



1949

**A humán *O*-(*N*-acetyl- β -D-glükózaminil)-L-szerin/treonin
N-acetylglükózaminil hidroláz enzim expressziója,
karakterizálása, új inhibitorainak szintézise és gátló
hatásuk meghatározása**

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

Kiss Mariann

Témavezetők: Dr. Somsák László, Dr. Barna Teréz

DEBRECENI EGYETEM

Természettudományi és Informatikai Doktori Tanács

Kémiai Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2022.

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi és Informatikai Doktori Tanács Kémiai Tudományok Doktori Iskola K/5 programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.

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

Debrecen, 20.

.....

a jelölt aláírása

Tanúsítom, hogy Kiss Mariann doktorjelölt 2016 - 2021 között a fent megnevezett Doktori Iskola K/5 programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Nyilatkozom továbbá arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét.

Az értekezés elfogadását javasolom.

Debrecen, 20..

.....

a témavezető aláírása

A humán *O*-(*N*-acetyl- β -D-glükózaminil)-L-szerin/treonin *N*-acetylglükózaminil hidroláz enzim expressziója, karakterizálása, új inhibitorainak szintézise és gátló hatásuk meghatározása

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

Írta: Kiss Mariann okleveles vegyész

Készült a Debreceni Egyetem Kémiai Tudományok Doktori Iskolája
(K/5, Szénhidrátok és heterociklusok kémiája és kémiai biológiája programja) keretében

Témavezetők: Dr. Somsák László, Dr. Barna Teréz

Az értekezés bírálói:

Dr.
Dr.

A bírálóbizottság:

elnök: Dr.
tagok: Dr.
Dr.
Dr.
Dr.

Az értekezés védésének időpontja: 20... .

Köszönetnyilvánítás

Elsősorban köszönettel tartozom témavezetőimnek, *Prof. Dr. Somsák László* egyetemi tanárnak és *Dr. Barna Teréz* adjunktusnak, hogy munkámat figyelemmel kísérték és értékes szakmai tanácsokkal láttak el.

Köszönöm *Dr. Kurtán Tibor* tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy munkámat lehetővé tette a Szerves Kémiai Tanszéken és köszönöm *Gálné Dr. Miklós Ida* tanszékvezető egyetemi docensnek, hogy a biokémiai területen folytatott munkámat a Genetikai és Alkalmazott Mikrobiológiai Tanszéken végezhettem.

Szeretném megköszönni *Dr. Bokor Éva* adjunktusnak, *Dr. Kun Sándor* adjunktusnak, *Dr. Juhászné Dr. Tóth Éva* adjunktusnak, *Vágvölgyiné Dr. Tóth Marietta* egyetemi docensnek és *Dr. Juhász László* egyetemi docensnek, hogy a Kémiai Glikobiológiai Kutatócsoportban töltött éveim alatt segítették a munkámat. Köszönöm *Nagy Károlyné*, *Kiss György Attila* és *Kulcsár Andrea Enikő* vegyésztechnikusoknak a mindennapi munkában nyújtott segítségüket.

Köszönöm labortársaimnak - *Dr. Kaszás Tímeának*, *Siposné dr. Szabó Erzsébet Katalinnak*, *Dr. Szennyey Eszternek*, *Dr. József Jánosnak*, *Dr. Kánya Nándornak*, *Homolya Ágnesnek*, *Homolya Leventének*, *Kacsir Istvánnak* és *Szakács Bencének* - hogy jelenlétükkel színesebbé tették a napokat és kellemes légkört biztosítottak a szürke hétköznapiakban.

Szeretném megköszönni *Szabó Ernának*, hogy nem csak a biokémia rejtelseibe vezetett be, hanem egy életre szóló barátságot is kaptam tőle.

Köszönettel tartozom *Dr. Timári István* adjunktusnak az NMR mérésekben és kiértékelésükben nyújtott segítségéért. Köszönöm *Prof. Dr. Gáspár Attila* egyetemi tanárnak, *Nagy Cynthiának* és *Pesti Annának* a HRMS méréseket.

Köszönöm *Dr. Kiss Attila* egyetemi docensnek, *Dr. Kónya-Ábrahám Anita* tanársegédnek és *Szabados Annának* a tömegspektrometriai és optikai forgatókéesség méréseket, valamint hogy mindig fordulhattam hozzájuk baráti jótanácsokért.

Köszönet illeti *Dr. Virág László* egyetemi tanárt, *Guti Elizát* és az Orvosi Vegytani Intézet munkatársait, hogy a Prágában elkezdett kísérletek befejezéséhez biztosították számomra a Tecan Plate Reader berendezés használatát.

Köszönöm *családomnak*, *kedvesemnek*, *barátaimnak*, *kollégáimnak* végtelen támogatásukat és biztatásukat.

A kutatás az NKFIH K109450 és FK-125067 számú projektek keretében, valamint az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával a GINOP-2.3.2.-15-2016-00008 és a GINOP-2.3.3-15-2016-00004 számú projektek keretében valósult meg.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	1
2. Irodalmi előzmények	3
2.1 Az <i>O</i> -(<i>N</i> -acetil-glükózaminilezés) poszt-transzlációs módosulás	3
2.2 Az OGT és OGA enzimek	6
2.3 Ismert OGA inhibitorok	10
2.4 Szintetikus előzmények.....	19
2.5 Biokémiai előzmények.....	21
3. Saját vizsgálatok	25
3.1 Célkitűzés.....	25
3.2 Célvegyületek szintézise	26
3.3 A teljes hosszúságú hOGA izoenzim heterológ expressziója	30
3.4 A hOGA enzim izolálása és tisztítása	35
3.5 Az enzimek kinetikai paramétereinek meghatározása ¹⁰⁸	37
3.6 Enzimgátlási mérések eredményei ^{108, 109}	38
3.7 Az eredmények értékelése, kitekintés	46
4. Kísérleti rész	48
4.1 Szintézis	48
4.1.1 Általános eljárás 1-(2-acetamido-3,4,6-tri- <i>O</i> -acetyl-2-dezoxi- β -D-glükopiranozil)-4-aryl(tio)szemikarbazidok (36a-h) és 1-(2-acetamido-3,4,6-tri- <i>O</i> -acetyl-2-dezoxi- β -D-glükopiranozil)-2-(arilsulfonil)-hidrazinok (36i-n) előállítására	49
4.1.2 Általános eljárás oxidációra CrO ₃ - piridin komplex-szel	59
4.1.3 Általános eljárás oxidációra MnO ₂ -dal.....	63
4.1.4 Általános eljárás az <i>O</i> -acetyl védőcsoportok eltávolítására ammóniával	67
4.2 Biokémiai anyagok és módszerek	75
4.2.1 Mikroorganizmusok és tenyésztési körülmények	75
4.2.2 A humán OGA heterológ expressziója <i>E. coli</i> -ban.....	76
4.2.3 A hOGA kromatográfiája	77
4.2.4 <i>N</i> -acetyl-glükózaminidáz aktivitási vizsgálat	77
4.2.5 Michaelis-Menten kinetikai állandók meghatározása hOGA és HexA/HexB (szarvasmarha veséből) enzimekre	78
4.2.6 Enzimgátlási vizsgálatok	79
5. Összefoglalás	81

6. Summary	84
7. Irodalomjegyzék	87
8. Függelék	97
8.1 A hOGA és a HexA/HexB Michaelis-Menten görbéi	97
8.2 A hOGA gátlási adatok Dixon és Cornish-Bowden diagramja	99
8.2 A HexA/HexB gátlási adatok Dixon és Cornish-Bowden diagramja.....	102
8.3 A hHexB gátlási adatok Michaelis-Menten kinetikai görbéi és Lineweaver-Burk diagramja	104
9. Publikációs lista	106

Rövidítések jegyzéke

4Å MS	4 Ångström méretű molekulaszita
4-MU-GlcNAc	4-metilumbelliferil <i>N</i> -acetyl-β-D-glükózaminid
AD	Alzheimer-kór
Asp	aszpartát
DTT	ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
ER	endoplazmatikus retikulum
GalNAc	<i>N</i> -acetyl-D-galaktózamin
GH20	glikozid hidrolázok 20-as családja
GH84	glikozid hidrolázok 84-es családja
GlcNAc	<i>N</i> -acetyl-D-glükózamin
HAT	hiszton-acetiltranszferáz
HBP	hexózamin bioszintetikus útvonal
HexA	β-hexózaminidáz A
HexB	β-hexózaminidáz B
IC ₅₀	50 %-os gátló hatást okozó koncentráció
IMAC	immobilizált fém affinitáskromatográfia
IPTG	izopropil-β-D-tiogalaktopiranozid
K _i	inhibíciós állandó
LOGNAC	2-acetamido-2-dezoxi-D-glükonohidroximo-1,5-lakton
n.a.	nincs adat
NAG-tiazolin	1,2-didezoxi-2'-metil-α-D-glükopiranozo-[2,1-d]-Δ2'-tiazolin
NMR	mágneses magrezonancia spektroszkópia
NOE	mag Overhauser hatás
OGA	[protein]-3-O-(<i>N</i> -acetyl-β-D-glükózaminil)-L-szerin/treonin <i>N</i> -acetylglükózaminil hidroláz
OGT	uridin difoszfó- <i>N</i> -acetyl-glükózamin:polipeptid <i>N</i> -acetyl-β-D-glükózaminiltranszferáz
PMSF	fenilmetilszulfonil-fluorid
<i>p</i> NP-GlcNAc	<i>p</i> -nitrofenil- <i>N</i> -acetyl-β-D-glükózaminid
PTM	poszt-transzlációs módosítás
PUGNAC	<i>O</i> -(2-acetamido-2-dezoxi-D-glükopiranozilidén)-imino- <i>N</i> -fenilkarbamát

QM/MM	kvantum-mechanika/molekuláris mechanika
SDS-PAGE	nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis
Ser	szerin
Streptozotocin	<i>N</i> -metil- <i>N</i> -nitrozoureido-D-glükózamin
Thr	treonin
TPR	ismétlődő tetratrikopeptidek
Tris	trisz-(hidroximetil)-aminometán
Tyr	tirozin
UDP-GlcNAc	uridin difoszfo- <i>N</i> -acetil-glükózamin
Val	valin

1. Bevezetés

A szénhidrátok jelentős szerepet töltenek be az élő szervezetekben. Mono-, oligo- és polimer formájukban régóta ismert tápanyagok, valamint a váz- és kötőszövetek alkotóelemei. Ám szerepük, jelentőségük ennél sokkal nagyobb. A glikánok és konjugátumaik (pl. glikolipidek és glikoproteinek) a felismerési folyamatok és a jelátvitel általános közvetítőiként működnek. Szerepük van olyan, az élő sejtek felületén lejátszódó folyamatokban, mint például a sejtadhézió, a sejtosztódás kontakt gátlása, vírusok, baktériumok, hormonok, toxinok megkötődése a sejteken, az immunválasz kialakulása, az ivarsejtek egymásra találása.¹

A fehérjék a transzláció után bizonyos módosításokon eshetnek át, amelyek megváltoztatják működésüket, lokalizációjukat vagy más molekulákkal kialakított kapcsolatukat. A legismertebb poszt-transzlációs módosítások (PTM) a metilezés, acetilezés, ubikvitilezés, foszforilezés és a glikozilezés.* A fehérjék glikozilezésekor olyan glikokonjugátumok keletkeznek, amelyben változatos szénhidrát egységek (mono-, oligo- és poliszacharidok) kovalens kötéssel módosítanak fehérjéket, O- és N-glikánokat eredményezve. A fehérjék glikozilezése a legelterjedtebb és szerkezetileg legváltozatosabb PTM.² Az O-(N-acetil-glükózaminilezés) egy olyan glikozilezési PTM, amely során egyetlen N-acetil-D-glükózamin (GlcNAc) egység kapcsolódik fehérjék szerin, illetve treonin oldallánc-OH csoportjához β -glikozidos kötéssel. Az O-(N-acetil-glükózaminilezés) reverzibilis és több esetben kompetitív a foszforilezéssel. Míg a foszforilezést számos kináz és foszfatáz enzim szabályozza, az O-(N-acetil-glükózaminilezés)-t egyetlen enzimpár végzi: az uridin difoszfó-N-acetilglükózamin:polipeptid N-acetil- β -D-glükózaminil-transzferáz (OGT), amely

* A magyar szakszövegekben az itt felsorolt módosítások kétféle szóalakja fordul elő: a szerves kémiai szakirodalomban a metilezés, acetilezés, stb. formákat, míg a biokémiai szövegekben a foszforiláció, glikoziláció típusú szóképzést használják. Ebben a dolgozatban a szerves kémiai írásmódot alkalmazzuk.

UDP-GlcNAc szubsztrátot használva felelős a monoszacharid egység fehérjéhez kapcsolásáért, míg a [protein]-3-O-(N-acetil- β -D-glükózaminil)-L-szerin/treonin N-acetilglükózaminil hidroláz (OGA) a hasítását katalizálja. A fehérje O-(N-acetilglükózaminilezés) szinte minden fő sejtfolyamatban szerepet játszik, beleértve a sejtciklust, a genom fenntartását, az epigenetikai szabályozást, a fehérjeszintézist/lebontást, a metabolikus és jelátviteli útvonalakat, a stresszválaszt és az apoptózist.³ Az elmúlt évtizedek vizsgálatai egyértelműen azt mutatják, hogy a fehérjék hiper- vagy hipo-O-(N-acetil-glükózaminilezés)-e szorosan összefügg számos emberi betegséggel, különösen a rák, a cukorbetegség és a neurodegeneratív rendellenességek esetében.

