

## I. BEVEZETÉS

Az enzimek az élő szervezet számára nélkülözhetetlenek, hiszen biokatalizátorok lévén lehetővé teszik az anyagcsere-folyamatok gyors végbemenetelét. Mai ismereteink szerint a természetben több tízezer enzim létezik, az általuk katalizált folyamatok igen sokfélék. Az enzimek széleskörű alkalmazást nyertek napjaink biotechnológiájában és humán élettani jelentőségük miatt a klinikumban és a gyógyászatban is nagy érdeklődésre tartanak számot, így gyakran állnak természettudományos kutatások középpontjában.

A Biokémiai Tanszéken régóta folynak szénhidrátbontó enzimekkel kapcsolatos vizsgálatok. Kutatások történtek különböző  $\alpha$ -amilázok aktív centrumának tanulmányozása céljából. Kromofor csoportot tartalmazó szubsztrát sorozatok segítségével számos amiláz szubsztrátkötő helyének alhelytérképét sikerült meghatározni. Emellett fontos kísérletek irányultak az amilázok, különös tekintettel a *Bacillus licheniformis* amiláz (BLA), a *Bacillus stearothermophilus* maltogén amiláz (BSMA) és a humán nyál amilázból (HSA) pontmutációval előállított, Tyr151Met mutáns transzferáz aktivitásának felhasználására oligoszacharidok szintézise céljából. A transzglykozilezési reakciók során számos olyan vegyületet állítottak elő, melyek enzim inhibitor tulajdonságuk miatt nagyon értékesnek bizonyultak.

2003-ban kapcsolódtam be a tanszéken zajló enzimológiai vizsgálatokba. Feladatom volt a klasszikus kémiai szintézissel, kemoenzimatis módon előállított, illetve különböző természetes eredetű humán nyál amiláz inhibitorok gátlásának kinetikai vizsgálata. A méréseket két különböző, egy szintetikus és egy természetes szubsztráton végeztem.

A munkám során kitűzött célok a következők voltak:

1. A természetes eredetű amiláz inhibitorok szerkezeti tulajdonságainak felderítése. Ennek során:
  - a tannin keverékek összetételének meghatározása

- a tannin alkotók molekulatömegének és szerkezetének megállapítása
  - a tanninok gallusz- és ellagisav tartalmának meghatározása.
2. A különböző inhibitorok HSA-ra kifejtett hatásának a vizsgálata. Ezen belül:
- a kinetikai mérések elvégzése a keményítő természetes szubsztrátján, az amilózon, illetve a szintetikus, kromofor csoporttal ellátott 2-klór-4-nitrofenil-4-O- $\beta$ -D-galaktopiranozil- $\alpha$ -D-maltozidon (GalG<sub>2</sub>-CNP) fotometriás méréssel
  - a gátlások típusának meghatározása
  - az inhibíciós konstansok és kinetikai állandók kiszámítása
  - az IC<sub>50</sub> értékek megállapítása
  - a gátlás mechanizmusára vonatkozó információk gyűjtése.

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

## II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### II/1. $\alpha$ -Amilázok

Az  $\alpha$ -amilázok ( $\alpha$ -1,4-glükán-4-glükánhidrolázok) a keményítő és a keményítővel rokon poli- és oligoszacharidok belső  $\alpha$ -1,4 glikozidos kötéseinek hidrolízisét katalizálják [1]. Széles körben megtalálhatók magasabb rendű növényekben, állatokban – gerincesekben és gerinctelenekben egyaránt – gombákban, baktériumokban és *Archea* fajokban is.

Az irodalmi adatok szerint [2] több mint 25000 enzim létezik a természetben, amelyeket a könnyebb áttekinthetőség érdekében szükséges volt csoportokra osztani. A legújabb meghatározások szerint a proteinek alapszerkezeti motívumainak száma 1000 körül van. Ebből következik, hogy ugyanaz a háromdimenziós szerkezeti motívum különböző, más funkciót betöltő enzimeknél is megtalálható. Az is ismert, hogy sok enzim széles körű reakció, illetve szubsztrát specificitással rendelkezik és az egyes enzimtípusok között gyakran előfordulnak átfedések, így az enzimek csoportosítása igen nehéz feladat.

Jelenleg az enzimeknek kétféle besorolása ismert. Az egyik a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Nemzetközi Egyesület (International Union of Biochemistry and Molecular Biology, IUBMB) által létrehozott csoportosítás, amelyben minden enzim egyéni, úgynevezett EC (Enzyme Commission) számmal rendelkezik. Ez az enzimeket a katalizált reakció típusa és szubsztrát specificitása alapján csoportosítja [2,3]. Ebből a szempontból az  $\alpha$ -amilázok a hasított kötés jellege alapján az O- és S-glikozidos kötések bontó glikozidázok közé, azaz az EC 3.2.1.1 csoportba tartoznak [4].

A másik féle besorolás a Henrissat-féle osztályozás, amely szerint a szénhidrátokon ható enzimeknek 260 családja létezik [5]. Ez a besorolás az aminosav sorrendben lévő azonosságokon alapul [6,7,8] és arra az ismeretre épít, hogy az elsődleges és a háromdimenziós fehérje szerkezet között közvetlen

kapcsolat áll fenn. Ez az osztályozás nagyon hasznos a szerkezeti tulajdonságok feltüntetése miatt és az olyan enzimek esetében, amelyek több különböző szubsztrát bontását katalizálják. A rendszerezésnek azonban vannak hátrányai is. Előfordul például, hogy különböző szubsztrát specifitású enzimek azonos családban találhatóak, míg ugyanolyan szubsztrát specifitással bíró enzimek különböző családban kaptak helyet [2,3]. Az  $\alpha$ -amiláz, az egyik legfontosabb keményítő bontó enzim, a Henrissat-féle beosztás szerinti 13. család tagja [9,5].

Az  $\alpha$ -amiláz család az enzimeknek azon csoportját foglalja magába, amelyek különböző tulajdonságokkal rendelkeznek, de mind egy azonos típusú,  $\alpha$ -1,4, vagy  $\alpha$ -1,6 glikozidos kötésekkel összekapcsolt glükóz egységekből felépülő szubsztráton hatnak. Ezen család tagjai sok közös tulajdonsággal rendelkeznek, de legalább 21 különböző enzim specifitása lehetséges a családon belül. Ezek a különbségek nem csak az aktív centrum felépítésében megnyilvánuló apró különbségek, hanem az enzim teljes szerkezetét érintő eltérésekből is adódnak [10].

Az  $\alpha$ -amiláz család két nagy csoportra osztható: a keményítő hidrolizáló enzimekre és a keményítő felépítését katalizáló vagy transzglykozilező enzimekre. Ezekben belül megkülönböztetünk még két alcsoportot, a következőképpen:

1. keményítő hidrolizáló enzimek:

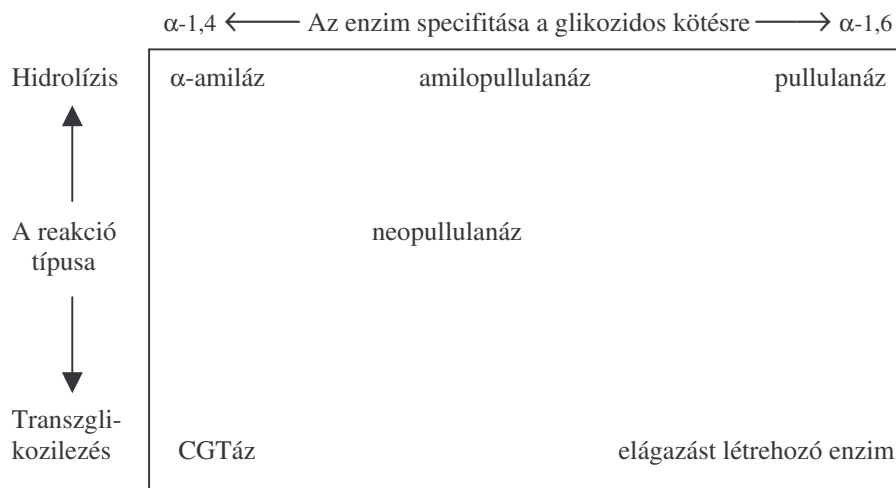
- a)  $\alpha$ -1,4-glikozidos kötések hasító enzimek  
pl.:  $\alpha$ -amilázok (EC 3.2.1.1),  $\beta$ -amilázok (EC 3.2.1.2),  
glükoamilázok (EC 3.2.1.3)
- b)  $\alpha$ -1,6-glikozidos kötések hasító enzimek  
pl.: pullulanáz (EC 3.2.1.41), izoamiláz (EC 3.2.1.68)

2. keményítő felépítését katalizáló enzimek:

- a)  $\alpha$ -1,4-glikozidos elágazást létrehozó enzimek  
pl.: ciklodextrin-glükoziltranszferáz (EC 2.4.1.19)
- b)  $\alpha$ -1,6-glikozidos elágazást létrehozó enzimek  
pl.: 1,4- $\alpha$ -D-glükán : 1,4- $\alpha$ -D-glükán-6- $\alpha$ -D-(1,4- $\alpha$ -D-glükano)-  
transzferáz vagy elágazást létrehozó enzim (EC 2.4.1.18),

oligo-1,6-glükozidáz (EC 3.2.1.10) [2].

A fenti csoportok tagjai azonban a gyakorlatban nem különülnek el egymástól ilyen élesen. Ismert például, hogy az  $\alpha$ -amilázok gyengén, de katalizálnak  $\alpha$ -1,4 transzglykozilezési és  $\alpha$ -1,6 hidrolízissel járó reakciókat is. A ciklodextrin-glükoziltranszferázok (CGTázok) pedig kis mértékben hajlamosak  $\alpha$ -1,4 hidrolízis végrehajtására is. Néhány pullulanáizról ismert, hogy az  $\alpha$ -1,6 mellett  $\alpha$ -1,4 glikozidos kötéseket is képesek hasítani [2]. A keményítőtöbontó enzimek közötti kapcsolat az 1. ábrán látható.



1. ábra: Az  $\alpha$ -amiláz enzimes család tagjai és az általuk katalizált reakciók.

Az  $\alpha$ -amiláz család enzimeinek jellemző tulajdonságai:

- $\alpha$ -glikozidos kötésekben fejtik ki a hatásukat
- anomer konfigurációt megtartó (retaining) enzimek
- hidrolíziskor  $\alpha$ -anomer mono- vagy oligoszacharidokat képeznek
- transzglykozilezéskor  $\alpha$ -1,4 vagy 1,6 glikozidos elágazásokat hoznak létre
- képesek ezt a két előző aktivitást egyszerre véghezvinni
- katalitikus doménjük  $(\beta/\alpha)_8$ -hordó szerkezetű

- négy, nagy mértékben konzervált régiót tartalmaznak az elsődleges szerkezetükben, melyekbe beletartoznak a katalitikus helyet kialakító aminosavak és néhány a  $(\beta/\alpha)_8$  szerkezet stabilitásáért felelős aminosav is [10].

### III/1.1. $\alpha$ -Amilázok szerkezete

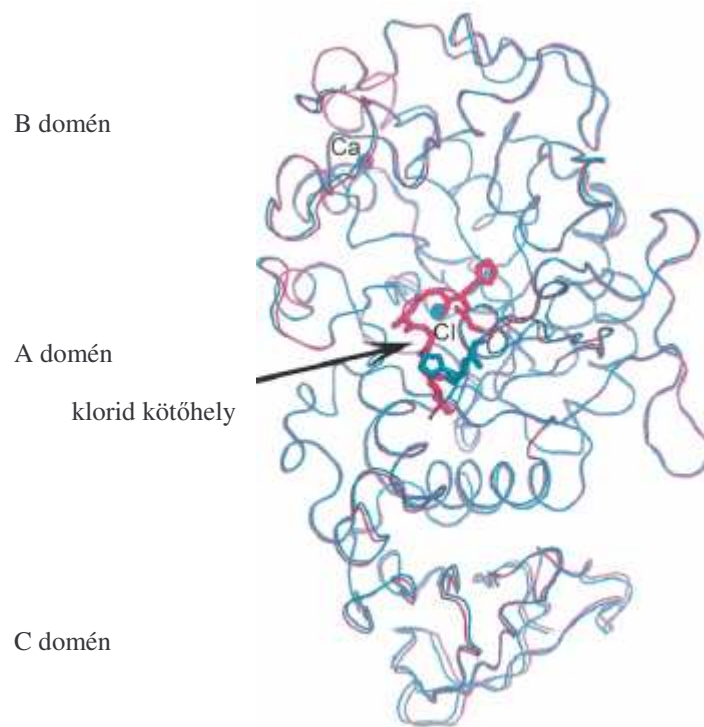
Az  $\alpha$ -amilázok multidomén fehérjék, amelyek katalitikus doménje minden esetben  $(\beta/\alpha)_8$ -hordó formát vesz fel. Mivel ezt a struktúrát legelőször a csirke izom trióz-foszfát-izomeráz esetében írták le, ezért TIM-hordónak is nevezik [2,10]. A TIM-hordó tehát 8, egymással párhuzamosan futó  $\beta$ -redőből áll, amelyek egy belső hengert képeznek, ezt pedig  $\alpha$ -hélixek veszik körül. Az alternáló hélixeket és  $\beta$ -redőket hurkok kötik össze. A szubsztrátkötő és az aktív helyet ezen hurkok és a  $\beta$ -redők aminosavai építik fel [9]. Ez a szerkezeti egység az úgynevezett A domén, ami a legtöbb  $\alpha$ -amiláz estében a fehérje N-terminális végén található.



2. ábra: A  $(\beta/\alpha)_8$ -hordó szerkezet sematikus ábrázolása.

A  $(\beta/\alpha)_8$ -hordó  $\beta$ -redői jobban konzerváltak, mint a megfelelő  $\alpha$ -hélixek, amelyek hosszúságukat és szekvenciájukat illetően nagyon változékonyak. A hurkokban lévő különbségek képezik az alapját a különböző enzim specificitásoknak a családon belül [11].

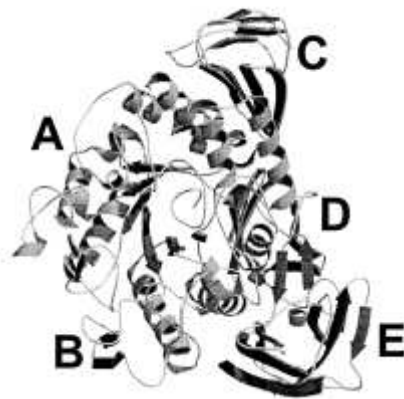
Az  $\alpha$ -amiláz család enzimei B doménnel is rendelkeznek, ami tulajdonképpen az A domén egy kitüremkedése a 3.  $\beta$ -redő és a 3.  $\alpha$ -hélix között. A hosszúsága 44-133 aminosav. A B domén szerkezete rendezetlen és enzimenként változik [9,12,13].



3. ábra: A humán nyál amiláz doménjeinek elhelyezkedése.

Az enzimes család tagjainak többsége a katalitikus TIM-hordót követően egy C domént is tartalmaz, ami egy antiparallel  $\beta$ -redőkből álló, összehajtogatott struktúra a fehérje N-terminális végén [12]. Funkcióját tekintve feltételezik, hogy a katalitikus domén stabilizálásában vesz részt, de a szubsztrát kötésben is szerepe lehet [9].

A ciklodextrin-glikozil-transzferázok és a *Bacillus stearothermophilus* maltogén amiláza további  $\beta$ -redős doméneket is tartalmaz, a C domén után elhelyezkedő D és E domént. A D doménhoz eddig nem párosul semmilyen ismert funkció, viszont az E doménről úgy tartják, hogy szerepet játszik a keményítő szemcsék kötésében [9].



4. ábra: A ciklodextrin-glikozil-transzferáz szalag modellje a különböző domének feltüntetésével.

Az  $\alpha$ -amilázok egyéb jellegzetes doménjei az N-terminális végen elhelyezkedő F, H vagy G domének, amelyek endoenzimekben vagy elágazó szubsztrátok  $\alpha$ -1,6 glikozidos kötéseit hasító enzimeknél fordulnak elő [10].

Minden  $\alpha$ -amiláz általános tulajdonsága, hogy legalább egy  $\text{Ca}^{2+}$ -ion kötődik egy erősen konzervált régióhoz a fehérjében. A  $\text{Ca}^{2+}$  kötőhely a központi hordó és a B domén között helyezkedik el. Gerinces amilázok esetén és a *Tenebrio molitor* amiláznál (TMA) a  $\text{Ca}^{2+}$  kationt nyolc ligand koordinálja: az Asp167 karboxil O atomjai (két koordinációs helyet megkötvé), az Arg158 és His201 karbonil oxigénjei, az Asn100 OD1 oldallánca és három víz molekula. Az ismert amilázok szerkezetét tekintve ezek a ligandok szigorúan konzerváltak, kivéve a bakteriális *Altheromonas haloplanctis*  $\alpha$ -amilázt (AHA) [1].

Amíg a  $\text{Ca}^{2+}$ -ion kötése teljesen általános, közös tulajdonságnak tekinthető az  $\alpha$ -amiláz család különböző specificitású enzimeinél, addig a  $\text{Cl}^-$ -ion kötése csak néhány  $\alpha$ -amiláz jellegzetessége [11]. Ez utóbbi csoport esetében a  $\text{Cl}^-$ -ion allosztérikus aktivátor szerepét tölti be. Ilyen enzimek a sertés hasnyálmirigy amiláz (PPA), a humán hasnyálmirigy amiláz (HPA), a humán nyál amiláz (HSA), az AHA és a TMA. Ezeknek az enzimeknek a szerkezetéből megállapították, hogy az Arg 195, Asn298, és Arg/Cys337 aminosav oldalláncok koordinálják a  $\text{Cl}^-$ -iont. Az Arg195 és Asn298 majdnem minden  $\alpha$ -amilázban konzervált, míg az Arg/Cys337 oldallánc specifikus az eddig ismert 38 potenciális  $\text{Cl}^-$ -ion függő amilázra. Emiatt ez a csoport lett az anion kötés fő ismérve, amit mutagenézis kísérletek is igazoltak.

A  $\text{Cl}^-$ -ion függő amilázokra jellemző még egy flexibilis hurok, egy proteáz szerű triád és diszulfid hidak jelenléte is [1].

A szerin proteázok és lipázok aktív centrumát mimikáló triád jelenléte bizonyára a legmegdöbbentőbb jelenség a  $\text{Cl}^-$  függő amilázoknál. A triád három aminosava a Ser340, His386, Glu27, amelyek szigorúan konzerváltak minden  $\text{Cl}^-$  függő  $\alpha$ -amilázban. Jelenlétük tehát nem véletlen, de funkciójuk a mai napig nem ismert. Feltételezik, hogy a fehérje szerkezet stabilizálásában tölthetnek be szerepet.

Minden  $\text{Cl}^-$ -ion függő amiláz tartalmaz 8 nagymértékben konzervált Cys aminosavat, melyek diszulfid kötésekkel létesítenek az ismert kristályszerkezetekben. A 28-86, 141-160, 378-384 és 450-462 Cys közötti intramolekuláris keresztkötések szükségesek az enzim megfelelő térszerkezetének kialakításához. A Cys70-115 közötti diszulfid híd, ami összeköti az A és B domént specifikus a gerinces amilázokra. Ennek a kötésnek a szerepét a hőmérséklethez való alkalmazkodásban látják, mivel korlátozza a hő hatására bekövetkező mozgást az aktív centrum körül. Ezen kötés kialakításában részt vevő Cys-ek kizárólag melegvérű állatoknál találhatók meg [1].

Az  $\alpha$ -amiláz enzimek szubsztrátkötő helye, mint egymást követő alhelyek sorozata írható le, ahol egy-egy alhely a szubsztrát egy-egy monoszacharid egységével lép kölcsönhatásba.

Az alhelyeket azoknak a hurkoknak az aminosav oldalláncai alkotják, melyek a  $\beta$ -redők C-terminális végét a következő  $\alpha$ -hélix N-terminális végéhez kapcsolják a katalitikus domén  $(\beta/\alpha)_8$ -hordó szerkezetében. Mivel a hurkok hossza és felépítése enzimenként változik, az alhelyek száma is különböző és jellegzetes ismérvét adja az egyes enzimeknek. A különböző  $\alpha$ -amilázok különböző szubsztrátokon fejtik ki a hatásukat. A szubsztrát hasítás feltétele, hogy a (-1)-es alhelyre egy  $\alpha$  kötésben lévő glükóz egységnek kell kerülnie [9].

Az alhelyeket a katalitikus helytől balra, a nem redukáló vég felé negatív számokkal (glikon kötőhelyek); jobbra, a redukáló vég felé pedig pozitív számokkal (aglikon kötőhelyek) jelölik a Davies-féle [14] nomenklatúra szerint. Egy szubsztrát különbözőképpen léphet kölcsönhatásba az alhelyekkel. Bekötődhet nem-produktívan (ilyenkor a hasítandó glikozidos kötés nem kerül a katalitikus aminosavak környezetébe), illetve produktívan, amikor a szubsztrát átnyúlik a katalitikus helyen, s ilyenkor a kötést az enzim elhasítja. A hasítás mindig a -1 és +1 alhelyek között történik.

Az aktív centrumban a kötőhelyek száma eltérő. A HSA esetén 6 (4 glikon, 2 aglikon) [15], a PPA esetén 5 (3 glikon, 2 aglikon) [16], a *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amiláz (BLA) esetében 8 (5 glikon, 3 aglikon) [17], az *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -amiláza (TAKA-amiláz) esetén pedig 7 (4 glikon, 3 aglikon) [18] szubsztrátkötő hellyel rendelkezik.

A szubsztrátkötő hely alhelyeinek számában lévő különbségek megmutatkoznak a termékeloszlásban is. A PPA például főként maltóz és maltotrióz képzésével, többszöri hasítási mechanizmussal bontja az amilózt és a rövidebb szubsztrátokat is. A HSA-nál ideális elrendeződés esetén a szubsztrát glükóz egységei betöltik mind a 6 alhelyet, s ilyenkor a nem redukáló vég felőli maltotetraóz felszabadulás dominál. A BLA esetében 6,7,8 monoszacharid

egységből álló szubsztrátok alkalmazásakor az enzim a nem redukáló vég felől általában maltopentaózt hasít le, ennél hosszabb szubsztrát lánc esetén a redukáló vég felől a maltotrióz hasítás válik kedvezményezetté.

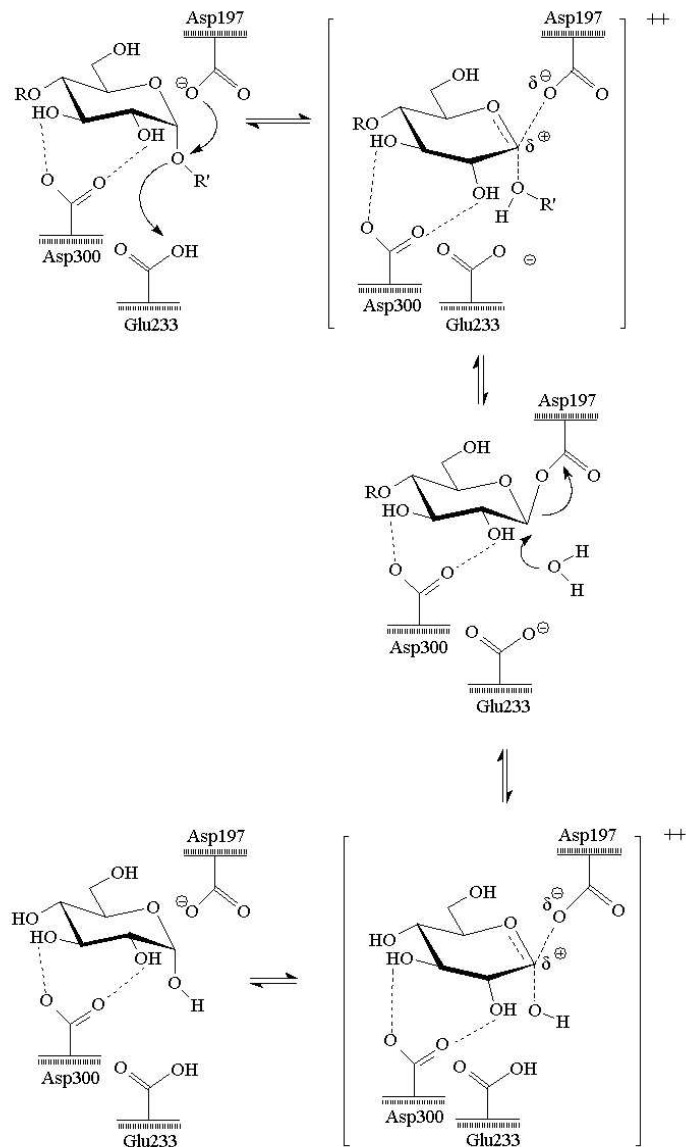
A különböző eredetű  $\alpha$ -amilázok specificitása eltérő. Elsősorban endoenzimiek. Többszörös támadással (multiple attack) vagy rendszertelen támadással (random attack) hatnak a szubsztráton. Ha a képződő termékek is szubsztrátjai az enzimnek, akkor másodlagos támadás (secondary attack) is bekövetkezik.

### *III/1.2. $\alpha$ -Amilázok reakciómechanizmusa*

Az  $\alpha$ -amilázok katalitikus mechanizmusát tekintve az  $\alpha$ -anomer konfigurációt megtartó ( $\alpha$ -retenciós), kettős helyettesítéses (double displacement) elképzelés az elfogadott [19]. A reakcióban az aktív hely két konzervált aminosav oldallánca vesz részt: a Glu233, mint sav/bázis katalizátor és az Asp197, mint nukleofil ágens (a számozás a HSA szekvenciájának felel meg) [20]. Maga a katalízis öt lépésben zajlik le:

1. a szubsztrát kötődése után a Glu233 protonálja a glikozidos kötés oxigénjét (a -1 és +1 alhelyek közé eső, két glükóz molekulát összekapcsoló oxigént) és a nukleofil Asp197 megtámadja a glükóz C-1 atomját a (-1) alhelyen;
2. az oxokarbónium-ion jellegű átmeneti állapotot követően egy kovalens intermedier alakul ki [21];
3. a (+1) alhelyen lévő protonált glükóz molekula elhagyja az aktív helyet, miközben egy víz molekula, vagy egy új glükóz molekula átveszi a helyét az aktív centrumban és megtámadja a (-1) alhelyhez kötött glükóz és az Asp197 közötti kovalens kötést;
4. újra egy oxokarbónium-ion jellegű átmeneti állapot jön létre;
5. a bázikus katalizátor Glu233 [22] hidrogént vesz fel egy belépő víztől vagy egy újonnan a (+1) alhelyre bekötődő glükóztól, ezen molekulák oxigénje áthelyezi az oxokarbónium kötést a (-1) alhelyen lévő glükóz és az Asp197

közé, ami vagy új hidroxil-csoportot képez a (-1) alhelyen lévő glükóz C-1 pozíciójában (hidrolízis) vagy glikozidos kötést alakít ki a (-1) és (+1) alhelyen lévő glükóz molekulák között (transzglykozilezés).



5. ábra: A retenció  $\alpha$ -amilázok működésének mechanizmusa.

