

Egyetemi doktori (PhD) értekezés téziseinek tervezete

**FEHÉRJÉK ÉS SZÉNHIDRÁTOK KÖLCSÖNHATÁSAINAK ÉS REAKCIÓINAK
VIZSGÁLATA IZOTERMIKUS TITRÁCIÓS KALORIMETRIÁVAL**

Lehoczki Gábor

Témavezető: Dr. Gyémánt Gyöngyi



DEBRECENI EGYETEM
Kémiai Doktori Iskola

Debrecen, 2017.

I. Bevezetés, célkitűzések

Az Debreceni Egyetem Biológiai és Kémiai Intézetében nagy múltra tekint vissza a szénhidrátok, illetve a szénhidrátokon ható enzimek tanulmányozása. Kutatócsoportunkban olyan enzimek *in vitro* vizsgálata folyik, melyek aktivitásának célzott megváltoztatása a jövőben a cukorbetegség és elhízás prevenciójában és/vagy terápiájában is hasznos lehet. Ennek megfelelően a doktori disszertációmban leírt tudományos eredmények is ebben a témakörben születtek.

A műszeres analitika folyamatos fejlődésének eredményeképpen az olyan klasszikusnak számító módszerek, mint a kalorimetria újra elterjedőben vannak. Lavoisier első, jégből készített kaloriméterétől hosszú út vezetett a mai modern, automatizálható mikrokaloriméterek kifejlesztéséig, melyek kis térfogatban képesek detektálni a fizikai-kémiai reakciók folyamán bekövetkező legkisebb hőváltozásokat is. Napjainkban a kalorimetria fő alkalmazási területe a molekuláris interakciók vizsgálata, de emellett alkalmazzák enzimkinetikai vizsgálatokhoz és élő sejtek anyagcseréjének vizsgálatára. Az izotermális titrációs kalorimetria (ITC) izoterm körülmények között méri az egyes titrálások során adagolt, és egy adiabatikus testben található mérőcellában lévő komponensek között kialakuló kölcsönhatás során bekövetkező hőváltozást, $\pm 0,001^\circ\text{C}$ pontossággal. Mivel minden fizikai és kémiai változást hőváltozás kísér, az ITC univerzális detektornak tekinthető. Optimális körülmények között a kötődési vizsgálatok eredményeképpen a reakció termodinamikai paraméterei (ΔH , ΔG , ΔS) mellett a reakció sztöchiometriája (n) és a kötődés erőssége (K_a , K_d) is megállapítható, az enzimkinetikai vizsgálatoknál K_M és v_{max} kalkulálható.

Enzimkinetikai vizsgálatokra több ITC alapú módszert is fejlesztettek, melyeknél az egyszeres vagy többszörös injektálással kapott izotermákat más-más szempontok szerint értékelik ki. Ezek a módszerek azonban, például rosszul oldódó szubsztrátok alkalmazása esetében nem szolgáltatnak megfelelő információkat. Abban az esetben, ha korlátozott mennyiségű minta (enzim, szubsztrát vagy inhibitor) áll rendelkezésre a módszerek hosszas optimalizálása további korlátja lehet a sikeres méréseknek.

Kutatásunk során egy olyan, enzim vizsgálatokra univerzálisan alkalmazható ITC alapú módszert szerettünk volna kifejleszteni az irodalomban található egyszeres és többszörös injektálási módszerek előnyös tulajdonságainak kombinálásával, ami az említett hiányosságokat kiküszöböli, emellett gazdaságosan alkalmazható mind kinetikai, mind gátlási vizsgálatokhoz. A vizsgálatokhoz egy jól ismert reakciót, a humán-nyál α -amiláz katalizálta hidrolízis reakciót használtuk modellként. A kidolgozott módszer univerzalitásának tesztelésére olyan méréseket terveztünk, amelyek más módszerekkel nehezen vagy egyáltalán nem kivitelezhetők.

A módszerfejlesztés mellett szerettük volna kihasználni az ITC „hagyományos” felhasználási módját is, fehérjék és szénhidrátok interakcióinak vizsgálatára, valamint az enzimes mérések során vizsgált vegyületek kötődési tulajdonságainak meghatározására.

II. Alkalmazott eszközök és módszerek

A vizsgált enzimeket és szubsztrátokat a Sigma-Aldrichtól (St. Louis, MO, USA) és a Serva-tól (Heidelberg, Germany) szereztük be, míg a Pektinex Ultra AFP ipari enzimekszítmény Novozyme termék. Mivel a megvásárolható sertés hasnyálmirigy α -amiláz (PPA) viszonylag sok szennyezőt tartalmaz, illetve a humán nyál α -amiláz (HSA) ammónium-szulfáttal van stabilizálva, ezeket az enzimeket felhasználás előtt Amicon 30K (Millipore, MA, USA) centrifugális szűrővel tisztítottuk.

Az ITC vizsgálatok során MicroCal ITC₂₀₀ (Northampton, MA, USA) mikrokalorimétert használtunk, mely 204 μ l térfogatú mintacellával és egy 40 μ l térfogatú injektorral rendelkezik. A kapott izotermákat az Origin program ITC-hez készített bővítménye segítségével értékeltük ki.

