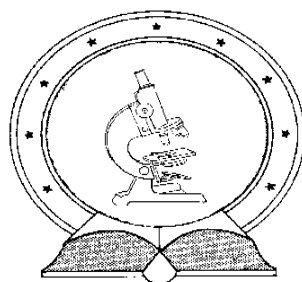


DE TTK



1949

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

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

szerző neve: Lehoczki Gábor

témavezető neve: Dr. Gyémánt Gyöngyi

DEBRECENI EGYETEM

Természettudományi Doktori Tanács

Kémiai Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2017.

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi Doktori Tanács Kémia Doktori Iskola Szénhidrátok és heterociklusok kémiája és kémiai biológiája (K/5) programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.

Nyilatkozom arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét.

Debrecen, 2017. szeptember 04.

a jelölt aláírása

Tanúsítom, hogy **Lehoczki Gábor** doktorjelölt 2013-2016 között a fent megnevezett Doktori Iskola Szénhidrátok és heterociklusok kémiája és kémiai biológiája (K/5) programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Nyilatkozom továbbá arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét.

Az értekezés elfogadását javasolom.

Debrecen, 2017. szeptember 04.

a témavezető aláírása

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

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
a Kémia tudományágban

Írta: Lehoczki Gábor okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Kémia Tudományok doktori iskolája
(Szénhidrátok és heterociklusok kémiája és kémiai biológiája, K/5 programja) keretében

Témavezető: Dr. Gyémánt Gyöngyi

A doktori szigorlati bizottság:

elnök:	Dr. Fábián István	egyetemi tanár
tagok:	Dr. Barna Terézia	egyetemi adjunktus
	Dr. Nádasdi Levente	analitikai fejlesztő (TEVA)

A doktori szigorlat időpontja: 2016. december 16.

Az értekezés bírálói:

Dr.	
Dr.	
Dr.	

A bírálóbizottság:

elnök:	Dr.	
tagok:	Dr.	
	Dr.	
	Dr.	
	Dr.	

Az értekezés védésének időpontja: 20... ..

Tartalomjegyzék

Köszönetnyilvánítás	6
Rövidítések jegyzéke.....	7
1. Bevezető.....	9
2. Irodalmi áttekintés.....	11
2.1. Az izoterm titrációs kalorimetria (ITC).....	12
2.2. Az ITC alkalmazása kötődési vizsgálatokban	13
2.2.1. A kötődési vizsgálatok alapjai	13
2.2.2. Kötődési vizsgálatok a kutatásban	19
2.3. ITC alkalmazása enzimkinetikai és gátlási vizsgálatokban.....	23
2.3.1. A mérések enzimkinetikai alapjai	24
2.3.2. Enzimkinetikai mérések ITC módszerrel.....	26
2.3.3. Gátlási vizsgálatok ITC-vel	28
2.4. Vizsgált enzim rendszerek.....	30
2.4.1. Alfa-amiláz	30
2.4.2. Pektináz.....	35
2.4.3. Celluláz	36
3. Célkitűzések	38
4. Vizsgálati eredmények és értékelésük.....	39
4.1. Molekuláris interakciók vizsgálata izoterm titrációs kalorimetriával	39
4.1.1. Humán szérum albumin és egy albumin specifikus monoklonális antitest kötődésének vizsgálata.....	39
4.1.2. Kationos γ -ciklodextrin és a Fondaparinux kölcsönhatásának vizsgálata	41
4.2. Enzimkinetikai vizsgálatok izoterm titrációs kalorimetriával	45
4.2.1. A kidolgozott módszer jellemzői és összevetése korábbi ITC-alapú technikákkal	45
4.2.2. Módszerkidolgozás a HSA-katalizálta hidrolízis reakciók ITC vizsgálatára	48
4.2.3. HSA katalizálta hidrolízis reakció vizsgálata három ortogonális (független) módszerrel.....	50
4.2.4. HSA katalizálta hidrolízis reakciók K_M értékének meghatározása.....	51
4.2.5. Pektináz és celluláz aktivitás mérése ITC-vel	57
4.3. Enzimgátlás vizsgálata izoterm titrációs kalorimetriával	61
4.3.1. Gyógy- és fűszernövények HSA gátló hatásának vizsgálata	65
4.3.2. Rossz oldékonysággal rendelkező, apoláros inhibitor vegyületek vizsgálata	74
5. Anyagok és módszerek.....	79
5.1. Alkalmazott pufferek.....	79

5.2. Felhasznált enzimek	79
5.3. Felhasznált szubsztrátok	80
5.4. Vizsgált α -amiláz inhibitorok	81
5.5. Kötődési vizsgálatok ITC módszerrel	82
5.6. Kinetikai és gátlási vizsgálatok ITC módszerrel	84
5.7. Kinetikai és gátlási vizsgálatok spektrofotometriás módszerrel.....	86
5.8. HPLC módszer a HSA katalizálta CNP-maltoheptaozid hidrolízis termékarányaiban bekövetkező változások követésére	87
5.9. A vizsgált növényi kivonatok előállítása.....	88
5.10. Általános módszerek.....	88
6. Összefoglalás.....	90
7. Summary	95
8. Irodalomjegyzék.....	99
9. Publikációk.....	109
10. Függelék.....	111

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek *Dr. Gyémánt Gyöngyi* egyetemi docensnek, aki az elmúlt nyolc évben tanácsaival, iránymutatásaival és támogatásával segítette a munkámat. Hálás vagyok, amiért hagyott hibázni, tanulni, de problémáimmal, kérdéseimmel bármikor fordulhattam hozzá, függetlenül attól, hogy azok szakmai vagy személyes természetűek voltak-e. Megtanított a helyes laboratóriumi munkára, és mellette tanutam meg a műszeres analitika és a szénhidrát vizsgálatok elméletét és gyakorlatát.

Köszönöm *Dr. Fábíán István* tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy lehetővé tette munkámat a Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszéken és hogy a doktori képzésem után a felajánlott munkalehetőséggel lehetőséget biztosított arra, hogy a dolgozatomban tárgyalt eredmények maradéktalanul megszülessenek.

Köszönöm *Dr. Batta Gyula* egyetemi tanárnak hogy a csoportjában lévő ITC készüléket a rendelkezésemre bocsájtotta és a dolgozat alapjául szolgáló méréseket ezen a készüléken végezhettem el. Szintén köszönöm *Fizil Ádámnak*, aki a készülékkel való első mérések során tanácsaival és tapasztalatával segítette munkámat.

Szintén köszönettel tartozom *Dr. Kandra Lilinek*, aki jelen volt a PhD munkám fontosabb állomásainál, segítségével és tanácsaival hozzájárult a publikációk és e dolgozat elkészültéhez is. Köszönöm *Dr. Remenyik Juditnak* és a csoportjában dolgozóknak, hogy ügyes-bajos dolgaikkal hozzájuk bármikor fordulhattam.

Köszönettel tartozom *Dr. Fazekas Erikának*, aki a labormunka első pillanatától biztatásával, segítségével, szakmai és baráti tanácsaival hozzájárult, hogy idáig eljussak és ez a munka elkészülhessen. Köszönöm *Szabó Kármennek*, hogy a labormunka során sokszor a saját feladatát félretéve is segítette munkámat.

Köszönettel tartozom *Dr. Gáspár Attilának* illetve csoportja volt és jelenlegi tagjainak, hogy befogadtak és egy mind szakmailag mind emberileg kedvező közegben végezhettem a munkámat.

Köszönöm a *Szervetlen és Analitikai Tanszék* minden munkatársának segítségét, akik az elmúlt években, a dolgozatban szereplő eredmények elkészültéhez technikai vagy szakmai segítséggel hozzájárultak.

Köszönöm a *GINOP-2.3.2-15-2016-00008* programnak az anyagi támogatást.

Végül köszönöm *feleségemnek, családomnak és barátaimnak* a türelmet, támogatást és segítséget, és hogy olyan stabil háttérrel biztosítanak számomra, amiben hatékonyan tudok a kitűzött céljaimért dolgozni.

Rövidítések jegyzéke

ACE	affinitás kapilláris elektroforézis
ACW	vízoldható antioxidáns kapacitás
CBM	szénhidrát kötő modul
CD	ciklodextrin
CE	kapilláris elektroforézis
CNP	2-klór-4-nitrofenol kromofor csoport
CZE	kapilláris zóna elektroforézis
DMSO	dimetil-szulfoxid
DNS módszer	3,5-dinitroszalicilsav módszer redukáló cukrok mennyiségi meghatározásához
DSC	differenciál pásztázó kalorimetria
EC	Enzyme Commission, az enzimek osztályozására szolgáló rendszer
ELISA	enzim kapcsolt immunoszorbens teszt
FP	fondaparinux
GH	glikozid hidroláz
GLP	glükagon szerű peptid
GTH	glükopiranozilidén-spiro-tiohidantoin
G _x	$\alpha(1,4)$ glikozidos kötésekkel kapcsolódó x glükóz egységből felépülő maltooligomer
HPA	humán hasnyálmirigy α -amiláz
HPLC	nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia
HSA	emberi nyál α -amiláz
IC ₅₀	50% enzimgátláshoz szükséges inhibitor koncentráció
ITC	izotermális titrációs kalorimetria
K _A	kötődési állandó
k _{cat}	katalitikus állandó, a termék képződésének sebességi állandója (k ₂)
K _D	disszociációs állandó
K _i	inhibitor konstans

K_M	Michaelis konstans. A maximális reakciósebesség 50%-ának eléréséhez szükséges szubsztrát koncentráció
K_M'	látszólagos K_M érték
LC/HC	az antitest könnyű/nehéz lánc
LE	ligand hatékonyság
LOD	detektálhatóság alsó határa
MALDI-TOF MS	mátrix segítette lézer deszorpciós ionizátorral és repülési idő analizátorral rendelkező tömegspektrométer
MES	morfolinó-etán-szulfonsav
NMR	mágneses magrezonancia
pIC_{50}	az IC_{50} érték negatív logaritmusa
PDB	Protein Data Bank, fehérje szerkezeti adatbázis
PPA	sértés hasnyálmirigy α -amiláz
PU-AFP	Pektinex Ultra AFP többféle pektin és cellulóz bontó enzimet tartalmazó ipari enzimkészítmény
RebA	rebaudiozid A
RIA	radioimmun esszé
RSD	relatív sztenderd deviáció
SN módszer	Somogyi-Nelson módszer, redukáló cukrok meghatározásához
SPR	felületi plazmon rezonancia
UV-VIS	ultraibolya-látható tartományban működő spektrofotometria
v_{max}	az enzimreakció maximális sebessége
WHO	Egészségügyi Világszervezet
ΔG	Gibbs szabadenergia változás
ΔH	szabadentalpia változás
ΔP	teljesítmény változás
ΔQ	hőváltozás
ΔS	entrópia változás

1. Bevezető

A Debreceni Egyetem Kémiai és Biológiai Intézeteiben 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 fogszuvasodás, cukorbetegség, elhízás és metabolikus szindróma prevenciójában és/vagy terápiájában is hasznos lehet. Ennek megfelelően a tervezett doktori disszertációmban leírt tudományos eredmények is ebben a témakörben születtek.

A WHO adatai szerint 2012-ben világszerte több mint 370 millió ember szenvedett elhízás következtében kialakult 2-es típusú cukorbetegségben, míg az elhízott emberek száma a 2 milliárdhoz közelít [1]. Ha ez a tendencia folytatódik az elhízás és az ezzel összefüggésbe hozható betegségek bekerülnek az öt leggyakoribb halálozási ok közé [2]. Ebből is látszik, hogy a szénhidrát és zsírsanyagcsere szabályozására, az elhízás és a cukorbetegség kezelésére irányuló kutatások jelentős aktualitással bírnak.

A cukorbetegség terápiájának egyik módja az emésztőrendszerben lévő szénhidrátbontó enzimek gátlása, a táplálékbevitel utáni (posztprandiális) vércukorszint emelkedés mérséklése érdekében. Az egyik legrészletesebben vizsgált szénhidrát emésztő enzim az α -amiláz. Az általa katalizált folyamatok követésére több módszert is találhatunk, melyek közül a különféle kromogén szubsztrátok alkalmazása és a keletkező termékek fotometriás módszerekkel történő detektálása a legelterjedtebb.

A szénhidrát emésztő enzimek gátlására jelenleg három hatóanyag (akarbóz, voglibóz, miglitol) van kereskedelmi forgalomban, azonban ezeknek több nemkívánatos mellékhatása is ismert. Az új inhibitor molekulák keresése folyamatos, mely során a szintetikus kismolekulák mellett a népi gyógyászatban alkalmazott gyógynövények is potenciálisan új hatóanyagok forrásaként jelennek meg. Számos gyógynövény esetében sikerült már tudományosan igazolni a különböző betegségekre és tünetekre gyakorolt jótékony hatásokat, emellett a növények további komponensei (vitaminok, antioxidáns vegyületek) is pozitív élettani hatásokkal bírhatnak.

A műszeres analitika folyamatos fejlődésének eredményeképpen az olyan klasszikusnak számító módszerek, mint a kalorimetria is újra elterjedőben vannak. Lavoisier első, jégből készített kaloriméterétől hosszú út vezetett a mai modern, automatizálható mikrokakoriméterek kifejlődéséig, melyek kis térfogatban képesek detektálni a fizikai-kémiai reakciók folyamán bekövetkező legkisebb hőváltozásokat is. A módszerrel lehetőség nyílik a reakciósebesség közvetlen mérésére, így jól alkalmazható enzimkinetikai és enzimgátlási vizsgálatok esetében is. Napjainkban a kalorimetria fő alkalmazási területe a molekuláris interakciók vizsgálata. A

módszer nagy előnye, hogy kellően robusztus ahhoz, hogy a vizsgált minta inhomogenitása vagy nagy viszkozitása se zavarja, így lehetőséget ad ilyen tulajdonságokkal bíró minták, de akár élő sejtek anyagcseréjének vizsgálatára is. Mivel minden fizikai és kémiai változást hőváltozás kísér, az ITC univerzális detektornak tekinthető.

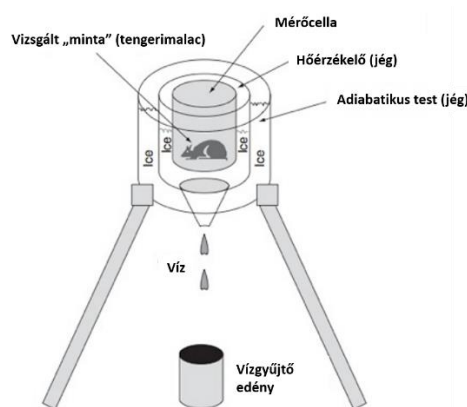
A gyógyszerészeti kutatásokban a jelölt molekulák targethez és a mátrixhoz való kötődésének erőssége fontos paraméter a várható biológiai hatás kialakulása szempontjából. A kutatások egyik új iránya a fehérje alapú gyógyszerek fejlesztése, mely során antitestekkel érik el a kívánt élettani hatást, mely esetében elsődleges fontosságú a megfelelő kötődés. Az ITC módszer lehetővé teszi a természetes, szervezetbeli *in vivo* körülmények megfelelő modellezése mellett a komponensek kölcsönhatásának oldat fázisban történő vizsgálatát anélkül, hogy azokat immobilizálni vagy módosítani kellene. Vizsgálataim során antigén-antitest és „host-guest” típusú kölcsönhatások termodinamikai és kötődési paramétereit határoztam meg.

Dolgozatom alapkutatás jellegű, méréseim megmutatják az ITC módszer fehérjék és szénhidrátok vizsgálatában rejlő széleskörű alkalmazási lehetőségét, mely új alternatívaként szolgálhat a biokémiai kutatások során felmerülő problémák megoldására.

2. Irodalmi áttekintés

A kalorimetria egy napjainkban reneszánszát élő termoanalitikai technika, amit az 1970-es években fedeztek fel újra és a módszer fejlesztése napjainkig is töretlen. A módszer alkalmazásának fő előnye, hogy a hőmérséklet változása olyan univerzális szignál, mellyel a fizikai, kémiai és biológiai változások egyaránt jellemezhetőek. Erre már az 1780-as években Lavoisier is rájött, aki megalkotta az első olyan kalorimétert, amivel egy élő állat metabolizmusát vizsgálta (1. ábra), így a napjainkban elsősorban fizikai-kémiai módszerként jellemzett technikát egy biológiai probléma hívta életre.

1974-ben Lodwig és munkatársa kezdte el újból vizsgálni Lavoisier szerkezetét [3], felhívva a figyelmet erre az elfeledett technikára. Ennek eredményeként 1979-ben leírták az első titrációs kalorimétert [4] és 1989-ben jelent meg az első izoterm titrációs kaloriméter [5].



1. ábra: Lavoisier kaloriméterének sematikus ábrája [6]

A kalorimétereket három csoportba oszthatjuk, aszerint hogy a hőmérsékletváltozás detektálása milyen módon történik. Ezek alapján megkülönböztetünk adiabatikus, hővezetési, és hő (teljesítmény) kompenzációs kalorimétereket. Az adiabatikus kaloriméterekben nem történik hőcserélődés a reakciótér és a környezet között ($\Delta T = 0$), amit általában egy jó szigetelő, adiabatikus réteg beiktatásával valósítanak meg. Ebben az esetben a mérőcellában kialakuló hőmérsékletváltozás idő függvényében való vizsgálata szolgáltatja a mért jelet.

A hővezetési kaloriméterek esetében a reakció során bekövetkező hőváltozás nem egy elszigetelt térben következik be, így a hő elvezetődhet a rendszert körülvevő nagy hőkapacitású közeg (pl. hűtőbordák) felé. A mérések során a két rendszer közti hőcserét tudjuk számszerűsíteni, megfelelő érzékelők segítségével. Lavoisier készüléke tekinthető az első

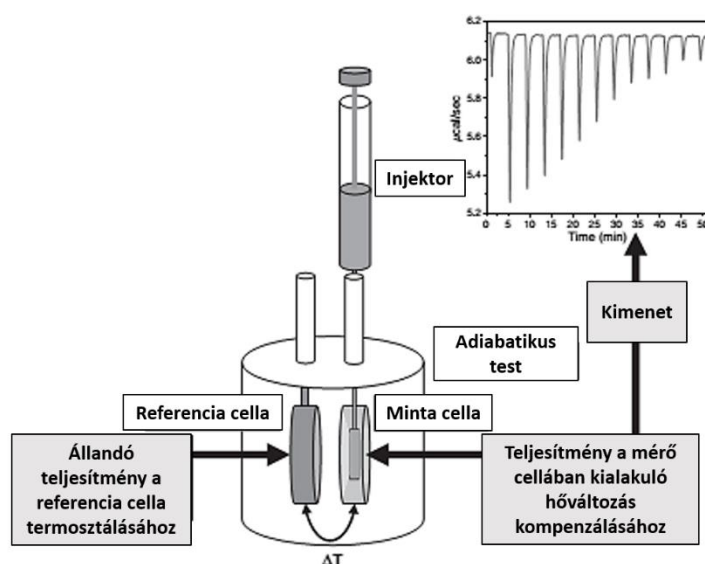
hővezetési kaloriméternek, ahol a jégpalást szolgált hő szenzorként és az elolvadó jégből lecsöpögő folyadék mennyisége a mért „jel”.

A hőkompenzációs kaloriméterek esetében a hőváltozást indirekt módon mérjük, mivel a Peltier effektust kihasználva gyorsan és pontosan szabályozható a reakciótér hőmérséklete, ezáltal az egy előre beállított hőmérsékleten termosztálható. Az az energia, ami ahhoz szükséges, hogy ezt az állandó (izoterm) körülményt fenntartsuk, szolgál a hőváltozás detektálásának alapjául, így a mért adat cal/s vagy J/s dimenzióban kerül meghatározásra [6]. A mai modern kaloriméterek a felsorolt típusok kombinációjának tekinthetők.

2.1. Az izoterm titrációs kalorimetria (ITC)

A kalorimetria két legdinamikusabban fejlődő formája a differenciál pásztázó kalorimetria (DSC) és az izotermális titrációs kalorimetria (ITC). Az előbbi technika egy minta melegítés vagy hűtés hatására bekövetkező, míg utóbbi elsősorban molekuláris interakciók és reakciók során bekövetkező energiaváltozások leírására szolgál. Mivel a dolgozatomban leírt eredményeket ITC módszerrel kaptam, így a DSC jellemzésétől eltekintek.

Az izoterm titrációs kalorimetria esetében a mérések egy adiabatikus test belsejében található, lapos, pénzérme alakú mérőcellában történnek, ahol a hőváltozás detektálása hőkompenzációs eljárás alapján. A készülék felépítését nézve, a mérőcella mellett egy azonos méretű és alakú referencia cella is található, illetve az adiabatikus testen kívül látható a termosztált injektor (2. ábra), ami mintaadagoláson kívül keverő funkciót is ellát.



2. ábra. Az ITC készülék felépítése [6]

A mérőcella referencia cellával megegyező hőmérsékletének fenntartását és a reakció közben bekövetkező ΔT hőváltozás gyors kompenzációját egy Peltier cella teszi lehetővé. A mérések során a Peltier cella által felhasznált energia időbeli változása szolgáltatja azt a nyers adatot, ami alapján a kiértékelés elvégezhető.

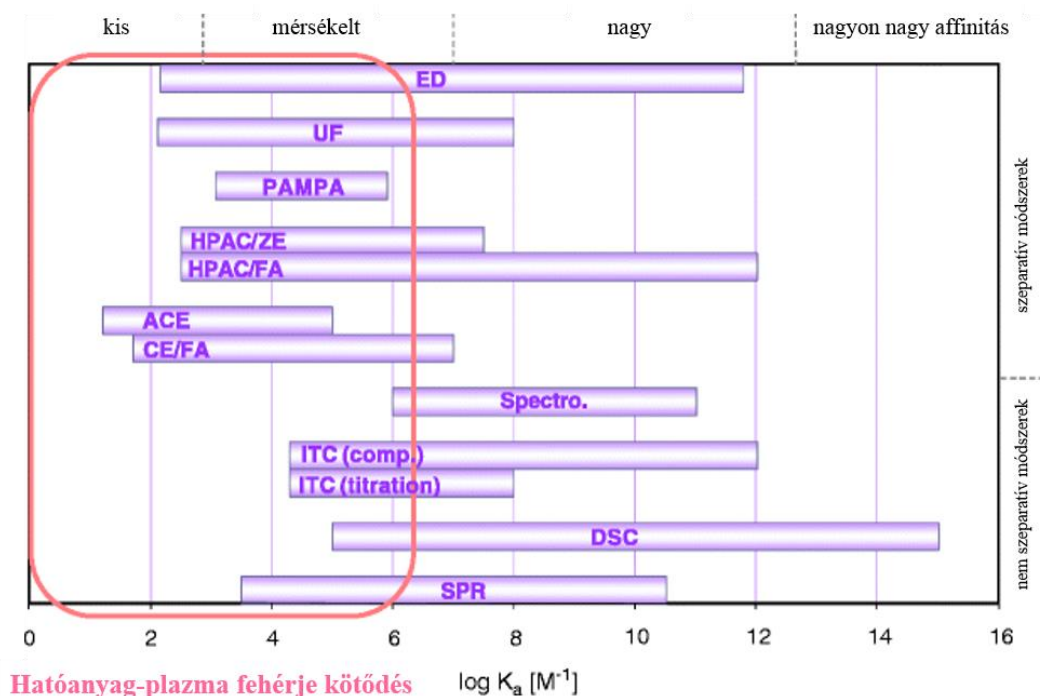
Ahogy az technika nevében is szerepel, a mérések során izoterm körülmények között vizsgáljuk a mérőcellában található és az injektorból kis térfogatokban adagolt komponensek között kialakuló kölcsönhatás/reakció során fellépő hőváltozásokat.

A módszer fő felhasználási területe a molekuláris interakciók vizsgálata, mely során két vagy több komponens kötődéséről kaphatunk információkat. Emellett a módszert széles körben alkalmazzák enzimkinetikai vizsgálatokhoz. Ebben az esetben a mérések nem a kötődés során bekövetkező hőváltozások detektálásra, hanem a reakciósebesség hőváltozáson alapuló meghatározására irányulnak. Egy harmadik, kevésbé elterjedt alkalmazás az élő rendszerek vizsgálata, mely során sejtek, sejt kultúrák vagy szövetek metabolizmusát lehet tanulmányozni az anyagcsere-folyamataik során fellépő hőváltozások alapján [7, 8].

2.2. Az ITC alkalmazása kötődési vizsgálatokban

2.2.1. A kötődési vizsgálatok alapjai

A kötődési egyensúly megállapításánál két fő megközelítést alkalmazhatunk. Az első esetben közvetlenül a szabad és kötött formában lévő ligandum koncentrációját határozzuk meg, ezek az úgynevezett szeparatív technikák. A másik megközelítés szerint (nem szeparatív technikák) a ligandum kötődése olyan mérhető fizikai változást okoz, mely alapján meghatározható a szabad és kötött ligandum aránya. Ez utóbbi kategóriába tartozik az ITC módszer is [9]. A gyógyszerfejlesztés folyamatában a vizsgált komponens kölcsönhatásainak felderítése elsődleges fontosságú, hiszen ez döntően meghatározza a molekula farmakokinetikai és farmakodinamikai tulajdonságait, illetve a szervezetből való kiürülés idejét és módját is. A 3. ábrán látható, hogy ennek a problémának a megoldására számos módszer alkalmazható, köztük szeparatív (LC, CE, ED, UF) és nem szeparatív technikák (ITC, SPR), annak függvényében, hogy milyen erős a két komponens közti kölcsönhatás.



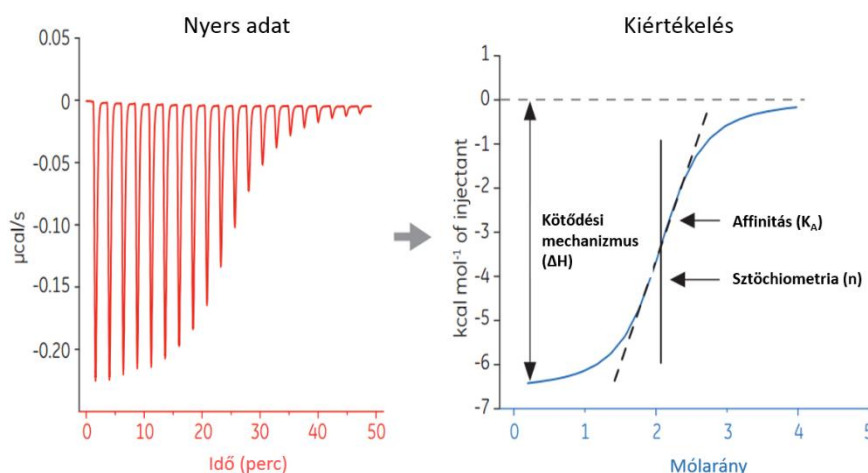
3. ábra Fehérje-ligandum kölcsönhatás vizsgálatára alkalmas módszerek összehasonlítása érzékenységük alapján [10]

ED: egyensúlyi dialízis, UF: ultraszűrés, PAMPA: parallel mesterséges membrán permeabilitási módszer, HPAC: nagy hatékonyságú affinitás kromatográfia zóna elúciós (ZE) és frontál analízis (FA) módszerrel, ACE: affinitás kapilláris elektroforézis, CE/FA: kapilláris elektroforézis, frontál analízis, Spectro: spektroszkópia, DSC: differenciál pásztázó kalorimetria, SPR: felületi plazmon rezonancia

Az ITC fő alkalmazási területe a makromolekula-ligandum kölcsönhatások vizsgálata, mely leggyakrabban fehérje-kismolekula interakciót jelent (receptor-ligand, enzim-inhibitor, antigén-antitest). Emellett más makromolekulák (DNS [11], RNS [12], poliszacharidok [13], lipidek [14]) kölcsönhatásai is hatékonyan vizsgálhatóak a módszer alkalmazásával. Ahhoz, hogy egy kötődési (asszociációs) reakciót pontosan jellemezni tudjunk, meg kell adni:

- a reakció sztöchiometriáját (kötőhelyek száma);
- a kötés erősségét minden kötőhelyre nézve;
- több kötőhely esetében azt, hogy van-e azok között kooperativitás vagy sorrendiség a ligandumok bekötődésében;
- hogyan befolyásolják a kötést a környezeti, abiotikus tényezők (pH, ionerősség, hőmérséklet);
- és a reakció Gibbs szabadenergia változásához (ΔG) milyen arányban járul hozzá az entalpia és az entrópia változás.

Optimális esetben egy jól beállított ITC mérésből, megfelelő kiértékeléssel ezeknek az adatoknak a többsége meghatározható vagy következtethető.



4. ábra: Egy exoterm kötődési reakció nyers adata és kiértékelése, a szigmoid görbe jellegzetes pontjainak megjelölésével [15]

A 4. ábrán egy kötődési vizsgálat során kapott nyers adat és annak kiértékelése látható. Az ilyen típusú vizsgálatok során az általános elrendezés az, amikor a makromolekula található a mérőcellában, míg a ligandum az injektorban. Ennek praktikus okai vannak, hiszen a makromolekulából így hígabb oldatot kell készíteni, míg a kismolekulából általában egyszerűbb egy töményebb oldat összeállítása. Ennek ellenére az irodalomban találhatunk példát a fordított elrendezésre is [16], sőt bizonyos esetekben javasolt a mérés mind a két elrendezésben való elvégzése, a pontosabb kiértékelés érdekében. A mérés során az injektorból tetszőleges számú injektálással kis térfogatokat adagolunk a mérőcellába és mérjük a kialakuló hőváltozásokat. A mérések folyamán több különböző hőváltozással is számolnunk kell. A mérőcellában lévő minta homogenitását és az injektált komponens gyors elkeveredését az injektor végén lévő keverő biztosítja, ami a mérés elején előre beállított keverési sebességgel forog. Ennek következtében kialakul egy lamináris, örvényszerű áramlás a cella belsejében, ami a folyadék és a cella fala közt súrlódást eredményez. Az ez által kialakuló hőváltozást a készülék a mérés kezdeti szakaszában kompenzálja. Az injektálások során azonban olyan hőváltozások is bekövetkeznek, melyeket a készülék nem tud automatikusan kompenzálni, így azt a mérést követően, kontroll mérések felhasználásával, manuálisan kell megtenni. Amikor egy nagyobb koncentrációjú oldatot egy hígabb rendszerhez adagolunk, a komponensek eltérő mértékű hígulást szenvednek, mely az izotermán hígulási hőeffektus formájában jelentkezik. Szintén hasonló effektust tapasztalhatunk, ha a két reaktáns nem ugyanolyan oldószerben vagy

pufferben található, hiszen ebben az esetben az eltérő ionerősségű vagy pH értékű oldatok illetve az oldószerek keveredése okoz hőváltozást, amit az irodalom „buffer mismatch” jelenséggént említ. Ennek a jelenségnek a kiküszöbölése a hatékony mérés alapkövetelménye, ezért a probléma megoldására több módot is kifejlesztettek, mint például a dialízis, vagy puffercsere ultraszűrővel vagy méretkizárási kromatográfiával [17].

Az ITC mérések során állandó nyomáson detektáljuk a hőváltozást, ami a folyamattal járó entalpiaváltozással arányos. Minden injektálás hőváltozást okoz a mérőcellában, amit az alábbi egyenlettel lehet jellemezni:

$$\Delta q_x = V \times [\Delta L]_b^x \times \Delta H \quad (1)$$

ahol a q_x az x . injektálás során kialakuló hőváltozás, a V a mérőcella térfogata és az $[\Delta L]_b^x$ az eltérés a kötött ligand koncentrációjában az $(x-1)$. és az x . injektálás között, ΔH az adott injektálás eredményeként kialakuló entalpia változás.

Ezek a kötődési események egy-egy csúcsot eredményeznek az izotermán, ahol a mérőcella referencia cellával azonos hőmérsékleten tartásához (hőkompenzáció) szükséges teljesítményt ($\mu\text{cal/s}$ vagy $\mu\text{J/s}$) láthatjuk az idő függvényében. Az injektálások eredményeként a szabad makromolekula koncentrációja egyre csökken, ezért a további ligandum hozzáadása kisebb hőváltozást eredményez. Ez a folyamat addig tart, amíg az összes makromolekula (M_T), ligandkötött formába (ML) nem kerül ($ML/M_T \sim 1$), ami az izotermán egyforma kis csúcsok (hígulási effektus) megjelenésében mutatkozik meg.

A kiértékelés során a csúcsok integráljai adják meg az egyes lépések során kialakuló hőváltozás (ΔH) értékét. Az összes csúcs integrálása után jutunk el azokhoz a pontokhoz, melyekre nem lineáris illesztéssel kapjuk meg 4. ábra bal oldalán látható görbét. A görbe inflexiós pontjához tartozó mólarány a reakció sztöchiometriáját adja meg.

Az adatok kiértékelése és a görbeillesztés különböző modellek segítségével történik, iterációval, a legkisebb négyzetek elve alapján, speciális szoftverek alkalmazásával. Ezek a szoftverek (pl. Origin, kinITC), tartalmazzák a leggyakoribb, az egy- és két kötőhelyre vonatkozó kötődési modelleket, de lehetőséget adnak az ettől eltérő kölcsönhatásokhoz saját modell létrehozására is.

Az n értékből következtetni lehet a kialakuló komplexek összetételére, valamint a ligand és a makromolekula ligand számára hozzáférhető koncentrációjáról is információkat kaphatunk. A görbe két plató fázisa közötti távolság adja meg a reakció teljes entalpiaváltozását (ΔH), míg a két plató közti szakasz meredekségéből a kötődés erőssége (K_A) számítható.

Ha egy kötőhellyel rendelkező makromolekula reverzibilis ligandum kötését vizsgáljuk a megfelelő beállítások mellett, az egyensúlyi asszociációs állandót (K_A) az alábbi összefüggés segítségével kaphatjuk meg:

$$K_A = \frac{[ML]}{[M][L]} = \frac{1}{K_D} \quad (2)$$

ahol az $[M]$ és $[L]$ a szabad makromolekula és ligandum koncentrációja, a K_D pedig a disszociációs állandó.

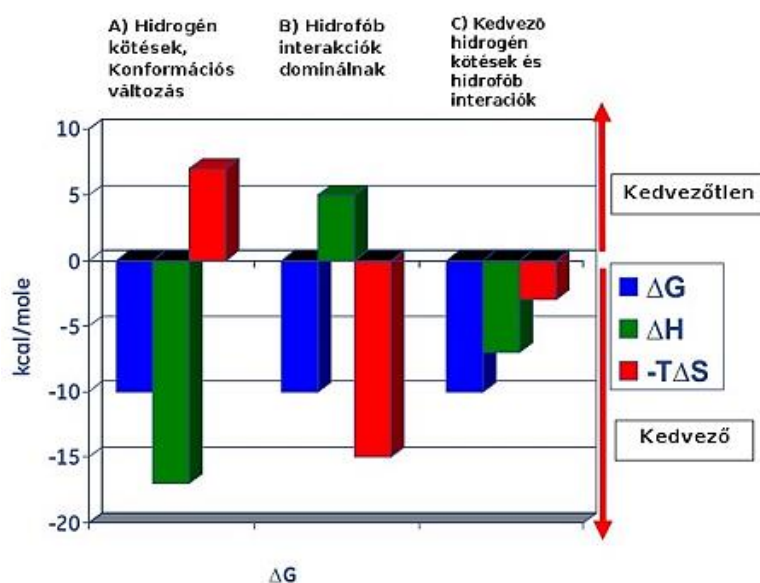
Termodinamikai szempontból a készülék belseje izolált rendszernek tekinthető, hiszen az adiabatikus testnek köszönhetően nem történhet hőcsere a mérőcella és a környezet között. A mérés tehát egy pontosan szabályozott állandó hőmérsékleten (izoterm) és állandó atmoszférikus nyomáson (izobár) történik, ennek megfelelően a mérések során meghatározható a rendszer Gibbs szabadenergia változása, melynek előjele megmutatja, hogy az adott reakció spontán végbemehet-e. A mérések során a szabadentalpia változás (ΔH) és a disszociációs állandó (K_D) ismeretében ΔG meghatározható, ezekből pedig az entrópia változás is kalkulálható az ismert 3. egyenlet alapján:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (3)$$

A Gibbs szabadenergia változás spontán lejátszódó reakciók esetében negatív előjelű, értéke közvetlenül is információt ad a kötés affinitására: minél negatívabb az értéke, annál erősebb a kölcsönhatás:

$$\Delta G = -RT \ln K_a = RT \ln K_D \quad (4)$$

A 3. egyenletben látható entalpia és entrópia tagok előjele és egymáshoz viszonyított értéke további fontos információkkal szolgál a kölcsönhatásról (5. ábra). Meghatározásukkal következtetéseket lehet levonni az olyan, kölcsönhatás során kialakuló molekuláris szintű történésekről és változásokról, mint a hidrogén kötések, elektrosztatikus, vagy diszperziós kölcsönhatások, illetve a konformációs változások.



5. ábra: Makromolekula-ligand kölcsönhatások általános termodinamikai profilja és a belőlük nyerhető információk [15]

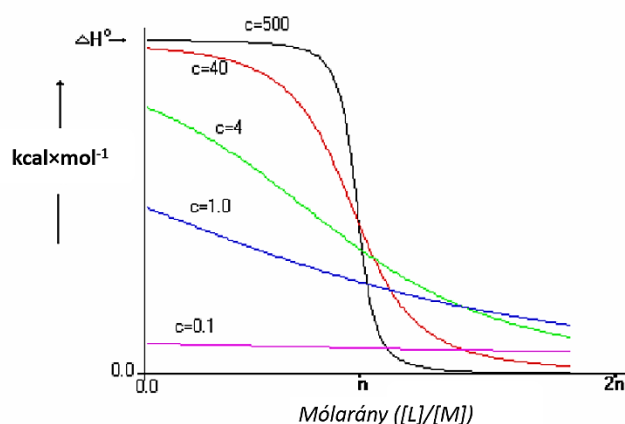
Amennyiben a ΔH negatív, a reakció exoterm és ha nagyobb mint $-T\Delta S$ a reakció entalpia vezérelt. ΔH tükrözi a két kölcsönhatásba lépő molekula közötti kötési kölcsönhatások erősségét az egyes komponensek oldószerrel mutatott affinitásához viszonyítva. Amennyiben a ΔS értéke pozitív és $-T\Delta S$ nagyobb mint ΔH a folyamat entrópia vezérelt. A ΔS megmutatja egy szolvatált komplex rendezetlenségét, két független szolvatált molekula rendezetlenségéhez képest. A kötődés erősségének növekedése csökkenti a rendszer rendezetlenségét, vagyis negatívabb $-T\Delta S$ értéket eredményez.

Az ITC mérésekre jellemző, a kísérlettervezésben és a kapott szigmoid görbe leírásához használt paraméter a Brandts-féle c érték [18]. Elviekben egy jól beállított kötődési vizsgálat esetében a fent leírt paraméterek akár egy méréssel is meghatározhatók, azonban ez nem minden esetben igaz. A mérések szükséges, de nem elégséges feltétele, hogy a kialakuló kölcsönhatás mérhető hőváltozással járjon ($>0.1 \mu\text{cal/s}$). Emellett a kapott görbe meredeksége és alakja szintén meghatározó. Abban az esetben, ha a K_A értéke túl kicsi vagy túl nagy, a görbe meredeksége nem megfelelő, így a kiértékelés során nem határozható meg minden paraméter. Ahhoz, hogy a kötődés során mérhető effektusokat kapjunk, megfelelő makromolekula koncentrációt kell választani. Ennek megbecslése érdekében vezették be a c értéket, mely az alábbi egyenlettel számítható, dimenzió nélküli szám:

$$c = [M_{total}] \times K_A \times N \quad (5)$$

ahol az M_{total} az mérőcellában lévő szabad és komplexben lévő makromolekula koncentrációja, az N a kötőhelyek száma.

A c ideális értékéről számos eltérő adatot lehet találni az irodalomban. Valahol 1 és 10000 közötti tartományt tekintik ideálisnak [18], van, ahol az ennél jóval szűkebb 20-100 [19] közötti értéket javasolják, az általunk használt készülék esetében a gyártó az 5-500 közé eső tartományt ajánlja. Általánosságban azonban elmondható, hogy amennyiben a c értéke túlságosan kicsi csak a K_A , míg ha túlságosan nagy csak a sztöchiometria és a ΔH értéke határozható meg megfelelő pontossággal. Az eltérő c értékek hatását a görbe lefutására a 6. ábra szemlélteti.



6. ábra A c -érték változtatásának hatása a szigmoid görbe alakjára [15]

2.2.2. Kötődési vizsgálatok a kutatásban

Az ITC módszer hagyományosan egy viszonylag kis teljesítményű (low throughput) módszer, mivel viszonylag nagy anyagmennyiségek alkalmazásával, időigényesen lehet a kötődési paramétereket meghatározni, ezért a módszert nem használták rutinszerű „screening” mérésekhez. A fejlesztések eredményeként az újabb készülékek érzékenyebbek, kisebb mintatérfogatokkal dolgoznak, ami a módszert költség- és időhatékonyabbá tette [20]. Az ITC módszer lehetőséget ad, hogy meghatározzuk a kötődési szabadenergiát, a sztöchiometriát és affinitást tág tartományokon belül (mM – pM), mindezt oldat fázisban, anélkül, hogy bármelyik komponenst jelölni, immobilizálni vagy módosítani kellene. A módszer kellően egyszerű és robusztus ahhoz, hogy a fenti 3 paramétert viszonylag gyorsan meghatározzuk, és ezek mindegyike rendelkezik olyan információtartalommal, melyet hatékonyan tudunk felhasználni különböző kötődő komponensek összehasonlítására. Ennek eredményeként az utóbbi években az ITC-alapú szkrínelési technikák is elterjedőben vannak [21].

A kifejlesztett módszerek a gyógyszerfejlesztés korai szakaszában a potenciális vegyületek tervezésében (fragmens-alapú tervezés és célzott fejlesztés [22]) és tesztelésében is sikeresen alkalmazhatóak [23, 24]. Ezekben a mérésekben a kötődési állandó mellett, a ligand hatékonyságot is sok esetben meghatározzák, mely a ligand egy atomjára eső kötési energiaként definiálható. Ennek oka az a megfigyelés, hogy egy hatóanyag sorozat esetében a kötődési (hatékonysági) potenciál sok esetben korrelál a molekulatömeggel.

