

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**A 2-es típusú cukorbetegség terápiájában
alkalmazható glikoenzim-inhibitorok *in vitro*
vizsgálata során felmerülő nehézségek és azok
megoldása**

Nagy-Szabó Kármén Annamária

Témavezető: Dr. Gyémánt Gyöngyi



DEBRECENI EGYETEM

Kémia Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2020

Rövidítések

AAG	aggregációalapú gátlás
AAI	aggregációalapú inhibitor
AMP	adenozin-monofoszfát
CNP-G7	2-klór-4-nitrofenil- β -D-maltoheptaozid
DLS	dinamikus fényszórásmérés
EC ₅₀	félhatásos aktivátorkoncentráció
GalG ₂ CNP	2-klór-4-nitrofenil-O- β -D-galaktopiranozil-(1 \rightarrow 4)-O- α -D-glükopiranozil-(1 \rightarrow 4)- α -D-glükopiranozil
GF	glikogén foszforiláz
GTH	glükopiranozilidén-spiro-tiohidantoin
G-1-P	glükóz-1-foszfát
ITC	izotermális titrálási kalorimetria
k _{cat}	katalitikus állandó (átviteli szám)
K _i	gátlási állandó
K _i [*]	látszólagos gátlási állandó
K _M	Michaelis-állandó
P _i	szervetlen foszfát
PPA	sertéshasnyálmirigy-eredetű α -amiláz

I. Bevezetés és célkitűzések

Annak ellenére, hogy napjainkban számos antidiabetikus hatású glikoenzim-inhibitor áll rendelkezésre, továbbra is intenzív kutatások folynak az új gátlószerek után. A 2-es típusú cukorbetegség terápiájának elsődleges enzimecélpontjai a glikogén foszforiláz (GF) és az α -amiláz. Doktori munkám során a glikoenzim-inhibitorok *in vitro* vizsgálatának két legproblematisabb elemével foglalkoztam, vagyis a megfelelő aktivitásmérési módszer alkalmazásával, valamint a kísérleti eredményekből történő helytálló következtetések levonásával.

Egy új aktivitásmérési módszer kidolgozása gyakran rendkívül összetett folyamat. Például a GF esetében figyelembe kell vennünk, hogy az enzim inaktív formában van jelen, ezért gondoskodnunk kell annak aktiválásáról. Mivel két szubsztrátos enzimről van szó, így azt is biztosítanunk kell, hogy a reakció az egyik szubsztrátra nézve pszeudo nulladrendű legyen. Ráadásul az enzim mind a glikogénlebontást, mind a glikogénszintézist képes katalizálni, ezért olyan módszert kell keresni, ami lehetővé teszi mindkét irányú folyamat vizsgálatát. Egy olyan aktivitásmérési módszer kidolgozását tűztem ki célul, mely során azonos körülmények között tudom követni mind a foszforolitikus, mind a lánchosszabbítási reakciót. Azonos reakciókörülmények alkalmazásával egy inhibitor gátlási paramétereit összevethetővé válnak, így meg lehet állapítani, hogy a nemfiziológiás irányban vizsgált vegyületek ugyanolyan jó gátló hatással rendelkeznek-e a gyógyászati szempontból releváns irány esetén is. Egy megfelelő aktivitásmérési módszer kidolgozása azonban önmagában nem elegendő; alapos körütekintéssel kell megválasztani a gátlásvizsgálatokhoz alkalmazni kívánt inhibitorokat, illetve a kísérletek eredményeit is számos szempont figyelembevételével kell értékelni. Ennek segítségével elkerülhetővé válik a gyógyszerfejlesztés során felmerülő másik gyakori probléma, vagyis hogy a már előállított gátlószerek 'zsákutcának' bizonyulnak. A gyógyszerfejlesztés szempontjából egyik legkedvezőtlenebb jelenség a gyógyszerek vagy gyógyszerjelöltek nemspecifikus, ún. promiszkuis jellege, vagyis a több, egymástól jelentősen eltérő enzimen kifejtett szignifikáns gátló hatásuk. A legtöbb esetben aggregátumképződés áll a promiszkuitás hátterében, ami jelentősen növeli a lehetséges mellékhatások kialakulásának kockázatát. A szakirodalomban azonban számos olyan publikációt lehet találni, ahol a már ismert vegyületek újabb és újabb kiemelkedően jó terápiás hatásáról számolnak be anélkül, hogy megvizsgálták volna e promiszkuis viselkedés hátterében álló molekuláris mechanizmust. Emellett olyan közleményekkel is találkozhatunk, ahol az újonnan szintetizált gátlószerek rendkívül nagy biológiai hatékonyságát írják le, habár olyan alapvázal rendelkeznek, mely már többször képezte más aggregációalapú inhibitor (AAI) szerkezeti egységét. Emiatt célul tűztem ki, hogy szintetikus eredetű, potenciális glikoenzim-inhibitorok aggregálódásra való hajlamát tanulmányozzam közvetlen és közvetett stratégiákat alkalmazva. Különböző szubsztituensekkel módosított, rodanin alapvázal tartalmazó tiazolidinonszármazékokon keresztül terveztem bemutatni azt, hogy az alapváz előzetes vizsgálatával helyesen következtethetünk-e egy inhibitor nemspecifikus, promiszkuis jellegére, illetve azt, hogy a promiszkuisnak bizonyuló vegyületek gátló mechanizmusának hátterében valóban aggregátumképződés áll-e.

II. Alkalmazott készülékek és módszerek

A nyúlvészom-eredetű glikogén foszforiláz enzim szubsztrátspecificitásának vizsgálatához, a GFb aktiválásához szükséges félhatásos aktivátorkoncentráció meghatározásához, illetve a koffein és a glükopiranozilidén-spiro-tiohidantoin (GTH) gátló hatásának analizéséhez izotermális titrálási kalorimetriás (ITC) módszert használtam, mely kísérleteket egy MicroCal ITC200 (Malvern, Worcestershire, UK) mikrokaloriméterrel valósítottam meg. A nyers kalorimetrikus jel alapján meghatározható dQ/dt érték a kezdeti reakciósebesség közvetlen mértékének tekinthető. A kísérleti ITC adatok kiértékeléséhez minden esetben Microcal Origin 7.0 grafikai és adatelemző szoftvert alkalmaztam (Northampton, MA, USA).

