltose, maltooligosaccharides, glucal oligosaccharid mixture (which consists of synthetic, 2,3 unsaturated hexapiranoses) , glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin (GTH) and α -acarviosinyl-(1,4)- α -D-glucopyranosyl-(1,6)-D-glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin (PTS-GTH) are listed in Table 1.

The glucal oligosaccharide mixture has the worst inhibitory properties. Although glucals mimic the transition state of the substrate, the poor affinity to HSA is due to the lack of OH groups. The substrate analogue GTH can form several different binding modes with the active site of the enzyme because of its small size. This can explain its low inhibitor potential. Maltose, maltotriose and maltopentaose can cause enzyme inhibition in only millimolar range on HSA. In

the case of maltose inhibition is completely non-competitive, while maltortiose and maltopentaose show completely competitive type of inhibition.

Table 1: The dissociation constants and IC₅₀ values of carbohydrate type HSA inhibitors on GalG₂-CNP substrate.

Inhibitor	K _{EI} (μM)	K _{ESI} (μM)	IC ₅₀ (μM)
glucal (DP 2-7)	35200	2700	2010*
GTH	7300	2840	10500
G ₂	-	4000	8000
G ₃	2650	-	3500
G ₅	400	-	800
PTS-GTH	0,19	0,24	0.03
acarbose	0,70	0,10	0.86

* The glucal's IC₅₀ value cannot be given in μM, because it is a mixture of oligosaccharides, so the IC₅₀ value for glucal is presented in the table in μg mL⁻¹.

Inhibition constants suggest that inhibitor efficiency is increased by increasing the number of sugar rings. It also succeeds in the relation of GTH-PTS-GTH inhibitors. The dissociation constants of PTS-GTH are four orders of magnitude lower than that of GTH. It contributes to the great inhibitory effect that acarbose was used as a donor by the synthesis of PTS-GTH, so a transition state mimicking cyclitol ring and through the acceptor a thiohydantoin ring is also present in the molecule. The acceptor and the hydrolysis product of the donor, the pseudotrisaccharide are linked via an α(1,6) glycosidic bond. That is the reason why the inhibitor molecule resists the hydrolysis of HSA. PTS-GTH, taking advantage of the beneficial properties of its building blocks, has a considerable inhibitory effect.

3.3. Tannins as HSA inhibitors

The kinetic analysis of pendunculate oak and aleppo oak originated tannins and pentagalloyl-β-D-glucopyranose (GG_{S5}) was performed. The results are summarised in Table 2.

Table 2: Dissociation constants of tannins.

Inhibitor	GalG ₂ -CNP			Amylose			
	K _{EI}	K _{ESI}	inhibition	K _{EI}	K _{ESI}	K _{ESI2}	inhibition
pendunculate oak derived tannin	8.27 μg/ml	45.00 μg/ml	m n-c.	1510.56 μg/ml	121.80 μg/ml	-	m n-c.
aleppo oak derived tannin	0.82 μg/ml	3.32 μg/ml	m n-c.	17.40 μg/ml	14.86 μg/ml	9.64 μg/ml	m n-c.
GG _{S5}	2.35 μM	5.02 μM	m n-c.	8.15 μM	14.00 μM	-	m n-c.
	2.21 μg/ml	4.72 μg/ml		7.66 μg/ml	13.16 μg/ml		
acarbose	0.70 μM	0.10 μM	m n-c.	3.70 μM	1.08 μM	-	m n-c.
	0.45 μg/ml	0.07 μg/ml		2.39 μg/ml	0.70 μg/ml		

(Comment: m n-c.=mixed non-competitive.)

Both tannins and also GG_{S5} were better inhibitors on the short substrate than on amylose substrate. In the case of tannin mixtures there is at least two orders of magnitude difference between the K_{EI} and nearly one order of magnitude difference between the K_{ESI} values on the two substrates. The reason for this is that GalG₂-CNP is a worse substrate of HSA than amylose, which is simply reflected by the fact that the K_M value on GalG₂-CNP: 1.29 mM and on amylose: 9.672 mgmL⁻¹=0.096-0.0096 mM is. In the case of GG_{S5} inhibitor the difference between the results on the two substrates was not so notable.