Transzglykozilezés általában akkor következik be, ha a reakció második helyettesítésekor a támadó csoport nem víz, hanem egy cukor hidroxil-csoportja [9].

Az aktív centrum konzervált aminosavai közül közvetlenül csak kettő vesz részt a kettős helyettesítés mechanizmusban. A harmadik konzervált aminosav, az Asp300 a szubsztrát OH-2 és OH-3 csoportjaihoz kötődik és fontos feladatot tölt be a szubsztrát szék konformációjú piranóz gyűrűjének eltorzításában, így elősegíti a kötés hasadását.

Egyéb konzervált aminosavak: His, Arg, Tyr, amelyek a szubsztrátot a megfelelő pozícióba irányítják az aktív centrumban, az átmeneti állapotot stabilizálják és a szubsztrát elektron szerkezetét polarizálják [10].

Az  $\alpha$ -amilázok kristályszerkezetéről készült vizsgálatok azt mutatták, hogy a Glu233 és az Asp300 katalitikus csoportok között található egy víz molekula. Ez a konzervált víz molekula (W641) az Asp197-el szemközt és a (-1) alhelyen lévő glükóz egység anomer szénjére irányuló nukleofil támadás irányával egy vonalban helyezkedik el. További mérések azt is igazolták, hogy ez a konzervált víz molekula tagja egy úgynevezett víz láncnak, ami jelen van a HSA, TAKA és az árpa amiláz enzimekben [23]. A víz lánc szerepe az, hogy rezervoárként víz molekulákat szolgáltatson az egymást követő reakciólépésekhez, mivel minden új ciklusban új víz molekula támadja a kovalens intermediert.

A W641-et a Phe256 koordinálja a megfelelő helyre az enzimben. Ha a Phe256-t Trp-ra cserélik, akkor a víz lánc megszakad és az enzim aktivitása jelentősen csökken. A W641 és a víz molekula lánc fontos szerepet tölt be az  $\alpha$ -amiláz aktivitás szempontjából.

A W641 molekula az előbb említett elhelyezkedése miatt a szubsztráthoz viszonyítva  $\alpha$ -anomer helyzetben van jelen. Ez az oka annak, hogy az  $\alpha$ -amilázok megtartják az eredeti konfigurációt, s az  $\alpha$ -1,4-glikozidos kötések hasításakor csak  $\alpha$ -anomer termékeket eredményeznek [2].

### *III/1.3. Az $\alpha$ -amilázok aktivitásának mérési módszerei*

Az  $\alpha$ -amiláz katalitikus koncentrációjának meghatározása a humán szérumban és a vizeletben diagnosztikus jelentőségű különböző betegségek felismerésekor. Jól ismert tény, hogy az emberi testnedvekben kétféle amiláz van jelen: a nyálmirigy eredetű amiláz (HSA) és a hasnyálmirigy által termelt amiláz (HPA). Számos eltérő elven alapuló és különböző szubsztrátot felhasználó módszert fejlesztettek ki ezen enzimek aktivitásának meghatározására [24].

A legrégebbi módszer a Fuwa [25] által kidolgozott technika, a keményítő mérése jóddal [26], amelynek alapja, hogy a keményítőben lévő helikális amilóz lánc képes a jód molekulát zárvány formájában, adszorpciós komplexként megkötni, ezért az amilóz jóddal jellegzetes sötétkék elszíneződést ad. Az amilázzal való reakció során kezdetben keletkező hosszabb molekulájú dextrinek a jóddal barnásvörös színt mutatnak, a keményítő teljes lebomlása után viszont az elegy jóddal nem ad színreakciót. A kutató laboratóriumok a módszer számos változatát alkalmazzák, melyekben a jód koncentrációja 3  $\mu$ M-től 0,25 mM-ig, a kifejlődött szín mérésének hullámhossza pedig 550 nm-től 700 nm-ig változik [27].

Az amiláz aktivitásának mérése azonban lehetséges redukáló érték alapján is. A keményítő hasítása során először dextrinek, majd pedig kisebb egységek (maltoteteraóz, maltotrióz, maltóz és glükóz) keletkeznek, amelyek létrejötte új cukor redukáló végek megjelenéséhez vezet. A redukáló érték növekedése pedig arányos az amiláz aktivitásával.

A redukáló érték meghatározására több lehetőség is adott. Ilyen a Somogyi-Nelson [28,29], a Folin-Wu [30] módszer, amelyek nehézfémeknek a glükóz aldehid-csoportja által való redukációján alapulnak [31]. Ilyen módszer a G. L. Miller által kifejlesztett dinitro-szalicilsavas [32] eljárás is. Ennek lényege, hogy a 3,5-dinitro-szalicilsav oxidálja a glükóz aldehid csoportját, miközben 3-amino-5-nitro-szalicilsav keletkezik, amelynek barnás-sárgás színe fotometriásan mérhető.





Az alkalmazott szubsztrátok következő generációját képviselik a triszacharid glikozid szubsztrátok. Ilyen az irodalomból ismert 2-klór-4-nitrofenil- $\alpha$ -D-glükopiranozil- $\alpha$ -1,4-glükopiranozil-  $\alpha$ -1,4- glükopiranozil (CNP-G<sub>3</sub>) [45]. 1988-ban közölték azt a közvetlen fotometriás módszert, amely CNP-G<sub>3</sub>-ot használt szubsztrátként és az  $\alpha$ -amiláz által katalizált reakcióban kizárólag a szabad kromofort eredményezi. A felszabadult CNP 405 nm-en mérhető. Hasonló elven alapul az általunk is használt 2-klór-4-nitrofenil- $\beta$ -galaktopiranozil- $\alpha$ -D-glükopiranozil- $\alpha$ -1,4-glükopiranozil (GalG<sub>2</sub>-CNP) szubsztrátot alkalmazó módszer [57]. A fenti szubsztrátok használata egy lépésben eredményezi a kromofor csoport felszabadulását, segédenzimek használata nélkül.

#### *III/1.4. $\alpha$ -Amilázok jelentősége*

Az  $\alpha$ -amilázokat és az amilázokkal rokon enzimeket széles körben alkalmazzák. Fontos szerepet játszanak napjaink biotechnológiájában, számos iparágban valamint klinikai és gyógyászati szempontból is igen jelentősek.

Mint az előző fejezetben már tárgyalásra került, az enzimaktivitás mérésekor illetve az aktív centrum feltérképezésekor már jól definiált oligoszacharidokat és módosított oligoszacharidokat használnak. Ezeknek a molekuláknak a szintetikus előállítására nincs igazán hatékony eljárás. Az e célból kidolgozott módszerek általában sok lépésből állnak és alacsony a hozamuk. Ezt a problémát hivatottak orvosolni a félszintetikus kémiai megoldások, amelyek esetén enzimatis úton, transzglikozilezéssel állítják elő a megfelelő tagszámú szubsztrátokat [58].

Az oligoszacharidok azonban nem csak szubsztrátként alkalmazhatóak. Specifikus maltooligoszacharidokból tiszta, viszkózus oldatok készíthetők, amelyek fogyaszthatók és kiválóan alkalmasak csecsemők, idős és beteg emberek táplálására. Veseelégtelenségben szenvedők esetében például gyakran használnak erre a célra maltopentaózt. A maltotetraózt adalékanyagként tesztelték ételek állagának és nedvességtartalmának megőrzése szempontjából. A tiszta

maltooligoszacharidok előállítása igen költséges lenne  $\alpha$ -amilázok híján, amelyek akár egy lépésben szolgáltatják a kívánt terméket [58].

Az 1900-as évek közepe óta sok irányban szétágazó keményítő feldolgozóipar fejlődött ki, amely főleg bakteriális és gomba eredetű amilázokat használ. A sütőipar például számos enzimet, köztük  $\alpha$ -amilázokat is használ [59] a pékáruk térfogatának növelésére, állagának javítására (ropogós héj, tömör kenyérbél, íz megőrzésére, esetleges nedvesedés elkerülésére). Ez a módszer azonban még nem általánosan elterjedt, mivel az amiláz túladagolása esetén a kenyér ragacsossá válhat [10].

Mindezek mellett azonban az amilázok használatosak még a cukorszirup gyártásban, ciklodextrinek, cikloamilozok előállításában [60], a sör és gyümölcslevek zavarosságának megszüntetésére. Mosószer adalékként alkalmazva, képesek alacsony hőmérsékleten a keményítő tartalmú foltok eltávolítására ruhából, illetve porcelánról [10].

A humán  $\alpha$ -amilázok a klinikumban fontos diagnosztikai jelentőséggel bírnak, a mai napig a legáltalánosabban használt indikátorai a nyálmirigy és a hasnyálmirigy eredetű rendellenességeknek. Közép-Európában a klinikai analízisek során leggyakrabban tesztelt 20 enzim közé tartoznak és meghatározásuk egyike a sürgősségi laboratóriumi szolgáltatások alapvető vizsgálatainak. Az  $\alpha$ -amiláz szint emelkedése a szérumban, vagy a vizeletben (esetleg mindkettőben) kapcsolatba hozható az akut hasnyálmirigy gyulladással, a pancreas vezeték elzáródásával, különféle akut hasüregi betegségekkel, sőt még szisztémás problémákkal is [18]. A nyál amiláz értékek növekedése pedig mumpszra, bakteriális eredetű fültőmirigy gyulladásra utalhat. Ma már azt is feltételezik, hogy a nyál amiláz aktivitásában vagy koncentrációjában bekövetkező változások monitorozása elősegítheti a szájüregi rákos daganatok korai felismerését [61].

### II/1.5. A humán nyál amiláz (HSA)

A humán nyál amiláz egy 496 aminosavból álló polipeptid lánc [62]. Összetételét tekintve két családba sorolható. Az **A család** tagjai ~62 kDa tömegű glikoproteinek, míg a **B család** tagjai ~55 kDa tömegű, nem glikozilezett fehérjék alkotják. A HSA-nak 5 izoenzime ismert, melyek közül az 1,3,5 számmal jelzettek az A, a 2,4 számúak pedig a B családba tartoznak. Az izoenzimek aktivitásukban, hőstabilitásukban és bontási képükben nem különböznek.

Az embernél a nyál és hasnyálmirigy izoenzimek (HSA, HPA) az 1. kromoszómán kódoltak egy multigén család tagjaként, ami a nyálmirigyekben és a pankréaszban a különböző izoenzimek kifejeződését szabályozza [62]. Nemrégiben fedeztek fel egy gént, amely egy harmadik, eddig ismeretlen humán amiláz (HXA) képződéséért felelős [63].

A HSA enzim szerkezete az  $\alpha$ -amilázok jellegzetességeit viseli magán, azaz 3 doménből épül fel: az A doménből, melyet az 1-99 és 170-404 aminosavak alkotnak, a B doménből, melyet a 100-169 aminosavak hoznak létre és a C doménből, ami a 405-496 aminosavakat tartalmazza [23]. Az A doménben elhelyezkedő mély hasadék a szubsztrátkötő hely. A V-alakú bemélyedés közelében található egy  $\text{Cl}^-$  és egy  $\text{Ca}^{2+}$  ion, amelyek fontos szerepet töltenek be az enzim aktivitásában [62].

A humán nyál amiláz számos fontos élettani funkcióval rendelkezik:

1. hidrolitikus aktivitása révén megkezdheti a táplálék szénhidrát tartalmának lebontását a szájüregben
2. képes hozzákötődni a szájban lévő mikroorganizmusokhoz, különösen a *Streptococcus* baktériumokhoz úgy, hogy közben az enzim megtartja aktivitását [64,65,66]
3. kötődik a fogzománchoz és a hidroxipatitához is [67,68].

### II/2. A humán nyál amiláz inhibitorai

## II/2.1. A nyál amiláz inhibitorok jelentősége és csoportosítása

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

Az amiláz inhibitorok gyakorlati jelentőségét a humán gyógyászatban az adja, hogy fontos vegyületek lehetnek a diabetes, az obesitas, és a caries kezelésében. Ezen hatásukat úgy fejtik ki, hogy gátolják a szervezetbe bejutott szénhidrátok lebomlását, így felszívódását és ezáltal a vércukor szint emelkedését, illetve a tápanyagok hasznosulását. Ezek a tényezők pedig kedvezően befolyásolhatják a cukorbetegségben és az elhízástól szenvedők állapotát. A humán nyál amiláz inhibitorai feltehetően a fogszuvasodás kialakulásának megelőzésében is eredményesen alkalmazhatók. Az enzim katalizálja a keményítő hidrolízisét és képes hozzákötődni a szájból lévő *Streptococcus* baktériumokhoz, illetve a fogzománchoz is [69,70]. A keményítő bontásából származó termékeket a baktériumok anyagcsere-folyamataik során tejsavvá alakítják. A lokálisan keletkező sav pedig a fogzománc károsodásához vezethet, ami kritikus lépés a fogszuvasodás kialakulásában.

Ezek alapján érthető, hogy a humán nyál amiláz inhibitorokkal az irodalom is részletesen foglalkozik.

A nyál amiláz inhibitorai több szempont alapján csoportosíthatók. Eredetük szerint megkülönböztetünk természetes, félszintetikus és szintetikus inhibitorokat. A természetes inhibitorok lehetnek növényi, illetve bakteriális eredetűek. A humán nyál amiláznak számos szintetikus inhibitora ismert, azonban előállításuk igen nehézkes és általában alacsony hozamú, ezért kerültek az érdeklődés

középpontjába a jóval egyszerűbb és gyorsabb kemoenzimatikus módszerek ilyen típusú vegyületek szintézisére.

A másik csoportosítási szempont a szerkezetük, amely alapján megkülönböztetünk polifenolokat, szénhidrát jellegű vegyületeket és fehérjéket. Előfordulnak még ezen csoportok kombinációi is (glikopeptidek, komplex tanninok).

## II/2.2. A humán nyál amiláz inhibitorainak leírása

### II/2.2.1. Polifenol típusú inhibitorok

A növényekben sokféle másodlagos anyagcseretermék –alkaloid, terpén, fenolos anyag – halmozódik fel. Bár ezek a vegyületek az elsődleges anyagcserében: a bioszintézisben, a biodegradációban és más, energiaátalakulással járó anyagcsere-folyamatokban nem vesznek részt, különböző biológiai aktivitással rendelkeznek. Lehetnek toxikusak, lehetnek hormonális hatásaik, ezenkívül szerepet játszhatnak a növényeknek a növényevőkkel és betegségekkel szemben való védekezésében.

A fenolos anyagok metabolizmusa a növényekben összetett, sokféle vegyületet eredményezhet, az ismert növényi pigmentektől (az antocianidinektől) kezdve, a növényi sejtfal összetett fenolos anyagaiig (a ligninig). A tanninok a fenolos anyagok csoportjába tartoznak. Kémiai reaktivitásuk és biológiai aktivitásuk élesen elkülöníti őket a többi növényi, másodlagos, fenolos anyagcsereterméktől.

A tanninok igen elterjedtek a növényvilágban. Megtalálhatók a nyitvatermőkben (*Pinus* fajokban) és a zárvatermőkben egyaránt. A zárvatermők esetében gyakrabban fordulnak elő a kétszikű növényekben. Jellegzetes tannin tartalmú kétszikű családok: *Leguminosae* (*Acacia*, *Lotus* fajok), *Myrtaceae* (*Eucalyptus*, *Mirtus* fajok), *Fagaceae* (*Quercus* fajok), *Aceraceae* (*Acer* fajok), *Betulaceae* (*Betula* fajok), *Salicaceae* (*Salix caprea*) [71].

Ipari szempontból fontos csersavtartalmú növények még a *Schinopsis Engl.* spp., az *Acacia mearnsii* (cserény) és a *Caesalpinia spinosa* (tara vagy tövises lepényfa). A tannin elnevezés a kocsányos tölgy (*Quercus robur*) ősi kelta nevéből származik. A tölgyfa ugyanis fontos tanninforrás [72,73].

A tanninokat általában a természetben előforduló, nagy molekulatömegű polifenolos vegyületekként definiálják, melyek fehérjékkel oldhatatlan komplexet képeznek. Szerkezetük alapján három fő csoportra oszthatók: hidrolizálható, kondenzált és komplex tanninok [74,75].

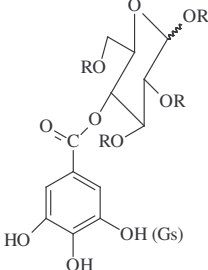
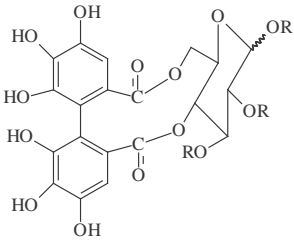
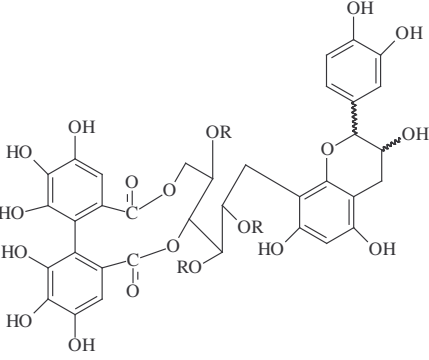
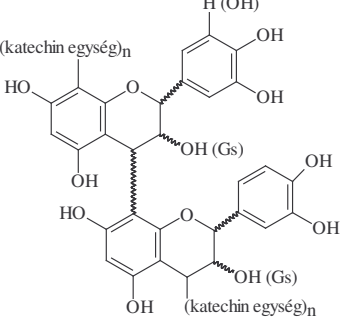
A hidrolizálható tanninok valamilyen poliólnak, legtöbbször a glükóznak az egy vagy több fenolos karbonsavval képzett észterei. Ha a fenolos karbonsav galluszsav, akkor gallotanninokról, ha hexahidroxi-difenilsav, akkor pedig ellagitanninokról beszélünk.

A hidrolizálható tanninok poliól része rendkívül sokféle lehet. Leggyakrabban D-glükóz, de lehet szacharóz, sikimisav, kinasav, kvercitol, fruktóz, a glükóz különböző származékai (szalicin, 2-hidroximetilfenil-, 6-fahéjsav-, 4-hidroxi-2-metoxifenil-, 4-hidroxi-3-metoxifenil-, 3,4,5,-trimetoxifenil-, 2,6-dimetoxi-4-hidroxifenil-, 4-karboxi-2,6-dihidroxifenil-, 3-karboxi-5,6-dihidroxi-fenil-glükóz), glükonsav, cukoralkoholok (D-glucitol), katechin és epikatechin is [74].

A hidrolizálható tanninokhoz tartoznak még a kávé-tanninoknak, illetve a taragallotanninoknak nevezett vegyületek. Az előbbieket szerkezetében a kinasav poliólhoz kávé-sav, míg az utóbbiak esetén galluszsav molekulák kapcsolódnak [71].

A kondenzált tanninok, vagy proantocianidinek természetes poliflavonoidok, melyek flavon-3-ol egységekből álló láncokból épülnek fel. A proantocianidinek leggyakoribb csoportja a procianidinek csoportja, amelyek 4-6 vagy 4-8 kötéssel összekapcsolódó katechin és/vagy epikatechin láncokból állnak [73].

A komplex tanninok pedig olyan tanninok, amelyekben egy katechin egység kapcsolódik glikozidos kötéssel keresztül egy gallo-, vagy egy ellagitannin egységhez [74].

Tanninok	
gallotanninok	ellagitanninok
	
komplex tanninok	kondenzált tanninok
	

6. ábra: Tanninok csoportosítása és szerkezete.

Míndez arra utal, hogy a tanninok nagy szerkezeti változatosságot mutatnak. Emellett széles körű biológiai aktivitással is rendelkeznek. Többek között potenciális fémion kelátorok, fehérje kicsapó ágensek és biológiai antioxidánsok.

Nagy mennyiségű tannint tartalmazó ételek tartós fogyasztása együtt járhat hiánybetegségek (pl. anaemia) kialakulásával. Ez a tanninok kelátképző tulajdonságával magyarázható, mert a tanninnal kelát komplexet kialakító fémionok biológiailag nem hozzáférhetőek [72].

Kiterjedt biológiai tesztek során a tanninok számos képviselőjéről kiderült, hogy antivirális és antibakteriális hatást mutatnak, de a legfigyelemreméltóbb tulajdonságuk talán mégis a tumor ellenes aktivitásuk. Bizonyos tanninok képesek szelektíven gátolni a HIV-vírus replikációját [74].

Az antivirális hatás oka, hogy a tanninok a vírusok protein burkához vagy a gazdasejt membránjához kötődnek, ezáltal képesek megakadályozni a vírus adszorpcióját és azt ezt követő penetrációját is [76].

A tanninok kifejezett antibakteriális hatást mutatnak a *Streptococcus mutans*-szal szemben, ami elsődleges szerepet tölt be a fogszuvasodás létrejöttében [77,78,79]. Bizonyított, hogy a gallotanninban gazdag extraktumok megakadályozzák a baktériumnak a fog felszínéhez való kötődését [76,80,81].

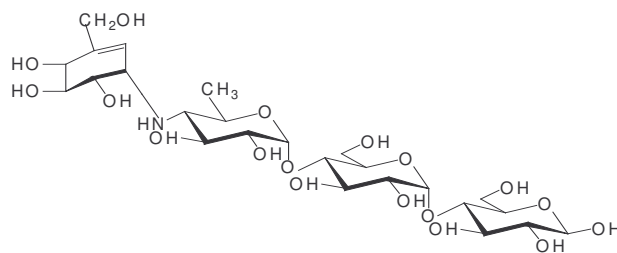
Mindezek mellett a tanninok az enzimekre is képesek gátló hatást kifejteni, ami sok esetben előnyös is lehet. A gallotanninok, procianidinek, teaflavinok és galloilezett flavon-3-olok inhibitorai a glükozil-transzferáznak. A *Larix laricina* tanninjai [82], és sok polifenol gátolja a xantin-oxidáz aktivitását, ami hasznos lehet a köszvény kezelésében. Az ellagitanninok bizonyítottan jó inhibitorai a protein kináz C-nek [83], a proantocianidinek pedig az angiotenzin konvertáló enzimnek [84]. Újabban az eper és a málna gyümölcsök kivonatáról is bebizonyosodott, hogy a bennük lévő ellagitanninok és antocianidinek hatékony  $\alpha$ -amiláz inhibitorok [85]. Az irodalomból az is ismert, hogy a tea polifenoljai és tanninjai gátolják a humán nyál amilázt [86,87,88,89,90]. Ezek a vegyületek, a HSA gátló tulajdonságuk és a *Streptococcus mutans*-ra kifejtett antibakteriális hatásuk miatt, fontos eszközei lehetnek a fogszuvasodás elleni küzdelemnek.

## II/2.2.2. Szénhidrát típusú inhibitorok

### II/2.2.2.1. Akarbóz

A leginkább ismert, a legelterjedtebben használt szénhidrát típusú amiláz inhibitor az akarbóz, amit a gyógyszeripar Glucobay néven forgalmaz a cukorbetegség kezelésére.

Az akarbóz az *Actinoplanes* fajok fermentációjának terméke. Szerkezetét tekintve egy pszeudotetraszacharid, ami tartalmaz egy telítetlen ciklitol (D-glüko konfigurációjú, 2,3,4-trihidroxi-5-(hidroximetil)-5,6-ciklohexén) gyűrűt, amely egy 4-amino-4,6-didezoxi-D-glükopiranoz N-jéhez kapcsolódik, ez pedig egy  $\alpha$ -1,4 kötés révén áll kapcsolatban egy maltóz egységgel. A ciklitol egység és az amino cukor által alkotott szerkezeti részt akarviozinnak nevezik.



7. ábra: Az akarbóz szerkezete.

Az akarbóz több enzimnek is erős kompetitív inhibitora, így az  $\alpha$ -glükozidázoknak, a ciklodextrin-glükozil-transzferázoknak, a glükóamilázoknak és az  $\alpha$ -amilázoknak is. A kiváló inhibitor hatás a telítetlen ciklohexén gyűrűnek – ami a félszék konformáció révén a glikozidos kötés hasításának átmeneti állapotát mimikálja – és az N-glikozidos kötésnek tulajdonítható [91,92,93].

Bár az akarbóz kitűnő inhibitora a keményítő hidrolízisnek, ismert egy nem kívánatos mellékhatása. Az irodalom szerint a vékony- és vastagbél enzimei

metabolizálják az akarbózt, amelynek során akarviozin-glükóz és glükóz keletkezik. A bomlási termékek a vastagbélbe érnek, ahol a D-glükóz mikrobiális fermentációja kellemetlen hastájéki panaszokat okozhat [94].

Számos akarbóz származékot állítottak elő [91,94,95,96] teljes vagy részleges enzimatis, illetve kémiai átalakítások révén az utóbbi évtizedben. Így a különböző származékok által lehetségessé vált az  $\alpha$ -amilázok hidrolitikus aktivitásának tanulmányozása, az új vegyületek inhibíciós hatásainak vizsgálata. Az inhibitorok szerkezeti módosításain alapuló inhibíciós vizsgálatok segítséget nyújthatnak a szubsztrát kötődés feltételeinek és a katalitikus specificitás feltérképezésében. Olyan potenciális inhibitorok is készültek, amelyek az akarbózzal szemben jobb inhibitorok bizonyultak és kellemetlen panaszokat nem okoztak.

#### II/2.2.2.2. Akarbóz származékok

##### 1) A nem redukáló végen módosított akarbóz származékok:

- a) *Actinoplanes* fajok fermentációval állítanak elő olyan származékokat, ahol az akarbóz nem redukáló végéhez maltodextrin egység kapcsolódik.
- b) A **4<sup>IV</sup>- $\alpha$ -maltohexaozil-akarbózt** (G<sub>6</sub>-Aca) és a **4<sup>IV</sup>- $\alpha$ -maltododekaozil-akarbózt** (G<sub>12</sub>-Aca) állítottak elő ciklomaltohexaóz és akarbóz jelenlétében a CGTáz enzimmel úgy, hogy az akarbóz nem redukáló végén a C-4 OH-hoz kapcsolták a maltohexaóz, vagy a maltododekaóz molekulát. Az így kapott anyagokat több amilázon is tesztelték (*Bacillus amiloliquefaciens* amilázon, PPA-n, HSA-n) és azt tapasztalták, hogy a maltodextrin láncok elősegítik az akarviozin egység beilleszkedését és rögzülését azokhoz az alhelyekhez, amelyekben a katalitikus aminosavak találhatóak [91].

## 2) *A redukáló végen módosított akarbóz származékok:*

Számos más különböző akarbóz analógot állítottak elő az akarbóz redukáló végén való módosítással, kihasználva a BSMA transzglykozilező képességét akarbóz és számos szénhidrát akceptorral [91]. Ilyen származékok az **akarviozin-glükóz** és az **izoakarbóz**, melyek elsősorban nem a HSA, hanem más  $\alpha$ -amilázok gátlásakor mutattak az akarbóznál jobb inhibitor hatást. Fontos megemlíteni, hogy ezek a származékok ellenállnak a bélbeli amilolitikus hidrolízisnek és fenntartják hatásukat anélkül, hogy belőlük glükóz, ennek következtében pedig felfűvódás alakulna ki [94].