Az ITC méréseket egyszeres injektálásos módszerrel hajtottam végre, ahol az injektor az enzimet, a referenciacella a puffert, míg a mérőcella a pufferben oldott szubsztrátot, a gátlásvizsgálatok alkalmával pedig az inhibitort is tartalmazta. A GF ITC-vel történő aktivitásmérése során ugyanazon körülményeket alkalmaztam az enzim által katalizált reverzibilis reakció mindkét irányában, csupán a puffer glükóz-1-foszfát (G-1-P) és szervesetlen foszfát (P_i) koncentrációját változtattam.

A GFb aktivitásmérésére alkalmas módszer reakciókörülményeinek optimalizálását, és a GTH, illetve a koffein GFb enzimen kifejtett gátló hatásának előzetes vizsgálatát HPLC módszer segítségével végeztem el. A kísérletekhez egy kvaterner pumpával, gáztalanító egységgel, automata mintaadagolóval és diódasoros detektorral felszerelt Agilent 1260 Infinity II készüléket (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) használtam. Az elválasztást Hypersil ODS (20 cm x 4,6 mm, 120 Å, 5 µm, Agilent) oszlopon valósítottam meg, izokratikus elúciót (acetonitril:víz=12:88 v/v%), valamint 1 mL/min áramlási sebességet alkalmazva. A szubsztrátként választott 2-klór-4-nitrofenil-β-D-maltoheptaoid (CNP-G7) és a hosszabb vagy rövidebb, kromogén maltooligomer-termékek detektálása 302 nm hullámhosszon történt. Minden mérés során 2,5 mM CNP-G7, illetve 2,5 mM-25 mM G-1-P vagy foszfát (Na_2HPO_4) szubsztrátot oldottam fel frissen a 2,6 mM EDTA-t és 1 mM AMP-t tartalmazó 35 mM β-glicerofoszfát pufferben (pH 6,8). Az enzim és szubsztrát homogenizált elegyét 5 percig 37°C-on inkubáltam, majd 15 percenként (összesen 4-szer) 5 µL mintát injektáltam az oszlopra. A kapott kromatogramok kiértékelése az Agilent ChemStation szoftver (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) segítségével történt.

Az akarbóz, gallotannin és a hét 2-tioxo-4-tiazolidinonszármazék promiszkuitásának, illetve aggregációalapú gátlásának felderítése spektrofotometriás módszerrel történt, mely kinetikai és gátlásvizsgálatok kivitelezéséhez egy termosztálható Jasco V550 típusú kétsugaras spektrofotométert (Jasco Corporation, Easton, MD, USA) alkalmaztam. E kísérletekhez sertéshasnyálmirigy-eredetű α-amilázt (PPA) választottam modellenzimként, míg 2-klór-4-nitrofenil-O-β-D-galaktopiranozil-(1→4)-O-α-D-glükopiranozil-(1→4)-α-D-glükopiranozid (GalG₂CNP) szubsztrátként. 400 nm hullámhosszon detektáltam a PPA hidrolízise nyomán felszabaduló kromoforcsoport (CNP) által kiváltott abszorbancianövekedést. A Jasco Spectra Manager™ szoftver (Jasco Corporation, Easton, MD, USA) Time course measurement funkciójának segítségével határoztam meg a kapott görbe kezdeti szakaszának meredekségét,

vagyis az időegység alatt bekövetkező abszorbanciaváltozást ($dAbs/min$), mely érték a katalizált reakció kezdeti sebességével volt arányos. A különböző inhibitor koncentrációk esetén kiszámolt százalékos maradék enzimaktivitást ábrázoltam az inhibitor koncentrációk függvényében, majd a kapott pontokra logisztikus összefüggés alapján, nemlineáris regresszióval görbét illesztettem a Microcal Origin 7.0 szoftver segítségével.

Az AAI-kal szemben állított követelmények teljesülésének vizsgálatához az eredeti reakció körülmények mellett kivitelezett gátlás vizsgálatokat megismételtem úgy, hogy (1) a puffer 0,01% vagy 0,1% Triton X-100 nemionos detergenst is tartalmazott, (2) az enzimet és az inhibitorokat 5, 10 és 30 percig inkubáltam mielőtt a szubsztrát hozzáadásával elindítottam volna az enzimreakciót, (3) az enzim koncentráció többszörösét alkalmaztam, (4) az inhibitor pufferes oldatát 30 percig centrifugáltam, majd a felülúszó gátló aktivitását vizsgáltam spektrofotometriásan.

Az aggregáció alapú gátlás (AAG) közvetlen stratégia szerinti felismeréséhez dinamikus fény szórás méréssel (DLS) vizsgáltam a részecskeméretet. Kísérleteimhez egy Zetasizer Nano ZS DLS készüléket (Malvern Panalytical Ltd, Worcestershire, UK) alkalmaztam. Az aggregáció okozta heterodiszperzitás miatt a minták jellemzésére az intenzitás szerinti részecskeméret-eloszlást használtam. Ezen érték mellett meghatároztam továbbá az egyes minták polidiszperzitás indexét és fotonbeütésszámát. Minden inhibitor esetében két mérésorozatot hajtottam végre. Először az inhibitor pufferes oldatát vizsgáltam, majd a fehérjeméretben inhibitor hatására bekövetkező változásokat szándékoztam kimutatni. Valamennyi mérés előtt a mintákat, és magát a puffert is, egy $0,22\ \mu m$ pórusátmérőjű fecskendőszűrővel (Millex[®]-GP; Millipore[™], Burlington, MA, USA) szűrtem, hogy elkerüljem az esetleges szennyeződések zavaró hatását. Az adatgyűjtéshez és az eredmények kiértékeléséhez a Malvern DTS 7.12 szoftvert (Malvern Panalytical Ltd, Worcestershire, UK) használtam.

III. Új tudományos eredmények

1. Egy új, izotermális titrálási kalorimetriás módszert dolgoztam ki a glikogén foszforiláz aktivitásának mérésére, mely alkalmazható az enzim által katalizált reverzibilis reakció mindkét irányában, a szubsztrát származékképzése és segédenzimek használata nélkül.

Az ITC készülék, mely az adott folyamat során keletkezett vagy elnyelt hőmennyiséget detektálja, megfelelőnek bizonyult a GF aktivitásának mérésére az enzim által katalizált reverzibilis reakció mindkét irányában. A módszer lehetőséget biztosított a GF természetes szubsztrátjának (glikogén) használatára származékképzés nélkül. Az enzimkinetikai vizsgálatokra alkalmazott hagyományos ITC technikákat nem használják elterjedten reverzibilis enzimreakcióknál, mert a folyamat során keletkező termékek a fordított irányú reakció szubsztrátjai lehetnek. Korábban csak olyan hidroláz enzimek esetében határozták meg az enzimaktivitást ITC-vel, ahol a fordított irányú reakció elhanyagolható a nagy mennyiségű víz jelenléte miatt.