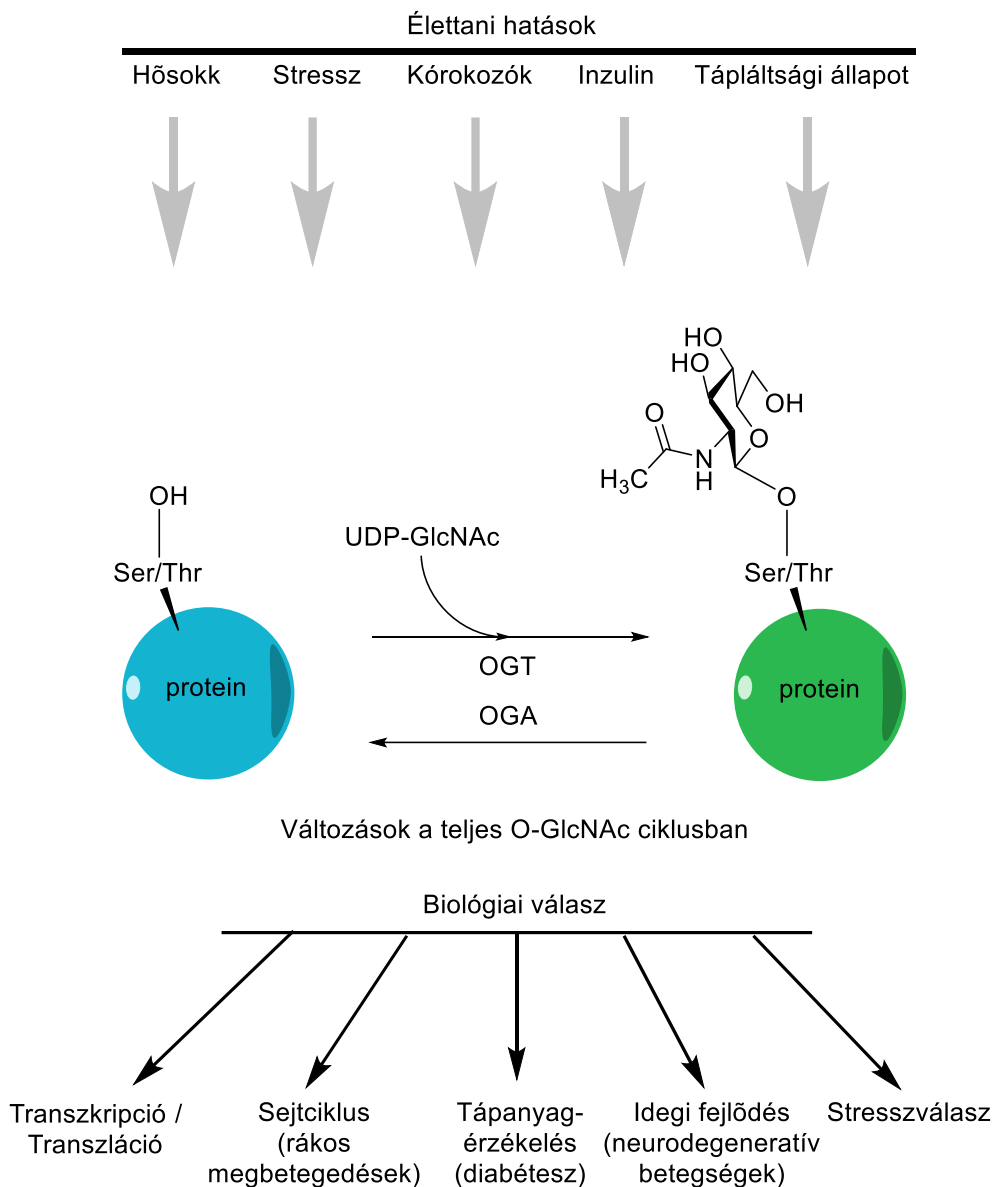
Kutatócsoportunk több évtizede foglalkozik különböző glikoenzimek (glikozil csoportok átvitelét katalizáló fehérjék) inhibitorainak tervezésével és szintézisével. A legnagyobb figyelmet a glikogén-foszforiláz enzim inhibitorai kapták, melyek biokémiai vizsgálatára is jól bevált partnerkapcsolatok jöttek létre. Néhány éve azonban egy új hidroláz enzim, az OGA is felkeltette az érdeklődésünket, melynek azonban biokémiai vizsgálatai még kiaknázatlanok voltak számunkra. Doktori munkám során tehát feladatom volt új OGA inhibitorok szintézise, valamint az enzim heterológ termeltetésének kidolgozása *Escherichia coli* (*E. coli*) expressziós rendszerben és a szintetizált vegyületek OGA enzimre kifejtett gátlási tulajdonságainak vizsgálata.

2. Irodalmi előzmények

2.1 Az *O*-(*N*-acetyl-glükózaminilezés) poszt-transzlációs módosulás

Az *O*-(*N*-acetyl-glükózaminilezés)-t több mint 30 éve tanulmányozzák, de a folyamatban lévő vizsgálatok még mindig hoznak biológiai meglepetéseket. Az *O*-GlcNAc-ot, ezt az egyszerű monoszacharidot, amely *O*-glikozidos kötéssel kapcsolódik polipeptidekhez, kezdetben nem vették észre glikoprotein és proteoglikán rokonainak rendkívül összetett glikánszerkezetei között. Az első leírást követően⁴ a kutatók egy kis csoportja elkezdte vizsgálni lehetséges biológiai funkcióit. A glikozilezés többnyire egymást követő, összehangolt lépésekből áll az endoplazmatikus retikulumban (ER) és a Golgi-készülékben, ami a szekréciós fehérjék glikozilezését eredményezi. Az akkoriban ismert glikoproteinektől eltérően az *O*-GlcNAc módosított fehérjéket azonban a sejtmagban és a citoplazmában találták meg. Az első azonosított *O*-GlcNAc módosított fehérjék a magpórus komplex komponensei voltak.⁵⁻⁸ Ezt követően számos kromatin fehérjét találtak *O*-GlcNAc módosítással, beleértve a transzkripciós faktorokat és a *Drosophila* politén kromoszómáinak sávközi régióit is.⁹ Az *O*-(*N*-acetyl-glükózaminilezés) funkciójának megértését a modern technológiák, köztük a proteomika, az őssejt-technológia, a genomika és a bioinformatika segítették elő. Az *O*-(*N*-acetyl-glükózaminilezés)-nek több különböző aspektusa van: 1) a Ser/Thr oldalláncok hidroxil csoportjainak kapcsolása egyetlen monoszachariddal, ellentétben az *O*- és *N*-glikánok összetett szerkezetével^{4, 5} 2) szinte kizárólag a sejtmagban, a citoplazmában és a mitokondriumban lokalizált fehérjéken van jelen;¹⁰ 3) ezen reverzibilis kovalens módosítást két enzim katalizálja és szabályozza: az *O*-GlcNAc transzferáz (OGT, amely katalizálja a GlcNAc kapcsolását Ser/Thr oldalláncához)¹¹⁻¹³ és az *O*-GlcNAc hidroláz (OGA, amely katalizálja az *O*-GlcNAc hasítását);¹⁴ 4) ez egy rendkívül dinamikus folyamat, ami gyorsan képes a fehérjék működésének módosítására, szélső esetben a funkciójuk be- és kikapcsolására (mint a foszforilezés) és 5) kölcsönhatásba lép más szabályozó PTM-ekkel (pl. kompetitív a foszforilezéssel). Molekuláris szinten az

O-GlcNAc fehérjék ezreit módosítja, amelyek szinte minden funkcionális osztályt képviselnek. Külön meg kell jegyezni, hogy az O-(N-acetil-glükózaminilezés) tápanyag-érzékelő, mivel az UDP-GlcNAc (az OGT donor szubsztrátja) intracelluláris koncentrációja nagymértékben érzékeny a hexózamin bioszintetikus útvonalon (HBP) keresztül történő tápanyagáramlásra. Tápanyag-függősége miatt egy O-GlcNAc módosítás hiánya a fehérjéken olyan kaszkádot indíthat el, amelynek célja, hogy „irányítsa” a sejtet a tápanyag-megőrzéssel kapcsolatos folyamatok fokozására, például a sejtprolifерáció csökkentésére, a tápanyagraktározás és a sejtnövekedés csillapítására. Bizonyos élettani hatások, mint amilyenek az 1. ábrán láthatók, képesek befolyásolni az UDP-GlcNAc szintjét a szervezetben. Igen kifinomult és összetett mechanizmus szabályozza a fehérjék O-(N-acetil-glükózaminilezés)-ét, amely érzékenyen tud reagálni mind a szervezet, mind a sejt energia és tápanyag státuszára, amely az UDP-GlcNAc homeosztázisában nyilvánul meg (1. ábra). Tekintettel arra, hogy az O-(N-acetil-glükózaminilezés)-sel módosított fehérjék funkciójukat tekintve rendkívül sokfélék, nem meglepő, hogy az aberráns fehérje O-(N-acetil-glükózaminilezés) számos kóros elváltozás etiológiájában szerepet játszik, különösen a krónikus anyagcsere-zavarokban (beleértve a cukorbetegséget),^{15, 16} rákos megbetegedésekben^{17, 18} és neurodegeneratív elváltozásokban.¹⁹⁻²¹



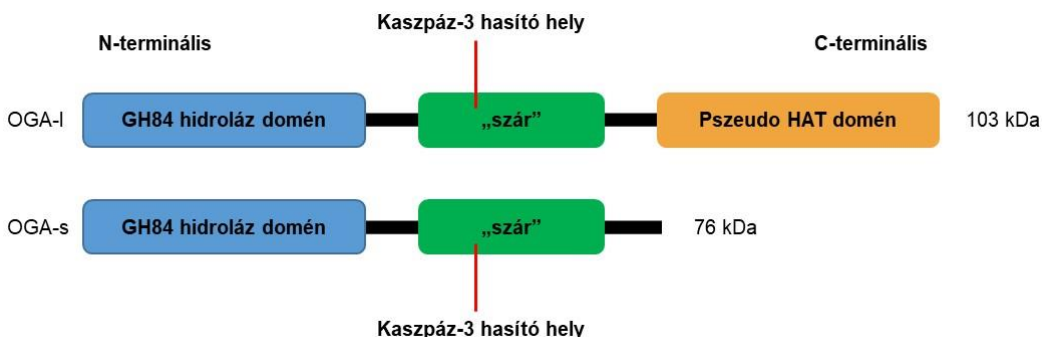
1. ábra Az UDP-GlcNAc homeosztázis érzékenyen reagál a különböző élettani hatásokra és meghatározza a fehérjék O-(N-acetil-glükózaminilezés)-i szintjét. A fehérjék működésének megváltoztatásával a megfelelő sejtválasz indul el.²²

2.2 Az OGT és OGA enzimek

Az emlős sejtekben csupán két enzim felelős az O-GlcNAc fehérjéhez kapcsolásáért és arról történő lehasításáért: az OGT és az OGA. Ebben különbözik a másik igen elterjedt intracelluláris poszt-transzlációs módosítástól, a foszforilezéstől, amely hasonló számú fehérjét módosít, mint az O-GlcNAc (és valójában gyakran közvetlenül verseng az O-GlcNAc helyekért), de több száz protein kináz és több tucat protein foszfatáz közvetíti. Mivel egyetlen enzim pár végzi a glikozilezést és a deglikozilezést, az OGT és az OGA enzimeknek bonyolult szubsztrátszelekciós mechanizmusokat kell alkalmazniuk, hogy képesek legyenek a sejt igényeinek megfelelően a kívánt fehérjék O-(N-acetil-glükózaminilezés)-ére, a szervezet finomhangolására.

Az O-GlcNAc transzferázt (OGT) egyetlen gén kódolja, amely az X (Xq13.1) kromoszómán található. Az OGT gén három különböző izoformát kódol, amelyek az N-terminális ismétlődő tetratrikopeptidek (TPR) hosszában térnek el egymástól. A teljes hosszúságú OGT (ncOGT) izoforma 13,5 tetratrikopeptid ismétlődést tartalmaz.^{23, 24} A tetratrikopeptid ismétlődéseket tartalmazó szekvencia határozza meg az N-terminális domént. A C-terminális - glikoziltranszferáz katalitikus aktivitást mutató - régió multidomén felépítésű. A mitokondriális OGT (mOGT), amely csak a mitokondriumokban lokalizálódik, 9,5 TPR hosszúságú N-terminális doménnel és kis katalitikus aktivitással rendelkezik.²⁵⁻²⁷ Végül a rövid OGT (sOGT) 3,5 TPR-t tartalmaz, és korlátozott kutatási eredmények állnak rendelkezésre a szerepéről és funkciójáról.²⁸ Az OGT szubsztrát-felismerésének mechanizmusáról több elmélet is született, melyeket Stephen és munkatársai foglaltak össze a közelmúltban.²⁹ A szubsztrát szelekciós mechanizmus valószínűleg egyedi minden fehérje vagy fehérjeosztály esetében. A szubsztrát felismerés különböző interakciós mechanizmusok, sejtszintű hatások (a tápanyag állapotából adódó), az adott fehérje számára kijelölt specifikus útvonalak kombinációja (beleértve a partnerfehérjék és az OGT poszt-transzlációs módosításait, speciális aminosav kölcsönhatásokat).

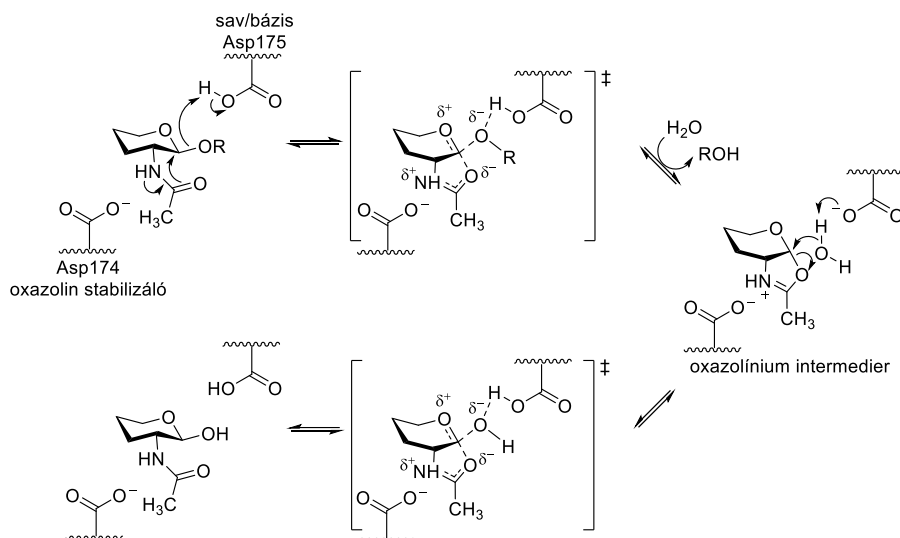
Az O-GlcNAcáz (OGA) egy hidroláz enzim, mely az OGT által a fehérjéhez kapcsolt O-GlcNAc hasításáért felelős. Az OGA-t kódoló gén a 10-es szomatikus kromoszómán található.³⁰ Az enzim két különálló doménből áll, melyeket egy „szár”, úgynevezett kapocs régió köt össze (2. ábra): Az N-terminális domén a hidroláz-aktivitást tartalmazó katalitikus domén, a C-terminális domén pedig hiszton-acetiltranszferáz-szerű (HAT-szerű) domén. Ez utóbbi domén HAT aktivitással nem rendelkezik, azonban, többek között szabályozza a DNS javító fehérjék kromatin asszociációját.³¹ Az OGA enzimnek két izoformája ismert: a hosszú „long” izoforma (OGA-l) elsősorban a sejtmagban és a citoszolban lokalizálódik, míg a rövid „short” izoforma (OGA-s) főleg a sejtmagban fordul elő.