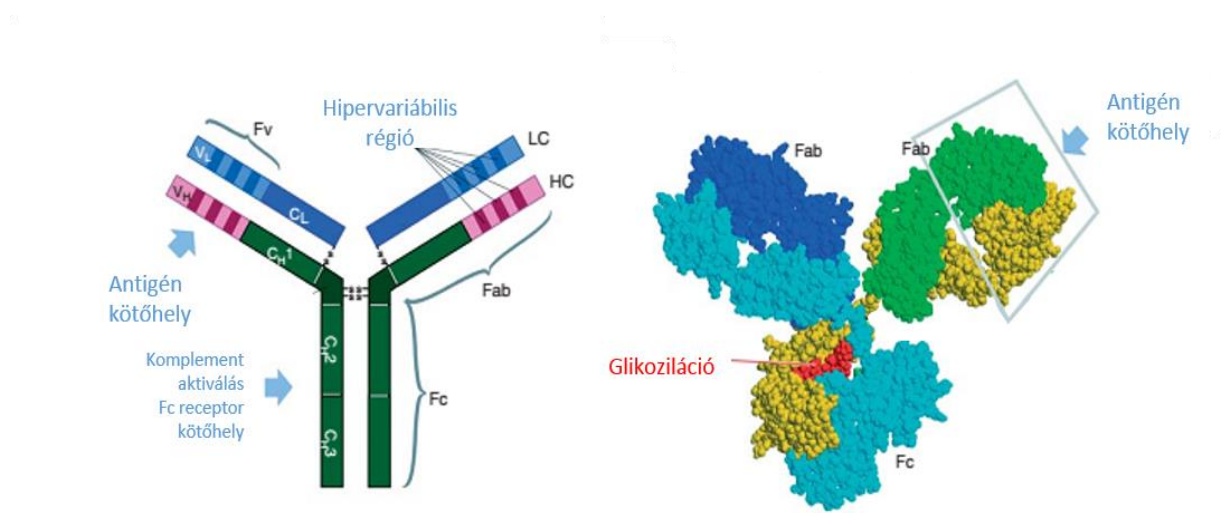
$$LE = \frac{\Delta G}{N_{NH}} = \left(\frac{1,37}{NH} \right) * pIC_{50} \quad (6)$$

ahol a ΔG a kötődés szabadenergia változása, az N_{NH} a ligandumban található „nehéz” (nem hidrogén) atomok száma, a pIC_{50} inhibitorok esetében az IC_{50} érték negatív logaritmusa.

A ΔG a 4. egyenlet felhasználásával számolható. Mivel a ΔG és a K_D között logaritmikus összefüggés áll fenn, ha előbbi -1.4 kcal/mol értékkel változik, az tízszeres eltérést eredményez ligand potenciál értékében [25]. Kuntz kb. 150 ligand felhasználásával meghatározta az egy, nem hidrogén atomra számolt maximális affinitás értékét, ami -1,5 kcal/mól értéknek adódott [26].

2.2.2.1. Antigén-antitest reakciók vizsgálata

Az antigén-antitest reakciók specificitásának és az antitestek affinitásának vizsgálata fontos, hogy pontosabb képet kapjunk az antitestek biológiai funkciójáról és annak hátteréről. Az antigén-antitest kölcsönhatás a természet legspecifikusabb felismerési és kötődési reakcióinak egyike. Az antitestek jellegzetes epitópok felismerésére képes, speciális kötőhellyel rendelkező, globuláris glikoproteinek. Szerkezetükre jellemző, hogy négy polipeptid láncból álló heterodimerek, melyek két-két azonos könnyű (LC) és nehéz láncból (HC) állnak. A polipeptid láncokat diszulfid hidak tartják össze és stabilizálják. Az Y-alakú antitest két rövidebb ágának végén, az N-terminálison találhatóak a könnyű és nehéz láncból létrejövő specifikus antigénkötő helyek (Fab régió).



7. ábra: Az antitestek általános szerkezete és jellegzetes régió [27]

Az antitestek antigénkötő affinitása az immunizálás időtartamának függvényében változik, idővel folyamatos növekedést mutat. Ezt a folyamatot nevezzük affinitás érésnek [28]. Ennek a folyamatnak a mikroklorimetriás vizsgálata megmutatta, hogy az antigénkötő régió változásából kifolyólag a folyamat során az antitestek affinitása akár két nagyságrenddel is növekedhet. Az antigén kötésnél elsősorban hidrogén kötések és van der Waals kölcsönhatások a meghatározóak, de az érés során a polaritási viszonyok megváltozása hidrofób kölcsönhatások kialakulását és erősödését is eredményezheti. A különböző nátrium-klorid koncentráció mellett végzett vizsgálatok kimutatták, hogy a kötődésben elektrosztatikus kölcsönhatások is szerepet játszanak, de ezek hozzájárulása a kötődéshez csekély [29]. A fehérjéhez kapcsolódó vízmolekulák stabilizálják a kölcsönhatást, az oldószer-mediált hidrogénkötések kialakulása miatt. Annak ellenére, hogy az antitestek hipervariábilis régióiknak köszönhetően számos antigén kötéséhez tudnak specializálódni, több vizsgálatban is arra a következtetésre jutottak, hogy a kötődési reakció elsősorban entalpia vezérelt, és a fent leírt kölcsönhatásokon alapul [30].

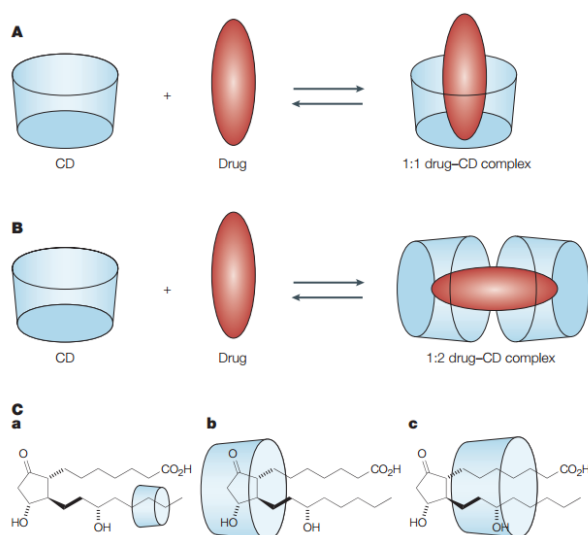
Napjainkban a biotechnológiai úton előállított gyógyszerek mutatják a legnagyobb fejlődést. Ezekben a hatóanyagok általában peptidek, vagy fehérje természetű molekulák, monoklonális antitestek [31]. Az antitestek kötődési állandója a hatóanyag jellemzésének fontos paramétere [32], melynek meghatározásához ELISA, RIA, SPR és ITC módszereket széles körben alkalmaznak [33]. Azonban fontos megjegyezni, hogy a többi módszerhez képest, az ITC nem csak az affinitásról ad információt, oldat fázisban beállíthatóak a majdani alkalmazási környezetnek megfelelő fizikai paraméterek, illetve nem igényel jelölést vagy immobilizációt, ami befolyásolhatná a kötődést és ezzel együtt a kapott adatokat [34]. Az antitesteket nem csak

gyógyászati célokra használják, affinitás kromatográfiás tölteteken és különféle immunoassay eljárásoknál is megtaláljuk ezeket [35].

2.2.2.2. Ciklodextrin ligandum kötése

A ciklodextrinek különböző számú, $\alpha(1,4)$ glikozidos kötéssel kapcsolódó glükóz egységekből álló, ciklikus oligoszacharidok. A leggyakrabban vizsgált és alkalmazott ciklodextrinek a 6,7 és 8 glükózból álló α -, β - és γ -ciklodextrin. Széleskörű alkalmazásuk oka, hogy a kialakuló gyűrűs szerkezet külső fele a hidroxil-csoportoknak köszönhetően hidrofil tulajdonságú, míg a gyűrűben található belső üreg hidrofób. Ennek következtében a ciklodextrinek apoláros molekulákkal zárvány komplexet képeznek és növelik azok oldékonyságát vizes rendszerekben, így gyógyszerhordozóként alkalmazva növelik az apoláros anyagok biológiai hasznosíthatóságát és stabilitását. Ezt a tulajdonságot kihasználva a ciklodextrineket a gyógyszeripar mellett, az élelmiszer-, kozmetikai- és vegyipar is széles körben alkalmazza.

A szabad CD, szabad ligand és a keletkező zárvány komplex közti dinamikus egyensúly akkor alakulhat ki, ha a CD üregének mérete, a ligandum mérete és tulajdonságai ezt lehetővé teszik, és ezek a tulajdonságok határozzák meg a komplexben a CD:ligand arányt. Erre mutat példákat a 8. ábra. A két komponens között másodrendű kölcsönhatások alakulnak ki, mely leggyakrabban hidrofób, és/vagy van der Waals kölcsönhatás.



8. ábra Különböző arányú ligand-CD komplexek [36]

A: 1:1 arányú komplex, B: 1:2 arányú komplex, C: prosztaglandin E2 komplexei a: α -CD-nel, b: β -CD-nel, c: γ -CD-nel

A ciklodextrinek előállítása, vizsgálata és alkalmazása hosszú múltra tekint vissza, ezzel kapcsolatban számos publikációt találhatunk [37, 38]. Az utóbbi években a különféle felszíni

csoportokkal módosított, ionos ciklodextrin származékok vizsgálata is előtérbe került, melyek jobb vízdékonyságuk mellett, pH-függő reverzibilis komplexek kialakítására képesek [39]. A töltéssel rendelkező ciklodextrineket leggyakrabban kapilláris elektroforézis vizsgálatoknál királis szelektorként alkalmazzák [40, 41]. Az irodalomban anionos ciklodextrin származékokat találunk nagyobb számban [42]. Kationos ciklodextrineket elsősorban molekuláris biológiai eljárásoknál használnak DNS megkötésére, például eukarióta sejtek transzfekciójánál [43]. Ezeknél a vizsgálatoknál a hatékonyság (megfelelő elválasztás, biológiai aktivitás) az adott kölcsönhatást jellemző mérőszám, így a kötődési affinitásról viszonylag ritkán találni számszerű adatot. Kivétel ez alól egy 2001-ben megjelent tanulmány, ahol kalorimetriás vizsgálatokkal bizonyították, hogy a különböző, pozitív töltésű trimetilamino-ciklodextrinek egy nagyságrenddel hatékonyabban kötik a negatív töltésű királis aminosav származékokat, mint a hagyományos ciklodextrinek, de a kötődésben a ligandum hidrofób részeinek elhelyezkedése és pozíciója is meghatározó szerepet tölt be. Más tanulmányok is arra a következtetésre jutottak, hogy habár az ellentétes töltésű csoportok között kialakuló elektrosztatikus kölcsönhatás képes stabilizálni és erősíteni a két komponens kötődését, önmagában nem elegendő, szükség van a poláros felszínnel vagy az apoláros üreggel kialakuló kölcsönhatásra is [44]. Ezt támasztja alá az a tanulmány is, ahol töltés nélküli ciklodextrinekkel kimutatták, hogy pozitív korreláció áll fenn a ligandok növekvő lipofil jellege és a kötődési állandó között [45].

A ciklodextrinek dipólus molekulák, parciális pozitív töltéssel rendelkeznek a primer oldalukon, ami befolyásolja az ionos molekulák orientációját. Ennek megfelelően az anionos vegyületek a primer pozitív, míg a kationos komponensek az ellentétes oldal irányába orientálódnak, utóbbi gyengébb kölcsönhatás kialakulását eredményezi. Azonban a dipól-dipól kölcsönhatások csak kismértékben járulnak hozzá a kötés kialakulásához, az elsődleges összetartó erők töltött ciklodextrinek és ligandumok között a Coulomb erők. Fontos figyelembe venni az ilyen jellegű kölcsönhatások vizsgálatánál, hogy biológiai rendszerekben a közeg ionkoncentrációja és pH-ja is jelentősen befolyásolja az ionos kölcsönhatások kialakulását [46].

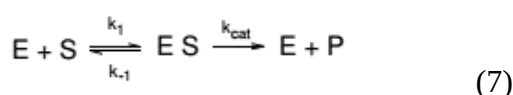
2.3. ITC alkalmazása enzimkinetikai és gátlási vizsgálatokban

Az ITC-t kötődési vizsgálatok mellett leggyakrabban enzimkinetikai vizsgálatokra alkalmazzák, köszönhetően annak, hogy a módszer robusztussága olyan méréseket is lehetővé tesz, amelyek más módszerekkel nem, vagy csak jelentős kompromisszumokkal végezhetők el. A módszer ilyen irányú alkalmazása, a kötődési vizsgálatokhoz képest rövidebb múltra tekint vissza [47], de elterjedőben van. Már a bevezetőben is rámutattam, hogy a módszer által

detektált hőváltozás olyan univerzális szignál, amivel a reakciókat jellemezni lehet, így a módszer a „label-free” technikák közé tartozik. Ez az enzimreakciók során leggyakrabban alkalmazott optikai módszerekkel szemben (pl. spektrofotometria) jelentős előnynek számít [48]. Mivel az enzimkinetikai és gátlási vizsgálatok során a reakciósebességet közvetlenül a reakcióhő változásából számítjuk, ami nagyságrendekkel nagyobb hőváltozás a kötődési hőeffektushoz képest, a módszer kellően érzékeny még kis szubsztrát koncentráció tartományban is. Emellett ezzel a módszerrel a reakciósebességet és annak változásait közvetlenül tudjuk mérni. Az alkalmazott enzim, amennyiben a szubsztrát vagy inhibitor kötődése nem irreverzibilis, visszanyerhető és a szennyezők eltávolítása után újra felhasználható, vagyis a módszer nem destruktív. A mérések során a rendszer inhomogenitásai csak olyan mértékben vannak hatással a kapott eredményre, melyek megfelelő kontroll mérésekkel korrigálhatóak. Ennek következtében olyan, méréstechnikailag „nem ideális” rendszerekben is történhetnek mérések [49], melyek az adott enzim természetes közegét jól utánozzák. Ez jelentheti komplex, rosszul definiált minták használatát ugyanúgy, mint szélsőséges pH, hőmérséklet vagy ionerősség alkalmazását. Ezzel részben kiküszöbölhető az az űr, ami az *in vitro* és *in vivo* mérések között sok esetben fennáll, és ami a sokszor ellentmondásos eredményekhez vezet. Emellett az újabb kísérletek bizonyították, hogy az ITC előnyeit kihasználva ipari szempontból fontos reakciók is jól vizsgálhatóak, mint például biomassza [50] vagy ipari hulladékok enzimes bontási reakciói [51].

2.3.1. A mérések enzimkinetikai alapjai

Az enzimreakciók leírására a Michaelis-Menten összefüggést használják, ami kapcsolatot teremt a szubsztrát koncentráció és a reakciósebesség között és olyan kvantitatív adatokat kaphatunk meg belőle, mint a Michaelis konstans (K_M) és az átviteli szám (k_{cat}), melyek aránya az enzim katalitikus hatékonyságát jellemző paraméter. Egy általános enzim katalizált reakció során az enzim és a szubsztrát kölcsönhatásából létrejön az enzim-szubsztrát komplex, melyből egy átmeneti, eltérő energiaszintű állapoton keresztül kialakul a termék, ami disszociál az enzimről (7. egyenlet).



ahol a k_1 és k_{-1} az ES komplex keletkezésének és disszociációjának a sebességi állandói, a k_{cat} pedig a termék képződésének sebességi állandója (k_2) [52].

A fenti séma értelmében, az enzimreakció sebessége az alábbi összefüggéssel adható meg:

$$v = \frac{k_{cat} \times [E] \times [S]}{K_M + [S]} = \frac{V_{max} \times [S]}{K_M + [S]} \quad (8)$$

ahol a v_{max} a reakciósebesség felső határértéke, K_M az a szubsztrát koncentráció, ahol $v = v_{max}/2$. A kinetikai mérések során leggyakrabban alkalmazott módszerek alapja, hogy a szubsztrát fogyása vagy a termék keletkezése által okozott abszorbancia változást mérjük spektrofotometriásan. Eltérő szubsztrát koncentrációk alkalmazásával, azonos enzimkoncentráció mellett meghatározott kezdeti sebességekből kapjuk meg a jól ismert Michaelis-Menten görbét. Ha azonban a szubsztrát és/vagy a termék ilyen módon nem detektálható, alternatív módszerekhez kell folyamodni. Ilyen alternatív módszerek lehetnek például a színes terméket eredményező kapcsolt reakciók, de tömegspektrométerrel vagy folyadékkromatográfiás módszerekkel is követhetjük a reakció lefutását, a szubsztrát vagy termék mennyiségének szakaszos, kvantitatív meghatározásával.

Az ITC mérések során lehetőségünk van a reakciósebesség közvetlen meghatározására azáltal, hogy a folyamat során tapasztalt hőváltozás arányos a reakció moláris entalpia változásával, ez pedig arányos a keletkező termék koncentráció változásával. Ahogyan az 9. egyenletből is látszik, ahhoz, hogy meghatározzuk egy enzimreakció sebességét, nem elegendő csupán a hőváltozást mérnünk, meg kell határoznunk a reakció entalpiáját is. Ezt legegyszerűbben úgy tehetjük meg, ha az enzimreakciót hagyjuk teljesen végbemenni, majd meghatározzuk a termogramon található csúcs alatti területet, ami a reakció entalpiájával egyenlő [48].

$$\frac{\Delta Q}{\Delta t} = \Delta H \times V \times \frac{\Delta P}{\Delta t} \quad (9)$$

ahol a ΔH a kísérletesen meghatározott szabadentalpia változás, V a mérőcellában található oldat térfogata, P a keletkező termék koncentrációja.

Amint azt korábban a kutatócsoportunkban igazolták, az amilázok hatására a reakció során keletkező termékek is szubsztrátjai lehetnek a reakciónak, vagy más reakció utak is megnyílhatnak [53], ilyenkor a módszer annyiban eltérő, hogy a reakció entalpiaváltozása csak ezek figyelembevételével határozható meg. Goldberg és munkatársai mikrokolorimetria segítségével megmérték a különböző tagszámú oligoszacharidok hidrolízis reakcióinak entalpiaváltozását és azt találták, hogy azonos körülmények között, amennyiben az oligomer azonos kötésekkel kapcsolódó egyforma monomerekből épül fel, az additivitás elve érvényesül. Ebből adódóan az adott kötés hasítási entalpia értékéből a tagszám ismeretben meghatározható a teljes folyamat entalpiaváltozása, illetve ennek a fordítottja is lehetséges: egy oligomer tagszámára is következtetni lehet a folyamat entalpiaváltozásából [54]. Olyan reakciók esetén,

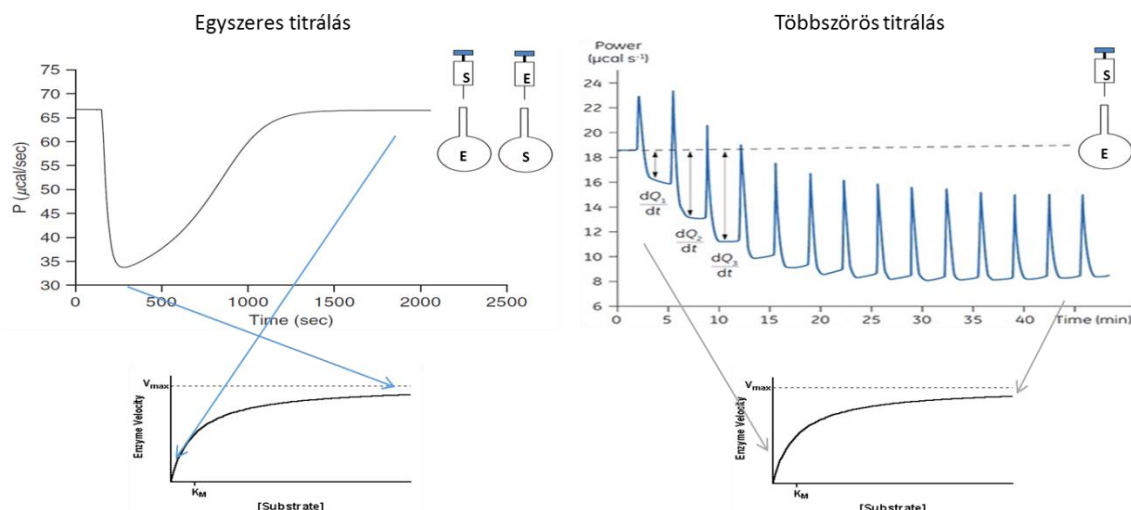
ahol a katalízis során proton átmenet történik, a kalorimetriával meghatározott entalpia értékét az alkalmazott puffer ionizációs entalpiaváltozása is befolyásolhatja [55].

2.3.2. Enzimkinetikai mérések ITC módszerrel

A kinetikai paraméterek meghatározásához szükséges 9. egyenletben látható ΔH és sebesség adatokat lehetőség van egy mérésen belül vagy két különálló méréssel meghatározni. Itt különül el egymástól az ITC alapú kinetikai módszerek két nagy csoportja, az egyszeres és többszörös titrálós technikák (9. ábra). Az egyszeres titrálási módszerek esetében az egyik komponens nagyobb térfogatát injektáljuk a mérőcellába, ahol az enzimreakció teljesen végbemegy. Ennek megfelelően a görbe integrálásával a reakció entalpia változása is meghatározható ugyanazzal a méréssel. Az egyszeres injektálási módszereknél általában a szubsztrát oldatához adják hozzá az enzimet, majd az enzim aktivitásától, és a hasítható kötések számától függően 0,5-1 óra alatt végbemegy a reakció [56]. Ahhoz, hogy a Michaelis-Menten görbét megkapjuk, a kiértékelő program minden időpillanatban, az adott pillanatban bekövetkező hőváltozásból meghatározza a mérőcellában a reakciósebességet és az aktuális szubsztrát koncentrációt, amíg a reakció teljesen le nem zajlik. Ennek eredményeként egy folyamatos $[S]$ - v adatsorozatot kapunk, amire a Michaelis-Menten egyenlettel görbe illeszthető [57].

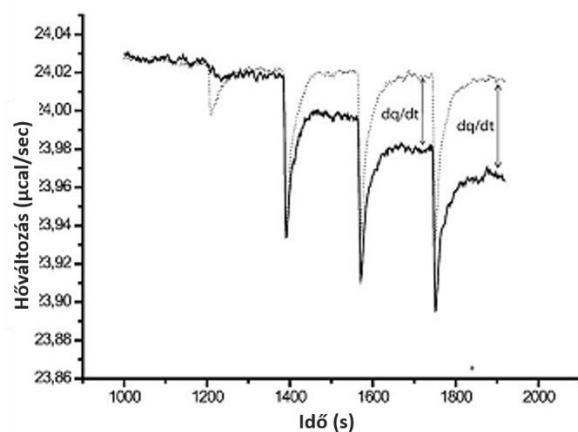
Ezzel szemben a többszörös titrálási módszerek esetében, hasonlóan a kötődési vizsgálatokhoz, a szubsztrátot kis mennyiségben injektáljuk a mérőcellába. Itt azonban a kiértékeléshez szükség van egy külön mérés során a ΔH meghatározására is. A többszörös titrálási módszereknél általában egy híg enzim oldatot titrálunk a szubsztrát oldatával, így a kialakuló hőváltozás a cellában lévő aktuális szubsztrát koncentrációra jellemző sebességet adja. Az injektálások között eltelt időt úgy határozzák meg, hogy kialakuljon a „steady state” állapot, azonban két injektálás között a szubsztrát koncentráció csökkenése ne haladja meg az 5 %-ot. A mérések során azt az időtartamot tekintjük „steady state” fázisnak, amikor a termogram y értéke állandó, vagyis a reakció az adott enzimkoncentrációnak megfelelő legnagyobb sebességgel zajlik.

Azokban az esetekben, amikor a szubsztrát injektálása jelentős hőváltozást okoz, szükséges egy harmadik mérés végrehajtása is, amivel a kapott adatsorunkat a hígulási hőváltozás értékével korrigálhatjuk [55].



9. ábra: Az egyszeres és többszörös titrálási módszerek sémái, az általánosan alkalmazott elrendezések (S – szubsztrát, E – enzim) és a belőlük kapott kinetikai görbék lefutása [6, 15]

Az irodalomban a két alap módszerből is több variációt találhatunk, melyek a kísérleti összeállításban vagy a kiértékelésben különböznek egymástól. A többszörös titrálási módszer esetében Bohlin és munkatársai [58] úgy küszöbölték ki a hígulási effektus torzító hatását, hogy a mérések során nem az injektálás után, az alapvonalról számított legnagyobb $\Delta Q/\Delta t$ kitérést vették alapul, hanem a csúcs után következő plató rész (steady state szakasz) és a kontroll mérés alapvonala közti távolságot határozták meg (10. ábra).



10. ábra: Bohlin és munkatársai által enzimkinetikai mérésekhez kidolgozott többszörös titrálási módszer sémája [58]

Karim és munkatársai [59] egyszeres injektálási módszerrel kapott adatokhoz olyan új kiértékelési modellt dolgoztak ki, mellyel már az injektálás közben is kinetikai adatokhoz juthatnak és sikerült megmérniük az inverziós enzimek reakciója során a mutarotáció okozta hőváltozást és annak hőmérséklet és pH függését. Emellett Poduch és munkatársai úgy módosították a hagyományos egy injektálásos technika során alkalmazott kiértékelést, hogy a

kapott termogram visszatérő szakaszának meredekségét használták fel a kinetikai görbe létrehozásához [60].

Meglepő a felismerés, hogy az irodalomban található ITC-vel végzett kinetikai vizsgálatok jelentős százaléka szénhidráton ható enzimekkel történt, ami jelen irodalmi áttekintés elkészítése szempontjából egy szerencsés véletlen. Ez azonban nem jelenti azt, hogy a módszer más enzim katalizálta folyamat vizsgálatára kevésbé alkalmazható, ahogy ezt a vizsgált enzimek nagy változatossága is mutatja. Az általánosan vizsgált hidrolázok mellett találhatunk példákat oxidoreduktáz [61, 62], transzferáz [63], liáz [60], izomeráz [64] és ligáz [65] katalizálta reakciók ITC-s vizsgálatára is.

Emellett az ITC módszert olyan speciális feladatokra is felhasználták, mint a sejtek energiatermeléséért felelős Na^+/K^+ ATPáz antiporter enzim aktivitásának a vizsgálata, magas oldhatatlan száraanyag tartalmú ($< 29 \text{ m/m } \%$) biotranszformáció enzimes bontásának követése [66], vagy az oldhatatlan kitin polimerek bontásának tanulmányozása [67], illetve megmérték hogyan befolyásolják a mátrix fehérjéi a hexokináz enzim működését [66].

2.3.3. Gátlási vizsgálatok ITC-vel

Annak ellenére, hogy kinetikai vizsgálatokra egyre szélesebb körben alkalmazzák, a mikrokolorimetria gátlási vizsgálatokban még mindig egy ritkán alkalmazott módszer. A legtöbb fellelhető publikációban a szubsztrát [67] és termék gátlásra [61] vonatkozó következtetéseket vonnak le ugyan a kinetikai adatokból, de a közvetlenül inhibíció vizsgálatáról szóló írások csak az utóbbi néhány évben jelentek meg.

Különböző inhibitor koncentrációknál meghatározott reakciósebesség értékekből meghatározható az inhibitor hatékonysága és a kinetikai paraméterek változásaiból a gátlás típusára is következtetni lehet. Az egyik első publikációt, ami ilyen témában íródott és részletes leírást ad a módszer gátlási vizsgálatra való alkalmazásáról, Benini [68] és munkatársai jegyzik. A mérések során egy korábbról már leírt gátlási vizsgálatot ismételték meg ITC alkalmazásával. Ebben a fluorid ionok ureáz gátló hatását igazolták, és meghatározták, hogy a gátlás típusa kompetitív és unkompetitív is lehet, amit a pH befolyásol. Maximova [69] és munkatársai nevéhez fűződik az egyik első olyan vizsgálat, ahol a tripszin enzim reverzibilis és irreverzibilis inhibitorait többszörös titrálási módszer segítségével vizsgálták, majd a gátlás típusára a K_M és v_{max} értékek változásaiból következtettek. A fenti eredmények mindkét tanulmány esetében megegyeztek a korábban leírt mechanizmusokkal, ezzel igazolva a módszer ilyen típusú vizsgálatokra való alkalmazhatóságát.

Az enzimműködés szabályozásának speciális esete az allosztérikus szabályzás, ahol az aktív helytől távol eső szabályzó helyre kötődik a regulátor molekula, ezzel olyan távolható változásokat hozva létre, ami az enzim működését alapvetően befolyásolja [70]. A humán farnezil-pirofoszfát szintáz enzim speciálisan szabályozott, mert a reakció során keletkező termék (farnezil-pirofoszfát) nem a hagyományos termék gátlás révén fejt ki a hatását, hanem egy másik, allosztérikus kötőhelyre kötődve. Park és munkatársai [65] írták le ezt a mechanizmust izotermális titrációs kalorimetria segítségével, a hagyományos egy injektálós módszert és kötődési méréseket is felhasználva.

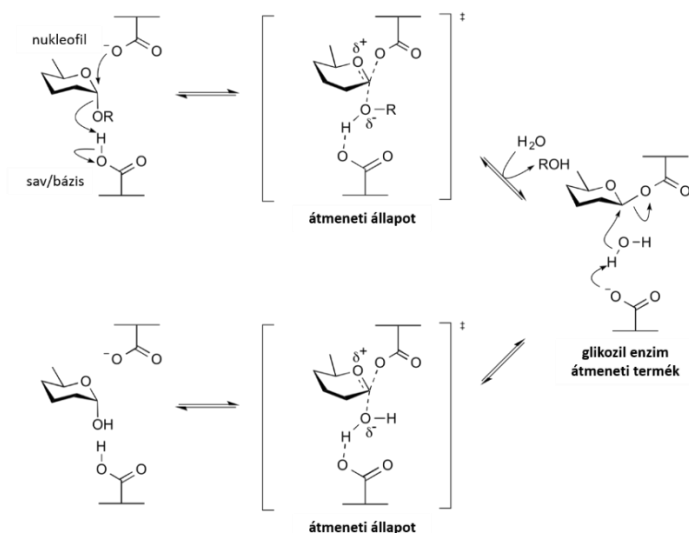
Az inhibitorok hatékonyságát leggyakrabban az IC_{50} vagy K_i értékkel jellemzik. A két érték a gátlás típusának és az enzim méréshez használt szubsztrát K_M értékének ismeretében, a Cheng-Prusoff összefüggések [71] felhasználásával egymásba átszámolható [72]. A K_i értéke meghatározható, ha egymástól függetlenül változtatjuk a szubsztrát és inhibitor koncentrációját és ilyen körülmények között határozzuk meg a reakciósebesség értékét, majd a kapott adatokat kiértékeljük, például Dixon módszerrel [73]. A K_i érték megadásával több esetben lehet találkozni [74, 75], hiszen például kalorimetriás vizsgálatokkal egyszerűbb egy disszociációs állandó meghatározása, mint egy több mérésből álló kinetikai mérésorozat megfelelő összeállítása és értékelése [69]. Az IC_{50} értékek helyett egyre több helyen a pIC_{50} értéket adják meg ($-\log IC_{50}$) [76]. Olyan esetekben, ahol több, jelentősen eltérő hatású komponens összehasonlítása a cél, a logaritmikus értékek könnyebben értelmezhetővé és összehasonlíthatóvá teszik az eredményeket, mintha több nagyságrend tartományban változó IC_{50} értékeket kellene összevetni. Emellett elfedi a mérés bizonytalanságából eredő kisebb hibákat, ezáltal könnyebben értelmezhetőek az adatokban lévő valódi különbségek.

2.4 Vizsgált enzim rendszerek

2.4.1. Alfa-amiláz

Az alfa-amilázok (EC 3.2.1.1) vagy más néven 1,4- α -D-glükán glükánhidrolázok a glikozid hidrolázok csoportjába tartozó (GH13) szénhidrátbontó enzimek, melyek a keményítőben és maltooligomerekben található $\alpha(1,4)$ glikozidos kötések hidrolízisét végzik. Az alfa-amilázok három doménből álló kalciumkötő fehérjék, melyek központi motívuma egy 8-8 β -redőből és α -hélixből álló $(\beta/\alpha)_8$ TIM-hordó struktúra [77]. Ennek C-terminális oldalán található az enzim aktív helye és a katalitikus aminosavak (Asp, Glu). A keményítő az árokszerű szubsztrátkötő helyre kötődik, ahol a hasításhoz megfelelő pozíció felvételét egy szubsztrátkötő modul (CBM) segíti elő. Az enzim működéséhez Ca^{2+} és Cl^- ionokra van szükség. A Ca^{2+} negatív töltésű aminosavakkal alakít ki kölcsönhatást, ami az enzim struktúráját stabilizálja [78], míg a Cl^- az enzimet allosztérikusan képes aktiválni [79]. A klorid ion más egyértékű anionnal is helyettesíthető, amivel az enzimaktivitás többszörösére emelhető, azid ion alkalmazásánál akár ötszörös aktivitás növekedés is elérhető rövid kromogén szubsztrát alkalmazása esetén [80].

A hasítás során a katalitikus helyen lévő Asp és Glu aminosavak nukleofilként és proton donorként viselkednek. A reakció eredményeként keletkező termékek megtartják anomer konfigurációjukat, vagyis az enzim retenciós mechanizmus szerint működik (11. ábra). Az enzim nevében lévő „alfa” jelölés nem a hasított kötésre, hanem a reakció eredményeként felszabaduló termék anomer konfigurációjára utal. A hasítás a szénhidrátlánc belsejében történik (endo-enzim), a hasítás eredményeként redukáló oligoszacharidok keletkeznek.



11. ábra: Az α -amilázok retenciós mechanizmusa [81]

A dolgozatban található mérések két eltérő eredetű α -amiláz enzimmel történtek, emberi nyál (HSA), és sertés hasnyálmirigy eredetű (PPA) α -amilázzal. Leggyakrabban ezt a két enzimet alkalmazzák az emlős α -amilázok modell enzimeként, mivel könnyen és olcsón beszerezhetők, illetve a humán hasnyálmirigy α -amilázzal 97 % illetve 91 % aminosav homológiát mutatnak (blastp [82]). Az emberi szervezetben a két jól ismert mirigy (nyál- és hasnyálmirigy) mellett több helyen is termelődik α -amiláz. Kis mennyiségben megtalálható a májban, belekben, méhben, herékben és a vázizmokban is [83]. A májban termelődő α -amilázt ugyanaz a gén kódolja, mint a nyál α -amilázt, azonban a termelődését két eltérő erősségű promóter aktiválja [84]. A májban termelődő α -amiláz nagy affinitással köti a glikogént, a termelődésében bekövetkező változás az elhízás és cukorbetegség korai markereként alkalmazható [2].

2.4.1.1. α -Amiláz aktivitás mérésére alkalmazott rendszerek

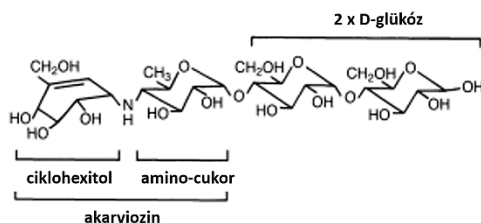
Az α -amilázok az egyik legjobban vizsgált enzim csoport, hiszen nemcsak orvosi, de ipari (élelmiszer-, bio üzemanyag-, textil, papíripar) szempontból is jelentősek [85-86]. Az emlős amilázok alhely szerkezetének részletes vizsgálata kutatócsoportunkban is az enzim gyógyászati jelentősége miatt indult [85]. Emellett, az utóbbi években idegrendszeri és pszichológiai kutatásokban is méri a HSA aktivitás változásait, mivel a szimpatikus idegrendszer működésének könnyen vizsgálható markere, amiből különféle stresszfactorok hatásai és az ezzel összefüggő idegrendszeri folyamatok jól vizsgálhatóak [87].

A szerteágazó alkalmazási területek miatt fontos, hogy az enzimaktivitás mérésére használt módszer pontos és megfelelően robusztus legyen, azonban az alkalmazott módszerek sok esetben nem alkalmasak arra, hogy egy rosszul jellemzett rendszeren megbízható eredményt szolgáltatassanak, illetve nem modellezik megfelelően az enzim *in vivo* körülményeit [88]. Az irodalomban megtalálható módszerek és a kinetikai vizsgálatoknál alkalmazott szubsztrátok nagy változatosságot mutatnak. A szubsztrátok között megtalálható az enzim természetes szubsztrátja a keményítő [89], a módosított keményítő [90], a különböző hosszúságú maltooligomerek [91] és ezek kromogén- vagy fluoreszcens csoportokat [92] tartalmazó származékai. Utóbbi csoportba tartozik a klinikai tesztekben használt 2-klór-4-nitrofenil-4-O- α -D-galaktopiranozil-maltozid (GalG₂-CNP) [93], a 2-klór-4-nitrofenil-maltotriozid [94] és maltoheptaóz származékok [95] is. Fluoreszcens csoportot tartalmazó szubsztrátot a kutatócsoport munkatársai is állítottak elő, mutáns amiláz katalizálta transzglikozilezéssel [92]. Az alkalmazott mérési módszer, gyorsasága és egyszerűsége miatt, általában valamilyen kolorimetriás teszt. Keményítő szubsztrát esetében Lugol [89], kék keményítő [96] vagy redukáló cukor tesztek használnak. Ezek közül is a leggyakoribb a 3,5-dinitrosalicilsav teszt

(DNS) [97], ami jól mérhető, de nem szöchiometrikusan keletkező színes terméket produkál. Diagnosztikában a kromogén szubsztrátok alkalmazása terjedt el, ahol az enzimreakció során felszabaduló színes kromofor csoportok által kiváltott színváltozást mérik spektrofotometriásan [98]. Korábban kapcsolt enzim reakciókat használtak a keletkező termék detektálására, ilyen volt például az oxidáz-peroxidáz rendszer, ahol a glükóz oxidációja során keletkező hidrogén-peroxidot mutatták ki [99]. Olyan szubsztrát alkalmazásakor, amikor a redukáló végéhez, az enzim számára nem hasítható β -glikozidos kötéssel kapcsolódik a kromofor csoport, az α -amiláz katalizálta reakció HPLC módszerrel is követhető, a keletkező termékek elválasztásával és arányaikban bekövetkező változások időfüggő meghatározásával. Ez a kutatócsoportunkban kidolgozott módszer alkalmas az enzim aktív hely szerkezetének és a hasítási tulajdonságainak a meghatározására is [100]. További alternatív módszerként Farias [101] agar diffúziós módszert használt aktivitásmérésre, mely során a keményítőből keletkező rövidebb oligomerek ki tudnak diffundálni az agaróz gélből, annak mérhető feltisztulását okozva. Találhatunk kalorimetriás példát is α -amilázok kinetikai vizsgálatára, D'Amico és munkatársai pszikrofil α -amilázok kinetikáját vizsgálták, mely során többek között egyszeres és többszörös injektálási módszereket is használtak [102].

2.4.1.2. Az α -amilázok inhibitorai (természetes és szintetikus)

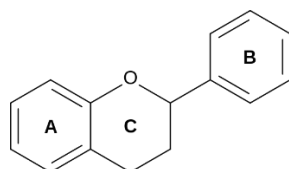
A szájon át adható diabétesz elleni szerek egyik csoportját az enzim inhibitorok alkotják, melyek gátló hatásuk révén lassítják a glükóz felszívódását és csökkentik a posztprandiális glükóz szint emelkedését [103]. Jelenleg három α -glikozidáz (EC 3.2.1.20) gátló hatóanyag van kereskedelmi forgalomban, ezek közül hazánkban az akarbóz érhető el, ami az α -amiláz enzimnek is inhibitora. Az akarbóz egy mikrobiális eredetű oligoszacharid származék (12. ábra), mely átmeneti állapot analóggént az emésztőrendszerben előforduló poliszacharidbontó enzimeket gátolja. A gátlási hatékonyság tekintetében az α -glükozidáz > α -amiláz > szacharáz > maltáz > izomaltáz sorrend figyelhető meg, míg a laktáz és trehaláz enzim esetében nincs mérhető gátló hatása [103].



12. ábra: Az akarbóz szerkezete [104]

Az enzimaktivitás csökkenése miatt emésztetlen oligoszacharidok jutnak a vékonybél alsóbb szakaszaiba is, ahol stimulálják a glukagon szerű peptid (GLP-1) szekrécióját. Ez a hormon lassítja a gyomor kiürülését és szabályozza a normál vércukorszint fenntartásáért felelős glukagon és inzulin termelését, ezáltal az akarbóz terápia hosszú távú hatása túlmutat az enzimgátlás által kiváltott rövidtávú hatáson [105]. Azonban az enzimgátláson alapuló gyógyszerek hatékony működése miatt a bélrendszer későbbi szakaszaiba nagy mennyiségben kerülnek részlegesen emésztett szénhidrátok, és ez gyakran kedvezőtlen bélrendszeri mellékhatások (puffadás, hasmenés) kialakulásához vezet [106].

A cukorbetegség és elhízás, valamint az ezekhez kapcsolódó metabolikus szindróma rohamos terjedése miatt az elmúlt évtizedekben jelentős figyelmet kapott az új α -amiláz és α -glükozidáz inhibitorok keresése. Mivel a gátolni kívánt enzimek az emésztőrendszerben működnek, a gátlószerek élelmiszerekkel való bejuttatása az alkalmazás egyik lehetősége. Egy 2012-es összefoglaló szerint [107] körülbelül 800 növényfajról írták le, hogy rendelkezik kisebb-nagyobb antidiabetikus hatással és ez a szám azóta is emelkedik. A legtöbb növény esetében még nem vizsgálták, mi az antidiabetikus hatás mechanizmusa. A vizsgált növényi kivonatok jelentős része oldószeres extrakcióval készült, ami leggyakrabban alkoholos [108, 109], kloroformos [110] vagy hexános [111] kivonást jelent. Ezekkel a módszerekkel az apoláros és enyhén poláros komponensek vonhatóak ki, amelyek jellegzetes és gyakran vizsgált képviselői a különböző növényi színanyagok és szekunder metabolitok. A fenolos vegyületek, ezen belül is a flavonoidok, az egyik legtöbbször vizsgált vegyületcsalád, ami bizonyított α -amiláz gátló hatással rendelkezik. A flavonoidok váza (13. ábra) két aromás gyűrűből és egy oxigén tartalmú heterociklusból áll és számos biológiailag aktív vegyület alapját képezi [107]. Lo Piparo és munkatársai [112] vizsgálták a HSA enzim és a flavonoidok között kialakuló kölcsönhatást, a gátló hatás hátterének megállapítása érdekében. Azt találták, hogy részben a B gyűrűn található hidroxil-csoportok száma határozza meg a gátlási hatékonyságot, az enzim aktív helye és az OH-csoportok között kialakuló hidrogénkötések miatt, részben az aktív hely aromás aminosavai és az aromás gyűrűk között kialakuló kölcsönhatások.