1.1. ITC módszer segítségével meghatároztam a katalitikus aktivitással nem rendelkező glikogén foszforiláz b aktiválásához szükséges félhatásos aktivátorkoncentrációt mind a foszforolízis, mind a glikogénszintézis irányában.

A katalitikus aktivitással nem rendelkező GFb AMP-vel allosztérikusan aktiválható. Az enzim hatékony működéséhez szükséges AMP koncentráció meghatározása érdekében vizsgáltam az AMP aktiváló hatását mind a foszforolízis, mind a szintézis irányában, CNP-G7 szubsztrát felhasználásával. Mivel a szintézis során keletkező P_i , illetve a lebontáskor felszabaduló G-1-P is szubsztrátja az enzimnek, biztosítanom kellett, hogy a reakció e komponensekre nézve pszeudo nulladrendű legyen. Méréseim során a félmaximális aktiváló hatást kiváltó koncentráció (EC_{50}) 50 μM volt a glikogénlebontás irányában, míg 26 μM a szintézis esetén.

1.2. A nyúlvázizom-eredetű glikogén foszforiláz szubsztrátspecifitásának karakterizálása érdekében meghatároztam az enzim katalitikus hatékonyságára jellemző k_{cat}/K_M arányokat négy különböző lánchosszúságú szubsztrát esetében.

Az új ITC módszer kidolgozásának első lépéseként a GFb enzim szubsztrátspecifitását vizsgáltam. E kísérletekhez maltopentaózt (G5), maltoheptaózt (G7), glikogént és CNP-G7-et alkalmaztam. A méréseket a fiziológiás (foszforolitikus) folyamat irányában valósítottam meg, amit a puffer 1 M foszfáttartalmával biztosítottam. Az ITC kísérletek során kapott kezdeti reakciósebességeket a szubsztrátkoncentrációk függvényében ábrázolva meghatároztam a Michaelis-állandót (K_M) és az enzimreakció maximális sebességét (v_{max}), mely értékeket összevettem a glikogénszintézisre vonatkozó irodalmi adatokkal. Mivel a szakirodalomban nem találtam a CNP-G7 lánchosszabbítási reakciójára vonatkozó kinetikai adatokat, ezért ezzel a szubsztráttal a szintézis irányában is elvégeztem az ITC kísérleteket, a puffer 50 mM G-1-P

tartalmával biztosítva a megfelelő irányú reakció lejátszódását. A lánchosszabbítás irányában $K_M=15,2 \pm 2,2$ mM és $k_{cat}/K_M=0,25 \cdot 10^3$ s⁻¹M⁻¹ lett.

Habár a foszforolitikus reakció során a lineáris szubsztrátok és a számtalan nemredukáló véget tartalmazó glikogén esetében az enzim katalitikus hatékonysága (k_{cat}/K_M) nagyságrendi hasonlóságot mutatott, a CNP-G7 alkalmazásával bizonyult az enzim a leghatékonyabbnak, ugyanis e szubsztrátnál kaptam a legnagyobb k_{cat}/K_M arányt (1. táblázat).

1. táblázat: Az rmGFb-katalizálta foszforolitikus reakció során kapott, különböző szubsztrátokon meghatározott kinetikai paraméterek összefoglalása

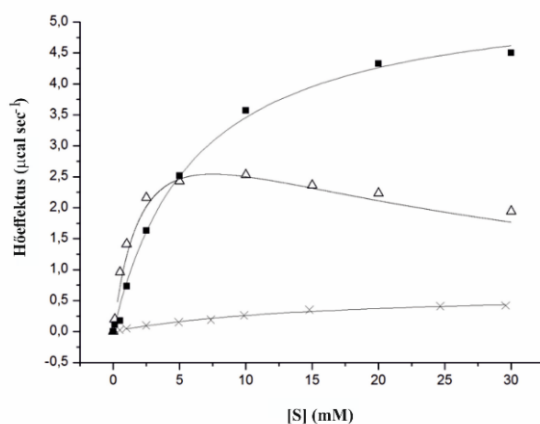
Szubsztrát	Nemredukáló végek száma	K_M^* (mM)	k_{cat}/K_M (s ⁻¹ M ⁻¹)
G5	1	20,2 ± 0,3	3,6*10 ³
G7	1	6,0 ± 0,6	4,6*10 ³
CNP-G7	1	2,3 ± 0,6	10,1*10³
Glikogén	~200	1,5 ± 0,1 [†]	6,3*10 ³

[†]: A glikogén esetében feltüntetett K_M érték mg/mL-ben van megadva.

*: Az eredmények átlagérték ± illesztési hiba formában vannak feltüntetve.

1.3 ITC mérésekkel igazoltam, hogy a CNP-G7 esetében tapasztalt szubsztrátgátlás a második szubsztrátmolekula kromoforcsoporton keresztül bekövetkező allosztérikus kötődésnek tulajdonítható.

A GFb szubsztrátspecificitásának vizsgálatokor szubsztrátgátlást figyeltem meg a CNP-G7 kromoforcsoporttal jelzett szubsztrát foszforolitikus reakciója esetén (1. ábra).



1. ábra: A [G7] és [CNP-G7] GFb enzim aktivitására kifejtett hatásnak ITC vizsgálata. A G7 foszforolízise (■) és a CNP-G7 szintézis irányú (x) reakciója során a görbék illesztése a Michaelis-Menten egyenlet alapján, nemlineáris regresszióval történt, míg a CNP-G7 foszforolízise (Δ) esetén a Haldane-egyenlet felhasználásával.

A Michaelis-állandó és a gátlási állandó (K_i), melyeket a szubsztrátgátlásra vonatkozó Haldane-egyenlettel határoztam meg, $K_M=2,3 \pm 0,6$ mM-nak és $K_i=23 \pm 7$ mM-nak adódott. Ezt követően vizsgáltam a CNP kromoforcsoport okozta szubsztrátgátlást a foszforolízis irányában, ITC

módszerrel, G7-et és foszfátot használva szubsztrátként. E kísérlet eredményeként azt kaptam, hogy 9 mM koncentrációjú CNP-re van szükség ahhoz, hogy az enzimreakció sebessége a felére csökkenjen ($IC_{50}=9$ mM). A CNP-G7 szubsztrátgátlásának oka az lehet, hogy az egyik szubsztrátmolekula G7 része bekötődik az aktív centrumba, míg a másik szubsztrátmolekula CNP csoportja nemkompetitív inhibitorként az enzim egy másik kötőhelyéhez kapcsolódik.