### II/2.2.3. Fehérje típusú inhibitorok

A növényi magvak – legfőképp a hüvelyesek és a gabonafélék magvai – gazdag forrásai a számtalan protein típusú inhibitornak, amelyek az  $\alpha$ -amilázokon vagy más poliszacharid bontó enzimeken fejtenek ki gátló hatást. Ennek oka, hogy a növények ilyen inhibitorok termelésével próbálnak védekezni az őket fogyasztó rovarok és ezek lárvái ellen. A rovar amilázok működését gátló anyagok miatt, a növényt fogyasztó állat képtelenné válik a növényi szénhidrátok lebontására és energia nyérésére, így elpusztul. Tudományos megfigyelések azonban kimutatták, hogy a növények által termelt peptid inhibitorok nem csak rovar, hanem bakteriális, gomba eredetű, emlős pankreász és humán  $\alpha$ -amilázokra, a HSA-ra és a HPA-ra is gátló hatást fejthetnek ki.

#### II/2.2.3.1. A búza (*Triticum aestivum*) magjának inhibitorai

A búza albuminjai között nagy számban fordulnak elő olyan proteinek, amelyek  $\alpha$ -amiláz gátló hatással rendelkeznek. Ezeket a fehérjéket három családba sorolják: a 12, 24 és 60 kDa molekulatömeggel jellemezhető családokba. Az  $\alpha$ -amiláz inhibitorok a 24 kDa családba tartoznak; rovar, emlős és emberi amilázokat is gátolnak. A 12 kDa család tagjai főként rovar amilázokon fejtenek ki hatást, a 60 kDa család inhibitorait pedig még nem tanulmányozták behatóbban.

A 12 kDa család legfőbb komponense a monomer 0,28-inhibitor [97], amelynek alapján a családot 0,28-izoinhibitor családnak is nevezik [98,99]. Ide tartoznak a 0,28; 0,32; 0,35; 0,39; 0,48 proteinek, amelyeket a brómfenolkékhez viszonyított elektroforetikus mozgékonyaságuk alapján neveztek el [99].

A 24 kDa családba ismereteink szerint tíz fehérje tartozik, amelyek mind dimerek és jól gátolják a HSA-t és a HPA-t, bár ez utóbbit kisebb mértékben [98]. A család kiemelkedő tagjai a 0,19-; 0,36-; 0,38-; 0,53-inhibitorok, melyek közül a 0,19 ( $K_i=0,29$  nM a HSA-n) és 0,53 gátolja a HSA-t és a HPA-t is [97,100]. A 0,53-inhibitor 500x nagyobb gátló hatást mutat a HSA, mint a HPA iránt. A 0,19- és 0,53-inhibitorok teljes aminosav sorrendje ismert [101]. A 0,19-inhibitor 21 különböző (ötféle emlős, négyféle madár, hatféle rovar, hatféle tengeri élőlény)  $\alpha$ -amilázt gátol, emellett aktivitása ellenáll a tripszinnek és hőhatásoknak, viszont elveszti a stabilitását olyan kezelések hatására, amelyek az alegységenként 4 db diszulfid hídját felbontják [102].

O'Donnel és McGreeney a búzából izoláltak egy 21000 Da tömegű 0,2 elektroforetikus mozgékonyasággal jellemezhető fehérjét, ami sok közös tulajdonságot mutat a 0,19-inhibitorral. Az enzim inhibíciós vizsgálatok alapján a 0,2-inhibitor 100x specifikusabb inhibitornak bizonyult a HSA-n ( $IC_{50}=0,1$   $\mu$ g), mint a HPA-n [103].

## II/2.2.3.2. Egyéb növényekből származó inhibitorok

A búzán kívül még számos gabonaféle és hüvelyes növény tartalmaz amiláz inhibitorokat. Az alábbi táblázatban láthatóak ezek az inhibitorok, az őket tartalmazó növények és a különböző amilázokra kifejtett hatásaik.

1. táblázat: Egyéb növényekből származó fehérje típusú inhibitorok jellemzői.

Növény neve		Inhibitor(ok) elnevezése	Gátolt amiláz típusa	Ref.
Magyarul	Latinul			
Közönséges bab	<i>Phaseolus vulgaris</i>	$\alpha$ AI-1	emlős, HSA, HPA	[104, 105,106]
		$\alpha$ AI-2 PvCAI	rovar (sem emlős, sem humán)	
Keskenylevelű bab	<i>Phaseolus acutifolius</i>	PvCAI $\alpha$ AI-2	rovar (sem emlős, sem humán)	[107]
Galambborsó	<i>Cajanus cajan</i>	6.2-inhibitor	HSA, marha PA	[108]
Tehénborsó	<i>Vigna unguiculata</i>	-	bakteriális	[109]
Rozs	<i>Secale cereale</i>	-	főként rovar, emlős	[110]

Az irodalmi adatok szerint a trópusi gyümölcsök között is léteznek olyanok, amelyekben amiláz gátló hatással rendelkező fehérjék vannak jelen. Ilyenek például a sárgadinnye (*Cucumis melo L.*) és az assai (*Euterpe oleraceae*), melyek a HSA aktivitását gátló fehérjéket tartalmaznak [111].

A fehérje inhibitorokat szekvenciájuk és a háromdimenziós szerkezetük alapján Richardson és munkatársai [112] hat csoportra osztották, amely szerint lektinszerű, „knottin”-féle, gabonaszerű, Kunitz-féle,  $\gamma$ -tioninszerű és thaumatinszerű protein inhibitorok léteznek.

Ezek közül csak néhány csoport tagjai képesek gátolni a humán amilázokat. A korábban említett, búzából származó inhibitorok a gabonaszerű, a közönséges bab  $\alpha$ AI-1 és  $\alpha$ AI-2 proteinjei pedig a lektinszerű csoportba tartoznak. A többi csoport tagjainak hatása kizárólag rovar amilázokra korlátozódik [113,114].

#### II/2.2.4. Egyéb típusú inhibitorok

Számos aszkorbinsav és izoaskorbinsav származékról derült ki, hogy  $\alpha$ -amiláz gátló hatásuk van. A szerkezet és inhibíciós hatás közötti összefüggést kutató vizsgálatok azt bizonyították, hogy az endiol molekularészlet esszenciális az  $\alpha$ -amiláz gátlás szempontjából. A humán nyál amilázon az izoaskorbinsav bizonyult a legjobb inhibitornak (gátlás: 100%), de az 5., 6. szénen acetállal védett izoaskorbinsav (gátlás: 98%) és aszkorbinsav (gátlás: 88%) mellett a 6. szénen hosszú láncú zsírsavval módosított aszkorbinsav is jelentős gátlást fejtett ki. A felsorolt vegyületek a humán pankreász amiláz, bakteriális és gomba eredetű amilázokkal szemben nagymértékű inhibíciós tulajdonságot mutattak [115].

### III. SAJÁT VIZSGÁLATOK

#### III/1. A humán nyál amiláz fehérje inhibitorai

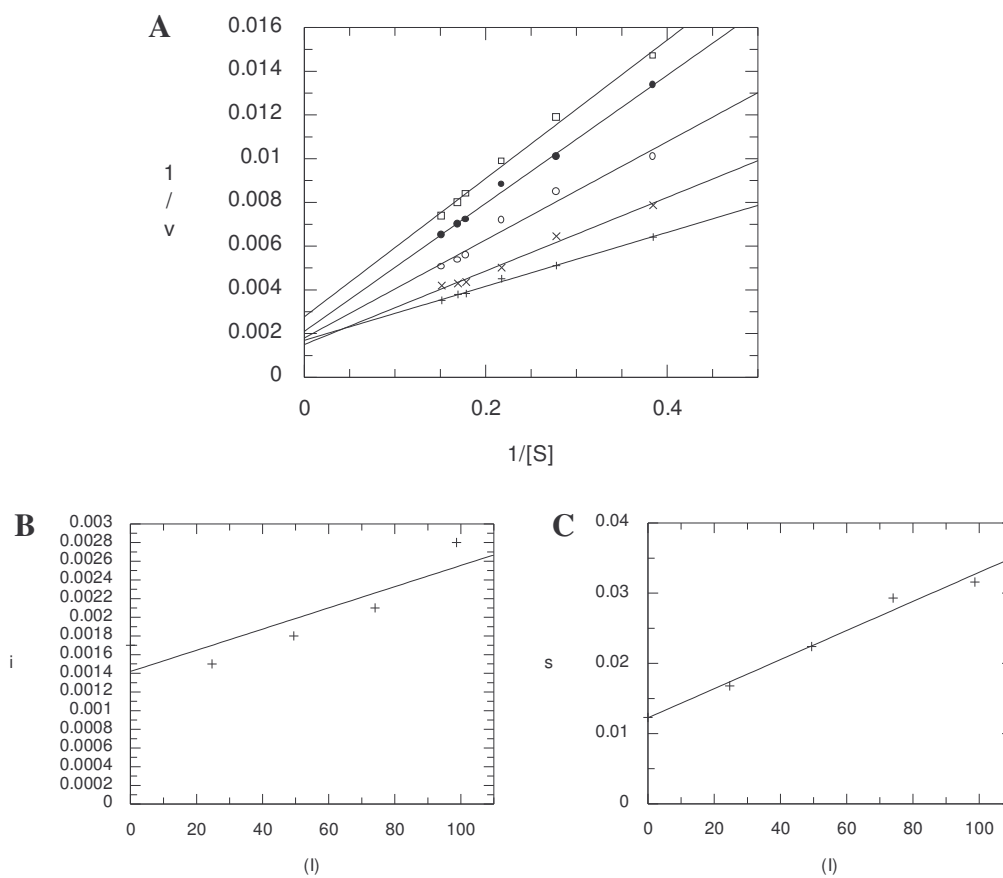
Ahogy az irodalmi áttekintés fejezetben már bemutattam, sok hüvelyes és gabonanövény magva tartalmaz protein típusú  $\alpha$ -amiláz inhibitorokat.

Kísérleti munkám során a búzából származó, kereskedelmi forgalomban kapható fehérjét vizsgáltam a HSA gátlásának tanulmányozására. A fehérje molekulatömegét MALDI-TOF MS analízissel állapítottuk meg, ami a minta sómentesítése után 13233 g/mol-nak adódott. A molekulatömeg alapján ez a protein a búzából  $\alpha$ -amiláz inhibitorainak 12 kDa-os családjába tartozó, monomer 0,28-inhibitor.

A kinetikai méréseket természetes eredetű amilózon végeztük humán nyál amiláz (EC 3.2.1.1) enzim jelenlétében. Az enzimreakció sebességére a redukáló érték mérésén alapuló, dinitro-szalicilsavas módszerrel következtettünk. A gátlás típusának megállapítására a klasszikus Lineweaver-Burk és Dixon-féle grafikus ábrázolást használtuk. A kezdeti sebességet spektrofotometriával különböző szubsztrát koncentrációknál inhibitor hiányában és adott inhibitor koncentrációk mellett mértük.

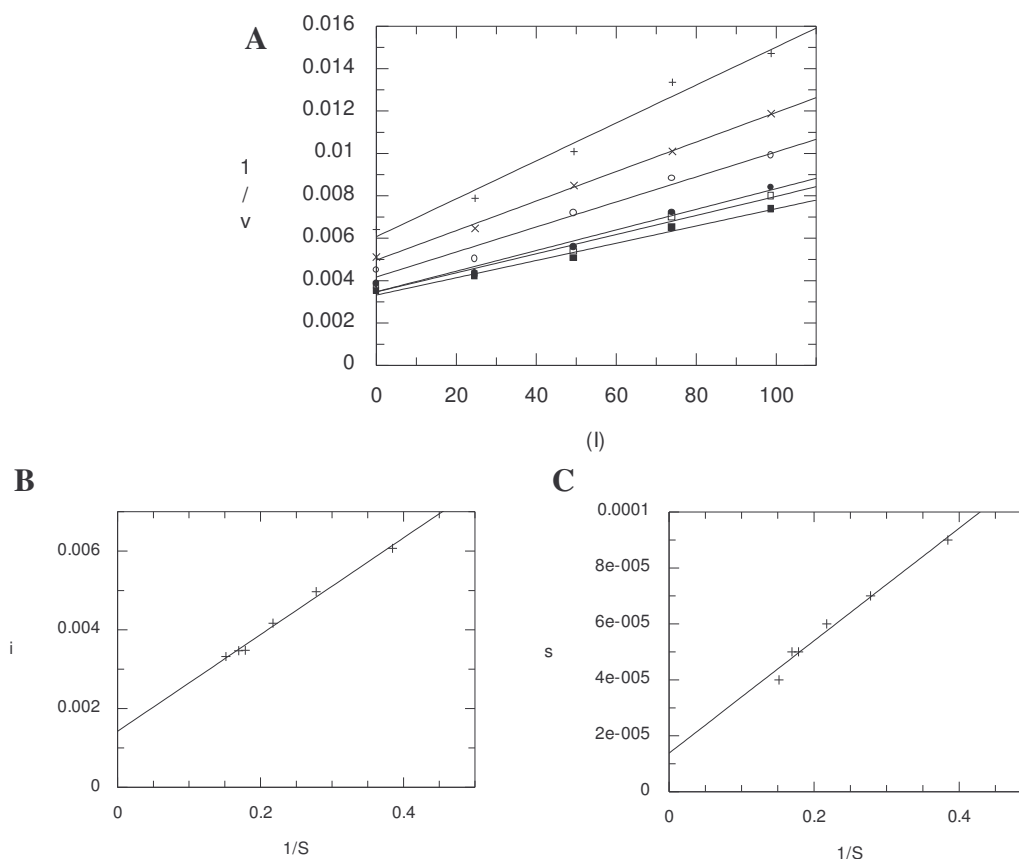
A 8. ábra mutatja a búzából származó protein inhibitorral gátolt nyál amilázra vonatkozó Lineweaver-Burk ábrázolás egyeneseit amilóz szubsztrát esetén. A kezdeti sebesség reciprokának a szubsztrát koncentráció reciprokának függvényében való ábrázolása, azaz az elsődleges Lineweaver-Burk ábrázolás egyeneseket eredményezett. A másodlagos ábrázolásoknál látható, hogy mind a meredekség (s), mind a tengelymetszet (i) növekszik az emelkedő inhibitor koncentrációval. Ezen megfigyelések alapján a gátlás nem kompetitív típusú. Mivel az elsődleges egyenesek metszéspontja a második síknegyedbe esik, a gátlás kevert, nem kompetitív [116]. A másodlagos ábrázolások esetén mind a tengelymetszet, mind a meredekség egyeneseket ad az inhibitor koncentráció

függvényében. Ez a gátlás Cleland szerint egy meredekség és ordináta metsző lineáris, nem-kompetitív gátlás [117]. Ezen egyenesek megfelelő első fokú egyenletei (Alkalmazott módszerek fejezet, 3. és 4. egyenlet) a fehérje koncentrációjára vonatkozóan arra utalnak, hogy egy molekula inhibitor kötődik mind a szabad enzimhez, mind az enzim-szubsztrát komplexhez.



8. ábra: Lineweaver-Burk elsődleges (A) és másodlagos (B:  $i$  vs  $[I]$ , C:  $s$  vs  $[I]$ ) ábrázolás. S = amilóz,  $[S] = \text{mgmL}^{-1}$ . I = 0,28-inhibitor,  $[I]$ : +, 0 nM; x, 24.7 nM; o, 49.4 nM; ●, 74nM; □, 98.7 nM.  $[1/v] = \text{min}\mu\text{M}^{-1}$ .

A Dixon-féle ábrázolás is megerősíti ezeket a megállapításokat, hiszen a kezdeti sebesség reciprokai az inhibitor koncentráció függvényében ábrázolva egyenesek. Az  $1/S$  függvényében ábrázolva a meredekséget és a tengelymetszetet szintén egyeneseket kaptunk, ami megerősíti, hogy egy molekula inhibitor kötődik az enzimhez és az enzim-szubsztrát komplexhez is.



9. ábra: Dixon-féle elsődleges (A) és másodlagos (B:  $i$  vs  $1/S$ , C:  $s$  vs  $1/S$ ) ábrázolás. S = amidáz. I = 0,28-inhibitor. [S]: ■, 2.6 mgmL $^{-1}$ ; □, 3.6 mgmL $^{-1}$ ; ●, 4.6 mgmL $^{-1}$ ; ○, 5.6 mgmL $^{-1}$ ; x, 5.9 mgmL $^{-1}$ ; +, 6.6 mgmL $^{-1}$ . [I] = nM,  $[1/v]$  = min $\mu$ M $^{-1}$ .

A gátlás kinetikai állandóit a Lineweaver-Burk és Dixon-féle másodlagos ábrázolásokból határoztuk meg, amelyeket a 2. táblázatban foglaltam össze.

2. táblázat: A HSA kinetikai paraméterei a búzamazag eredetű, protein 0,28-inhibitor jelenlétében.

Számítás módja	$v_{\max}$ ( $\mu\text{Mmin}^{-1}$ )	$K_M$ ( $\text{mgmL}^{-1}$ )	$K_{EI}$ (nM)	$K_{ESI}$ (nM)
Lineweaver-Burk-féle másodlagos ábrázolás	704,23	8,66	61,5	142
Dixon-féle másodlagos ábrázolás	714,28	8,78	61,5	140

Az amilózzal végzett vizsgálathoz szükséges 0.5-5  $K_M$  koncentráció tartomány 4.4  $\text{mgmL}^{-1}$  – 43,9  $\text{mgmL}^{-1}$  amilóz koncentrációnak felel meg. Az amilóz oldékonysága nem teszi lehetővé ezen koncentráció alkalmazását, mivel vízben kevesebb, mint 5%-ban oldódik fel [118]. Ezért csak a telítési görbe lineáris szakaszát tudtuk kimérni, így az értékelésnél a nem lineáris regressziót nem alkalmazhattuk.

A  $K_{EI}$  alacsonyabb értékei miatt, a gátlás inkább kompetitív jellegű, mivel az inhibitor nagyobb valószínűséggel kapcsolódik a szabad enzimhez, mint az enzim–szubsztrát komplexhez.

Meghatároztam a 0,28-inhibitorra vonatkozó  $IC_{50}$  értéket is, ami a 2-klór-4-nitrofenil-4-O- $\beta$ -D-galaktopiranozil- $\alpha$ -D-maltozid (GalG<sub>2</sub>-CNP) szubsztáton 18,27 nM-nak adódott.

A fehérje típusú inhibitorokról ismert, hogy erősen képesek kötődni az enzim molekulához, mivel nagy méretük miatt a katalitikus helytől távol lévő enzim területekkel is kölcsönhatást alakítanak ki [119].

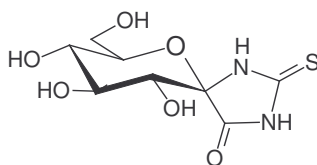
### III/2. Szénhidrát típusú nyál amiláz inhibitorok

A Biokémiai Tanszéken számos szénhidrát típusú vegyület HSA gátló hatását tesztelték. Vizsgálták egyszerű cukrok (pl.: glükóz), di- és oligoszacharidok (pl.: maltóz, maltotrióz, maltopentaóz) inhibitor tulajdonságait. A glükóz esetében gátló

hatást nem tapasztaltak, a di- illetve oligoszacharidok csak mM-os koncentrációban voltak képesek az enzim gátlására.

Több, szintetikus módon előállított vegyülettel is végeztünk méréseket. Ilyen szintetikus anyag a Dr. Herczegh Pál és munkatársai által előállított glükál oligoszacharid keverék, amelynek komponensei ismétlődő, 2,3 telítetlen hexapiranoz egységekből épülnek fel [120]. Az oligoszacharidokat poli-Ferrier reakcióval a 3,6-di-O-acetil-D-glükálból nyerték. A glükál amiláz inhibitor aktivitását GalG<sub>2</sub>-CNP szubsztráton vizsgáltuk. A mérési eredmények alapján a számított inhibíciós konstansok mM-os nagyságrendbe esnek ( $K_{EI} = 35.2$  mM,  $K_{ESI} = 2,7$  mM).

Másik szintetikus módon előállított vegyület a Dr. Somsák László és munkatársai által, a Szerves Kémia Tanszéken előállított glükopiranozilidén-spirothiohidantoin (GTH) (10. ábra), a glikogén-foszforiláz enzim igen hatékony inhibitora [121].



10. ábra: A GTH szerkezete.

A GTH glükopiranozil része H-kötéseket, míg a rigid thiohidantoin-csoport egy kedvező elektrosztatikus környezetben további poláris kölcsönhatásokat létesít az enzim fehérjével. Az inhibíciós vizsgálatok kimutatták, hogy a GTH a nyál amiláznak is inhibitora. A kinetikai vizsgálatokat humán nyál amiláz enzim jelenlétében 2-klór-4-nitrofenil-4-O- $\beta$ -D-galaktopiranozil-maltóz (GalG<sub>2</sub>-CNP) és amilóz szubsztráton is elvégeztük. Az amilózon végzett mérésekkor a GTH enzim gátló hatást nem fejtett ki, a rövid szubsztráton viszont inhibitornak bizonyult.

A GalG<sub>2</sub>-CNP szubsztráton végzett kinetikai mérések eredményeit Lineweaver-Burk és Dixon-féle grafikus ábrázolással elemeztük. A másodlagos ábrázolások

során a meredekségek és a tengelymetszetek az inhibitor koncentráció, illetve a szubsztrát koncentráció reciprokának függvényében való ábrázolásakor egyeneseket kaptunk. Ez azt jelenti, hogy egy molekula GTH kötődik mind az enzimhez, mind az enzim-szubsztrát komplexhez. A gátlás típusa kevert, nem kompetitívnek adódott [122]. A mérés eredményeit a 3. táblázat tünteti fel.

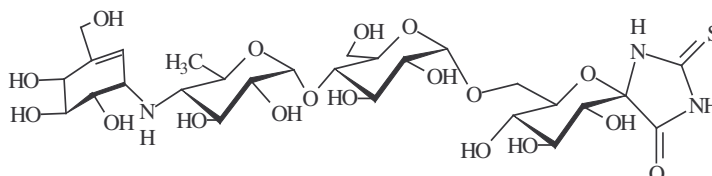
3. táblázat: A GTH-nal gátolt GalG<sub>2</sub>-CNP hidrolízisének kinetikai paraméterei.

Számítás módja	$V_{\max}$ (nMmin <sup>-1</sup> )	$K_M$ (mM)	$K_{EI}$ (mM)	$K_{ESI}$ (mM)
Lineweaver-Burk-féle másodlagos ábrázolás	42.95	2.36	7.28	2.84
Dixon-féle másodlagos ábrázolás	44.05	2.43	7.30	2.84
GRAFIT teljes, nem kompetitív modell	44.87	2.51	7.60	2.71
GRAFIT kevert (Duggleby) modell	44.87	2.51	7.61	2.71

A HSA aktív helye viszonylag hosszú (4 + 3 alhely), ami elősegíti, hogy a kis méretű GTH többféle kötőmódban helyezkedjen el a szubsztrátkötő helyen. A gyenge inhibitor hatásnak feltehetően ez az oka. Feltételeztük, hogy egy több alhelyet elfoglaló molekula hatékonyabb gátlást eredményezne.

A GTH-nál hosszabb molekula szintézisét Dr. Remenyik Judit végezte el enzimátikus transzglykozilezéssel. A kemoenzimátikus transzglykozilezést a *Bacillus stearothermophilus* maltogén amilázzal (BSMA) katalizált reakcióval sikerült megoldani. Ezt az enzimet már korábban is sikeresen használták akarbóz analógok előállítására [123]. A BSMA az akarbóz donorról katalizálta az akarviozin-glükóz (PTS) átvitelét a GTH-ra, mint akceptorra. A BSMA megtartotta sztereoszelektivitását, de a glikozilezés főként a C-6-en történt és az  $\alpha$ -akarbózinil-(1-4)- $\alpha$ -D-glükopiranozil-(1-6)-D-glükopiranozilidén-spirotiohidantoin (PTS-GTH) képződését eredményezte. Az így keletkezett tetraszacharidszerű vegyület mind az átmeneti állapot analóg, mind a szubsztrát

analóg inhibitorok szerkezeti tulajdonságait magán hordozza [124], szerkezetét a 11. ábra mutatja be.

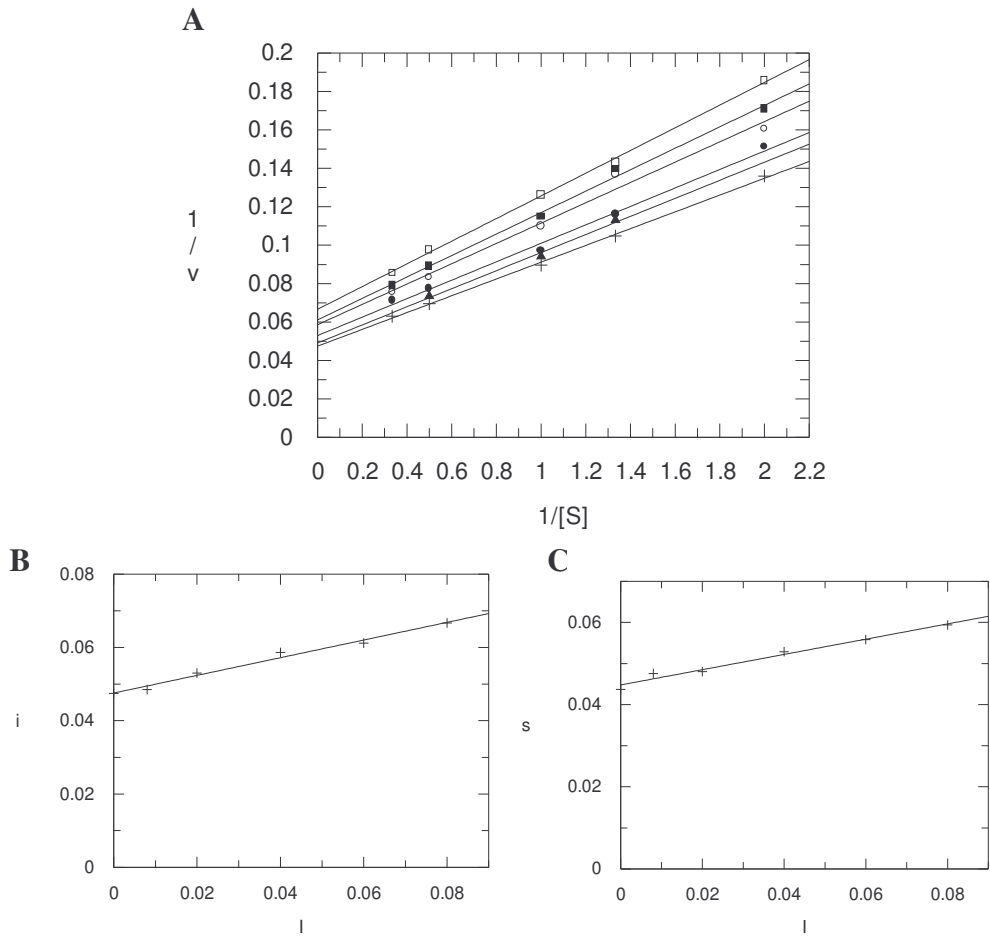


11. ábra: A PTS-GTH szerkezete.