When aleppo tannin was used as an inhibitor, first order kinetic was observed on GalG₂-CNP, but a second order kinetic (Fig. 1) on amylose substrate. This can be explained by the fact that tannin is able to bind to amylose, so this way not only ESI, but ESI₂ complex also can be formed. This means that the inhibitor can bind not only to the enzyme, but also to the substrate. Second order kinetic was not found when pendunculate oak derived tannin was the inhibitor.

This comes from the structural difference between the tannins. On the basis of MALDI-TOF MS PSD analysis it was concluded that the pendunculate oak derived tannin has rather an elongated structure, in which mainly gallic acid trimer, dimer and in low quantity monomer units are bound to the quinic acid polyol. Aleppo tannin has

a rather compact structure, in which the central glucose polyol is esterified with gallic acid monomers (or dimers).

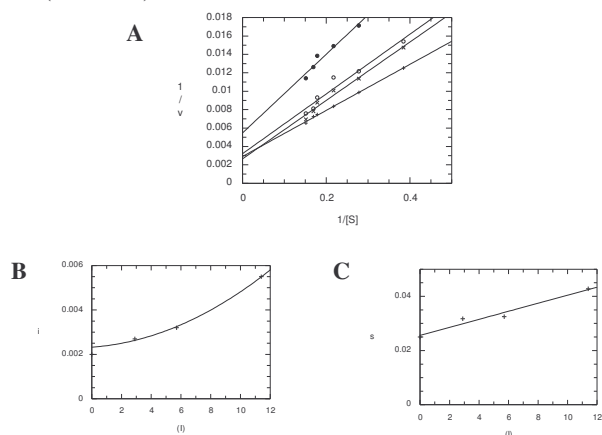


Fig. 1: Second order kinetic in the case of aleppo tannin. Lineweaver-Burk plots (A) and secondary plots (B, C) of the measurement carried out on amylose substrate. $[S]=\text{mg mL}^{-1}$. $[I]$: +, 0 $\mu\text{g mL}^{-1}$; \times , 2.9 $\mu\text{g mL}^{-1}$; \circ , 5.7 $\mu\text{g mL}^{-1}$; \bullet , 11.4 $\mu\text{g mL}^{-1}$. $[1/v]=\text{min}\mu\text{M}^{-1}$

Comparing the two kinds of tannins, aleppo tannin turned out to be a better inhibitor on both substrates, which can be explained by the difference in the arrangement of gallic acids of the tannins. The K_{EI} value of aleppo tannin is two orders of magnitude lower on GalG₂-CNP and on amylose substrate than pendunculate oak tannin's.

GGs₅ is nearly as effective inhibitor of HSA as aleppo tannin, since it is a component of aleppo tannin. It should be mentioned, that the competitive constants of aleppo tannin are two times lower than PGG's. This is because aleppo tannin is a mixture containing hexagalloyl-glucose, which is presumably a better inhibitor than GGs₅. Due to the presence of one additional gallic acid, they can form more interactions, so they bind stronger to the enzyme than GGs₅.

The type of inhibition is mixed non-competitive in every case. When pendunculate oak tannin was used as an inhibitor on amylose substrate the value of

the competitive constant was found higher than the uncompetitive's, which means that the inhibitor binds favourably to the enzyme-substrate complex, than to the free enzyme. On GalG₂-CNP substrate the situation is inverse. From the dissociation constants of GG₅ the uncompetitive constant turned out to be higher, so the inhibition is rather competitive. GG₅ binds favourably to the enzyme than to the enzyme-substrate complex. Aleppo tannin shows rather competitive inhibition on the short, chromogenic substrate, but on amylose the previously described second order kinetic was observed.

On the short substrate all the tannins and GG₅ present a rather competitive inhibition. On amylose substrate the character of the inhibitions was alternating. It is explained by the fact that, in the case of amylose, the interactions between the substrate and the inhibitor might have an effect on the inhibition, while this phenomenon does not play a role when using GalG₂-CNP substrate.

The inhibitory potential of aleppo tannin is close to acarbose's on GalG₂-CNP substrate. Pendunculate oak tannin and GG₅ is nearly one order of magnitude worse inhibitor, than acarbose. On amylose substrate pendunculate oak tannin was much worse inhibitor than acarbose, but aleppo tannin and GG₅ were only one order of magnitude worse than acarbose.

3.3.1. The binding of tannins to HSA

To understand the binding of tannins to HSA better STD NMR analysis and measurements with HSA mutants were carried out in the presence of pentagalloyl- β -D-glucopyranose.