1.4. Két ismert glikogén foszforiláz inhibitor gátlási állandójának ITC-vel történő meghatározása révén igazoltam az újonnan kidolgozott aktivitásmérési módszer gátlásvizsgálatok kivitelezésére való alkalmasságát.

Az újonnan kidolgozott aktivitásmérési módszer gátlásvizsgálatokra való alkalmazhatóságának igazolása érdekében meghatároztam két ismert GF inhibitor (koffein és GTH) K_i értékét a reverzibilis reakció mindkét irányában. Ehhez első lépésként optimalizálni kellett a reakciókörülményeket, amit HPLC módszerrel végeztem, CNP-G7-et használva szubsztrátként. A puffer G-1-P és P_i koncentrációjának szisztematikus változtatásával biztosítottam, hogy csak az egyik irány domináljon. 10-szeres felesleg már biztosította a kívánt irányt. A termékek csúcsterületei csökkentek a GTH és a koffein jelenlétében.

Az ITC gátlásvizsgálatokhoz a GF enzim természetes szubsztrátját, vagyis a glikogént használtam. A kívánt reakció lejátszódását a puffer megfelelő G-1-P/ P_i tartalmával biztosítottam: 2,5 mM G-1-P/25 mM P_i arányt alkalmaztam a glikogén foszforolíziséhez, 25 mM G-1-P/2,5 mM P_i arányt pedig a glikogén lánchosszabbítási reakciójához. A maradék enzimaktivitásokat ábrázoltam az inhibitor koncentrációk függvényében, majd a kapott pontokra a Greco-Hakala-egyenlet alapján, nemlineáris regresszióval illesztett görbék segítségével a látszólagos gátlási állandókhoz (K_i^*) jutottam, mely értékekből ki tudtam számolni a K_i -t.

1.5. Megállapítottam, hogy a kompetitív inhibitor (GTH) esetében a gátlási állandók megegyeznek a glikogén foszforiláz által katalizált reverzibilis reakció két irányában. Ezzel ellentétben, a vegyes típusú gátlási mechanizmussal ható vegyületnél (koffein) a gátlási állandók eltérnek.

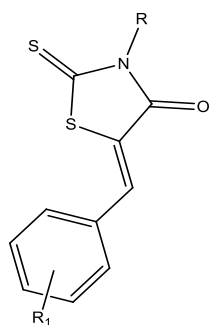
A GF-katalizálta reverzibilis reakció két különböző irányában kapott irodalmi értékek gyakran jelentősen eltérnek egymástól annak ellenére, hogy a gátlási állandóknak meg kellene egyezniük, hiszen a K_i az enzim-inhibitor komplex disszociációs állandójának felel meg. A koffein esetében, mely a GF purin nukleotid kötőhelyéhez kapcsolódó inhibitor, a K_i^* $1,9 \pm 0,1$ mM lett a glikogénszintézis irányában, míg $4,0 \pm 0,3$ mM a lebontási reakcióban. A tisztán nemkompetitív inhibitoroknál, mint például a koffeinnél, a $K_i^*=K_i$. A szintézis és lebontás irányú K_i -k közti eltérés oka, hogy a koffein nem képes nagy affinitással kötődni a GF enzimhez, márpedig az illesztéshez alkalmazott Greco-Hakala egyenlet elsősorban a szorosán kötődő inhibitorokra érvényes. A szubsztráttal kompetitív módon bekötődő, glükózanalóg inhibitor, vagyis a GTH ITC vizsgálatok kapott K_i -k már sokkal jobb egyezést mutattak. A K_i^* $48,9 \pm 4,1$ μ M volt a szintézis esetén, míg $59,9 \pm 3,2$ μ M a lebontási reakcióban. A K_i^*

értékekből számított K_i -k a glikogénszintézis irányában 11,5 μM , míg a glikogénlebontás során 13,8 μM lett.

A kompetitív inhibitornál (GTH) az egymással ellentétes irányú folyamatokban meghatározott közel azonos K_i érték jó összhangban van azzal, hogy e gátlástípus során egyetlen enzim-inhibitor komplex jön létre, melyet egy jól-definiált gátlási állandó jellemez. A vegyes típusú gátlás esetén (koffein) azonban a gátlószer nemcsak a szabad enzimhez, hanem az enzim-szubsztrát komplexhez is hozzá tud kapcsolódni. Mivel ekkor két inhibitor komplex is keletkezik, ezért a gátlás leírásához két különböző gátlási állandóra van szükség. A GF által katalizált reverzibilis reakcióban a szubsztrátok eltérnek a lebontás, illetve a szintézis irányú reakcióban, ami négy különböző gátlási állandót eredményez. Még ha az összes mikroszkópikus disszociációs állandó meg is egyezik a szintézis és a lebontási reakcióban, az azokból adódó makroszkópikus állandók eltérhetnek, ami az egyes irányok esetében kapott gátlási állandók közti különbséghez vezethet.

2. Két természetes és hét szintetikus eredetű, antihyperglükémiás aktivitással rendelkező inhibitor promiszkuitásának háttérében álló molekuláris mechanizmust határoztam meg.

Eltérő szubsztituáltságú, szintetikus eredetű 2-tioxo-4-tiazolidinonszármazékok (2. ábra) promiszkuis jellegét, illetve aggregációra való hajlamát tanulmányoztam közvetett és közvetlen módszerekkel.



Vegyület száma	R	R ₁
1	CH ₂ COOH	3-OCH ₂ CONH ₂
2	CH ₂ COOH	4-OCH ₂ CONH ₂
3	CH ₂ COOH	3-OCH ₃ , 4-OCH ₂ CONH ₂
4	CH ₂ COOH	4-OCH ₃ , 3-OCH ₂ CONH ₂
5	CH ₂ COOH	4-OCH ₂ C ₆ H ₅
6	CH ₂ COOH	3-OCH ₂ C ₆ H ₅
7	H	4-OC ₆ H ₅

2. ábra: A vizsgált hét 2-tioxo-4-tiazolidinonszármazékok szerkezete

E tiazolidinonszármazékok alapvázát a rodanin képezi, mely már számos esetben eredményezte a kifejlesztett inhibitorok promiszkuis, aggregációalapú gátló sajátosságát. Emiatt feltételeztem, hogy a vizsgált tiazolidinonszármazékok mindegyike AAI. Mivel azonban a szerkezeti módosítások lehetővé tehetik az aggregáció bekövetkezését okozó tényezők kiküszöbölését, kísérleti úton győződtem meg arról, hogy az alapváz hatása maradt-e a domináns.