13. ábra: A flavonoidok általános szerkezete [113]

A polifenolok másik, α -amiláz gátlás szempontjából jelentős csoportját a tanninok alkotják. A tannin gyűjtőnév a növényvilágban sok helyen megtalálható, heterogén vegyületcsoportra utal, melynek két fő típusát a hidrolizálható és kondenzált tanninok alkotják. Előbbi csoport (gallo- és ellagitanninok) egy központi poliolból és a hozzá kapcsolódó galluszsav egységekből, míg utóbbi katechinhez kapcsolódó proantocianidin oligomerekből épül fel. A tanninok általános enzim gátlószereknek tekinthetők, hatásmechanizmusuk valószínűsíthetően erős fehérjekötő képességükkel magyarázható, ami akár fehérje denaturációhoz és oldhatatlan fehérje-tannin aggregátumok kialakulásához is vezethet [114].

A poláros komponensek kivonásához vizes (pufferes) [115] vagy vizes alkoholos extrakciót [116] használnak. Ezekben az esetekben a kivonatok főként különféle glikozidokat, szerves savakat és származékait és fehérje természetű anyagokat tartalmaznak [117].

De nemcsak növényi kivonatok enzimgátló tulajdonságait vizsgálták, hanem olyan anyagokét is, amik a hétköznapi életben az emberi szájba vagy emésztőrendszerbe juthatnak. Ennek példája a dohányfüst komponenseinek igazolt HSA aktivitást csökkentő hatása. Kimutatták, hogy a dohányfüstben lévő telített és telítetlen aldehidek is képesek csökkenteni az enzimaktivitást, a nyálban lévő fehérjék tiol csoportjaival való reakciójuk révén [118]. Emellett szintetikus kismolekulákat is terveztek és vizsgáltak inhibitoroként, melyek között megtalálhatóak szintetikus oligopeptidek [119], szénhidrát származékok [120] és heterociklusos vegyületek is [121].

2.4.1.3. Új α -amiláz inhibitorok keresése *in silico* módszerekkel

A szerkezetvizsgáló módszerek fejlődésének eredményeként egyre pontosabb fehérje szerkezetek kerülnek fel az online adatbázisokba (pl.: PDB). Ezzel párhuzamosan olyan modellező szoftverek is elérhetővé váltak, amik lehetővé teszik a potenciális inhibitor molekulák kötődésének számítógépes modellezését. Ez gyorsítja és költséghatékonyabbá teszi a szerkezet-alapú gyógyszertervezést és a jelölt vegyületek gyors tesztelését. Így anélkül szűrhetőek ki a hatékony molekulák, hogy nagyszámú, sokszor költséges *in vitro* mérést is el kellene végezni. A dokkolási vizsgálatok célja kettős, egyrészt szerkezeti modellezést végeznek, ezzel kiszűrve azokat a komponenseket, melyek képesek az enzim aktív helyére vagy más szabályozó régióhoz kötődni, másrészt a kialakuló kölcsönhatások alapján megbecsülik a komponens várható biológiai aktivitását. A számítógépes modellezésnél számos különféle algoritmus használható, melyek a fehérje és kismolekula szerkezete és flexibilitása mellett általában a sztérikus tényezőket, elektrosztatikus, van der Waals és hidrogén kötésekkel valamint a K_A értéket veszik figyelembe és ezeknek megfelelően vagy egy pontszámot vagy egy becsült

kötődési energia (ΔG) értéket adnak eredményül [122]. Az így kapott eredmények azonban nem minden esetben tükrözik megfelelően a komponensek *in vitro* és *in vivo* hatékonyságát, hiszen a komponensek rossz oldékonysága, az oldatbeli viszonyok és a mátrix komponensei mind megváltoztathatják a kötődést [123].

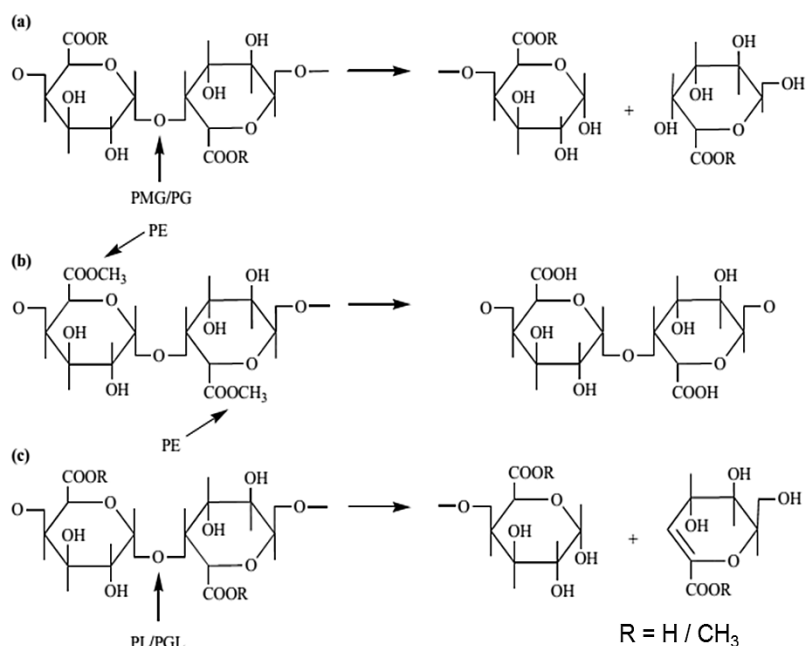
Az utóbbi években megszorodtak az olyan publikációk, melyek számítógépes dokkolási módszerekkel szűrik ki a lehetséges inhibitor molekulákat, melyek között több α -amilázzal és α -glükózidázzal kapcsolatos tanulmányt is találhatunk. Jhoung [124] ismert inhibitorokat modellezett humán és bakteriális α -amiláz és α -glükózidáz enzimekhez, majd az itt kapott pontszámokat használta fel 47 növényi komponens gátló hatásának becslésére. Hyun [125], Mohapatra [126] és Rasouli [127] szintén növényi komponenseket tesztelt. A fenti négy cikk mindegyikében fenolos vegyületek bizonyultak a legjobb gátló komponenseknek, függetlenül a kiindulási növényfajtól. Siow egy új többlépcsős folyamatot dolgozott ki, melyben köménymag eredetű fehérje hidrolizátumából azonosított, izolált és tesztelt gátló hatású oligopeptid szakaszokat [128].

2.4.2. Pektináz

A pektin növények sejtfalában előforduló, elágazásokat tartalmazó heteropoliszacharid, melynek vázát $\alpha(1,4)$ kötésekkel kapcsolódó galakturonsav egységek alkotják. A növényekben a pektin előfordulhat a normál poligalakturonsav formán kívül metilészter, vagy acetilezett formában is. Az acetil csoportok jelenléte és az elágazások száma jelentősen befolyásolja a pektinek gélesedési tulajdonságait.

A pektináz megnevezés poligalakturonsav bontó enzimek összefoglaló neve, mely több eltérő hatásmóddal működő enzimet foglal magában. A 14. ábrán látható a három legfontosabb pektin bontó enzim a poligalakturonáz (EC 3.2.1.15), a pektin-liáz (EC 4.2.2.10) és a pektin metilészteráz (EC 3.1.1.11) [129], melyek között endo- és exo hatásmódú, savas és bázikus pektinázokat is találhatunk.

A funkcionális változatosság ellenére, az enzimek szerkezete nagyfokú hasonlóságot mutat, az enzim egy hurkokkal összekötött paralell β -redőkből felépülő henger alakú doménből áll, melynek oldalán található a szubsztrátkötő hely [130].



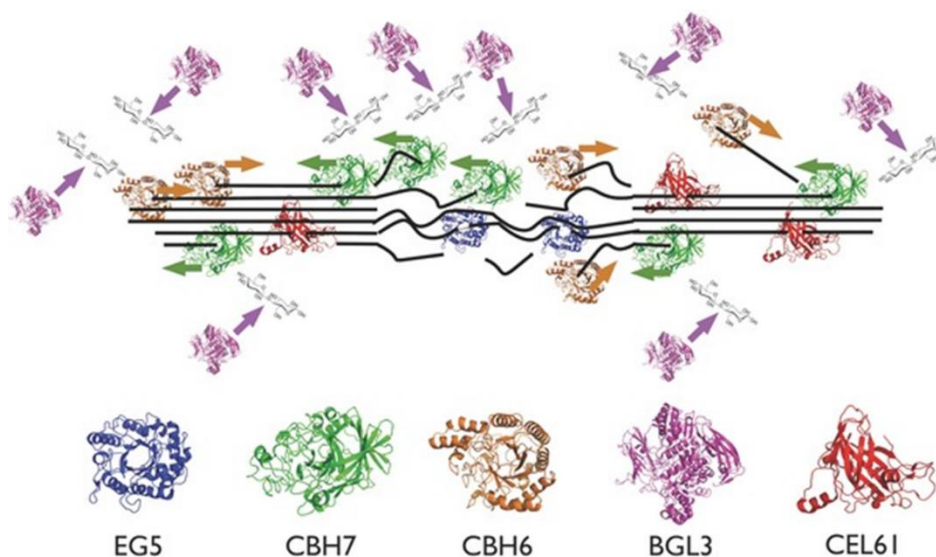
14. ábra: A pektin enzimatis lebonásának három fő típusa
a: poligalakturonáz (PG) és polimetilgalakturonáz (PMG), b: pektin metilészteráz (PE), c: pektin liáz (PL) és pektát liáz (PGL) által katalizált reakció sémája [131]

A pektin oldható, de az emberek számára emészthetetlen ételmi rostok közé tartozik, melynek nagy vízmegkötő képessége szükséges a megfelelő bélműködéshez. Ez a vízmegkötő képesség ipari szempontból hátrányt jelent, mivel a zöldségek és gyümölcsök levének kinyerését gátolja. Emiatt a pektinbontó enzimek fő felhasználási területe az élelmiszeripar, ahol mikrobiális eredetű, többféle aktivitással rendelkező enzimkészítményeket használnak a növényi alapanyagok előkezelésére [132]. A pektináz enzimek működésének vizsgálata a vízben oldhatatlan, gélesedő szubsztrát, a többféle lehetséges enzimaktivitás és a reakció nyomon követésének nehézségei miatt nem triviális feladat. Ipari körülmények között nem a háttérben működő folyamat pontos leírása, hanem a bontás hatékonyságának a növelése és a folyamat monitorozása az elsődleges cél. A folyamatot általában a pektin tartalmú minta viszkozitás csökkenésének mérésével [133], vagy a folyamat során keletkező redukáló szénhidrátok kimutatásával (pl. DNS módszer) követik [134].

2.4.3. Celluláz

A cellulóz a növényi sejtfalat felépítő, oldhatatlan, lineáris poliszacharid, melyben a glükóz egységek $\beta(1,4)$ glikozidos kötással kapcsolódnak egymáshoz. Mivel a sejtfal egyik fő felépítője, a cellulóz a Földön legnagyobb mennyiségben előforduló poliszacharid, ezzel a keletkező biotomassza és az ipari folyamatok során keletkező növényi hulladékok legnagyobb arányú alkotója. A cellulóz lebontását végző enzimrendszer (15. ábra) egyik legfontosabb tagja

a celluláz (EC 3.2.1.4) enzim, ami a poliszacharid láncon belül a glikozidos kötéseket hidrolizálja. Az enzimes család több különböző *endo*- és *exo* hatásmódú enzimet foglal magában, utóbbiak között redukáló és nem redukáló végi specificitást mutatóak is találhatóak, melyek szinergisztikusan együtt működve járulnak hozzá a cellulóz gyors lebontásához [135].



15. ábra: Cellulolitikus enzimek szinergisztikus működése [135]

EG: $\beta(1,4)$ endoglukanáz, CBH: cellobiohidroláz, BGL: β -glükózidáz, CEL: cellulóz monooxygenáz

A celluláz enzim aktivitásának vizsgálatánál is a pektináz aktivitásmérésénél leírthoz hasonló problémák merülnek fel. A szubsztrát oldhatatlan, és eltérő méretű polimerek keveréke, valamint a folyamat nyomon követése csak speciális módszerekkel lehetséges. A celluláz esetében is elterjedten alkalmazzák a redukáló cukor meghatározási módszereket, mint a DNS vagy a Somogyi-Nelson módszer (SN), de a turbiditás mérésén alapuló módszert is leírtak [136]. Azonban a redukáló cukor meghatározási eljárásoknak és köztük a DNS módszernek is megvannak a korlátai, amit a celluláz enzimmel kapcsolatban írtak le Gusakov és munkatársai [137]. Négyféle β -glikozidos kötésekre specifikus szénhidrátbontó enzim vizsgálatokor megfigyelték, hogy az eredmények, amiket DNS és SN módszerekkel kaptak akár tízszeres különbségeket is mutattak, ezzel felhívták a figyelmet az irodalomban ilyen módszerekkel meghatározott értékek bizonytalanságára. Ezek az aktivitásmérési módszerek nem tesznek különbséget a különböző hatásmódú enzimek között, hiszen vagy a hidrolízis során keletkező új glikozidos hidroxil csoportokat, vagy a szubsztrát rövidüléséből eredő oldékonyság növekedést detektálják.

3. Célkitűzések

Az ITC módszer két fő felhasználási területe a kötődési paraméterek meghatározása és enzimkinetikai vizsgálatok végzése.

Elsődleges célunk volt egy enzim vizsgálatokra univerzálisan alkalmazható ITC alapú módszer kidolgozása. Az irodalomban található egyszeres és többszörös injektálási módszerek hiányosságait kiküszöbölve, a pozitív tulajdonságok kombinálásával kinetikai és gátlási vizsgálatokhoz gazdaságosan alkalmazható eljárás leírását terveztük. Modellként egy jól ismert reakciót, a humán-nyál α -amiláz katalizálta hidrolízis reakciót választottuk. Az ITC módszer robusztusságának tesztelésére olyan méréseket is terveztünk, ami más módszerekkel nehezen vagy egyáltalán nem kivitelezhetőek, például a különféle maltooligoszacharidok hidrolízisének követése és a reakció fő kinetikai paramétereinek meghatározása. Egy kromofor csoportot tartalmazó maltooligomer sorozat segítségével célom volt vizsgálni az aromás kromofor csoportok befolyásoló hatását az enzim reakcióra. A pektin és cellulóz lebontás során egy gomba eredetű illetve egy iparban alkalmazott enzim elegy (Pektinex Ultra AFP) segítségével kívántam bemutatni a módszer alkalmazhatóságát erősen viszkózus szubsztrát, és több enzimaktivitás együttes működése esetén.

Gátlási vizsgálataink célja a népi gyógyászatban cukorbetegség kezelésére javasolt növények vizes kivonatainak a HSA katalizálta hidrolízis reakcióra kifejtett gátló hatásának tesztelése. Emellett, ezeken a méréseken keresztül annak a kérdésnek az eldöntése, hogy lehetséges-e egy sokkomponensű minta gátló hatásának vizsgálata ITC módszerrel. A HSA gátlási vizsgálatok kiterjesztéseként, apoláris, nem szénhidrát alapú szintetikus vegyületek tesztelését is terveztük, németországi partnereink által számítógépes modellezéssel kiválasztott, vízben rosszul, DMSO-ban azonban jól oldódó vegyületekkel.

Az ITC módszer által nyújtott lehetőségeket kihasználva többféle kötődési vizsgálatot is terveztünk antigén-antitest illetve ciklodextrin komplexek felhasználásával.

Munkámmal célom volt, hogy a módszert és alkalmazási lehetőségeit megismertessem a szűkebb és tágabb kutatói környezetemmel, hogy a jövőben hatékonyan tudják alkalmazni különböző biológiai és kémiai feladatok megoldása során.

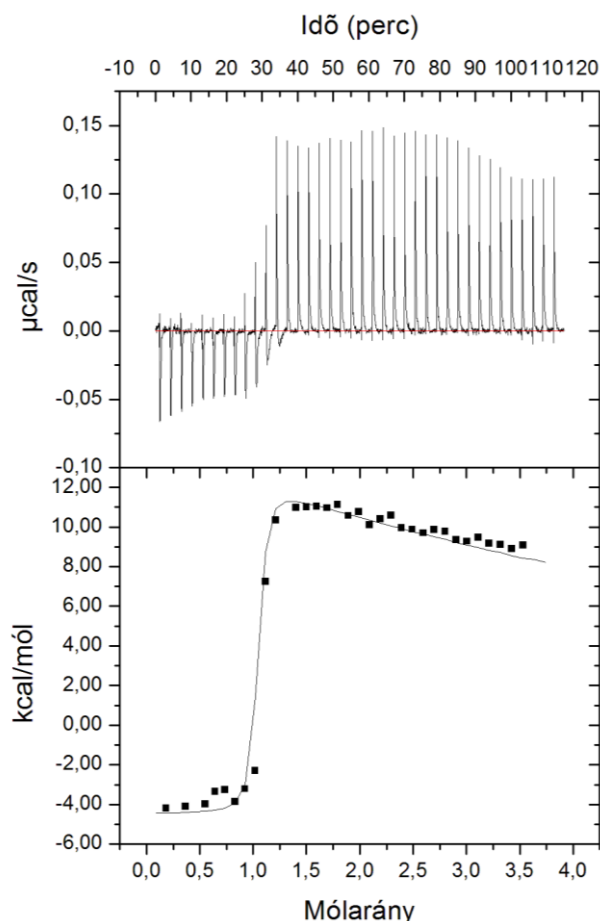
4. Vizsgálati eredmények és értékelésük

4.1. Molekuláris interakciók vizsgálata izoterm titrációs kalorimetriával

4.1.1. Humán szérum albumin és egy albumin specifikus monoklonális antitest kötődésének vizsgálata

Az albumin a vérben legnagyobb mennyiségben található fehérje, proteomikai vizsgálatokhoz gyakran szükséges, szelektív eltávolításának egyik lehetséges módszere az affinitás kromatográfia. Vizsgálataim során egy humán szérum albuminra specifikus monoklonális antitest albuminkötő tulajdonságait határoztam meg. Az antigén-antitest kötődés tanulmányozásához három eltérő elven működő módszert alkalmaztunk és a kapott eredményeket összevetettük. A kapilláris zóna elektroforézissel a kötődés sztöichiometriáját, míg az affinitás kapilláris elektroforézissel a kötődés erősségét tudtuk meghatározni. A mérések során az emberi vérre jellemző körülményeket választottunk. Ennek megfelelően a pH értékét 50 mM foszfát pufferrel pH 7,4-re, míg a hőmérsékletet 37 °C-ra állítottuk be. Az ionerősség az emberi vérnél alacsonyabb volt, ez kedvez az antigén-antitest kölcsönhatás kialakulásának [138]. Az ITC mérés fő limitáló tényezője a kölcsönhatás során kialakuló hőváltozás viszonylag kis értéke, ezért a mérések során nagy koncentrációjú albuminnal (184 μ M) titráltuk a cellában lévő, limitáltan rendelkezésre álló antitestet (8 μ M).

A 16. ábrán az ITC mérések során kapott izoterma és ennek kiértékelése látható. Az izoterma y-tengelyén látható, hogy még ezzel a viszonylag nagy koncentrációjú albumin oldattal is igen kis effektusokat mértünk, a módszer érzékenységeinek alsó határait feszegetve. Az izotermán két jól elkülöníthető rész figyelhető meg. A mérés első szakaszában negatív előjelű csúcsok láthatóak, amik exoterm reakciót jeleznek, majd az albumin koncentrációjának növekedésével a csúcsok mérete folyamatosan csökken, amíg előjel váltás következik be. Ez a mintázat általánosan előfordul több kötőhelyes reakciók esetében [139], ami a kiértékelés során be is igazolódott. A csúcsok integrálása és a megfelelő korrekciók után a kapott pontokra szekvenciális két kötőhelyes modellel tudtunk görbét illeszteni. Az ilyen típusú kötődések során 1:2 sztöichiometria alakul ki, ez jelen esetben azt jelenti, hogy egy antitest két albumint köt meg, azonban a kötődés sorrendje nem véletlenszerű.



16. ábra: *A humán szérum albumin és az albumin specifikus monoklonális antitest kötődési izotermája és kiértékelése*

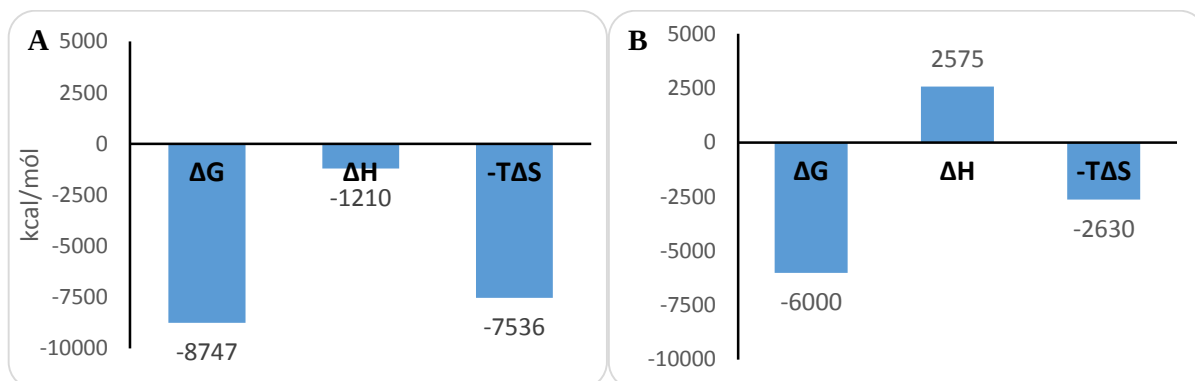
Ez a sorrendiség látszik a két kötőhely esetében számított K_D értékeken is (1. táblázat), mivel a második kötőhelynél a kötődés egy nagyságrenddel gyengébb, mint az első kötőhely esetében. Ez azt jelenti, hogy a második kötőhelyre nagy valószínűséggel csak akkor fog bekötődni az antigén, ha a szabad első kötőhely koncentrációja kellően lecsökken. A kapilláris elektroforézissel kapott adatok jó egyezést mutatnak az ITC-vel meghatározott értékekkel, ahogyan az az 1. táblázatban is látható.

1. táblázat: *A humán szérum albumin és a humán szérum albumin specifikus monoklonális antitest kötődési paraméterei*

	ACE	CZE	ITC
K_{D1}	$4,45 \times 10^{-8}$ M		$2,74 \times 10^{-8}$ M
K_{D2}	$1,08 \times 10^{-7}$ M		$1,04 \times 10^{-7}$ M
n		1:2	1:2

A módszerek tekintetében, azonban fontos megjegyezni, hogy kapilláris elektroforézissel két módszerrel elvégzett több mérés szükséges, hogy meghatározzuk a fenti paramétereket, míg az

ITC-vel viszonylag rövid optimalizálás után ezek egy méréssel (+ kontroll mérések) meghatározhatóak. Az ITC további előnye, hogy a kötődés termodinamikai paramétereiből a kialakuló kölcsönhatásra is következtetni tudunk.

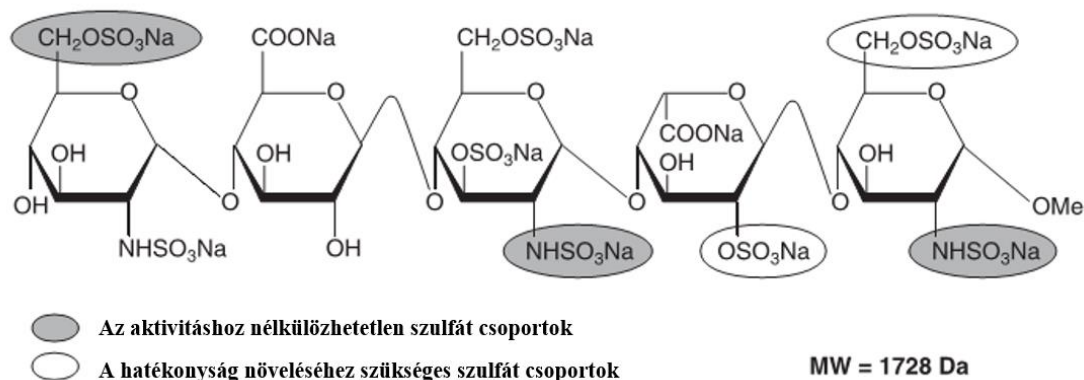


17. ábra: A vizsgált antigén-antitest kötődés ITC-vel meghatározott termodinamikai paramétere. A: az első kötőhely adatai B: a második kötőhely adatai

A 17. ábrán ábrázolt termodinamikai paraméterek is mutatják, hogy az első kötőhely ligandum kötése exoterm, míg a második endoterm folyamat, ami az izoterma előjelváltásán is látható. A $-T\Delta S$ értéke is mutatja, hogy az első kötőhelyhez nagyobb affinitással kötődik az antigén, mivel nagyobb mértékben csökken a rendszer rendezetlensége. A három paraméter egymáshoz viszonyított értéke alapján az első kötődésben hidrogén kötések és hidrofób interakciók is szerepet játszanak, míg a második kötőhely esetében elsősorban utóbbiak játszanak szerepet. A ΔS pozitív értéke a kötődés során felszabaduló felszíni vízmolekulákra utal.

4.1.2. Kationos γ -ciklodextrin és a Fondaparinux kölcsönhatásának vizsgálata

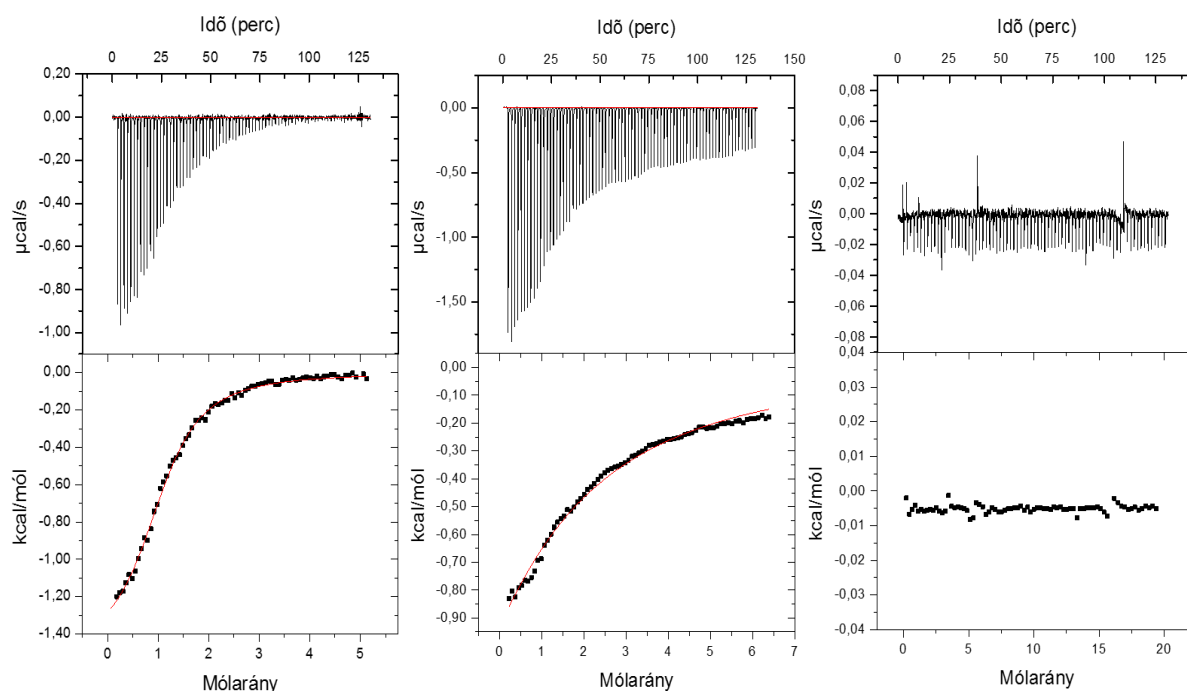
A véralvadást gátlóként alkalmazott fondaparinux (FP) egy szintetikus heparin analóg vegyület (18. ábra), aminek összetétele és szekvenciája nagyon hasonló a természetes heparinhoz, annyi különbséggel, hogy ez 5 monomerből áll, metil aglikonnal [140]. Fiziológiai körülmények között, az amid szulfát csoportok deprotonálódnak, így a molekula negatív töltésű ($pK_a \sim 2.3-3.3$). A szerkezetből való szelektív eltávolítására próbáltuk ki a kationos ciklodextrinnel való komplexálást. Méréseim során vizsgáltam, hogy egy kationos amin funkciós csoportokat tartalmazó γ -ciklodextrin (γCD^+) képes-e fiziológiai körülmények között megkötni a fondaparinuxot, és ez az erősség elegendő-e ahhoz, hogy a molekula a Xa faktor helyett a ciklodextrinhez kötődjön.



18. ábra: A fondaparinux szerkezete [141]

A vizsgált ciklodextrin származék pontos jellemzőit szabadalmi okokból nem tüntethetem fel. A molekulán található pozitívan töltött csoportok száma nem egységes, az előállítás során különböző termékek keletkeznek. A vizsgálatokhoz használt γCD^+ és az ugyanilyen funkciós csoportokkal szubsztituált maltoooktaóz (G_8^+) átlagos molekulatömege MALDI és NMR vizsgálatok alapján 1700 g/mol. A mérések során a γCD^+ mellett, a nyíltláncú G_8^+ molekulával és kontrollként hagyományos γ -ciklodextrinnel (γCD) is elvégeztem a kísérleteket. A mérések első szakasza desztillált vízben történt, semleges pH-n, hogy a rendszerben lévő ionok ne zavarják a kialakuló elektrosztatikus kölcsönhatásokat. A mérések eredményei a 19. ábrán láthatóak.

A két izotermából látható, hogy a kötődés, mind a γCD^+ ciklodextrin, mind a G_8^+ esetében exoterm folyamat. Az integrálás során kapott pontokra illesztett görbe nem a szabályos szigmoid formát mutatja, ennek az oka, hogy kisebb injektált térfogatok vagy hígabb oldat kellett volna ahhoz, hogy a görbe első részét is lássuk, azonban ebben az esetben vagy a kapott hőeffektusok nem voltak mérhetőek, vagy nem sikerült elérni a telítéshez szükséges vagy azt közelítő oligoszacharid koncentrációt a mérőcellában. A görbét egy kötőhelyes modellel tudtam illeszteni. A kapott eredmények alapján a reakció szöichiometriája mindkét esetben 1:1, az ettől való kismértékű eltérés legfőbb oka az átlagos molekulatömegből számolt koncentráció bizonytalansága.



19. ábra: A γCD^+ és FP, a G_8^+ és FP illetve a hagyományos γCD és FP kötődési izotermája és kiértékelése

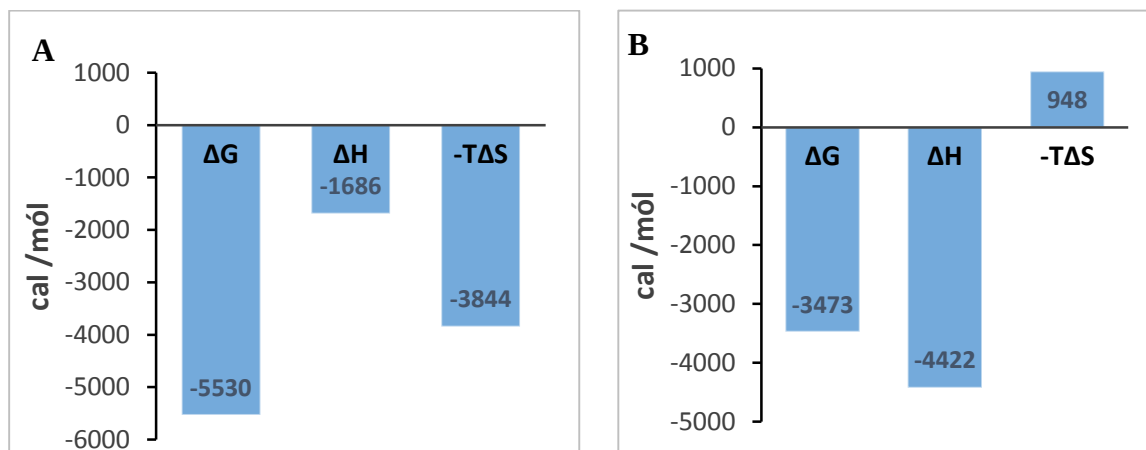
A γCD esetében nem volt mérhető kölcsönhatás a fondaparinuxsal, még igen nagy 100 mM γ -ciklodextrin koncentráció esetén sem. Abból, hogy G_8^+ maltoooktaóz a fondaparinuxot a γCD^+ -nél használt aránynál ($\sim 1:5$) nagyobb arány esetében ($\sim 1:7$) sem tudta telíteni, következtetni lehet a gyengébb kötődésre. Ezt mutatják a kapott eredmények is, melyeket a 2. táblázatban foglaltam össze.

2. 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
$-T\Delta S$ (cal/mól)	-3844	948	
ΔG (cal/mól)	-5530	-3473	

A fenti eredményekből azt a következtetést lehet levonni, hogy önmagában a ciklodextrin nem, vagy csak nagyon kis affinitással képes megkötni a fondaparinuxot, vagyis a felszíni poláros és a belső apoláros felület önmagában nem elegendő a mérhető kölcsönhatás kialakulásához. A nyíltláncú kationos forma esetében már mérhető a kialakuló kölcsönhatás, de ez viszonylag gyenge. Ennek következtében a kiértékelés során a görbe csak manuálisan volt illeszthető, ami növeli az eredmények bizonytalanságát. Az így kapott K_D érték egy nagyságrenddel elmarad a

gyűrűs formánál mért értéktől. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy önmagában sem a gyűrűs forma sem a töltött csoportok nem elegendőek egy erősebb kölcsönhatás kialakításához, a kettő együttesen játszik szerepet a kötődésben. A γCD^+ esetében a disszociációs állandóra kapott $125\ \mu\text{M}$ érték jól mérhető, azonban jelentősen elmarad a fondaparinux Xa faktorhoz való kötődésének erősségétől ($K_D = 32\ \text{nM}$) [142]. Ez azt jelenti, hogy habár a kölcsönhatás egy izolált rendszerben ki tud alakulni, a vérben ahol a Xa faktor is jelen van, ennek valószínűsége nagyon kicsi.



20. ábra: A FP kötődésének termodinamikai paramétereit A) γCD^+ és B) G_8^+ esetén

A kapott termodinamikai adatokból (20. ábra) is következtetni tudunk a kötődés hátterében lévő kölcsönhatások típusára. A kapott termodinamikai paraméterek alapján a kötődés a γCD^+ esetében együttesen entalpia és entrópia vezérelt exoterm folyamat, melyben részben hidrofób kölcsönhatások részben ionos kölcsönhatások és deszolvatáció játszik szerepet. A nyílt láncú formánál entalpia vezérelt a folyamat, vagyis az ionos kölcsönhatások dominálnak, ami érthető, hiszen hiányzik a ciklodextrinnél meglévő apoláris üreg.

Mivel a kölcsönhatás kialakulása során az elektrosztatikus kölcsönhatás hozzájárulása a legnagyobb, vizsgáltam a kötődést nagyobb ionerősség alkalmazásával is. Ebben az esetben a vizsgált komponenseket fiziológiás sóoldatban oldottam fel. Ebben a rendszerben is megismétltem a fentiekben legjobbnak talált γCD^+ - FP kötődési vizsgálatot, azonban nem sikerült mérhető kölcsönhatást kimutatni. Ez valószínűleg abból adódik, hogy a rendszerben lévő klorid ionok lekötik a γCD^+ pozitív töltéseit, enélkül pedig, ahogyan a hagyományos γCD esetében láttuk nem alakul ki mérhető erősségű kölcsönhatás. Az eredmények azt mutatják, hogy a fondaparinux eltávolítása a vérből ezzel a megközelítéssel nem lehetséges. Habár az elektrosztatikus kölcsönhatás erősségét más pozitívan töltött csoportok alkalmazásával valószínűleg lehetne fokozni, a vérben lévő ionok várhatóan ekkor is jelentősen csökkentenék a kötés erősségét, ami nem tenné lehetővé a fondaparinux eltávolítását Xa faktor jelenlétében.

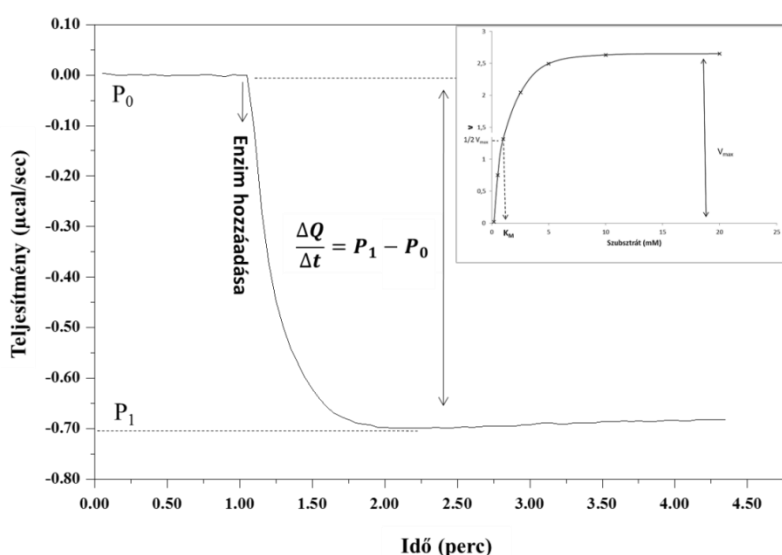
4.2. Enzimkinetikai vizsgálatok izoterm titrációs kalorimetriával

4.2.1. A kidolgozott módszer jellemzői és összevetése korábbi ITC-alapú technikákkal

Az általunk használt módszer alapelvét D'Amico 2004-es pszikrofil α -amilázok vizsgálatáról szóló cikkében [102] már leírta, azonban a módszer részleteiről, teljesítőképességéről és egyéb vizsgálatokban való alkalmazhatóságáról nem találtunk hivatkozást. Ebből adódóan úgy gondoltuk, hogy a módszer pontosabb körbejárása és leírása, illetve az alkalmazási területek kibővítése egy hatékony, jól alkalmazható módszert eredményez.

A mérések során az enzim oldata található az injektorban, amiből egy alkalommal kis térfogatot injektálunk a szubsztrát oldatát tartalmazó mérőcellába, majd mérjük a reakció eredményeként detektálható legnagyobb hőváltozás értékét (21. ábra). Ezt, az injektálás után bekövetkező maximális hőváltozás (teljesítmény változás) értéket tekintjük az adott szubsztrát koncentrációhoz tartozó reakciósebességnek. Szigorúan véve ez csak a reakciósebességgel arányos mennyiség, de egy adott kísérleti összeállításban az arányossági tényező ($\Delta H \times V$) állandó. Az ITC módszer különlegessége, hogy közvetlenül tudunk sebességet detektálni, hiszen az y-tengelyen sebesség van ábrázolva, $\mu\text{cal/s}$ vagy $\mu\text{J/s}$ dimenzióban, beállítástól függően. Ebből következően a 10. összefüggés felhasználásával, közvetlenül a reakciósebesség értékéhez jutunk.

$$v \sim \frac{\Delta Q}{\Delta t} = P_1 - P_0 \quad (10)$$



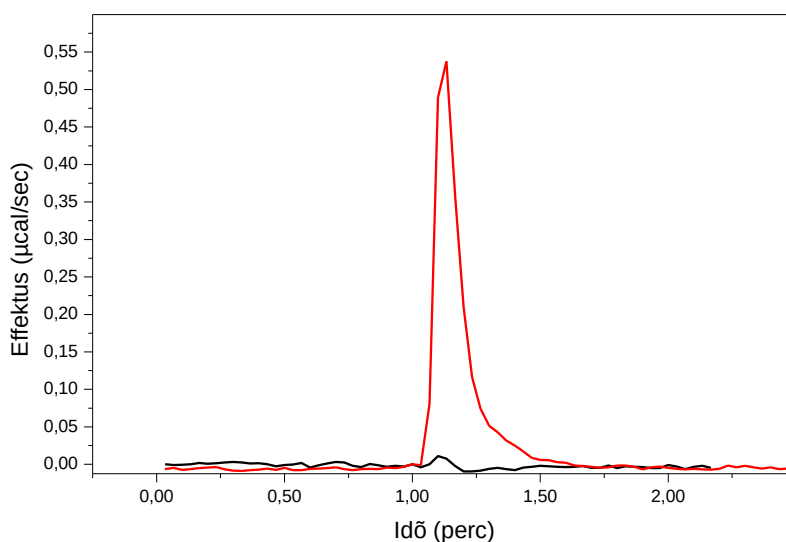
21. ábra: A reakciósebesség meghatározására alkalmazott ITC módszer termogramja, kiértékelése és K_M meghatározása. A belső képen a HSA katalizálta maltoheptaóz hidrolízis során kapott pontokra illesztett Michaelis görbe látható

A 21. ábrán egy HSA katalizálta hidrolízis reakció tipikus termogramja látható, amit 6 mM maltoheptaóz koncentráció alkalmazásával kaptunk. A mérés elején 60 másodperes késleltetéssel történik meg az injektálás, ami azért szükséges, hogy amennyiben valamilyen eltérést, bizonytalanságot vagy jelentős elmozdulást tapasztalunk az alapvonalban, a mérés még az enzim injektálása előtt leállítható. A termogramból látható, hogy a glikozidos kötés hidrolízise exoterm folyamat. Az injektálás után kialakuló állandó teljesítmény az a „steady state” állapot, amikor az enzim-szubsztrát komplex koncentrációja állandó. Az idő előrehaladtával ez az érték csökkenni kezd, ami a szubsztrát fogyásának illetve bizonyos esetekben a felhalmozódó termékek gátló hatásának tudható be.

A módszer számos előnyös tulajdonsággal rendelkezik az általánosan alkalmazott egy- és többszörös titrálási módszerekhez képest. Ez a módszer a két klasszikus módszer kombinációjának tekinthető, mivel a két módszer előnyös tulajdonságait ötvözi. Az alkalmazás során egy titrálás történik, ami az egyszeres injektálási módszerekből jól ismert, viszont az injektált térfogat a többszörös titrálási módszerekre jellemző módon csupán 1-2 μl . A mérés a fenti két módszerrel ellentétben nem tesz lehetővé folyamatos mérést, hanem szakaszosan határozhatóak meg a sebesség adatok. Ez az adott rendszernek megfelelő módszer kidolgozása szempontjából is kedvező, hiszen az optimalizálás viszonylag gyorsan elvégezhető és a többi módszerrel szemben, nem kell a teljes, általában hosszadalmas mérést megismételni 1-1 paraméter változtatásakor, csupán egy mérést, ami a módszert igen költség- és idő hatékonyá teszi. Emellett, mivel a kiértékelés alapjául szolgáló adatpontok egymástól függetlenül mért értékek, bármikor, bármelyik mérés megismételhető néhány perc alatt, illetve akár plusz mért pontok is beilleszthetők a pontosabb kiértékelés érdekében.