2. ábra Sematikus ábra az OGA enzim izoformáiról

Az OGA a GH84 glikozid-hidroláz család tagja a CAZy osztályozási rendszerben.^{32, 33} A GlcNAc egy kétlépcsős sav/bázis katalitikus mechanizmussal szabadul fel a glikopeptidekből, melyet szubsztrát-segített vagy szomszédcsoport részvétellel történő mechanizmusként is említene. A katalitikus hidrolízis az anomer konfiguráció megtartásával megy végbe, amelyben az aminosav szekvenciában egymást követő két aszparaginsav oldallánc (a humán OGA esetében Asp174 és Asp175) vesz részt. Az Asp175 szolgál általános sav/bázis katalizátorként segítve az aglikon távozását (3. ábra).³⁴⁻³⁷ Az első lépésben az acetamido csoport megtámadja az anomer szénatomot, és oxazolin intermediert jön létre. Az Asp174 oldallánc stabilizálja az oxazolin intermediert. Majd egy

víz molekula, amelyet az Asp175 karboxilát oldallánc aktivál, nukleofil támadást intéz az anomer szénre, és a második lépésben hidrolizálja az intermediert.



3. ábra A GH84 családba tartozó humán OGA enzim katalitikus mechanizmusa

A szerkezeti jellemzés alátámasztja azt a megfigyelést, hogy az OGA válogatás nélkül hasítja a különböző O-GlcNAc helyeket különböző célfehérjéken, nagyjából egyenértékű katalitikus hatékonysággal.³⁸ Összességében elmondható, hogy maga az O-GlcNAc rész modulálja az OGA specificitását, nem pedig a fehérjegerinc vagy az aminosav oldalláncok. Az OGA ilyen csekély szubsztrát-szelektivitása részben megmagyarázhatja, hogy miért elegendő egyetlen enzim az O-GlcNAc eltávolításához az intracelluláris O-GlcNAc homeosztázis fenntartásához. Számos módszert fejlesztettek ki az OGA funkcionális szerepének vizsgálatára. Az emlősökben az OGA kiütése újszülöttkori letalitáshoz vezet, amely a visszamaradott fejlődés és az embriók O-GlcNAc szintje emelkedésének következménye.³⁹ Számos genetikai módszert alkalmaztak az OGA különböző biológiai szerepeinek feltárására (pl. szabályozott körülmények között ki- majd bekapcsolt OGA aktivitás, az OGA enzim siRNA által indukálható kikapcsolása és az OGA adenovírus által közvetített túlzott expressziója).⁴⁰⁻⁴⁴ Valójában az OGT-hez hasonlóan az OGA működése szigorúan szabályozott, és ha ez a szabályozás

nem megfelelő, aberráns O-GlcNAc ciklus alakul ki, amely számos betegséget okoz.^{17, 45-48}

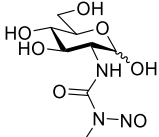
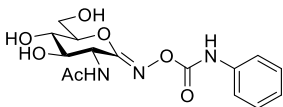
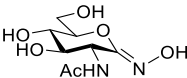
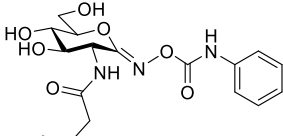
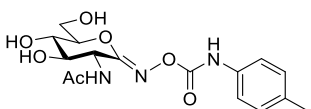
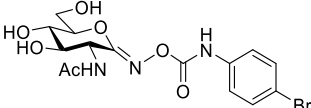
A *HEXA* és *HEXB* gének két olyan fehérje láncot kódolnak, amelyek asszociációjából funkcionális hexóزامинidáz enzim áll elő. A hexóزامинidázok szintén hidrolitikusan hasítják a terminális N-acetil-D-glükóزامинot glikokonjugátumokról. A β -hexóزامинidáz A (HexA) izoenzim heterodimer, a *HEXA* gén kódolta α és a *HEXB* kódolta β láncokból áll. A homodimer izoenzim, a hexóزامинidáz B (HexB), két β -alegységből áll. Az α - és β -alegységek kb. 60%-ban azonosak.^{49, 50} Mindkét alegység katalizálja a terminális β -N-acetilglükóزامин és β -N-acetilgalaktóزامин lehasítását a glikokonjugátumok széles spektrumáról. A β alegység biztosítja a semleges szubsztrátok hidrolízisét, és szükséges a G_{M2} -aktivátor komplex HexA-hoz való kötődéséhez, G_{M2} gangliozid hidrolízisekor. A G_{M2} gangliozid a HexA legfontosabb természetes szubsztrátja.^{51, 52} Az α alegység még a negatív töltésű szubsztrátokról, mint pl. keratán-szulfátról, is képes lehasítani a β -glikozidos kötésben levő GlcNAc-6-szulfát csoportokat. Mindkét enzim a glikozid-hidrolázok GH20-as családjába tartozik, és általában a lizoszómákban belül lokalizálódik. Ezen enzimek működési zavara gangliozidok és más glikokonjugátumok felhalmozódását eredményezi a lizoszómákban, ami a Tay-Sachs- és Sandhoff-kórként ismert, öröklődő neurodegeneratív rendellenességeket okozza.⁵³ A két enzimes család (GH20 és GH84) katalitikus mechanizmusa megegyezik, valamint az aktív hely szerkezete is nagy hasonlóságot mutat függetlenül attól, hogy szekvenciálisan nincs közöttük hasonlóság. Könnyű belátni, hogy fontos a szelektív inhibitorok fejlesztése, hogy elkerüljük a nem kívánt mellékhatásokat a gyógyszerként történő alkalmazásuk során.

2.3 Ismert OGA inhibitorok

A kis molekulájú OGA inhibitorok nagy érdeklődést váltottak ki az *O*-(*N*-acetyl-glükózaminilezés) fiziológiai szerepének vizsgálatában. Ezeknek a vegyületeknek a többsége szénhidrát alapú inhibitor, melyek vagy a katalitikus reakció közbenső termékeit vagy az átmeneti állapotokat utánozzák, valamint ismert néhány nem szénhidrát alapú inhibitor is. Az inhibitorok itt következő bemutatása az irodalomban megtalálható összefoglalók alapján készült.⁵⁴⁻⁵⁶

A Streptozotocin, (*N*-metil-*N*-nitrozoureido-*D*-glükózamin, STZ, **1**, 1. táblázat) egy természetes vegyület, amelyet régóta használnak I-es típusú cukorbetegség előidézésére állatmodellekben a hasnyálmirigy-szigetekre gyakorolt káros hatása miatt. Az STZ (**1**) gyenge OGA-inhibitor ($K_i = 1,5 \text{ mM}$),⁵⁷ nyilvánvaló „off-target” hatásokkal, ezért nem alkalmas eszköz az *O*-GlcNAc sejtbiológia tanulmányozására. Néhány tanulmány azonban az **1** STZ-t használta az *O*-GlcNAc módosulás fiziológiai szerepének vizsgálatára az Alzheimer-kórban,⁵⁸ valamint az apoptózisban.^{59, 60} A PUGNAc (*O*-(2-acetamido-2-dezoxi-*D*-glükopiranozilidén)-imino-*N*-fenilkarbamát, **2**, 1. táblázat) az OGA erős inhibitora ($K_i = 46 \text{ nM}$),³⁴ azonban nem szelektív, mivel hasonló módon gátolja a GH20 családba tartozó *N*-acetylhexózaminidázokat. Az *N*-fenil-karbamát rész hidrogén-kötéseket tud kialakítani az oxim nitrogénatomja és az aktív centrum aminosav oldalláncai között, az aktív hely zsebéből kiforduló fenil csoport pedig kölcsönhatásokat hoz létre a hidrofób aromás oldalláncokkal.⁶¹ A fenil-karbamát csoportot nem tartalmazó LOGNAc (2-acetamido-2-dezoxi-*D*-glükonohidroximo-1,5-lakton, **3**, 1. táblázat) körülbelül 30-szor gyengébb inhibitor ($K_i = 1,68 \text{ }\mu\text{M}$),¹⁴ ami azt mutatja, hogy ez a rész jelentősen hozzájárul a kötődéshez.

1. táblázat Streptozotocin, PUGNAc és hasonló OGA inhibitorok

Inhibitor	K_i (OGA) [μ M]	K_i (HexB) / K_i (OGA)
 Streptozotocin (STZ, 1)	1500	n. a.
 PUGNAc, 2	0,046	1
 LOGNAc, 3	1,68	n. a.
 butil-PUGNAc, 4	2,4	11
 5	0,028	1
 6	0,056	1

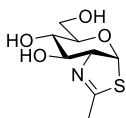
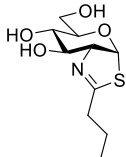
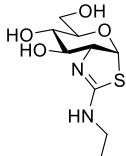
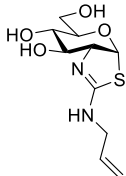
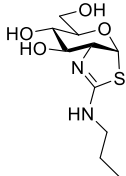
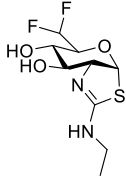
n. a.: nincs adat

Habár a GH20 és GH84 családba tartozó enzimek katalitikus mechanizmusa megegyezik, a GH84 aktív centrumában található zseb mélyebb, így lehetőség van a 2-acilamido csoportok lánchosszabbítására, ezáltal a szelektivitás növelésére. A butil-PUGNAc (**4**, 1. táblázat), habár veszít gátlóképességéből ($K_i = 2,4 \mu\text{M}$)⁶² a 2 PUGNAc-hoz képest, szelektivitása jelentősen nő a hosszabb láncnak köszönhetően. A négy szénatomnál hosszabb láncok azonban már jelentősen rontják a gátlóképességet és a szelektivitást is.⁶² A PUGNAc (**2**) fenil csoportjának szubsztituálása (**5**, **6**, 1. táblázat) kis mértékben képes befolyásolni a gátlóképességet, de a szelektivitást nem javítja.⁶³

Knapp és munkatársai állították elő az 1,2-didezoxi-2'-metil- α -D-glükopiranozo-[2,1-d]- $\Delta 2'$ -tiazolint⁶⁴ (NAG-tiazolin, **7**, 2. táblázat), mely jelentős mértékben gátolta mind az OGA, mind a HexB enzimet ($K_i = 70 \text{ nM}$ mindkét enzimre).³⁴ A NAG-tiazolin (**7**) szerkezetéből adódóan más módon kötődik az enzim aktív centrumához, mint a PUGNAc (**2**). Míg utóbbi az sp^2 hibridállapotú szénatom miatt az oxokarbénium-ion átmeneti állapothoz hasonló szerkezettel bír,⁶⁵ a NAG-tiazolin (**7**) geometriailag az oxazolinium intermedierre hasonlít, amelynél a piranóz gyűrű enyhén torz pszeudo-szék 4C_1 konformációban van.⁶⁶ Az erősen konzervált aktív hely egy mély zsebet mutatott a metil csoport alatt, amely nagyobb szubsztituenseket képes befogadni. Ez az üreg nincs jelen a lizoszómális GH20 β -hexózaminidázokban. Ez a felfedezés vezetett a szelektív humán OGA inhibitor, az NButGT (**8**, 2. táblázat) szintéziséhez, amelynél *n*-propil-lánc kapcsolódik a tiazolingyűrűhöz ($K_{i(\text{OGA})} = 0,230 \mu\text{M}$, $K_{i(\text{HexB})} = 340 \mu\text{M}$).³⁴ Ismert szelektivitása miatt a **8** NButGT-t széles körben használják az O-GlcNAc módosítás funkcionális szerepének tanulmányozására, mivel a PUGNAc (**2**) esetében jelentkező „off-target” hatásokat nem észlelték. Az Alzheimer-kór (AD) egy *in vivo* állatmodelljének vizsgálata kimutatta, hogy ez a szelektív inhibitor használható a β -amiloid plakkok lerakódásának csökkentésére és a memória megmentésére.⁶⁷ Az oldatban lévő NButGT (**8**) nagy része deprotonált formában van jelen 7,4-es fiziológiás pH mellett, ami gyenge ionos kölcsönhatásra utal a

kulcsfontosságú katalitikus Asp174-gyel, amely elősegíti az anomer centrummal szomszédos acetamido csoport támadását.⁶⁸ A Thiamet-G (**9**, 2. táblázat) esetében a metilén csoport NH-ra történő cseréje a tiazolin gyűrű endociklusos nitrogénjének bázikusságát növeli, így elősegíti annak protonálódását és erősebb ionos kölcsönhatás létrejöttére van lehetőség a katalitikus Asp174-gyel. Ezáltal a Thiamet-G (**9**) erősebben kötődik az aktív centrumhoz ($K_i = 21$ nM) és a szelektivitása is jelentősen nőtt HexB-vel szemben.⁶⁹ A **9** Thiamet-G-t számos csoport használta a fehérjék O-GlcNAc szintjének növelésére, valamint a tau-aggregáció és az amiloid patológiák elleni védelemre AD állatmodellekben.⁷⁰⁻⁷³ A **9** Thiamet-G-t a humán leukémiás sejtek paklitaxellel, a rák kezelésére használt mikrotubulus-stabilizáló szerrel szembeni érzékenyítésére is használták anélkül, hogy a sejtek életképességét befolyásolta volna.⁷⁴ A 2'-amino-alkil-láncok méretének növelése (**10**, **11**, 2. táblázat) ugyan nem eredményezte a vegyületek erősebb kötődését, de a szelektivitást jelentős mértékben fokozta HexB-vel szemben.⁷⁵ A **9** Thiamet-G viszonylag alacsony membrán-permeabilitást mutatott, ezért McEachern és munkatársai kísérletet tettek a permeabilitás növelésére.⁷⁶ Ez eredményezte az MK-8719 (**12**, 2. táblázat) szintézisét. A primer CH₂OH csoport difluormetilre történő cseréje jelentős mértékben növelte a vér-agy gáton való átjutást, és a vegyület megtartotta erős gátlóképességét ($K_i = 7,9$ nM) és szelektivitását is.⁷⁶