Through the results of STD analysis it was proved that GG₅ binds to HSA and it makes interactions with the hydrophobic patches of the protein. On the basis of the information about the active site of HSA it is suggested that Trp59, Tyr62 and Tyr151 aromatic amino acid residues near the subsites (-3/-2), (-1,+1) and (+2), respectively, can form stacking interactions with the aromatic ring of gallic acids. GG₅ is thought to be likely to form hydrogen bonds with the enzyme too, but from STD

measurements this kind of information cannot be drawn. It is presumed that the compact structure of aleppo tannin is more favourable to form interactions with HSA than the elongated shape of oak tannin components.

Measurements were carried out with HSA mutants in the presence of GG_S₅. Through the mutation Trp58, near subsite (-2), was changed to Leu in one case, and in the other case Tyr151 of subsite (+2) was replaced by Met. In the absence of aromatic groups HSA was not able to form stacking interactions. A highly decreased inhibitory effect was found by both mutated enzymes. This confirms that aromatic amino acid residues at subsites (-2) and (+2) play a crucial role in GG_S₅ binding.

4. Summary

According to my results I can state that from the viewpoint of the inhibitory effect it is advantageous:

- if the inhibitor molecule is long enough
- in the case of carbohydrate inhibitors it is useful if the inhibitor consists of several monosaccharide units (therefore it can make contact with more subsites in the active site of the enzyme)
- if the molecule contains several OH groups to form hydrogen bonds with the current amino acid residues of the enzyme
- if the inhibitor has an unsaturated cyclohexene ring, mimicking the transition state of the glycosidic bond (acarbose, glucal) or a spiro-thiohydantoin ring (PTS-GTH), which is capable of forming polar contacts
- if there is a group in the inhibitor which can form stacking interactions with the enzyme

It was observed that these properties individually are not enough to achieve an excellent inhibitory effect. Acarbose and PTS-GTH possess all the above-mentioned

advantageous features. In addition with that they were found to be the best HSA inhibitors among the carbohydrate-like inhibitors.

Tannins are polyphenolic compounds of high molecular weight, which beside the properties of necessary length and number of OH groups, are able to form stacking interactions with the aromatic amino acid residues of the HSA active center subsites. In the case of aleppo tannin these interactions contribute to the good inhibitory potential, which is close to the inhibitory effect of acarbose and PTS-GTH. Pentagalloyl- β -D-glucopyranose (GGs₅) is a constituent of aleppo tannin and its dissociation constants are not much higher than aleppo tannin's. The reason for the difference is that the aleppo tannin mixture contains hexagalloyl-glucose molecules, which are thought to be better inhibitors than GGs₅. The pendunculate oak originated tannin is worse inhibitor of HSA than aleppo tannin. This can be explained by the linear structure of oak tannin, which was determined with MALDI-TOF MS PSD analysis. This linear structure is probably more unfavourable from the viewpoint of making interactions with the enzyme.

During the kinetic analysis of aleppo tannin on amylose substrate a special kind of inhibition was observed. On the basis of the Lineweaver-Burk secondary plots it was concluded that one molecule of inhibitor binds to the free enzyme and two to the enzyme-substrate complex. It is because aleppo tannin can bind to the enzyme and to amylose, too. All the other inhibitors showed first order kinetic, which means that one inhibitor molecule binds to the free enzyme and to the enzyme-substrate complex.

The formation of ESI₂ complex in the case of aleppo tannin is based on the fact, that amylose is a polysaccharide, which can form a secondary structure containing hydrophobic cavities, so they are able to make strong interactions with polyphenols. In the case of pendunculate oak tannin this phenomenon was not observed, presumably because of the linear structure of this tannin.

Among the inhibitors the wheat seed derived, proteinaceous 0,28-inhibitor had the best inhibitory effect on HSA on the basis of IC₅₀ values. It is because of the great size of the protein molecule, which can therefore make interactions not only with the active site of the enzyme, but also with more distant areas of HSA.