A PTS-GTH nyál amilázra kifejtett gátló hatását GalG<sub>2</sub>-CNP és amilóz szubsztráton is vizsgáltuk. A rövid, kromoforral ellátott szubsztrát estén a gátlás kinetikáját nem lineáris regresszióval és Lineweaver-Burk-féle ábrázolással és a megfelelő másodlagos ábrázolásokkal határoztuk meg (12. ábra). Az elsődleges ábrázolás (12. A ábra) esetén egyeneseket kaptunk, amelyek a második síknegyedben metszik egymást. A meredekség és a tengelymetszet értékek is növekvő tendenciát mutattak az inhibitor koncentráció függvényében. A gátlás tehát kevert, nem kompetitív típusú.

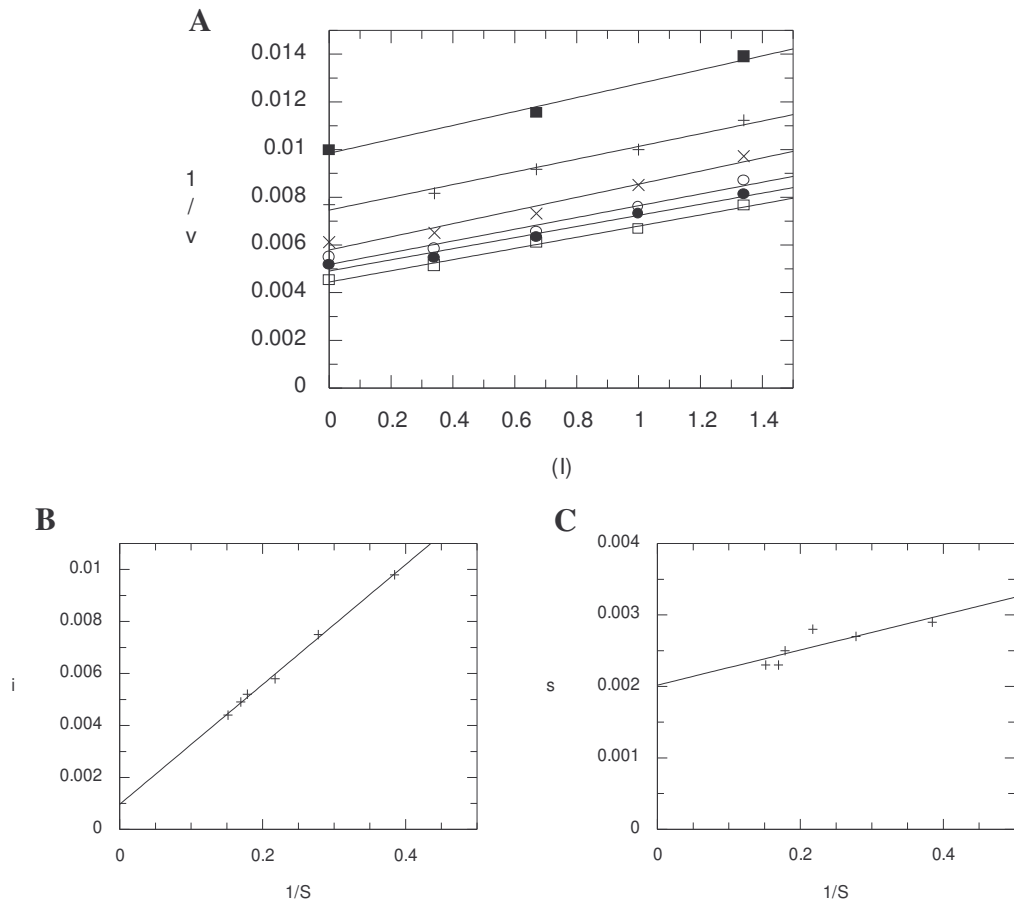
A másodlagos ábrázolások (12. B, C ábra) egyeneseket eredményeztek. Az első rendű összefüggés arra utal, hogy egy molekula inhibitor kapcsolódik a szabad enzimhez és az enzim-szubsztrát komplexhez is. Ezeket a megfigyeléseket a Dixon-féle ábrázolás eredményei is megerősítik.

Mivel az amilózzal végzett vizsgálat esetén a 0,5-5 K<sub>M</sub> közötti szubsztrát koncentráció tartományt nem tudtuk biztosítani az amilóz rossz oldékonysága miatt, így a nem lineáris regressziót a kiértékelés során nem alkalmazhattuk.



12. ábra: Lineweaver-Burk elsődleges (A) és másodlagos (B:  $i$  vs  $[I]$ , C:  $s$  vs  $[I]$ ) ábrázolás.  $S = \text{GalG}_2\text{-CNP}$ ,  $[S] = \text{mM}$ .  $I = \text{PTS-GTH}$ ,  $[I]$ : +, 0 nM; ▲, 8 nM; ●, 20 nM; ○, 40 nM; ■, 60 nM; □, 80 nM.  $[1/v] = \text{min}\mu\text{M}^{-1}$ .

A 13. ábra mutatja a Dixon elsődleges és másodlagos ábrázolásokat.



13. ábra: Dixon-féle elsődleges (A) és másodlagos (B:  $i$  vs  $[1/S]$ , C:  $s$  vs  $[1/S]$ ) ábrázolás.  $S$  = amilóz.  $I$  = PTS-GTH.  $[S]$ : □, 6.6 mgmL<sup>-1</sup>; ●, 5.9 mgmL<sup>-1</sup>; ○, 5.6 mgmL<sup>-1</sup>; x, 4.6 mgmL<sup>-1</sup>; +, 3.6 mgmL<sup>-1</sup>; ■, 2.6 mgmL<sup>-1</sup>.  $[I]$  = nM,  $[1/v]$  = min $\mu$ M<sup>-1</sup>.

A GalG<sub>2</sub>-CNP szubsztráthoz hasonlóan itt is egy inhibitor molekula kapcsolódik az enzimhez, illetve az enzim-szubsztrát komplexhez. A gátlás disszociációs állandóit a Lineweaver-Burk és a Dixon-féle grafikus ábrázolások és a megfelelő másodlagos ábrázolások alapján számítottuk.

A kinetikai állandókat a 4. táblázatban összegeztem.

4. táblázat: A GalG<sub>2</sub>-CNP és az amilóz HSA által történő hidrolízisének kinetikai paraméterei PTS-GTH inhibitor jelenlétében.

Kinetikai paraméterek	Szubsztrátok			
	GalG <sub>2</sub> -CNP		Amilóz	
	Nem lineáris regresszió	Lineweaver-Burk másodlagos ábrázolás	Lineweaver-Burk másodlagos ábrázolás	Dixon-féle másodlagos ábrázolás
$K_M$	0.9 mM	0.94 mM	22.8 mgmL <sup>-1</sup>	23.1 mgmL <sup>-1</sup>
$V_{max}$ (μMmin <sup>-1</sup> )	20.3	21.0	983	954
$K_{EI}$ (μM)	0.21	0.19	8.45	9.28
$K_{ESI}$ (μM)	0.22	0.24	0.5	0.5

A PTS-GTH mindkét szubsztrát esetén kevert, nem kompetitív gátlást fejtett ki. A  $K_{EI}$  és  $K_{ESI}$  inhibíciós állandók a GalG<sub>2</sub>-CNP szubsztráton gyakorlatilag azonosak, így az EI és ESI komplexek stabilitása is megegyezik. Az amilóz szubsztrát esetén eltérő eredményeket tapasztaltunk. A  $K_{ESI}$  alacsonyabb értéke azt jelzi, hogy az ESI komplex kialakulása kedvezőbb, mint az EI komplex kialakulása, így a gátlás jellege inkább unkompetitív. Az ESI komplexre vonatkozó disszociációs állandók mindkét szubsztrát esetén hasonló értékeket mutatnak, tehát mindkét szubsztrát esetén az enzim-szubsztrát-inhibitor komplex stabilitása is hasonló. Az inhibitor feltehetően az enzim másodlagos kötőhelyéhez kötődik, s ezt a szubsztrát minősége nem befolyásolja. A  $K_{EI}$  értékeket tekintve a PTS-GTH erősebb inhibitor hatást fejt ki a rövid szubsztráton, mint a hosszú láncú amilózon [125].

A szénhidrát típusú HSA inhibitorok disszociációs állandóit és IC<sub>50</sub> értékeit az összehasonlítás megkönnyítése végett az 5. táblázatban foglaltam össze.

5. táblázat: A szénhidrát típusú HSA inhibitorok disszociációs állandói GalG<sub>2</sub>-CNP szubsztráton mérve.

Inhibitor	K <sub>FI</sub> (μM)	K <sub>ESI</sub> (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)
glükál (DP 2-7)	35200	2700	2010*
GTH	7300	2840	10500
G <sub>2</sub>	-	4000	8000
G <sub>3</sub>	2650	-	3500
G <sub>5</sub>	400	-	800
PTS-GTH	0,19	0,24	0.03
akarbóz	0,7	0,1	0.86

\* Mivel a glükál minta egy oligoszacharid keverék, az IC<sub>50</sub>-et μM egységben nem lehet megadni, ezért az érték a táblázatban μg mL<sup>-1</sup> mértékegységben szerepel.

Mint látható, a leggyengébb inhibitor tulajdonságokkal a glükál jellegű vegyület sorozat rendelkezik. Bár a glükálok a szubsztrát átmeneti állapotát mimikálják, a gyenge affinitás a OH csoportok hiányával magyarázható. A szubsztrát analóg GTH molekula kis mérete miatt többféle kötőmódot létesíthet az enzim aktív helyével, ami megmagyarázhatja az alacsony inhibitor aktivitást. A maltóz, a maltotrióz és a maltopentaóz mM-os koncentráció tartományban okoz enzim gátlást a humán nyál amilázon. A maltóz esetén a gátlás típusa tisztán unkompetitív, míg a maltotrióz és a maltopentaóz esetén tisztán kompetitív. Az inhibíciós állandók arra utalnak, hogy a cukorgyűrűk számának növekedésével jelentősen nő az inhibitor hatékonyság. Ez a hatás jól érvényesül a GTH – PTS-GTH inhibitorok viszonylatában is. A PTS-GTH-nak négy nagyságrenddel kisebbek a disszociációs állandói, mint a GTH-nak. A kiváló inhibitor hatáshoz hozzájárul, hogy a vegyület szintézisekor akarbózt használtunk donorként, így az átmeneti állapotot mimikáló ciklitol gyűrű és az akceptor révén a tiohidantoin gyűrű is jelen van a molekulában. Az akceptor és a donor hidrolízis terméke, a pszeudotriszacharid (PTS) α(1-6) glikozidos kötéssel kapcsolódik egymáshoz,

ezáltal az inhibitor molekula ellenáll a HSA hidrolízisének és építő egységeinek előnyös gátló tulajdonságait ötvözve képes jelentős inhibitor hatást kifejteni.

Méréseink bizonyítják, hogy egy vegyület inhibitor tulajdonságait meghatározza a hossza (annál hatékonyabb az inhibitor, minél több alhellyel képes kölcsönhatást kialakítani) és a funkciós csoportjainak jellege és száma, ami az enzimmel létesített kötések típusát és mennyiségét befolyásolja.

### **III/3. Tanninok, mint HSA inhibitorok**

A Biokémiai Tanszéken végzett munkám nagy részét természetes polifenolos vegyületekkel, a tanninokkal készült inhibíciós vizsgálatok képezik. Méréseinket a kocsányos tölgy (*Quercus robur*) és az aleppói vagy más néven kurdisztáni tölgy (*Quercus infectoria Olivier*) eredetű tanninnal végeztük.

A szerkezeti analízis eredményei alapján mindkét anyag keveréknek bizonyult, így biológiai rendszerekre kifejtett hatásuk nehezebben értelmezhető, mint egy adott molekula esetén. Ebből a megfontolásból egy tiszta, szerkezetileg jól definiált tannin komponens, a pentagalloil- $\beta$ -D-glükopiranozt (GGs<sub>5</sub>) is megvizsgáltunk, ami az  $\alpha$ -amiláz enzimen hatásos inhibitor vegyületnek bizonyult.

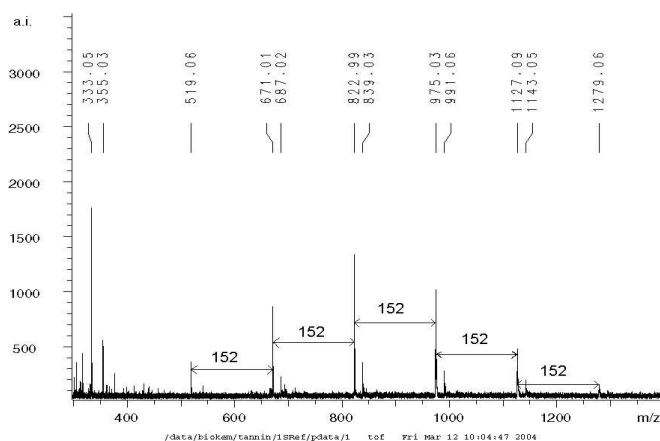
#### *III/3.1. A kocsányos tölgyből származó tannin vizsgálata*

Mint ahogy az irodalmi részben már tárgyalásra került, a tanninok szerkezetileg igen összetett anyagok, így megkíséreltük a kocsányos tölgy eredetű tannin alkotóelemeinek beazonosítását.

Elsőként egy gallotannin meghatározást végeztünk el. A gallotanninok kvantitatív analízisére használható megbízható módszer a galluszsav mennyiségének meghatározása rodaninnal [126]. A vizsgálatot galluszsavval standardizáltuk. Két külön mérést hajtottunk végre. Az egyiket a tannin hidrolízise előtt, a szabad galluszsav, a másikat a savas hidrolízis után a teljes galluszsav

mennyiségének mérésére. A galluszsav koncentráció a hidrolizátumban lévő tannin mennyiségének 60%-a. Ebből csak 1% a szabad galluszsav.

Elvégeztük a tannin MALDI-TOF MS analízisét pozitív-ion módban, DHB mátrixban. A 14. ábra a tanninról készült spektrumot mutatja.



14. ábra: A kocsányos tölgy eredetű tannin MALDI-TOF MS spektruma.

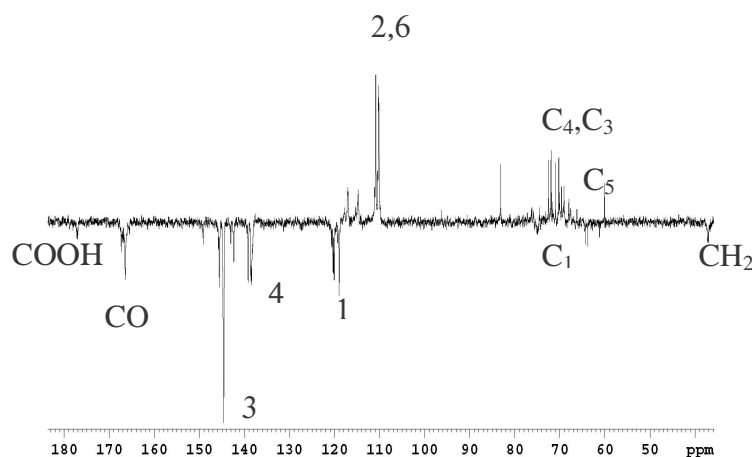
A tannin vizsgálata egész sor molekulaiont eredményezett. A vegyületek 152 tömegegységenként különülnek el egymástól. Ez a tömegkülönbség egy galloil-csoportnak felel meg. A sor legkisebb tömegű tagja (m/z 519), a legnagyobb tömegű (m/z 1279). A gallotanninok általában glükóz alapúak, így meglepő volt, hogy az első csúcs  $[M+Na]^+$  (m/z 519) molekulatömege 12 tömegegységgel különbözik a digalloilezett glükóz tömegétől. Ez kizárja a glükóz jelenlétét, viszont megfelel egy digalloilezett kinasavnak. Ezek alapján a kocsányos tölgy eredetű tannint 2-7 galluszsavval észtereszített kinasav molekulák alkotják.

Hasonló gallotannin sorozatot észleltek ESI-MS technikával kereskedelmi forgalomban lévő (Aldrich Chemical Company), tölgyfa extraktumból származó

tannin vizsgálatokor [127]. A szerzők szerint ezek a vegyületek a metil-4-keto- $\beta$ -D-glükopiranozid egy sorozatát alkotják.

A spektrumban megfigyelhető még más vegyületek jelenléte is: m/z 215, m/z 333, m/z 355-nél, amelyek a galluszsav  $[M+Na]^+$ , a monogalloilezett glükóz  $[M+H]^+$  és  $[M+Na]^+$  ionok tömegének felelnek meg. Ezek a komponensek csak kis mennyiségben vannak jelen ebben a tanninban.

Ezeket az eredményeket alátámasztja az NMR analízis is. A  $^{13}C$  spin-echo NMR spektrumban a kinasav C-1 atomjához rendelhető jel 83.1 ppm-nél található. A glükóz jelenlétét viszont kizárja a szénhidrátok anomer régiójára jellemző jelek hiánya a 90-100 ppm-es tartományban.



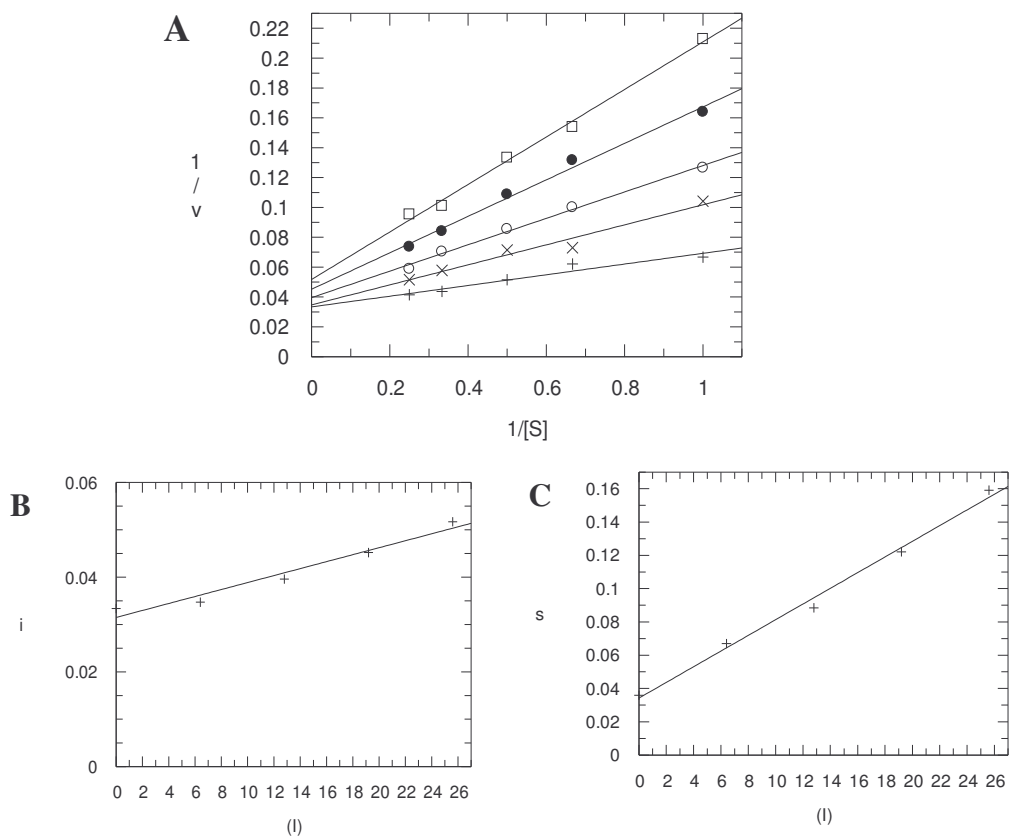
15. ábra: A tannin  $^{13}C$  spin-echo NMR spektruma.

A nagyobb érzékenységű HSQC spektrumban található kis intenzitású jelek (92, 95, és 97 ppm-nél) alapján azonban arra következtetünk, hogy a fő komponenshez viszonyítva 10%-nál kisebb mennyiségben galloilezett glükóz molekulák mégis jelen vannak a keverékben.

Emellett a 60-75 ppm tartományban számos jel detektálható, ami még inkább alátámasztja a kinasavban lévő OCH csoportok jelenlétét.

A részletes szerkezeti analízis eredményei bizonyítják tehát, hogy a kinetikai mérésekhez használt, kocsányos tölgy eredetű tannin fő alkotója a galloilezett kinasav.

A kinetikai méréseket humán nyál amiláz (EC.3.2.1.1.) enzim jelenlétében, GalG<sub>2</sub>-CNP szubsztráton végeztük. A gátlás kinetikáját a klasszikus Lineweaver-Burk és Dixon-féle grafikus ábrázolással tanulmányoztuk. A 16. ábra szemlélteti a kocsányos tölgy eredetű tanninnal gátolt nyál amilázra vonatkozó Lineweaver-Burk-féle ábrázolás egyeneseit.



16. ábra: Lineweaver-Burk elsődleges (A) és másodlagos (B:  $i$  vs  $[I]$ , C:  $s$  vs  $[I]$ ) ábrázolás.  $S = \text{GalG}_2\text{-CNP}$ ,  $[S] = \text{mM}$ .  $I = \text{kocsányos tölgy tannin}$ ,  $[I]$ : +, 0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; x, 6.4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; o, 12.8  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; ●, 19.2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; □, 25.6  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .  $[1/v] = \text{minnM}^{-1}$ .

Ezen ábrázolás metszéspontjainak (i) és iránytangenseinek (s) másodlagos ábrázolása az inhibitor koncentráció függvényében újabb információt szolgáltat a gátlás mechanizmusára vonatkozóan. A 16. A ábra mutatja, hogy a tanninnal gátolt amiláz kinetikai állandóinak meghatározására használt Lineweaver-Burk-féle reciprok ábrázolás a GalG<sub>2</sub>-CNP hidrolízise lineáris összefüggést eredményez. Mind a meredekség (s), mind a tengelymetszet (i) növekszik az emelkedő inhibitor koncentrációval. Ezen eredmények igazolják egyértelműen, hogy a gátlás nem kompetitív típusú. Az elsődleges egyenesek metszéspontja a második síknegyedbe esik. Ennek megfelelően a gátlás kevert, nem kompetitív.

Ahogy a 16. B és 16. C ábra mutatja, mind a tengelymetszet, mind a meredekség az inhibitor koncentráció függvényében egyeneseket ad. Az előbbi egyenesek megfelelő első fokú egyenletei a tannin koncentrációjára vonatkozóan arra utalnak, hogy egy molekula inhibitor kötődik mind a szabad enzimhez, mind az ES komplexhez. Parabolikus összefüggés arra utalna, hogy két molekula inhibitor kötődik az E-hez és az ES komplexhez [128].

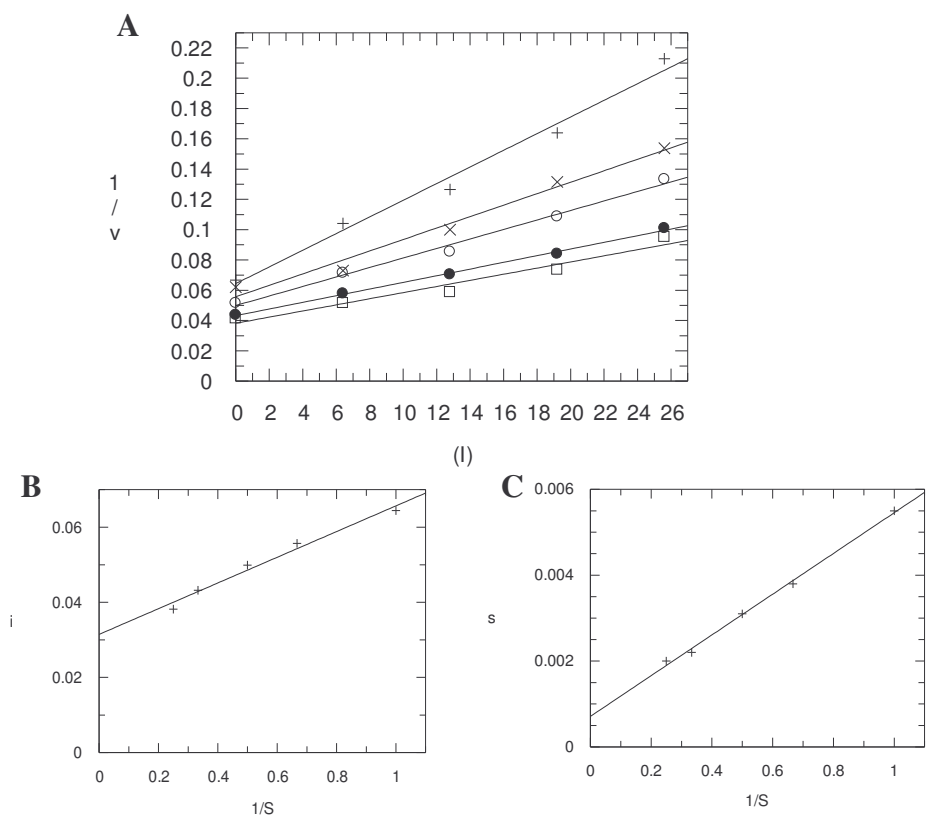
Ezeket az eredményeket a Dixon-féle ábrázolás (17. ábra) is megerősíti, mivel a kezdeti sebesség reciprokai az inhibitor koncentráció függvényében ábrázolva egyenesek.

Fontos megemlíteni, hogy a meredekség és a tengelymetszet is egyenest ad a 1/S függvényében ábrázolva.

Meghatároztuk a  $K_{EI}$  és  $K_{ESI}$  disszociációs konstansokat a másodlagos ábrázolásból, illetve a Grafit program segítségével nem lineáris regresszióval is.

A különbözőképpen meghatározott értékek jól egyeznek és a 6. táblázatban láthatók.

A  $K_{EI}$  alacsonyabb értéke azt mutatja, hogy az EI komplex képződése kedvezőbb, mint az ESI komplexé. A kinetikai állandókat  $\mu\text{gmL}^{-1}$ -ben tüntettem fel, mert a pontos molekulatömeg nem adható meg, mivel a tannin olyan keverék, amelyben a kinasavat különböző számú galluszsav (2-7) észteresíti.



17. ábra: Dixon-féle elsődleges (A) és másodlagos (B:  $i$  vs  $[1/S]$ , C:  $s$  vs  $[1/S]$ ) ábrázolás.  $S = \text{GalG}_2\text{-CNP}$ .  $I = \text{kocsányos tölgy tannin}$ .  $[S]$ : +, 1,0 mM; x, 1,5 mM; o, 2,0 mM; ●, 3,0 mM; □, 4,0 mM.  $[I] = \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $[1/v] = \text{minnM}^{-1}$ .

6. táblázat: Kinetikai állandók összegzése GalG<sub>2</sub>-CNP szubsztráton a kocsányos tölgy tannin esetén.