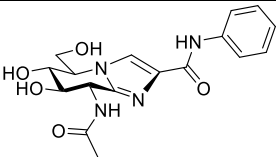
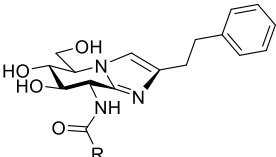
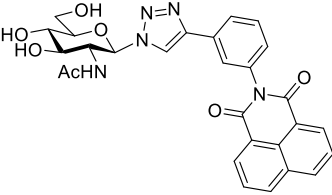
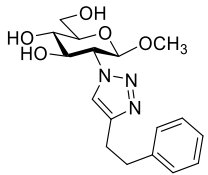
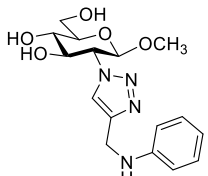
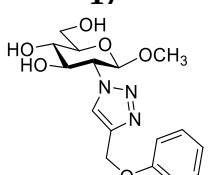
2. táblázat Átmeneti állapot analóg OGA inhibitorok

Inhibitor	K_i (OGA) [μ M]	K_i (HexB) / K_i (OGA)
 NAG-tiazolin, 7	0,070	1
 NButGT, 8	0,230	1500
 Thiamet-G, 9	0,0021	350 000
 10	0,0032	950 000
 11	0,0020	1 850 000
 MK-8719, 12	0,0079	> 1200

A PUGNAc-imidazol hibrid (**13**, 3. táblázat) egy módosított glüko-nagstatin származék, mely tartalmazza a **2** PUGNAc-ban lévő fenil-karbamát csoportot. OGA enzimmel szembeni gátlása gyengébb ($K_i = 3,8 \mu\text{M}$), mint a PUGNAc (**2**) gátlása.⁷⁷ Az amid linker orientációja kedvezőtlen, síkban van az imidazol gyűrűvel és így a fenil csoportot kifordítja a hidrofób oldalláncokkal körülvett zsebből.⁷⁷ Ezért van Aalten és munkatársai a fenil- és imidazol csoportok közötti amid-linkert két metilénegységgel helyettesítették, és a 2'-helyzetben lévő alkil-lánc méretét is növelték a szelektivitás növelése érdekében.^{78, 79} A GlcNAcstatin B-H (**14**, 3. táblázat) vegyületek 2'-helyzetben változatosan szubsztituált glüko-nagstatin származékok. A leggyengébb kötődést a GlcNAcstatin F 3-merkaptopropánamid származék mutatta ($K_i = 11,2 \text{ nM}$), míg a legerősebbet a GlcNAcstatin B és D etán- és propánamid származékok mutatták ($K_i = 0,42 \text{ nM}$ és $0,72 \text{ nM}$). Valamennyi vegyület szelektívnek bizonyult a lizoszómális β -hexózáminidázal szemben, a legszelektívebb a GlcNAcstatin G penta-2,4-diénamid származék (szelektivitás: $> 900\,000$) és a GlcNAcstatin H butánamid származék (szelektivitás: $35\,000$).^{78, 79}

Li és munkatársai glikozil-azidok és alkinek közötti Cu(I)-katalizált „click” cikloaddíciós reakcióval létrehoztak egy molekulakönyvtárat, amely vegyületeket vizsgálták OGA enzimmel szemben. A leghatékonyabb inhibitornak a **15** triazol származék bizonyult ($K_i = 186 \mu\text{M}$, 3. táblázat).⁸⁰ Később egy másik kutatócsoport ugyanezt a reakciótípust alkalmazta olyan vegyületek szintézisére, melyekben a 2-acetamido csoportot cserélték triazol linkerre. Az így előállított 12 vegyületből három származék mutatott számottevő OGA gátlást (**16**; **17**; **18**; $\text{IC}_{50} = 0,50$; $0,52$ és $0,72 \mu\text{M}$, 3. táblázat), valamint szelektivitást HexB-vel szemben.⁸¹

3. táblázat Heterociklust tartalmazó OGA inhibitorok

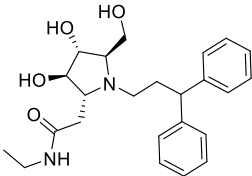
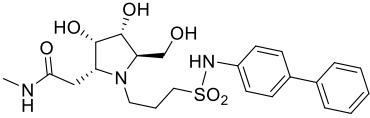
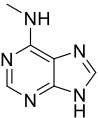
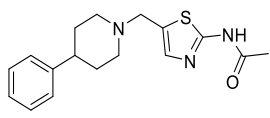
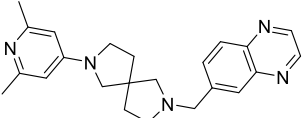
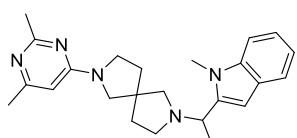
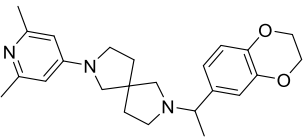
Inhibitor	K_i (OGA) [μM]	K_i (HexB) / K_i (OGA)
 13	3,8	n. a.
 14 GlcNAcstatin B-H, 14 R = Me, Et, Pr, iPr, $(\text{CH}_2)_2\text{SH}$, $\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}$	$4,2 \cdot 10^{-4}$ - $1,1 \cdot 10^{-2}$	4 - 900 000
 15	186	n. a.
 16	$\text{IC}_{50} = 0,50$	1100
 17	$\text{IC}_{50} = 0,52$	1100
 18	$\text{IC}_{50} = 0,72$	800

n. a.: nincs adat

Számos különböző gyűrűméretű iminociklitol származék található az irodalomban, amelyek hatékony inhibitoroknak bizonyultak különböző glikozid-hidroláz családokkal szemben,⁸²⁻⁸⁴ köztük a GH20 családba tartozó β -N-acetilhexóزامинидázok⁸⁵⁻⁸⁷ és a funkcionálisan analóg, GH84 családba tartozó OGA enzim^{88, 89} esetében. A fordított amid pirrolidinek, melyek N1 helyzetben szubsztituált propil-láncot tartalmaznak (**19** és **20**, 4. táblázat), bizonyultak a legjobb inhibitoroknak ezen származékok közül ($IC_{50} = 3,7$ nM és 2,0 nM), valamint szelektivitásuk is számottevő β -N-acetilhexóزامинидázokkal szemben (65 000 és 150 000).⁸⁸

Mivel egyetlen ismert szénhidrát alapú OGA inhibitor sem felel meg a Lipinski-féle „drug-like” szabályoknak, Dorfmueller és munkatársai⁹⁰ nagyszámú molekula szűrésével felfedeztek egy N⁶-metiladenin származékot (**21**, 4. táblázat), mely megfelel a „drug-like” szabályoknak és alacsony mikromólos tartományban gátolja az OGA enzimet ($IC_{50} = 4$ μ M), valamint szelektivitást is mutat a GH20 családdal szemben. Johnson és munkatársai egy sor nem szénhidrát alapú, 2,5-diszubsztituált tiazolt állítottak elő⁹¹ és vizsgálták az OGA enzimmel szembeni gátlásukat. A **22** vegyület (4. táblázat) $IC_{50} = 0,2$ μ M gátlást mutatott humán OGA enzimmel szemben.⁹² A közelmúltban a szabadalmi irodalomban egy sor biciklusos spiropiperidint és spiropirrolidint (**23-25**, 4. táblázat) nagyon erős OGA-inhibitorként azonosítottak, amelyek IC_{50} -értéke a pikomoláris tartományba esik az enzimátikus vizsgálatban, valamint a HEK293 sejteket alkalmazó sejtes vizsgálatban.⁹³ A vegyületek hasznosak lehetnek számos tauopathiával összefüggő neurodegeneratív betegség, köztük az Alzheimer-kór, a frontotemporális demencia, a Pick-kór és a Down-szindróma kezelésében.⁹⁴

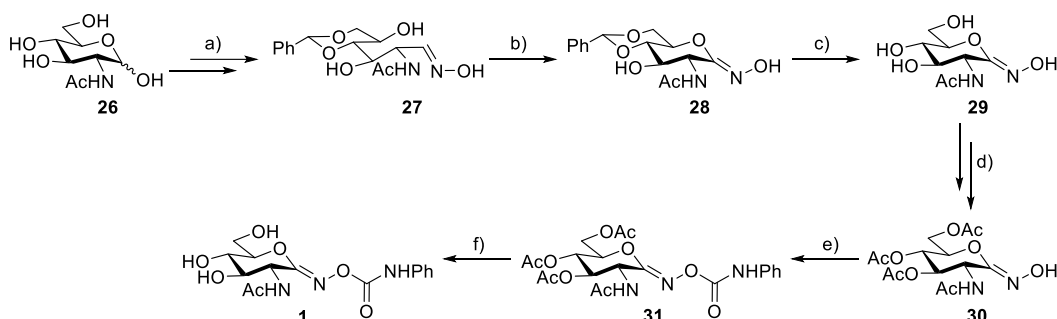
4. táblázat Iminociklitolok és egyéb, nem szénhidrát alapú OGA inhibitorok

Inhibitor	IC ₅₀ (OGA) [nM]	IC ₅₀ (HexB) / IC ₅₀ (OGA)
 19	3,7	65 000
 20	2	150 000
 21	4000	75
 22	200	n. a.
 23	0,00665	n. a.
 24	0,00558	n. a.
 25	0,00675	n. a.

n. a.: nincs adat

2.4 Szintetikus előzmények

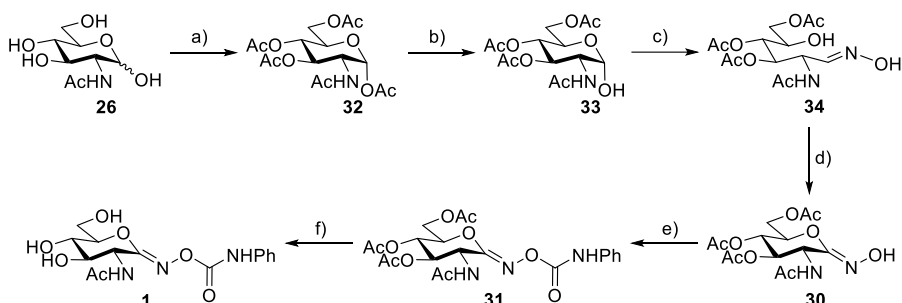
A PUGNac (2) szintézisét először Beer és Vasella 1990-ben írták le (4. ábra).⁹⁵ A nyolclépéses szintézisút (összhozam 14 %) két kritikus lépést is tartalmazott: a) a **27** kiindulási vegyület (melyet két lépésben kaptak a **26** *N*-acetyl-D-glükózaminból) nem teljes és alacsony hozamú átalakulása a **28** hidroximo-1,5-laktont eredményező oxidációs lépésben (50% hozam, 65% konverzió), b) a benzilidén védőcsoport eltávolítása nátriummal cseppfolyós ammóniában, mely a **29** szabad oximot eredményezi. Mindkét transzformáció multigrammos szintézisre való kiterjesztése alacsonyabb hozamokhoz vezetett, és kényelmetlen feldolgozási eljárásokkal járt.⁹⁶ A **30** acetyl-védőcsoportokkal védett oximot két lépésben kapták jó hozammal, melyet fenil-izocianáttal reagáltatva, majd az acetyl-védőcsoportok eltávolításával kapták az **2** PUGNac-ot.



4. ábra A PUGNac (**2**) első közölt szintézise: a) két lépés,^{97, 98} 81 %; b) MnO_2 , MeOH, 50°C, 12h, 35 % **27**, 50 % **28**; c) Na/NH₃, MeOH, -35°C, 86 %; d) 1. Ac₂O, piridin, 0°C-tól rt., 96 %; 2. MeNH₂, EtOH, 0°C, 71 %; e) PhNCO, Et₃N, THF, 3h, 94 %; f) NH₃/MeOH, 0°C, 4h, 61 %.

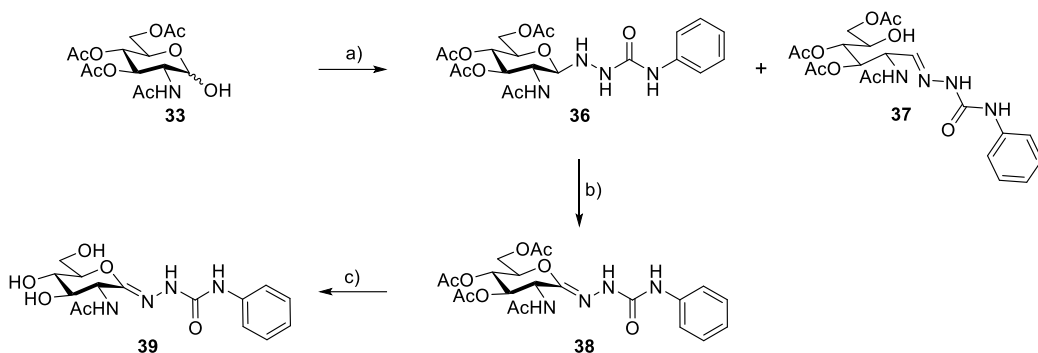
2000-ben Mohan és Vasella egy javított, hatlépéses (összhozam 15 %) szintézisutat közöltek (5. ábra).⁹⁶ A szerzők a szintézisút első felét módosították; a **26** *N*-acetyl-D-glükózamin peracetilezésével, majd szelektív dezacetilezéssel kapták a **33** triacetátot. A **33** triacetátot hidroxilamin-hidrokloriddal reagáltatva állították elő a **34** oximot. A **34** oxim reakciója MnO_2 -dal nem vezetett eredményre, így a **30** hidroximo-1,5-laktont DBU/NCS-sel történő oxidációval kapták, de csak 59 %-os hozammal, és ennél a lépésnél a -40°C hőmérséklet tartása volt a kritikus:

alacsonyabb hőmérsékleten az átalakulás nem volt teljes, míg magasabb hőmérsékleten az 1,4-lakton-oxim képződött.