Az ITC-vel kapott eredmények igazolásához, 2-klór-4-nitrofenil-4-O- β -D-galaktopiranozil-maltozid (GalG₂CNP) és CNP-maltoheptaoid (CNP-G₇) szubsztrátok felhasználásával párhuzamos méréseket végeztünk HPLC-vel és spektrofotometriával. Szintén spektrofotometriás mérésekkel történt a berlini Freie Universitát-en dolgozó partnereinknél számítógépes modellezéssel kiválasztott vegyületek gátlási vizsgálatainak első köre. A folyadékkromatográfiás mérésekhez manuális mintaadagolóval, gázmentesítő modullal és diódasoros detektorral felszerelt Agilent Infinity HPLC (Agilent, Santa Clara, CA) rendszert használtunk. A kinetikai adatokat a kromatogramok kiértékelése során, a keletkező fő termék csúcs alatti területének változásából nyertük. A spektrofotometriás méréseket Jasco V550 (Jasco Co., Easton, MD, USA) kétsugaras, termosztálható spektrofotométeren végeztük, 37 °C hőmérsékleten, 400 nm hullámhosszon GalG₂CNP (Sorachim SA, Lausanne, Switzerland) szubsztrát alkalmazásával. A kezdeti reakciósebességeket a kinetikai görbe kezdeti lineáris szakaszára illesztett egyenes meredekségéből határoztuk meg Jasco Spectra Manager szoftver segítségével. A kinetikai és IC₅₀ görbéket Grafit (Erithacus Software Ltd, Horley, UK) és Origin (Northampton, MA, USA) programok segítségével illesztettük.

A gyógy- és fűszernövényekkel végzett gátlási vizsgálatokhoz a szárított növényi részeket a Herbária Kft.-től szereztük be. Az elkészített vizes extraktumok összetételét MALDI-TOF (Bruker, MA, USA) mérésekkel vizsgáltuk. A növények vízdoldható antioxidáns kapacitását ACW módszerrel, PHOTOCHEM[®] készülékkel (Analytik Jena AG, Jena, Germany) határoztuk meg, melyhez a gyártó által biztosított ACW kiteket használtuk. A mérések során kapott görbéket a PCLsoft (Analytik Jena AG, Jena, Germany) szoftverrel értékeltük ki.

III. Új tudományos eredmények

1. Meghatároztam különböző antigén-antitest, makromolekula-ligand és enzim-inhibitor kölcsönhatások erősségét, sztöchiometriáját és főbb termodinamikai paramétereit izotermális titrációs kalorimetria alkalmazásával.

Az ITC „klasszikus” alkalmazása az egymással kölcsönhatásba lépő komponensek kötődési tulajdonságainak (kötődési állandó, sztöchiometria és termodinamikai paraméterek) meghatározása a reakció során tapasztalható hőváltozások detektálásából. A leggyakoribb alkalmazások közé tartoznak az antigén-antitest, makromolekula-ligand és receptor-ligand kölcsönhatások vizsgálatai.

1.1. ITC segítségével meghatároztam a humán szérum albumin és egy albumin specifikus antitest kötődésének sztöchiometriáját és asszociációs állandóját.

Az albumin az emberi szérumban legnagyobb koncentrációban jelen lévő fehérje. A szérumban lévő egyéb fehérjék és peptidek meghatározása során az albumin nagy koncentrációja jelentős zavaró hatással bír, amit az albumin hatékony és szelektív eltávolításával lehetne kiküszöbölni. Ennek érdekében olyan specifikus antitesteket termeltettek, melyek TiO_2 kromatográfiás töltethez kovalensen kötött formában képesek szelektíven eliminálni az albumint a szérummintából. Vizsgálatunk során kapilláris zónaelektroforézissel (CZE) és ITC-vel is meghatároztuk az antigén-antitest kötődés sztöchiometriáját, ami mindkét módszer esetében 1:2-nek adódott, vagyis egy antitest két albumint képes megkötni. Affinitás kapilláris elektroforézissel (ACE) és ITC-vel a két kötőhelyre kötődő albuminok disszociációs állandóit (K_d) határoztuk meg, melyek ACE esetében $4,45 \times 10^{-8}$ és $1,08 \times 10^{-7}$ M, míg az ITC esetében $2,74 \times 10^{-8}$ és $1,04 \times 10^{-7}$ M-nak adódtak.

1.2. Mérésekkel igazoltam egy véralvadásgátlóként alkalmazott szénhidrát származék és egy kationos γ -ciklodextrin származék kölcsönhatását, és jellemeztem a kötődést.

A fondaparinux egy, a klinikumban alkalmazott szintetikus, szelektív Xa faktor gátló, antikoaguláns pentaszacharid. A szervezetből történő kiürülése a veséken keresztül történik (féléletideje 17-21 óra), de bizonyos esetekben szükséges lehet az ennél gyorsabb eltávolítása. Ennek egyik lehetséges módja a ciklodextrinnel történő komplexálás, ami meggyorsítja a szervezetből való kiürülést. Kötődési vizsgálatok segítségével, ITC módszerrel vizsgáltam, hogy egy amin funkciós csoportokat tartalmazó kationos γ -ciklodextrin (γCD^+) képes-e megkötni a fondaparinuxot, meggyorsítva ezzel a szervezetből való kiürülést. A kapott disszociációs állandó ($K_d = 0,125 \pm 7$ mM) alapján a vizsgált γCD^+ képes ugyan megkötni a fondaparinuxot, de a kötés erőssége jelentősen elmarad a fondaparinux – Xa faktor közti kötődés

erősségétől ($K_D = 32 \text{ nM}$). A kötődést koncentráció függően tovább gyengíti a vérszérumban jelen lévő NaCl is, így a vizsgált kölcsönhatás a véráramban várhatóan nem fog létrejönni.