Számítás módja	$v_{\max}$ (nMmin <sup>-1</sup> )	$K_M$ (mM)	$K_{EI}$ (μg mL <sup>-1</sup> )	$K_{ESI}$ (μg mL <sup>-1</sup> )
Lineweaver-Burk másodlagos egyenesek	31.8	1.29	8.27	45.00
Dixon másodlagos egyenesek	31.8	1.29	8.27	45.00
GRAFIT teljes nem kompetitív modell	32.1	1.51	9.03	47.84
GRAFIT kevert (Duggleby) modell	32.2	1.28	8.97	49.38

A számított kinetikai adatok szerint a tannin vagy az aktív centrumhoz vagy az enzim másodlagos kötőhelyéhez kapcsolódik, s így keletkezik az EI komplex. A  $K_{EI}$  alacsonyabb értékei alapján feltételezhető, hogy a gátlás típusa inkább kompetitív, azaz a tannin előnyösebben tud kötést kialakítani az aktív helyvel, mint az enzim felszínének más helyeivel.

A kinetikai méréseket amilóz szubsztráton is elvégeztük. A meghatározást, a felszabaduló redukáló végek mérésén alapuló dinitro-szalicilsavas módszerrel 2.6-6.6 mgmL<sup>-1</sup> szubsztrát koncentráció tartományban, és 0; 53,4; 106,7; 160.0 µgmL<sup>-1</sup> tannin koncentrációk alkalmazásával kiviteleztük. Eredményeinket a 7. táblázat foglalja össze.

7. táblázat: HSA katalizálta amilóz hidrolízis kinetikai paraméterei kocsányos tölgy tannin inhibitor jelenlétében.

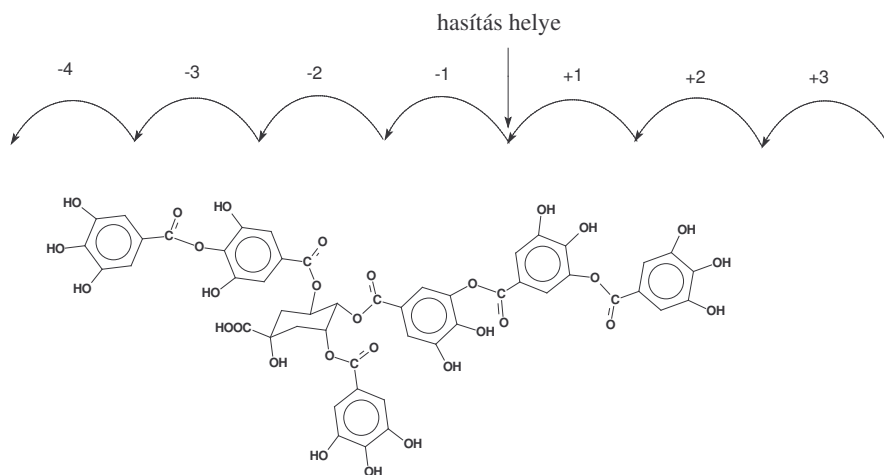
Számítás módja	$v_{max}$ µMmin <sup>-1</sup>	$K_M$ (mgmL <sup>-1</sup> )	$K_{EI}$ (mgmL <sup>-1</sup> )	$K_{ESI}$ (mgmL <sup>-1</sup> )
Lineweaver-Burk másodlagos egyenesek	408.86	9.672	1.510	0.122
Dixon másodlagos egyenesek	408.86	9.672	1.510	0.122

Az amilóz rossz oldékonysága nem tette lehetővé, hogy 0.5 és 5  $K_M$  közötti szubsztrát koncentrációkat alkalmazzunk, így a nem lineáris regressziót nem használhattuk a kinetikai paraméterek kiszámításakor.

A  $K_M$  értékek mgmL<sup>-1</sup> mértékegységben vannak feltüntetve, mivel az amilóz pontos molekulatömege nem adható meg, tekintve, hogy ez a szubsztrát különböző hosszúságú α-1,4 glikozidos kötéssel összekapcsolódó glükóz molekulákból felépülő láncokból áll.

A disszociációs konstansok értékei a gátlás unkompetitív jellegére utalnak. A tannin az amilóz hidrolízisekor sokkal gyengébb inhibitornak bizonyult a GalG<sub>2</sub>-CNP-n végzett vizsgálatok eredményeihez képest. A kompetitív tag esetén három, az unkompetitív tag esetén pedig egy nagyságrendnyi különbség látható, ami a

különböző szubsztrátok alkalmazásából adódik. Mivel a tannin molekulatömege sokkal inkább összevethető a rövid szubsztát molekulatömegével, így könnyebben kiszorítja a GalG<sub>2</sub>-CNP-t az aktív centrumból, mint a nagy molekulatömegű amilózt.



18. ábra: Egy feltételezett szerkezetű, hexagalloilezett kinasav inhibitor molekula lehetséges kötőmódja az EI komplexben.

Az 18. ábrán egy tannin komponens egy lehetséges kötőmódja látható, ha feltételezzük, hogy egy molekula hexagalloilezett kinasav molekula kapcsolódik a szabad enzim aktív centrumához [129].

A HSA aktív helye hét alhelyből áll és a katalitikus hely a (-1) és a (+1) alhelyek között helyezkedik el [130].

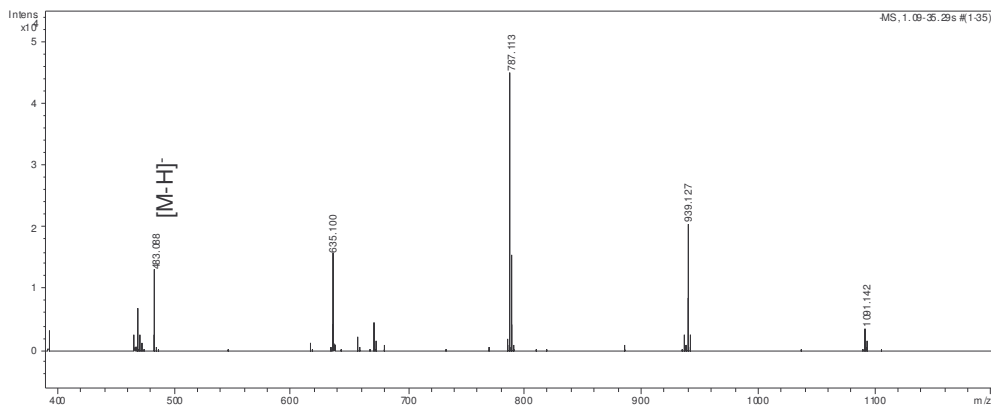
A nyál amiláizról készült röntgenkristallográfiás vizsgálatok alapján ismert, hogy a keményítő vagy maltooligoszacharid szubsztrátok képesek hozzákötődni az aktív hely árkához [131]. A galloilezett kinasav molekulák szintén rendelkeznek szabad OH csoportokkal, amelyek képesek hidrogén kötésekben részt venni. Továbbá a galluszsavak aromás gyűrűi stacking kölcsönhatást létesíthetnek a (-3)/(-2), (-1)/(+1) és (+2) alhelyek közelében lévő Trp59, Tyr62 és Tyr151 aromás

aminosavakkal [132]. Az előzőekben szemléltetett inhibitor szerkezete és a kötődés módja azonban csak feltételezés.

### III/3.2 Az aleppói tölgyből izolált tannin vizsgálata

Hasonlóképpen a kocsányos tölgy eredetű tanninhoz, az aleppói tölgyből származó tannin vizsgálatát is a szerkezet analízis elvégzésével kezdtük. A galluszsav mennyiségét a rodaninos módszerrel mértük a csersav kénsavas hidrolízise előtt és után. A szabad galluszsav koncentráció 3%, míg a teljes galluszsav mennyiség 70%-a a bemért tannin mennyiségének. A tanninok galluszsav mellett gyakran tartalmazhatnak ellagisavat is, ezért meghatároztuk az aleppói tölgy eredetű tannin ellagisav tartalmát is Hagerman és Wilson módszere [133] szerint. A mérést ellagisavra standardizáltuk. A kénsavas hidrolízis előtt a szabad ellagisav 2%-nak adódott, míg a hidrolízis után 7%-nyi teljes ellagisav tartalmat mértünk. Így fő tömegében ez a keverék is gallotannin.

Az aleppó tanninról negatív ion módban ESI MS analízis készült. A 19. ábrán látható a mérés során kapott spektrum. A spektrumon öt csúcs látható, amelyek molekulatömege 152 tömegegységgel különbözik egymástól, ami megfelel egy galloil-csoport tömegének.



19. ábra: Az aleppó tannin ESI MS spektruma.

A mérési adatok alapján a tannin poliol alapját a glükóz képző, amit 2-6 galluszsav észterez. A 403.088; 635.100; 787.113; 939.127; és 1091.142 Da-nál megjelenő csúcsok rendre a digalloil-, a trigalloil-, a tetragalloil-, a pentagalloil- és a hexagalloil-glükóz deprotonált  $[M-H]^-$  formájának felelnek meg.

Az irodalom szerint aleppói tölgy tannint tömegspektrometriával korábban még nem vizsgáltak, viszont különböző, a longánfa magjából [134] és a szentjánoskenyérfa gyümölcsének, a karobnak a rostjából [135] származó gallo- és ellagitanninokat azonosították már be ESI-MS illetve HPLC-ESI-MS módszerrel.

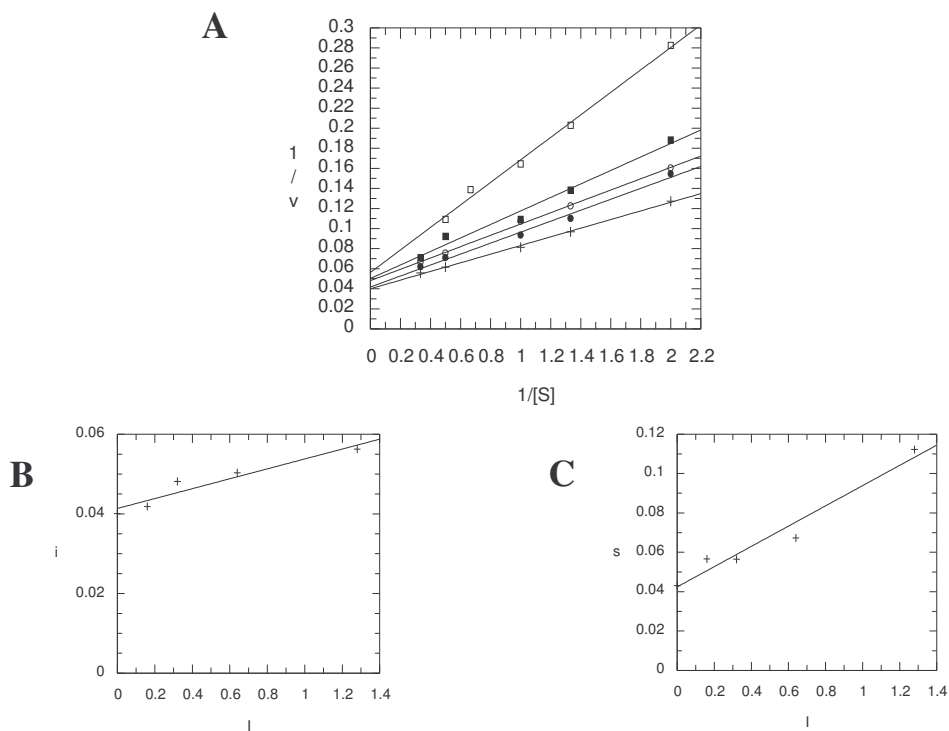
A szerkezeti analízis eredményei azt tükrözik, hogy az aleppó tannin egy gallotannin, ami galloilezett glükóz molekulákból áll és emellett 7%-nyi ellagisavat is tartalmaz.

A kinetikai mérésekhez GalG<sub>2</sub>-CNP és amilóz szubsztrátot használtunk. A rövid, kromoforral ellátott szubsztrátot 0.5-3 mM-os koncentráció tartományban alkalmaztuk. A kezdeti sebességet inhibitor nélkül és különböző inhibitor koncentrációknál mértük. A Lineweaver-Burk és Dixon ábrázolások alapján a gátlás kevert, nem kompetitív típusúnak adódott.

A másodlagos ábrázolások (20. B, C ábra) egyeneseket eredményeztek. Az első fokú függvény arra utal, hogy csak egy inhibitor molekula kötődik a szabad enzimhez vagy az enzim-szubsztrát komplexhez.

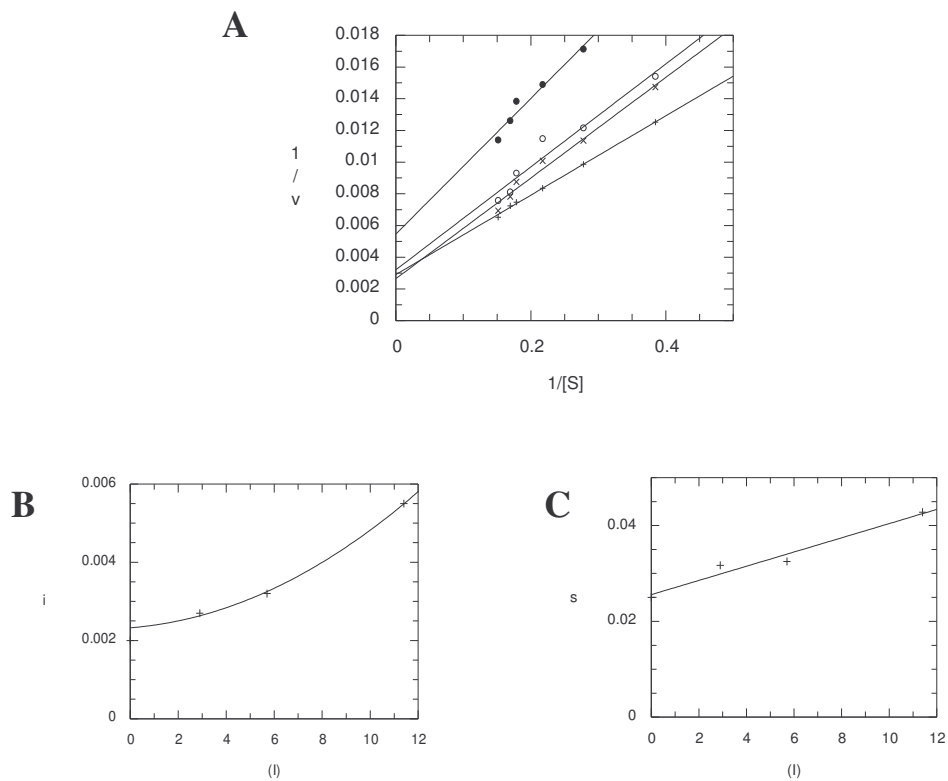
Az amilóz hidrolízisének elemzése (21. ábra) azonban eltérő eredményre vezetett. A gátlás kinetikája szintén kevert, nem kompetitív. Azonban az elsődleges egyenesek tengelymetszete, az inhibitor koncentráció függvényében ábrázolva parabolát adott.

Az eredményeket különböző szubsztrát koncentrációknál és adott inhibitor koncentrációk mellett kaptuk.



20. ábra: Lineweaver-Burk elsődleges (A) és másodlagos (B:  $i$  vs  $[I]$ , C:  $s$  vs  $[I]$ ) ábrázolás. S = GalG<sub>2</sub>-CNP,  $[S]$ = mM. I = aleppói tölgy tannin,  $[I]$ : +, 0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; ●, 0.16  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; ○, 0.32  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; ■, 0.64  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; □, 1.28  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .  $[1/v] = \text{min}\mu\text{M}^{-1}$ .

A másodfokú összefüggés a tengelymetszeteknek az inhibitor koncentráció függvényében való ábrázolásakor, arra utal, hogy az enzim-szubsztrát komplexhez két inhibitor molekula kötődik [128,136,137]. A meredekségeknek az inhibitor koncentráció függése azonban lineáris. Ez azt jelenti, hogy a szabad enzim molekulához csak egy molekula aleppói tölgy tannin kötődik.



21. ábra: Lineweaver-Burk ábrázolás. S = amilóz, [S]=mgmL<sup>-1</sup>. I= aleppó tannin. [I]: +, 0 μgmL<sup>-1</sup>; ×, 2.9 μgmL<sup>-1</sup>; ○, 5.7 μgmL<sup>-1</sup>; ●, 11.4 μgmL<sup>-1</sup>

A 8. táblázatban láthatók az aleppói tölgy tanninra vonatkozó kinetikai állandók.

8. táblázat: Az aleppói tölgy tannin disszociációs állandói.

Szubsztrát	K <sub>EI</sub> (μgmL <sup>-1</sup> )	K <sub>ESI</sub> (μgmL <sup>-1</sup> )	K <sub>ESI2</sub> (μgmL <sup>-1</sup> )
GalG <sub>2</sub> -CNP	0.8	3.3	-
amilóz	17.4	14.86	9.64

A GalG<sub>2</sub>-CNP szubsztrát esetén a K<sub>EI</sub> alacsonyabb értéke azt mutatja, hogy az EI komplex képződése kedvezőbb, mint az ESI komplexé, azaz a gátlás inkább

kompetitív jellegű. Az amilóz szubsztráton a  $K_{ESI}$  és a  $K_{ESI2}$  értéke összevethető a  $K_{EI}$  értékével, azaz az EI, az ESI és  $ESI_2$  komplexek azonos eséllyel alakulhatnak ki, így a gátlás határozottan kevert típusú.

A tanninokat gyakran használják nyákszerű poliszacharidok (pl.: az aloéban jelenlévő acetilezett polimannóz, a növények által termelt béta-glükánok és mikroorganizmusok által előállított poliglükánok) vizes kivonatból való extrakciójára, melynek alapját a tanninokkal bekövetkező komplexképzés adja [138]. Egyes poliszacharidok – különösen az amilóz – az irodalmi adatok szerint hidrofób árkokat tartalmazó másodlagos szerkezet kialakítására képesek, amelyek polifenolos vegyületekkel erős kölcsönhatásba léphetnek [139].

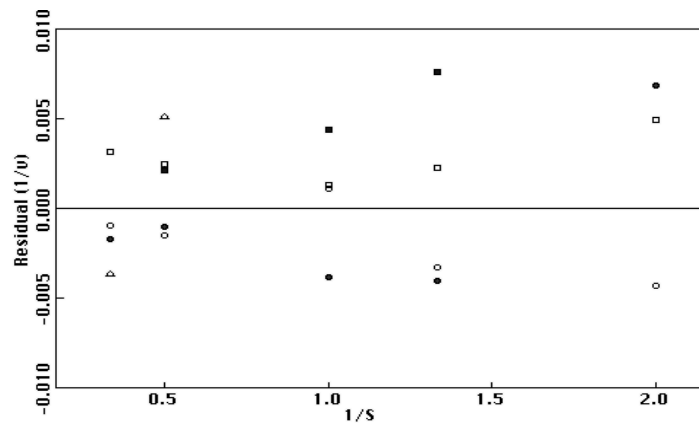
Eredményeink is azt mutatják, hogy az aleppói tölgy tannin képes hozzákötődni az amilóz szubsztráthoz. Feltételezzük, hogy nagy inhibitor koncentrációk esetén a szubsztrát és a tannin közötti kölcsönhatás sokkal kifejezettebb, mint kis inhibitor koncentrációknál. Így az ESI komplex koncentrációjának növekedésével az inhibíció típusa megváltozhat. Amilóz szubsztrát jelenlétében a Lineweaver-Burk ábrázolás egyenesei alacsony inhibitor szint esetén inkább kompetitív, míg nagy inhibitor koncentrációknál inkább unkompetitív gátlást mutatnak.

Az inhibitor kötődését jelentős mértékben befolyásolja a használt szubsztrát kémiai szerkezete. GalG<sub>2</sub>-CNP alkalmazásakor az inhibitor feltehetően az enzim aktív centrumához kötődik. Amilóz szubsztrát esetén azonban az inhibíció jellege teljesen megváltozik. Egy molekula inhibitor kötődik a szabad enzimhez és két molekula inhibitor az enzim-szubsztrát komplexhez. Valószínűleg az egyik tannin molekula az enzimhez, míg a másik az amilóz szubsztráthoz kötődik.

Az aleppói tölgy tannin jobb amiláz inhibitornak bizonyult a rövid, kromoforral ellátott szubsztráton, mint a hosszú láncú amilózon. A különbség szembetűnő, elsősorban a kompetitív konstans esetén, ami majdnem két nagyságrenddel nagyobb az amilóz szubsztráton. Az unkompetitív tagok közötti különbség már nem ilyen jelentős. A különböző méretű és kémiai szerkezetű szubsztrát okozhatja

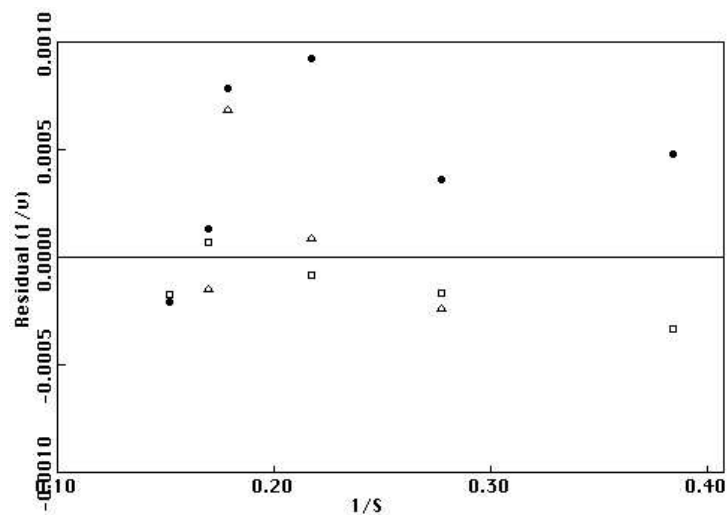
ezt az eltérést, melyet a tannin és az amilóz közötti kölcsönhatással magyarázhatunk.

Mindkét szubsztráton kivitelezett mérés esetén elvégeztünk egy hiba analízist, melynek célja a szisztematikus hiba kizárása volt. A vizsgálat a Lineweaver-Burk ábrázolás adatai alapján történt. A grafikonokon a mért értékek és a legjobban illeszkedő egyenes alapján kiszámított értékek különbségét ábrázoltuk a szubsztrát koncentráció reciprokának függvényében. A maradék ábrázolás annak felderítésére szolgál, hogy az illesztett egyenestől való eltérés szisztematikus hibának, vagy véletlenszerű szórásnak tudható-e be [140].



22. ábra: Maradékábrázolás a GalG<sub>2</sub>-CNP szubsztrát esetén különböző (□, 0 μg mL<sup>-1</sup>; ●, 0.16 μg mL<sup>-1</sup>; ○, 0.32 μg mL<sup>-1</sup>; △, 0.64 μg mL<sup>-1</sup>; ■, 1.28 μg mL<sup>-1</sup>) inhibitor koncentrációknál.

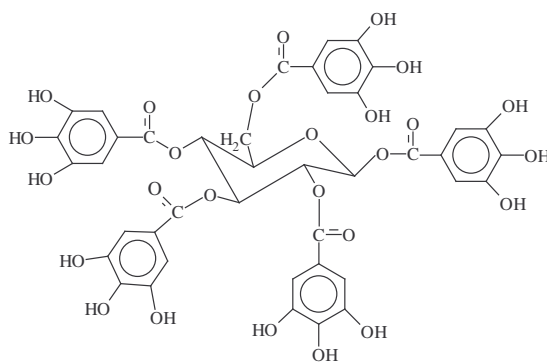
A 22. és 23. ábrán látható maradékábrázolásokon a pontok az abszcissa mentén egy párhuzamos sávban elszórtan helyezkednek el, ami azt jelenti, hogy a mért értékek standard deviációja ugyanaz. Így megállapítható, hogy az eltérések véletlen szórásból erednek, a szisztematikus hiba lehetőségét kizárhatjuk [140,141].



23. ábra: Maradékábrázolás az amiláz szubsztrát esetén különböző ( $\square$ ,  $0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ;  $\bullet$ ,  $2.9 \mu\text{g mL}^{-1}$ ;  $\circ$ ,  $5.7 \mu\text{g mL}^{-1}$ ;  $\Delta$ ,  $11.4 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) inhibitor koncentrációknál.

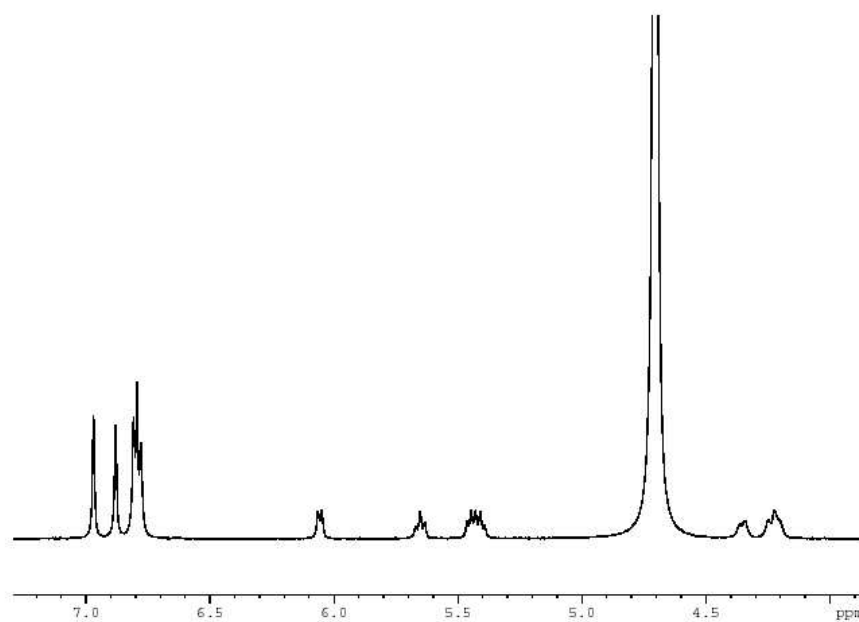
### III/3.3 A pentagalloil- $\beta$ -D-glükopiranoz ( $GG_5$ ) inhibitor hatása

A tanninok nyál amilázra kifejtett hatását végül a pentagalloil- $\beta$ -D-glükopiranozon, mint modell vegyületen vizsgáltuk. A vegyület szerkezetét a 24. ábra mutatja.



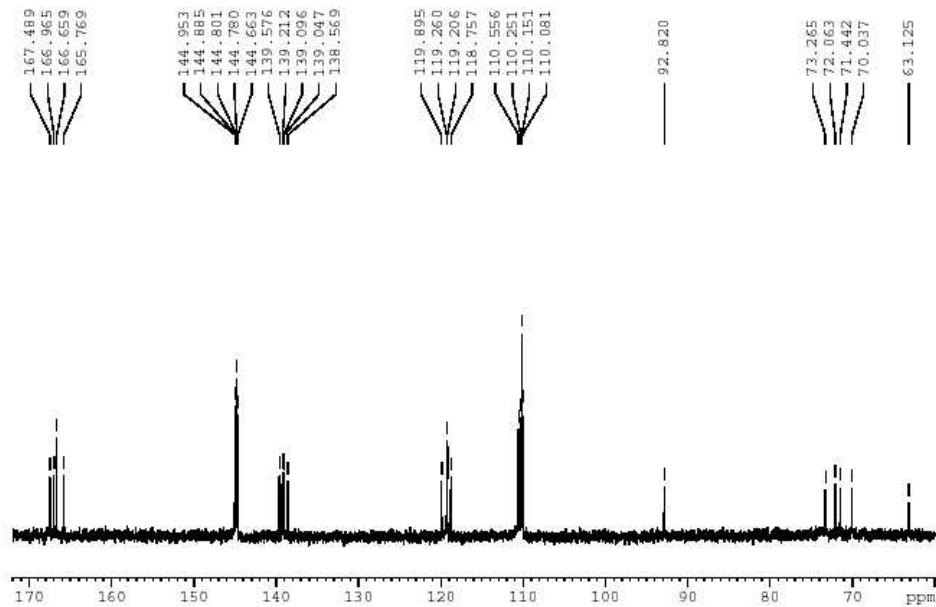
24. ábra: A pentagalloil- $\beta$ -D-glükopiranoz szerkezete.