A közvetett stratégia értelmében azt vizsgáltam, hogy mely vegyületek teljesítik az AAI-kal szembeni kritériumokat, vagyis a detergens jelenlétére, az enzim-inhibitor előinkubálásra, a célenzim koncentrációjának változtatására és a centrifugálásra való érzékenységet. A közvetlen stratégia alkalmazásával pedig a kolloidméretű részecskék jelenlétét és a részecskeméretben bekövetkező változásokat mutattam ki DLS módszerrel.

Az AAG bizonyításához PPA-t alkalmaztam modellenzimként, míg GalG₂CNP-t szubsztrátként. A közvetett stratégia (promiszkuis AAI-kal szembeni feltételek teljesülésének vizsgálata) szerint megvalósított kísérletekhez elsődlegesen UV-VIS spektrofotometriát használtam, melyet ITC mérésekkel egészítettem ki. A közvetlen stratégia során DLS módszert alkalmaztam az inhibitor- és enzim-molekulák méretében bekövetkező változás időbeli követésére.

Kontrollvegyületekként akarbózt és egy gallotannint használtam. Miután az akarbóz egy kereskedelmi forgalomban kapható antidiabetikum, feltételezhető volt annak specifikus jellege, mely ilyen módon kiválóan alkalmazható negatív kontrollként. Pozitív kontrollként egy hatékony α -amiláz gátlószerként ismert másodlagos növényi metabolitot, egy tannint választottam. Polifenolos szerkezete és számos ismert biológiai hatása miatt úgy gondoltam, hogy a vizsgált aleppóitölgly-eredetű gallotannin az AAI-k egyik képviselője.

2.1 Hét, vízben rosszul oldódó, hidrofób karakterű tiazolidinonszármazék promiszkuis jellegét bizonyítottam be az α -glükozidáz és α -amiláz enzimeken kifejtett gátló hatásuk kimutatása révén.

Mivel az AAG egyik legkorábbi figyelmeztető jele a promiszkuitás, vagyis a specificitás hiánya, először azt vizsgáltam, hogy az inhibitorok képesek-e szignifikáns gátló hatást kifejteni különféle enzimeken. Számos közlemény található az akarbóz és a gallotanninok különböző enzimekkel szembeni gátló aktivitásáról, ezért e két vegyületet a szakirodalmi adatok felhasználásával ítélem promiszkuisnak. A szintetikus eredetű tiazolidinonszármazékok aldóz reductáz és protein tirozin foszfatáz-1B enzimmel szembeni gátló hatásáról szintén található publikáció a szakirodalomban, mely eredményeket a PPA és az α -glükozidáz esetében elvégzett gátlásvizsgálatokkal egészítettem ki. A spektrofotometriás módszerrel általam kivitelezett gátlásvizsgálatok során kapott IC_{50} értékeket és az irodalmi adatokat a 2. táblázatban tüntettem fel.

2. táblázat: Az 1-7 tiazolidinonszármazék különféle mechanizmussal és/vagy funkcióval rendelkező enzimeken kifejtett gátló aktivitása

Vegyület száma	IC ₅₀ (μM)*			
	PPA	α-glükozidáz	aldóz reduktáz ¹	protein tirozin foszfatáz-1B ¹
1	194 ±3	208 ±3	0,06	717
2	96,4 ±1,7	89,6 ±2	0,2	max. 10% gátlás
3	96,9 ±1,8	100 ±2	0,2	378
4	66,2 ±0,3	62,1 ±1,2	0,1	679
5	294 ±5	max. 21% gátlás (102 μM [I] esetén)	0,05	56
6	max. 23% gátlás (193 μM [I] esetén)	141 ±5	0,05	43,1
7	rendellenes viselkedés	max. 25% gátlás (211 μM [I] esetén)	0,06	63,9

*: Az IC₅₀ értékek átlag ± illesztési hiba formájában vannak feltüntetve

Még ha a hasonló mechanizmusuk és funkciójuk miatt a PPA-t és az α-glükozidázt egyetlen csoportként is kezeltem, a hétből öt vegyület (**1**, **3**, **4**, **5**, **6**) akkor is egyértelműen promiszkuis AAI-nek tekinthető a három egymástól eltérő enzimen kifejtett jelentős gátló hatásuk miatt. Habár a 2-es és 7-es származék teljesítette a promiszkuitás kritériumát, vagyis képesek voltak több enzimet is gátolni, a promiszkuis AAI-kel szemben állított követelménynek (legalább 3, egymástól jelentősen eltérő enzim gátlása) nem tettek egyértelműen eleget.

2.2 Az akarbóz és az **1**, **3**, **4** vegyületek esetében igazoltam, hogy promiszkuis jellegük ellenére nem tekinthetők aggregációalapú inhibitoroknak.

Az AAI-k közvetett stratégia szerinti azonosításához megismételtem az eredeti gátlásvizsgálatokat 0,01% Triton X-100 nemionos detergens alkalmazásával, 5, 10 és 30 perces enzim-inhibitor előinkubálást, a PPA koncentrációjának módosítását, illetve az inhibitor pufferes oldatának centrifugálását követően. Az akarbóz (negatív kontroll), valamint az **1**-es, **3**-as és **4**-es tiazolidinonszármazék gátló aktivitására a reakciókörülmények változtatása semmilyen hatást sem gyakorolt. DLS módszer segítségével alátámasztottam és kiegészítettem az AAG közvetett stratégia szerinti azonosításakor kapott eredményeimet. Az intenzitás szerinti részecskeméret-eloszlás, a polidiszperzitás index és a fotonbeütésszám alapján közvetlen bizonyítékot nyertem arra nézve, hogy e négy vegyület specifikusan fejti ki a gátló hatását. Különböző időpontokban vizsgáltam az inhibítormolekulák, valamint az enzimmolekulák méretét. Az akarbóz esetében még fél óra után sem volt jelen detektálható részecske, és a PPA méretében sem következett be változás. Az **1**-es, **3**-as és **4**-es vegyületeknél viszont kimutattam, hogy az inhibítormolekulák kismértékű aggregálódáson mennek keresztül (~120 nm átlagos

¹ Maccari R, Del Corso A, Paoli P, Adornato I, Lori G, Balestri F, Cappiello M, Naß A, Wolber G, Ottanà R. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2018; 28: 3712-3720.

részecskeméret), bár a teljes mérési idő alatt nem következett be változás az aggregátum méretében. Azonban a gyenge aggregálódás ellenére sem tekinthető az aggregátum az aktív gátló részecskének, ugyanis a reakciókörülmények változtatása semmilyen hatást sem gyakorolt e három tiazolidinon gátló aktivitására. Ennek megfelelően, e három inhibitor esetében egyetlen enzim-inhibitor komplex kialakulásával járó, specifikus enzimgátlási mechanizmust feltételeztem.