A módszer egyik fontos előnye a gyorsaság. Az egy injektálás és az a tény, hogy nem kell megvárunk a szubsztrát teljes hidrolízisét, azt eredményezi, hogy a módszerrel jelentősen gyorsabban lehet meghatározni a fő kinetikai paramétereket. Utóbbi tényező azért is lényeges, mert a hagyományos egy injektálásos módszernél fontos a szubsztrát és enzim arányának megfelelő beállítása annak érdekében, hogy egy teljes, értékelhető kinetikai görbét kapjunk, ez pedig hosszabb optimalizálással járhat, nem beszélve a hosszú mérési időről, ami nagy szubsztrát koncentráció esetén a teljes hidrolízishez szükséges. Az egyszeres injektálás másik problémája, hogy csak alacsony v_{max}/K_M értékű reakcióknál használható, ahol az enzim könnyebben telíthető, akár egy alacsonyabb szubsztrát koncentráció alkalmazásával. Ellenkező esetben előfordulhat, hogy egy rossz oldékonysággal rendelkező szubsztrát esetében nem tudjuk elérni a kívánt ($10 \cdot K_M$) koncentrációt.

A módszerünk alkalmazásakor az általános elrendezés, hogy a szubsztrát oldata illetve a szubsztrát és inhibitor keveréke található a mérőcellában. Ezzel az elrendezéssel kiküszöbölhetővé válik a többszörös injektálási módszereknél gyakran jelentkező két probléma, a megfelelő koncentráció elérésének és a hígulási effektusnak a problémája. Mivel a készülékekben található injektor térfogata jelentősen kisebb, mint a mintacella térfogata, bármelyik reaktáns kerül is bele, viszonylag nagy koncentrációban kell lennie, hogy egy teljes kinetikai görbét kapjunk a kiértékelés során. A többszörös titrálás során alkalmazott leggyakoribb elrendezés, amikor a szubsztrát oldata található az injektorban, amit híg enzim oldatba injektálnak. Rosszul oldódó szubsztrátoknál, vagy nagy K_M értékkel rendelkező enzim-szubsztrát pároknál azonban sok esetben nem lehet biztosítani azt a szubsztrát koncentrációt az injektorban, hogy az a cellába kerülve és meghígulva is megfelelő koncentrációt érjen el. A másik probléma, hogy ha egy nagyon koncentrált mintát egy híg rendszerhez adunk, az nagy hígulási effektust okoz (22. ábra), ami akár el is fedheti az enzimreakció által okozott hőváltozást, illetve annak egy részét. A harmadik probléma, hogy a többszörös titrálási módszerek esetében jól beállított koncentrációkra és injektálási időtartamokra van szükség, hogy a szubsztrát fogyás két injektálás között ne legyen jelentős (<10 %), illetve hogy kiértékelhető legyen a mérés. Ennek beállítása is optimalizálást és több mérést igényel.



22. ábra: Hígulási effektus mértéke 1 μ l 10 mM G_7 szubsztrát (piros) illetve 1 μ l 1,13 μ M HSA enzim injektálásakor (fekete)

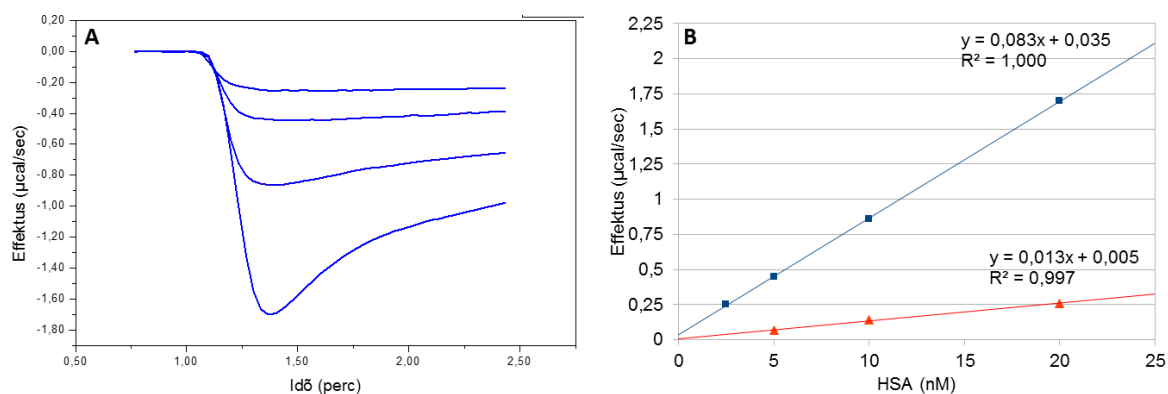
Az általunk leírt és használt módszer esetén a módszer kidolgozása és optimalizálása a megfelelő enzimkoncentráció beállítására korlátozódik. Ezt úgy kell beállítani, hogy az enzimreakció ne legyen túl gyors, de még kis szubsztrát koncentráció esetén is mérhető jelet kapjunk. A mérőcellát először a legnagyobb elérhető koncentrációjú szubsztrát oldattal töltjük

fel, amihez az enzimet adjuk, így ideális esetben telítjük az enzimet. A mérés során egyre hígabb szubsztrát oldatokkal végezzük el a mérést, egészen addig, amíg mérhető jelet kapunk. A módszer rugalmassága abban rejlik, hogy a hígítások és a mérések száma tetszőlegesen, az adott rendszernek megfelelően változtatható. Mivel a nagy koncentrációjú szubsztrát oldat a mérőcellában van és ehhez csak kis térfogatban adjuk a jóval kisebb koncentrációjú enzim oldatot, kiküszöbölhető a hígulási effektus. A mérőcella térfogata a mi készülékünk esetében ötszöröse az injektor térfogatának, így ebben az elrendezésben kiküszöbölhető a szubsztrát esetében az a legalább ötszörös, de akár kétszázszoros hígulási tényező, amivel a fordított elrendezésben számolni kellene. A mérések során a Transtrum által írt [56], az injektor szivárgásából adódó mérési problémával nem találkoztunk. Az így elvégzett mérések során a hígulási effektus és a szubsztrát enzimhez való kötődéséből származó hőváltozás elhanyagolható az enzimreakció által okozott hőváltozáshoz képest.

4.2.2. Módszerkidolgozás a HSA-katalizálta hidrolízis reakciók ITC vizsgálatára

Az emberi nyál α -amiláz mind kinetikai mind gátlási vizsgálatok szempontjából az egyik legrészletesebben tanulmányozott enzim. Ebből adódóan az irodalomban jelentős mennyiségű adat és információ áll rendelkezésre, így a módszer beállítása és a kapott eredmények értékelése szempontjából megfelelő modellrendszer.

A módszer reprodukálhatóságát és a különböző műszeres paraméterek hatását HSA-katalizálta hidrolízis reakciókkal vizsgáltam. Mivel az optimalizáció elsősorban a megfelelő enzimkoncentráció beállítását jelenti, vizsgáltam ennek hatását a kapott reakciósebesség értékekre és meghatároztam a mérések során használható koncentrációt, maltoheptaóz szubsztráton. Olyan enzimkoncentrációt választottam, ami még kis szubsztrát koncentráció esetében is mérhető értéket ad, ezért a méréseket a maltoheptaóz K_M értéke közelében (1 mM) és egy kisebb koncentráción (0,1 mM) is elvégeztem. A 23. ábra bal oldalán az 1 mM szubsztrát koncentrációnál kapott izotermák láthatóak, mellette a növekvő enzimkoncentrációkkal kapott effektusok a két eltérő szubsztrát koncentráció esetén. A mérések alapján 5 nM enzimkoncentrációt választottam a HSA katalizálta hidrolízis reakciók és gátlási vizsgálatok elvégzéséhez.



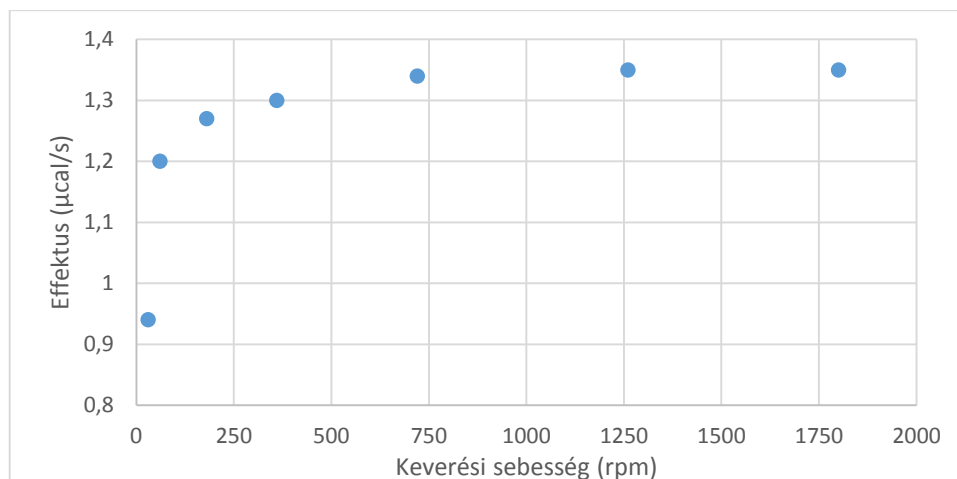
23. ábra: A mérésekhez használt enzimkoncentráció meghatározása. A: 20 nM, 10 nM, 5 nM, 2,5 nM HSA-val felvett termogramok. B: 1 mM maltoheptaóz (■) és a 0,1 mM maltoheptaóz (▲) koncentrációnál kapott effektusok enzimkoncentráció függése

A vizsgálataim során sok esetben GalG₂CNP szubsztrátot használtam, ami egy a klinikai diagnosztikában alkalmazott rövid, kromogén szubsztrát. Azonban mivel a molekula túl rövid hogy megfelelően illeszkedjen az enzim aktív helyére, különböző egyértékű aniont kell a rendszerhez adni, ami segíti a molekula megfelelő pozicionálódását és lehetővé teszi az aglikon hasítását hidrolízissel [143]. Ennek érdekében az alkalmazott rendszer 152 mM NaN₃-ot tartalmazott. Végeztem méréseket azidmentes pufferben is, ekkor a maltotrióz esetében 30 mM koncentrációnál sem sikerült elérnem a maximális reakciósebességet és még a legnagyobb koncentrációnál is csak a készülék érzékenységének alsó határát súroló effektusokat kaptam. Ebben az esetben nem sikerült pontos K_M értéket meghatározni, de becsléseim szerint az a 10 mM-os nagyságrendben mozog. Az ettől hosszabb oligomerek esetében és a keményítőnél sem tapasztaltam számottevő eltérést a K_M értékekben, így a méréseket az azidot tartalmazó a rendszerben végeztem.

A következőkben vizsgáltam a különböző, speciálisan az ITC módszerre jellemző műszeres paraméterek hatását a kapott effektusokra. Ilyen paraméterek a keverés sebessége, a referencia teljesítmény, a „feed back” mód beállítása és az injektálási sebessége.

A keverés sebessége meghatározó tényező a mérés során. Ideális esetben az injektált anyagot pillanatszerűen kell eloszlatni a mérőcellában lévő oldatban, ellenkező esetben ez torzíthatja a kapott reakciósebesség értéket és negatívan befolyásolja a kapott izoterma alakját.

Ahogy az 24. ábrán látható a keverés sebességének hatása telítést mutat, vagyis 750 rpm fölött nincs hatása a kapott sebesség értékére. A keverési sebesség értékét az alapvonalzaj miatt is körültekintően kell beállítani, a nagyobb keverési sebesség zajosabb alapvonalat eredményez.



24. ábra: Keverési sebesség hatása a kapott sebesség értékekre, keményítő szubsztráton mérve (37 °C, 2 % keményítő, 5 nM HSA)

Méréseim alapján az injektálás sebességének (0,25-4 µl/s) tartományban nincs hatása a kapott sebesség értékekre.

A referencia teljesítmény és a „feed back” mód beállítása a kiindulási teljesítményt és a hőeffektus kialakulása utáni kompenzáció érzékenységet határozza meg. Keményítő szubsztráton vizsgáltam a két paraméter hatását, de a kapott értékek 5 %-os hibahatáron belül ingadoztak, tendenciát nem mutattak. Ez abból adódhat, hogy a kötődési vizsgálatokhoz képest itt jelentősen nagyobb és hosszabb hőeffektusok alakulnak ki, amikre ezeknek a finomhangolásra szánt paramétereknek nincs érdemi hatása.

Az ITC alapú módszerek előnye a nagy érzékenység, azonban ez bizonyos esetekben hátránynak is tekinthető. Mivel a méréseim többségében a vizsgált rendszer 0,5 % keményítő szubsztrátot tartalmaz, a módszerrel kapott sebesség értékek reprodukálhatóságát 5 nM HSA-katalizálta 0,5 % keményítő hidrolízis reakción vizsgáltam. Az 5 párhuzamos mérés alapján kapott értékek RSD%-a 4,1 %-nak adódott, ami megfelel a módszerrel szemben támasztott $\pm 5\%$ -os elvárásoknak. Az értékek szórását inhibíciós vizsgálatok során is meghatároztam. A 0,5 % keményítő hidrolízisének málna levél kivonattal (1,25 mg/ml) vizsgált gátlásakor a mért sebesség értékek szórása 2,86 %-nak adódott. Ebből arra következtetek, hogy a módszer még egy ismeretlen összetételű, több komponenst tartalmazó rendszer esetén is megbízható eredményeket szolgáltat.

4.2.3. HSA katalizálta hidrolízis reakció vizsgálata három ortogonális (független) módszerrel

Miután meghatároztam az ITC-nél alkalmazott fő műszeres paramétereket és a módszer néhány teljesítményjellemzőjét, párhuzamos HPLC és spektrofotometriás vizsgálatokat végeztem,

hogy az ITC-vel kapott eredmények valódiságát és helyességét ellenőrizsem. A HPLC mérésekhez CNP-G₇ szubsztrátot és egy HPLC módszert használtam, ami során a fő terméként keletkező CNP-G₃ területének változása segítségével követtem a reakciót és ez szolgált a kiértékelés alapjául is. A spektrofotometriás mérés során egy korábban már sokszor alkalmazott rövid kromogén szubsztrátot GalG₂CNP-t használtam, ahol az enzimreakció során felszabaduló kromofor csoportot detektáltam 400 nm-en. A két módszerrel kapott és az irodalomban megtalálható eredményeket vetettem össze, az ITC által szolgáltatott adatok megfelelőségének igazolása céljából (3. táblázat).

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

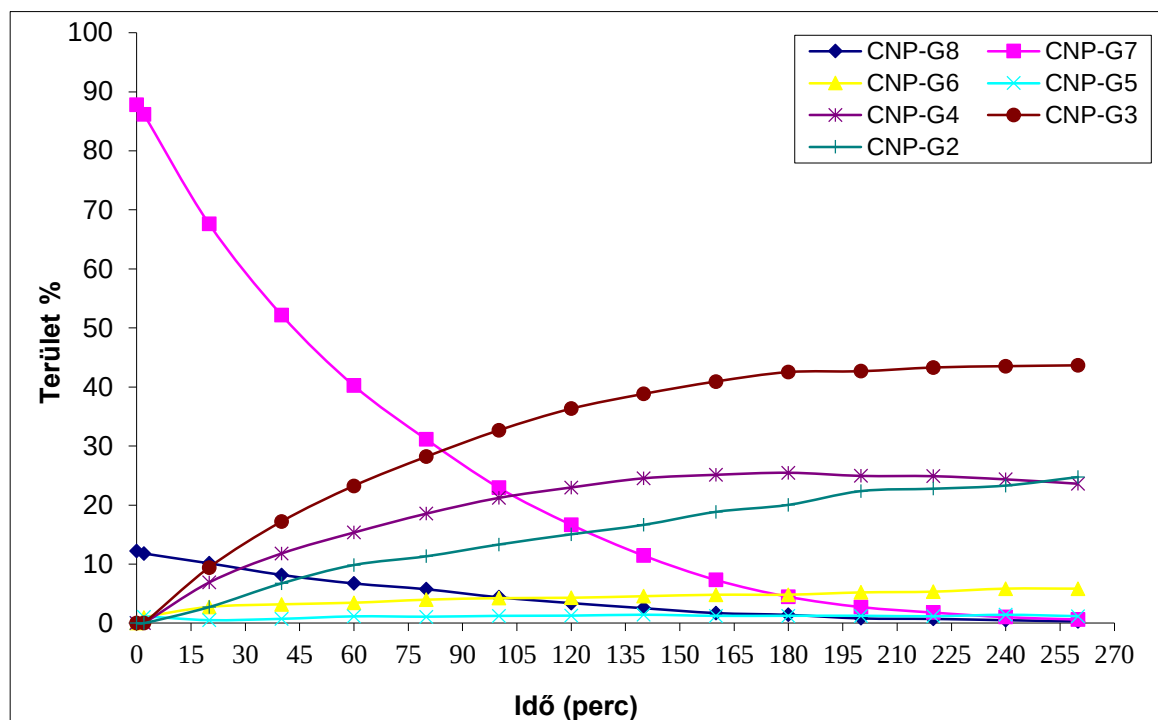
Szubsztrát	ITC	UV-VIS	HPLC	Irodalom
GalG ₂ CNP	2,8	1,0	ND	0,9 [143]
CNP-G ₇	0,6	ND	0,9	0,3 [95]

A CNP-G₇ esetében az ITC-vel kapott adatok jó egyezést mutatnak az irodalmi és a HPLC-vel meghatározott adatokkal. A heptamer esetében az irodalmi adatot α -nitrofenil glikozid szubsztráttal, kapcsolt enzim reakcióval mérték. A GalG₂CNP esetében jelentősebb eltérést kaptam a kalorimetriás mérés során. Ez azzal magyarázható, hogy az irodalmi adatok is a kutatócsoportunkban korábban, azonos körülmények között elvégzett spektrofotometriás mérésekből származnak, emiatt a két adat nagyon hasonló. A következő fejezetben látható, maltooligomer sorozat vizsgálatakor kapott tendenciába azonban teljesen beleillik ez az érték, így az eltérést a két módszer jelentős különbözőségével és a vizsgálati módszerek közötti eltérésekkel magyarázom.

4.2.4. HSA katalizálta hidrolízis reakciók K_M értékének meghatározása

Az α -amiláz természetes szubsztrátja a keményítő, azonban a klinikai diagnosztikában és a kutatásban is sok esetben maltooligomerek segítségével vizsgálják az enzim aktivitását és aktivitásában bekövetkező változásokat. A natív, kromofor-csoportokat nem tartalmazó oligomerek esetében a detektálás nehézségei, míg a kromogén szubsztrátoknál az aromás csoportok módosító hatásai befolyásolják a kapott értékeket. Emellett a rövid szubsztrátok eltérő kötődése is jelentős hatással bír. Ezeket az eltéréseket és befolyásoló hatásokat határoztam meg a leírt ITC módszerrel, ami potenciális alternatívát jelenthet az eddig alkalmazott módszerek mellett.

Vizsgálataim során kezdeti reakciósebességet mértem, amikor a szubsztrát fogyása nem éri el a 10 %-ot. Ezt igazolandó 2-klór-4-nitrofenol kromofor csoportot tartalmazó maltoheptaózzal, (12 % CNP-maltooktaozidot tartalmazott) HPLC segítségével követtem a reakció előrehaladását 260 percen keresztül és vizsgáltam a keletkező termékek arányát (25. ábra), az ITC mérésekben is használt koncentráció arányok mellett.



25. ábra: A termékarányok változása 2 mM CNP-G₇ HSA katalizálta hidrolízise során, fordított fázisú HPLC módszerrel mérve

Egy átlagos mérés az ITC-vel az injektálástól számítva 2-5 percig tart. Ezen belül, a maximális effektus eléréséhez szükséges idő, az injektálástól számított néhány másodperctől körülbelül fél percig terjed, a szubsztrát koncentrációtól függően. A fenti ábrán látható, hogy a kiindulási összetételhez képest, 2 perc után a keletkező termékek összmenyisége kb. 2 %. A 10 % konverzió eléréséhez szükséges idő kb. 10 perc. Ezek az értékek 2,6 mg/ml (CNP-G₇-re számolva 2 mM) koncentrációnál lettek meghatározva, azonban ennél kisebb koncentráció esetében is megmarad a konverzió értéke 10 % alatt, mivel ott a maximális effektus beállításához szükséges idő is rövidebb (<10-15 másodperc). Az ábra segítségével jól megfigyelhető az α -amiláz működése, az endo hatásmód. Érdekesség a sárgával jelölt CNP-G₆ szintjének a változása, ami a reakció előrehaladtával lassú növekedést mutat, holott a hidrolízis reakcióban nem keletkezik. Ennek oka, hogy az α -amiláz megfelelő koncentráció viszonyok mellett nemcsak hidrolízis reakciót katalizál, hanem ennek fordítottját is. A transzglykoizilezés következtében a növekvő mennyiségű rövid termékből hosszabb oligomerek keletkeznek, amik

viszont újra szubsztrátjai lesznek az enzimnek, és kialakul egy dinamikus egyensúly. Ez is korlátozhatja lehet az egyszeres titráláson alapuló módszer alkalmazásának, hiszen több reakció is zajlik párhuzamosan a cellában. A transzglykozilezés az általam használt konverzió tartományban elhanyagolható.

4. táblázat: A különböző szubsztrátok HSA-katakizálta hidrolízis reakcióinak ITC módszerrel meghatározott K_M értékei

	G₃	G₄	G₅	G₆	G₇	G₈	Amilóz	Keményítő
K_M (mM)	3,4	2,4	0,9	1,4	1,2	1,1		
K_M (mg/ml)	1,7	1,6	0,75	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4
	GalG₂CNP	CNP-G₄	CNP-G₆ CNP-G₇ CNP-G₈			Kék keményítő		
K_M (mM)	2,9	2,0		1,0	0,6	0,6		
K_M (mg/ml)	1,9	1,6		1,1	0,8	0,9		0,7

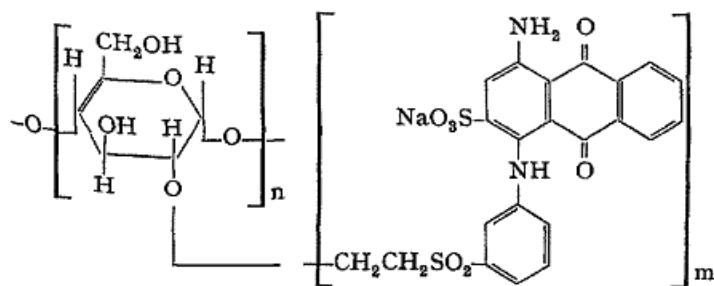
A fent említett befolyásoló tényezők vizsgálatához szabad- és kromofor csoportot tartalmazó szubsztrát sorozatot vizsgáltam és meghatároztam az egyes hidrolízis reakciók K_M értékét. Az így kapott értékeket az 4. táblázatban foglaltam össze. Mind a szabad, mind a kromofor csoportot tartalmazó sorozat esetében megfigyelhető egy csökkenő tendencia K_M értékében az oligomer tagszám növekedésével, ami arra utal, hogy a hosszabb oligomerek kötődése kedvezőbb. A szabad oligoszacharidok esetében az értékek a maltoheptaóztól kezdve nem csökkennek tovább, még az amilóz és a keményítő esetében sem, ami arra utal, hogy viselkedésében és a reakció paramétereit tekintve a maltoheptaóz a természetes szubsztráthoz hasonlóan viselkedik. Ezek alapján a maltoheptaózzal végzett vizsgálatok eredményei összevethetőek a keményítővel végzett vizsgálatok eredményeivel. A szabad oligoszacharidok esetében a tendenciából a maltopentaóz lóg ki, a többször megismételt mérés során is jelentősen kisebb K_M értékeket kaptam. Ennek oka, hogy az emberi nyál α -amiláz aktív helyére az öt glükózból álló oligomer illeszkedik a legjobban, ami a jelentősen jobb kinetikai adatok formájában nyilvánul meg. Az enzim aktív hely szerkezetéről több tanulmány is készült. Nagamine [145] kinetikai adatai alapján az HSA és HPA aktív hely szerkezete nagyon hasonló, 5 glükóz egység befogadására alkalmas. Ez alátámasztja a táblázatban is látható adatokat. A termékarányok és 3D szerkezet alapján később a kutatócsoportban elkészített alhelytérkép szerint az enzimnek legalább hét alhelye van az aktív centrumban [100], ami egybevág az

adatok maltoheptaóztól állandósuló értékeivel. A két szélső alhely energiái viszont lényegesen kisebbek, mint a többi 5 alhelyé.

Az enzim aktív helyén lévő aromás aminosavak szubsztrát kötődésben és a katalízisben játszott szerepét Ramasubbu és munkatársai írták le [95], natív és mutáns HSA enzimmel katalizált CNP-G₇ hidrolízis esetében. Ez a pozitív hatás a táblázat adataiból is látszik, hiszen az aromás kromofor csoportot tartalmazó szubsztrátok rendre kisebb K_M értékeket mutatnak, mint a szabad oligomer megfelelőik. A polimerizációs fokkal csökkenő K_M értékek ebben az esetben is megfigyelhetők egészen a CNP-G₇-ig, ahol a természetes szubsztrátnál is kisebb K_M értéknél állandósulnak az értékek. Ez is mutatja, hogy a megfelelő hossz esetében a kromofor csoport jelenléte akár a természetesnél is „jobb” szubsztrátot eredményezhet.

A GalG₂CNP esetében kapott K_M érték kb. duplája a maltoheptaóznál vagy a keményítőnél kapott értéknek, még úgy is, hogy a puffer nagy koncentrációban tartalmazott NaN₃-ot. Ebből kifolyólag ez a szubsztrát csak megfelelő körültekintéssel és megkötésekkel alkalmazható gátlási vizsgálatokra, mivel a kapott értékek a természetes szubsztráthoz képest akár nagyságrenddel nagyobb/jobb gátlást is jelezhetnek. Erre a problémára a későbbiekben, a gátlási vizsgálatoknál még visszatérek.

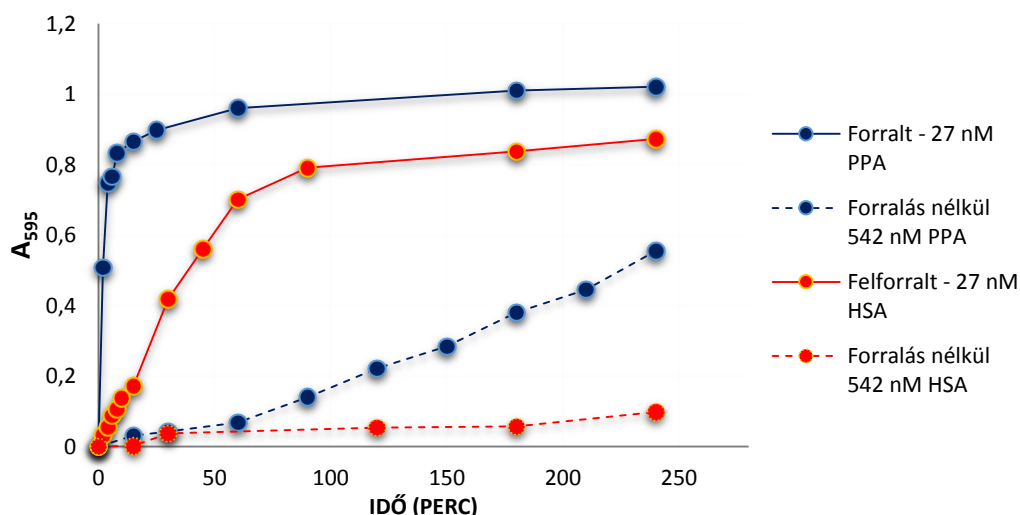
A természetes szubsztráttal történő vizsgálatok esetében a kék keményítőn történő mérések jó kompromisszumot jelentenek, hiszen a reakció ebben az esetben spektrofotometriásan követhető. A kék keményítő egy speciális, vízben rosszul oldódó, reaktív antrakinon festékkel (Remazol Brilliant Blue R), hidroxil csoportokon kovalensen módosított keményítő (26. ábra), amiből az enzimreakció során oldható oligomerek keletkeznek, az oldat színének megváltozását okozva [146].



26. ábra: A kék keményítő szerkezete [146]

A kék keményítő szubsztráton végzett kinetikai vizsgálatoknál nincs egységes leírás arról, hogy a keményítő szuszpenzió kell-e elvégezni a méréseket vagy fel kell forralni a szuszpenziót, ezáltal duzzasztva a keményítő szemcséket. Az emberi táplálkozás szempontjából a nyers keményítő kevésbé releváns, mivel a magas keményítő tartalmú növényeket (pl. burgonya,

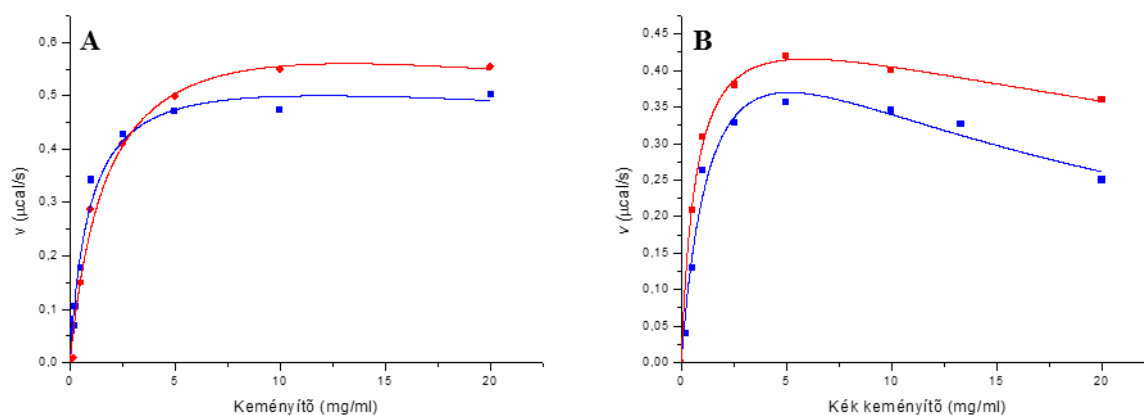
gabonafélék) általában hőkezelés után fogyasztjuk. A kék keményítőt felhasználva spektrofotometriás módszerrel ($\lambda = 595 \text{ nm}$) vizsgáltam, hogy az emberi nyál α -amiláz és a sertés hasnyálmirigy α -amiláz esetén van-e mérhető hatása a keményítő forralással való előkezelésének az enzimreakció sebességére.



27. ábra: A forralással történő előkezelés hatása a 2 % kék keményítő szubsztrát HSA és PPA katalizálta hidrolízisére

A két enzim esetében fotometriásan mértem a reakció során az abszorbancia változását 595 nm-en, majd meghatároztam a reakció kezdeti sebességét mind forralt mind szobahőmérsékleten készített kék keményítő oldat esetében. A vizsgálat során nyert adatok a 27. ábrán láthatóak. Ahhoz, hogy a forralt mintákhoz hasonló, mérhető abszorbancia változást kapjak a forralás nélküli minták esetében húszezszoros koncentrációjú enzimet kellett alkalmazni. A kezdeti reakciósebességet a görbék kezdeti lineáris szakaszának meredekségéből határoztam meg az eltérő koncentrációkkal való korrekció után. A kapott kezdeti reakciósebesség értékek azt mutatják, hogy a HSA esetében hatszázszorosa, míg a PPA esetében száznegyvenszerese a forralt keményítőn a hidrolízis reakció sebessége a forralás nélküli mintáknál számított értékekhez képest. Ez összhangban van azzal, hogy emészthetőség szempontjából a hőkezelt élelmiszerek jobban hasznosíthatóak, mint azok, amikben a keményítő szemcsék nincsenek duzzasztva [147]. Mivel az ITC-t nem zavarják a rendszer inhomogenitásai a hagyományos keményítővel forralás nélküli mintákat is vizsgáltam, azonban ebben az esetben nem kaptam mérhető változást az 5nM HSA katalizálta hidrolízis reakció során. Ezeket az eredményeket felhasználva, a dolgozatban szereplő összes további mérést felforralt keményítő oldaton végeztem, az így kapott eredmény látható a 4. táblázatban is.

ITC-vel vizsgáltam továbbá, hogy van-e eltérés a hagyományos és kék keményítő viselkedésében, vagyis a kromofor csoportokhoz hasonlóan a kék keményítőben alkalmazott festék is befolyásolja-e a reakciót. Az összehasonlítást a K_M értékek alapján végeztem el. A kapott adatok alapján az látszik, hogy a PPA katalizálta reakcióban a kapott K_M értékek valamennyivel kisebbek, 0,72 és 0,65 mg/ml a keményítő és kék keményítő esetében. A HSA esetében ez az érték 1,4 illetve 0,7 mg/ml. Ezek alapján a kék keményítő viselkedése nem tér el jelentősen a hagyományos keményítőétől.



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

Azonban a 28B. ábrán látható, hogy a kék keményítő esetében a reakciósebesség nagy koncentrációnál csökkenni kezd, vagyis szubsztrát gátlás figyelhető meg, amit a hagyományos keményítő esetében, ebben a koncentráció tartományban nem lehetett kimutatni.

A szubsztrát gátlást mutató kék keményítő esetében az ORIGIN szoftver alkalmazásával, az alábbi, szubsztrát gátlást leíró, Haldane egyenlet [148] felhasználásával végeztem nem lineáris illesztést:

$$v = \frac{v_{max} \times [S]}{K_M + [S] + \frac{[S]^2}{K_i}} \quad (11)$$

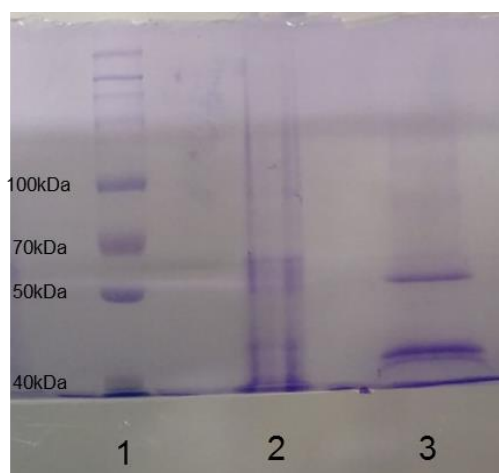
A kapott K_i értékek a HSA esetében 49 mg/ml míg a PPA esetében 16,4 mg/ml. Ez azt jelenti, hogy az α -amiláz aktivitásának vizsgálatához a gyártó (Sigma) által javasolt koncentráció mellett (20 mg/ml kék keményítő törzsoldat, 18 mg/ml kék keményítő a mintában) a szubsztrát gátlás már befolyásolhatja a kapott értékeket. Emiatt javasoljuk a kék keményítő aktivitásmérésre használt protokoll módosítását az alábbiak szerint. Emlős α -amilázok aktivitás vizsgálata során 5 mg/ml koncentrációban alkalmazzák a felfőzött keményítő szuszpenziót, majd az enzim aktivitástól függően 5-15 perc inkubáció után mérjék az abszorbancia változását. Ezzel a változtatással a módszer érzékenyebbé válik és az enzimkinetikai mérések során a detektálható

színváltozás eléréséhez kisebb enzimaktivitás is elegendő, a keményítő lánc jobb hozzáférhetősége miatt. Az 5 mg/ml szubsztrát koncentrációval a HSA és PPA enzim esetében a maximális reakciósebességet közelítjük, ahol a szubsztrát koncentrációban jelentkező kisebb eltérések az adatokban nem okoznak jelentős hibát, ugyanakkor ennél a koncentrációnál még nem jelentkezik a szubsztrát gátlás torzító hatása.

4.2.5. Pektináz és celluláz aktivitás mérése ITC-vel

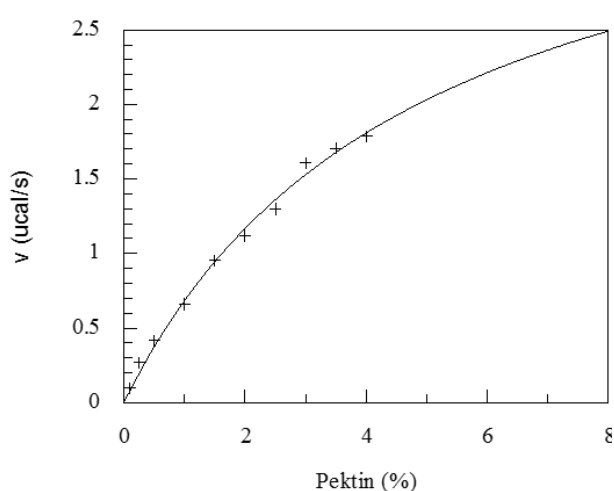
A cellulóz és pektin enzimes lebontása az élelmiszeriparban a különböző növényi alapanyagok feldolgozása során gyakran a kezdő lépések egyike. Azonban a hatékonyságot több tényező is befolyásolhatja, ezért a reakciót alkalmazás előtt optimalizálni kell, ami a szubsztrát rossz oldékonysága, a nagy vízmegkötő képesség miatti gélesedés és a detektálás nehézségei mellett nehezen kivitelezhető. Ezen kívül a lebontáshoz legtöbbször nem egy enzimet, hanem enzim elegyet használnak, és nem az egyes enzim komponensek, hanem azok együttes hatása érdekes. Eredményeimmel az ITC módszer robusztusságát szeretném bemutatni, amivel lehetővé válik egy ilyen rosszul definiálható enzimreakció hatékony követése.

Vizsgálataim során a Pektinex Ultra AFP nevű ipari enzimméztményt használtam (PU-AFP, *Aspergillus aculeatus* *Aspergillus niger*), ami egy többféle enzimaktivitással rendelkező keverék. Az ehhez hasonló kevert enzimméztmények alkalmazása azzal indokolható, hogy korábban kimutatták a pektináz és celluláz enzimek közti szinergizmust, vagyis hogy egymás aktivitását elősegítik [149]. Az ipari készítmény mellett egy kutatási célra forgalmazott, szintén *Aspergillus* eredetű pektinázt (továbbiakban pektináz) is vizsgáltam. A PU-AFP-ről és a pektinázzról készült gékép látható az 29. ábrán. Ezen látszik, hogy a PU-AFP számos komponenst tartalmaz, míg a pektináz esetében három sáv különíthető el.



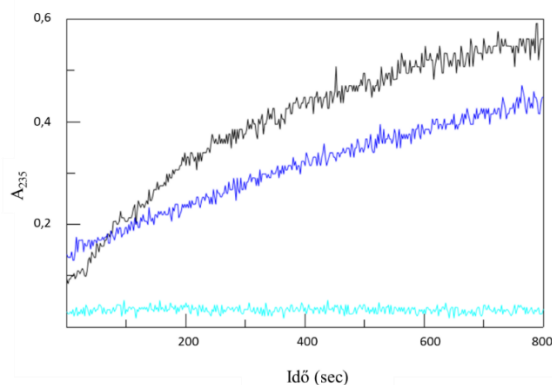
29. ábra: A sztenderd fehérje elegy (1) PU-AFP (2) és a pektináz (3) elektroforetikus elválasztásáról készült gékép

Mivel mind a pektináz, mind a később tárgyalt celluláz esetében több különböző enzimaktivitás járul hozzá a mért értékhez, így K_M érték helyett látszólagos K_M értéket (K_M') határoztam meg. Méréseimet az enzimkészítmény gyártójának javaslata és az irodalmi adatok alapján 45 °C-on végeztem. Elsőként a pektináz enzimet vizsgáltam, meghatároztam a katalizált reakció K_M' értékét és vizsgáltam, hogy ez a készítmény rendelkezik-e pektin liáz aktivitással. A K_M' érték meghatározásához 4 % pektin oldatot használtam, aminek az oldódását szacharóz hozzáadásával növeltem. A mérőcella tartalmazta a pektin szuszpenziót, majd a reakciót az enzim hozzáadásával (7 µg/ml) indítottam. A kapott sebesség értékeket és az illesztett görbét az 30. ábra mutatja. Ezek alapján a pektináz K_M' értéke 45 °C-on 4,86 %, vagyis 48,6 mg/ml.



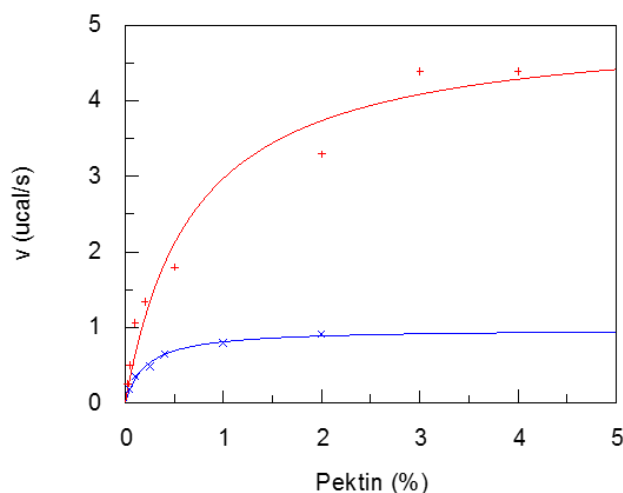
30. ábra: A pektináz K_M' értékének meghatározása ITC-vel 0,1-4 % pektin szubsztráton

Az enzim rendelkezik liáz aktivitással is, amit spektrofotometriásan igazoltam. Ehhez a 0,3 mg/ml koncentrációjú enzim oldatból 15 illetve 50 µl-t adtam a 400 µl 0,6 % szubsztrát oldathoz (végtérfogat 500 µl, pufferrel kiegészítve), majd a kettős kötést tartalmazó termék elnyelési maximumán, 235 nm hullámhosszon követtem a keletkező termék mennyiségét (31. ábra).



31. ábra: A pektináz pektin liáz aktivitásának vizsgálata 0,6 % pektin szubsztráton spektrofotometriásan, 235 nm hullámhosszon
— kontroll, — 15 µl és — 50 µl enzim

A PU-AFP esetében a gyártói leírás alapján a fő enzim aktivitás a pektin liáz és a poligalakturonidáz. A készítmény tisztítás után is sötétbarna színű, ami nem tette lehetővé a liáz aktivitás fent leírt spektrofotometriás vizsgálatát. A készítmény pektináz és celluláz aktivitását 25 és 45 °C-on, 0,1 – 4 % koncentráció tartományban ITC-vel vizsgáltam (32. ábra).