A GGs<sub>5</sub> tisztaságát és szerkezetét az 500 MHz-en végzett egy-, és kétdimenziós (COSY, HSQC) NMR mérésekkel igazoltuk. A proton spektrum esetében (25. ábra) az összes vicinális proton-proton csatolás nagy értéke (7,6-9,1 Hz) a GGs<sub>5</sub> β anomer konfigurációját és <sup>4</sup>C<sub>1</sub> konformációját igazolja.



25.ábra: A pentagalloyl-β-D-glükopiranoz <sup>1</sup>H NMR spektruma.

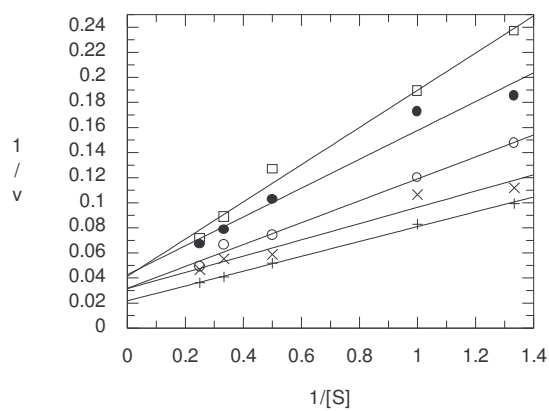
A konfiguráció hozzárendelését a C-1 anomer szén atom kémiai eltolódása (92.82 ppm) is megerősíti a <sup>13</sup>C spektrumon (26. ábra). Az egyes protonok rezonancia helyei (kémiai eltolódásai) a következők: H-2 5.44 ppm, H-3 5.65 ppm, H-4 5.41 ppm, H-5 4.22 ppm, H-6a 4.33 ppm, H-6b 4.23 ppm. A szén atomok kémiai eltolódása, az egyes jelek kémiai eltolódása: C-2 71.44 ppm, C-3 73.26 ppm, C-4 70.04 ppm, C-5 72.06 ppm, C-6 63.13 ppm.



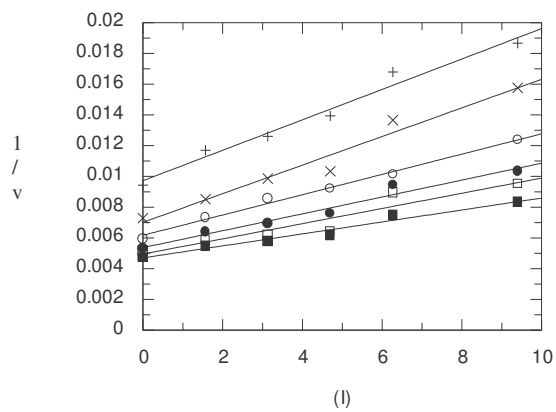
26. ábra: A pentagalloyl- $\beta$ -D-glükopiranoz  $^{13}\text{C}$  NMR spektruma.

A GGs<sub>5</sub> a kinetikai analízis során hatásos HSA inhibitornak bizonyult. A mérést a korábbiakban is használt mindkét szubsztráton elvégeztük. A GalG<sub>2</sub>-CNP szubsztrát esetén a szubsztrát koncentrációk 0.75-4 mM-os tartományba estek. A CNP felszabadulását inhibitor hiányában és különböző (1,764–4.704  $\mu\text{M}$ -os) inhibitor koncentrációk mellett követtük nyomon. Az amilóz szubsztráton végzett mérésekkor a szubsztrátot 2.6-6.6  $\text{mgmL}^{-1}$  koncentrációban alkalmaztuk, a pentagalloyl- $\beta$ -D-glükopiranoz mennyisége pedig a 1.5-9.4  $\mu\text{M}$  közötti tartományban változott.

Mindkét szubsztrát esetén elvégeztük a Lineweaver-Burk és a Dixon-féle elsődleges (26. és 27. ábra) és másodlagos ábrázolásokat is. A gátlás típusa minden esetben kevert, nem kompetitívnek adódott.



27. ábra: Lineweaver-Burk elsődleges ábrázolás. S = GalG<sub>2</sub>-CNP, [S] = mM. I = pentagalloil-β-D-glükopiranoz, [I]: +, 0 μM; x, 1.76 μM; o, 2.35 μM; •, 3.53 μM; □, 4.70 μM. [1/v] = minμM<sup>-1</sup>.



28. ábra: Dixon-féle elsődleges ábrázolás. S = amiloz, [S] = ■, 2.6 mgmL<sup>-1</sup>; □, 3.6 mgmL<sup>-1</sup>; •, 4.6 mgmL<sup>-1</sup>; o, 5.6 mgmL<sup>-1</sup>; x, 5.9 mgmL<sup>-1</sup>; +, 6.6 mgmL<sup>-1</sup>. I = pentagalloil-β-D-glükopiranoz, [I] = μM

9. táblázat: A pentagalloyl- $\beta$ -D-glükopiranozra vonatkozó disszociációs állandók.

Számítás módja	GalG <sub>2</sub> -CNP		Amilóz	
	K <sub>EI</sub> ( $\mu$ M)	K <sub>ESI</sub> ( $\mu$ M)	K <sub>EI</sub> ( $\mu$ M)	K <sub>ESI</sub> ( $\mu$ M)
Lineweaver-Burk-féle ábrázolás	2.35	5.02	8.15	14
Dixon-féle ábrázolás	2.338	4.89	8.077	15

A 9. táblázat adatait a Lineweaver-Burk és Dixon ábrázolások másodlagos egyenesei alapján számítottuk. Látható, hogy az amilóz szubsztrát esetén a GG<sub>S5</sub> rosszabb inhibitornak bizonyult. Mindkét szubsztrát esetén a K<sub>EI</sub> disszociációs konstans értéke a kisebb, azaz az inhibitor kedvezményezetten kötődik a szabad enzimhez, míg az enzim-szubsztrát komplex felé kisebb affinitást mutat. A gátlásban tehát inkább a kompetitív jelleg dominál.

#### III/3.4. A tannin inhibitorokkal kapcsolatos eredményeink összefoglalása

Mind a kocsányos, mind az aleppói tölgy eredetű tanninok és a GG<sub>S5</sub> kinetikai analízisét is elvégeztük. A mérések eredményeit az 10. táblázatban összegeztem, amelyben az inhibitor hatékonyság megítélésének elősegítése céljából az akarbóz kinetikai állandóit is feltüntettem.

Mint az adatokból jól látható a rövid szubsztráton mindkét tannin és a GG<sub>S5</sub> is jobb inhibitornak bizonyult, mint az amilózon. A keverék tanninok esetén legalább két nagyságrendnyi különbség van a K<sub>EI</sub> és körülbelül egy nagyságrend eltérés van a K<sub>ESI</sub> értékek között a két szubsztrátot tekintve.

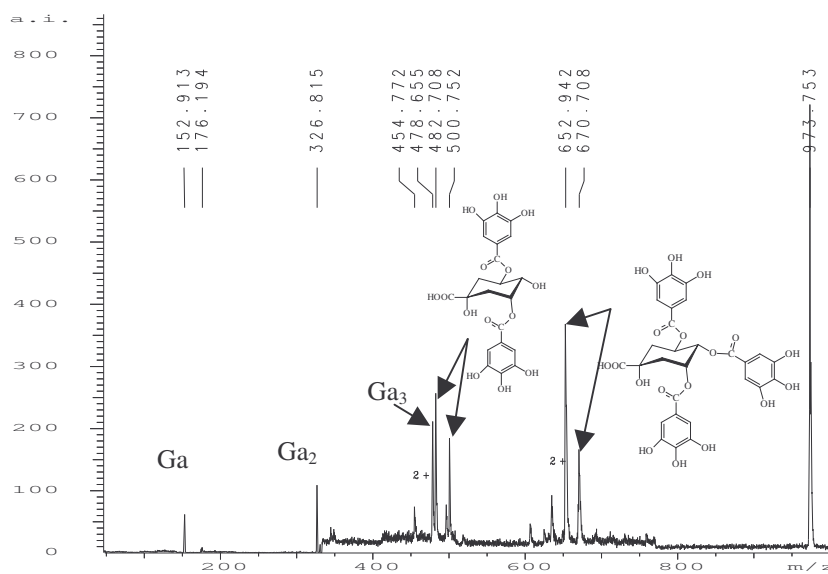
Ennek oka a szubsztrátok jellemzőiben található, ugyanis a GalG<sub>2</sub>-CNP az amilózhoz viszonyítva rosszabb szubsztrátja a HSA-nak, amit a számított K<sub>M</sub> értékek is jól tükröznek: GalG<sub>2</sub>-CNP: 1.29 mM, amilóz: 9.672 mg/ml = 0.096-0.0096 mM. (Az amilóz K<sub>M</sub> értékének mM-ba való átszámításakor egy irodalmi, 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> Da-os molekulatömeg tartományt vettem alapul [142].) A GG<sub>S5</sub> inhibitor

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

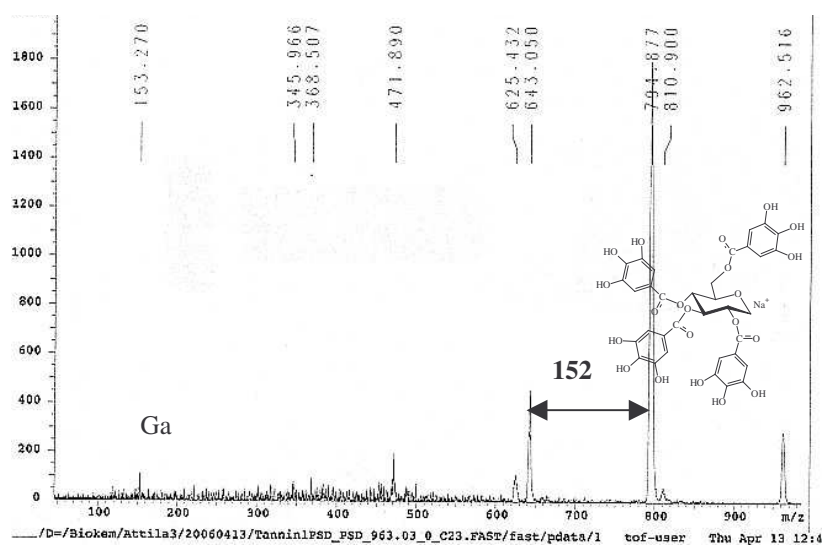
10. Táblázat: A vizsgált tanninokra vonatkozó disszociációs állandók.

Inhibitor	GalG <sub>2</sub> -CNP			Amilóz			
	K <sub>EI</sub>	K <sub>ESI</sub>	inhibíció	K <sub>EI</sub>	K <sub>ESI</sub>	K <sub>ESI2</sub>	inhibíció
kocsányos tölgy tannin	8.27 μg/ml	45 μg/ml	k., nk.	1510.56 μg/ml	121.8 μg/ml	-	k., nk.
aleppói tölgy eredetű tannin	0.82 μg/ml	3.32 μg/ml	k., nk.	17.4 μg/ml	14.86 μg/ml	9.64 μg/ml	k., nk.
GGs <sub>5</sub>	2.35 μM	5.02 μM	k., nk.	8.15 μM	14 μM	-	k., nk.
	2.209 μg/ml	4.718 μg/ml		7.66 μg/ml	13.16 μg/ml		
akarbóz	0.7 μM	0.1 μM	k., nk.	3.7 μM	1.08 μM	-	k., n.k.
	0.452 μg/ml	0.0646 μg/ml		2.389 μg/ml	0.697 μg/ml		

Az aleppói tölgy tannin esetén a két szubsztrát közötti különbség abban is megnyilvánul, hogy a GalG<sub>2</sub>-CNP-n első, az amilózon pedig másodrendű kinetikát tapasztaltunk. Ez nagy valószínűséggel, azzal magyarázható, hogy a tannin képes hozzákötődni az amilóz szubsztráthoz, így nemcsak az ESI, hanem az ESI<sub>2</sub> komplex is létrejöhet, azaz az inhibitor nem csak az enzimhez, hanem a szubsztráthoz is hozzákötődik. A másodrendű kinetikát a kocsányos tölgy eredetű tannin esetében nem tapasztaltuk. Hogy ezt a jelenséget megmagyarázzuk, további vizsgálatokat végeztünk el a tanninok szerkezetének még pontosabb felderítésére. Ennek érdekében MALDI-TOF MS PSD mérések készültek mindkét tannin egy-egy komponenséről.



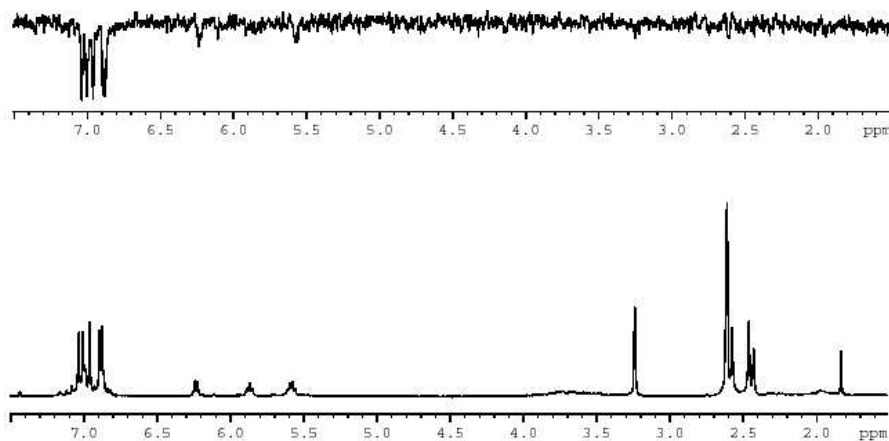
29.A. ábra: A kocsányos tölgy egyik komponenséről, a pentagalloil-kínasavról készült MALDI-TOF MS PSD spektrum.



29. B. ábra: Az aleppói tölgy egyik komponenséről a pentagalloil-glükóizról készült MALDI-TOF MS PSD spektrum.

A PSD vizsgálatokból kiderült, hogy a két tannin egymástól nem csak a központi poliol minőségében különbözik, amit az enzim gátlás szempontjából gyakorlatilag jelentéktelennek gondolunk. Feltételeztük, hogy az enzimmel való kölcsönhatás kialakításáért a poliolhoz kapcsolódó galluszsavak a felelősek. A mérések feltárták, hogy a két tannin esetén a galluszsavak elrendeződése jelentősen különbözik. A kocsányos tölgy eredetű tannin inkább elnyújtott szerkezetű, amiben főleg galluszsav trimer, dimer és kisebb mennyiségben monomer egységek kötődnek a kinasav poliolhoz. Az aleppói tölgy tannin inkább egy kompakt struktúrát képvisel, amelyben a központi glükóz poliolt galluszsav monomerek (esetleg dimerek) veszik körül. A szerkezetbeli különbségek nyilvánvalóan okozhatják a kinetikai eltéréseket.

A tanninok HSA-hoz való kötődésének jobb megértése érdekében felkértük Dr. Batta Gyulát, hogy telítési átvitel differencia (Saturation Transfer Difference, STD) NMR technikával vizsgálja meg a GG<sub>S5</sub> – nyál amiláz kölcsönhatást. Az STD NMR méréseket széles körben alkalmazzák protein és valamilyen ligand összekötődésének vizsgálatára [143, 144].

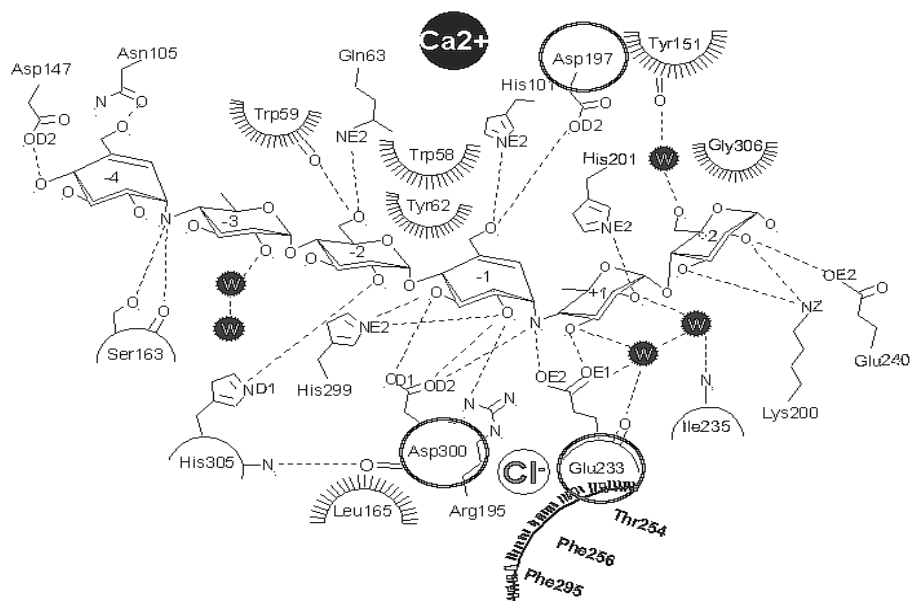


30. ábra: A GG<sub>S5</sub> STD differencia és <sup>1</sup>H spektruma.

Választásunk azért a GG<sub>S5</sub>-ra esett, mert ez tiszta, jól definiált szerkezetű, az egyik tannin komponense, s így jó modell vegyület lehet az inhibitor enzim kölcsönhatások tanulmányozása szempontjából.

Az STD NMR vizsgálatok D<sub>2</sub>O/CD<sub>3</sub>OD (5:1) oldatban történtek 100 μM HSA és 1-2 mM GG<sub>S5</sub> jelenlétében. A proton jeleit –1 ppm-nél szelektíven besugározva (azaz telítve) az STD spektrumban mind az öt aromás csoporthoz rendelhető jeleket azonosítottuk. A ligandumra nézve töményebb oldatban és 5%-nyi DMSO-d<sub>6</sub> hozzáadása után az öt aromás proton jelei mellett, az anomer protonon is észleltünk gyenge STD hatást.

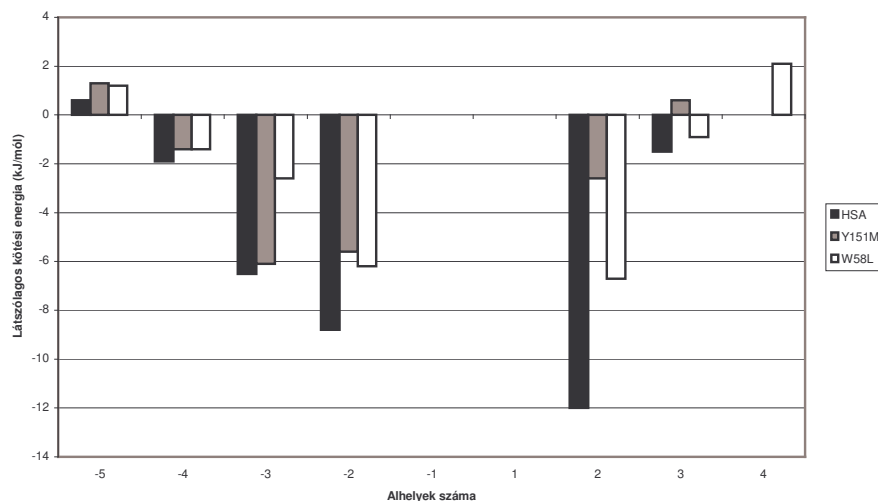
Míndezek alapján arra következtethetünk, hogy a GG<sub>S5</sub> hozzákötődik a HSA-hoz, ezen belül szívesen alakít ki kölcsönhatást a fehérje hidrofób régióival. A HSA aktív helyéről való ismereteink alapján feltételezhető, hogy a (-3)/(-2), a (-1)/(+1) és a (+2) alhelyek közelében lévő Trp59, Tyr62 és Tyr151 aromás aminosavak a galluszsavak aromás gyűrűivel stacking kölcsönhatást létesítenek.



31. ábra: A katalitikus és nevezetes aromás aminosavak elhelyezkedése a HSA-ban ■ inhibitor jelenlétében.

Valószínű, hogy a fehérje és az inhibitor között H-hidak is kialakulnak, de a STD mérés alapján erre vonatkozó információkat nem lehet levonni, mivel a galluszsav hidroxil-csoportjaiban lévő hidrogének az adott kísérleti körülmények között mind deutériumra cserélődnek. Ezek alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az aleppói tölgy tannin kompakt szerkezete valószínűleg kedvezőbb a HSA-val való kapcsolat létesítése szempontjából, mint az elnyújtott alakú kocsányos tölgy tannin komponenseké.

Hogy a gátlás kialakulásáról még több információt szerezzünk a humán nyálamiláz enzim mutánsaival végeztünk inhibíciós vizsgálatot pentagalloil- $\beta$ -D-glükopiranoz jelenlétében. A mutáció során az egyik enzimmél a vad típusú HSA (-2) helyénél elhelyezkedő Trp58-at helyettesítették Leu-al [145], míg a másiknál a (+2) helyénél található Tyr151-es aminosavat cserélték le Met-ra [132]. Mint láthatjuk mindkét esetben aromás aminosavat helyettesítettek egy apoláros, illetve egy kevésbé poláros, töltéssel nem rendelkező aminosavval, ami az alhelyek által kialakítható kötések típusát teljesen megváltoztatja. A változások az enzim alhelytérképét is érintik, mint ahogy a 31. ábrán látható.



32. ábra: A vad típusú amiláz, az Y151M és a W58L mutáns összehasonlító alhelytérképe.

Mindkét mutáns esetén az összes alhely energia értéke lecsökkent a vad típusú enzimhez képest. A legfeltűnőbb csökkenés mindkét esetben a mutáció helyénél látható: az Y151M mutánsnál a (+2) alhelyen, az W58L mutánsnál pedig a (-3) alhelyen [130, 146].

Az aromás csoportok hiányában az enzim a mutációval átalakított helyeken stacking kölcsönhatások kialakítására nem képes [146].

11. tábl.: Mutáció befolyása a HSA működésére.

Enzim	Aminosavak és pozíciójuk	Kötés energiája (kJ/mol)	összes energia (kJ/mol)	Gátlás %
vad típusú HSA	Tyr151 (+2) Trp58 (-2)	-12,0 -8,8	30,7	50%
mutáns 1	W58L (-2)	-6,2	18,0	7,9%
mutáns 2	Y151M (+2)	-2,6	15,7	2,8%

A 11. táblázatban látható, hogy mindkét mutáns enzim esetén csökkent gátlást tapasztaltunk. Ez bizonyítja, hogy a (-2) és (+2) alhelyeken található aromás aminosavak milyen fontos szerepet töltenek be a GG<sub>5</sub> megkötésében. Ez is alátámasztja az STD vizsgálatok eredményét, miszerint az inhibitor és az enzim kapcsolata a galluszsavak és az aromás aminosavak közötti stacking kölcsönhatáson alapul. A (-2) alhelynél található még két aromás aminosav, a Trp59 és a Tyr62, amelyek szintén alkalmas partnerek lehetnek a stacking kölcsönhatások kialakításában, bár ezt a feltételezést erre vonatkozó mérési eredményekkel, a megfelelő mutáns enzimek hiányában nem tudjuk alátámasztani.

A két tannin közül az aleppói tölgy tannin bizonyult jobb inhibitornak mindkét szubsztrát esetén, amit szintén a galluszsavak elrendeződésében lévő különbségekkel magyarázunk. A K<sub>EI</sub> értékeket tekintve az aleppói tölgy tannin mind a GalG<sub>2</sub>-CNP, mind az amilóz szubsztráton két nagyságrenddel kisebb értékeket mutat, mint a tölgy tannin.

A GG<sub>5</sub> nagyjából olyan hatásos inhibitora a HSA-nak, mint az aleppói tölgy tannin, ami nem meglepő eredmény, tekintve, hogy a GG<sub>5</sub> az aleppói tölgy tannin egyik komponense. Meg kell említenünk, hogy a kompetitív tagok között kb. kétszeres különbség van az aleppói tölgy tannin javára. Ennek oka az lehet, hogy ez az inhibitor egy keverék, ami hexagalloil-glükózt is tartalmaz, ami valószínűleg jobb inhibitor a GG<sub>5</sub>-nél. A több galluszsav jelenléte miatt több kölcsönhatást tudnak kialakítani, s ezáltal erősebben kötődnek az enzimhez, mint a GG<sub>5</sub>.

Az inhibíció típusa minden esetben kevert, nem kompetitív. A kocsányos tölgy tannin esetén az amilóz szubsztráton a kompetitív tag értéke a nagyobb, azaz az inhibitor szívesebben kötődik az enzim-szubsztrát komplexhez, mint a szabad enzimhez. Ez a különbség annyira kifejezett, hogy az ábrázolás képe teljesen unkompetitív jelleget mutat. A GalG<sub>2</sub>-CNP szubsztráton az unkompetitív tag lett a nagyobb. A GG<sub>5</sub> disszociációs állandói közül mindkét szubsztráton az unkompetitív tag bizonyult nagyobbak, ebből következően a gátlás típusa inkább kompetitív. A GG<sub>5</sub> tehát szívesebben kötődik a szabad enzimhez, mint az enzim-szubsztrát komplexhez. Az aleppói tölgy tannin a rövid szubsztráton inkább kompetitív jelleget mutat, az amilózon pedig a korábban már taglalt másodrendű kinetikát tapasztaltuk.

A rövid szubsztrát esetén mindegyik tannin és a GG<sub>5</sub> is inkább kompetitív jellegű gátlást mutat. Az amilóz szubsztráton az inhibíciók jellege azonban változó. Ezt azzal magyarázzuk, hogy az amilóz esetén a szubsztrát és az inhibitor közötti kölcsönhatások is befolyásolják a gátlást, míg ezzel a GalG<sub>2</sub>-CNP szubsztrát használatakor nem kell számolni.

Az aleppói tölgy tannin a GalG<sub>2</sub>-CNP szubsztráton nem sokkal marad el az akarbóz inhibitor hatásától. A kocsányos tölgy tannin és a GG<sub>5</sub> kb. egy nagyságrenddel rosszabb inhibitor, mint az akarbóz. Amilóz szubsztráton a kocsányos tölgy tannin sokkal rosszabb inhibitornak bizonyult, az aleppói tölgy tannin és a GG<sub>5</sub> viszont körülbelül csak egy nagyságrenddel rosszabb hatékonyságú, mint az akarbóz.

Az inhibíciós hatás könnyebb áttekinthetősége céljából feltüntettem a tannin inhibitorok IC<sub>50</sub> értékeit a GalG<sub>2</sub>-CNP szubsztrát esetén.