2.3 Az aggregációalapú inhibitorok közvetett módszerrel történő azonosítása során bebizonyítottam a gallotannin és a 2, 5, 6, 7 vegyületek időfüggő gátló hatását, a detergenssel, centrifugálással és a célenzim koncentrációjának változtatásával szembeni érzékenységet. Továbbá dinamikus fényszórásméréssel kimutattam az aggregátumok jelenlétét, illetve azt, hogy az inhibitor- vagy az enzimmolekulák aggregálódása következett-e be.

A promiszkuis AAI-kal szembeni feltételek (detergenssel, enzim-inhibitor előinkubálással, a célenzim koncentrációjának változtatásával és a centrifugálással szembeni érzékenység) teljesülésének vizsgálatát követően bebizonyítottam a gallotannin (pozitív kontroll), a 2-es, 5-ös, 6-os és 7-es tiazolidinonvegyület gátló hatásának reakciókörülményektől való függését. A reakciókörülmény-módosításoknak az egyes inhibitorok gátló aktivitására kifejtett hatását a 3. táblázatban foglaltam össze.

3. táblázat: A gallotannin és a 2, 5, 6, 7 tiazolidinonszármazék gátló aktivitásában a reakciókörülmények módosításának hatására bekövetkező változások mértéke és iránya

	Detergens jelenléte	Enzim-inhibitor előinkubálás	Többszörös enzimkoncentráció alkalmazása	Inhibitoroldat centrifugálása
Tannin	50-szeres gátlásromlás	4-szeres gátlásjavulás	10-szeres gátlásromlás	14-szeres gátlásjavulás
2	1,3-szeres gátlásromlás	gátlás teljes megszűnése	1,8-szeres gátlásromlás	gátlás teljes megszűnése
5	3,3-szeres gátlásjavulás	1,6-szeres gátlásjavulás	nincs változás	gátlás teljes megszűnése
6	1,8-szeres gátlásjavulás	2,5-szeres gátlásromlás	1,5-szeres gátlásromlás	gátlás teljes megszűnése
7	1,4-szeres gátlásjavulás	40-szeres gátlásromlás	mérhető gátlás	gátlás teljes megszűnése

A tannin DLS vizsgálatát követően megállapítottam, hogy a szakirodalmi hipotézissel ellentétben, miszerint a gallotanninok a fehérjeaggregáció előidőzésén keresztül fejtik ki hatásukat, az aggregálódott inhibitorokmolekulák az aktív gátló részecskék: szignifikáns növekedés mutatkozott (a 2,2 nm átmérőjű monomer >5000 nm méretűre nőtt 30 perc alatt) a tanninmolekula méretében, miközben az enzim mérete változatlan maradt. A 2-es és 6-os tiazolidinonszármazéknál hasonló eredményre jutottam, mint az 1-es, 3-as és 4-es vegyületnél: az átlagosan 100-200 nm inhibitorokmolekulák méretében nem tapasztaltam változást 20 perc elteltével sem. Az 5-ös és 7-es inhibitoroknál, valamint a tanninnál viszont a részecskeméret

jelentősen nőtt. Az 5-ös származék esetében 509 nm \pm 93, a 7-es vegyületnél 758 nm \pm 136, míg a tanninnál 4886 nm \pm 680 méretű inhibítormolekulákat detektáltam. Tehát e három esetben az egyedi inhibítormolekulák aggregálódása következett be. Enzimaggregációt két gátlószer tudott előidézni: a 6-os és a 7-es tiazolidinonvegyület. 20 perc mérési idő után az előbbinél három csúcs jelent meg (1. csúcs: 23,5 nm \pm 0,8; 2. csúcs: 70,7 nm \pm 3,7; 3. csúcs: 404 nm \pm 9,3), míg az utóbbinál 1039 nm \pm 52 átmérőjű aggregátum volt jelen a vegyület pufferes oldatában.

2.4 A közvetett és közvetlen módszerekkel végzett vizsgálatok eredményeinek összevetésével meghatároztam az aggregátumok méretét, kialakulásának gyorsaságát, illetve a gátlásban való részvételük módját.

Bebizonyítottam, hogy az akarbóz specifikus, nem aggregációalapú mechanizmus alapján fejti ki gátló hatását, ugyanis nem teljesítette az AAI-kal szembeni követelmények egyikét sem, és a DLS vizsgálatok során sem tudtam nanoméretű részecskéket kimutatni. Ugyanerre a következtetésre jutottam az 1-es, 3-as és 4-es tiazolidinonszármazék esetében is annak ellenére, hogy a DLS kísérletek rámutattak e vegyületek kismértékű aggregálódására.

A gallotanninok esetében igazoltam, hogy az egyedi inhibítormolekulák több ezer nanométeres aggregátumot hoznak létre, mely nemspecifikus módon, adszorpciós mechanizmussal vesz részt az enzimgátlásban. A két alkalmazott módszer összevetésével megállapítottam, hogy az aggregálódás folyamata lassan ment végbe; 30 percre volt szükség ahhoz, hogy a több ezer nanométeres aggregátum kialakulhasson, ami magyarázza a 30 perces enzim-inhibitor előinkubálás okozta jelentős gátlásjavulást (60-szor nagyobb felület sokkal több enzimet képes adszorbeálni). Továbbá a detergens hatásának vizsgálata során kapott eredmények alapján rávilágítottam, hogy az egyedi tanninmolekulák specifikus kötődése nagyobb mértékű gátlást tud kiváltani, mint az aggregátum adszorpciós mechanizmusa. A 2-es származék méretét tekintve ugyan nem tért el jelentősen a 1-es, 3-as és 4-es tiazolidinonvegyülettől, azonban az AAI-k valamennyi kritériumának eleget tett, ami arra utal, hogy az aggregátum az aktív gátló részecske. A közvetett és közvetlen módszerek eredményeinek összevetésével az is megállapítható, hogy csak körülbelül 63-163 nm közötti mérettartományban képes az inhibitoraggregátum kifejteni hatását. Az 5-ös vegyület DLS vizsgálata értelmében a mintaelőkészítéshez szükséges néhány perc is elegendő az aggregálódás teljes végbemeneteléséhez; már az első mérés során több mint 500 nm átmérőjű aggregátumot detektáltam, ami a következő 20 percben nem mutatott további növekedést. Ez az eredmény alátámasztja a közvetlen módszerrel tapasztalt változásokat: 5 perc enzim-inhibitor előinkubálás után sokkal kisebb lett az IC_{50} érték, ami viszont azt követően nem módosult tovább, vagyis az aggregátumképződés mindkét módszer értelmében rendkívül gyorsan ment végbe. A 6-szoros enzimfelesleg alkalmazásának elégtelensége pedig összefüggésbe hozható az aggregátum 500 nm feletti méretével, ami nagy adszorpciós felületet tud biztosítani. A 6-os tiazolidinonszármazéknál nem az egyedi inhibítormolekulák összekapcsolódása, hanem a fehérjemolekulák aggregációja következett be. A PPA koncentrációjának növelése, illetve a 30 perc enzim-inhibitor előinkubálás hatására bekövetkező gátlásromlás a nagyméretű enzimaggregátumok nagyobb aktivitásra vezethető vissza. A 7-es származék esetében az egyedi