5. Publications

Publications in the subject of the Ph.D. thesis

1. Lili Kandra, Gyöngyi Gyémánt, **Ágnes Zajác**z and Gyula Batta
Inhibitory effects of tannin on human salivary α -amylase
Biochem. Biophys. Res. Commun. **319** (2004) 1265-1271.
Impact factor: 2.836
2. Lili Kandra, Judit Remenyik, Gyöngyi Gyémánt, **Ágnes Zajác**z and Gyula Batta
Synthesis of a novel inhibitor specific for human α -amylases
In: Rare Sugars, Creating a Novel Bio-World with Rare Sugars, p. 289-294.
Proceedings of the Second Symposium of International Society of Rare Sugars,
Takamatsu, Kagawa, Japan, May 27-29, 2004.
3. Lili Kandra, Judit Remenyik, **Ágnes Zajác**z, Gyöngyi Gyémánt
Kinetic investigation of a new inhibitor for Human Salivary α -Amylase
Biochem. Biophys. Res. Commun. **334** (2005) 824-828.
Impact factor: 2.836
4. Sándor Kéki, Gyula Batta, Ilona Bereczki, Zsolt Fejes, Lajos Nagy, **Ágnes Zajác**z, Lili Kandra, Imre Kiricsi, György Deák, Miklós Zsuga, Pál Herczegh
New types of α -amylase enzyme inhibitory polysaccharides from D-glucal
Carbohydr. Polym. **63** (2006) 136-140.
Impact factor: 1.71
5. **Ágnes Zajác**z, Gyöngyi Gyémánt, Natale Vittori and Lili Kandra
Aleppo tannin: structural analysis and salivary amylase inhibition
Carbohydr. Res. **342** (2007) 717-723.
Impact faktor: 1.703

Lectures and posters in the subject of the Ph.D. thesis

Lectures:

1. Berezki Ilona, Kéki Sándor, Batta Gyula, Fejes Zsolt, Deák György, Nagy Lajos, Kiricsi Imre, **Zajác Ágnes**, Kandra Lili, Zsuga Miklós, Herczegh Pál
Új típusú poliszacharidok szintézise glükál-származékok poli-Ferrier-reakciójával.
Munkabizottsági ülés, Debrecen, 2004. 10. 05.
2. **Zajác Ágnes**, Kandra Lili, Gyémánt Gyöngyi, Batta Gyula
Tannin - a humán nyál amiláz (HSA) inhibitora
Kémiai Előadói Napok, Szeged, 2004. 10. 25-27.
3. Berezki Ilona, Herczegh Pál, Kéki Sándor, Batta Gyula, Fejes Zsolt, Zsuga Miklós, Deák György, Nagy Lajos, **Zajác Ágnes**, Kandra Lili, Kiricsi Imre
Új típusú polikondenzációs reakció Ferrier-átrendeződéssel: Új poliszacharidok szintézise glükál származékok polikondenzációjával
X. Nemzetközi Vegyészkonferencia, Kolozsvár, 2004. 11. 12-14.
4. **Ágnes Zajác**, Lili Kandra, Gyöngyi Gyémánt, Gyula Batta
Effect of quinic acid based gallotannin on HSA
2nd Austrian-Hungarian Carbohydrate Conference, Somogyaszaló, 2005. 05. 24-26.
5. **Zajác Ágnes**, Kandra Lili
 α -Amiláz inhibitorok vizsgálata
Tudomány Napja, Debrecen, 2005. 11. 16.
6. Kandra Lili, Gyémánt Gyöngyi, Batta Gyula, **Zajác Ágnes**
Fehérje-ligand kölcsönhatás tanulmányozása a humán nyál amiláz (HSA) hatásmechanizmusának felderítésére
Centenárium Vegyészkonferencia, Sopron, 2007. 05. 29.-06. 01.

Posters:

1. **Zajác Ágnes**, Kandra Lili, Gyémánt Gyöngyi, Natale Vittori
Az aleppói tölgy gubacsából izolált tannin inhibitor hatása a humán nyál
amilázon
Vegyész konferencia, Hajdúszoboszló, 2005. 06. 26-30.
2. **Ágnes Zajác**, Gyöngyi Gyémánt, Gyula Batta, Lili Kandra
Tannins of great inhibitor activity on Human Salivary Amylase (HSA)
Summer Course Glycosciences, Wageningen (The Netherlands), 2006. 06. 06-
09.
3. Lili Kandra, Gyöngyi Gyémánt, Narayanan Ramasubbu, Gyula Batta, **Ágnes
Zajác**
Structure-function correlation studies on human salivary amylase (HSA) using
tannins as inhibitors
3rd Symposium on the Alpha-Amylase Family, Smolenice, 2007. 09. 23-27.