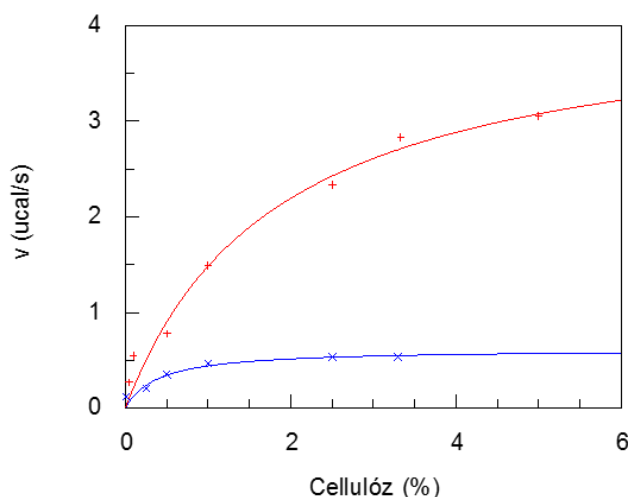


32. ábra: A PU-AFP által katalizált pektin lebontás sebességének szubsztrát koncentráció függése 25 °C (kék) és 45 °C-on (piros)

Jól látható, hogy az enzim a gyártó által ajánlott 45 °C-on sokkal nagyobb sebességgel működik, mint szobahőmérsékleten. Ha a két hőfokon kapott K_M ' értékeket hasonlítjuk össze, azt láthatjuk, hogy az alacsonyabb hőfok esetében a maximális reakciósebesség 50 %-nak eléréséhez 0,2 % (2,1 mg/ml) szubsztrát koncentráció is elegendő, azonban a maximális sebesség is jóval alacsonyabb (1 μcal/s). A 45°C-on végzett mérések esetében a K_M ' érték 1 % (10,1 mg/ml), de a számított maximális reakciósebesség ötször nagyobb (5,4 μcal/s). Összevetve a PU-AFP és a pektináz K_M ' értékeit, az látszik, hogy az ipari enzimműködés esetében már ötöd akkora szubsztrát koncentrációnál elérhető a legnagyobb reakciósebesség, ami a hatékonyság szempontjából kedvező. Ezt a különbséget okozhatja, hogy a PU-AFP készítményben több eltérő aktivitással rendelkező pektin bontó enzim is megtalálható, míg a kutatási célra szánt, tisztított pektináznál kimutatható ugyan liáz aktivitás, de ennek a hozzájárulása a reakcióhoz valószínűleg csekély. Emellett az ipari enzimműködésben lehetnek további olyan enzimek, amik segíthetik a pektin lebontását.

Az egyik ilyen kiegészítő enzim a celluláz, aminek az aktivitása szintén jól detektálható. Ennek a jelenléte az irodalmi összefoglalóban említett szinergizmus miatt indokolt, illetve mivel a cellulóz a növényi sejtfal egyik fő alkotója, ennek megbontása szintén hozzájárul az ipari folyamatok (pl. a gyümölcslé kinyerésének) magasabb hatékonyságához. A celluláz aktivitást ugyanabban az ITC rendszerben vizsgáltam, mint a pektin lebontását, a cellulóz szubsztrát

oldatot a mérőcella tartalmazta, amihez a PU-AFP enzimekészítményt adtam. A vizsgált cellulóz koncentráció tartomány 0,1-5 % (1-50 mg/ml) volt, ahol szintén 25 és 45 °C-on végeztem a méréseket. A K_M értékek meghatározásához ebben az esetben is szubsztrát koncentráció – sebesség grafikont készítettem (33. ábra).



33. ábra: A Pektinex Ultra AFP enzimekészítmény által katalizált cellulóz hidrolízis sebességének szubsztrát koncentráció függése 25 °C (kék) és 45°C-on (piros)

Hasonlóan a pektin bontásnál kapott eredményekhez, itt is jelentős eltérés figyelhető meg a 25 és 45 °C-on kapott sebességi és K_M értékek között. 25 °C-on mérve a reakció K_M értéke 0,39 % (3,9 mg/ml) volt, azonban a rendszer a maximális reakciósebességet már 1 % cellulóz koncentrációnál elérte (0,6 μcal/s). Ezzel szemben, 45°C-on a 5 % cellulóz koncentráció esetén sem sikerült elérni a maximális sebességet (~4,2 μcal/s), a K_M értéke a Grafit program alapján 1,83% (~18,3 mg/ml). A görbeillesztések alapján a két rendszer maximális sebessége között körülbelül hétszeres sebességkülönbség van.

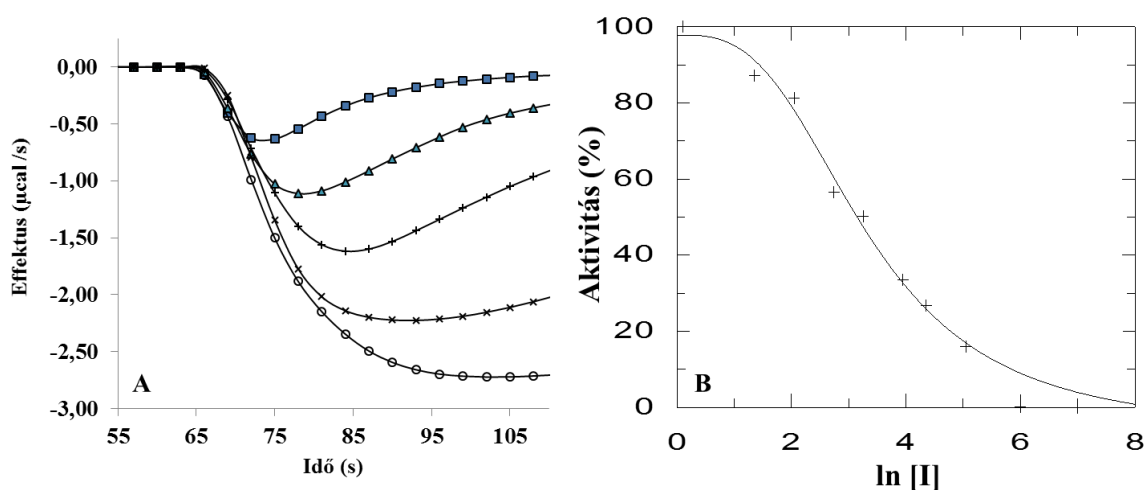
Ezeket a méréseket annak demonstrálása céljából végeztem el, hogy ITC alapú módszerrel jól követhetők az inhomogén viszkózus rendszerekben történő reakciók is. Mind a pektin, mind a cellulóz esetében volt olyan koncentráció, ahol szobahőmérsékleten nem lehetett elvégezni a mérést, annyira viszkózus volt a szubsztrát (5. táblázat) oldata. A pektin esetében 2 % fölött, míg a cellulóz esetében 3,3 % fölött a cella feltöltésére szolgáló fecskendővel nem lehetett felszívni a sűrű gél, így ekkor sem a készülék paraméterei akadályozták a mérés elvégzését.

5. táblázat: A vizsgált gélesedő szubsztrátok Ostwald-Fenske viszkoziméterrel meghatározott viszkozitása 25 és 45 °C-on

	Viszkozitás (mPas)		
	4 % Pektin	5 % Cellulóz	2 % Keményítő
25°C	102.5	158	1.7
45°C	59.3	103.7	1.3

4.3. Enzimgátlás vizsgálata izoterm titrációs kalorimetriával

Az enzimgátlás vizsgálatakor az enzimreakció sebességében bekövetkező változásokat határozzuk meg különböző inhibitor molekulák jelenlétében, a kinetikai méréseknél leírt módszerek segítségével. Annak ellenére, hogy az ITC esetében a sebesség meghatározására közvetlenül van lehetőség, kevés ilyen típusú tanulmányt írtak eddig. Az enzimgátlási vizsgálataim során új, potenciális humán nyál α -amiláz inhibitorokat kerestem, amihez az előzőekben leírt módszert és 0,5 % keményítő szubsztrátot használtam. Ebben az esetben is elvégeztem a módszer által szolgáltatott adatok „ellenőrzését”, amihez egy kereskedelmi forgalomban lévő inhibitort, akarbózt használtam. Az alkalmazott módszer a kinetikai mérésektől annyiban tér el, hogy a mérőcella a szubsztrát mellett az inhibitort is tartalmazza, a reakció ebben az esetben is az enzim hozzáadásával indul (34. ábra).



34. ábra: Az akarbóz IC_{50} értékének meghatározása 0,5 % keményítő szubsztráton.
A: A gátlási vizsgálat nyers adatai ($[I] = \circ: 0 \mu M, \times: 7,75 \mu M, +: 25,8 \mu M, \blacktriangle: 52 \mu M, \blacksquare: 155 \mu M$) B: az akarbóz dózis-hatás görbéje

Az 34. ábrán látható a reakciósebesség, inhibitor koncentráció növekedésével párhuzamos csökkenése. A kiindulási értéket az üres körökkel jelölt adatsor mutatja, melyet inhibitor hozzáadása nélkül 0,5 % keményítő oldaton rögzítettem. A 0,5 % keményítő koncentráció használatát az indokolta, hogy a kinetikai mérések alapján az enzim itt már közel maximális reakciósebességgel dolgozik, vagyis a koncentráció kismértékű megváltozása nem befolyásolja jelentősen a kapott sebesség értékeket.

A módszer alkalmazhatóságának és a kapott adatok helyességének ellenőrzésére keményítő mellett G₇ és GalG₂CNP szubsztrátokon is meghatároztam az akarbóz IC_{50} értékét, ehhez ITC és spektrofotometriás módszereket használtam. Ezeket az eredményeket a 6. táblázatban foglaltam össze.

6. táblázat: Az akarbóz különböző módszerekkel meghatározott IC_{50} és K_i értékeinek összehasonlítása eltérő hosszúságú szubsztrátok esetében

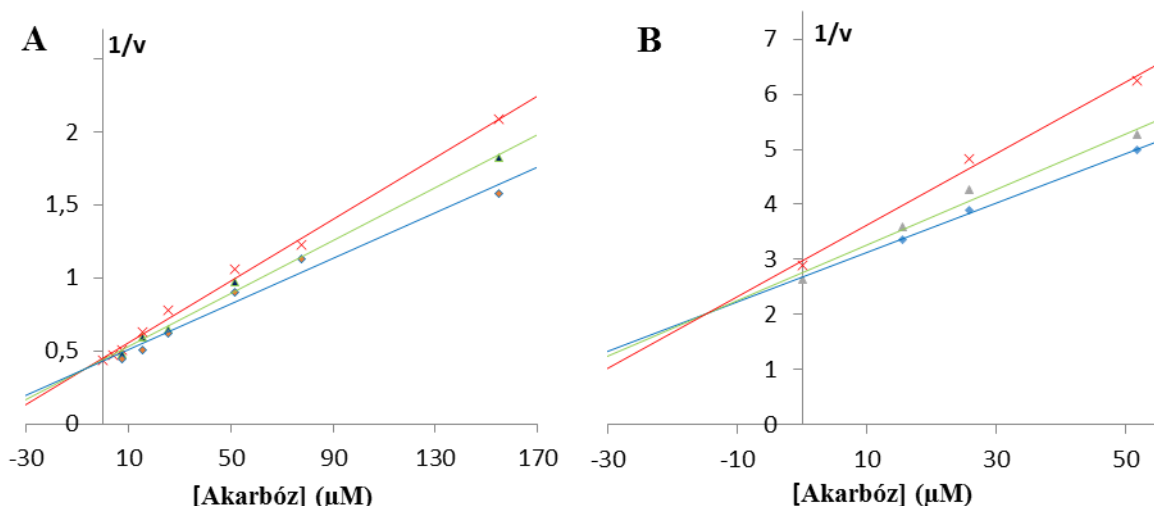
Szubsztrát	IC_{50} (μM)		pIC_{50}	K_i (μM)	
GalG₂CNP	0,66	UV	6,15	0.24	Számított
	0,88	ITC	6,04	0.28	Számított
G₇	18,55	ITC	4,73	5.43	Számított
Keményítő	29	ITC	4,53	8	Mért

A GalG₂CNP esetében a két módszerrel elvégzett párhuzamos mérések eredményei mutatják, hogy az ITC-vel kapott eredmények reálisak. Ha megfigyeljük a növekvő hosszúságú szubsztrátok esetén kapott IC_{50} és pIC_{50} értékek változását, megfigyelhető az egyértelmű tendencia. Ennek oka, hogy az akarbóz átmeneti állapot analóg, kompetitív inhibitor, vagyis a kötődése során a szubsztráttal verseng. Minél jobb a szubsztrát kötődése az enzim aktív helyén, annál nagyobb koncentrációban kell alkalmazni az inhibitort. A GalG₂CNP kötődéséről tudjuk, hogy gyenge, mivel már a kötés hasításhoz szükséges megfelelő illeszkedéshez is egyértékű anionokra (pl. azid ion) van szükség, így nem meglepő a kapott kis IC_{50} érték. A maltoheptaóz (G₇) esetében az illeszkedés megfelelő az aktív helyen, ami két nagyságrenddel nagyobb IC_{50} érték formájában jelentkezik. A G₇ és a keményítő kötődése között nincs jelentős különbség, ahogy az a kinetikai mérések eredményeiből is látható volt. A nagyobb IC_{50} érték azzal magyarázható, hogy a keményítő láncának megfelelő illeszkedéséhez a szénhidrát kötő modulok is hozzájárulnak, ami hatékony pozicionálást tesz lehetővé. Másrészt a keményítő hidrolízis termékei is szubsztrátjai az enzimnek (konszekutív reakció) így a G₇-tel ellentétben a hasítható kötések száma csak a reakció későbbi szakaszában indul fogyáshoz, ami további kompetitorok jelenlétét jelenti az oldatban.

Az irodalmi adatokkal való összevetés gátját az irodalomban található adatok diverzitása jelenti. Az akarbózt a klinikai felhasználásán kívül széles körben alkalmazzák *in vitro* kutatásokban is, mivel a hatásmechanizmusa ismert és jó gátlási hatékonysággal rendelkezik. Annak ellenére azonban, hogy számos kutatásnál pozitív kontrollként használják, például az irodalomban az HSA és PPA katalizálta keményítő bontási reakcióra meghatározott IC_{50} értékek jelentős eltéréseket mutatnak (0,9 μM [112], 40,7 μM [150], 128 μM [124], 1 mM [151]), melyek a mérési körülmények (szubsztrát típusa, koncentrációja) eltéréseivel csak részben magyarázhatóak.

$$K_i = \frac{IC_{50}}{(S/K_m + 1)} \begin{cases} \text{if } S = K_m, & K_i = IC_{50}/2 \\ \text{if } S \gg K_m, & K_i \ll IC_{50} \\ \text{if } S \ll K_m & K_i \cong IC_{50} \end{cases} \quad (12)$$

Az inhibitorok jellemzésére használt másik paraméter a K_i , ami az inhibitor disszociációs állandója. A fenti táblázatban feltüntettem a három szubsztrát esetében a K_i értékét is, amit a rövid szubsztrát esetében a Cheng-Prusoff összefüggéssel (12. egyenlet) számítottam, míg a keményítő esetében Dixon módszerrel határoztam meg (35. ábra).



35. ábra: Az akarbóz K_i értékének meghatározása Dixon módszerrel keményítő szubsztráton ($\times$:0,05 % $\blacktriangle$:0,126 % $+$: 0,5 %). A: a HSA B: a PPA enzimmel elvégzett kísérlet eredménye

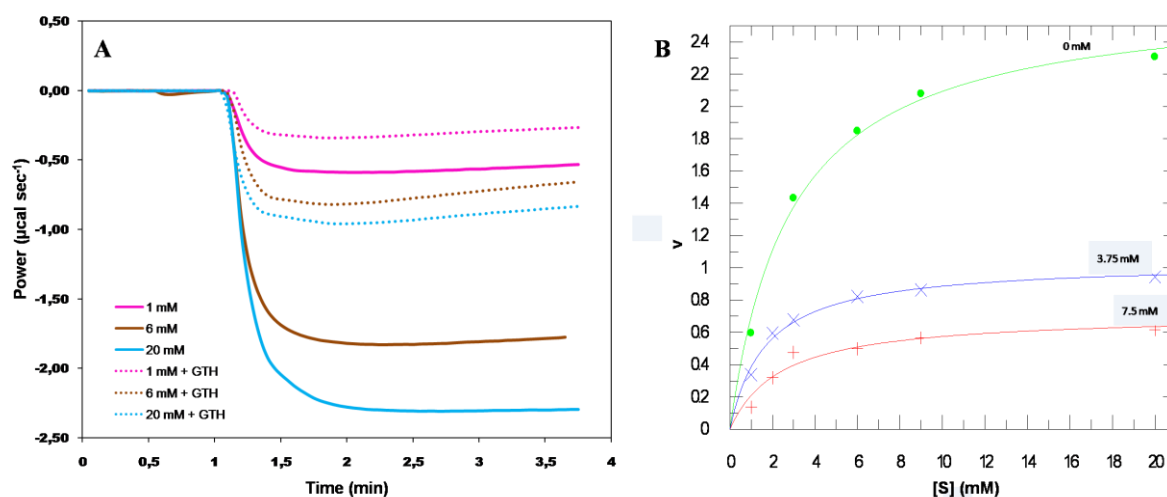
Ehhez eltérő szubsztrát koncentrációknál mértem az akarbóz koncentráció sorozat sebesség csökkentő hatását. Az $1/v$ értékeket az inhibitor koncentráció függvényében ábrázolva az illesztett egyenesek metszéspontjának abszolút értéke adja az inhibitor konstans értékét.

A K_i érték meghatározása a Dixon módszer mellett egy hagyományos ITC kötődési vizsgálattal is elvégezhető. A HSA esetében nem állt rendelkezésünkre elegendő fehérje egy kötődési vizsgálat elvégzéséhez, így PPA-val dolgoztam. Annak érdekében, hogy összevethető eredményeket kapjak, a PPA esetében is elvégeztem a Dixon-féle K_i meghatározást is.

A PPA esetében a két módszerrel meghatározott K_i értékek között egy nagyságrend különbség mutatkozott. A Dixon ábrázolás alapján a K_i érték $12 \mu M$ értéknek adódott, ami jó egyezést mutat a HSA esetén meghatározott $8 \mu M$ -os értékkel. Az ITC kötődési vizsgálat esetében azonban $0,85 \mu M$ értéket határoztam meg a kapott izoterma kiértékelése során. Habár a Dixon módszernél az eltérő szubsztrát koncentrációk alkalmazása kiküszöböli a szubsztrát befolyásoló hatását a kapott értékre, ennek ellenére a különbség mégis részben erre vezethető vissza. Az eltérés másik okozója a linearizálás hibája, ami növeli a kapott értékek bizonytalanságát. Ezekre a megállapításokra jutott Karrar is [152], amikor három eltérő kiértékelési módszer összehasonlítása során nagyságrendi eltérést tapasztalt a Dixon módszerrel kapott érték

esetében. Az ITC módszernél a rendszer csak az enzimet és az inhibitort tartalmazza, így a zavaró hatások jelentősen csökkenthetőek.

Az inhibitorok vizsgálatának másik jelentős területe a gátlás típusának meghatározása. ITC-vel kapott eredményeket azonban nem találni az irodalomban, leszámítva a szubsztrát és termék gátlással kapcsolatos írásokat. A gátlás típus meghatározásánál klasszikusnak számító Lineveawer-Burk kettős reciprok módszer a linearizálás hibája miatt manapság már nem tekinthető elég megbízhatónak, így ebben az esetben is nem lineáris regressziót használnak, ahol a paraméterek (K_M , v_{max}) változásából lehet következtetni a gátlás típusára. A fent leírt ITC módszer analóg módon használható a gátlás típusának meghatározásához, mint a klasszikus spektrofotometriás módszer, vagyis különböző inhibitor koncentrációkat alkalmazva mértem a reakció szubsztrát koncentráció függését, majd meghatároztam a kinetikai paramétereket, a kinetikai méréseknél leírt módon (36. ábra).



36. ábra: A GTH gátlás típusának meghatározása ITC módszerrel, 1-20 mM GalG₂CNP szubsztrát alkalmazásával

A gátlás típusok meghatározását két, korábban jellemzett inhibitorral, akarbózzal és glükopiranozilidén-spiro-tiohidantoinnal (GTH) végeztem el, emellett egy több komponenszt tartalmazó vizes növényi kivonat (sztívia) gátlási típusát is vizsgáltam. Az akarbóz esetében a korábban is használt GalG₂CNP mellett G₇ szubsztráton, a GTH-t és sztívia esetében csak GalG₂CNP szubsztráton vizsgáltam a gátlás típusát spektrofotometriásan és ITC-vel. Az egyes inhibitorok különböző szubsztrátokon kapott gátlási típusai a 7. táblázatban láthatóak.

7. táblázat: A vizsgált inhibitorok különböző szubsztrátokon UV-VIS és ITC módszerekkel meghatározott gátlás típusa

Inhibitor	Szubsztrát	Módszer	Gátlás típusa
Akarbóz	GalG ₂ CNP	UV-VIS	kompetitív
		ITC	vegyes
Akarbóz	G ₇	ITC	vegyes
GTH	GalG ₂ CNP	UV-VIS	vegyes [100]
		ITC	vegyes
Sztívia kivonat	GalG ₂ CNP	UV-VIS	kompetitív
		ITC	vegyes

Az akarbózt, mint átmeneti állapot analóg inhibitor az irodalomban kompetitív inhibitorként tartják számon. Azonban a táblázatban látható, hogy a két módszerrel kapott gátlás típusok nem egyeznek meg egymással. A korábban taglalt akarbóz kötődési vizsgálat eredményéből kiderül, hogy az inhibitor nem csak az aktív helyre tud bekötődni, emiatt térhet el a gátlás típusa a várt kompetitív formától. A GTH esetében a korábban leírt gátlási típussal megegyező eredményt kaptam az ITC módszerrel elvégzett vizsgálat során. A sztívia kivonat esetében is megfigyelhető eltérés a két módszer között. A sztívia fő alkotói a szeviol glikozidok, köztük legnagyobb mennyiségben a szteviozid és a rebaudozid. A találhatóak meg a növényben, amelyek a kereskedelmi forgalomban is kapható, természetes édesítőszer. A sztívia gátlási tulajdonságairól a későbbiekben még részletesebben is lesz szó.

4.3.1. Gyógy- és fűszernövények HSA gátló hatásának vizsgálata

Az előző fejezetben látható volt, hogy a módszer alkalmas enzim gátlás vizsgálatára, jól definiált rendszer esetében helyes eredményeket szolgáltat. Ennek fényében vizsgáltam olyan vizes növényi kivonatokat, melyek összetétele nem meghatározott és fizikai jellemzőik (pl. szín, rossz oldékonyság) nem teszik lehetővé a hagyományos spektrofotometriás módszerek alkalmazását.

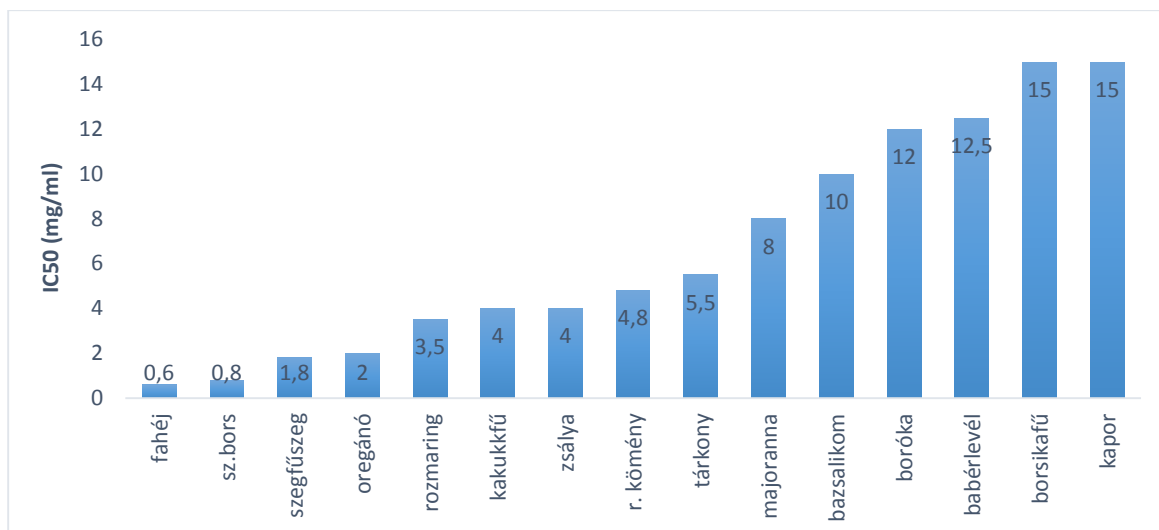
A célom az volt, hogy minél pontosabban modellezsem a táplálkozással bevitt növények emésztő enzimre gyakorolt gátló hatását. 0,14 % forralt keményítő szubsztrátot (HSA-keményítő reakció K_M értéke) használtam a mérésekhez. Vizsgálataim során száraz növényi részekből készített forró vizes extraktumokat (tea) vizsgáltam, melyeket az összehasonlíthatóság és a koncentráció meghatározása érdekében liofilizáltam. Az így kapott száraz kivonatokat, minden további minta előkészítés nélkül vizsgáltam és meghatároztam a

HSA enzim gátló tulajdonságaikat. A vizsgált növények között megtalálhatóak a leggyakrabban alkalmazott fűszerek, a népi gyógyászatban cukorbetegség és emésztőrendszeri panaszok kezelésére javasolt gyógynövények, az édesítőszerként használt sztívia és néhány egyéb, általánosan ismert, Közép-Európában őshonos gyógynövény. Az így kapott növényi kivonatokat 0-15 mg/ml koncentráció tartományban vizsgáltam és meghatároztam az IC₅₀ értéküket illetve a maximális gátló hatásukat.

A vizsgált 25 fűszernövény közül 22 esetben volt mérhető a reakciósebesség csökkenése (37. ábra), míg a vöröshagyma, mustármag és a szerecsendió esetében a kontroll értéktől magasabb reakciósebesség értéket mértem, ami a vizes kivonat jelentős, az enzim számára bontható szénhidrát tartalmának a következménye. A petrezselyem, koriander, ánizs, fűszerkömény, fokhagyma, lestyán és turbolya esetében a vizsgált koncentráció tartományban nem sikerült elérni az 50 %-os gátlást, így ezekben az esetekben nem határoztam meg IC₅₀ értéket. A 15 IC₅₀ értékkel rendelkező növény közül a fahéj és a szegfűbors gátlási tulajdonságai bizonyultak a legjobbnak, melyek IC₅₀ értékei 1 mg/ml érték alatt maradtak (0,6 illetve 0,8 mg/ml), míg 2,5 mg/ml koncentrációnál 80 % feletti aktivitás csökkenés volt megfigyelhető. Tovább növelve a koncentrációt, az enzim aktivitását teljesen sikerült gátolni.

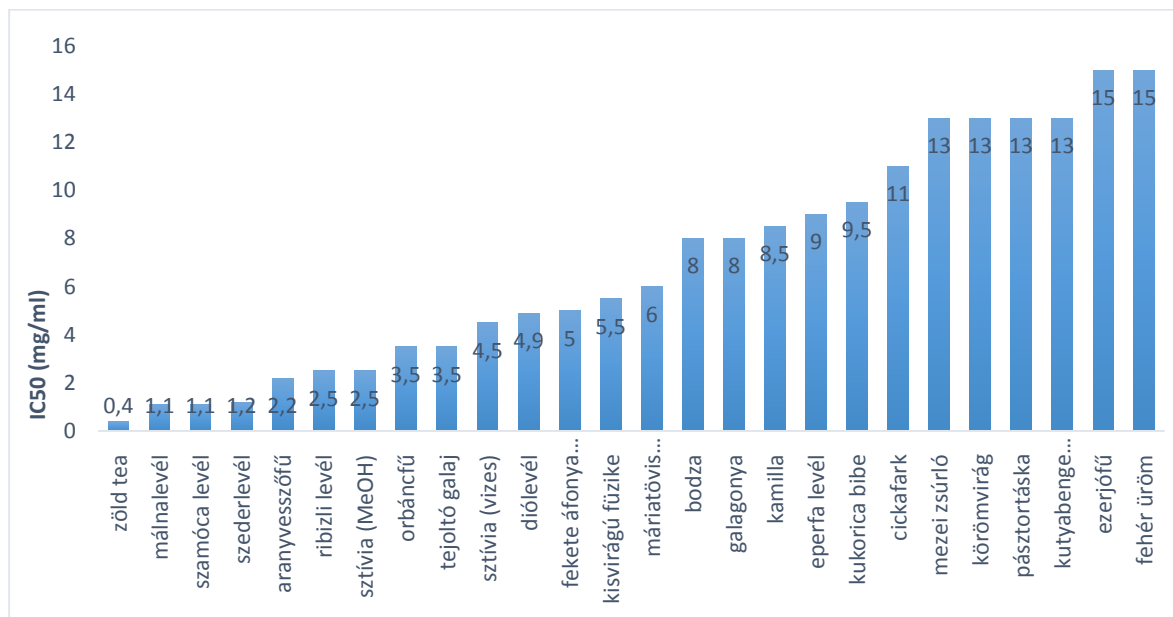
A fahéj esetében találhatunk a kapott eredményeket alátámasztó korábbi irodalmi adatokat. Keményítő szubsztráton, DNS módszerrel vizsgálták többféle fahéj vizes kivonatának α -amiláz, maltáz és szacharáz gátló hatását [153]. Eredményeik alapján a kivatok IC₅₀ értékei az α -amiláz esetében 1,2-4 mg/ml, a másik két enzim esetében 1 mg/ml alattiak voltak. Az akarbózzal együtt alkalmazva, ebben az esetben is megfigyelhető volt a szinergizmus. A fahéjjal kapcsolatban több *in vitro* és *in vivo* tanulmány született, melyet egy összefoglaló cikkben összegeztek [154]. Ennek fő megállapítása a mi eredményeinkkel azonos, a fahéj jó kiegészítője lehet a hagyományos diabétesz vagy elhízás elleni terápiának. A szegfűbors esetében jóval kevesebb irodalmi előzményt találni. Egy 2016-os publikációban etanolos szegfűbors kivonat hatását tesztelték keményítő szubsztráton DNS módszerrel, és 148 μ g/ml-es IC₅₀ értéket mértek. Ez nagyságrendileg megegyezik az általunk, vizes kivonat esetében kapott 800 μ g/ml értékkel.

A szegfűszeg és oregánó is 90 % fölötti maximális gátlást ért el, azonban az IC₅₀ értékük elmaradt az előző két növényétől. A maradék 11 növény esetében 50-75 % közötti gátlás volt megfigyelhető a vizsgált koncentráció tartományban.



37. ábra: A HSA katalizált keményítő hidrolízis folyamatára gátló hatást kifejtő fűszernövények IC₅₀ értékei

A gyógynövények esetében 33 növényből 35 minta készült, ezeknél is a fent leírt módon jártam el a gátlási vizsgálatok során. A 35 gyógynövény kivonat mindegyikénél volt mérhető csökkenés a hidrolízis sebességében, azonban 8 minta (gyermekláncfű levél és gyökér, csalán, mályva levél, fehér babháj, rebarbara gyökér, bíbor kasvirág, kecskeruta) esetén nem tudtam IC₅₀ értéket meghatározni. A fehér babháj mintánál a kontroll értékhez képest nagyobb reakciósebességi értéket mértem, ami ebben az esetben is a kivonat hidrolizálható szénhidráttartalmával magyarázható.

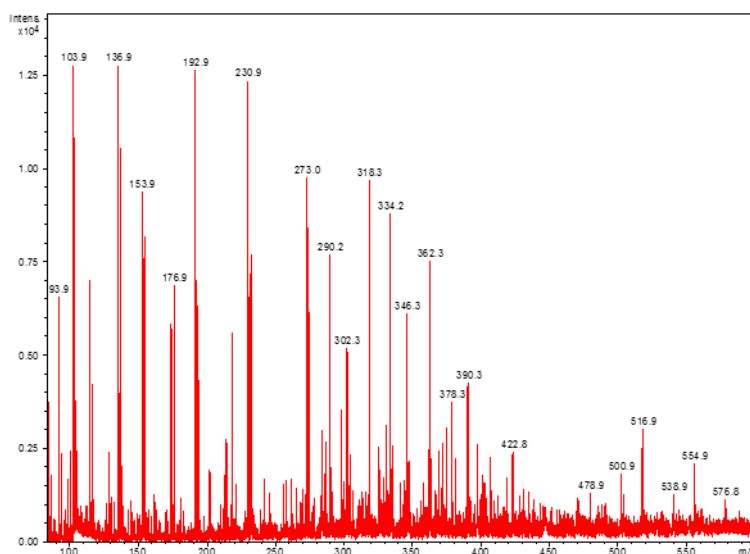


38. ábra: A HSA katalizált keményítő hidrolízis folyamatára gátló hatást kifejtő gyógynövények IC₅₀ értékei

A vizsgált 35 mintából a zöld tea kivonat és a különböző bogyós gyümölcsök levelei (málna, szeder, szamóca) rendelkeztek a legnagyobb gátló hatással (38. ábra). A zöld tea 0,4 mg/ml, míg a bogyósok levele 1,1-1,2 mg/ml koncentrációban a reakciósebességet a felére csökkenti. A fenti öt mintából a zöld tea és a szamóca levél kivonata teljesen képes volt meggátolni az enzim működését, de a szeder és málna levél esetében is 90 % fölötti gátlást figyeltem meg. A ribizli levél (IC_{50} : 2,5 mg/ml) és az orbáncfű (IC_{50} : 3,5 mg/ml) kivonatok is jelentős gátló hatást mutattak, 98 illetve 97 % maximális gátlással, de a gátlás kialakulásához szükséges koncentráció az előzőekhez képest nagyobb.

McDougall és kutatócsoportja több ízben vizsgálta a különféle piros bogyós gyümölcsökből és színes növényekből (pl. vörös káposzta) készült magas tannin tartalmú vizes kivonatok enzimgátló hatását, többek közt az α -amiláz és α -glükozidáz esetében is. Az α -amiláz vizsgálatok során, hozzánk hasonlóan felforralt keményítő szubsztrátot használva, a fent leírt eredményeinkhez hasonló, jelentős enzimgátló hatást detektáltak [155, 156]. Ennek a vizsgálatnak a folytatásaként Grussu és munkatársai a gátlásért felelős antocianinok azonosítása céljából összehasonlították a piros és sárga bogyós gyümölcsök α -amilázra gyakorolt hatását. Arra a következtetésre jutottak, hogy a piros szín kialakulásáért felelős komponensek állnak a gátlás hátterében, mivel az azonos növények (pl. málna) sárga variánsai jelentősen kisebb gátló hatással rendelkeztek. A kapott eredményeik alapján a málna, és madárberkenye rendelkezik a legjobb gátlási tulajdonságokkal, IC_{50} értékük 21 és 4,5 μ g/ml [157]. Már Grussu is felfigyelt a kivonatok akarbózzal közös alkalmazása során fellépő szinergisztikus hatásra, amit egy következő cikkükben [158] a berkenye és a fekete ribizli esetében igazolni is tudtak. Eredményeink több ponton jól megfeleltethetőek a fenti irodalmi előzményekkel. Az általunk kapott IC_{50} értékek jelentősen nagyobbak, ez abból adódik, hogy a növények levelei jóval kevesebb a fenti vizsgálatok során aktívnak bizonyult antocianin vegyületet tartalmaznak [159]. Az elkészült vizes kivonatokról MALDI-TOF spektrumokat vettünk fel annak érdekében, hogy meghatározzuk a bennük lévő komponenseket és az aktív hatóanyagokat. A meleg vizes kivonás eredményeként a poláros anyagok mellett az enyhén apoláros anyagok is kivonásra kerültek, így a legtöbb kapott tömegspektrum számos csúcsot tartalmaz (39. ábra). A komponensek azonosítását online adatbázisok és az irodalomban található adatok felhasználásával kíséreltem meg. Az azonosítást nehezítette, hogy az aktív komponensek keresése során általában apoláros oldószeres illetve alkoholos extrakciót alkalmaznak, így az ezekben a mintákban azonosított komponensek kis átfedést mutattak az én mintáimban található komponensekkel. További problémát jelentett, hogy az azonosított komponensek között több izomer is található, így a tömeg alapján nem lehet őket egyértelműen beazonosítani.

Egy minta, a kisvirágú füzike esetében sikerült meghatározni a fő komponenst, ami az oenothin B nevű ($[M+K]^+$: 1607) hidrolizálható ellagitannin (Függelék, 3F. ábra). Az esetek többségében azonban a komponenseknek csak kis százalékát sikerült beazonosítani. A bogyós gyümölcsök levelében több, a termésben is megtalálható vegyületet azonosítottam, melyek bizonyított HSA gátló hatással rendelkeznek [149]. Ilyen vegyületek quercetin, kampferol, delfinidin, petunidin és ezek glikozidjai, valamint az ellagi sav, katechin és galluszsav, melyek a különböző tanninok építő egységei.



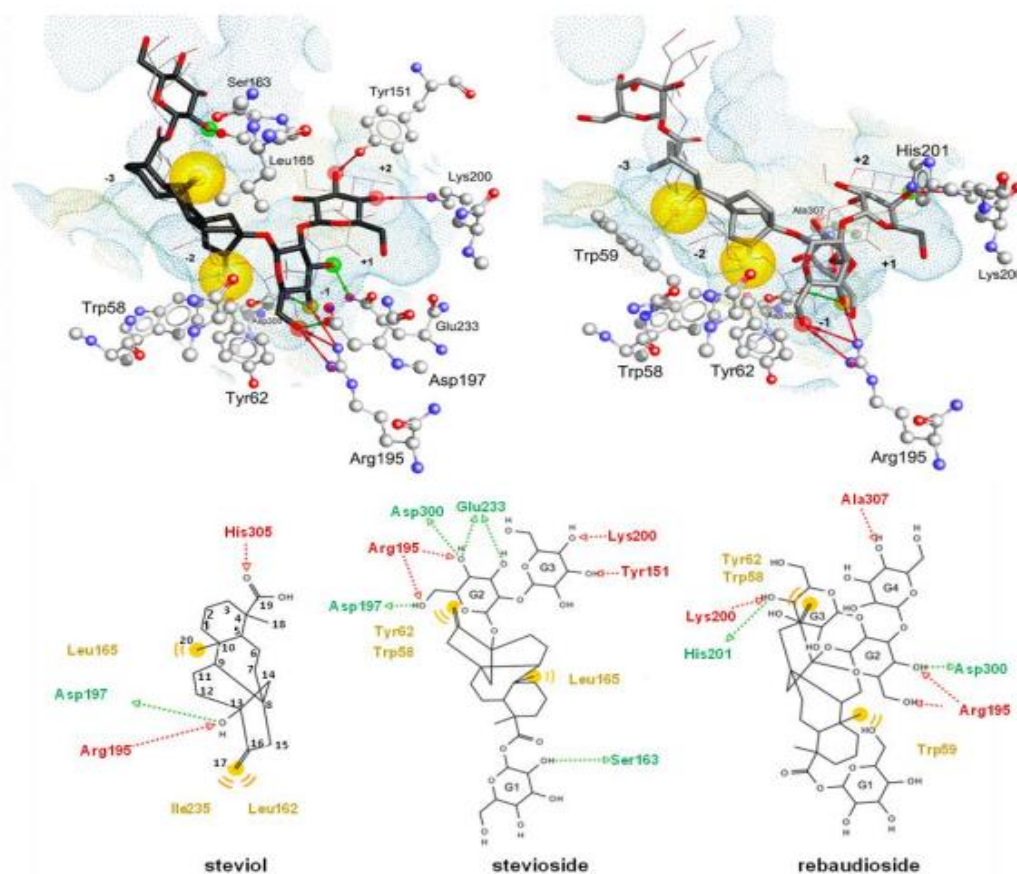
39. ábra: A málna levél kivonat MALDI-TOF tömegspektruma

A szárított gyógynövények hatékony felhasználásához a Magyar Gyógynövény Szövetség és Terméktanács 2-4 g szárított növényi rész 2-3 dl vízzel történő forrázását javasolja [160]. A vizes extraktumok liofilezése és a szilárd anyag mennyiségének meghatározása után megkaptam az egyes növények vízdoldható szárazanyagtartalmát (Függelék, 1F táblázat). Ebből és a kapott IC_{50} értékekből kiszámoltam, hogy az ajánlásnak megfelelő elkészítés esetén bevihető-e a szervezetbe a gátlás kialakulásához szükséges koncentráció. Számításaimhoz 2 g szárított növény 2 dl vízzel történő elkészítését vettem alapul. Eredményeim alapján a leghatékonyabbnak talált gyógy- és fűszernövények (fahéj, szegfűbors, zöld tea, szamóca-, szeder-, málna levél) esetében a fenti recept alapján készült forrázatban lévő „hatóanyag” koncentrációja meghaladja a gátlási vizsgálatok során meghatározott IC_{50} értéket. Ebben a számításban csak az elkészült kivonat koncentrációja szerepel, és nem kalkulál az emésztőrendszerben a hatóanyag hígulásával. A hatékonyságról pontosabb adatokat csak egy *in vivo* kísérlet adna. Az azonban az *in vitro* vizsgálataink eredménye és a tömegspektrumok alapján elmondható, hogy az elkészített forrázatok tartalmaznak aktív komponenseket, így ezek

az akár házilag is elkészíthető kivonatok hatékony kiegészítői lehetnek egy diabétesz terápiának vagy egy súlycsökkentő diétának.

4.3.1.2. Sztívia kivonatok vizsgálata

A növény komponensek HSA gátló hatásának vizsgálatába bevontuk az édesítőszer alapanyagként használt sztíviát (*Stevia rebaudiana*). A növény leveleiben eddig azonosított nyolcféle szteviol glikozid a szacharózhoz képest többszörös édesítő hatással rendelkezik. Szerkezetüket tekintve egy diterpén származék aglikonhoz a szteviolhoz kapcsolódnak a különböző glükóz és szoforóz származékok. Szerkezeti felépítésükből adódóan az emberi szervezetben nem bontódnak le, ezáltal fogyasztásuk esetén nem emelkedik a vércukorszint, így ideálisak cukorbetegség részére. A sztíviában található glikozidok közül legnagyobb mennyiségben a szteviozid és a Rebaudiozid A (RebA) található [161], ezek α -amilázra gyakorolt hatását vizsgáltuk. A németországi Freie Universitte kutatócsoportjában *in silico* modellezték a két komponens aktív helyre való bekötődését, aminek eredménye az 40. ábrán látható.



40. ábra: A szteviol, szteviozid, és rebaudiozid A által kialakított kötések és az utóbbiak illeszkedése a HSA aktív helyén

Három komponens, a *szteviol*, a *szteviozid* és a *rebaudiozid A* illeszkedését vizsgálták HSA enzim aktív helyéhez, melyhez az akarbóz dokkolása adta a referenciát. Az 1MFV kódjelű PDB adatbázisban megtalálható HSA szerkezetet használták fel az akarbóz illeszkedésének vizsgálatához, amit LigandScout 3.1 program segítségével végeztek el [162].