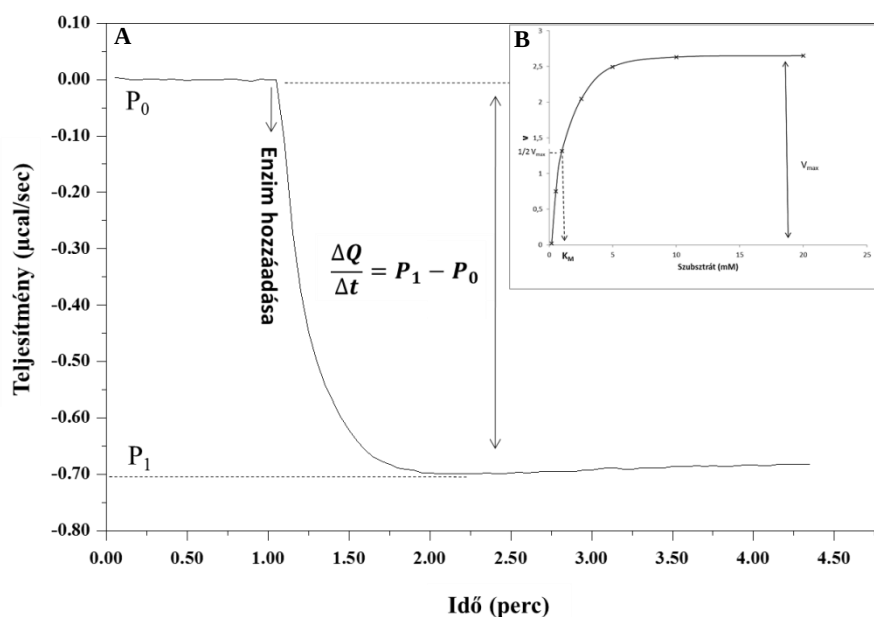
Vizsgáltam az ugyanolyan funkciós csoportokkal rendelkező maltoooktaóz (G_8^+) és a γ CD fondaparinux kötődését is, előbbi esetben csak gyengébb kölcsönhatást ($K_D = 3,57 \text{ mM}$) sikerült kimutatni, míg utóbbi esetben nem tapasztaltam kötődést. A kapott K_D értékek arra utalnak (1. táblázat), hogy a kötődéshez mind a γCD^+ felületén található ionos csoportokra, mind az apoláros karakterű belső üregre szükség van. A termodinamikai paraméterek alapján a γCD^+ fondaparinux kötése entalpia és entrópia vezérelt exoterm folyamat, melyben ionos és hidrofób kölcsönhatások, valamint deszolvatáció játszanak szerepet.

1. táblázat: A fondaparinux és a kationos oligoszacharidok disszociációs állandója és a kötődési termodinamikai paraméterei

	FP+ γCD^+	FP+ G_8^+	FP+ γCD
K_D (mM)	0,125	3,57	
ΔH(cal/mól)	-1686	-4422	Nem mérhető
-TΔS (cal/mól)	-3844	948	
ΔG (cal/mól)	-5530	-3473	

2. A korábbi izotermális titrációs kalorimetria (ITC) alapú módszerek előnyös tulajdonságainak kombinálásával kidolgoztam egy módszert, mely alkalmas enzimkinetikai és enzim gátlás vizsgálatok elvégzésére.

A korábban publikált ITC alapú módszerek, az egyszeres és többszörös injektálást alkalmazók egyaránt, túlságosan hosszadalmasak, nehezen optimalizálhatóak és az általuk szolgáltatott adatok kiértékelése is sokszor nehézkes. Ezeket a negatívumokat küszöböli ki az általam alkalmazott módszer, melynél egy injektálással, gyorsan lehetséges a kezdeti reakciósebesség meghatározása. A szakaszos mérés során, az enzim oldat egyszeri, kis térfogatú injektálása gazdaságossá teszi a mérést és az injektálás után rögtön meghatározható a reakciósebesség, így egy-egy mérés időtartama 2-3 perc (1. ábra).



1. ábra: A reakciósebesség meghatározására alkalmazott ITC módszer termogramja, kiértékelése és a K_M meghatározása (A). A belső képen (B?) HSA katalizálta maltoheptaóz hidrolízise során kapott pontokra illesztett Michaelis görbe látható.

Egy adott mérési feladat esetében a rendszer gyorsan optimalizálható egy egyszerű stratégiát követve. A tetszőleges számú különálló mérés eredményeire szoftveres görbe illesztéssel kaphatóak meg a kinetikai paraméterek, illetve gátlás vizsgálatok során az IC_{50} és/vagy K_i értékek.

2.1. HSA katalizálta hidrolízis reakciók segítségével meghatároztam a kinetikai mérésekre használható fő paraméter tartományokat.

Humán nyál α -amiláz (HSA) és maltoheptaóz, illetve keményítő rendszert vizsgálva meghatároztam az értékelhető és reprodukálható mérésekhez szükséges fő mérési paramétereket: injektált enzim mennyisége és koncentrációja, injektálás sebessége, a rendszer kevertetési sebessége, a mérés közben alkalmazott referencia teljesítmény. A paraméterek optimalizálásával egy gyors, gazdaságos és érzékeny módszert sikerült beállítani, ami széles körben alkalmazható olyan rendszerek esetében is, ami más módszerekkel nem vagy csak nehezen vizsgálható.