5. ábra A PUGNAc (**2**) javított szintézise: a) Ac_2O , piridin, rt., 92 %; b) $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, THF/MeOH, rt., 24h, 74 %; c) $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$, piridin/MeOH, reflux, 2h, 75 %; d) DBU, NCS/ CH_2Cl_2 , -40°C , 59 %; e) PhNCO , Et_3N , CH_2Cl_2 , rt., 3h, 70 %; f) vizes NH_3 , -10°C -tól rt., 3h, 73 %.

Wolk és munkatársai 1992-ben közzölték a 2-acetamido-2-dezoxi-D-glükono-1,5-lakton 4-fenilszemikarbazon (**39**) háromlépéses szintézisét (6. ábra).⁹⁹ Első lépésben a **33** laktolt forralták 4-fenilszemikarbaziddal (**35**) 1,2-diklóretánban, katalitikus mennyiségű oxálsav jelenlétében. Azt tapasztalták, hogy két termék is keletkezett, a gyűrűs **36** és a nyílt láncú **37** forma, melyek egyensúlyban vannak egymással. A két vegyületet „flash”-kromatográfiával elválasztották egymástól, és a **36** gyűrűs származékot reagáltatták tovább. Az oxidációs reakciót számos reagenssel elvégezték (pl.: jódbenzol, MnO_2 , PbO_2), a legjobbnak a CrO_3 -piridin komplex bizonyult diklórmétánban szobahőmérsékleten, mely során jó hozammal kapták a megfelelő glükono-1,5-lakton-szemikarbazon (**38**). A védőcsoport eltávolítását ammóniával telített metanollal végezték. A 2-acetamido-2-dezoxi-D-glükono-1,5-lakton 4-fenilszemikarbazon (**39**) nagyon hasonló a **2** PUGNAc-hoz, ezért megvizsgálták a vegyület inhibíciós képességét szarvasmarha borjú veséből származó HexA/HexB enzimre. A vegyület jó inhibitornak bizonyult ($K_i = 130$ nM), ám az „O” cseréje „NH”-ra nem okozott javulást a gátlásban.



6. ábra A 2-acetamido-2-dezoxi-D-glükono-1,5-lakton 4-fenilszemikarbazon (**39**) szintézise: a) $\text{NH}_2\text{NHCONHPh}$ (**35**), kat. $(\text{COOH})_2$, $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$, 58 % **36**, 19 % **37**; b) CrO_3 -piridin, CH_2Cl_2 , 74 %; c) NH_3/MeOH , 83 %.

2.5 Biokémiai előzmények

Az OGA enzim szekvenciája rendkívül konzervatív magasabb szintű eukarióta szervezetekben, főleg emlősökben.³⁰ A humán enzim *N*-terminális ~400 és a *C*-terminális ~350 aminosav hosszúságú szakasza a legnagyobb mértékben konzervált. Ezt a két domént egy nagyon variábilis, ~150 aminosavból álló régió választja el. 1994-ben Dong és Hart patkány lépéből izolálták az OGA enzimet, majd tisztítás után vizsgálták stabilitását és aktivitását különböző körülmények között.¹⁴ Megállapították, hogy az OGA enzim pH optimuma a semleges tartományban van, ellentétben a β -*N*-acetilhexóزامинидázokkal szemben, melyek a savas tartományban aktívak. Az általuk izolált enzim kizárólag a fehérjék szerin vagy threonin oldalláncához kapcsolódó β -D-GlcNAc-ot hasította, míg nem mutatott aktivitást sem a GalNAc-val, sem más olyan szubsztráttal szemben, amelyen a β -*N*-acetilhexóزامинидázok aktívak. A mesterséges *p*-nitrofenil-GlcNAc (*p*NP-GlcNAc) szubsztrátra nagy, 2,55 mM-os K_M értéket mértek 50 mM-os Na-kakodilát pufferben 7,0-s pH-n. Vizsgálták az enzimet különböző kationok jelenlétében és megállapították, hogy a Cu^{2+} , Hg^{2+} , Zn^{2+} és Cd^{2+} ionok gátolják az aktivitást 1 mM-os koncentrációban, míg a Mg^{2+} , Fe^{3+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} és Co^{2+} ionok jelenléte nincs hatással az enzimre. Etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA) hozzáadásával szintén nem

változik az aktivitás, így valószínűsíthető, hogy az aktivitáshoz nincs szükség kétértékű kationokra. A nagy sókoncentráció (1 M NaCl, és 75 mM trisz-(hidroximetil)-aminometán [Tris]) szintén gátolja az enzim aktivitását. Megvizsgálták néhány β -*N*-acetilhexóزامинидáz inhibitorral szemben is, köztük a PUGNAc (2) és LOGNAc (3) vegyületekkel, melyek jó inhibitoroknak bizonyultak (K_i = 52 nM és 1,68 μ M)

Később Gao és munkatársai szarvasmarha agyból is izoláltak és tisztítottak OGA enzimet, majd aminosav szekvencia analízisnek vetették alá.³⁰ A kapott szekvencia alapján a humán genomban azonosították a humán OGA enzimet kódoló gént. Ennek alapján molekuláris biológiai módszerekkel izolálták a cDNS fragmenst, amely kódolja a 916 aminosavat tartalmazó nukleocitoplazmatikus OGA enzimet, amely a hosszú izoformának felel meg. A hOGA izoformát emlős expressziós rendszerben fejezték ki először His₆-tag fúziós fehérjeként. Egy egyszerű IMAC affinitás kromatográfia segítségével, egy lépésben tisztították a rekombináns enzimet, majd vizsgálták aktivitását.

Egy másik kutatócsoport szintén emlős expressziós rendszerben, HEK-293 sejtekben fejezte ki a teljes hosszúságú hOGA izoformát, *N*-terminális GST–hOGA fúziós fehérjeként.¹⁰⁰

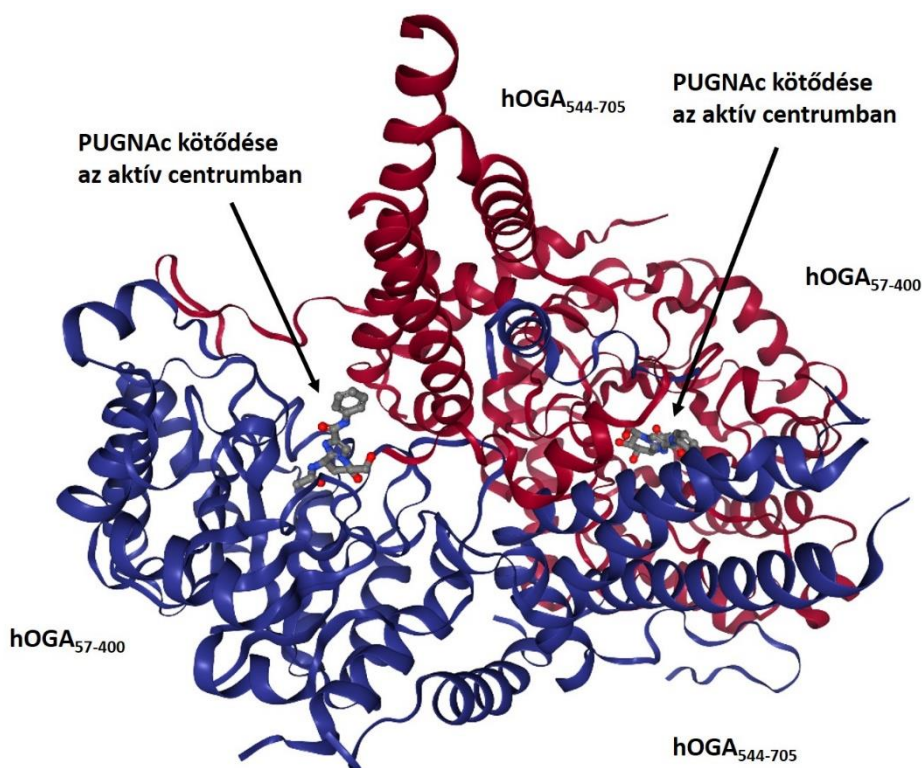
Prokarióta, *E. coli* expressziós rendszerek is megfelelőnek bizonyultak a teljes hosszúságú hOGA enzim termeltetésére. A kapott enzim preparátumok biokémiai paraméterei azonban eltérést mutattak. Vocadlo és munkatársai 2005-ben kanamicin rezisztenciát hordozó pET28a expressziós vektorba inzertálták az OGA enzimet kódoló plazmidot, majd Tuner (λ DE3) *E. coli* sejtekbe transzformálták és termeltették a rekombináns enzimet *N*-terminális His₆-tag fúziós fehérjeként, és az oligohisztidin szekvenciát koordinálni képes IMAC affinitás kromatográfiával tisztították.⁶⁸ Az így kapott enzim kinetikai paramétereit PBS (10 mM nátrium-foszfát puffer, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl) pufferben vizsgálták 7,4-es pH-n. Ilyen körülmények között 206 μ M-os K_M értéket kaptak pNP-GlcNAc szubsztrátra.

Egy másik prokarióta expressziós rendszerben pBAD/HisA expressziós vektort és *E. coli* TOP 10 sejteket alkalmazva *N*-terminálisan His₆-tag szekvenciát tartalmazó rekombináns hOGA fehérjét kaptak.¹⁰¹ Meglepően nagy ionerősség mellett vizsgálták az enzim aktivitását (0,5 M citrát/foszfát pufferben, 6,5-ös pH-n). Ilyen körülmények között 1,1 mM-os K_M értéket kaptak *p*NP-GlcNAc szubsztrátra.

A különböző expressziós rendszerekben termeltetett és különböző módon tisztított fehérje preparátumok tisztaságát nehéz megítélni az irodalomban fellelhető közlemények alapján, mivel ezek nem tartalmazzak elektroforetikus analízist, csupán Western-blot ábrát mutatnak be, amelyhez oligohisztidin szekvenciára specifikus antitestet használnak.

Az emlős és prokarióta mellett bakulovírus-vektort alkalmazó expressziós rendszerben is termeltették a hOGA fehérjét. A hOGA háromdimenziós szerkezetének megfejtéséhez ez utóbbi, a *Spodoptera frugiperda* rovarsejttenyészetben termelt hOGA különböző fragmenseinek sikeres egykristály növesztése, majd röntgendiffrakciós szerkezetmegoldása járult hozzá. 2017-ig nem sikerült a teljes hosszúságú hOGA enzim kristályosítása és a szerkezet megoldása. Több kutatócsoport is próbálkozott egyrészt rövidített aminosav szekvenciájú hOGA fehérje, valamint különböző hOGA fragmensek kifejezésével, amelyek egykristály növesztésére alkalmasak voltak, és megőrizték aktivitásukat a teljes hosszúságú hOGA szubsztrátok iránt. Különösen a hOGA fragmensekkel történő kísérletek bizonyultak eredményesnek, ahol az első fragmens a katalitikus domén volt (hOGA₅₇₋₄₀₀) kihagyva az *N*-terminális első 56 aminosavból álló rendezetlen szekvenciát.¹⁰² A második fragmens a katalitikus domén és a pszeudo-HAT domén közötti úgynevezett kapocs régió, amelyből kihagyták az *N*-terminális rendezetlen szakaszt (hOGA₅₄₄₋₇₀₅).¹⁰² A két fragmens komplexet alkot oldatban, valamint hasonló katalitikus tulajdonságokkal rendelkezik, mint a teljes hosszúságú hOGA. A két fragmens közös kristályosítása alkalmasnak bizonyult röntgendiffrakciós szerkezetmeghatározásra 3,21 Å felbontásban. A szerkezetben a katalitikus domén

szorosan kötődik a kapocs régióhoz, egy komplexet alkot, amely dimerizálódik. PUGNac (2) jelenlétében kristályosították a hOGA_{57-400/544-705} konstrukciót (PDB kód: 5UHO).¹⁰² A szerkezetben azonosítani lehetett az aktív centrumot, melyet nem csak a katalitikus domén alkot, hanem a dimer szerkezetben a második komplex kapocs régiója is hozzájárul a felépítéséhez (7. ábra). A későbbiekben bebizonyosodott, hogy oldatban is dimer formában van jelen, és az aktivitást ez képviseli.¹⁰³ A hOGA_{57-400/544-705} konstrukció kinetikai paraméterei *p*NP-GlcNac szubsztrátra $K_M = 40 \mu\text{M}$, a katalitikus állandó értéke közel azonos, mint a hosszú izoformának. A 2 PUGNac-kal történő gátlás hasonló eredményt hozott, mint a hosszú izoforma esetében.¹⁰²

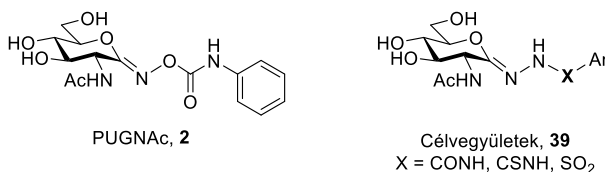


7. ábra A hOGA_{57-400/544-705} - PUGNac (2) (PDB kód: 5UHO) komplex kristályszerkezete. Kék és bordó színekkel vannak jelölve a hOGA_{57-400/544-705} konstrukció monomerjei. A fehérje ábrázolása szalagdiagrammal történik, a másodlagos szerkezeti elemeket jelölve, míg a ligandum megjelenítése golyó és pálcika ábrázolásmóddal történik.