inhibitormolekulák által képzett aggregátum tekinthető a gátlásban résztvevő aktív részecskének, mely kolloidméretű részecske az enzim aggregálódását is előidézi. Mindezek alapján elmondható, hogy valamennyi tiazolidinonszármazék keresztülment kisebb-nagyobb mértékű aggregálódáson, mely folyamat rendkívül gyorsan (a mintaelőkészítéshez szükséges néhány perc alatt) ment végbe. Az aggregátumok mérete, típusa és gátlásban való részvétele eltért az egyes inhibitoroknál.

IV. Az eredmények hasznosításának lehetőségei

A doktori munkám során kidolgozott új aktivitásmérési módszer nemcsak a glikogén foszforiláz enzim által katalizált reverzibilis reakció azonos reakciókörülmények közötti vizsgálatára ad lehetőséget, hanem más, szintén megfordítható folyamatot katalizáló enzimek aktivitásának mérésére és energetikai hátterének megismerésére is. Ezzel a módszerrel az ellentétes irányú folyamatokban kapott gátlási paraméterek összevethetővé válnak, és eldönthető, hogy a nemfiziológiás irányban történő vizsgálatok eredményei gyógyászati szempontból relevánsak-e.

A kutatásom másik fő területe, vagyis a promiszkuis glikoenzim-inhibitorok aggregálódásra való hajlamának vizsgálata, szintén számos olyan eredménnyel szolgált, mely elősegítheti más kutatócsoportok antidiabetikus szerek utáni kutatásának hatékonyságát.

Bemutattam, hogy az alapváz előzetes vizsgálatával helyesen következtethetünk egy inhibitor aggregálódásra való hajlamára, mely aggregáción alapuló nonspecifikus gátló mechanizmus megszünteti egy vegyület gyógyszerjelöltként való alkalmasságát. Továbbá a tiazolidinonszármazékokkal és a gallotanninnal végzett kísérleteim tapasztalatai hozzájárulhatnak az olyan szoftverek adatbázisának kiegészítéséhez, melyek meghatározott paraméterek és a korábban aggregátornak ítélt vegyületekkel való összevetés révén jósolják meg egy adott inhibitor aggregálódásra való hajlamát (pl. *Aggregator Advisor*).

A gyógyszer-promiszkuitás vizsgálatával foglalkozó szakemberek között nincs egyetértés azzal kapcsolatosan, hogy a hidrofóbicitás mértéke összefüggésbe hozható-e az aggregálódásra való hajlammal. A szakirodalomban fellelhető legtöbb publikációban arról számolnak be, hogy egy vegyület hidrofób jellegének növekedésével arányosan nő az aggregációalapú gátló mechanizmus valószínűsége. Kutatásom eredményei viszont azt támasztják alá, hogy a hidrofóbicitás mértékéből nem lehet pontosan megjósolni egy inhibitor aggregálódásra való hajlamát. Az *Aggregator Advisor* szoftver által megbecsült, a hidrofóbicitás mértékére utaló $\log P$ értékek alapján a kilenc kiválasztott inhibitor (akarbóz, gallotannin, tiazolidinonszármazékok) közül csak az egyiknél állt fent az aggregálódás esélye. Az akarbózon kívül azonban valamennyi inhibitornál kimutattam kisebb-nagyobb mértékű aggregációt annak ellenére, hogy valamelyik vegyület negatív $\log P$ -vel rendelkezett, vagyis csak csekély mértékben volt hidrofób.

Végül, de nem utolsó sorban, rávilágítottam arra, hogy pontatlan az aggregációalapú inhibitorokkal szemben állított azon szakirodalmi követelmény, miszerint detergens jelenlétében a vegyület gátló hatásának jelentősen romlania kell. Helyesebb azt a megfogalmazást használni, hogy a gátló aktivitás megváltozik detergens jelenlétében. Egy detergens ugyanis csak abban az esetben eredményez gátlásromlást, ha az egyedi inhibitormolekula kisebb mértékű aktivitáscsökkenést vált ki, mint az aggregátum adszorpció mechanizmusa.

Tudományos eredmények

Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények

1. Gábor Lehoczki, Kármén Szabó, Lili Kandra, Gyöngyi Gyémánt: **Inhibition studies on α -amylase using isothermal titration calorimetry.**

Amylase, **2018**; 2: 11-16. DOI:10.1515/amylase-2018-0002

2. Kármén Szabó, Lili Kandra, Gyöngyi Gyémánt: **Studies on the reversible enzyme reaction of rabbit muscle glycogen phosphorylase b using isothermal titration calorimetry.**

Carbohydrate Research, **2019**; 477: 58-65. DOI: 10.1016/j.carres.2019.03.014 (IF (2018): 1,873)

3. Kármén Szabó, Csaba Hámori, Gyöngyi Gyémánt: **Gallotannins are Non-Specific Inhibitors of α -Amylase: Aggregates are the Active Species taking part in Inhibition.**

Chemical Biology & Drug Design, **2020**. (IF (2018): 2,256)

További közlemények

1. Gábor Lehoczki, Kármén Szabó, István Takács, Lili Kandra, Gyöngyi Gyémánt: **Simple ITC method for activity and inhibition studies on human salivary α -amylase.**

Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, **2016**; 6: 1648-1653. DOI:10.3109/14756366.2016.1161619 (IF (2018): 4,027)