2.2. A módszer által szolgáltatott adatok pontosságát három független módszerrel és irodalmi adatokkal való összevetés segítségével igazoltam.

A módszer alkalmazásával kapott értékek helyességét párhuzamos spektrofotometriás és HPLC mérésekkel igazoltam, melyekhez CNP-G₇ és rövid GalG₂CNP szubsztrátot használtam. Az ITC-vel kapott értékek jó egyezést mutattak

a kontrollmérésekkel kapott és a szakirodalomban megtalálható értékekkel egyaránt (2. táblázat), nagyságrendi eltérést egyik mérés során sem tapasztaltam.

2. táblázat: A CNP-G₇ és GalG₂CNP HSA katalizálta hidrolízis reakciójának párhuzamos módszerekkel meghatározott K_M értékei (mM) összevetve irodalmi adatokkal

Szubsztrát	ITC	UV-VIS	HPLC	Irodalom
GalG ₂ CNP	2,8	1,0	ND	0,9 ¹
CNP-G ₇	0,6	ND	0,9	0,3 ²

3. Kihasználva a technika univerzalitását és robusztusságát, olyan enzimreakciókat tanulmányoztam, melyek más módszerekkel nehezen vizsgálhatók.

A szénhidrátokon ható enzimek vizsgálata során nehézséget okoz a szubsztrátok és keletkező termékek érzékeny detektálása és ezáltal reakcióik tanulmányozása. Mivel az ITC módszer a reakció során fellépő hőváltozást méri, a korábban alkalmazott módszereknél fellépő detektálási nehézségek eliminálódnak, így lehetőség van az enzim természetes szubsztrátjaival történő vizsgálatára, a természetes körülményeket jól szimuláló környezetben.

3.1. Összevettem kromofor csoportot tartalmazó és szabad oligoszacharidok HSA katalizálta hidrolízis reakcióinak, azonos módszerrel meghatározott fő kinetikai paramétereit.

A kinetikai állandók összehasonlításánál döntő fontosságú, hogy az adatok azonos körülmények között kerüljenek meghatározásra. A kidolgozott módszer segítségével meghatároztam a rövid kromogén szubsztráttól (GalG₂CNP), a különböző hosszúságú szabad és kromofor csoportot tartalmazó maltooligomereken (G₃-G₈) át amilóz, hagyományos- és kék keményítő HSA-val történő hidrolízis reakcióinak kinetikai paramétereit. A kapott K_M értékek (3. táblázat) jól mutatják, hogy az aromás kromofor csoport jelenléte segíti a reakciót, az enzim aktív helyen található aromás aminosavakkal való kölcsönhatásnak köszönhetően, illetve, hogy a G₇ vagy az ennél hosszabb oligomerek alkalmasak a keményítő-HSA reakció modellezésére.

¹ Kandra L, Zajácz Á, Remenyik J, Gyémánt G. Kinetic investigation of a new inhibitor for human salivary α -amylase. Biochemical and biophysical research communications. 2005;334:824-828.

² Ramasubbu N, Ragunath C, Sundar K, et al. Structure-function relationships in human salivary α -amylase: role of aromatic residues. Biologia 2005;16:47–56.

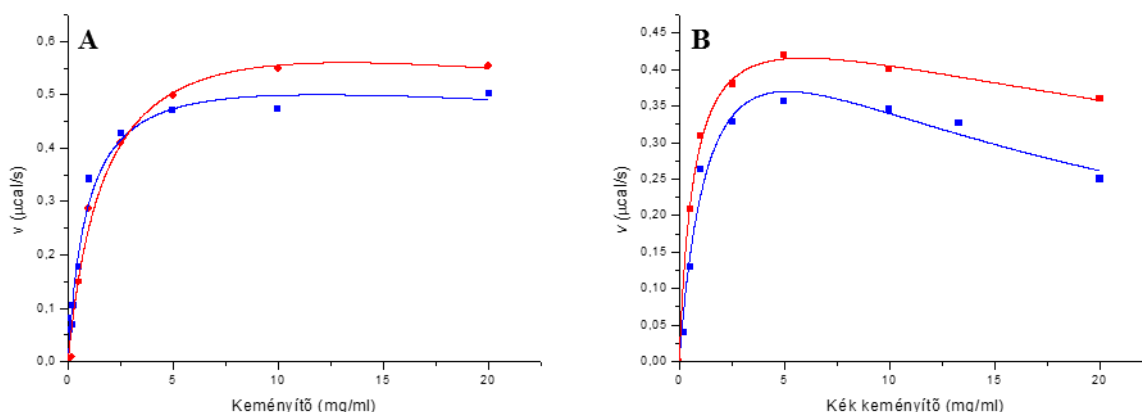
3. táblázat: Különböző hosszúságú szabad és kromofor csoportot tartalmazó maltooligoszacharidok HSA katalizálta hidrolízisének K_M értékei

	G ₃	G ₄	G ₆	G ₇	G ₈	Amilóz	Keményítő
mM	3,4	2,4	1,4	1,2	1,1		
mg/ml	1,7	1,6	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4
	GalG ₂ CNP	CNP-G ₄	CNP-G ₆	CNP-G ₇	CNP-G ₈		Kék keményítő
mM	2,9	2	1	0,6	0,6		
mg/ml	1,9	1,6	1,1	0,8	0,9		0,7

Emellett vizsgáltam a hőkezelés hatását a keményítő emészthetőségére humán és sertés pankreász eredetű α -amiláz (PPA) enzim bevonásával. A mérések során kapott reakciósebesség értékek azt mutatják, hogy a hőkezelés jelentősen javítja a keményítő emészthetőségét.