3. Saját vizsgálatok

3.1 Célkitűzés

Habár a PUGNAc (**2**) egy gyakran és széleskörűen alkalmazott inhibitor, a szintézise tartalmaz néhány kritikus lépést, melyek jelentősen rontják a szintézisút összhozamát (lásd: 2.4 Szintetikus előzmények). Az *N*-fenil-karbamát rész fontos szerepet játszik az enzimhez való kötődésben: az oxim nitrogénje és a karbamát NH-ja hidrogénkötések kialakítására képes az aktív centrum aminosav oldalláncaival, a fenil csoport pedig az aromás oldalláncokkal alakít ki kölcsönhatást. Korábban vizsgálták a PUGNAc aromás gyűrűjének szubsztituáltságát, de méretének növelését nem, valamint megállapították, hogy 2-es helyzetben hosszabb *N*-acil láncok alkalmazása növeli szelektivitását hexóزامинидázokkal szemben. A cukorgyűrű és az aromás csoport közötti linker változtatására azonban nincs példa az irodalomban. Ezeket az előzményeket szem előtt tartva 2-acetamido-2-dezoxi-D-glükono-1,5-lakton hidrazonok (**39** célvegyületek a 8. ábrán) szintézisét terveztük. Vizsgálni kívántuk a cukorgyűrű és az aromás csoport közötti linker ($X = \text{CONH}$: szemikarbazonok, $X = \text{CSNH}$: tioszemikarbazonok, $X = \text{SO}_2$: szulfonilhidrazonok) hatását a kötődésre. Az aromás rész ($\text{Ar} = \text{fenil}$, szubsztituált-fenil, naftil) elektronsűrűségének és méretének változása is befolyással lehet a kötődésre. A **39** célvegyületek előállítása várhatóan egyszerűbb, mint a PUGNAc (**2**) esetében, azonban a nagyfokú szerkezeti hasonlóság miatt a változtatások ellenére megőrizhetik, vagy javíthatják az inhibíciós tulajdonságát.



8. ábra PUGNAc (**2**) és **39** célvegyületek szerkezete

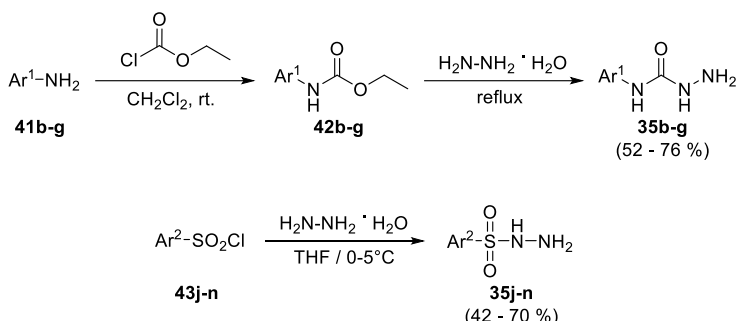
Ahhoz, hogy a szintetizált vegyületek inhibíciós tulajdonságait vizsgáljuk, terveztük a hOGA enzim heterológ expressziójának kidolgozását a rendelkezésünkre álló *E. coli* expressziós törzsekben. A 2.5 Biokémiai előzmények fejezet tanulmányozása után könnyű belátni, hogy a megfelelő hOGAexpressziós rendszer alkalmazása nagy fontossággal bír funkcionális enzim termeltetés szempontjából. A rekombináns hOGA enzim biokémiai jellemzése elengedhetetlen, hogy alátámasszuk ezt a funkcionalitást és meghatározzuk az enzim kinetikai paramétereit. A GH84 családba tartozó hOGA katalitikus mechanizmusa megegyezik a GH20 családba tartozó β -N-acetilhexóزامинидázokkal (HexA és HexB), ami miatt a legtöbb OGA inhibitor gátolja a hexóзаминидázokat is, mely tulajdonság nem kívánt mellékhatásokhoz vezethet az inhibitor alkalmazása során. Ezért a szintetizált vegyületek inhibíciós tulajdonságait vizsgálni szükséges a GH20 családba tartozó enzimekre is.

3.2 Célvegyületek szintézise

A **39a** célvegyület megtalálható az irodalomban,⁹⁹ ezért a szintézis ennek a publikált eljárásnak az adaptációján alapult (5. táblázat). A 2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetil-2-dezoxi-D-glükopiranoz (**33**) kiindulási anyagot D-glükóзамин- hidrokloridból (**40**) állítottuk elő két lépésben irodalmi módszerek alapján.^{104, 105} A **33** vegyületet 4-arilszemikarbazidokkal (**35a-h**), illetve arilszulfonil-hidrazidokkal (**35i-n**) reagáltattuk 10 mol% p-toluolszulfonsav jelenlétében.

A **35a**, **35h**, valamint **35i** reagensek kereskedelmi forgalomból származó vegyületek voltak, míg a **35b-g** vegyületeket aromás aminokból (**41b-g**) állítottuk elő irodalmi módszerek alapján (9. ábra).¹⁰⁶ Etil-klórformiáttal először a megfelelő **42b-g** karbamátot állítottuk elő, majd hidrazin-monohidráttal forralva kaptuk a **35b-g** szemikarbazidokat közepes hozammal. A **35f-n** vegyületeket arilszulfonsav-kloridokból (**43f-n**) hidrazin-hidráttal állítottuk elő irodalmi módszerek alapján közepes hozammal (9. ábra).¹⁰⁷ A **39a** irodalmi példa szintézise során 1,2-diklóretánt alkalmaztak oldószerként, ami a kutatólaborunkban nem gyakran használt oldószer, ezért szerettünk volna lecserélni. Így elvégeztük a reakciót

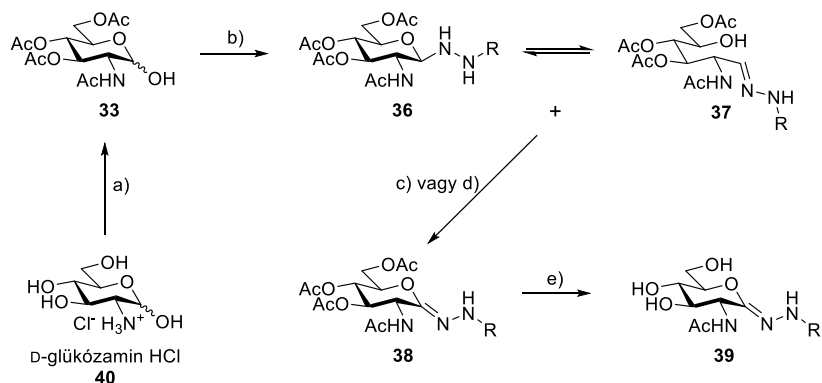
toluolban, diklórmétánban és kloroformban. Toluolban a kiindulási anyag nehezen oldódott, míg diklórmétánban alacsonyabb hozamot értünk el, mint kloroformban. Ezért ez utóbbi oldószer alkalmazása mellett döntöttünk.



9. ábra A **35b-g** 4-arilszemikarbazidok, valamint a **35j-n** arilszulfonil-hidrazidok szintézise irodalmi módszerek alapján

A **35a-g** szemikarbazidokkal elvégzett reakciók esetében a **37a-g** nyílt láncú tautomerek jelenléte is megfigyelhető volt a ^1H NMR spektrumokban, míg a **35h** tioszemikarbazid, illetve a **35i-n** szulfonilhidrazidok esetében a nyílt láncú tautomer képződését nem tapasztaltuk. A tautomereket nem próbáltuk meg elválasztani, keverékként vittük tovább a következő reakcióban. A keverékek NMR spektrumai tartalmazták azokat a jeleket, amelyeket az irodalomban a tiszta **36a** és **37a** vegyületek. A **36** és **37** tautomer keverékek oxidációja CrO_3 -piridin komplex-szel jó hozammal eredményezte az **38a-g** lakton szemikarbazonokat. Azonban a **36h** tioszemikarbazid és a szulfonilhidrazinok (**36i-n**) esetében ez a reagens kombináció komplex reakcióelegyet eredményezett. Számos oxidálószeret teszteltünk (I_2/NEt_3 , PIDA, $\text{ICl}/\text{Cs}_2\text{CO}_3$), végül a MnO_2 bizonyult hatékonynak a kívánt **38h-n** vegyületek előállításában. Az *O*-acetyl védőcsoportok eltávolítását ammóniával telített metanolban végeztük, mely a megfelelő **39** lakton hidrazonokat eredményezte. Ezeknek az ötlépéses szintézis-szekvenciáknak az összhozama 15-55 % közé esik.

5. táblázat Célvegyületek szintézise^{108, 109}



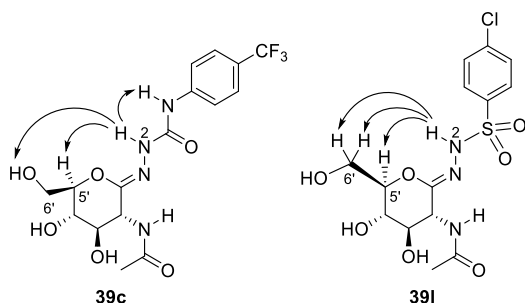
Reagensek és körülmények: a) 1. Ac₂O, absz. piridin, r.t.; 2. 4Å MS, absz. MeOH, r.t. (83 % két lépésre)^{104, 105}; b) NH₂NHR (35), 0.1 ekv. pTsOH·H₂O, CHCl₃, reflux; c) **a-g** esetében: CrO₃-piridin, absz. CH₂Cl₂, 0°C → r.t.; d) **h-n** esetében: MnO₂, absz. CH₂Cl₂, reflux; e) NH₃/MeOH, r.t.

R	Termékek és hozamok (%)				
	36 + 37	36 : 37 aránya ^a	38	39	39 összhozama D-glükózaminból
a CONHPh	90	5:1	83	79	49
b CONH(<i>p</i> -MePh)	83	7:1	92	86	55
c CONH(<i>p</i> -CF ₃ Ph)	81	5:1	26	87	15
d CONH(<i>p</i> -OMePh)	87	7:3	86	83	52
e CONH(<i>p</i> -ClPh)	77	4:1	78	74	37
f CONH(1-naftil)	94	^b	64	83	41
g CONH(2-naftil)	80	^b	93	75	46
h CSNHPh	87 ^c	-	78	83	47
i SO ₂ (<i>p</i> -MePh)	77 ^c	-	69	94	41
j SO ₂ (<i>p</i> -CF ₃ Ph)	85 ^c	-	60	83	35
k SO ₂ (<i>p</i> -FPh)	86 ^c	-	72	85	44
l SO ₂ (<i>p</i> -ClPh)	89 ^c	-	77	78	44
m SO ₂ (1-naftil)	89 ^c	-	66	80	39
n SO ₂ (2-naftil)	76 ^c	-	56	75	26

^a A feldolgozott reakcióelegyek ¹H NMR spektrumából meghatározva. ^b A **37f** és **37g** nyílt láncú termékek képződését vékonyrétegekromatográfiás vizsgálattal detektáltuk, de a jelek átfedése és a keletkezett vegyületek kis mennyisége miatt nem sikerült megállapítani a **36:37** arányt. ^c Csak a **36** vegyület keletkezett a reakció során.

A **36** gyűrűs vegyületekben a piranóz gyűrű téralkatára a ^1H NMR spektrumokból, a vicinális vázprotonok csatolási állandóiból következtettünk. A nagy, 9-10 Hz-es értékek a $^4\text{C}_1$ konformációt igazolják. A konformáció ismeretében a $\sim 10\text{ Hz } ^3J_{\text{H-1}-\text{H-2}}$ csatolási állandókból a $\beta(\text{D})$ konfigurációra lehet következtetni. A **37** nyílt láncú vegyületek jelenlétére bizonyíték a ^1H NMR spektrumokban a kiszélesedő szinglett megjelenése $\sim 3,8\text{ ppm}$ -nél ($-\text{OH}$) és a $\text{CH}=\text{N}$ dublett megjelenése $\sim 7,2\text{ ppm}$ -nél kis csatolási állandóval ($\sim 4\text{ Hz}$), továbbá a ^{13}C NMR spektrumban eltűnik a C-1-hez tartozó jel $\sim 89\text{ ppm}$ -nél, és megjelenik a $\text{CH}=\text{N}$ -hez tartozó jel $\sim 140\text{ ppm}$ -nél. A **38** vegyületek esetében a ^1H NMR spektrumban egy NH jellel kevesebb található, mint a **36** vegyületek spektrumában, valamint eltűnik a H-1 proton jele is. A ^{13}C NMR spektrumokban eltűnik a C-1-hez tartozó jel $\sim 89\text{ ppm}$ -nél és megjelenik a $\text{C}=\text{N}$ jele $142\text{--}146\text{ ppm}$ -nél. A **39** vegyületekben a $\text{C}=\text{N}$ kötés konfigurációjának igazolására szelektív NOE (nuclear Overhauser effect = mag Overhauser hatás) mérést alkalmaztunk. 2D ^1H - ^1H EASY ROESY kísérletet végeztünk*, amely a NOE módszerek robusztus változata kis és közepes méretű molekulák számára.¹¹⁰ A NOE jelet biztosító maximális térbeli távolság körülbelül $5\text{ \AA}$. Így a **39** vegyületek *E-Z* izomer formáit várhatóan meg lehet különböztetni az N(2)H és a szénhidrátégység jellegzetes protonjai közötti informatív NOE keresztcúcsok alapján. A **39c** vegyület ^1H - ^1H ROESY spektrumában az N(2)H rezonanciajele NOE keresztcúcsokat szolgáltatott a H(5') és O(6')H rezonanciajelekkel (10. ábra), ami ezeknek a protonoknak a térbeli közelségét jelzi, és így a *Z* izomer jelenlétét támasztja alá. Mivel a többi **39a-h** lakton szemikarbazon ^1H és ^{13}C NMR spektruma is nagyon hasonlít a **39c** vegyületére, így feltehetően ezekben a vegyületekben is a *Z* izomer van jelen.

* A méréseket Dr. Timári István végezte.