A *szteviol* esetében nem volt kimutatható olyan illeszkedés, ami *in vivo* körülmények között kialakuló kötődésre utalna. A *szteviozid* és a *rebaudiozid A* orientálódtak a kötő helyhez, és hasonlóan az akarbózhoz -3-tól +2 alhelyekhez illeszkedtek. A *szteviozid* és a *rebaudiozid A* esetében is a G2-es glükóz egység hidroxil csoportjai tudnak H-kötést létesíteni a -1 és +1 alhelyhez közeli aminosav oldalláncokkal. A *szteviozid* esetében három H-kötés alakul ki a 3-, 4- és 6-OH csoport és az aminosav oldalláncok (Asp197, Glu233 és Asp300) között. A *rebaudiozid A* esetén az Asp300 és a 4-OH csoport között jön létre H-kötés. Mind a két komponens esetében megfigyelhető két H-kötés kialakulása a 4- és 6-OH csoportok (G2) és az Arg195 között. Hidrofób kölcsönhatások is megfigyelhetők a triptofán és tirozil oldalláncok és a komponenseken található metil csoportok között.

A kötődést elősegítő kölcsönhatásként a *szteviozid* esetében a G1 glükóz és a -3 alhely közelében található Ser163, illetve a G3 glükóz 3- és 4-OH és a Tyr151 és Lys200 aminosavak között feltételeznek H-kötés kialakulást. A *rebaudiozid A*-nál G3 glükóz 4-OH és a Lys200 és His201 aminosavak, valamint a disztális G4 glükóz 4-OH és az Ala307 aminosavak esetében létesülhet H-híd kötés.

A dokkolási vizsgálatok alapján arra jutottak, hogy a *szteviozid in vitro* inhibíciós hatása várhatóan jobb, mint a többi vizsgált komponensé. Esetében létrejöhet az összes gátláshoz szükséges kölcsönhatás, jól illeszkedik a kötőhelyhez és kölcsönhat a -3-tól +2 alhelyekkel.

A dokkolási vizsgálat során HSA enzim aktív helyéhez való kötődést modelleztek, azonban ebből nem állt rendelkezésünkre a kötődési vizsgálatokhoz szükséges mennyiség. A HSA-val 90 % fölötti aminosav homológiát mutató PPA enzimmel tudtam elvégezni az ITC kötődési vizsgálatot, hogy alátámasszam a dokkolási vizsgálat során kapott eredményeket. A vizsgálat során 282 μ M koncentrációjú PPA enzimet titráltam 6,5 mM *sztevioziddal*, körülbelül 1:5 makromolekula ligandum arányig, azonban a hígulási effektuson kívül nem sikerült kötődést detektálni.

Ezután *in vitro* vizsgálatok során határoztam meg a dokkolásnál jó illeszkedést mutató két *szteviol* glikozid, valamint a vizes és metanolos sztívia kivonatok gátlási hatékonyságát, amihez spektrofotometriás és ITC módszert, illetve GalG₂CNP és keményítő szubsztrátot is használtam. A két vizsgált kivonat közül a metanollal készült mutatott hatékonyabb gátlást, ami

arra utal, hogy a növényben olyan gátló hatással rendelkező komponensek találhatóak, amik vízzel nem, vagy csak kisebb hatékonysággal vonhatóak ki.

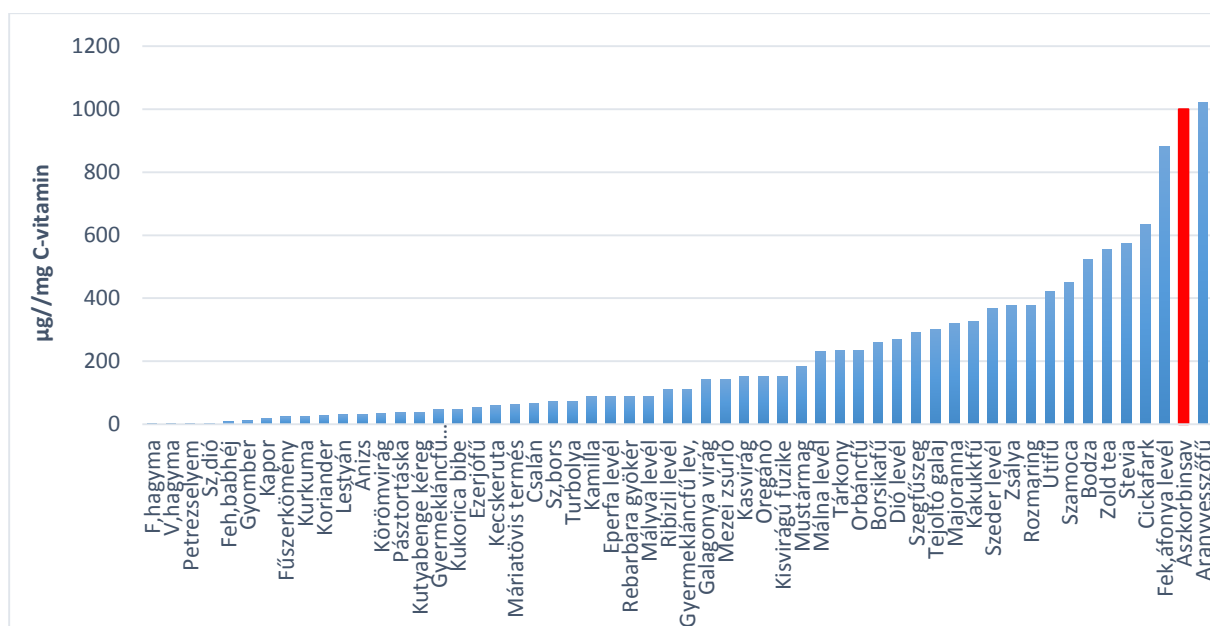
A szteviozid és a rebaudiozid A önmagukban nem rendelkeznek jelentős enzim gátló hatással (8. táblázat). Rövid kromogén szubsztráton vizsgálva a szteviozid IC_{50} értéke 5 mM volt, míg a rebaudiozid A esetében nem sikerült pontosan meghatározni. Keményítő szubsztráton ITC módszerrel vizsgálva a sztevioziddal ~35 % gátlást sikerült elérni. A rebaudiozid A esetében az inhibitor koncentráció növelése kis mértékben növelte a mért effektust annak ellenére, hogy a HSA nem tudja hidrolizálni a benne lévő $\beta(1,2)$ és $\beta(1,3)$ glikozidos kötéseket. Egy 2015-ös tanulmány alapján, a jelenséget a HSA katalizálta transzglykozilezési reakcióval lehet magyarázni, amit Ye és munkatársai [163] is kimutattak *Aspergillus* eredetű α -amiláz és rebaudiozid A esetén.

8. táblázat: *Sztívia kivonatok és szteviol glikozidok különböző módszerekkel meghatározott IC_{50} értékei*

	UV-VIS	ITC
Vizes kivonat	0.42 mg/ml	4 mg/ml (keményítő)
Metanolos kivonat	0.3 mg/ml	0.36 mg/ml (GalG ₂ CNP) 1.25 mg/ml (G ₇) 2.5 mg/ml (keményítő)
Szteviozid	5 mM	Nem gátol
Rebaudiozid A	>10 mM	Nem gátol

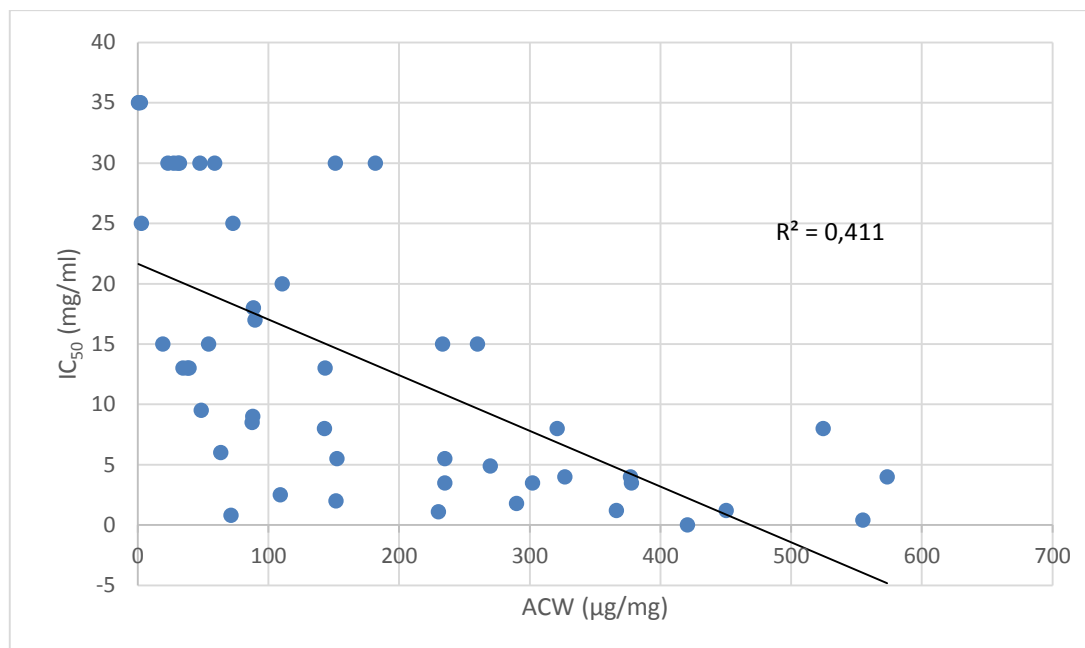
4.3.1.3. Antioxidáns mérések

A szervezet oxidatív stresszel szembeni védekezését is támogatni kell, ezért egyre nagyobb hangsúlyt kap az antioxidáns vegyületek vizsgálata. Cukorbetegség során a magas vércukorszint hatására a poliol útvonal aktivitása jelentősen megnövekszik. A poliol útvonalon aldóz reduktáz enzim katalizálta reakcióban a glükóz vagy galaktóz fruktózzá történő átalakítása történik szorbitolon keresztül. A folyamat során reaktív oxigén gyökök keletkeznek, emellett a szorbitol ozmotikus hatása, a NADPH igény miatt megváltozó redox körülmények és további tényezők [164] is szerepet játszanak a cukorbetegség során kialakuló szem-, vese- és idegrendszeri károsodásokban [165]. Ezek a tények és a vizsgált növények esetében azonosított, ismert antioxidáns hatású vegyületek indokolták, hogy meghatározzam az 58 növény vízzeloldható antioxidáns kapacitását.



41. ábra: A vizsgált növényi kivonatok ACW módszerrel meghatározott vízdoldható antioxidáns kapacitása, aszkorbinsavhoz viszonyítva

A kapott adatokat a 41. diagramon ábrázoltam illetve a függelékben található 1F. táblázat tartalmazza. Kiemeltem a viszonyítás alapjául szolgáló aszkorbinsavat, így jól látható, hogy a növények többsége gyengébb antioxidáns, mint a referencia vegyület. Az aranyvesszőfű esetében azonban magasabb antioxidáns értéket kaptam. A fűszerek általánosságban kisebb antioxidáns hatással rendelkeznek, mint a gyógynövények. A bazsalikom, babérlevel, boróka és fahéj esetében nem tudtuk meghatározni a vízdoldható antioxidáns kapacitás értékét, a mintában található valamilyen zavaró komponensek jelenléte miatt. A színes vegyületekben található kettős kötések általánosságban növelik az antioxidáns hatást, azonban a várakozásunkkal ellentétben a színes részeket tartalmazó növények (máriatövis, körömvirág, galagonya) nem mutattak nagyobb antioxidáns kapacitást, mint a zöld növényi részek. A kapott eredményeket nem lehet közvetlenül a vizsgált növényekre vonatkoztatni, mivel nem tudjuk, hogy a meleg vizes extrakció során mennyire bomlottak el az antioxidáns hatású vegyületek. Azonban a gátlási vizsgálatoknál jobb eredményt elérő kivonatok rendre magasabb antioxidáns aktivitást mutattak. Mivel a bogyósok esetében antioxidáns hatású vegyületeket sikerült azonosítani megvizsgáltam, hogy van-e összefüggés a két paraméter között, vagyis az antioxidáns vegyületek milyen mértékben tehetők felelőssé az enzimgátlás kialakulásáért.

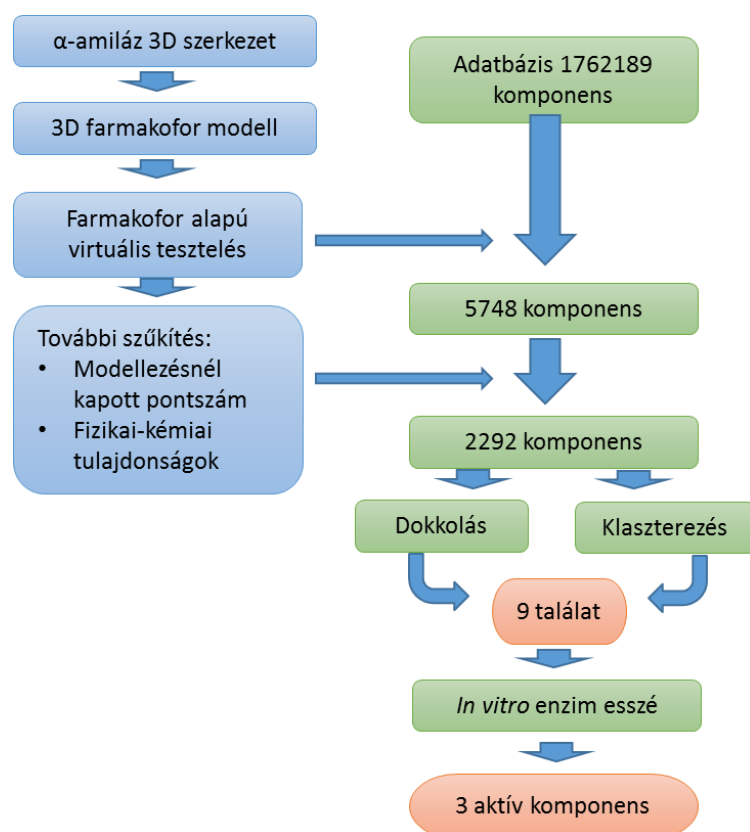


42. ábra: Növényi kivonatok antioxidáns kapacitása és HSA-keményítő rendszeren mért IC_{50} értékei közti korreláció vizsgálata Pearson-analízissel

A diagramon (42. ábra) ábrázolt adatpontokban szemmel jól látható tendencia figyelhető meg. Ennek számszerűsítése érdekében Pearson-féle korrelációs statisztikai analízist végeztünk. A kapott $R^2 = 0,411$ érték alapján megállapítottuk, hogy valóban fennáll egy gyenge negatív korreláció a két adatsor között, vagyis a nagyobb antioxidáns kapacitással rendelkező növényi kivonatok jobb α -amiláz gátló hatással rendelkeznek (kisebb IC_{50} értékkel). Ez azt mutatja, hogy az antioxidáns vegyületek is szerepet játszhatnak az enzimgátlás kialakulásában.

4.3.2. Rossz oldékonysággal rendelkező, apoláros inhibitor vegyületek vizsgálata

A németországi Freie Universität-en működő partner kutatócsoport kidolgozott egy számítógépes dokkolási módszert, amivel rövid idő alatt nagyszámú vegyület HSA enzimhez való kötődését lehet modellezni. Szénhidrát részt nem tartalmazó α -amiláz inhibitorokról viszonylag kevés információ áll rendelkezésre, így ebben a kísérletsorozatban apoláros, „drug-like” kismolekulákat teszteltek *in silico*, egy farmakofor alapú számítógépes módszer segítségével (43. ábra). A tesztek során kémiai adatbázisokban található vegyületek szkrínelését végezték el, majd kiválasztották azokat, amik jó affinitást mutattak az α -amiláz aktív helyén lévő aminosavakhoz. A vizsgálat során több ezer vegyületet teszteltek a számítógépes modell segítségével, melyek közül kb. 50 esetben tapasztaltak megfelelő illeszkedést.



43. ábra: Az in vitro vizsgált komponensek kiválasztásának folyamata [162]

Az így kiszűrt vegyületek tesztelését végeztem el *in vitro* spektrofotometriás módszerrel GalG₂CNP szubsztrát alkalmazásával. A legjobb IC₅₀ értékkel rendelkező vegyületeket (IC₅₀ < 100 μM) keményítő szubsztráton ITC módszerrel is teszteltem. A mérést nehezítette, hogy a vizsgált vegyületek rosszul oldódnak vízben, ezért DMSO-ban feloldva készítettem minden vegyületből törzsoldatot. A spektrofotometriás vizsgálatok során az inhibitor hígításokat szintén DMSO-val készítettem oly módon, hogy a DMSO a vizsgált reakcióelegyben mindig állandó koncentrációban legyen jelen.

A vizsgált 56 db inhibitorból 11 db hatástalannak bizonyult már GalG₂CNP szubsztráton is, 37 db inhibitor mutatott mérsékelt gátló hatást (IC₅₀ > 100 μM) és 8 esetben mértem 100 μM-nál kisebb értéket (9. táblázat). A spektrofotometriás mérések során, a rossz oldékonyság mellett több potenciális inhibitor színe akadályozta a mérést azáltal, hogy interferált a felszabaduló kromofor csoport színével, ami a mérési tartományt meghaladó abszorbancia értékeket eredményezett.

9. táblázat: A spektrofotometriás vizsgálatok során legjobb gátlást mutató inhibitorok ($IC_{50} \leq 100 \mu M$) GalG₂CNP és keményítő szubsztráton mért IC_{50} és ligandum hatékonyság értékei ($LE = (1,37/HA) \cdot pIC_{50}$)

	GalG ₂ CNP (UV-VIS)		Keményítő (ITC)	
	IC_{50} (μM)	LE	IC_{50} (μM)	LE
Akarbóz	0,5	0,13	29	0,22
18a	85	0,21	650+	<0,17
20a	70	0,17	400+	<0,14
20h	100	0,16	N.A.	N.A.
26	100	0,24	800+	<0,18
27	100	0,24	1000+	<0,18
30	50	0,23	300+	<0,23
31	62	0,24	400+	<0,26
38	40	0,30	400+	<0,3

A 8 leghatékonyabb vegyületet vizsgáltam tovább a természetes keményítő szubsztráton, a korábban már leírt ITC rendszerben. Az ITC mérés során a szerves oldószertartalom jelenti a legnagyobb problémát, mivel a készülékben maximum 5v/v % szerves oldószer tartalmú minták vizsgálhatóak. Emellett a szerves oldószerek jelentős hígulási effektust okozhatnak, ezért a mérések során az injektorban lévő enzimoldatnak is a mérőcellában lévő mintával azonos koncentrációban kellett tartalmaznia DMSO-t. A minta az ITC mérések során, a spektrofotometriás mérésekhez hasonlóan ~2 % DMSO-t tartalmazott, így azt az enzim oldathoz és a referencia cellában található pufferhez is ilyen arányban adtam. A 9. táblázatban látható, hogy a keményítőn meghatározott IC_{50} értékek jellemzően egy nagyságrenddel nagyobbak, de oldékonysági problémák miatt csak közelítő értékek adhatók meg. Hasonló nagyságrendi különbséget tapasztaltak kutatócsoportunk korábbi mérései során Kandra és munkatársai [143] akarviozinil-glükopiranozilidén-spiro-tiohidantoin (PTS-GTH) inhibitor vizsgálatokor, GalG₂CNP és amilóz szubsztrát alkalmazásával. A nagyságrendi eltérés oka, hogy GalG₂CNP nem ideális szubsztrátja a HSA enzimnek, ahogyan az a kinetikai és az

akarbózzal végzett inhibíciós mérések esetében is látszik, így a hidrolízis gátlása kisebb inhibitor koncentrációval vagy kevésbé hatékony inhibitor alkalmazásával is elérhető.

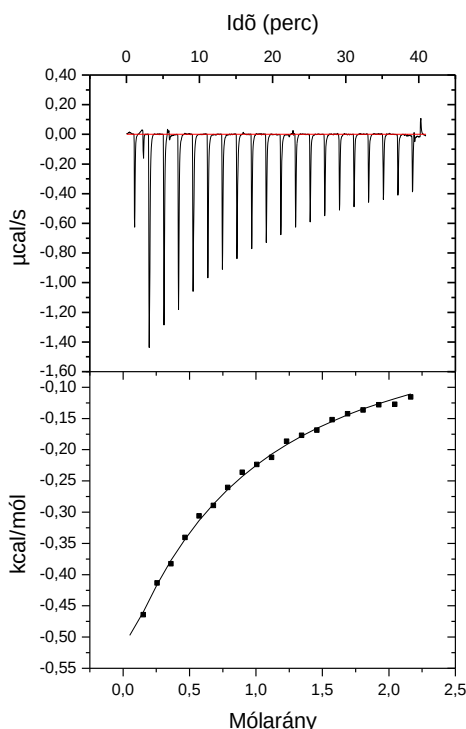
A 9. táblázatban feltüntettem a ligandum hatékonyság értékeit is, ami a molekula méretének (nehéz atomok számának) figyelembevételével korrigálja a kapott IC₅₀ értékeket, ezáltal pontosabb összehasonlítást tesz lehetővé. Jól látható, hogy habár a kontrollként alkalmazott akarbóznál még a legjobb 8 komponens esetében is magasabb IC₅₀ értékeket kaptunk, a GalG₂CNP esetében a ligandum hatékonyság értékek rendre alacsonyabbak a molekulák kisebb mérete miatt. Mivel a keményítővel végzett vizsgálatok esetében nem sikerült pontos IC₅₀ értékeket kapni, ezért az ebből számolt ligandum hatékonyság értékek is csak közelítőek, de a táblázat utolsó három komponense (**30, 31, 38**) esetén itt is az akarbóznak megfelelő vagy annál jobb értéket kaptunk.

Ezek az eredmények mutatják, hogy az *in silico* farmakofor alapú számítógépes modellezés hatékony eszköz új inhibitor komponensek felkutatásában, abban az esetben, ha a gátolni kívánt enzim háromdimenziós szerkezete kellő felbontásban rendelkezésre áll. Ebben a vizsgálatban több adatbázisból, milliós nagyságrendű vegyület tesztelése történt meg, melyből végül a fent leírt 56 inhibitor jutott el az *in vitro* vizsgálatokig. Ezek olyan apoláros kismolekulák és származékaik, amiket eddig még nem írtak le α -amiláz inhibitorokként, és szemben a legtöbb inhibitoroként ismert kismolekulával, nem rendelkeznek szénhidrát egységgel vagy flavonoid típusú alapvázsal. Az *in vitro* vizsgálatok eredményei rámutatnak arra, hogy a rövid kromogén szubsztrátok széles körű alkalmazása ellenére, az ezekkel végzett gátlási vizsgálatok eredményei nem adnak valós információt az inhibitorok természetes közegben kifejtett hatékonyságáról. Mivel fizikai-kémiai tulajdonságai jelentős eltérést mutatnak a keményítőtől, az ilyen szubsztrátok az egyszerű felhasználás és jó érzékenység miatt szkrínelésre jól használhatóak, de a kapott eredmények nem felelnek meg a természetes körülmények között lejátszódó folyamatok adatainak. Az ITC módszer segítségével a színes oldatok illetve a csapadék zavaró hatását sikerült kiküszöbölni és a keményítő alkalmazásával a vizsgálati paramétereket közelíteni az *in vivo* körülményekhez. Azonban ebben a rendszerben vizsgálva az inhibitorok rendre hatástalannak, vagy gyenge hatékonyságúnak mutatkoztak. A rossz oldékonyság mérés technikai oldalról fellépő problémáit az ITC alkalmazásával részben ki tudtuk küszöbölni, de azok az inhibitorok, amelyek egy 2 % DMSO tartalmú rendszerben sem tarthatóak oldatban, *in vivo* tesztekre ilyen formában mindenképpen alkalmatlanok.

Két inhibitor esetében (**26, 39**) történtek kísérletek az inhibitor oldatban tartására ciklodextrinnel képzett zárvány komplex formájában. A mérések során a vegyületek

komplexálásához β -ciklodextrint választottam, melynek megfelelő méretű a belső üreg átmérője a vizsgált komponensek befogadására.

A **39** inhibitor esetében nem sikerült kötődést detektálnunk. A **26** inhibitor esetében a gyenge kötődés miatt nagy koncentrációk alkalmazásával vizsgáltam a kölcsönhatást. 15 mM β CD és 0,9 mM inhibitor esetén sikerült jól mérhető hőeffektusokat és értékelhető izotermát kapni (44. ábra). A mérés igazolta, hogy a β CD képes komplexálni az inhibitort, bár a kötődés gyenge ($K_D = 3,3$ mM).



44. ábra: A **26** inhibitor β CD-hez való kötődésének izotermája és kiértékelése

Az így kapott eredmények alapján összeállítottam egy spektrofotometriás rendszert a β CD-t is tartalmazó inhibitor oldat gátlási vizsgálatához. Az előzetes kontroll mérések során a β CD még nagy koncentrációban sem befolyásolta az enzim működését, így a gátlási vizsgálatokban kapott eredményekre nincs közvetlen hatással. Az inhibitor gátlási hatékonyságának változását a β CD nélküli GalG₂CNP szubsztráttal kapott IC₅₀ értékhez (100 µM) viszonyítottam. A mérések során azt tapasztaltam, hogy az inhibitor oldékonysága a β CD jelenlétében sem változott jelentősen, azonban a mérések során kapott IC₅₀ értékek az alkalmazott β CD koncentrációjával arányosan emelkedtek. Ez az emelkedés 13 mM β CD esetében körülbelül kétszeres, míg 15 mM β CD esetében közel ötszörös IC₅₀ értéket eredményezett. A gátlási vizsgálat eredménye azt mutatja, hogy a β CD valóban képes az oldatban lévő inhibitor egy részének komplexálására és így az oldatban lévő szabad inhibitor koncentrációját csökkenti.

5. Anyagok és módszerek

5.1. Alkalmazott pufferek

HSA puffer

Az kétféle α -amilázzal kapcsolatos vizsgálatokhoz és az enzimek tisztításához 50 mM MES puffert használtam (pH = 6,0), ami 5 mM kalcium-acetátot és 51,1 mM nátrium kloridot és 152 mM nátrium-azidot tartalmazott [142]. A pH beállításához NaOH-ot és HCl-at alkalmaztam. A PPA-val végzett kötődési vizsgálatok esetében ugyanilyen összetételű és pH értékű, de azidmentes puffert használtam. A puffereket felhasználásig hűtőszekrényben tároltam.

Acetát puffer

Az *kutatási célú* pektináz és az ipari enzimmészítmény (Pektinex Ultra AFP) tisztításához és az ezekkel kapcsolatos kinetikai mérésekhez 1 mM magnézium-acetátot 0,2 M nátrium-acetátot és 0,2 M ecetsavat tartalmazó acetát puffert készítettem (pH = 4,8), amit felhasználásig 5°C-on tároltam.

5.2. Felhasznált enzimek

Humán nyál α -amiláz (HSA)

A vizsgálatok során alkalmazott liofilezett humán nyál α -amilázt a Sigma gyártotta (type XIII, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). A forgalmazott enzim fehérjetartalma 5-15 % közötti, amit ammónium-szulfáttal és nátrium-citráttal stabilizáltak. Ezeket a stabilizátorokat a sikeres ITC mérések érdekében el kell távolítani, amit 30 kDa pórusméretű centrifugás filter egység (Amicon 30K, Millipore, MA, USA) segítségével tettem meg. A törzsoldat elkészítéséhez egy doboz, 1 KU aktivitású humán nyál α -amilázt 10 ml azidos HSA pufferben feloldottam, a centrifugás filter egység segítségével több lépésben eltávolítottam a szennyező sókat és a kapott oldatot 1 ml térfogatúra töményítettem. Az így kapott és a vizsgálatokhoz használt tisztított enzim törzsoldat koncentrációja: 11,3 μ M volt, Bradford módszerrel meghatározva [166].

Sertés hasnyálmirigy α -amiláz (PPA)

A felhasznált sertés hasnyálmirigy α -amilázt szintén a Sigma-Aldrich-tól vásároltuk (Type 6B, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Ez a készítmény laktózt tartalmaz stabilizátorként, így a HSA-hoz hasonlóan ezt is tisztítottam 30 kDa pórusméretű centrifugás filter egység segítségével. Ehhez 1 g sertés hasnyálmirigy α -amilázt 15 ml HSA pufferben 15 percig szobahőmérsékleten kevertettem, majd 30 percig 5000 rpm fordulatszámon centrifugáltam. A felülúszót a centrifugás filter egység segítségével több lépésben tisztítottam, majd 1 ml

térfogatra töményítettem. A kötődési vizsgálatokhoz készített PPA törzsoldathoz azidmentes HSA puffert használtam, az így kapott enzimotozat koncentrációja 312 μM volt. A kinetikai mérésekhez használt törzsoldatot azidos HSA pufferrel készítettem, ez a törzsoldat 140 μM koncentrációjú volt (Bradford szerint).

Pektináz

A vizsgálatokhoz *Aspergillus niger* eredetű pektináz enzimet használtunk (Pektináz 5S, Serva GmbH, Heidelberg, Germany). A gyári adatok alapján az enzim aktivitás értéke 0,8 U/mg, mely több különböző aktivitást is magában foglal (pektin hidroláz: EC 3.2.1.15; pektin liáz: EC 4.2.2.10). A több eltérő aktivitású enzim jelenlétét az SDS-PAGE mérések során kapott több fehérje sáv is alátámasztja. Az ITC-vel történt vizsgálatokhoz 40 mg enzimet 10 ml acetát pufferben oldottam, majd több lépésben 30 kDa pórusméretű centrifugás filter egység (Amicon 30K, Millipore, MA, USA) alkalmazásával megtisztítottam a kisméretű szennyezőktől. A kapott oldatot töményítettem, majd 1 ml-re egészítettem ki acetát pufferrel. Az így kapott és a mérésekhez használt törzsoldat 0,3 mg/ml koncentrációjú volt (Bradford szerint), a moláris koncentráció meghatározása a több összetevő miatt nem volt lehetséges.

Pektinex Ultra AFP®

A Pektinex Ultra AFP (Novozymes, Franklinton, NC, USA) egy, az élelmiszeriparban használt enzimekészítmény, melyet főként a gyümölcsökben található pektin lebontására használnak. A gyári adatok alapján, a keverékben a fő enzimalkotó a pektin liáz (EC 4.2.2.10), de emellett pektin hidroláz (poligalakturonidáz, EC 3.2.1.15) és celluláz (EC 3.2.1.4) aktivitással is rendelkezik. Mivel a készítmény nem kutatási célokra lett kifejlesztve, számos szennyező anyagot tartalmaz. A felhasználás előtt ezeknek a szennyezőknek a mennyiségét a már több ízben leírt 30 kDa centrifugás szűrő egység segítségével csökkentettem. A mérésekhez használt, a kiindulási enzimotozat hatszoros térfogatának megfelelő mennyiségű acetát puffer segítségével puffer cserét hajtottam végre és a kiindulási térfogat negyedére töményítettem a mintát.

5.3. Felhasznált szubsztrátok

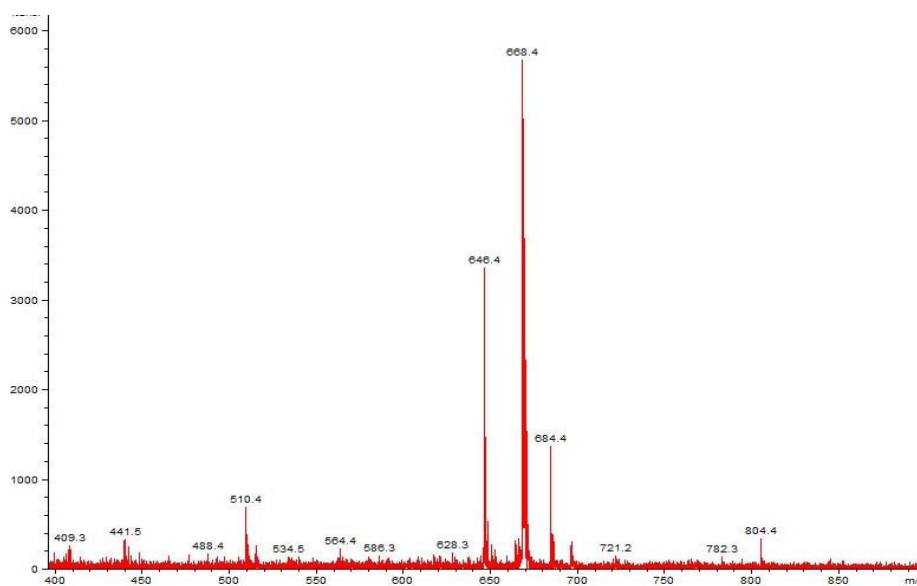
A 2-klór-4-nitrofenol kromofor csoportot tartalmazó maltooligomer β -glikozid szubsztrátokat korábban, a kutatócsoport munkatársai állították elő, kemo-enzimatisztikus szintézissel, β -ciklodextrinből kiindulva [167]. A 3-6 glükózból álló oligomereket és a hétnél nagyobb polimerizációs fokú maltooligomereket nyúl vázizom glikogén foszforiláz b enzim reakcióját használva állították elő. Első esetben a glikogén foszforiláz exo foszforolitikus hatásmódját használták fel a kiindulási oligomer rövidítéséhez, mely során láncvégi glükóz egység szabadul

fel [168]. Utóbbi esetben reakciókörülmények változtatásával glükóz-1-foszfát jelenlétében elérhető, hogy az enzim a fordított irányú reakciót katalizálja, ezáltal meghosszabbítva a kiindulási maltooligomert [169]. A spektrofotometriás méréseknél rövid, kromogén 2-klór-4-nitrofenil-4-O- β -D-galaktopiranozil-maltozid (GalG₂CNP) szubsztrátot (Sorachim SA, Lausanne, Switzerland) használtunk. A 2-klór-4-nitrofenil koromofor csoport abszorpciós maximuma kötött formában 302 nm, míg szabad formában 400 nm hullámhosszon van, így a vizsgálatok során ezeken a hullámhosszokon történt a detektálás.

A szabad maltooligomereket, a burgonya keményítőt, kék keményítőt (Remazol Brilliant Blue R festékhez kötött oldhatatlan kukorica keményítőt) és cellulózt a Sigma-Aldrichtól, míg a pektináz aktivitásméréseknél használt pektint a Serva-tól szereztük be.

5.4. Vizsgált α -amiláz inhibitorok

A modellrendszerként vizsgált HSA katalizálta hidrolízis reakciók során többféle olyan inhibitor vizsgáltunk, melyekről rendelkezésünkre állt információ a gátlási hatékonyságról és a gátlás típusáról. A vizsgálatok során alkalmazott akarbózt a Glucobay[®] tablettából nyertük ki, vizes extrakcióval, majd liofileztük. Ehhez 5 db 50 mg hatóanyag tartalmú Glucobay tablettát porítottuk, majd 20 ml háromszor ioncserélt vízzel elkeverve 45 percig ultrahangos fürdőben tartottuk. Az oldhatatlan hordozó anyagokat centrifugálással (2x15 perc, 10000 rpm) távolítottuk el, majd a felülúszót 0,45 μ m pórusméretű fecskendőszűrőn tovább tisztítottuk. Az így kapott tiszta oldatot liofilizáltuk, majd felhasználásig fagyaszttva tároltuk. Az így extrahált akarbóz MALDI-TOF MS spektruma a 45. ábrán látható.



45. ábra: A Glucobay tablettából kivont akarbóz MALDI-TOF tömegspektruma
A három fő csúcs az akarbóz protonált (646,4 Da), nátriummal (668,4 Da) és káliummal (684,4 Da) ionizált formájához tartozik

Történtek gátlási vizsgálatok a Somsák László és kutatócsoportja által szintetizált glükopiranozilidén-spiro-tiohidantoin (GTH) vegyülettel is [170], mely egy ismert glikogén-foszforiláz inhibitor [171]. α -Amiláz gátló hatását kutatócsoportunk mutatta ki [172] és kemoenzimatisz szintézissel egy hatékonyabb inhibitor is sikerült belőle előállítani [173]. 58 különböző növényből készült 60 kivonat HSA gátló hatását vizsgáltam ITC módszer segítségével. A növényekből készült kivonatok adatainak táblázatos összefoglalása a függelékben található.

A vizsgált apoláros karakterű („drug-like”) inhibitorokat a német Freie Universität bocsájtotta a rendelkezésünkre. A gátlási vizsgálatok során a vegyületekből DMSO-val telített oldatokat készítettünk, majd a vizsgálatok során is DMSO-val hígítottuk. A vizsgált inhibitorok kódszámai, szerkezetük és a GalG₂CNP szubsztráton végzett HSA gátlási vizsgálatok során kapott IC₅₀ értékek a függelékben (2F. táblázat) találhatóak. Az eredményekből született publikációban található kódszámok és a dolgozatban szereplő kódszámok eltérnek egymástól.

5.5. Kötődési vizsgálatok ITC módszerrel

Vizsgálatainkat egy MicroCal ITC₂₀₀ (Malvern, Worcestershire, UK) mikrokloriméterrel végeztük. A készülékben egy 204 μ l térfogatú referencia, illetve mérő cella, valamint egy 40 μ l térfogatú termosztált injektor található. A készülék érzékenysége a gyártó által megadott adatok alapján 0,1 μ cal/s, így a vizsgálatoknál ezt az értéket tekintettük a detektálhatóság alsó határának (LOD). A mérések során a referencia cella, minden esetben a vizsgált komponensek oldószerét, az alkalmazott puffert tartalmazta.

Humán szérum albumin és albuminra specifikus antitest kötődésének vizsgálata

A vizsgálat során a specifikus monoklonális antitest (Biosystem International) és az albumin (Sigma-Aldrich) 50 mM foszfát pufferben (pH = 7,4) oldottuk fel (Sigma-Aldrich). A mérés közben kialakuló, esetleges szennyezők vagy oldószer maradékok miatti hígulási hőeffektus elkerülése érdekében az antitest oldaton puffercserét hajtottunk végre a vizsgálatok során alkalmazott foszfát pufferrel, melyhez egy 30 kDa pórusátmérőjű Amicon Ultra 30K centrifugás filter egységet használtunk. A tisztítás során a kiindulási mintatérfogatot háromszor hígítottuk meg 2 ml-re (az egység maximális térfogata), majd töményítettük vissza a kívánt koncentráció eléréséig. A pontos fehérje koncentrációt Bradford módszerrel határoztuk meg. A mérés során a mérőcella tartalmazta az antitestet (8 μ M, 204 μ l), melyhez az injektorból 38-szor 1-1 μ l, 184 μ M koncentrációjú albumin oldatot adtunk, 180 másodperces különbséggel. A hozzáadott albumin gyors elkeveredését a mérőcella 400 rpm sebességgel való kevertetésével

biztosítottuk. A keverési sebesség viszonylag alacsony, a minta habzása, és a megnövekedett alapvonalzaj alacsonyan tartása miatt. A mérések, az emberi testhőmérsékletnek megfelelően, 37 °C-on történtek. A kapott termogramot az Origin szoftver ITC-hez készült bővítményével értékeltük ki. Az integrálás során kapott pontokat a szekvenciális két kötőhelyes modell segítségével illesztettük.

γCD^+ , $G8^+$ és γCD fondaparinux kötésének vizsgálata

A különböző ciklodextrinek, ciklodextrin származékok és a heparin származék fondaparinux a Cyclolab Kft-től származnak. A heparin származék kötődését kationos γ -ciklodextrinnel (γCD^+), ennek nyílt láncú formájával ($G8^+$) és γ -ciklodextrinnel (γCD) végeztük el, vízben és fiziológiás sóoldatban. A mérések során a fondaparinux oldatával töltöttük fel a mérő cellát, melyhez az oligoszacharidokat injektáltuk. Az eltérő erősségű kölcsönhatások miatt, a különböző vegyületeknél más-más koncentrációviszonyokat kellett használni az értékelhető termogramok eléréséhez. Ennek megfelelően a 13,25 mM γCD^+ , 33,14 mM $G8^+$ illetve 100 mM γCD oldatokkal töltöttük fel az injektort, melyből a mérésektől függően 48-78 injektálás során 0,5-0,8 μ l térfogatokat adtunk a rendre 0,56 mM, 1,08 mM és 1,08 mM koncentrációjú fondaparinux oldathoz. A mérések 37 °C-on történtek. A mérőcellába injektált komponensek gyors elkeveredését 800 rpm sebességű keveréssel értük el. A fiziológiás sóoldatban történt mérések esetén a kötődő komponenseket a fentiekkel megegyező koncentrációban 0,9 % NaCl oldattal készítettük el, majd azonos körülmények alkalmazásával vizsgáltuk. A termogramok kiértékeléséhez az Origin szoftverben, az integrálás után kapott pontokra egy kötőhelyes modellel illesztettünk görbét.

Az akarbóz kötődésének vizsgálata sertés hasnyálmirigy eredetű α -amilázhoz

A sertés pankreász α -amiláz (PPA) és az akarbóz közti kötődés vizsgálata során 3,75 mM akarbózzal titráltuk a mérőcellában lévő 109 μ M koncentrációjú PPA oldatot, melyek az α -amiláz mérésekhez használt azidmentes MES pufferben lettek feloldva és hígítva. A titrálások során 25-ször 1,5 μ l akarbózt injektáltunk, 180 másodperces különbségekkel. A mérés 37 °C-on történt, 600 rpm kevertetés mellett. A kapott adatokra az Origin szoftver egy kötőhelyes modelljével illesztettük görbét.

5.6. Kinetikai és gátlási vizsgálatok ITC módszerrel

Enzimkinetikai mérések ITC módszerrel

Az enzimkinetikai vizsgálatok során a készülék mérőcelláját a különböző koncentrációjú, megfelelő pufferben oldott szubsztrát oldatokkal töltöttem fel. Az összeállított minták térfogata minden esetben 300 μl volt, melyből 204 μl szükséges a cella feltöltéséhez. A mérések során a referencia cella minden esetben az alkalmazott pufferrel lett feltöltve.