3.2. Összehasonlítottam a keményítő és kék keményítő HSA és PPA katalizálta hidrolízis reakcióját, és az eredmények alapján javaslom a kék keményítővel végzett kinetikai vizsgálatok gyári ajánlásának módosítását

A kék keményítő kompromisszumos megoldást jelent a természetes keményítő szubsztrát és a jól detektálható kromofor aglikonnal ellátott oligomer származékok alkalmazása között. A HSA és PPA katalizálta hidrolízis reakciók vizsgálata során szubsztrát gátlást figyeltünk meg, ami már a gyártó által javasolt szubsztrát koncentráció (18 mg/ml) mellett is jelentkezhet. A kapott sebességi adatokra Haldene egyenlet alapján görbét illesztve (2. ábra) meghatároztam a kék keményítő K_i értékét, ami a PPA esetében 16,4 mg/ml, a HSA esetében 49 mg/ml. Az előző tézispontban leírt hőkezelés érzékenység növelő hatása és a kapott szubsztrát gátlásra vonatkozó információk alapján javasoljuk a gyártó (Sigma) által ajánlott, kék keményítővel végzett kinetikai vizsgálatok módszerének módosítását.



2. ábra: A HSA (piros) és PPA (kék) katalizálta hidrolízis reakció sebességének szubsztrát koncentráció függése keményítő (A) és kék keményítő (B) szubsztrát esetén.

3.3. Egy ipari szempontból fontos enzim elegyet modellként használva igazoltam, hogy a módszer alkalmas rosszul oldódó, gélesedő szubsztrátokon ható enzimek aktivitásának meghatározására.

Mivel a mérést nem zavarják a vizsgált minta inhomogenitása, nagy viszkozitása vagy erőteljes színe, így rosszul oldódó és/vagy színes szubsztrátok reakcióinak vizsgálatára is alkalmas.

Ennek szemléltetésére egy erősen viszkózus, gélesedő rendszerben vizsgáltam egy gombából izolált és egy iparban alkalmazott kevert pektináz enzimkészítmény (Pectinex Ultra AFP) pektin bontási reakciójának szubsztrát-koncentráció függését. Mindkét vizsgált enzim minta többféle enzimaktivitással rendelkezett, így az összehasonlítás alapjául a két hőmérsékleten meghatározott látszólagos Michaelis állandó értékek (K_M') szolgáltak. Az ipari enzimkészítmény a pektinázzal szinergizmusban működő celluláz enzimet is tartalmaz, ezért a celluláz esetében is vizsgáltam a szubsztrát-koncentráció függést azonos körülmények között és meghatároztam a K_M' értéket a két eltérő hőmérsékleten. A 4. táblázatban láthatóak a kapott eredmények, amin megfigyelhető a hőmérséklet változtatásának reakciósebességre és K_M' értékekre gyakorolt hatása. Az enzim reakciók K_M értéke általában nő a hőmérséklet növelésével, jelezve, hogy a nagyobb hőmozgás miatti konformációs változások gyengítik a szubsztrát kötődését.

4. táblázat: A Pectinex Ultra AFP enzimkészítményben lévő pektináz és celluláz enzim katalizálta reakciók K_M' és v_{max}' értékei 25 és 45°C-on

	Hőmérséklet	Celluláz	Pektináz
K_M' (mg/ml)	45 °C	18.3±2.5	10.1±3.5
	25 °C	3.9± 0.4	2.1±0.3
v_{max}' (μcal/s)	45 °C	4,2±0,4	5,4±0,1
	25 °C	0,6±0,1	1±0,3

4. Igazoltam, hogy a módszer mérés technikailag lehetővé teszi komplex oldatok és apoláros karakterű („drug-like”) anyagok enzim gátló hatásának meghatározását.

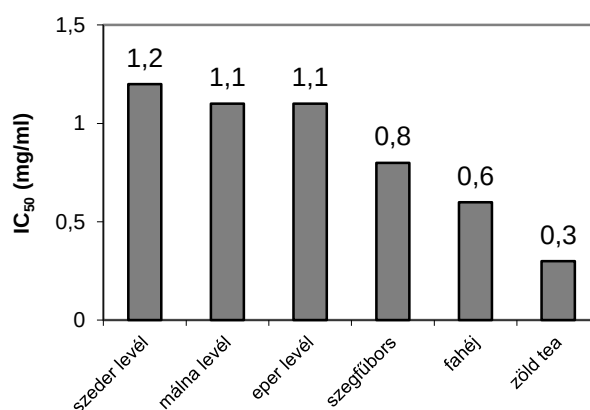
A cukorbetegség terápiájának egyik lehetősége a szénhidrátbontó enzimek gátlása révén valósul meg. Az ilyen elven működő hatóanyagoknak azonban számos nemkívánatos mellékhatása ismert. Emiatt kutatások folynak olyan természetes és szintetikus hatóanyagok után, melyekkel hasonló hatást lehet elérni, vagy a már alkalmazott terápiát ki lehet egészíteni.