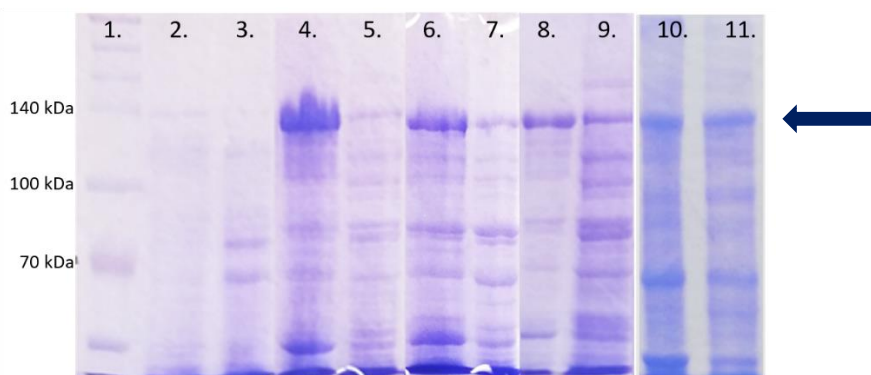
10. ábra A **39c** és **39l** vegyületekben megfigyelt NOE keresztcsúcsok

A **39l** vegyület ^1H - ^1H ROESY spektrumában NOE keresztcsúcsok figyelhetők meg az N(2)H rezonanciajele és a H(5'), H(6'a,b) rezonanciajelek között (10. ábra), amelyek jelzik ezeknek a protonoknak a térbeli közelségét, és így a *Z* izomer jelenlétét. Mivel a többi **39i-n** lakton szulfonilhidrazon ^1H és ^{13}C NMR spektruma is nagyon hasonlít a **39l** vegyületére, így feltehetően ezekben a vegyületekben is a *Z* izomer van jelen.

3.3 A teljes hosszúságú hOGA izoenzim heterológ expressziója ¹⁰⁸

A teljes hosszúságú hOGA izoenzimet kódoló gént inzertként tartalmazó vektorkonstrukciót D. J. Vocadlo (Simon Fraser Egyetem, Burnaby, Kanada) bocsájtotta rendelkezésünkre. A gént a pET28b plazmid NdeI és XhoI endonukleáz hasító helyei által meghatározott szakasz hordozza. A pET családba tartozó klónozó vektorokat *E. coli* expressziós rendszerhez fejlesztették ki. A pET vektorcsalád előnye, hogy T7 bakteriofág egyik legerősebb promóterének ($\phi 10$) szabályozása alatt áll a célgén transzkripciója. A gazdasejt genomi DNS-e pedig inzertként tartalmazza a T7 RNS polimerázt kódoló gént. A T7 RNS polimeráz génjének transzkripcióját indukálható promóter (lac promóter) biztosítja. A T7 RNS polimeráz specifikus promóterére, tehát kizárólag a pET vektorba inszertált gént írja át. A pET28-as vektor további előnye, hogy a multiklónozó helye 11 különböző endonukleáz hasítóhelyet tartalmaz, valamint *N*-terminális és *C*-terminális hat hisztidinből álló His₆-tag fűziójára van lehetőség a kívánt géntermékkel. A hOGA enzim expresszióját optimalizáltuk öt különböző *E. coli* expressziós törzsben: *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* BL21(DE3) pLysS, *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-

RIPL, *E. coli* BL21 STAR(DE3) és *E. coli* BL21(DE3) Rosetta. A kis léptékű expressziós kísérletek nagy mértékű nem funkcionális enzim termeléséhez vezettek, amelyeknek két fő okát azonosítottuk: a rekombináns hOGA hajlamát zárványtest aggregátumok képzésére a fehérjetermelési fázis során, valamint a rekombináns enzim jelentős proteolitikus lebomlását *in vivo* és *in vitro* (11. ábra). Ez utóbbi jelenséget annak ellenére tapasztaltuk, hogy az alkalmazott *E. coli* expressziós törzsekben hiányoznak az ompT és Lon proteázok, amelyek feltehetően felelősek a hibás feltekeredésű fehérjék lebontásáért.¹¹¹⁻¹¹³

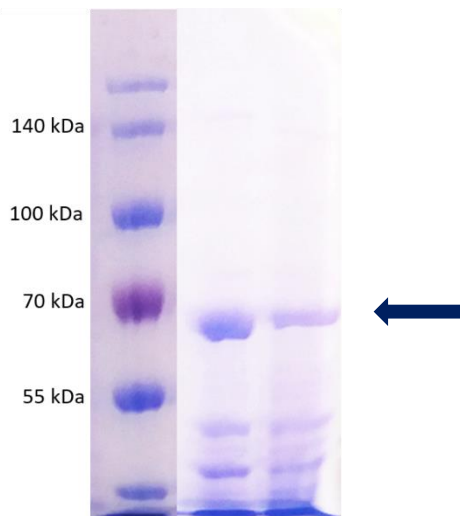


11. ábra Kis léptékű, különböző transzformáns *E. coli* törzsek hOGA expressziójának eredménye. Az expresszió körülményei: termeltetés 23°C-on korai stacioner fázisig, indukció a középexponenciális fázisban 0,4 mM IPTG-vel. A sejtek feltárása után kapott szolubilis és ülepitett frakciók gélelektroforetikus (8 % SDS-PAGE) analízise.

Sávok: 1. fehérje marker, 2. *E. coli* BL21(DE3) csapadék, 3. *E. coli* BL21(DE3) felülúszó, 4. *E. coli* BL21(DE3) RIPL csapadék, 5. *E. coli* BL21(DE3) RIPL felülúszó, 6. *E. coli* BL21(DE3) Rosetta csapadék, 7. *E. coli* BL21(DE3) Rosetta felülúszó, 8. *E. coli* BL21 Star (DE3) csapadék, 9. *E. coli* BL21 Star (DE3) felülúszó, 10. *E. coli* BL21(DE3) pLysS csapadék, 11. *E. coli* BL21(DE3) pLysS felülúszó

Ebből a szempontból a legrosszabbul teljesítő törzs a BL21(DE3) volt, ahol alig termelődik teljes hosszúságú rekombináns fehérje (11. ábra). A nem-specifikus proteolízis mellett a BL21 Star és pLysS törzsek esetében egy 70 kDa hosszú csonka hOGA fragmentum jelentős termelődését figyeltük meg, ami egy szekvenciaspecifikus proteolitikus hasítási hely létezésére utal. Ez a fragmentum

kötődött az affinitáskromatográfia során használt oszlophoz, és β -*N*-acetilglükózaminidáz aktivitást mutatott (12. ábra). Ennek a viszonylag stabil hOGA-fragmensnek a mérete és aktivitása az *E. coli* sejtek kaszpáz-3-szerű proteáz-aktivitásának jelenlétére utal, amely aktiválódhat a hOGA túltermelése miatt, proteotoxikus stresszt okozva a sejtben.¹¹⁴⁻¹¹⁷



12. ábra Az *E. coli* BL21 Star (DE3) törzs által termelt és IMAC kromatográfiával izolált „csonka” vad típusú hOGA-frakció gélelektroforetikus (8% SDS-PAGE) analízise

Két törzs, a RIPL és a Rosetta esetében a transzlációt olyan génekre optimalizálták, amelyek kodonhasználatában különböznek az *E. coli*-tól, ritka tRNS-géneket hordoznak a plazmidokon. Ez a két törzs fokozott rekombináns enzimtermelést mutatott, azonban a Rosetta törzs esetében kaptunk megfelelő mennyiségű aktív, oldható formában lévő fehérjét (11. ábra). A Star és a pLysS törzsek termelékenysége nagyon hasonló volt, viszonylag magas aktív hOGA hozam mellett az aggregált formához képest. Ez rávilágít az mRNS megnövekedett élettartamának fontosságára a Star törzs esetében és a pLysS nagyon szigorú expressziós szabályozására. Azonban a Star és a pLysS mutatta a legnagyobb specifikus proteolitikus aktivitást, ami a 70 kDa hosszú hOGA fragmentumot eredményezte. Mindezekből a megfigyelésekből az a következtetés vonható le,

hogy a törzsek eltérő toleranciát mutattak a hibásan feltekeredett fehérje túltermelésével szemben.

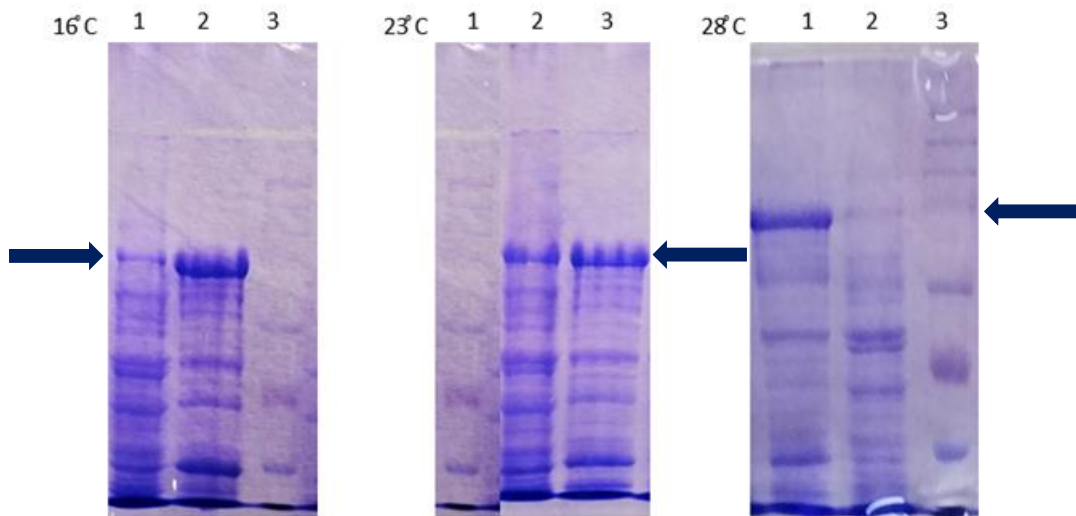
Mivel a Rosetta bizonyult a legjobban teljesítő expressziós törzsnek, a tenyésztési paramétereket erre a törzsre optimalizáltuk. A hőmérséklet hatását a rekombináns fehérjetermelésre 30°C alatt, három hőmérsékleten (16, 23 és 28°C) vizsgáltuk (13. ábra). Elméletileg az alacsony fehérjekoncentrációnak csökkentenie kell a fehérjék részleges és hibás feltekeredését, így megakadályozva az aggregációt.¹¹⁸ A tenyésztési hőmérséklet csökkentése csak 23 °C-on kedvezett a teljes hosszúságú és aktív enzim termelésének, amelyet *N*-acetilglükózaminidáz enzim aktivitással jellemezhetünk (6. táblázat). A hOGA termeltetése során általában 16°C-os hőmérsékletet alkalmaznak az irodalomban. A mi esetünkben azonban alacsonyabb hőmérsékleten (16°C) felgyorsult a humán enzim hibás feltekeredése, és az *E. coli* chaperon rendszerei nem tudták megakadályozni az aggregátum képződést.

A tenyésztés hozamát befolyásolta az is, hogy a tenyészet növekedésének mely fázisában indukáltuk a hOGA enzimet kódoló gén transzkripcióját. Ha az induktort a közép exponenciális növekedési fázis után alkalmaztuk (OD₆₀₀ = 0,6 helyett 0,9), akkor 50%-kal magasabb hozamot érhattünk el anélkül, hogy tapasztaltunk volna jelentősebb proteolitikus bomlást vagy zárványtest-aggregátumok képződését (14. ábra).

Az így kapott optimalizált körülményeket alkalmaztuk a hOGA nagy léptékű heterológ expressziójához, amely során az enzim aggregátum-képződése minimálisra csökkent, és jó hozammal teljes hosszúságú, nagy mennyiségű aktív hOGA enzimet kaptunk.

6. táblázat A különböző hőmérsékleten (16 °C, 23 °C, 28 °C) növesztett *E. coli* Rosetta tenyészetek *N*-acetilglükózaminidáz enzim aktivitása.

A sejtlizátum oldható frakciója	16 °C	23 °C	28 °C
Összes <i>N</i> -acetilglükózaminidáz aktivitás (U)	30	71	35
Specifikus enzimaktivitás (U/mg)	0.13	0.21	0.16

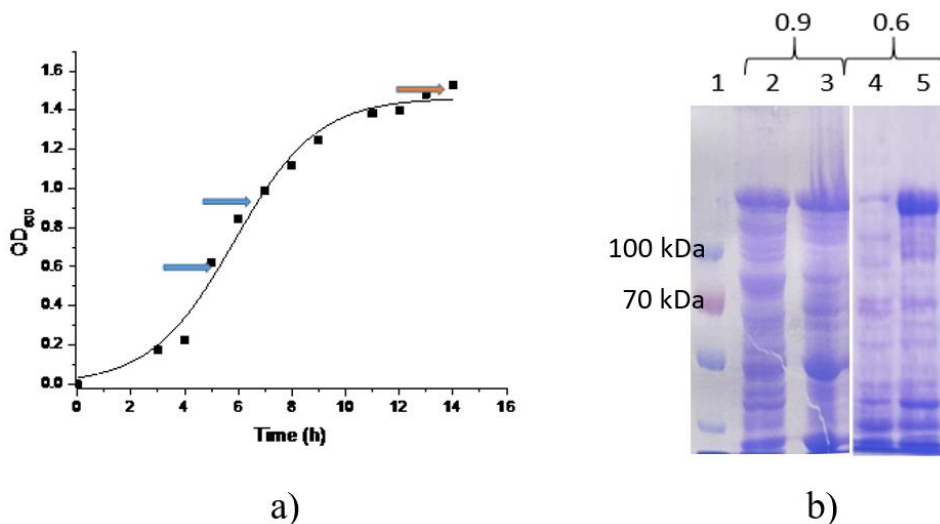


13. ábra Különböző hőmérsékleten növesztett *E. coli* Rosetta expressziós tenyészetekből nyert sejtlyázatok 8%-os SDS-PAGE analízise.