α -Amiláz (HSA, PPA) katalizálta hidrolízis reakciók vizsgálata

Az injektor tartalmazta az 1,1 μM koncentrációjú HSA oldatot, amit a sómentesített HSA törzsoldatból azidos HSA pufferrel hígítva készítettem. A mérések során, 60 másodperces késleltetés után 2 másodperc alatt 1 μl enzimet injektáltam a mérőcellába, ami az azidos HSA pufferben oldott szubsztrát oldatot tartalmazta. A mérés során az oldatot a cellában 800 rpm sebességgel kevertem. A készülék beállításai közül a hőmérsékletet 37°C-ra, az injektálás sebességét 0,5 $\mu\text{l/s}$ -ra, a referencia teljesítményt 5 $\mu\text{cal/s}$ -ra, a „feed back módot” „alacsony” értékre állítottam, míg az adatvételezés gyakorisága 2-3 másodperc volt. A mérések időtartama az adott rendszernek megfelelően változott. A kapott termogramok kiértékelése során az 21. ábrán látható módon jártam el, vagyis az injektálás után meghatároztam a termogram alapvonalhoz viszonyított legnagyobb eltérést és a kapott értéket tekintettem az adott szubsztrát koncentrációnál mért reakciósebességnek. A reakció szubsztrát koncentráció függésének vizsgálatakor több eltérő szubsztrát koncentrációnál határoztam meg a reakciósebességet, majd a kapott sebesség értékekre Grafit program segítségével, a Michaelis-Menten összefüggés alapján iterációval illesztettem görbét, ami alapján a program meghatározta a K_M és $v_{\max}$ értékeket.

Pektináz és celluláz aktivitás vizsgálata

A pektináz és celluláz méréseket a fent leírt rendszerben végeztem és az enzimek működésének optimális hőmérsékletét, 45 °C-ot állítottam be. A Pektinex Ultra AFP esetében egy második mérőszorozatot keretein belül 25 °C-on is meghatároztam a reakciósebesség értékeket. Az *Aspergillus* pektináz esetén az injektált enzim térfogata, a kisebb aktivitás miatt 5 μl volt, amit 5 másodperc alatt juttattam a szubsztrát oldatot tartalmazó, 800 rpm sebességgel kevert cellába. A Pektinex Ultra AFP-ben található pektináz és celluláz aktivitás vizsgálata során 2 másodperc alatt 2 μl -t injektáltam a cellába az enzim elegyből, a keverés sebessége ebben az esetben is 800 rpm volt. A K_M érték meghatározásához a pektináz vizsgálatok esetében 0,25-40 mg/ml pektin koncentráció között vizsgáltam a reakciósebesség értékeket, míg a celluláz esetében ez a

tartomány 0,5-50 mg/ml volt. A kapott sebesség értékeket Grafit szoftver segítségével, a HSA vizsgálatánál leírt módon értékeltem ki. Mivel mind az *Aspergillus* mind a Pektinex Ultra AFP több különböző enzimaktivitással rendelkezik a program által kalkulált K_M és v_{max} értékek látszólagos értékeknek tekinthetők, amik magukban foglalják az összes olyan enzimaktivitást, ami az adott szubsztráton működik.

HSA enzim gátlásának vizsgálata ITC módszerrel

A gátlási vizsgálatok során a mérőcella a szubsztrát mellett az inhibitor is tartalmazza és ehhez a keverékhez adjuk egy titrálás során a 2 µl 1,1 µM koncentrációjú HSA oldatot. A gátlási vizsgálatok esetében eltérő inhibitor koncentrációk gátló hatását vizsgáltam állandó 1,4 mg/ml keményítő koncentráció mellett. Az összeállított minták minden esetben 75 µl 0,56 % felforralt keményítő oldatot tartalmaztak, amihez annyi puffert adtunk, hogy a minták végtérfogata az inhibitorral együtt 300 µl legyen. A mérés során alkalmazott egyéb paraméterek (hőmérséklet, keverési sebesség) megegyeznek a HSA kinetika részben leírtakkal.

A vízben rosszul oldódó inhibitorok vizsgálata során a komponenseket DMSO-ban oldottam és a méréshez szükséges koncentrációk eléréséhez is DMSO-val hígítottam ezeket. Ez esetben a 300 µl térfogatú mintákban a szubsztrát mellett (75 µl) az inhibitor oldat térfogata (15 µl) is állandó volt. Ezt az indokolta, hogy a mérések során az injektorban és a referencia cellában is a mérőcellában lévő oldattal azonos, állandó DMSO koncentrációt (2 v/v %) kellett fenntartani, a hígulási effektus minimalizálása érdekében.

Az egyes méréseknél kapott reakciósebesség értékeket, egy inhibitor nem tartalmazó kontroll méréshez viszonyítottam, majd meghatároztam a maradék enzim aktivitást %-ban kifejezve. Ezeket az értékeket az inhibitor koncentráció logaritmusának függvényében ábrázoltam, majd a Grafit program segítségével illesztettem rá görbét az 13. összefüggés alapján, megkapva a dózis-hatás görbéket, és az IC_{50} értéket. Az egyenletben az a a görbe két végpontja közti távolság, az x az inhibitor koncentráció, az s a meredekségi faktor, míg a b a háttérre vonatkozó paraméter.

$$y = \frac{a}{1 + \left(\frac{x}{IC_{50}}\right)^s} + b \quad (13)$$

A gátlás típus meghatározásánál legalább két eltérő inhibitor koncentrációt alkalmazva vizsgáltam a HSA katalizálta hidrolízis reakció szubsztrát koncentráció függését GalG₂CNP és G₇ szubsztrátokkal, majd a kapott adatpontokra nem-lineáris regresszióval illesztettem a

Michaelis-Menten görbét Grafit program segítségével. A görbék egymáshoz viszonyított lefutásából és a program által számított K_M és v_{max} értékek változásából határoztam meg a gátlás típusát.

5.7. Kinetikai és gátlási vizsgálatok spektrofotometriás módszerrel

A HSA enzim kinetikájának vizsgálata spektrofotometriával

A méréseket egy termosztálható Jasco V550 típusú kétsugaras spektrofotométeren végeztük, GalG₂CNP szubsztráton, HSA enzimmel. A szubsztrátot és az enzimet azidos HSA pufferben oldottuk és azzal hígítottuk. A kinetikai vizsgálatok során a küvettában 390 µl végtérfogatban állítottuk össze a szubsztrát koncentráció sorozatot, majd 37°C-on 2 percig termosztáltuk. A reakciót 10 µl HSA enzim (2 nM) hozzáadásával indítottuk, majd mértük a kezdeti reakciósebességet. Ehhez 120 másodpercig időben követtük a felszabaduló kromofor csoport által kiváltott abszorbancia növekedést 400 nm-en puffer vakkal szemben, majd meghatároztuk a kapott görbe kezdeti szakaszának meredekségét, amihez a Jasco Spectra Manager szoftverének Time course measurement funkcióját használtuk.

Forralt és forralás nélküli kék keményítő oldat HSA katalizálta hidrolízisének reakciósebesség meghatározása

A kék keményítővel végzett vizsgálatok esetében 2,5 ml 2 %-os (20 mg/ml) kék keményítő oldatot készítettem azidmentes HSA pufferrel, melyet a forralás nélküli reakcióknál rögtön felhasználtam, míg a forralással történt mérések esetében 1 percig forraltam, majd hagytam szobahőmérsékletűre hűlni. Megmértem a kiindulási oldatok abszorbanciáját, majd a további mérések esetén kapott értékeket ezzel korrigáltam. A méréseket a tisztított HSA és tisztított PPA enzimmel is elvégeztem. A reakciót az enzim hozzáadásával indítottam úgy, hogy az enzimkoncentrációk a felforralt minták esetében 27 nM, míg a forralás nélküli minták esetében 542 nM voltak. A forralt keményítőt tartalmazó reakcióelegyből 2 percenként, míg a forralás nélküliből 15 percenként homogenizálás után 20 µl mintát vettem, ezt pufferrel 400 µl-re egészítettem ki, majd 60 másodperc centrifugálás után a felülúszóból 595 nm-en meghatároztam az abszorbancia növekedést a kiindulási értékhez képest. A kapott abszorbancia változás adatokat az idő függvényében ábrázoltam, majd ebből meghatároztam a kezdeti reakciósebességet.

Pektin liáz aktivitás meghatározása

Az *Aspergillus* eredetű pektináz és a Pektinex Ultra AFP esetében is vizsgáltam a pektin liáz aktivitást. Ehhez 0,6 %-os pektin oldatot készítettem acetát pufferrel és a fent leírt enzimeket használtam. A vizsgálatok 500 µl térfogatban, 45 °C hőmérsékleten történtek. Ehhez a 400 µl szubsztrátoldatot kvarc küvettába pipettáztam, majd az enzim hozzáadásával (*Aspergillus* pektináz esetében 15 illetve 50 µl, a Pektinex Ultra AFP esetében 10 µl) indítottam el a reakciót, amit 235 nm-en, a keletkező termék abszorpciós maximumán követtem 20 percig a Jasco Spectra Manager Time Course funkcióját használva. A liáz aktivitás meglétére vagy hiányára a kapott görbék alakjából és a kezdeti szakasz meredekségéből következtettünk.

HSA katalizálta hidrolízis reakciók gátlásának vizsgálata

Gátlási vizsgálatok esetében, a kinetikai mérésekhez hasonlóan 390 µl végtérfogatban állítottuk össze a mintát, ami minden esetben 300 µl 5 mM GalG₂CNP szubsztrátot, 80 µl puffert és 10 µl inhibitor tartalmazott. Az inhibitor oldékonyságtól függően vízzel vagy DMSO-val hígítottuk. A kiindulási enzimaktivitási érték meghatározásához (negatív kontroll) DMSO-ban oldódó minták esetén inhibitor helyett 10 µl DMSO-t, pufferben oldott inhibitor esetében 10 µl puffert tartalmazott a minta. Az enzimreakciót 2 perc termosztálás után 10 µl enzim hozzáadásával indítottuk (2 nM), majd 2 percig követtük az abszorbancia változását 400 nm-en. A kapott görbe kezdeti szakaszának meredekségére alapján mértük a kezdeti reakciósebességet. A gátlási hatékonyság meghatározásához az IC₅₀ értéket az ITC-vel végzett gátlási vizsgálatoknál leírtaknak megfelelően az inhibitor koncentráció és a kiváltott reakciósebesség csökkenése alapján számítottuk.

A gátlás típus meghatározásánál az ITC-nél található leírást követtem, annyi eltéréssel, hogy GalG₂CNP szubsztrátot használtam a mérések során.

5.8. HPLC módszer a HSA katalizálta CNP-maltoheptaozid hidrolízis termékarányaiban bekövetkező változások követésére

Egy új HPLC módszert állítottunk be a hosszabb kromogén szubsztrát (CNP-G₇) HSA katalizálta enzimatis bontásának követésére. Ehhez egy diódasoros detektorral felszerelt Agilent Infinity készüléket és egy Genesis C-18 (15 cm, 4.6 mm, 4 µm) fordított fázisú oszlopot használtunk. Az izokratikus elválasztás során acetonitril-víz (15:85) eluenst és 0,8 ml/perc áramlási sebességet használva a keletkező fő termék (CNP-G₃) mennyiségének változását követtük 302 nm-en. Az 1-6 mM koncentrációjú szubsztrát oldathoz adott HSA enzimmel (1,64

nM) indítottuk a reakciót és 37°C-on inkubáltuk. A reakcióelegyből 20 percenként injektálva, a fő termék csúcsterületének változásából határoztuk meg a kinetikai görbét.

5.9. A vizsgált növényi kivonatok előállítása

A növényi kivonatok készítése során 5 g szárított növényi kivonatból indultunk ki, melyeket dörzsmozsárban homogenizáltunk. A virágos hajtásokat és leveleket 100 ml desztillált vízzel leforráztuk, majd lefedve hagytuk szobahőmérsékletre hűlni. A keményebb növényi részek (gyökér, termés, kéreg) esetében 30 percig forraltuk a mintákat 100 ml desztillált vízzel, majd ezeket is hagytuk szobahőmérsékletre hűlni. A kihűlt kivonatokat először redős szűrőpapírral leszűrtük, majd centrifugáltuk és 0.2 µm pórusátmérőjű fecskendőszűrővel szűrtük. Az így kapott tiszta oldatokat lefagyasztottuk, fagyasztva szárítottuk, majd felhasználásig hűtőben tároltuk. A vizsgált növények listája, és a különböző mérések során kapott eredmények összefoglalása a függelék 1F. táblázatában található.

5.10. Általános módszerek

Vízoldható antioxidáns kapacitás meghatározása ACW módszerrel

A kivonatok antioxidáns kapacitásának meghatározására több módszer is ismert, melyeket a lejátszódó reakció típusa alapján két csoportra oszthatunk, elektron transzferrel és hidrogén atom transzferrel járó folyamatokra. Utóbbi csoportba tartozik a dolgozatban leírt eredményeket is szolgáltató kemilumineszcens ACW (vízoldható antioxidáns kapacitás) módszer [174]. A növényi kivonatok vízoldható antioxidáns kapacitását PhotoChem® (Analytic Jena AG) készülékkel határoztuk meg aszkorbinsavhoz viszonyítva [175]. Ehhez a készülékhez kapott gyári kalibrációs kit segítségével aszkorbinsav kalibrációs egyenest vettünk fel 0,2-3 nM koncentráció tartományban. A mérés során a készülékben UV-A (360 nm) sugárzás hatására a luminol és oxigén reakciójában szabadgyökök keletkeznek, ez gerjesztett aminosavakat eredményez, amik az energiát kemilumineszcencia formájában adják le. Ha a minta antioxidáns komponensei semlegesítik a gyököket, csökken a mért kemilumineszcencia. A minta koncentrációjából és a maradék szabadgyökök meghatározásával a készülék egy aszkorbinsav sztenderdhez viszonyítva adja meg az antioxidáns kapacitást [175].

Desztillált vízzel 2 mg/ml törzsoldatot készítettünk a liofilizált növényi kivonatokból, majd a kapott gyári reagensekkel, megadott arányban keverve állítottuk össze a mintákat. A mintát desztillált vízzel addig hígítottuk, amíg a kapott érték a kalibrációs tartományon belülre esett. A készülék által meghatározott adatok alapján, a hígítással és a bemért tömeggel

visszaszámolva a vízoldható antioxidáns kapacitás $\mu\text{g}/\text{mg}$ aszkorbinsav dimenzióban adható meg.

Fehérje koncentráció meghatározás

A felhasznált fehérje oldatok koncentrációját Bradford módszerrel [166] határoztam meg. Ehhez a fehérje oldatból annak becsült koncentrációjának megfelelően hígítást készítettem, majd a meghígított mintából $20\ \mu\text{l}$ -t adtam $1\ \text{ml}$ Bradford reagenshez. A keveréket ezután 10 percig szobahőmérsékleten tartottam, a megfelelő színintenzitás kialakulásának érdekében, majd $595\ \text{nm}$ -en spektrofotometriásan meghatároztam a minta abszorbanciáját. A mérés során $20\ \mu\text{l}$ víz és $1\ \text{ml}$ Bradford reagens keverékét használtam vaknak. A kapott abszorbancia értékből, a hígítással való korrekció után egy albuminnal készített kalibráció segítségével határoztam meg a minta pontos fehérjekoncentrációját, mg/ml dimenzióban.

MALDI-TOF MS

Az alkalmazott szubsztrátok és az extrahált akarbóz tisztaságának ellenőrzésére, illetve a növényi kivonatok összetételének vizsgálatához tömegspektrumokat vettünk fel MALDI-TOF tömegspektrométerrel (Bruker Biflex III), pozitív reflektrom módban. A készülékben a minta ionizálásához egy $337\ \text{nm}$ hullámhosszon működő nitrogén lézert találhatók. Mátrixként $2,5$ -dihidroxi-benzoesav (DHB) alkoholos oldatát használtuk. A kalibrációhoz α -, β - és γ -CD sorozat $[\text{M}+\text{Na}]^+$ tömegeit használtuk fel, amik sorban $995,3067\ \text{Da}$, $1157,3595\ \text{Da}$ és $1319,4124\ \text{Da}$.

Viszkozitás meghatározása

A keményítő, karboximetil-cellulóz és pektin oldatok viszkozitását Ostwald-féle viszkoziméterrel határoztam meg. A mérőműszert vízre és DMSO-ra kalibráltam, majd az így meghatározott állandót ($0,04115\ \text{CSt/s}$) használtam a viszkozitás számításakor. A kapott értékeket CSt dimenzióban kaptam meg, amit mPas-ra váltottam át ($1\ \text{CSt} = 1\ \text{mPas}$).

6. Összefoglalás

PhD munkám során az ITC módszer két fő felhasználási módját alkalmazva enzimkinetikai és kötődési vizsgálatokat végeztem, és ehhez szükséges módszereket állítottam be fehérjék és szénhidrátok vizsgálatára.

Az irodalomban enzimkinetikai vizsgálatokhoz egyszeres és többszörös injektálást alkalmazó módszereket is találhatunk, ezek azonban általában nehezen optimalizálhatóak, így alkalmazásuk idő- és költséghatákonyság szempontjából sem tekinthető ideálisnak. D'Amico 2004-ben leírt módszere alapján egy humán nyál α -amilázt alkalmazó modellrendszer segítségével kidolgoztam és jellemeztem egy ITC-alapú enzimkinetikai és gátlási vizsgálatokra alkalmas módszert, mely kombinálja egymással a korábbi egyszeres és többszörös vizsgálatok előnyös tulajdonságait és kiküszöböli az enzimes vizsgálatok során a szubsztrát oldékonyságából és hígulásból adódó problémákat.

A módszerfejlesztés során meghatároztam a kinetikai vizsgálatokhoz megfelelő műszes paramétereket és a vizsgálatokhoz szükséges koncentráció viszonyokat. Ezek alapján a méréseket 37 °C-on, 5 μ cal/s referencia teljesítménnyel, legalább 750 rpm keverési sebességgel végeztem. A mérésekhez 5 nM enzimet használtam és HPLC segítségével igazoltam, hogy a vizsgálat időtartama alatt a szubsztrát kevesebb mint 10 %-a alakul át. A módszer alkalmazhatóságát HSA és PPA katalizálta hidrolízis reakciók segítségével teszteltem. Ehhez elsőként GalG₂CNP és szintén CNP kromofor csoportot tartalmazó maltoheptaóz segítségével végeztem kinetikai vizsgálatokat, majd a kapott eredményeket a csoportunkban korábban alkalmazott és az irodalomban leírt spektrofotometriával és HPLC-vel kapott eredményekkel vettem össze. Az adatok jó egyezést mutattak, így a mérést kiterjesztettem szabad- és CNP kromofor csoportot tartalmazó maltooligomer sorozatok vizsgálatára. Mivel az ITC univerzális detektornak tekinthető, alkalmazásával kiküszöbölhető a kromofor nélküli szénhidrátokkal történő vizsgálatok kritikus pontja, a szubsztrát vagy keletkező termékek detektálása. A kapott K_M értékek alapján elmondható, hogy az oligomer szubsztrátok esetében a maltoheptaóz, illetve az ennél nagyobb polimerizáltságú oligomerek alkalmazásával jól modellezhetők a keményítővel történő vizsgálatok, mivel az ezek esetében kapott K_M értékek a keményítő HSA katalizálta hidrolízis reakció K_M értékével megegyeznek ($K_M = 1,4$ mg/ml). A kromofor csoport hatása is látható, mivel az aromás kromofort tartalmazó oligomerek esetében kapott K_M értékek minden esetben kisebbek az azonos hosszúságú szabad oligomereknél meghatározott értékektől.

A természetes keményítő szubsztráttal való vizsgálatok és a kromoforos szubsztrátok alkalmazása között kompromisszumos megoldást jelent a jól detektálható kék keményítővel végzett kinetikai vizsgálat. Mind a kék mind a natív keményítő esetében is található az irodalomban olyan módszer, ahol felforralják a keményítő szuszpenziót és olyan is ahol nem, így vizsgáltam a szubsztrát hőkezelésének hatását a reakcióra. Ehhez PPA és HSA enzimekkel spektrofotometriás mérést végeztem a kék keményítő, és ITC mérést a natív és a kék keményítő esetében. Az eredmények azt mutatják, hogy a hőkezelt keményítők esetében a reakciósebesség két nagyságrenddel nagyobb mind a két enzim esetében. Az ITC-vel végzett vizsgálatok során a forralás nélküli keményítővel az általánosan használt enzimkoncentrációval nem kaptam mérhető effektust. Összehasonlítandó a keményítő és kék keményítő hidrolízis reakcióit, HSA és PPA enzimekkel meghatároztam a reakciók K_M értékét 0,1-20 mg/ml koncentráció tartományban, ahol a kék keményítő esetében szubsztrát gátlást figyeltem meg mindkét enzim esetében. Az adatokra a Haldene egyenlet segítségével görbét illesztve meghatároztam a K_M és K_i értékeket. A kék keményítő hidrolízis reakciójának a K_M értéke mindkét enzim esetében kisebb, mint a normál keményítő esetében kapott érték, míg a K_i érték a HSA esetében 49 mg/ml, a PPA esetében 16,4 mg/ml. Az eredmények alapján javaslatot tettünk a kék keményítővel végzett kinetikai vizsgálatok módszerének módosítására.

Kinetikai vizsgálatokat végeztem rosszul oldódó, gélesedő szubsztrátok viszkózus oldatainak alkalmazásával is, demonstrálva ezzel, hogy a rendszer kellően robusztus egy ilyen, más módszerekkel nehezen vagy nem vizsgálható rendszer jellemzésére is. Ehhez pektin és cellulóz lebontását vizsgáltam egy ipari enzim keverék (Pektinex Ultra AFP) és egy pektináz készítmény alkalmazásával, két hőmérsékleten (25 és 45 °C). Mivel mindkét enzimműködés többféle enzimaktivitással rendelkezik, a vizsgált reakciók esetében látszólagos K_M (K_M') értékeket határoztam meg. A két, pektin bontó aktivitással rendelkező készítmény esetében a K_M' értékek alapján elmondható, hogy az ipari készítmény (Pektinex Ultra AFP) aktivitása körülbelül ötszöröse a kutatási célra forgalmazott készítménynek, ami a több enzimaktivitásnak és a készítményben található szinergisztikusan működő enzimeknek tulajdonítható. A PU AFP celluláz aktivitással is rendelkezik, így vizsgáltam a cellulóz bontó képességet és meghatároztam a reakció K_M' értékét a pektin lebontás vizsgálatánál is használt két hőfokon. A mérések konklúziója, hogy a módszer alkalmas akár erősen viszkózus rendszerekben való mérésre is. A módszer alkalmazhatóságának korlátját az erősen viszkózus oldatok esetében (>100 mPas) a mérőcella feltöltésére használt fecskendő használatának nehézsége jelentette.

A módszert alkalmaztam enzim gátlás vizsgálatára is. Ennek tesztelésére egy kereskedelmi forgalomban kapható α -glukozidáz inhibitor (akarbóz) és a fent leírt HSA modellrendszert

használtam. Az akarbóz kompetitív átmeneti termék analóg, ami a különböző hosszúságú szubsztrátok (GalG₂CNP, G₇, keményítő) alkalmazása során, az IC₅₀ és K_i értékekben mutatkozó tendencia alapján is igazolást nyert. A GalG₂CNP esetében kapott IC₅₀ értéket összevettem a csoportunkban korábban elvégzett spektrofotometriás módszerekkel kapott értékkel is, ahol jó egyezést találtam (0,66 illetve 0,88 µM). A módszert alkalmaztam továbbá gátlás típus meghatározására is akarbóz, GTH és sztívia vizsgálatokban. Az ITC módszerrel kapott eredményeket összehasonlítottam korábbi publikált eredményekkel is.

A gátlási vizsgálatokat gyakorlatban is alkalmaztam 60 különböző, gyógy- és fűszernövényekből készített vizes kivonat HSA gátló hatásának tesztelésére, keményítő szubsztrátot tartalmazó rendszeren. A kapott eredmények alapján a bogyós gyümölcsök levelei, a zöld tea, fahéj és szegfűbors jelentős gátló hatással rendelkezik, IC₅₀ értékünk 0,4-1,2 mg/ml érték között van. Meghatároztam a kivonatok alapját képező száraz növényi részek vízdoldható szárazanyag tartalmát, amiből arra a következtetésre jutottam, hogy a fent leírt, legjobbnak talált kivonatok esetében, akár otthoni fogyasztás során is elérhető az enzimgátláshoz szükséges hatékony koncentráció. Tömegspektrometriás módszerrel megkíséréltem azonosítani a kivonatokban található gátlásért felelős komponenseket, de néhány flavonoid típusú ismert gátló hatással bíró vegyület kivételével ezidáig nem sikerült a komponensek azonosítása. Kiemelten foglalkoztuk az édesítőszer alapanyagként használt sztívia növény vizsgálatával is. A vizes és alkoholos kivonatok rendelkeznek HSA gátló hatással (IC₅₀: 4 illetve 2,5 mg/ml keményítő szubsztráton mérve), azonban a fő komponensként ismert szteviozid és rebaudiozid a keményítővel szemben nem mutatott gátló hatást. Meghatároztam a növényi kivonatok vízdoldható antioxidáns kapacitását ACW módszerrel aszkorbinsavra viszonyítva, mely során gyenge korrelációt találtam a gátlási hatékonyság és az antioxidáns hatás között. Ismerve a cukorbetegség során a redoxi rendszer eltolódása következtében kialakuló szövődeményeket, további előnyt jelenthet a kezelésben. Eredményeink alapján a fenti gyógynövényekből készített kivonatok hatékony kiegészítői lehetnek egy cukorbetegség terápiának vagy egy fogyókúra diétának.

Németországi együttműködő partnereink számítógépes modellezés segítségével új, eddig nem vizsgált, szénhidrát részt nem tartalmazó HSA inhibitorokat keresnek. A modellezés alapján potenciálisan hatékonnak ítélt komponensek *in vitro* vizsgálatát is elvégeztem spektrofotometriásan GalG₂CNP és keményítő szubsztráttal ITC módszer segítségével. Mivel ezek a komponensek vízben rosszul oldódnak, 2% DMSO tartalmú rendszerben vizsgáltam a gátlási tulajdonságukat. Az ITC módszer érzékeny a szerves oldószerekre, azok nagy híguláshője miatt, így vizsgáltam, hogy egy DMSO tartalmú rendszer hogyan kezelhető. A

spektrofotometriásan tesztelt 56 db inhibitorból 8 rendelkezett 100 μM alatti IC_{50} értékkel, így ezeket vizsgáltam tovább ITC módszerrel, keményítő szubsztráton. A mérések során azt tapasztaltam, hogy a rövid kromogén szubsztráton kapott IC_{50} értékeknél, keményítő esetében egy nagyságrendnyi növekedés volt megfigyelhető. Meghatároztuk a 8 vizsgált inhibitor ligand hatékonyságát is, ami a GalG_2CNP esetében mind a 8 inhibitornál a pozitív kontrollként használt akarbóznál jobb volt, míg a keményítő esetében csak 2 esetben tapasztaltunk jobb értéket. Azonban a komponensek rossz oldékonysága és a keményítővel szemben mutatott kisebb gátlási hatásuk miatt *in vivo* tesztelésükre várhatóan nem kerül sor. Az oldékonyság javítására történt kísérlet ciklodextrinnel való komplexálásra két inhibitor esetében, azonban a komplex nem mutatott gátló hatást. Az ITC rendszer a mérések során jól működött 2% DMSO mellett, a hígulási effektus is kiküszöbölhető volt, ha az enzim és a referencia cella is ugyanilyen koncentrációban tartalmazta az oldószert. A mérések eredménye azt mutatja, hogy a számítógépes modellezés potenciális technika nagyszámú vegyület hatásosságának tesztelésére, csökkentendő a költséges és időigényes *in vitro* és *in vivo* tesztek számát.

Az ITC módszert használtam kötődési vizsgálatokra is. Ennek keretén belül egy humán szérum albuminra specifikus monoklonális antitest albumin kötését és a heparin származék fondaparinux kationos γ -ciklodextrin származékkal való kölcsönhatását vizsgáltam.

Az albumin kötődésének vizsgálata során három módszerrel határoztuk meg a kötődés sztöchiometriáját és a kötődési állandót. Az ITC módszer előnye, hogy ezek a paraméterek egy méréssel meghatározhatók, míg a párhuzamos módszerként alkalmazott kapilláris elektroforézis esetében meghatározásukhoz két módszerre volt szükség (CZE, ACE). A kapott adatok jó egyezést mutatnak, az antitest két albumint képes megkötni, de a kötődés nem véletlenszerűen történik. A kapott K_D értékek alapján első kötőhely jelentősen erősebben köti az albumint ($K_D \sim 10^{-8}$ M), mint a második ($K_D \sim 10^{-7}$ M). A termodinamikai paraméterek alapján az első kötődésben hidrogén kötések és hidrofób interakciók is szerepet játszanak, míg a második kötőhely esetében elsősorban utóbbiak játszanak szerepet. A ΔS pozitív értéke a kötődés során felszabaduló felszíni vízmolekulákra utal.

A fondaparinux egy véralvadásgátlóként alkalmazott szintetikus oligoszacharid, aminek a szerkezetből történő gyorsított eltávolításának egyik lehetséges módja a ciklodextrinnel való komplexálás. A mérések során amid funkciós csoportokkal módosított kationos γ -ciklodextrin származék (γCD^+), ennek nyíltláncú formája (G8^+) illetve egy normál γ -ciklodextrin fondaparinux kötését vizsgáltam. Eredményeim azt mutatják, hogy töltött csoportokat tartalmazó származékok képesek komplexálni a fondaparinuxot, azonban a kötés erőssége elmarad a fondaparinux X_a faktorhoz való affinitásától, így a vérben ez a kötődés nagy

valószínűséggel nem megy végbe. A kötés erősségét tovább csökkentik a környezetben jelenlévő kloridionok, ami további limitációja az ilyen jellegű komplexképződésnek. A kapott termodinamikai paraméterek alapján a kötődés a γCD^+ esetében együttesen entalpia és entrópia vezérelt exoterm folyamat, melyben részben hidrofób kölcsönhatások részben ionos kölcsönhatások és deszolvatáció játszik szerepet. A nyílt láncú formánál entalpia vezérelt a folyamat, vagyis az ionos kölcsönhatások dominálnak, ami érthető, hiszen hiányzik a ciklodextrinnél meglévő apoláris üreg.

Dolgozatommal szerettem volna bemutatni, hogy az ITC technika az általánosan elterjedt kötődési vizsgálatok mellett egyaránt alkalmas enzimkinetikai és gátlási vizsgálatokra egyaránt. Az általam leírt módszer jó alternatíva lehet más módszerekkel nehezen vizsgálható rendszerek, vagy rosszul detektálható reakciók jellemzésére, akár a dolgozatban szereplő szénhidrát témakörben, akár más biológiai vagy kémiai rendszerek esetében.

7. Summary

During the work related to my PhD I developed and applied ITC methods to investigate enzyme kinetics and binding properties of different proteins and carbohydrates.

In the literature single- and multiple injection methods can be found to measure enzyme kinetics, but the optimisation of these are generally difficult, thus these can not be considered ideal in term of time and cost efficacy. According to the method of D'Amico I developed and characterised an ITC technique to enzyme kinetic and inhibition studies using a model system based on human salivary α -amylase (HSA). The method combines the advantages of earlier ones and ignores the drawbacks arised from the problems of solubility and dilution of substrate solutions. During the method development, I defined proper instrumental parameters and concentration ranges needed to the successful kinetic studies. Based on these results the measurements were carried out at 37 °C, using 5 μ cal/sec reference power and 750 rpm stirring speed. I used 5 nM of HSA enzyme after I checked with HPLC that during the assay the conversion of substrate is less than 10%. The applicability of method was verified using HSA and PPA catalised hydrolysis reactions. First, I performed kinetic measurements applying GalG₂CNP and CNP chromophore containing maltoheptaoside and I compared the obtained results with results from the literature, obtained with HPLC and got earlier in our reseach group. The data were in good agreement, therefore I extended the measurements to series of free- and chromophore group containing maltooligomers. Since ITC can be considered as an universal detector, its application can eliminate one of the biggest problem of carbohydrate researches, the detection of substrates or products. On the basis of the obtained K_M values, maltoheptaoside and longer oligomers can model properly the behaviour of starch, because these have the same K_{MS} as starch ($K_M = 1.4$ mg/mL). The effect of chromophore group can also be observed, since the K_{MS} are consistently lower at the chromophore containing oligomers.

A compromise solution between the choromophore containing oligomers and natural starch substrate is the use of well detectable starch azure. In the literature can be found methods about starch and starch azure with and without boiling. I investigated the effect of boiling of substrate solution on the hydrolysis reaction, using PPA and HSA, measuring the reaction rate with spectrophotometer and ITC. The result show that the reaction rate is two magnitudes higher after heat treatment of substrates in the case of both enzymes. Using the general enzyme concentration, I cannot detect heat change if the starch solution was not boiled. To compare the hydrolysis reactions of starch and starch azure catalysed by HSA and PPA, I measured the K_M values in concentration range between 0.1-20 mg/mL and concluded that starch azure brings

about substrate inhibition on both enzymes. Fitting curve based on the Haldene equation I determined the K_M and K_i values of the hydrolysis reactions. The K_M of starch azure is lower than starch in case of both enzymes; the K_i values of starch azure measured on HSA and PPA is 49 mg/ml and 16.4 mg/mL, respectively. Based on our results we suggested the modification of method of kinetic measurements using starch azure.

I also carried out some kinetic measurements with viscous solutions of badly soluble, gelatinous substrates to demonstrate that this technique is robust enough to investigate such a system. Pectin and cellulose solutions were investigated using an industrial enzyme mixture (Pectinex Ultra AFP, PU AFP) and a pectinase enzyme at two different temperature (25 and 45 °C). Since both investigated enzyme products have multiple enzyme activity, apparent K_M (K_M') values were calculated. K_M values of the two enzymes product, which have pectinase activity, show that the activity of industrial one is about five-times higher than the activity of the other pectinase. The phenomenon could be due to the multiple enzyme activities, which work in synergistic manner. The industrial PU AFP also has cellulase activity, therefore I investigated the cellulose degrading ability and determined the K_M' value at the same two temperatures as used in pectinase assays. The main conclusion of these tests is this ITC-based method is suitable for measurements in viscous systems. The limitation of the method is the syringe, which is used to fill the measurement cell, because it could not work properly with highly viscous solutions (>100 mPas).

I applied this method in enzyme inhibition assays, as well. To test the applicability of the method to this purpose a commercially available α -glycosidase inhibitor (acarbose) and the above-mentioned HSA-based system was used. Acarbose is a competitive, intermediary product analogue inhibitor, which properties have been certified with the tendency of K_i and IC_{50} obtained in assays with different length of substrates (GalG₂CNP, G₇, starch). In the case of GalG₂CNP, the IC_{50} values gained with ITC were compared with data from earlier spectrophotometric studies and good agreement were observed (0.66 and 0.88 μ M). I also used the method to identify the type of inhibition of acarbose, GTH and stevia and compared the result with our earlier data and data from the literature.

The inhibition studies were carried out using aqueous extracts of sixty medicinal herbs and spices to test the HSA inhibition potency on starch substrate. The results show that leaves of berries, green tea, cinnamon and allspice have significant inhibition activity against HSA, these IC_{50} values ranged between 0.4-1.2 mg/ml. I ascertained the water soluble dry matter content of used plant parts and concluded that in the case of the seven best extracts the concentration needed to the enzyme inhibition can be reached even normal consumption at home. I attempted

to identify the active compounds in aqueous extracts using mass spectrometry, but except for some well-known flavonoid inhibitor this attempt has not been successful yet. We also dealt with stevia plant, the source of some natural sweeteners. The aqueous and methanolic extracts have α -amylase inhibitor activity (IC_{50} : 4 and 2.5 mg/mL respectively) measured on starch substrate, but the main compounds (stevioside and rebaudiosid A) were inefficient.

The water-soluble antioxidant capacity of aqueous extracts was also determined using ACW technique compared to ascorbic acid. A weak correlation was detected between inhibition activity and water-soluble antioxidant capacity. Knowing the complications in diabetes mellitus forming due to the shift in redox system, this antioxidant properties of extracts could be an additional advantage in treatment. Based on our results, these infusions made from medicinal plants could be effective complements of a diabetes therapy or a slimming diet.

Our collaborators from Germany seek new HSA inhibitors which do not contain carbohydrate moieties using computer modelling. According to the modelling, the *in vitro* test of potentially effective inhibitor compounds was carried out using GalG₂CNP with spectrophotometry and starch substrate with ITC. Since these compounds are badly soluble in water, I used 2% DMSO containing buffered system to test their inhibition potency. ITC is sensitive to organic solvents due to the significant dilution heat change, so I attempted to ascertain how to use a system like this. From the 56 spectrophotometrically tested compounds 8 have IC_{50} under 100 μ M, these were tested further with ITC and starch substrate. I experienced that the IC_{50} values obtained with short chromogen substrate were one magnitude lower than ones determined using starch. I calculated the ligand efficiency (LE) of these eight compounds, which was better than the LE of positive control acarbose, measured on GalG₂CNP. When the LE was calculated from the data acquired with starch, in two cases got better values than acarbose's. Because of the bad solubility and the lower efficacy against starch, *in vivo* test of these compounds will not be performed. In the case of two inhibitor I attempted to improve the solubility using cyclodextrin, but the inhibitor-cyclodextrin inclusion complexes did not show any inhibitor activity. ITC works well with the 2% DMSO containing buffer and the dilution heat effect can be eliminated in case of the injector and reference cell also contained the organic solvent in the same concentration. The results point out that the computer modelling is a well-applicable technique to screen high number of compounds to be reduced the number of time-consuming and expensive *in vitro* and *in vivo* tests.

I applied ITC to binding studies as well. The albumin binding properties of human serum albumin specific monoclonal antibody and fondaparinux binding of cationic γ -cyclodextrin were investigated relating to my Phd work.

In the course of the investigation of albumin binding the stoichiometry and binding constant were determined using three methods. The advantage of ITC is the capability to measure both parameter within one measurements in contrast to the used capillary electrophoresis methods, from which two techniques (ACE, CZE) were needed. The results acquired with the parallel methods are in good agreement, the antibody is able to bind two albumins, but the binding is not random. Based on the K_D values, the albumin binding on the first binding site is much stronger ($K_D \sim 10^{-8}$ M) then the binding on the second site ($K_D \sim 10^{-7}$ M). Thermodynamic parameters indicate that in the binding on the first site hydrogen bonds and hydrophobic interactions take part, but in the second site especially hydrophobic interactions form. The positive value of ΔS means water release during the binding event.

Fondaparinux is a synthetic oligosaccharide applied as an anticoagulant. Acceleration of excretion from the human body could be reached with complexation with cyclodextrin. During my study, cationic γ -cyclodextrin (γCD^+) containing an amide function groups, its open-chained form ($G8^+$) and a γ -cyclodextrin (γCD) fondaparinux binding properties were tested using ITC.

The results show that charged derivatives can complex fondaparinux, but the strength of binding is significantly lower than the strength of fondaparinux – factor Xa binding. This means that the complexation in human bloodstream probably will not form. The chloride ions in the surrounding also weakens the strength of binding, which means further limitations of such attempts. Based on the thermodynamic parameters, fondaparinux binding of γCD^+ is both enthalpy and enthalpy driven exotherm reaction, in which hydrophobic- and electrostatic interactions and desolvation take part. The fondaparinux binding of open-chained form is enthalpy driven, namely electrostatic interactions dominate, because hydrophobic cavity of cyclodextrin is missing.

With my work, I wanted to demonstrate that ITC is also suitable for enzyme kinetic and inhibition studies besides the well-known binding measurements. The here described method would be a good alternative for systems, which hardly investigated with other methods or to characterize poorly detectable reactions. This method can be used to solve problems related to not only carbohydrates, but also any biological or chemical ones.

8. Irodalomjegyzék

1. Kahn SE, Cooper ME, Del Prato S. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. *The Lancet*. 2014;383:1068-1083.
2. Mojibafan M, Afsartala Z, Amoli MM, Mahmoudi M, Yaghmaei P, Larijani B, Ebrahim-Habibi A. Liver alpha-amylase gene expression as an early obesity biomarker. *Pharmacological Reports*. 2017;69:229-234.
3. Ludwig TH, Smeaton WA. The ice calorimeter of Lavoisier and Laplace and some of its critics. *Annals of Science* 1974;31:1-18.
4. Biltonen RL, Langerman N. Microcalorimetry for biological chemistry: experimental design, data analysis, and interpretation. *Methods in Enzymology* 1979;61:287-318.
5. Wiseman T, Williston S, Brandts JF, Lin LN. Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Analytical Biochemistry* 1989;179:131-137.
6. Freyer MW, Lewis EA. Isothermal titration calorimetry: experimental design, data analysis, and probing macromolecule/ligand binding and kinetic interactions. *Methods in Cell Biology* 2008;84:79-113.
7. Wang SSS, Lin MS, Chen SL, Chang Y, Ruaan RC, Chen Wy. Using isothermal titration calorimetry to real-time monitor the heat of metabolism: A case study using PC12 cells and A β (1-40). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2011;83:307-312.
8. Braissant O, Wirz D, Gopfert B, Daniels AU. Use of isothermal microcalorimetry to monitor microbial activities. *FEMS Microbiol Letters* 2010;303: 1-8.
9. Freire, E, Mayorga OL, Straume M. Isothermal titration calorimetry. *Analytical Chemistry* 1990;62:950A-959A.
10. Vuignier K, Schappler J, Veuthey JL, Carrupt PA, Martel S. Drug-protein binding: a critical review of analytical tools. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2010;398:53-66.
11. Matulis D, Rouzina I, Bloomfield VA. Thermodynamics of DNA binding and condensation: isothermal titration calorimetry and electrostatic mechanism. *J. Molecular Biology* 2000;296:1053-1063.
12. Salim NN, Feig AL. Isothermal titration calorimetry of RNA. *Methods* 2009;47:198-205.
13. Camci-Unal G, Pohl NLB. Quantitative determination of heavy metal contaminant complexation by the carbonylhydraze polymer chitin. *J. Chemical Engineering Data* 2010; 55:1117-1121.
14. Seelig J. Thermodynamics of lipid-peptide interactions. *BBA Biomembranes* 2004;1666:40-50.
15. ITC oktatási segédanyagok – www.malvern.com (2014)
16. Pochetti G, Montanari R. Isothermal titration calorimetry to determine the association constants for a ligand bound simultaneously to two specific protein binding sites with different affinities. *Protocol Exchange*. 2012. doi: 10.1038/protex.2012.063
17. Bian X, Lockless SW. Preparation to minimize buffer mismatch in isothermal titration calorimetry experiments. *Analytical Chemistry* 2016;88:5549-5553.
18. Brandts L.N, Lin T, Wiseman S, Williston, Yang CP. An instrument for rapid determination of binding constants for biomolecules *AM LAB* 1990;22:30-41.
19. Myszka DG, Abdiche YN, Arisaka F, Byron O, Eisenstein E, Hensley P, Thomson JA, Lombardo CR, Schwarz F, Stafford W, Doyle ML. The ABRF-MIRG'02 study: assembly state, thermodynamic and kinetic analysis of an enzyme/inhibitor interaction. *J. Biomolecular Techniques* 2003;14:247-269.