4.1. Egy ismert glikozid-hidroláz inhibitor alkalmazásával, eltérő módszerekkel való párhuzamos mérések segítségével igazoltam a módszer gátlási vizsgálatokra való alkalmasságát.

Az akarbóz kereskedelmi forgalomban is elérhető Glucobay tablettá hatóanyaga, melyet cukorbetegség kezelésére használnak. Hatását a szénhidrátbontó enzimek (α -glükózidáz és α -amiláz) gátlása révén fejt ki, ezáltal csökkentve a felszívódó és véráramba kerülő monoszacharidok mennyiségét. GalG₂CNP-, CNP-G₇- és keményítő-HSA, illetve keményítő-PPA rendszeren meghatároztam az akarbóz IC₅₀ értékeit és összevetettem a kapott eredményeket a spektrofotometriával és HPLC-vel kapott, illetve a szakirodalomban megtalálható értékekkel, melyek jó egyezést mutattak. Keményítő-HSA és keményítő-PPA rendszerek esetében Dixon-módszer segítségével meghatároztam az inhibitor K_i értékét, ami 9 μ M illetve 14 μ M-nak adódott. Az akarbóz kötődési állandóját ITC kötődési vizsgálattal meghatároztam, ami a PPA esetében 0,85 $\pm$ 0,56 μ M-nek adódott.

4.2. Meghatároztam hatvan különböző gyógy- és fűszernövény tisztítatlan vizes extraktumának α -amiláz gátló tulajdonságait és vízdoldható antioxidáns kapacitását.

A népi gyógyászatban számos különböző gyógy- és fűszernövényt használnak a vércukorszint szabályozására. Vizsgálataim során ezen növények vizes kivonatainak HSA gátló hatását vizsgáltam 0,14 % keményítő szubsztráton, a fent leírt technika segítségével. Eredményeim (3. ábra) azt mutatják, hogy a különféle bogyós gyümölcsök levelei, a zöld tea, a fahéj és a szegfűbors olyan vízdoldható hatóanyagokat tartalmaznak, melyek jelentős α -amiláz gátlóhatással rendelkeznek (IC₅₀ < 1,2 mg/ml).



3. ábra: A HSA katalizálta keményítő hidrolizisre legjobb gátlást mutató növények IC₅₀ értékei.

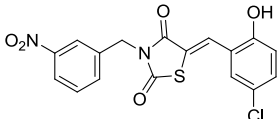
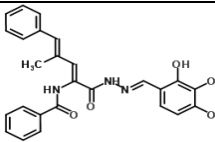
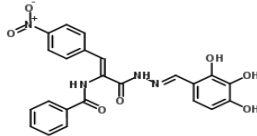
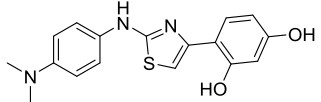
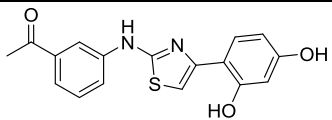
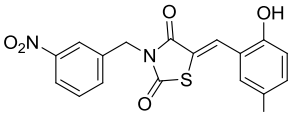
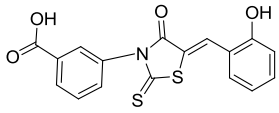
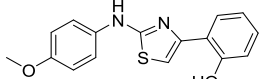
ACW módszer segítségével meghatároztam a vizsgált növények C-vitaminra vonatkoztatott antioxidáns kapacitását. A kapott antioxidáns kapacitások és a gátlási

tulajdonságok között megállapítottam egy gyenge korrelációt, ami valószínűleg a kivonatokról készült tömegspektrumokon is azonosítható fenolos komponenseknek tulajdonítható hatás.

4.3. Vízben rosszul oldódó, apoláros karakterű vegyületek HSA gátlási tulajdonságainak vizsgálatára alkalmaztam ITC módszert, szerves oldószert tartalmazó vizes rendszerben.

A vízzel elegyedő szerves oldószerek használata ITC mérések során alacsony forráspontjuk, illékonyságuk és az elegyedés során fellépő (jelentős) hőváltozás miatt csak szűk korlátokon belül valósítható meg. A fent említett németországi kutatócsoporttal való együttműködés keretében potenciális α -amiláz inhibitorokat teszteltünk spektrofotometriás és ITC módszer segítségével. A vizsgált körülbelül 50 vegyületet számítógépes modellezés segítségével választották ki, melyek többsége vízben rosszul oldódott. Így vizsgálatainkat 2% DMSO-t tartalmazó pufferelt rendszerben 2 lépésben végeztük. Az első lépésben egy rövid kromogén szubsztrát (3,75 mM GalG₂CNP) HSA (5 nM) katalizálta hidrolízisének gátlását vizsgáltuk spektrofotometriásan, majd az itt megfelelő gátlást mutató inhibitorokat ITC-vel 0,14% keményítő szubsztráton is teszteltük. A modellezéssel kiválasztott vegyületek közül 8 mutatott érdemi gátlást GalG₂CNP-vel szemben ($IC_{50} \leq 100 \mu M$), azonban a természetes keményítő szubsztráton mérve gyengébb gátlást mutattak (5. táblázat). Ez az eredmény is mutatja, hogy a klinikai diagnosztikában aktivitásmérésre alkalmazott rövid kromogén szubsztrátokkal végzett gátlási vizsgálatok nem adnak valós információt az inhibitorok természetes közegben kifejtett hatékonyságáról.