12.táblázat: A tannin HSA inhibitorok IC<sub>50</sub> értékei a GalG<sub>2</sub>-CNP szubsztrát esetén.

inhibitor	IC <sub>50</sub>	
	( $\mu\text{M}$ )	( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
kocsányos tölgy tannin	-	23.69
aleppói tölgy tannin	-	1.175
GG <sub>s5</sub>	4.54	4.27
akarbóz	0.86	0.56

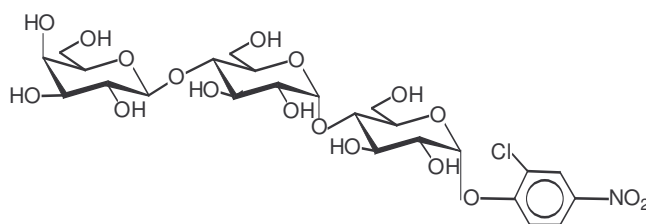
Az eredmények egyértelműen mutatják, hogy az aleppói tölgy tannin a legjobb, a kocsányos tölgy tannin pedig a legkevésbé jó inhibitor a rövid szubsztráton. A GG<sub>s5</sub> inhibíciós hatása megközelíti az aleppó tanninét, de az akarbóz gátló hatását egyik tannin sem éri el.

## IV. KÍSÉRLETI RÉSZ

### IV/1. Felhasznált anyagok

#### IV/1.1. Szubsztrátok

A kinetikai vizsgálatokat két különböző szubsztrát felhasználásával végeztük el. A szintetikus, kromoforral ellátott, rövid 2-klór-4-nitrofenil-4-O- $\beta$ -D-galaktopiranozil- $\alpha$ -D-maltozid (GalG<sub>2</sub>-CNP) szubsztrátot a SORACHIM S.A., míg a természetes amilóz szubsztrátot a GENAY cégtől vásároltuk. A GalG<sub>2</sub>-CNP szerkezetét a 33. ábra mutatja.



32. ábra: A GalG<sub>2</sub>-CNP szerkezete.

Ezen szubsztrát alkalmazásakor nincs szükség segédenzimekre a kromofor felszabadításához, mivel az enzimreakció során csak az aglikon hasad le, amely két termék, a  $\beta$ -D-galaktopiranozil-maltóz és a 2-klór-4-nitrofenol (CNP) létrejöttét eredményezi. Más termékek nem keletkeznek.

#### IV/1.2. Enzim

A humán nyálból származó, IXA típusú  $\alpha$ -amilázt (EC 3.2.1.1) a SIGMA-tól szereztük be. Az enzim nátrium-dodecilszulfát-poliakrilamid gél elektroforézis

(SDS-PAGE) során egyetlen sávot eredményezett,  $\alpha$ - és  $\beta$ -glikozidáz aktivitást nem mutatott.

A vad típusú HSA-t és pontmutációval előállított mutánsait, a Y151M-et és a W58L enzimet Narayanan Ramasubbu és munkatársai készítették (Department of Oral Biology, New Jersey Dental School, University of Medicine and Dentistry, Newark, NS 07103, USA).

#### *IV/1.3. Inhibitorok*

Kinetikai méréseink során számos nyál amiláz inhibitorot használtunk. A glükál oligoszacharid keverék Dr. Herczegh Pál laboratóriumában készült (Gyógyszerési Kémia Tanszék, Debreceni Egyetem). A glükopiranozilidén-spiro-tiohidantoint (GTH) Dr. Somsák László és munkatársai állították elő (Szerves Kémia Tanszék, Debreceni Egyetem). A PTS-GTH szintézisét Dr. Remenyik Judit oldotta meg enzimatis transzglykozilezés révén BSMA enzim felhasználásával, akarbóz donor és GTH akceptor jelenlétében (Biokémiai Tanszék, Debreceni Egyetem). A búzamazgából származó, I. típusú  $\alpha$ -amiláz inhibitor fehérjét, a 0,28-inhibitor a SIGMA-tól szereztük be csakúgy, mint a kocsányos tölgy eredetű tannint. Az aleppói tölgy gubacsából izolált tannint Natale Vittori vegyészmérnök (Biotechnology Services and Consulting Inc., Coppel, TX 75019, USA) kérésére analizáltuk és tanulmányoztuk. A pentagalloil- $\beta$ -D-glükopiranozt Ann E. Hagerman (Department of Chemistry and Biochemistry, Miami University, Oxford, OH 45056, USA) kereskedelmi forgalomban kapható tanninból izolálta acetát pufferben való metanolízissel [72]. A természetes eredetű és szintetikus előállított inhibitorok szerkezetét MALDI-TOF MS, ESI MS, NMR, a tannin keverékek esetében pedig galluszsav és ellagisav meghatározással is bizonyítottuk.

## IV/2. Alkalmazott módszerek

### IV/2.1. Galluszsav meghatározás

A galluszsav mennyiségét Hagerman és Inoue módszerével [126] határoztuk meg. 5 mg tannin mintát 5 mL 1M-os  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -ban oldottunk fel. Az oldatot ampullákba pipettáztuk, majd lefagyasztottuk. Az ampullákat vákuum alatt leforrasztottuk, majd 24 órán át  $100^\circ\text{C}$ -os szárítószekrénybe helyeztük. Az ampullákat lehűtöttük, kinyitottuk, tartalmukat desztillált vízzel tízszeres térfogatra hígítottuk. 200  $\mu\text{L}$  hígított mintát összekevertünk 300  $\mu\text{L}$  0.667 w/v%-os, frissen elkészített rodanin metanolos oldatával. 5 perc eltelte után 200  $\mu\text{L}$  0.5M-os KOH oldatot adtunk a reakcióelegyhez, amit 2,5 perc múlva 5 mL-re hígítottunk desztillált vízzel. 5-10 perc várakozás után 520 nm-en mértük az elegyek abszorbanciáját.

A meghatározás alapja az, hogy a rodanin a galluszsav vicinális OH csoportjaival vörös színű komplexet képez, amely 520 nm-nél mutat maximális abszorbanciát. Az el nem reagált rodanin bázikus körülmények között 412 nm-nél mutat maximális abszorbanciát, viszont 450 nm-nél nagyobb hullámhossznál nincs elnyelése. A vörös színű komplex kizárólag csak szabad galluszsavból képződik, galluszsav észterekből, ellagisavból és más, a kivonatban jelen lévő fenolos anyagokból nem [147]. Standardként galluszsavat használtunk, a kísérleteket három párhuzamos, független méréssel ismételtük meg. A mért abszorbancia a következő lineáris összefüggésnek felel meg:  $A_{520} = [0.1562 \times \text{galluszsav mennyiség } (\mu\text{gmL}^{-1})]$ .

### IV/2.2. Ellagisav meghatározás

Az ellagisav mennyiségét a Bate-Smith által kidolgozott [148]  $\text{NaNO}_2$ -es módszer, Hagerman és Wilson [133] által továbbfejlesztett változatával határoztuk

meg. 10 mg tannin mintát 1 mL 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-ban oldottunk. Az oldatokat ampullákba töltöttük és lefagyasztottuk. Az ampullákat vákuum alatt leforrasztottuk, majd 24 órára 100 °C-os szárítószekrénybe helyeztük. Az ampullákat lehűtés után kinyitottuk. A leszűrt oldatokat piridinnel 10 mL-re hígítottuk. 1 mL hígított mintát 1 mL piridinnel kevertünk össze, majd 0,1 mL 1 w/v%-os NaNO<sub>2</sub> vizes oldatával elegyítettük, és a reakcióelegy abszorbanciáját 538 nm-en mértük. 36 perces, 30 °C-on végzett inkubáció után az abszorbanciát újra lemértük.

Az ellagisav meghatározásra szolgáló fotometriás módszer azon alapul, hogy az ellagisav nitrozált származéka vörös kinon-oximot képez.

A szín 30 °C-on fejlődik ki piridin, NaNO<sub>2</sub> és HCl katalizátor jelenlétében. A módszer igen szelektív, csak a szabad ellagisav ad pozitív reakciót, a galluszsav, ellagisav észterek, proantocianidinek és flavonoidok nem. A nulla időpontban illetve a 36 perces inkubálás után lemerített abszorbanciák különbsége ( $\Delta A_{538}$ ) arányos az ellagisav koncentrációval. A mért abszorbancia különbség a következő lineáris összefüggésnek felel meg:  $\Delta A_{538} = [0.03 \times \text{ellagisav mennyiség (mgmL}^{-1})] - 0.04$ .

#### *IV/2.3. MALDI-TOF MS analízis*

A kocsányos tölgy eredetű tannin MALDI-TOF MS analízisét pozitív ion módban végeztük Burker Biflex III. MALDI-TOF tömegspektrométerrel. A minta molekulák deszorpcióját/ionizációját 337 nm-es lézerrel váltottuk ki. A spektrumot több (legalább 100) lézerlövés után való összegzéssel kaptuk 19 kV gyorsító és 20 kV reflektoron feszültség mellett. Külső kalibrációt alkalmaztunk, melyhez a 6-8 polimerizációs fokú ciklodextrinek  $[M+Na]^+$  m/z: 995, m/z: 1157 és m/z: 1319 Da csúcsait használtuk fel. A spektrum 2,5-dihidroxi-benzoésav (DHB) mátrixszal, „dry-droplet” módszerrel készült.

#### *IV/2.4. MALDI-TOF MS PSD analízis*

A mérések mindkét tannin esetén a MALDI-TOF MS analízis részben leírt körülmények között zajlottak, 200-400 ns „delay extraction” alkalmazásával.

#### *IV/2.5. ESI MS analízis*

Az elektropray analízist negatív ion módban végeztük Burker microTOF-Q tömegspektrométerrel. A műszer beállítási paraméterei a következők voltak. Tömeg tartomány: 50-3000 m/z, szárító gáz: N<sub>2</sub>, szárító hőmérséklet: 150 °C, reflektoron feszültség: 13000 V, detektor feszültség: 1920 V. A minta oldatot 0.1 mgmL<sup>-1</sup> koncentrációban 1:1 MeOH:H<sub>2</sub>O oldószerrel készítettük el, 2 µLmin<sup>-1</sup> áramlási sebességgel fecskendeztük a készülékbe. A külső kalibráció nárium-trifluoracetát klaszter ionok [M-H<sup>+</sup>] csúcsainak segítségével történt a 200-1200 Da-os tömeg tartományban.

#### *IV/2.6. <sup>1</sup>H és <sup>13</sup>C NMR analízis*

A <sup>1</sup>H (500.13 MHz) és <sup>13</sup>C (125.76 MHz) NMR spektrumokat Burker DRX-500 spektrométerrel vették fel. A kémiai eltolódásokat a külső kalibrációra használt TMS-hoz képest számították. A tölgy eredetű tanninról készült spektrumot D<sub>2</sub>O-ben, a GG<sub>5</sub>-ről D<sub>2</sub>O:MeOD elegyben vették fel. A telítési transzfer differencia (STD) mérést 500 MHz-es proton frekvenciával, 300 °K hőmérsékleten, D<sub>2</sub>O/MeOD elegyben végezték szintén Bruker DRX-500 spektrométerrel.

#### *IV/2.7. Kinetikai mérések GalG<sub>2</sub>-CNP szubsztráton*

A rövid, kromoforral ellátott szubsztráton való méréseket 37 °C-on, pH 6, 5 mM Ca(OAc)<sub>2</sub>-ot, 51.5 mM NaCl-ot és 152 mM NaN<sub>3</sub>-ot tartalmazó, 50 mM-os

MES-pufferben végeztük. A szubsztrátot (0.5-3 mM) és az inhibitorot összekevertük, a reakciót pedig a HSA (2 nM) inkubációs elegyhez való hozzáadásával indítottuk. Az reakcióelegy össztérfogata minden esetben 500  $\mu$ L volt. A HSA által felszabadított CNP által okozott abszorbancia növekedést Jasco V550 spektrofotométer Paralell Kinetics Analysis programjával követtük nyomon folyamatosan 405 nm-nél. A kezdeti sebességet a kinetikai görbék lineáris szakasza alapján számítottuk. Minden mérést háromszor-négyszer ismételtünk.

#### *IV/2.8. Kinetikai mérések amilóz szubsztráton*

Amilóz szubsztrát esetén a kinetikai méréseket 37 °C-on, 48.6 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-ot, 38.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-ot és 50 mM NaCl-ot tartalmazó, pH 7 foszfát pufferben végeztük. A szubsztrátot (2.6-6.6 mgmL<sup>-1</sup>) és az inhibitorot összekevertük, majd a reakciót a HSA (6.5 nM) hozzáadásával indítottuk. A reakcióelegy össztérfogata minden esetben 150  $\mu$ L volt. 10 perces reakcióidő letelte után a reakciót 1 mL dinitro-szalicilsav (DNS) reagens (1% 3,5-dinitro-szalicilsav, 0,2% fenol, 0,1% Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, 1% NaOH vizes oldatban) hozzáadásával állítottuk le. Az elegyet foszfát pufferrel 2 mL-re egészítettük ki. A lefedett kémcsöveket 15 percen át 100 °C-on főztük, míg a várt sárgás-barna szín meg nem jelent. Ezután 300  $\mu$ L 40%-os kálium-nátrium-tartarát (Rochelle só) oldatot adtunk a reakcióelegyhez a szín stabilizálásának érdekében. A csöveket hideg vizes fürdőben lehűtöttük, majd a Jasco V550 spektrofotométer Fixed Wavelength Measurement programja segítségével 540 nm-nél mértük az abszorbanciát.

#### *IV/2.9. Statisztikai analízis*

A kinetikai paramétereket a Lineweaver-Burk, Dixon és a GalG<sub>2</sub>-CNP szubsztrát esetén nem lineáris regresszióval is meghatároztuk a Grafit, enzim-kinetikai program (2.1 verzió, Erithacus Software) segítségével. Az inhibíció típusát

a Lineweaver-Burk egyenesek és az ezek alapján ábrázolt másodlagos egyenesekből (a meredekség illetve a tengelymetszet *vs* inhibitor koncentráció grafikonok egyeneseiből) állapítottuk meg.

A kinetikai analízis általános egyenlete a következő:

$$v_0 = \frac{v_{\max} [S]}{K_M \left( 1 + \frac{1}{K_{EI}} [I] \right) + [S] \left( 1 + \frac{1}{K_{ESI}} [I] \right)} \quad (1)$$

Mivel az aleppói tannin esetén a Lineweaver-Burk ábrázolás tengelymetszeteinek az inhibitor koncentráció függvényében való ábrázolásakor másodrendű kinetikát tapasztaltunk az alapegyenlet a következőképpen módosul:

$$v_0 = \frac{v_{\max} [S]}{K_M \left( 1 + \frac{[I]}{K_{EI}} \right) + [S] \left( 1 + \frac{[I]}{K_{ESI}} + \frac{[I]^2}{K_{ESI} K_{ESI_2}} \right)} \quad (2)$$

Az (1) egyenletet alkalmaztuk a Grafit program teljes, nem kompetitív és kevert (Duggleby) modelljének nem lineáris regresszióra való felhasználásakor és az inhibíciós konstansok kiszámítására mindkét másodlagos ábrázolás során.

A Lineweaver-Burk ábrázolás másodlagos egyeneseinek egyenletei:

$$s = \frac{K_M}{v_{\max}} + \frac{K_M}{v_{\max} K_{EI}} [I] \quad (3)$$

$$i = \frac{1}{v_{\max}} + \frac{1}{v_{\max} K_{ESI}} [I]. \quad (4)$$

A Dixon-féle ábrázolás másodlagos egyeneseinek egyenletei:

$$s = \frac{K_M}{K_{EI} v_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max} K_{ESI}} \quad (5)$$

$$i = \frac{K_M}{v_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}}. \quad (6)$$

Az aleppói tannin esetén a Lineweaver-Burk ábrázolás másodlagos egyeneseinek egyenletei:

$$s = \frac{K_M}{v_{\max}} + \frac{K_M}{v_{\max} K_{EI}} [I] \quad (3)$$

$$i = \frac{1}{v_{\max}} + \frac{1}{v_{\max} K_{ESI}} [I] + \frac{1}{v_{\max} K_{ESI} K_{ESI2}} [I]^2. \quad (7)$$

Az egyenletekben található jelölések:  $v_0$  a kezdeti sebesség inhibitor hiányában és jelenlétében,  $v_{\max}$  a maximális sebesség.  $[S]$  és  $[I]$  a szubsztrát és inhibitor koncentrációkat jelölik.  $K_{EI}$ ,  $K_{ESI}$ ,  $K_{ESI2}$  rendre az EI, ESI és ESI<sub>2</sub> inhibitort tartalmazó komplexek disszociációs állandói. A  $K_M$  a Michaelis-konstans,  $K_{EI}$  az enzim-inhibitor komplex disszociációs állandója,  $K_{ESI}$  az enzim-szubsztrát-inhibitor komplex disszociációs állandója.

Az IC<sub>50</sub> értékeket minden esetben az 1 mM-os GalG<sub>2</sub>-CNP koncentrációnál, az 50%-os aktivitáshoz legközelebb lévő reakciósebesség felhasználásával, aránypárral számítottam.

## V. ÖSSZEFOGLALÁS

Dolgozatomban összefoglaltam a Biokémiai Tanszéken folyó, a humán nyál amiláz enzim inhibitorainak vizsgálatával kapcsolatos kutatásokat. Munkám legfőképp a HSA kinetikai és gátlás vizsgálatára vonatkozik, mely során megkíséreltem az ideális enzim inhibitor tulajdonságaira vonatkozó információkat összegyűjteni. Ennek érdekében számos, mind szerkezetét, mind eredetét tekintve különböző típusú inhibitorral végeztem vizsgálatokat. Méréseim szénhidrát, fehérje és polifenol jellegű, enzim gátló hatással rendelkező anyagokra is kiterjedtek, melyek között természetes, szintetikus eredetű és kemoenzimatikus úton előállított vegyületek is találhatóak. Ez a sokféleség kiváló alapot szolgáltatott a szerkezeti jellegzetességek és az inhibíciós hatás közötti összefüggések tanulmányozására. Az összegyűjtött információk megadják az esélyt egy későbbi, a lehető legjobb inhibitor hatású vegyület kifejlesztésére, ami komoly és áldásos következményekkel járna a diabetes, az obesitas, azaz az olyan betegségek kezelésében, amelyeknél az  $\alpha$ -amiláz gátlása előnyösnek bizonyult.

A kutatásaim során használt inhibitorok egy része kereskedelmi forgalomban kapható. Más részüket a tanszéken illetve az egyetem más tanszékein állították elő szintetikus, illetve félszintetikus úton, így ezek szerkezete ismert és jól definiált volt. A természetes eredetű tannin minták esetében azonban szerkezeti analízis volt szükséges. A mérések során különböző szerkezetvizsgáló módszereket (MALDI-TOF MS, MALDI-TOF PSD MS, ESI MS,  $^1\text{H}$  és  $^{13}\text{C}$  NMR) és a galluszsav, illetve az ellagisav tartalom meghatározására pedig a klasszikus rodaninos és  $\text{NaNO}_2$ -es színreakciókat használtuk.

Ezek alapján a kocsányos tölgy eredetű tannin olyan keveréknek bizonyult, melyben 2-7 galluszsavval észterezett kinasav molekulák találhatóak. A galluszsavak elrendeződése a kinasav körül elnyúlt struktúrát kölcsönöz a kocsányos tölgy tannin molekuláknak, ugyanis főként galluszsav trimer, dimer és kis mennyiségben monomer egységek kapcsolódnak a poliolhoz. Ezzel ellentétben

az aleppói tölgy eredetű tannin központi poliolja a glükóz, amelyhez 2-6 galluszsav kötődik, mégpedig főként monomer (esetleg dimer) formában. Ennek következtében az aleppó tannin a kocsányos tölgy eredetű tanninhoz képest egy kompaktabb struktúrát képvisel.

A kinetikai vizsgálatokat a legtöbb esetben két szubsztráton végeztem el. A mesterséges 2-klór-4-nitrofenil-4-O- $\beta$ -D-galaktopiranozil- $\alpha$ -D-maltozid (GalG<sub>2</sub>-CNP) szubsztrát gyors és egyszerű meghatározást tett lehetővé, míg a természetes amilóz szubsztrát használata az amiláz természetes működésének körülményeit volt hivatott megközelíteni. A mesterséges szubsztrát esetén a CNP kromofor felszabadulását követtem nyomon fotometriás módszerrel. Az amilóz alkalmazásakor a redukáló érték kimutatásán alapuló dinitro-szalicilsavas módszert használtam.

A gátlás típusát a Lineweaver-Burk és Dixon-féle ábrázolások elkészítésével és kiértékelésével határoztam meg. A kinetikai állandókat a Lineweaver-Burk és Dixon-féle másodlagos ábrázolásokból és a GalG<sub>2</sub>-CNP szubsztrát esetén nem lineáris regresszióval is kiszámítottam.

Vizsgálataim eredményeiből megállapítottam, hogy az inhibitor hatás szempontjából előnyös:

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

jelen az inhibitorban

Megfigyeltem, hogy az egyes tulajdonságok önmagukban nem elegendők a kiváló inhibitor hatás eléréséhez. Így például a glükál vegyületek hiába megfelelő hosszúságúak, a kettős kötések jelenlétéből adódóan kevés számú OH csoportot tartalmaznak, s emiatt csak mM-os koncentrációban képesek gátolni az amiláz enzimet. A szubsztrát analóg GTH-ban hiába van jelen a heteroatomokat tartalmazó spiro-tiohidantoin gyűrű, rövidsége miatt ez sem bizonyult jó inhibitornak. Az inhibitor molekula hosszának jelentőségét jól mutatja a korábban a tanszéken glükózzal, maltózzal, maltotriózzal és maltopentaózzal végzett vizsgálat, ami rámutat, hogy a monoszacharid egységek számának növekedésével nő az inhibitor hatás.

Az akarbóz és a PTS-GTH az ideális inhibitor minden korábban felsorolt jellemzőjével rendelkeznek, így ezek bizonyultak a HSA legjobb inhibitorainak a szénhidrát típusú vegyületek közül.

A megfelelő hosszúság és a kellő számú OH csoport jelenléte mellett a polifenolos vegyületek közé tartozó tanninok rendelkeznek még azzal az inhibíció szempontjából előnyös tulajdonsággal, hogy galluszsav csoportjaik révén stacking kölcsönhatást hozhatnak létre a HSA kötő alhelyeinek aromás aminosavaival, amely révén az aleppó tannin megközelíti az akarbóz és a PTS-GTH gátló hatását. A GG<sub>S5</sub> inhibitor hatása nem sokkal marad el az aleppó tanninétól. A különbség oka, hogy az aleppó tannin hexagalloil-glükózt is tartalmaz, ami valószínűleg jobb inhibitor a GG<sub>S5</sub>-nél. A kocsányos tölgy eredetű tannin kevésbé jó gátló hatását elnyúlt szerkezetével magyarázzuk, ami a HSA-val való kölcsönhatás kialakítása szempontjából valószínűleg kedvezőtlenebb, mint a kompakt struktúra.

Megállapítottam, hogy a GalG<sub>2</sub>-CNP rosszabb szubsztrátja a HSA-nak, mint az amilóz, így érthető, hogy az inhibitorok a rövid, kromoforos szubsztráton jobb gátló hatást képesek kifejteni, mint a másikon. A szubsztrát tulajdonságai pedig az inhibíció jellegét is képesek megváltoztatni az inhibitorral létrehozott kölcsönhatás jellemzőitől függően.

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

Az aleppó tannin esetén az  $ESI_2$  komplex képződése azzal magyarázható, hogy az amilóz olyan poliszacharidok közé tartozik, amelyek hidrofób árkokat tartalmazó másodlagos szerkezetet tudnak kialakítani, s ezáltal képesek polifenollokkal erős kölcsönhatást kialakítani. A kocsányos tölgy tannin esetén valószínűleg az elnyújtott szerkezet miatt nem volt tapasztalható a másodrendű kinetika.

Az inhibitorok közül a búzamazóból származó fehérje, a 0.28-inhibitor bizonyult a legjobbnak a HSA gátlásakor az  $IC_{50}$  értékek alapján. Ennek oka, hogy a protein nagy méretéből adódóan nem csak az aktív centrumhoz kapcsolódhat, hanem attól távol lévő enzim területekkel is kölcsönhatást alakíthat ki.

## VI. SUMMARY

Interactions between salivary components and bacteria are thought to be important with regards to oral microflora, which play a crucial role in the formation of oral diseases, including dental caries, periodontal disease and tooth loss. Dental caries is a multifunctional disease in which diet, nutrition, microbial infection and host response play important roles. It has been shown that human salivary amylase (HSA) takes part in the formation of dental plaque and subsequent caries formation. In solution  $\alpha$ -amylase binds with high affinity to viridans oral *Streptococci*. The bacteria-bound amylase is capable of hydrolyzing starch to oligosaccharides, which can be used as a food source by the bacteria where it is metabolized to lactic acid. The local acid production can lead to the dissolution of tooth enamel, which is a critical step in dental caries progression, so inhibition of HSA could decrease the risk of caries formation.

The main aim of our research was to investigate the inhibition kinetics of different amylase inhibitors, to determine the kinetic constants, to gain information on the mechanism of inhibitor action.

Amylase inhibitors from several origins were used for the inhibition of Human Salivary Amylase (HSA). The proteinaceous inhibitor from wheat seed, the 0.28 inhibitor and the different tannin samples (tannin originated from pendunculate and aleppo oak), which consist of polyphenolic compounds, are natural materials. Among the carbohydrate like inhibitors PTS-GTH ( $\alpha$ -acarviosinyl-(1-4)- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1-6)-D-glucopyranosylidene-spiro-thio-hydantoin) was synthesized chemoenzymatically, GTH (D-glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin) and the glucal compounds are of synthetic origin. The various structural properties of these inhibitors render to study the inhibitor structure – inhibitory potential connections.

One part of the used inhibitors were purchased from commercial sources. The other part of them were of synthetic origin. These molecules were structurally well-

known and well-defined. In the case of the natural tannin samples structural analysis was necessary. For this reason different kind of methods (MALDI-TOF MS, MALDI-TOF MS PSD, ESI MS,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR) were used. For the determination of gallic and ellagic acid content of the tannins spectrophotometric methods were carried out with the use of rhodanine and  $\text{NaNO}_2$ , respectively.

The results of these measurements confirm that the pendunculate oak originated tannin is a mixture of gallotannins, in which quinic acid forms the polyol. Mainly trimer and dimer and in little quantity monomer gallic acid units are bound to the central polyol, which gives a linear structure to the components of pendunculate oak tannin. The polyol of the aleppo oak originated tannin is glucose, to which 2-6 gallic acids are connected through ester bonds, mainly in a monomer form. Therefore aleppo tannin has a compact structure in contrast with pendunculate oak tannin.

With the structurally characterised and known inhibitors kinetic studies were done. The measurements were carried out on two different substrates. The using of the artificial 2-chloro-4-nitrophenyl-4-O- $\beta$ -D-galactopyranosylmaltotriose ( $\text{GalG}_2\text{-CNP}$ ) substrate makes a simple and quick enzyme activity determination possible. The natural amylose substrate is for presenting the natural circumstances of amylase function. In the case of  $\text{GalG}_2\text{-CNP}$  substrate the amount of the liberated CNP chromophore was measured spectrophotometrically. When amylose was used, the kinetic measurements were based on the determination of the reducing value by dinitro-salicylic acid method.