20. Peters WB, Frasca V, Brown RK. Recent development of in isothermal titration calorimetry label free screening. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening* 2009;12:772-790.
21. Torres FE, Recht MI, Coyle JE, Bruce RH, Williams G. Higher throughput calorimetry: opportunities, approaches and challenges. *Current Opinion in Structural Biology* 2010;20:598-605.
22. Ladbury JE. Calorimetry as a tool for understanding biomolecular interactions and aid to drug design. *Biochemical Society Transactions* 2010;38:888-893.
23. Chaires JB. Calorimetry and thermodynamics in drug design. *Annual Reviews in Biophysics* 2008;37:135-151.
24. Weber PC, Salemme FR. Application of calorimetric methods to drug discovery and the study of protein interactions. *Current Opinion in Structural Biology* 2003;13:115-121.
25. Hopkins AL, Groom CR, Alex A. Ligand efficiency: a useful metric for lead selection. *Drug Discovery Today* 2004;9:430-431.
26. Kuntz D, Chen K, Sharp KA, Kollman PA. The maximal affinity of ligands. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences* 1999;96:9997-10002.
27. Dubel S, Reichert JM. *Handbook of Therapeutic Antibodies* (2nd edition) Wiley-Blackwell 2014.
28. Adhikary R, Yu W, Oda M, Walker RC, Chen T, Stanfield RL, Wilson IA, Zimmermann J, Romesberg FE. Adaptive Mutations Alter Antibody Structure and Dynamics during Affinity Maturation. *Biochemistry* 2015;54:2085–2093.
29. Torigoe H, Nakayama T, Imazato M, Shimada I. The affinity maturation of anti-4-hydroxy-3-nitrophenylacetyl mouse monoclonal antibody. A calorimetric study of the antigen-antibody interaction. *Journal of Biological Chemistry* 1995;270:22218-22222.
30. Bhat NT, Bentley GA, Boulot G, Greene MI, Tello D, Dall'Acqua W, Souchon H, Schwarz FP, Mariuzza RA, Poljak RJ. Bound water molecules and conformational stabilization help mediate an antigen-antibody association. *PNAS* 1994;91:1089-1093.
31. Reichert JM. Antibody-based therapeutics to watch in 2011. *mAbs*.2011; 3: 76-99.
32. Edeling MA, Austin SK, Shrestha B, Dowd KA, Mukherjee S, Nelson CA, Johnson S, Mabila MN, Christian EA, Rucker J, Pierson TC, Diamond MS, Fremont DH. Potent dengue virus neutralization by a therapeutic antibody with low monovalent affinity requires bivalent engagement. *PLOS Pathogens* 2014;10:1-10.
33. Maynard J, Georgiou G. Antibody engineering. *Annual Review of Biomedical Engineering* 2000;2:339-376.
34. Livingstone JR. Antibody characterisation by isothermal titration calorimetry. *Nature*. 1996;384:491-492.
35. Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*. 2000;405:837-846.
36. Davis ME, Brewster ME. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Nature Reviews*. 2004;3:1023-1035.
37. Del Valle EMM. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*. 2004;39:1033-1046.
38. Mura P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2014;101:238-250.
39. Yang SY. Synthesis and characterization of cationic and anionic cyclodextrin oligomers and their use in layer-by-layer film formation. *Bulletin of the Korean Chemical Society*. 2013;34:2016-2022.
40. Zhou J, Tang J, Tang W. Recent development of cationic cyclodextrins for chiral separation. *Trends in Analytical Chemistry*. 2015;65:22-29.

41. Juvancz Z, Markides KE, Jicsinszky L. Chiral analysis of metoprolol and its by-products by capillary electrophoresis. *Journal of Microcolumn Separations*, 1999;11:716-722.
42. Zia VS, Rajewski RA, Stella VJ. Effect of cyclodextrin charge on complexation of neutral and charged substrates: comparison of (SBE) 7M- β -CD to HP- β -CD. *Pharmaceutical research*. 2001;18:667-673.
43. Cryan SA, Holohan A, Donohue R, Darcy R, O'Driscoll CM. Cell transfection with polycationic cyclodextrin vectors. *European journal of pharmaceutical sciences*. 2004;21: 625-633.
44. Liu Y, Yu ZL, Zhang YM, Guo DS, Liu YP. Supramolecular architectures of β -cyclodextrin-modified chitosan and pyrene derivatives mediated by carbon nanotubes and their DNA condensation. *Journal of the American Chemical Society*. 2008;130:10431-10439.
45. Waters LJ, Bedford S, Parkes GMB, Mitchell JC. Influence of lipophilicity on drug-cyclodextrin interactions: a calorimetric study. *Thermochimica Acta*. 2010;511:102-106.
46. Wenz G, Strassnig C, Thiele C, Engelke A, Morgenstern B, Hegetschweiler K. Recognition of ionic guests by ionic β -cyclodextrin derivatives. *Chemistry-A European Journal*. 2008;14:7202-7211.
47. Morin PE, Freire E. Direct calorimetric analysis of the enzymic activity of yeast cytochrome c oxidase. *Biochemistry*. 1991;30:8494-8500.
48. Bianconi ML. Calorimetry of enzyme-catalyzed reactions. *Biophysical chemistry*. 2007;126:59-64.
49. Thierry G, Lonhienne A, Winzor DJ. A potential role for isothermal calorimetry in studies of the effects of thermodynamic non-ideality in enzyme-catalyzed reactions. *Journal of Molecular Recognition*. 2004;17:351-361.
50. Murphy L, Borch K, McFarland KC, Bohlin C, Westh P. A calorimetric assay for enzymatic saccharification of biomass. *Enzyme and Microbial Technology*. 2010;46:141-146.
51. Siddiqui KS, Ertan H, Charlton T, Poljak A, Khaled AD, Yang X, Marshall G, Cavicchioli. Versatile peroxidase degradation of humic substances: use of isothermal titration calorimetry to assess kinetics, and applications to industrial wastes. *Journal of biotechnology*. 2014;178:1-11.
52. Chen CW, Niepel M, Sorger PK. Classic and contemporary approaches to modeling biochemical reactions. *Genes & development*. 2010;24:1861-1875.
53. Fazekas E, Szabó K, Kandra L, Gyémánt G. Unexpected mode of action of sweet potato β -amylase on maltooligomer substrates. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013;1834:1976-1981.
54. Goldberg RN, bell D, Tewari YB, McLaughlin MA. Thermodynamics of hydrolysis of oligosaccharides. *Biophysical chemistry*. 1991;40:69-76.
55. Haq I, Hill B. Calorimetry in the fast lane: The use of ITC for obtaining enzyme kinetic constants. *Microcal, LLC application note*. 2002.
56. Transtrum MK, Hansen LD, Quinn C. Enzyme kinetics determined by single-injection isothermal titration calorimetry. *Methods*. 2015;76:194-200.
57. Krokeide IM, Eijsink VGH, Sørli M. Enzyme assay for chitinase catalyzed hydrolysis of tetra-N-acetylchitotetraose by isothermal titration calorimetry. *Thermochimica acta*. 2007;454:144-146.
58. Bohlin C, Olsen SN, Morant MD, Patkar S, Borch K, Westh P. A comparative study of activity and apparent inhibition of fungal β -glucosidases. *Biotechnology and Bioengineering*. 2010;107:943-952.

59. Karim N, Okada H, Kidokoro S. Calorimetric evaluation of the activity and the mechanism of cellulases for the hydrolysis of cello-oligosaccharides accompanied by the mutarotation reaction of the hydrolysed products. *Thermochimica Acta*. 2005;431:9-20.
60. Poduch E, Bello AM, Tang S, Fujihashi M, Pai F, Kotra LP. Design of inhibitors of orotidine monophosphate decarboxylase using bioisosteric replacement and determination of inhibition kinetics. *Journal of medicinal chemistry*. 2006;49:4937-4945.
61. Wiggers HJ, Cheleski J, Zottis A, Oliva G, Andricopulo AD, Montanari CA. Effects of organic solvents on the enzyme activity of *Trypanosoma cruzi* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in calorimetric assays. *Analytical biochemistry*. 2007;370:107-114.
62. Ertan H, Siddiqui KS, Muenchhoff J, Charlton T, Cavicchioli R. Kinetic and thermodynamic characterization of the functional properties of a hybrid versatile peroxidase using isothermal titration calorimetry: insight into manganese peroxidase activation and lignin peroxidase inhibition. *Biochimie*. 2012;94:1221-1231.
63. Olsen SN. Applications of isothermal titration calorimetry to measure enzyme kinetics and activity in complex solutions. *Thermochimica Acta*. 2006;448:12-18.
64. Bai W, Shen J, Zhu Y, Men Y, Sun Y, Ma Y. Characteristics and kinetic properties of L-rhamnose isomerase from *Bacillus subtilis* by isothermal titration calorimetry for the production of D-allose. *Food Science and Technology Research*. 2015;21:13-22.
65. Park J, Zielinski M, Magder A, Tsantrizos YS, Berghuis AM. Human farnesyl pyrophosphate synthase is allosterically inhibited by its own product. *Nature Communications*. 2017. DOI: 10.1038/ncomms14132
66. Olsen SN, Lumby E, McFarland K, Borch K, Westh P. Kinetics of enzymatic high-solid hydrolysis of lignocellulosic biomass studied by calorimetry. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2011;163:626-635.
67. Lonhienne T, Baise E, Feller G, Bouriotis V, Gerday C. Lonhienne, T., Baise, E., Feller, G., Bouriotis, V., & Gerday, C. Enzyme activity determination on macromolecular substrates by isothermal titration calorimetry: application to mesophilic and psychrophilic chitinases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*. 2001;1545:349-356.
68. Benini S, Cianci M, Mazzei L, Ciurli S. Fluoride inhibition of *Sporosarcina pasteurii* urease: structure and thermodynamics. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 2014;19:1243-1261.
69. Maximova K, Trylska J. Kinetics of trypsin-catalyzed hydrolysis determined by isothermal titration calorimetry. *Analytical Biochemistry*. 2015;486:24-34.
70. Stadtman ER. Allosteric regulation of enzyme activity. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*. 1966;28:41-154.
71. Cheng YC, Prusoff WH. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochemical pharmacology*. 1973;22:3099-3108.
72. Cer RZ, Mudunuri U, Stephens R, Lebeda FJ. IC₅₀-to- K_i : a web-based tool for converting IC₅₀ to K_i values for inhibitors of enzyme activity and ligand binding. *Nucleic acids research*. 2009;37:441-445.
73. Dixon M. The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochemical journal*. 1953;51:170.
74. Dahot MU, Saboury AA, Moosavi-Movahedi AA. Inhibition of β -amylase activity by calcium, magnesium and zinc ions determined by spectrophotometry and isothermal titration calorimetry. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. 2004;19:157-160.

75. Wapenaar H, van den Bosch T, Leus NG, van der Wouden PE, Eleftheriadis N, Hermans J, Bischoff R. The relevance of K_i calculation for bi-substrate enzymes illustrated by kinetic evaluation of a novel lysine (K) acetyltransferase 8 inhibitor. *European journal of medicinal chemistry*. 2017;136:480-486.
76. Lorenzo VP, Junior FJBM, Filho JMB, Scotti L, Scotti MT. Theoretical study of phosphoethanolamine: a synthetic anticancer agent with broad antitumor activity. *Journal of Chemistry*. 2016. DOI: 10.1155/2016/4068641
77. Ramasubbu N, Luo PV, Brayer GD, Levine MJ. Structure of human salivary α -amylase at 1.6 Å resolution: implications for its role in the oral cavity. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. 1996;52:435-446.
78. Vallee BL, Stein EA, Sumerwell WN, Fischer EH. Metal content of α -amylases of various origins. *Journal of Biological Chemistry*. 1959;234:2901-2905.
79. Numao S, Maurus R, Sidhu G, Wang Y, Overall CM, Brayer GD, Withers SG. Probing the role of the chloride ion in the mechanism of human pancreatic α -amylase. *Biochemistry*. 2008;41:215-225.
80. Maurus R, Begum A, Williams LK, Fredriksen JR, Zhang R, Whitners S, Brayer GD. Alternative catalytic anions differentially modulate human α -amylase activity and specificity. *Biochemistry*. 2008;47:3332-3344.
81. Cazy (Carbohydrate active enzyme database) www.cazy.org
82. blast.ncbi.nlm.nih.gov
Altschul SF, Wootton JC, Gertz EM, Agerwala R, Morgulis A, Schäfer AA, Yu YK. Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. *FEBS J*. 2005;272:5101-5109.
83. Warshaw AL, Lee KH. Characteristic alterations of serum isoenzymes of amylase in diseases of liver, pancreas, salivary gland, lung and genitalia. *Journal of Surgery Research*. 1977;22:362-369.
84. Schibler U, Hagenbüchle O, Wellauer PK, Pittet AC. Two promoters of different strenghts control the transcription of the mouse alpha-amylase gene Amy-1a in the parotid gland and the liver. *Cell*. 1983;33:501-508.
85. Kandra L. α -Amylases of medical and industrial importance. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*. 2003;666:487-498.
86. Souza PMD. Application of microbial α -amylase in industry-A review. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2010;41:850-861.
87. Rohleder N, Nater UM. Determinants of salivary α -amylase in humans and methodological considerations. *Psychoneuroendocrinology*. 2009;34:469-485.
88. Kaufman RA, Tietz NW. Recent advances in measurement of amylase activity--a comparative study. *Clinical chemistry*. 1980;26:846-853.
89. Zhizhuang X, Storms R, Tsang A. A quantitative starch-iodine method for measuring alpha-amylase. *Anal Biochemistry*. 2006;351:146-148.
90. Manitchotpisi P, Skory CD, Leathers TD, et al. α -Amylase activity during pullulan production and α -amylase gene analyses of *Aureobasidium pullulans*. *J Indian Microbiol Biotechnology* 2011;38:1211-1218.
91. Tran PL, Lee JS, Park KH. Experimental evidence for a 9-binding subsite of *Bacillus licheniformis* thermostable α -amylase. *FEBS Letters*. 2014;588:620-624.
92. Mótýán JA, Fazekas E, Mori H, et al. Transglycosylation by barley α -amylase. *J Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2011;72:229-237.
93. Xu Y, Zhang Z, Li L, et al. Catechins play key role in green tea extract-induced postprandial hypoglycemic potential in vitro. *European Food Research Technology*. 2013;237:89-99.

94. Lorentz K, Gütschow B, Renner F. Evaluation of a direct α -amylase assay using 2-chloro-4-nitrophenyl- α -D-maltotrioxide. *Clinical Chemistry Lab Medicine*. 2005;37:1053–1062.
95. 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.
96. Kumar PS, Sudha S. Evaluation of α -amylase and α -glucosidase inhibitory properties of selected seaweeds from Gulf of Mannar. *International Research Journal of Pharmacology*. 2012;3:128–130.
97. Manaharan T, Appleton D, Cheng HM, Palanisamy UD. Flavonoids isolated from *Syzygium aqueum* leaf extract as potential antihyperglycaemic agents. *Food Chemistry*. 2012;132:1802–1807.
98. Morishita Y, Iinuma Y, Nakashima N, et al. Total and pancreatic amylase measured with 2-chloro-4-nitrophenyl-4-O-beta-D-galactopyranosylmaltoside. *Clinical Chemistry*. 2000;46:928–933.
99. Trinder P. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *Journal of clinical pathology*. 1969;22:158-161.
100. Kandra L, Gyémánt Gy, Remenyik J, Ragunath C, Ramasubbu N. Subsite mapping of human salivary α -amylase and the mutant Y151M. *FEBS letters*. 2003;544:194-198.
101. Farias DF, Carvalho AFU, Oliveira CC, Sousa NM, Rocha-Bezerra LCB, Ferreira PMP, Hissa DC. Alternative method for quantification of α -amylase activity. *Brazilian Journal of Biology*. 2010;70:405-407.
102. D'Amico S, Sohler JS, Feller G. Kinetics and energetics of ligand binding determined by microcalorimetry: insights into active site mobility in a psychrophilic α -amylase. *Journal of molecular biology*. 2006;358:1296-1304.
103. Caspary WF, Graf S. Inhibition of human intestinal α -glucosidehydrolases by a new complex oligosaccharide. *Research Experimental Medicine*. 1979;175:1-6.
104. Schmidt DD, Frommer W, Junge B, Müller L, Wingender W, Truscheit E. α -glucosidase inhibitors. *Naturwissenschaften*. 1977;64:535-536.
105. Rosak C, Mertes G. Critical evaluation of the role of acarbose in the treatment of diabetes: patient considerations. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy*. 2012;5:357.
106. Clissold SP, Edwards C. Acarbose. *Drugs*. 1988;35:214-243.
107. Sales PM, Souza PM, Simeoni LA, Magalhaes PO, Silveira D. α -Amylase inhibitors: a review of raw material and isolated compounds from plant source. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. 2012;15:141-183.
108. Kobayashi K, Baba E, Fushiya S, Takano F, Batkhuu J, Dash T, Yoshizaki F. Screening of mongolian plants for influence on amylase activity in mouse plasma and gastrointestinal tube. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2003;26:1045-1048.
109. Prashanth D, Padmaja R, Samiulla DS. Effect of certain plant extracts on α -amylase activity. *Fitoterapia*. 2001;72:179-181.
110. Bhat M, Zinjarde SS, Bhargava SY, Kumar AR, Joshi BN. Antidiabetic Indian plants: a good source of potent amylase inhibitors. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2011. doi: 10.1093/ecam/nen040
111. Ali H, Houghton PJ, Soumyanath A. α -Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. *Journal of ethnopharmacology*. 2006;107:449-455.
112. Lo Piparo E, Scheib H, Frei N, et al. Flavonoids for controlling starch digestion: structural requirements for inhibiting human α -amylase. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2008;51:3555–3561.

113. Beecher GR. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *The Journal of nutrition*. 2003;133:3248-3254.
114. Khanbabaee K, Ree T. Tannins: classification and definition. *Natural product reports*. 2001;18:641-649.
115. Funke I, Melzig MF. Traditionally used plants in diabetes therapy: phytotherapeutics as inhibitors of alpha-amylase activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2006;16:1-5.
116. Sheliya MA, Begum R, Pillai KK, Aeri V, Mir SR, Ali A, Sharma M. In vitro α -glucosidase and α -amylase inhibition by aqueous, hydroalcoholic, and alcoholic extract of *Euphorbia hirta* L. *Drug Development and Therapeutics*. 2016;7:26-30.
117. Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, Omar AKM. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *Journal of Food Engineering*. 2013;117:426-436.
118. Weiner D, Levy Y, Khankin EV, Reznick AZ. Inhibition of salivary amylase activity by cigarette smoke aldehydes. *J Physiol Pharmacol*. 2008;59:727-737.
119. Doleckova-Maresova L, Pavlik M, Horn M, Mares M. De novo design of α -amylase inhibitor: A small linear mimetic of macromolecular proteinaceous ligands. *Chemistry & biology*. 2005;12:1349-1357.
120. Kato E, Chikahisa F, Kawabata J. Synthesis and study of the pancreatic α -amylase inhibitory activity of methyl acarviosin and its derivatives. *Tetrahedron Letters*. 2016;57:1365-1367.
121. Shahidpour S, Panahi F, Yousefi R, Nourisefat M, Nabipoor M, Khalafi-Nezhad A. Design and synthesis of new antidiabetic α -glucosidase and α -amylase inhibitors based on pyrimidine-fused heterocycles. *Medicinal Chemistry Research*. 2015;24:3086-3096.
122. Kitchen DB, Decornez H, Furr JR, Bajorath J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature reviews. Drug discovery*. 2004;3: 935-949.
123. Mohan V, Gibbs AC, Cummings MD, Jaeger EP, DesJarlais RL. Docking: successes and challenges. *Current pharmaceutical design*. 2005;11:323-333.
124. Jhong CH, Riyaphan J, Lin SH, Chia YC, Weng CF. Screening alpha-glucosidase and alpha-amylase inhibitors from natural compounds by molecular docking in silico. *Biofactors*. 2015;41:242-251.
125. Hyun TK, Eom SH, Kim JS. Molecular docking studies for discovery of plant-derived α -glucosidase inhibitors. *Plant Omics Journal*. 2014;7:166-170.
126. Mohapatra S, Prasad A, Haque F, Ray S, De B, Ray SS. In silico investigation of black tea components on α -amylase, α -glucosidase and lipase. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2015;5:42-47.
127. Rasouli H, Hosseini-Ghazvini SM, Adibi H, Khodarahmi R. Differential α -amylase, α -glucosidase inhibitory activities of plant-derived phenolic compounds: A virtual screening perspective for the treatment of obesity and diabetes. *Food and Function*. 2017. DOI: 10.1039/C7FO00220C
128. Siow HL, Lim TS, Gan CY. Development of a workflow for screening and identification of α -amylase inhibitory peptides from food source using an integrated bioinformatics-phage display approach: Case study – Cummin seed. *Food Chemistry*. 2017;214:67-76.
129. Gummadi SN, Panda T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases—a review. *Process biochemistry*. 2003;38:987-996.
130. Gummadi SN, Manoj N, Kumar S. Structural and biochemical properties of pectinases. *Industrial Enzymes: Structures, Functions and Applications*. Springer, 2007. 99-115.
131. Pedrollo DB, Monteiro AC, Gomes E, Carmona EC. Pectin and pectinases: production, characterization and industrial application of microbial pectinolytic enzymes. *Open Biotechnology Journal*. 2009;3:9-18.

132. Kashyap DR, Vohra PK, Chopra S, Tewari R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource technology*. 2001;77:215-227.
133. Collmer A, Ried JL, Mount MS. Assay methods for pectic enzymes. *Methods in Enzymology*. 1988;161: 329–335.
134. Biz A, Farias FC, Motter FA, Paula DH, Richard P, Krieger N, Mitchell DA. Pectinase activity determination: an early deceleration in the release of reducing sugars throws a spanner in the works! *PloS One*. 2014;9:1-8.
135. Xiros C, Topakas E, Christakopoulos P. Hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Energy and Environment*. 2013;2:633-654.
136. Wood TM, Bhat KM. Methods for measuring cellulase activities. *Methods in enzymology*. 1988;160:87-112.
137. Gusakov AV, Kondratyeva EG, Sinitsyn AP. Comparison of two methods for assaying reducing sugars in the determination of carbohydrase activities. *International journal of analytical chemistry*. 2011. doi:10.1155/2011/283658
138. Reverberi R, Reverberi L. Factors affecting the antigen-antibody reaction. *Blood Transfusion*. 2007;5:227-240.
139. Brautigam CA. Fitting two-and three-site binding models to isothermal titration calorimetric data. *Methods*. 2015;76: 124-136.
140. Boeckel CA, Petitou M. The unique antithrombin III binding domain of heparin: a lead to new synthetic antithrombotics. *Angewandte Chemie International Edition*. 1993;32:1671-1690.
141. Alban S. From heparins to factor Xa inhibitors and beyond. *European Journal of Clinical Investigation*. 2005;35:12-20.
142. Paolucci F, Clavies MC, Donat F, Necciari J. Fondaparinux Sodium Mechanism of Action. *Clinical pharmacokinetics*. 2002;41:11-18.
143. Winn-Deen ES, David H, Sigler G, Chavez R. Development of a direct assay for alpha-amylase. *Clinical Chemistry*. 1988;34:2005–2008.
144. Kandra L, Zajáč Z, Remenyik J, Gyémánt G. Kinetic investigation of a new inhibitor for human salivary α -amylase. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005;334:824-828.
145. Nagamine Y, Omichi K, Ikenaka T. A comparison of the modes of actions of human salivary and pancreatic α -amylases on modified maltooligosaccharides. *The Journal of Biochemistry*. 1988;104:667-670.
146. Rinderknecht H, Wilding P, Haverback BJ. A new method to determination of α -amylase. 1967. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 23(10):805-805
147. Dona AC, Pages G, Gilbert RG, Kuchel PW. Digestion of starch: In vivo and in vitro kinetic models used to characterise oligosaccharide or glucose release. *Carbohydrate Polymers*, 2010;80:599-617.
148. Sonnad JR, Goudar CT. Solution of the Haldane equation for substrate inhibition enzyme kinetics using the decomposition method. *Mathematical and computer modelling*. 2004;40:573-582.
149. Zhang J, Pakarinen A, Viikari L. Synergy between cellulases and pectinases in the hydrolysis of hemp. *Bioresource Technology*. 2013;129:302-307.
150. Kawamura-Konishi Y, Watanabe N, Saito M, et al. Isolation of a new phlorotannin, a potent inhibitor of carbohydrate hydrolyzing enzymes, from the brown alga *Sargassum patens*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012;60:5565–5570.
151. Dayananda KS, Gopinath SM, Murthy RK. Inhibitory effect of *Gymnema sylvestre*, *Stevia rebaudiana*, *Phyllanthus emblica* and *Syzygium cumini* on porcine pancreatic amylase.

- Global Journal of Research on Medicinal Plants & Indigenous Medicine. 2013;2:554-561.
152. Kakkar T, Boxenbaum H, Mayersohn M. Estimation of K_i in a competitive enzyme-inhibition model: comparisons among three methods of data analysis. *Drug metabolism and disposition*. 1999;27:756-762.
 153. Adisakwattana S, Lerdsuwankij O, Poputtachai U, Minioun A, Suparpprom C. Inhibitory activity of cinnamon bark species and their combination effect with acarbose against intestinal α -glucosidase and pancreatic α -amylase. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2011;66:143-148.
 154. Ranasinghe P, Jayawardana R, Galappaththy P, Constantine GR, Gunawardana N, Katulanda P. Efficacy and safety of 'true' cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) as a pharmaceutical agent in diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Diabetic medicine*, 2012;29:1480-1492.
 155. McDougall GJ, Stewart D. The inhibitory effects of berry polyphenols on digestive enzymes. *Biofactors*. 2005;23:189-195.
 156. McDougall GJ, Shpiro F, Dobson P, Smith P, Blake A, Stewart D. Different polyphenolic components of soft fruits inhibit α -amylase and α -glucosidase. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2005;53:2760-2766.
 157. Grussu D, Stewart D, McDougall GJ. Berry polyphenols inhibit α -amylase in vitro: identifying active components in rowanberry and raspberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011;59:2324-2331.
 158. Boath AS, Stewart D, McDougall GJ. Berry components inhibit α -glucosidase in vitro: Synergies between acarbose and polyphenols from black currant and rowanberry. *Food chemistry*. 2012;135:929-936.
 159. Wang SY, Lin HS. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2000;48:140-146.
 160. http://www.gyogynovenyszovetseg.hu/a_teakeszites_szabalyai_reszletesen (2015. július 29.)
 161. Goyal SK, Goyal RK. Stevia (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2010;1:1-10.
 162. Al-Asri J, Fazekas E, Lehocski G, Perdih A, Görick C, Melzig MF, Mortier J. From carbohydrates to drug-like fragments: Rational development of novel α -amylase inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2015;23:6725-6732.
 163. Ye F, Yang R, Hua X, Shen Q, Zhao W, Zhang W. Modification of stevioside using transglucosylation activity of *Bacillus amyloliquefaciens* α -amylase to reduce its bitter aftertaste. *LWT-Food Science and Technology*. 2013;51:524-530.
 164. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation research*. 2010;107:1058-1070.
 165. Tang WH, Martin KA, Hwa J. Aldose reductase, oxidative stress, and diabetic mellitus. *Frontiers in pharmacology*. 2012;3:1-8.
 166. Bradford MM. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 1976;72:248-254.
 167. Farkas E, Jánosy L, Harangi J. Synthesis of chromogenic substrates of alpha-amylases on a cyclodextrin basis. *Carbohydrate Research*. 1997;303:407-415.
 168. Kandra L, Gyémánt G, Lipták A. Chemoenzymatic preparation of 2-chloro-4-nitrophenyl β -maltooligosaccharide glycosides using glycogen phosphorylase b. *Carbohydrate research*. 1999;315:180-186.

169. Kandra L, Gyémánt Gy, Pál M, Petró M, Remenyik J, Lipták A. Chemoenzymatic synthesis of 2-chloro-4-nitrophenyl β -maltoheptaoside acceptor-products using glycogen phosphorylase b. *Carbohydrate research*. 2001;333:129-136.
170. Somsák L, Nagy V. A new, scalable preparation of a glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin: one of the best inhibitors of glycogen phosphorylases. *Tetrahedron: Asymmetry*. 2000;11:1719-1727.
171. Ősz E, Somsák L, Szilágyi L, Kovács L, Docsa T, Tóth B, Gergely P. Efficient inhibition of muscle and liver glycogen phosphorylases by a new glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 1999;9:1385-1390.
172. Gyémánt G, Kandra L, Nagy V, Somsák L. Inhibition of human salivary α -amylase by glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003;312:334-339.
173. L. Kandra, J. Remenyik, G. Batta, L. Somsák, G. Gyémánt, K. H. Park Enzymatic synthesis of a new inhibitor of alpha-amylases: acarviosinyl-isomaltosyl-spirothiohidantoin, *Carbohydr. Res.* 2005;340: 1311-1317.
174. Rácz A, Papp N, Balogh E, Fodor M, Héberger K. Comparison of antioxidant capacity assays with chemometric methods. *Analytical Methods*. 2015;7:4216-4224.
175. Popov I, Volker H, Lewin G. Photochemiluminescent detection of antiradical activity. V. Application in combination with the hydrogen peroxide-initiated chemiluminescence of blood plasma proteins to evaluate antioxidant homeostasis in humans. *Redox Report*. 2001;6:43-48.

9. 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, Cornelia Görick, 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 Ősz. **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 poszterek

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.

10. Függelék

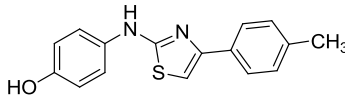
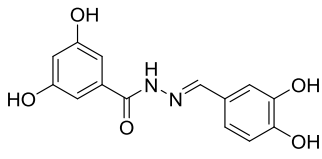
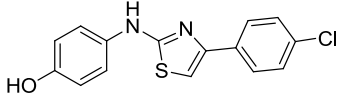
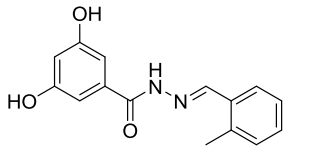
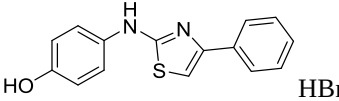
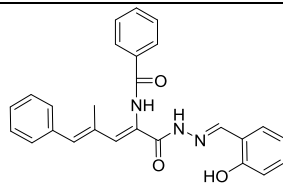
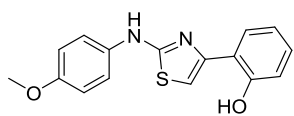
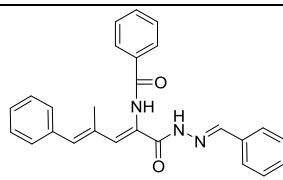
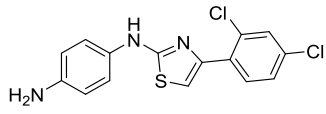
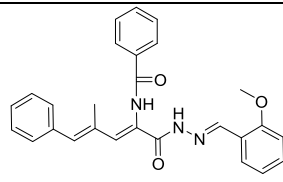
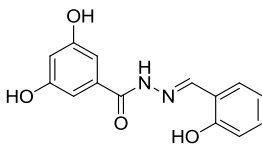
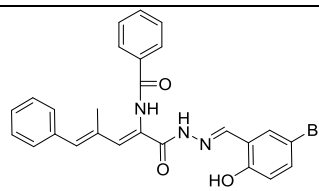
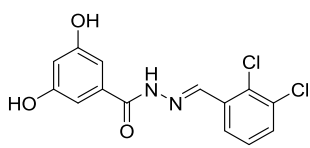
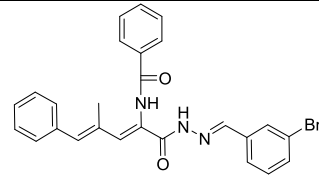
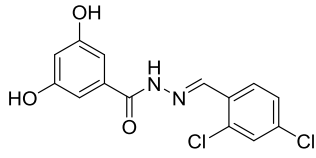
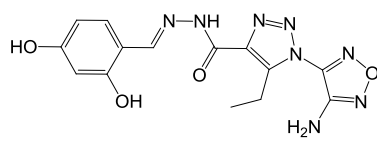
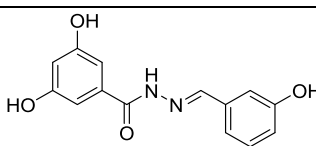
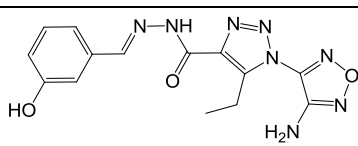
1F. táblázat

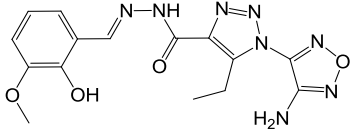
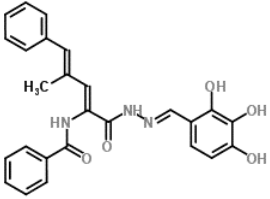
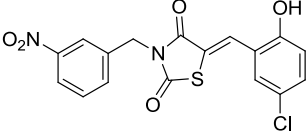
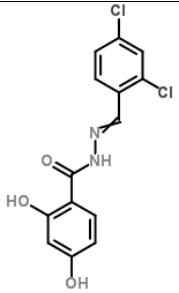
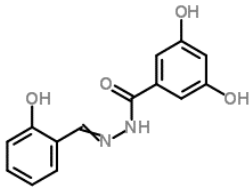
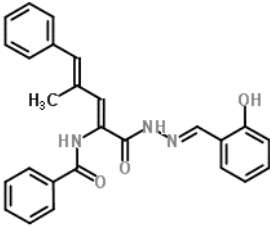
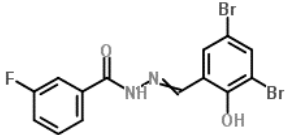
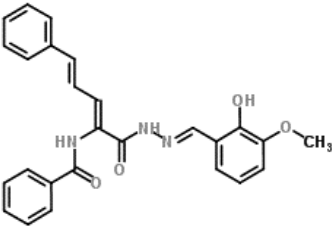
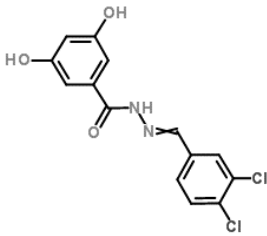
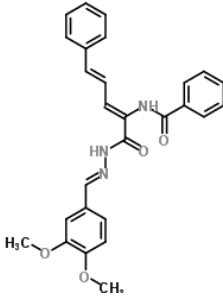
Növény	Latin név	Vizsgált növényi rész	IC ₅₀ (mg/ml)	Max. gátlás (%)	Vízoldható szárazanyag tartalom	ACW (µg/mg aszkorbinsav)
Ánizs	<i>Pimpinella anisum</i>	mag	N.D.	34	7,6 %	31,77
Babér	<i>Laurus nobilis</i>	levél	12,5	53	11,2 %	N.D.
Bazsalikom	<i>Ocimum basilicum</i>	levél	10	63	11,3 %	N.D.
Bíbor kasvirág	<i>Echinacea purpurea</i>	virágos hajtás	N.D.	19	27,5 %	151,2
Boróka	<i>Juniperus communis</i>	termés	12	61,5	13,8 %	N.D.
Borsikafű	<i>Satureja montana</i>	levél	15	49,5	5,4 %	259,8
Cickafark	<i>Achillea collina</i>	virágos hajtás	11	59	11,0 %	635,24
Csalán	<i>Urtica dioica</i>	levél	N.D.	15	14,9 %	67,42
Dió	<i>Juglans regia</i>	levél	4,9	73	16,3 %	269,74
Egybibés galagonya	<i>Crataegus monogyna</i>	virág	8	76	15,2 %	142,785
Ezerjófű	<i>Centaurium erythraea</i>	virágos hajtás	15	49,5	18,2 %	54,11
Fahéj	<i>Cinnamomum verum</i>	kéreg	0,6	97	8,2 %	N.D.
Fehér bab	<i>Phaseolus vulgaris</i>	hüvely	N.D.	16	10,2 %	8,38
Fehér eper	<i>Morus alba</i>	levél	9	45	10,9 %	88,065
Fehér mustár	<i>Sinapis alba</i>	mag	N.D.	N.D.	7,4 %	181,86
Fehér üröm	<i>Artemisia absinthium</i>	virágos hajtás	15	50	12,5 %	233,15
Fekete áfonya	<i>Vaccinium myrtillus</i>	levél	5	71,5	17,5 %	881,1
Fekete bodza	<i>Sambucus nigra</i>	virág	8	73	19,1 %	524,48
Fekete ribizli	<i>Ribes nigrum</i>	levél	2,5	97	20,2 %	109,06
Fekete szeder	<i>Rubus fruticosus</i>	levél	1,2	98	17,8 %	366,28
Fokhagyma	<i>Allium sativum</i>	gumó	N.D.	28	53,3 %	0,41
Gyermekláncfű	<i>Taraxacum officinale</i>	gyökér	N.D.	25	24,2 %	47,66
Gyermekláncfű	<i>Taraxacum officinale</i>	levél	N.D.	43	13,7 %	110,53
Kakukkfű	<i>Thymus serpyllum</i>	levél	4	65	10,5 %	326,78
Kanadai aranyvesszőfű	<i>Solidago gigantea</i>	virágos hajtás	2,2	85	19,6 %	1022,03
Kapor	<i>Anethum graveolens</i>	levél	15	50	22,3 %	19,11
Kecskeruta	<i>Galega officinalis</i>	virágos hajtás	N.D.	36	9,9 %	58,71
Kisvirágú füzike	<i>Epilobium parviflorum</i>	virágos hajtás	5,5	79	21,3 %	152,33
Koriander	<i>Coriandrum sativum</i>	levél	N.D.	31,5	8,6 %	27,45
Kömény	<i>Carum carvi</i>	mag	N.D.	30	11,8 %	23,09
Körömvirág	<i>Calendula officinalis</i>	virág	13	55,5	14,8 %	34,52
Kukorica	<i>Allium sativum</i>	bibe	9,5	64,5	4,4 %	48,4
Kutyabenge	<i>Frangula dodonei</i>	kéreg	13	56	13,8 %	39,33

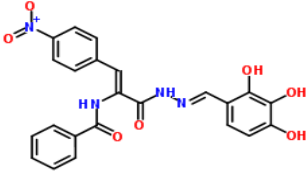
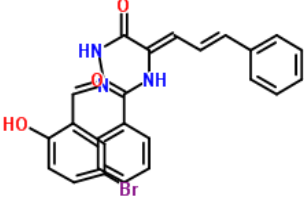
Lándzsás útifű	<i>Plantago lanceolata</i>	virágos hajtás	N.D.	44	22,6 %	420,67
Lestyán	<i>Levisticum officinale</i>	levél	N.D.	34	12,9 %	30,53
Majoranna	<i>Origanum majorana</i>	levél	8	65,5	12,1 %	320,91
Málna	<i>Rubus idaeus</i>	levél	1,1	90	17,2 %	230,02
Mályva	<i>Malva sylvestris</i>	levél	N.D.	46	12,5 %	89,56
Máriatövis	<i>Silybum marianum</i>	termés	6	82	3,3 %	63,406
Mezei zsúrló	<i>Equisetum arvense</i>	meddő hajtás	13	59,5	15,7 %	143,34
Orbánkfű	<i>Hypericum perforatum</i>	virágos hajtás	3,5	98	15,1 %	234,9
Oregánó	<i>Origanum vulgare</i>	levél	2	95	18,5 %	151,57
Orvosi székfű	<i>Matricaria chamomilla</i>	virágos hajtás	8,5	62,5	12,2 %	87,39
Pásztortáska	<i>Capsella bursa-pastoris</i>	virágos hajtás	13	54	12,6 %	38,072
Petrezselyem	<i>Petroselinum crispum</i>	levél	N.D.	30	10,2 %	2,02
Rebarbara	<i>Rheum rhabarbarum</i>	gyöktörzs	N.D.	42	20,1 %	88,43
Római kömény	<i>Cuminum cyminum</i>	mag	4,8	66	11,8 %	109,06
Rozmaring	<i>Rosmarinus officinalis</i>	levél	3,5	73	8,2 %	377,83
Szamóca	<i>Fragaria vesca</i>	levél	1,1	100	15,2 %	450,19
Szegfűbors	<i>Pimenta dioica</i>	termés	0,8	100	4,7 %	71,36
Szegfűszeg	<i>Syzygium aromaticum</i>	bimbó	1,8	89,5	16,1 %	289,76
Szerecsendió	<i>Myristica fragrans</i>	mag	N.D.	N.D.	4,0 %	2,78
Sztívia (MeOH)	<i>Stevia rebaudiana</i>	levél	2,5	64	N.D.	N.D.
Sztívia (vizes)	<i>Stevia rebaudiana</i>	levél	4,5	55	14,4 %	573,44
Tárkony	<i>Artemisia dracunculus</i>	levél	5,5	70	9,6 %	234,88
Tejoltó galaj	<i>Galium verum</i>	virágos hajtás	3,5	85	13,8 %	302,137
Turbolya	<i>Anthriscus cerefolium</i>	levél	N.D.	39	9,9 %	72,78
Vörös hagyma	<i>Allium cepa</i>	gumó	N.D.	N.D.	N.D.	0,798
Zöld tea	<i>Camelia sinensis</i>	levél	0,4	100	N.D.	554,72
Zsálya	<i>Salvia officinalis</i>	levél	4	67	15,5 %	377,06

2F. táblázat

Kód	Szerkezet	IC50 (μM)	Kód	Szerkezet	IC50 (μM)
8		326	24		423
9		850	25		165
15		N.D.	26		100
16		298	27		100
17		300	28		4000
18		17	29		4000
19		N.D.	30		50
20		27	31		62
21		407	32		260
22		680	33		700
23		642	34		492

Kód	Szerkezet	IC50 (μM)		Kód	Szerkezet	IC50 (μM)
35		735	44		812	
36		1043	45		1340	
37	 HBr	1274	46		255	
38		40	47		365	
39		270	48		290	
40		812	49		181	
41		1212	50		180	
42		700	51		450	
43		1043	52		950	

Kód	Szerkezet	IC50 (μM)	Kód	Szerkezet	IC50 (μM)
53		900	20a		70
18a		85	20b		N.D.
18b		N.D.	20c		180
18c		N.D.	20d		N.D.
18d		580	20e		N.D.
18e		N.D.	20f		N.D.
18f		172	20g		N.D.

20h		100
20i		N.D.

3F. ábra: Az oenothainB szerkezete és kisvirágú fűzike kivonat tömegspektruma