5. táblázat: A kiválasztott „drug-like” inhibitorok GalG₂CNP és keményítő szubsztráton mért IC₅₀ értékeinek összehasonlítása

Vizsgált komponens		IC ₅₀ (μM)	
Kód	Szerkezet	GalG ₂ CNP (UV-VIS)	Keményítő (ITC)
18a		85	650+
20a		70	400+
20h		100	N.D.
26		100	800+
27		100	1000+
30		50	300+
31		62	400+
38		40	400+

IV. Eredmények hasznosításának lehetőségei

Kutatásaink során egy új módszerrel bővítettük az egyetemen folyó szénhidrátkémiai és biokémiai kutatások során alkalmazható technikák körét. A mikrokolorimetria, a készülék magas ára és a módszer viszonylag limitált felhasználási lehetősége miatt ugyan nem számít rutin eljárásnak, ennek ellenére a szakirodalomban egyre növekszik az ITC méréseket is tartalmazó közlemények száma. Eredményeink alapján azonban elmondható, hogy a módszer jóval túlmutat a „klasszikus” felhasználási lehetőségeken, amit az is igazol, hogy folyamatosan növekszik az enzim kinetikai ITC módszerek fejlesztésére fókuszáló tanulmányok száma. Ennek egyik fő oka, hogy az enzimes kutatások során a mintakomponensek és termékek érzékeny detektálása jelenti az egyik fő problémát, amire az ITC készülék, mint univerzális detektor megoldást jelenthet. Az általunk kidolgozott módszer hasznos alternatívát jelenthet az irodalomban megtalálható, sokszor körülményesen alkalmazható vagy nehezen optimalizálható módszerek kiváltására. A technika kellően robusztus ahhoz, hogy különféle, akár inhomogén enzimes rendszerek esetében is alkalmazható legyen, és használatával, a korábbiaknál rugalmasabban, idő- és költséghatékonyabban lehet elvégezni az enzimkinetikai és gátlási vizsgálatokat. A módszer lehetőséget ad továbbá, hogy az enzimeket természetes szubsztrátjaik segítségével vizsgáljuk. Az ilyen mérések pontosabb információt adnak az inhibitorok természetes körülmények között kifejtett hatékonyságáról is, amit a HSA esetében az inhibitorok keményítővel és rövid kromogén szubsztráttal kapott IC_{50} értékeinek összehasonlítása jól szemléltet.

Az új inhibitorok keresése több fronton zajlik, ehhez kapcsolódik a növényi kivonatokkal és apoláros komponensekkel kapcsolatos vizsgálatunk. Ismerve a vizsgált növények IC_{50} értékeit és vízdoldható szárazanyag tartalmát arra a következtetésre jutottunk, hogy a legjobb gátlást mutató növények hétköznapi felhasználása során elérhető a gátláshoz szükséges koncentráció, így diabétesz terápia kiegészítőjeként való alkalmazásuk is lehetséges. A vizsgált apoláros inhibitorok keményítő szubsztráton vizsgálva nem mutattak megfelelő hatékonyságot, emellett a vizes közegben mutatott rossz oldékonyságuk sem teszi lehetővé a jövőbeni *in vivo* alkalmazást.

Az antigén-antitest kötődés során kapott eredmények egy új albuminkötő oszlop kifejlesztésében játszanak szerepet, ami a jövőben megkönnyítheti a szérumból izolált, kis mennyiségben előforduló fehérjék vizsgálatát. Szintén egy új alkalmazás reményében történtek a ciklodextrinnel kapcsolatos kötődési vizsgálatok is. A mérések során kapott új információk, segíteni fogják új, hatékonyabb komplexáló funkcióval rendelkező molekulák kifejlesztését.

Publikációk

A dolgozat anyagából eddig megjelent közlemények

Melinda Andrási, Gábor Lehoczki, Zoltán Nagy, Gyöngyi Gyémánt, András Pungor, Attila Gáspár: **A comparative study of capillary electrophoresis and isothermal titration calorimetry for the determination of binding constant of human serum albumin to monoclonal antibody.**

Electrophoresis, **2015**;36: 1274–1281. (IF.: 2,482)

Jamil Al-Asri, Erika Fazekas, Gábor Lehoczki, Andrej Perdih, CorneliaGörick, Matthias F. Melzig, Gyöngyi Gyémánt, Gerhard Wolber, Jérémie Mortier. **From Carbohydrates to Drug-Like Fragments: Rational Development of Novel α -Amylase Inhibitors.**

Bioorganic&medicinal chemistry, **2015**;23: 6725-32. (IF: 2,923)

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**;6:1648-53. (IF: (2015) 3,428)

Jamil Al-Asri, Gyöngyi Gyémánt, Erika Fazekas, Gábor Lehoczki, Matthias F. Melzig, Gerhard Wolber, Jérémie Mortier. **α -Amylase Modulation: Discovery of Inhibitors Using a Multi-Pharmacophore Approach for Virtual Screening**

ChemMedChem. **2016**. DOI: 10.1002/cmdc.201600427 (IF: (2015) 2,98)

A dolgozatban nem tárgyalt közlemények

Tamás Gáll; Gábor Lehoczki; Gyöngyi Gyémánt; Tamás Emri; Zsuzsa M. Szigeti; György Balla; József Balla; István Pócsi. **Optimization of desferrioxamine-E production by *Streptomyces parvulus*.**

Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica **2016**;63:475–489. (IF: (2015)0,568)

Virág Kiss, Gábor Lehoczki, Katalin Ósz. **Mathematical description of pH-stat kinetic traces measured during photochemical quinone decomposition**

Photochemical and Photobiological Sciences **2016**. DOI: 10.1039/C6PP00333H ((IF: (2015) 2,235)

Az értekezés témájához kapcsolódó előadások

Lehoczki Gábor, Gyémánt Gyöngyi. **ITC: Új alternatíva enzim kinetikai vizsgálatokhoz**

Tavaszi szél konferencia 2014. március 21-23., Debrecen

Gábor Lehoczki, Gyöngyi Gyémánt. **Application of microcalorimetry for inhibition study of HSA**

Annual meeting of the Working Committee for Carbohydrates, Nucleic Acids and Antibiotics of the Hungarian Academy of Sciences, 2014. május 21-23. Mátraháza

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

Doctoral Workshop 2015. október 10-11., Pécs

Gábor Lehoczki, KláraPető, István Takács, Gyöngyi Gyémánt, Renátó Kovács. **Anti-amylase and antifungal effect of common herbs and spices.**

8th Central European Conference "Chemistry towards Biology" 2016. augusztus 28 – szeptember 1., Brno

Gábor Lehoczki, Kármén Szabó, Gyöngyi Gyémánt. **Screening and classifying plant derived inhibitors for carbohydrate metabolism enzymes.**

Annual meeting of the Working Committee for Carbohydrates, Nucleic Acids and Antibiotics of the Hungarian Academy of Sciences, 2017. május 31- június 2., Mátraháza

Az értekezés témájához kapcsolódó posztterek

Gábor Lehoczki, Gyöngyi Gyémánt. **Kinetic investigation of human salivary amylase using microcalorimetry**

11th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis, 2014. október 20-22., Brno

Melinda Andrási, Gábor Lehoczki, Zoltán Nagy, Gyöngyi Gyémánt, András Pungor, Attila Gáspár. **Determination of Binding Constant of Human Serum Albumin to Monoclonal Antibody using Capillary Electrophoresis and Isothermal Titration Calorimetry.**

10th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods, 2015. szeptember 2-4., Siófok

Gyöngyi Gyémánt, Judit Remenyik, Gábor Lehoczki, Lóránt Jánossy, Lili Kandra. **20 years of studies on human salivary amylase. Overview of methodology and results**
Debreceni Szénhidrát Kollokvium 2015 – Lipták András Emlékkonferencia, 2015. nov. 6-8.



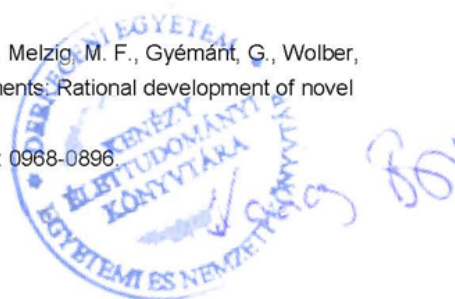
Nyilvántartási szám: DEENK/260/2017.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Lehoczki Gábor
Neptun kód: A3POII
Doktori Iskola: Kémiai Tudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10054367

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (4)

1. **Lehoczki, G.**, 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
2. Al, A. J., Gyémánt, G., Fazekas, E., **Lehoczki, G.**, Melzig, M. F., Wolber, G., Mortier, J.: α -amylase modulation: discovery of inhibitors using a multi-pharmacophore approach for virtual screening.
ChemMedChem. 11 (21), 2372-2377, 2016. ISSN: 1860-7179.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cmdc.201600427>
IF: 3.225
3. András, M., **Lehoczki, G.**, Nagy, Z., Gyémánt, G., Pungor, A., Gáspár, A.: A comparative study of capillary electrophoresis and isothermal titration calorimetry for the determination of binding constant of human serum albumin to monoclonal antibody.
Electrophoresis. 36 (11-12), 1274-1281, 2015. ISSN: 0173-0835.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/elps.201400513>
IF: 2.482
4. Al, A. J., Fazekas, E., **Lehoczki, G.**, Perdi, A., Görick, C., Melzig, M. F., Gyémánt, G., Wolber, G., Mortier, J.: From carbohydrates to drug-like fragments: Rational development of novel α -amylase inhibitors.
Bioorg. Med. Chem. 23 (20), 6725-6732, 2015. ISSN: 0968-0896.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2015.09.007>
IF: 2.923





További közlemények

Idegen nyelvű közlemények hazai folyóiratban (1)

5. Gáll, T., **Lehoczki, G.**, Gyémánt, G., Emri, T., Máthéné Szigeti, Z., Balla, G., Balla, J., Pócsi, I.:
Optimization of desferrioxamine E production by *Streptomyces parvulus*.
Acta Microbiol. Immunol. Hung. 63 (4), 475-489, 2016. ISSN: 1217-8950.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/030.63.2016.029>.
IF: 0.921

Idegen nyelvű közlemények külföldi folyóiratban (1)

6. Kiss, V., **Lehoczki, G.**, Ősz, K.: Mathematical description of pH-stat kinetic traces measured during photochemical quinone decomposition.
Photochem. Photobiol. Sci. 16 (4), 519-526, 2016. ISSN: 1474-905X.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/C6PP00333H>
IF: 2.344

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 16,188

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
12,923**

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, 2017.08.22.