Az értekezés témájához kapcsolódó előadások

1. Lehoczki Gábor, Szabó Kármén, Takács István, Gyémánt Gyöngyi: **Gyors ITC módszer enzimreakciók vizsgálatához.**

Doctoral Workshop, 2015. október 10-11, Pécs

2. Szabó Kármén, Gyémánt Gyöngyi: **Új ITC aktivitásmérési módszer a glikogén foszforiláz katalizálta reverzibilis reakció követésére.**

Professzorok az Európai Magyarországért Egyesület által szervezett XVII. PhD-Konferencia, 2018. november 15, Budapest

3. Szabó Kármén, Hámori Csaba, Gyémánt Gyöngyi: **Új ITC-alapú módszer kidolgozása a glikogén foszforiláz enzim aktivitásának méréséhez.**

I. FKF Szimpózium, 2019. április 3-5, Debrecen

4. Szabó Kármén, Gyémánt Gyöngyi: **Potenciális glikoenzim-inhibitorok aggregálódásra való hajlamának vizsgálata.**

XXII. Tavaszi Szél Konferencia, 2019. május 3-5, Debrecen

(Kémiai és környezettudományi szekció, Biokémia és orvosi kémia alszekció I. helyezés)

Az értekezés témájához kapcsolódó poszterek

1. Erika Fazekas, Gabriella Kis, Kármén Szabó, Gyöngyi Gyémánt: **New method for the activity measurement of glycogen phosphorylase b.**

13th International Symposium and Summer School on Bioanalysis (ISSSB), 2013. június 27-július 7, Debrecen

2. Kármén Szabó, Csaba Hámori, Gyöngyi Gyémánt: **Activity and inhibition studies on rabbit muscle glycogen phosphorylase b using isothermal titration calorimetry.**

5th EFMC Young Medicinal Chemist Symposium, 2018. szeptember 6-7, Ljubljana, Szlovénia

3. Ilenia Adornato, Kármén Szabó, Jérémie Mortier, Gerhard Wolber, Rosaria Ottanà, Rosanna Maccari: **Evaluation of 4-thiazolidinone derivatives as alpha-amylase inhibitors.**

5th EFMC Young Medicinal Chemist Symposium, 2018. szeptember 6-7, Ljubljana, Szlovénia

4. Kármén Szabó, Gyöngyi Gyémánt: **Study on the aggregation tendency of known glycoenzyme inhibitors.**

13th Carbohydrate Bioengineering Meeting, 2019. május 19-22, Toulouse, Franciaország

5. Kármén Szabó, Csaba Hámori, Gyöngyi Gyémánt: **Study on the Aggregation Tendency of Tannins - or are Tannins Specific α - Amylase Inhibitors?**

7th Symposium on the Alpha-Amylase Family (ALAMY_7), 2019. szeptember 29-október 3, Smolenice, Szlovákia

6. Kármén Szabó, Gyöngyi Gyémánt: **Study on the promiscuous nature and aggregation-tendency of 4-thiazolidinone derivatives.**

21st International Conference and Exhibition on Pharmaceutics & Novel Drug Delivery Systems, 2020. március 11-12, Róma, Olaszország

ISBN-számmal rendelkező, lektorált, szerkesztett konferenciakötetben megjelent tanulmányok

1. Szabó Kámen, Gyémánt Gyöngyi: **Új ITC aktivitásmérési módszer a glikogén foszforiláz katalizálta reverzibilis reakció követésére.**

Professzorok az Európai Magyarországért Egyesület, Budapest, 2018. 118-128. oldal.

Szerkesztette: Dr. Koncz István, Szova Ilona. ISBN 978-615-5709-05-0118-128

2. Szabó Kármén, Gyémánt Gyöngyi: **Potenciális glikoenzim- inhibitorok aggregálódásra való hajlamának vizsgálata.**

Doktoranduszok Országos Szövetsége, Budapest, 2020. 105-116. oldal. Szerkesztette: Bihari Erika, Molnár Dániel, Szikszai-Németh Ketrin. ISBN 978-615-5586-61-3



Nyilvántartási szám: DEENK/252/2020.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Nagy-Szabó Kármén Annamária
Doktori Iskola: Kémiai Tudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10058551

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

Idégen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (3)

1. **Nagy-Szabó, K. A.**, Hámori, C., Gyémánt, G.: Gallotannins are Non-Specific Inhibitors of α -Amylase: Aggregates are the Active Species taking part in Inhibition.
Chem. Biol. Drug Des. "Accepted by Publisher", 1-28, 2020. ISSN: 1747-0277.
IF: 2.548 (2019)
2. **Nagy-Szabó, K. A.**, Kandra, L., Gyémánt, G.: Studies on the reversible enzyme reaction of rabbit muscle glycogen phosphorylase b using isothermal titration calorimetry.
Carbohydr. Res. 477, 58-65, 2019. ISSN: 0008-6215.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2019.03.014>
IF: 1.841
3. Lehoczki, G., **Nagy-Szabó, K. A.**, Kandra, L., Gyémánt, G.: Inhibition studies on α -amylase using isothermal titration calorimetry.
Amylase. 2 (1), 11-16, 2018. EISSN: 2450-9728.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1515/amylase-2018-0002>

Magyar nyelvű konferencia közlemények (2)

4. **Nagy-Szabó, K. A.**: Potenciális glikoenzim-inhibitorok aggregálódásra való hajlamának vizsgálata.
In: Tavasz Szél = Spring Wind 2019 : Tanulmánykötet. Szerk.: Bihari Erika, Molnár Dániel, Szikszai-Németh Ketrin, Doktoranduszok Országos Szövetsége, Budapest, 105-116, 2020.
ISBN: 9786155586613
5. **Nagy-Szabó, K. A.**: Új ITC aktivitásmérési módszer a glikogén foszforiláz katalizálta reverzibilis reakció követésére.
In: A 15 éves PEME XVII. PhD-konferenciájának előadásai. Szerk.: Koncz István, Szova Ilona, Professzorok az Európai Magyarorszáért Egyesület, Budapest, 118-128, 2018. ISBN: 9786155709050





További közlemények

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (1)

6. Lehoczki, G., **Nagy-Szabó, K. A.**, Takács, I., Kandra, L., Gyémánt, G.: Simple ITC method for activity and inhibition studies on human salivary α -amylase.

J. Enzym. Inhib. Med. Chem. 31 (6), 1648-1653, 2016. ISSN: 1475-6366.

DOI: <http://dx.doi.org/10.3109/14756366.2016.1161619>

IF: 4.293

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 8,682

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
4,389**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2020.08.31.