The type of inhibitions were determined using the classical Lineweaver-Burk and Dixon plots. The kinetic constants were calculated from the Lineweaver-Burk and Dixon secondary plots and in the case of  $\text{GalG}_2\text{-CNP}$  substrate by non-linear regression, too.

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

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

It was observed that these properties individually are not enough to achieve an excellent inhibitory effect. E.g. the glucal molecules are enough long, but according to the presence of double bounds they contain only a few OH groups, so they inhibit HSA only in millimolar range. The substrate analogue GTH has a spiro-thiohydantoin ring part, but because of its shortness it does not proved to be a good inhibitor. The importance of the inhibitor's length is well shown by the experiments carried out with glucose, maltose, maltotriose and maltopentose earlier in our department. The results of this study confirmed that with the increasing number of monosacharide units the inhibitory effect increases.

Acarbose and PTS-GTH possesses all the above mentioned advantageous features. In addition with that they was found to be the best HSA inhibitors among the carbohydrate like inhibitors.

Tannins are polyphenolic compounds of high molecular weight, which beside the properties of necessary lenght and number of OH groups are able to form stacking interactions with the aromatic amino acid residues of the HSA active center subsites. This conclusion is based on the results of a STD NMR assay and experiments with mutated enzymes (Y151M, W58L), which showed that Tyr151

and Trp58 at (+2) and (-2) subsites are highly involved in the binding of the tannins.

In the case of aleppo tannin these interactions contribute to the good inhibitory potential, which is close to the inhibitory effect of acarbose and PTS-GTH. Pentagalloyl- $\beta$ -D-glucopyranose (GG<sub>5</sub>) is a constituent of aleppo tannin and its dissociation constants are not much higher than aleppo tannin's. The reason of the difference is that the aleppo tannin mixture contains hexagalloyl-glucose molecules, which are thought to be better inhibitors than GG<sub>5</sub>. The pendunculate oak originated tannin is worse inhibitor of HSA than aleppo tannin. This can be explained by the linear structure of pendunculate oak tannin, which was determined with MALDI-TOF PSD MS analysis. Probably this linear structure is more unfavourable from the viewpoint of making interactions with the enzyme.

It was established that GalG<sub>2</sub>-CNP is not as good substrate of HSA as amylose. So it can be understood, why all the used inhibitors displayed worse inhibitory potential on amylose substrate. The properties of the substrate also have a great effect on the type of inhibition according to the characteristics of the interaction between the inhibitor and the substrate.

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

The formation of ESI<sub>2</sub> complex in the case of aleppo tannin is based on the fact, that amylose belongs to the polysaccharides, which can form a secondary structure containing hydrophobic cavities, so they are able to make strong interactions with polyphenols. In the case of pendunculate oak tannin this

phenomenon was not observed, presumably because of the linear structure of this tannin.

Among the inhibitors the wheat seed derived, proteinaceous 0.28-inhibitor had the best inhibitory effect on HSA on the basis of  $IC_{50}$  values. It is because of the great size of the protein molecule, which therefore can make interactions not only with the active site of the enzyme, but also with more distant areas of HSA.

## VII. IRODALOMJEGYZÉK

1. S. D'Amico, C. Gerday, G. Feller, *Gene*, **253** (2000) 95-105.
2. T. Kuriki, T. Imanaka, *J. Biosci. Bioeng.*, **87** (1999) 557-565.
3. B. Henrissat, G. Davies, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **7** (1997) 637-644.
4. <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi-bin/enzymes/>
5. <http://www.afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/index.html>
6. G. Davies, B. Henrissat, *Structure*, **3** (1995) 853-859.
7. J.A. Campbell, G.J. Davies, V. Bulone, B. Henrissat, *Biochem. J.*, **326** (1997) 929-942.
8. B. Henrissat, A. Bairoch, *Biochem. J.*, **316** (1996) 695-696.
9. E.A. MacGregor, Š. Janeček, B. Svensson, *BBA*, **1546** (2001) 1-20.
10. M.J.E.C. van der Maarel, B. van der Veen, J.C.M. Uitdehaag, H. Leemhuis, L. Dijkhuizen, *J. Biotechnol.*, **94** (2002) 137-155.
11. Š. Janeček, *Prog. Biophys. Molec. Biol.*, **67** (1997) 67-97.
12. N. Oudjeriouat, Y. Moreau, M. Santimone, B. Svensson, G. Marchis-Mouren, V. Desseaux, *Eur. J. Biochem.*, **270** (2003) 3871-3879.
13. C. Rangunath, K. Sundarand, N. Ramasubbu, *Protein Expres. Purif.*, **24** (2002) 202-211.
14. G.J. Davies, K.S. Wilson, B. Henrissat, *Biochem. J.*, **321** (1997) 557-559.
15. L. Kandra, G. Gyémánt, *Carbohydr. Res.*, **329** (2000) 579-585.
16. M. Quian, R. Haser, G. Buisson, E. Duée, F. Payan, *Biochemistry*, **33** (1994) 6284-6294.
17. L. Kandra, G. Gyémánt, J. Remenyik, G. Hovánszki, A. Lipták, *FEBS Lett.*, **518** (2002) 79-82.
18. A.M. Brzozowski, G. J. Davies, *Biochemistry*, **36** (1997) 10837-10845.
19. D.E. Koshland, *Biol. Rev.*, **28** (1953) 416-436.
20. B.Y. Tao, P.J. Reilly, J.F. Robyt, *BBA*, **995** (1989) 214-220.
21. J.D. McCarter, S.G. Withers, *J. Biol. Chem.*, **271** (1996) 6889-6894.

22. E.H. Rydberg, C. Li, R. Maurus, C. M. Overall, G.D. Brayer, S.G Withers, *Biochemistry*, **41** (2002) 4492-4502.
23. N. Ramasubbu, K. Sundar, C. Rangunath, M.M. Rafi, *Arch. Biochem. Biophys.*, **421** (2004) 115-124.
24. S. Tokutake, R. Uchida, K. Kotani, K. Saito, N. Yamaji, *Carbohydr. Res.*, **239** (1993) 109-133.
25. H. Fuwa, *J. Biochem.*, **41** (1954) 583-603.
26. S. Satomura, S. Okajima, T. Hamanaka, A. Shintani, Y. Miyashita, Y. Sakata, *Clin. Chim. Acta.*, **138** (1984) 21-29.
27. Z. Xiao, R. Storms, A. Tsang, *Anal. Biochem.*, **351** (2006) 146-148.
28. R.J. Henry, N. Chiamori, *Clin. Chem.*, **6** (1960) 434-452.
29. M. Somogyi, *Clin. Chem.*, **6** (1960) 23-35.
30. H.D. Graham, J.H.M. Henderson, *Plant Physiol.*, **39** (1961) 405-408.
31. <http://www.cimascsientific.com>
32. G.L. Miller, *Anal. Chem.*, **31** (1959) 426-428.
33. T. Baks, A.E.M. Janssen, R.M. Boom, *Enzyme Microb. Tech.*, **39** (2005) 114-119.
34. P. Biely, D. Mislovičová, O. Markovič, V. Kaláč, *Anal. Biochem.* **172** (1988) 176-179.
35. T. Kikuchi, S. Kimata, K-I. Majima, S. Asano, *Clin. Chim. Acta*, **273** (1998) 1-12.
36. W.H. Porter, R.E. Roberts, *Clin. Chem.*, **24** (1978) 1620-1624.
37. G.P. James, R.B. Passey, J.B. Fuller, M.L. Giles, *Clin. Chem.*, **23** (1977) 546-550.
38. I. Koyama, S-I. Komine, M. Yakushijin, S. Hokari, T. Komoda, *Comp. Biochem. Phys. B.*, **126** (2000) 553-560.
39. N. Saito, T. Horiuchi, M. Yoshida, T. Imai, *Clin. Chim. Acta*, **97** (1979) 253-260.

40. E-O. Hägele, E. Schaich, E. Rauscher, P. Lehmann, H. Bürk, A-W. Wahelfeld, *Clin. Chem.*, **28** (1982) 2201-2205.
41. B.K. Gillard, H.C. Markman, S.A. Feig, *Clin. Chem.*, **23** (1977) 2279-2282.
42. R.A. Kaufman, L.J. Dunka Jr., L.M. Hall, *Clin. Chem.*, **26** (1980) 1018.
43. A. Scholer, W. Hohenwallner, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **22** (1984) 677-684.
44. T. Suganuma, Y. Maeda, K. Kitahara, T. Nagahama, *Carbohydr. Res.*, **303** (1997) 219-227.
45. F.-J. Gella, G. Gubern, R. Vidal, F. Canalias, *Clin. Chim. Acta*, **259** (1997) 147-160.
46. S. Teshima, N. Mitsuhida, M. Ando, *Clin. Chim. Acta*, **150** (1985) 165-174.
47. E. Henkel, S. Morich, R. Henkel, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **22** (1984) 489-495.
48. J.C.M. Hafkenscheid, M. Hessels, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **23** (1985) 529-533.
49. S. Satomura, T. Iwata, Y. Sakata, K. Omichi, T. Ikenaka, *Carbohydr. Res.*, **176** (1988) 107-115.
50. G. Dupuy, G. Hialire, C. Aubry, *Clin. Chem.*, **33** (1987) 524-528.
51. S. Satomura, Y. Sakata, K. Omichi, T. Ikenaka, *Clin. Chim. Acta*, **174** (1988) 315-324.
52. S. Teshima, Y. Hayashi, S. Emi, K. Ishimaru, *Clin. Chim. Acta*, **199** (1991) 23-32.
53. S. Satomura, K. Omichi, T. Ikenaka, *Carbohydr. Res.*, **180** (1988) 137-146.
54. K. Omichi, T. Ikenaka, *Clin. Chim. Acta*, **138** (1984) 197-203.
55. T. Usui, K. Ogawa, H. Nagai, H. Matsui, *Anal. Biochem.*, **202** (1992) 61-67.
56. H. Matsui, H. Kawagishi, T. Usui, *BBA*, **1035** (1990) 90-96.
57. Y. Morishita, Y. Iinuma, N. Nakashima, K. Majima, K. Mizuguchi, Y. Kawamura, *Clin. Chem.*, **46** (2000) 928-933.
58. L. Kandra, *J. Mol. Struct.*, **666-667** (2003) 487-498.

59. G. Muralikrishna, M. Nirmala, *Carbohydr. Polym.*, **60** (2005) 163-173.
60. A.M. Brzozowski, D.M. Lawson, J.P. Turkenburg, H. Bisgaard-Frantzen, A. Svendsen, T.V. Borchert, Z. Dauter, K.S. Wilson, G.J. Davies, *Biochemistry*, **39** (2000) 9099-9107
61. A.O. Aluoch, O.A. Sadik, G. Bedi, *Anal. Biochem.*, **340** (2005) 136-144.
62. N. Ramasubbu, C. Ragunath, P.J. Mishra, *J. Mol. Biol.*, **325** (2003) 1061-1076.
63. K. Omichi, K. Shiosaki, K. Matsubara, T. Ikenaka, *J. Biochem.*, **107** (1990) 546-549.
64. A.M. Vacca-Smith, A.R. Venkitaraman, R.G. Quirey Jr., W.H. Bowen, *Archs. Oral Biol.*, **41** (1996) 291-298.
65. F.A. Scannapieco, G.I. Torres, M.J. Levine, *J. Dent. Res.*, **74** (1995) 1360-1366).
66. F.A. Scannapieco, E.J. Bergey, M.S. Reddy, M.J. Levine, *Infect. Immun.*, **57** (1989) 2853-2863.
67. Y. Yao, J. Grogan, M. Zehnder, U. Lendenmann, B. Nam, Z. Wu, C.E. Costello, F.G. Oppenheim, *Arch. oral Biol.*, **46** (2001) 293-303.
68. H. Liang, Y. Wang, Q. Wang, M.-S. Ruan, *J. Chromatograph. B*, **724** (1999) 381-388.
69. F.A. Scannapieco, G. Torres, M.J. Levine, *Crit. Rev. Oral Biol. M.*, **4** (1993) 301-307.
70. F.A. Scannapieco, K. Bhandary, N. Ramashubbu, M.J. Levine, *Biocem. Bioph. Res. Co.*, **173** (1990) 1109-1115.
71. <http://www.ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/tannin/index.html>
72. <http://www.users.muohio.edu/hagermae/tannin.pdf>
73. J.M.G. Galvez, B. Riedl, A.H. Conner., *Holzforschung*, **51** (1997) 235-243.
74. K. Khanbabaee, T. van Ree, *Nat. Prod. Rep.*, **18** (2001) 641-649.
75. R. Niemetz, G.G. Gross, *Phytochemistry*, **66** (2005) 2001-2011.

76. T. de Bruyne, L. Pieters, H. Deelstra, A. Vlietink, *Biochem. Syst. Ecol.*, **27** (1999) 445-459.
77. S. Hamada, H.D. Slade, *Microbiol. Rev.*, **44** (1980) 331-384.
78. S. Hamada, T. Koga, T. Ooshima, *J. Dent. Res.*, **63** (1984) 407-411.
79. W.J. Loesche, *Microbiol. Rev.*, **50** (1986) 353-380.
80. M. Sato, H. Tanaka, S. Fujiwara, M. Hirata, R. Yamaguchi, H. Etoh, C. Tokuda, *Phytomedicine*, **9** (2002) 427-433.
81. S. Otake, M. Makimura, T. Kuroki, Y. Nishihara, M. Hirasawa, *Caries Res.*, **25** (1991) 438-443.
82. P.L. Owen, T. Johns, *J. Ethnopharmacol.*, **64** (1999) 149-160.
83. G.M. Polya, B.H. Wang, L.Y. Foo, *Phytochemistry*, **38** (1995) 307-314.
84. M. Wagner, G. Elbl, M. Lotter, M. Guinea, *Pharm. Pharmacol. Lett.*, **1** (1991) 15-18.
85. G.J. McDougall, F. Shpiro, P. Dobson, P. Smith, A. Blake, D. Stewart, *J. Agric. Food Chem.*, **53** (2005) 2760-2766.
86. J. Zhang, S. Kashket, *Caries Res.*, **32** (1998) 233-238.
87. S. Kashket, V.J. Paolino, *Arch. Oral Biol.*, **33** (1988) 845-846.
88. [www.teahealth.co.uk/th/facts/9.htm](http://www.teahealth.co.uk/th/facts/9.htm)
89. M.W.L. Koo, C.H. Cho, *Eur. J. Pharmacol.*, **500** (2004) 177-185.
90. Q. He, Y. Lv, K. Yao, *Food Chem.*, **101** (2007) 1178-1182.
91. S.-H. Yoon, J.F. Robyt, *Carbohydr. Res.*, **338** (2003) 1969-1980.
92. S. H. Yoon, J.F. Robyt, *Carbohydr. Res.*, **337** (2002) 2427-2435.
93. F. Payan, *BBA*, **1696** (2004) 171-180.
94. M.-J. Kim, S.-B. Lee, H.-S. Lee, S.-Y. Lee, J.-S. Baek, D. Kim, T.-W. Moon, J.F. Robyt, K.-H. Park, *Arch. Biochem. Biophys.*, **371** (1999) 277-283.
95. M. Takada, K. Ogawa, T. Murata, T. Usui, *J. Carbohydr. Chem.*, **18** (1999) 149-163.

96. R. Uchida, A. Nasu, S. Tokutake, K. Kasai, K. Tobe, N. Yamaji, *Carbohydr. Res.*, **307** (1998) 69-76.
97. V. Silano, J.C. Zahnley, *BBA*, **533** (1978) 181-185.
98. C.M. Connor, K.F. McGreeney, *BBA*, **658** (1981) 387-396.
99. V. Silano, F. Pocchiari, D.D. Kasarda, *BBA*, **317** (1973) 139-148.
100. K. Maeda, S. Kakabayashi, H. Matsubara, *BBA*, **828** (1985) 213-221.
101. K. Maeda, K. Tamakoshi, A. Yamashita, T. Fukumoto, *BBA*, **828** (1985) 222-228.
102. T. Petrucci, A. Rab, M. Tomasi, V. Silano, *BBA*, **420** (1976) 288-297.
103. M.D. O'Donnel, K.F. McGeeney, *BBA*, **422** (1976) 159-169.
104. C.S.A. Dayler, P.A.M. Mendes, M.V. Prates, C. Bloch Jr., O.L. Franco, M.F. Grossi-de-Sá, *FEBS Lett.*, **579** (2005) 5616-5620.
105. V. le Berre-Anton, V. Nahoum, F. Payan, P. Rougé, *Plant Physiol. Biochem.*, **38** (2000) 657-665.
106. I. Kluh, M. Horn, J. Hýblová, J. Hubert, L. Dolečková-Marešová, Z. Voburka, I. Kudlíková, F. Kocourek, M. Mareš, *Phytochemistry*, **66** (2005) 31-39.
107. T. Yamada, K. Hattori, M. Ishimoto, *Phytochemistry*, **58** (2001) 59-66.
108. A.P. Giri, M.S. Kachole, *Phytochemistry*, **47** (1998) 197-202.
109. F.R. Melo, M.P. Sales, L.S. Pereira, C. Bloch Jr., O.L. Franco, M.B. Ary, *Proteine Peptide Lett.*, **6** (1999) 385-390.
110. J. Iulek, O.L. Franco, M. Silva, C.T. Slivinski, C. Bloch Jr., D.J. Rigden, M.F. Grossi de Sá, *Int. J. Biochem. Cell B.*, **32** (2000) 1195-1204.
111. C.L. Araújo, I.W.L. Bezerra, I.C. Dantas, T.V.S. Lima, A.S. Oliveira, M.R.A. Miranda, E.L. Leite, M.P. Sales, *Food Chem.*, **85** (2004) 107-110.
112. M. Richardson (1991) (L.J. Rogers Ed.), *Methods in Plant Biochemistry*, vol.5, pp. 259-305, Academic Press, New York.
113. B. Svensson, K. Fukuda, P.K. Nielsen, B.C. Bønsager, *BBA*, **1696** (2004) 145-156.

114. O.L. Franco, D.J. Rigden, F.R. Melo, M.F. Grossi-de-Sá, *Eur. J. Biochem.*, **269** (2002) 397-412.
115. A.D. Abell, M.J. Ratcliffe, J. Gerrard, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **8** (1998) 1703-1706.
116. Keleti Tamás, *Enzimkinetika*, Nemzeti Tankönyvkiadó, 1994.
117. W.W. Clealand, *Biochim. Biophys. Acta*, **67** (1963) 173-187.
118. [http://quaff.org/SpeakerNotes/Grain\\_Composition\\_Functionality-Chad-Stevens.pdf](http://quaff.org/SpeakerNotes/Grain_Composition_Functionality-Chad-Stevens.pdf)
119. M. Machius, L. Vértesy, R. Huber, G. Wiegand, *J. Mol. Biol.*, **260** (1996) 409-421.
120. S. Kéki, G. Batta, I. Bereczki, Z. Fejes, L. Nagy, Á. Zajácz, L. Kandra, I. Kiricsi, G. Deák, M. Zsuga, P. Herczegh, *Carbohydr. Polym.*, **63** (2006) 136-140.
121. L. Somsák, V. Nagy, T. Docsa, B. Tóth, P. Gergely, *Tetrahedron-Asymmetr.*, **11** (2000) 405-408.
122. G. Gyémánt, L. Kandra, V. Nagy, L. Somsák, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **312** (2003) 334-339.
123. K.H. Park, M.J. Kim, H.S. Lee, N.S. Han, D. Kim, J.F. Robyt, *Carbohydr. Res.*, **313** (1998) 235-246.
124. L. Kandra, J. Remenyik, G. Batta, L. Somsák, G. Gyémánt, K.H. Park, *Carbohydr. Res.*, **340** (2005) 1311-1317.
125. L. Kandra, Á. Zajácz, J. Remenyik, G. Gyémánt, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **334** (2005) 824-828.
126. A.E. Hagerman, K.H. Inoue, *Anal. Biochem.*, **169** (1988) 363-369.
127. A.R.S. Ross, M.G. Ikonov, I.K. Orians, *Anal. Chim. Acta.*, **411** (2000) 91-102.
128. G. Ferey-Raux, J. Perrier, E. Forest, G. Marchis-Mouren, A. Puigserver, M. Santimone, *BBA*, **1388** (1998) 10-20.

129. L. Kandra, G. Gyémánt, Á. Zajácz, G. Batta, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **319** (2004) 1265-1271.
130. L. Kandra, G. Gyémánt, J. Remenyik, C. Ragunath, N. Ramasubbu, *FEBS Lett.*, **544** (2003) 194-198.
131. P. Moynihan, P. Lingström, A.J. Rugg-Gunn, D. Birkhed, The role of dietary control, in: O. Fejerskov, E. Kidd (Eds.), *The Disease and its Clinical Management*, Blackwell Munksgaard, Oxford, 2003, pp. 222-244.
132. P.J. Mishra, C. Ragunath, N. Ramasubbu, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **292** (2002) 468-473.
133. A.E. Hagerman, T.C. Wilson, *J. Agric. Food Chem.*, **38** (1990) 1678-1683.
134. Y.Y. Soong, P.J. Barlow, *J. Chromatogr. A*, **1085** (2005) 270-277.
135. R.W. Owen, R. Haubner, W.E. Hull, G. Erben, B. Spiegelhalder, H. Bartsch, B. Haber, *Food Chem. Toxicol.*, **41** (2003) 1727-1738.
136. V. Desseaux, R. Koukikolo, Y. Moreau, M. Santimone, G. Marchis-Mouren, *Biologia*, **57** (2002) 163-170.
137. M. Santimone, R. Koukikolo, Y. Moreau, V. Le Berre, P. Rougé, G. Marchis-Mouren, V. Desseaux, *BBA*, **1696** (2004) 181-190.
138. N. Vittori, U. S. Patent, 6,482,942, 2000; *Chem. Abstr.*, **133** (2000) 101738s.
139. T. Ozawa, T.H. Lilley, E. Haslam, *Phytochemistry*, **26** (1987) 2937-2942.
140. A. Cornish-Bowden, Residual plots and their kinetic uses, in: A. Cornish-Bowden, *Fundamentals of enzyme kinetics*, London, 2002, pp. 313-315.
141. A. Cornish-Bowden, Comparing models, Additional remarks about residual plots, in: A. Cornish-Bowden, *Analysis of Enzyme Kinetic Data*, New York, 1995, pp. 49-59.
142. [www.freeweb.hu/hydra2002/images/KemenyitoZaro.pdf](http://www.freeweb.hu/hydra2002/images/KemenyitoZaro.pdf)
143. J. Yan, A.D. Kline, H. Mo, M.J. Shapiro, E.R. Zartler, *J. Magn. Reson.*, **163** (2003) 270-276.

144. L. Nissler, R. Gebhardt, S. Berger, *Anal. Bioanal. Chem.*, **379** (2004) 1045-1049.
145. N. Ramasubbu, C. Ragunath, P.J. Mishra, L.M. Thomas, G. Gyémánt, L. Kandra, *Eur. J. Biochem.*, **271** (2004) 2517-2529.
146. L. Kandra, G. Gyémánt, J. Remenyik, C. Ragunath, N. Ramasubbu, *Biologia, Bratislava*, **60** (2005) 57-64.
147. L.J. Porter, Tannins, in: J.B. Harborne, *Methods in Plant Biochemistry: Plant Phenolics*, Vol.1, Academic Press, London, 1989, pp. 389-419.
148. E.C. Bate-Smith, *Phytochemistry*, **11** (1972) 1153-1156.

## VIII. PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### A dolgozat témakörében megjelent közlemények:

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

## A dolgozat témakörében bemutatott előadások és poszterek:

### *Előadások:*

1. Bereczki Ilona, Kéki Sándor, Batta Gyula, Fejes Zsolt, Deák György, Nagy Lajos, Kiricsi Imre, **ZajácZ Ágnes**, Kandra Lili, Zsuga Miklós, Herczegh Pál  
Új típusú poliszacharidok szintézise glükál-származékok poli-Ferrier-reakciójával.  
Munkabizottsági ülés, Debrecen, 2004. 10. 05.
2. **ZajácZ Ágnes**, Kandra Lili, Gyémánt Gyöngyi, Batta Gyula  
Tannin - a humán nyál amiláz (HSA) inhibitora  
Kémiai Előadói Napok, Szeged, 2004. 10. 25-27.
3. Bereczki Ilona, Herczegh Pál, Kéki Sándor, Batta Gyula, Fejes Zsolt, Zsuga Miklós, Deák György, Nagy Lajos, **ZajácZ Ágnes**, Kandra Lili, Kiricsi Imre  
Új típusú polikondenzációs reakció Ferrier-átrendeződéssel: Új poliszacharidok szintézise glükál származékok polikondenzációjával  
X. Nemzetközi Vegyészkonferencia, Kolozsvár, 2004.11.12-14.
4. **Ágnes ZajácZ**, Lili Kandra, Gyöngyi Gyémánt, Gyula Batta  
Effect of quinic acid based gallotannin on HSA  
2<sup>nd</sup> Austrian-Hungarian Carbohydrate Conference, Somogyaszaló, 2005. 05.24-26.
5. **ZajácZ Ágnes**, Kandra Lili  
 $\alpha$ -Amiláz inhibitorok vizsgálata  
Tudomány Napja, Debrecen, 2005. 11. 16.
6. Kandra Lili, Gyémánt Gyöngyi, Batta Gyula, **ZajácZ Ágnes**  
Fehérje-ligand kölcsönhatás tanulmányozása a humán nyál amiláz (HSA) hatásmechanizmusának felderítésére  
Centenárium Vegyészkonferencia, Sopron, 2007. máj. 29-jún. 1.

*Poszterek:*

1. **Zajác Ágnes**, Kandra Lili, Gyémánt Gyöngyi, Natale Vittori  
Az aleppói fenyő gubacsából izolált tannin inhibitor hatása a humán nyál  
amilázon.  
Vegyész konferencia, Hajdúszoboszló, 2005. jún. 26-30.
2. **Ágnes Zajác**, Gyöngyi Gyémánt, Gyula Batta, Lili Kandra  
Tannins of great inhibitor activity on Human Salivary Amylase (HSA).  
Summer Course Glycosciences, Wageningen (The Netherlands), 2006.06.06-  
09.

## Humán nyál amiláz inhibitorok vizsgálata

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

Írta: ZajácZ Ágnes  
diplomás gyógyszerész

Készült a Debreceni Egyetem KÉMIA doktori programja  
(K/5 alprogramja) keretében  
Témavezető: Dr. Kandra Lili

A doktori szigorlati bizottság:

Elnök: .....

Tagok: .....

.....

A doktori szigorlat időpontja: 2007.

Az értekezés bírálói:

Dr..... .....

Dr. .... .....

A bírálóbizottság:

Elnök: Dr. .... .....

Tagok: Dr. .... .....

Dr. .... .....

Dr. .... .....

Dr. .... .....

Az értekezés védésének időpontja: 2007.