16 °C: 1. felülúszó, 2. csapadék, 3. protein marker;

23 °C: 1. protein marker, 2. felülúszó, 3. csapadék;

28 °C: 1. csapadék, 2. felülúszó, 3. protein marker.



a)

b)

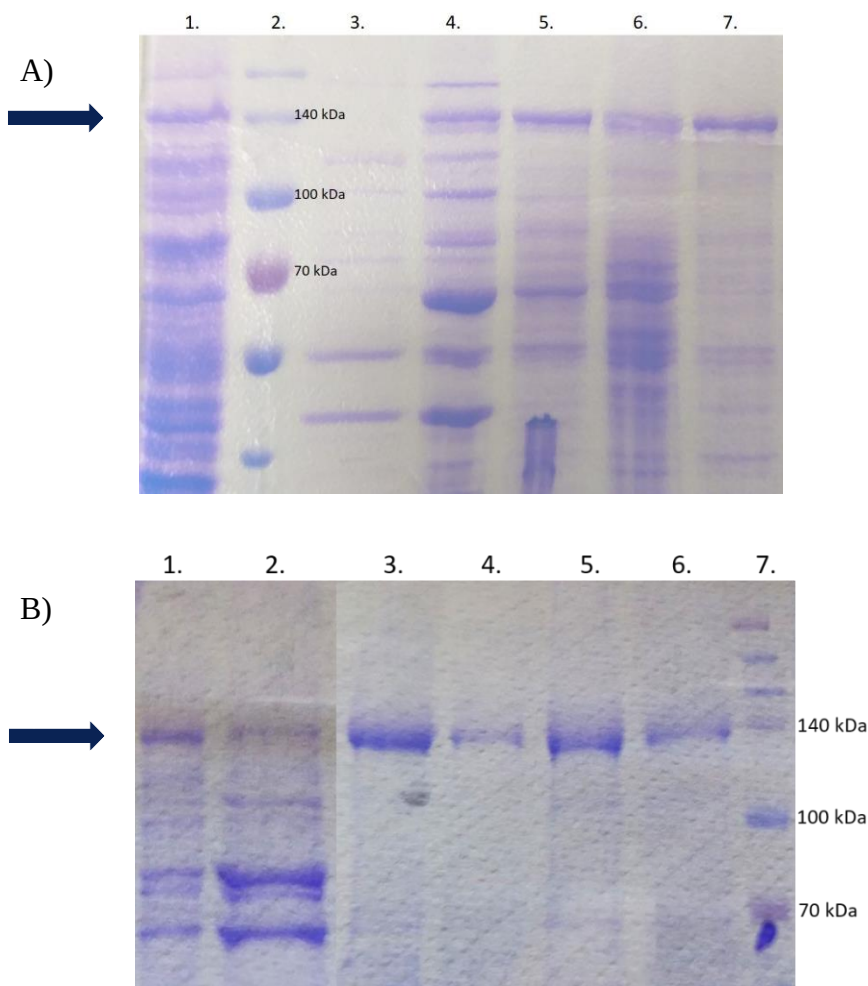
14. ábra a) Az *E. coli* BL21(DE3) Rosetta tenyészet növekedési görbéje 23 °C-on. A kék nyilak az indukciós fázist jelzik ($OD_{600} = 0,6$ és $0,9$), a narancssárga nyíl pedig a tenyésztés leállítását. b) A sejtlyázatok 8%-os SDS-PAGE analízise. Sávok: 1. protein marker; 2. a későbbi fázisban indukált tenyészet felülúszója, 3. csapadéka. 4. a korábbi fázisban indukált tenyészet felülúszója, 5. csapadéka.

3.4 A hOGA enzim izolálása és tisztítása

Az intracellulárisan termelődő rekombináns hOGA kinyeréséhez kidolgoztuk a sejtfeltárási körülményeket, amelyhez ultrahangot és lizozim enzimes kezelést alkalmaztunk. Az enzim stabilitása szempontjából fontos volt a megfelelő lízispuffer kikísérletezése és a szonikálás fizikai paraméterei. A különböző pufferekben mért enzimstabilitás eredménye azt mutatta, hogy a Tris pufferben a legkisebb, míg 50 mM-os foszfát pH 7,5-ös pufferben nagyobb az enzim aktivitása, a nátrium- és kálium-foszfát pufferek közül pedig az utóbbi bizonyult jobbnak. Az ionerősség nagymértékben befolyásolja az enzim aktivitását: határozott csökkenés tapasztalható $>0,5$ M NaCl vagy KCl jelenlétében. Az alkalmazott redukáló ágens minősége is befolyásolja az enzim stabilitását, 1 mM 2-hidroxi-1-etántiol alkalmazása jobbnak bizonyult, mint 1 mM DTT. A detergensok közül a Tween 20 nagy mértékben szolubilizálja a fehérjét. Luu Thanh Sinh szakdolgozatában különböző körülmények között (ionerősség, detergens, redukálószer, pufferösszetétel) kimérte a hOGA denaturációs kinetikáját.^{108, 119}

Az *N*-terminális 6 hisztidint tartalmazó szekvencia alkalmassá teszi a fehérjét arra, hogy IMAC oszlophoz kötődjön. A hOGA IMAC kromatográfiája során jelentősnek bizonyult, hogy milyen átmenetifém iont alkalmaztunk. Az általánosan alkalmazott Ni^{2+} ion a mi esetünkben jelentős enzimaktivitás csökkenést eredményezett. Ezért több fémionnal próbálkoztunk, mint Cu^{2+} és Co^{2+} , az utóbbi kötötte meg szelektíven a His₆-tag-gel rendelkező rekombináns hOGA fehérjét. A kromatográfia hatékonyságát nagymértékben befolyásolták a mintafelvitel körülményei (a minta koncentrációja, hőmérséklet, áramlási sebesség) és a kromatográfiás egyéb paraméterek, mint az aspecifikus fehérjék kötődését gyengítő sókoncentráció és tenzid alkalmazása. Az egyik legfontosabb paraméter a mintafelvitel során alkalmazott kezdeti imidazol koncentráció, amely nagymértékben segítette a proteolitikusan sérült hOGA fragmensek elválasztását a teljes hosszúságú hOGA fehérjétől (15. ábra). A lízishez kidolgozott pufferösszetétel alkalmasnak bizonyult az enzim hosszútávú tárolására is.

Ebben a pufferben a hOGA -20°C-on legalább két évig megőrizte stabilitását, 30%-os glicerinnel hozzáadásával.



15. ábra *E. coli* BL21(DE3) Rosetta törzsben optimalizált körülmények között termeltetett hOGA tisztítása Co^{2+} ion IMAC affinitás kromatográfiával HiPrep IMAC Fast Flow oszlopon.

A) Az oszlopra felvitt minta kötőpuffere 10 mM imidazolt tartalmazott. Elúció imidazol gradienssel, 100-500 mM imidazolt tartalmazó elúciós pufferrel.

Sávok: 1. Oszlopra felvitt minta; 2. fehérje marker, 3. 100 mM imidazol / 1.; 4. 100 mM imidazol / 2.; 5. 200 mM imidazol / 1.; 6. 200 mM imidazol / 2.; 7. 500 mM imidazol.

B) Az oszlopra felvitt minta kötőpuffere 50 mM imidazolt tartalmazott. Elúció imidazol gradienssel, 100-500 mM imidazolt tartalmazó elúciós pufferrel.

Sávok: 1. Oszlopra felvitt minta; 2. a kötő pufferrel eluált frakció, 3. 100 mM imidazol; 4. 150 mM imidazol; 5. 200 mM imidazol; 6. 500 mM imidazol; 7. fehérje marker.

3.5 Az enzimek kinetikai paramétereinek meghatározása¹⁰⁸

A hOGA enzimet a fent leírt módszer szerint expresszáltuk és tisztítottuk. A borjú veséből származó HexA/HexB heterodimer enzimet kereskedelmi forgalomból szereztük be, míg a hHexB enzimet a Cseh Tudományos Akadémia Mikrobiológiai Intézete Biotranszformációs Laboratóriumának munkatársai bocsájtották rendelkezésünkre.¹²⁰ A hHexB-vel végzett kísérleteket lehetőségem volt Prágában elvégezni Prof. Vladimír Křen vezetésével.* Mindhárom enzim esetében pNP-GlcNAc szubsztrátot alkalmaztunk a kinetikai paraméterek meghatározására. A hOGA enzim Michaelis-Menten kinetikai vizsgálata kálium-foszfát pufferben 7,5 pH-n $K_M = 20 \mu\text{M}$ és $k_{\text{cat}} = 1,6 \text{ s}^{-1}$ értékeket eredményezett (7. táblázat). A meghatározott k_{cat} érték jól korrelál a korábban publikált adatokkal.⁶⁸ Azonban ilyen körülmények között a pNP-GlcNAc szubsztrát nagyobb affinitással kötődik az enzimhez, mint a korábban közölt körülmények között.

A borjú veséből származó HexA/HexB enzim kinetikai paramétereinek meghatározása kálium-foszfát pufferben 5,8-as pH-n, míg a hHexB enzim paramétereinek vizsgálata citrát-foszfát pufferben történt 5,0-s pH-n. Mindkét hexóaminidáz esetében a $K_M = 1,1 \text{ mM}$.

A hOGA enzim esetében elvégeztük a Michaelis-Menten kinetikai paraméterek meghatározását a fluoreszcens 4-MU-GlcNAc szubsztrát jelenlétében is. Ebben az esetben kálium-foszfát pufferben 7,5-ös pH-n a $K_M = 12 \mu\text{M}$. A Michaelis-Menten kinetikai görbéket a 8. Függelék tartalmazza.

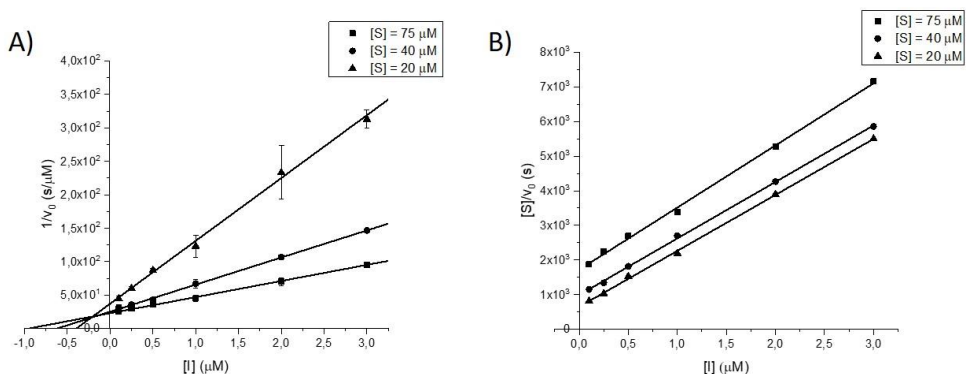
7. táblázat A hOGA enzim Michaelis-Menten kinetikai paraméterei pNP-GlcNAc szubsztrátra.

Puffer	50 mM K ₂ HPO ₄ - KH ₂ PO ₄ puffer, pH 7,5	PBS (10 mM foszfát puffer, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl) pH 7,4 ⁶⁸	0,5 M citrát/foszfát puffer, pH 6,5 ¹⁰¹
K_M	20 $\mu\text{M} \pm 2$	206 μM	1,1 mM
$k_{\text{cat}} (\text{s}^{-1})$	1,6 $\pm 0,1$	1,5	3,4

* A rövidtávú tudományos tanulmányút a COST Action 18132 keretein belül valósult meg.

3.6 Enzimgátlási mérések eredményei^{108, 109}

A hOGA enzim, valamint a borjú veséből származó HexA/HexB enzim esetében az inhibíciós állandók (K_i) meghatározása Dixon módszerrel¹²¹ történt. A kezdeti sebesség reciprokát az inhibitor koncentrációjának függvényében ábrázoltuk három különböző szubsztrát-koncentráció esetén (16A. ábra). A kapott egyenesek egy pontban metszik egymást (K_i) a koordináta-rendszer negyedik kvadránsában. A metszéspont elhelyezkedése a gátlás módjára is utal, kompetitív vagy vegyes gátlási mód feltételezhető. Mivel a Dixon-diagram nem tudja egyértelműen megkülönböztetni ezeket a gátlási módokat, a kinetikai adatokat a Cornish-Bowden módszerrel¹²² is ábrázoltuk.



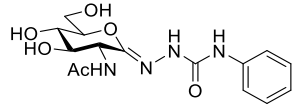
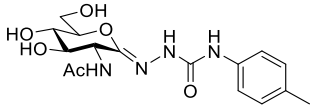
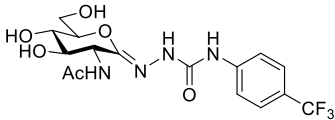
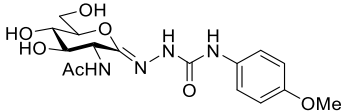
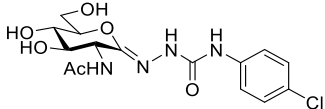
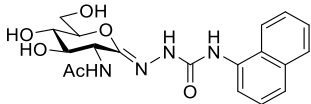
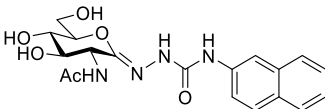
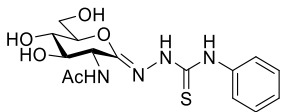
16. ábra A hOGA gátlás kinetikai adatainak ábrázolása **39a** jelenlétében három szubsztrát-koncentráció esetében (■ $75 \mu\text{M}$; ● $40 \mu\text{M}$; ▲ $20 \mu\text{M}$) Dixon módszerrel (A) és Cornish-Bowden módszerrel (B).

Az $[S]/v$ -t ábrázolva az inhibitor-koncentráció függvényében párhuzamos egyeneseket kaptunk (16B. ábra), azaz a szintetizált vegyületek kompetitív inhibitorai mind a hOGA, mind a HexA/HexB, mind a hHexB enzimeknek. A hHexB gátlása esetén a Michaelis-Menten görbéket $p\text{NP-GlcNAc}$ szubsztrát alkalmazásával vettük fel. Az inhibíciós állandókat nemlineáris regressziós analízissel határoztuk meg a kompetitív gátlási modell alkalmazásával. A 16. ábrán a **39a** vegyület példáján mutatom be a Dixon- és Cornish-Bowden-diagramokat, a többi vegyület diagramjait a 8. Függelék tartalmazza.

A **39a-h** lakton szemikarbazon származékok esetében *p*NP-GlcNAc szubsztrátot alkalmaztunk a hOGA enzimmel szembeni inhibíciós állandók meghatározásához, kivéve az erősen kötődő **39e** és **39g** származék esetén, ahol az enzimkoncentráció összemérhető volt az inhibitor-koncentrációval, így a Dixon módszert nem lehetett alkalmazni. Ezért a fluoreszcens 4-MU-GlcNAc szubsztrátot alkalmaztuk, kihasználva a fluoreszcens módszer nagyobb érzékenységét, így csökkenteni tudtuk az enzimkoncentrációt. A **39i-n** lakton szulfonilhidrazon származékok esetében szintén a fluoreszcens szubsztrátot alkalmaztuk.

A **39** vegyületek gátlási állandói hOGA enzimmel szemben az alacsony μM -os, illetve a nM -os tartományba esnek. A **39a-h** lakton szemikarbazon származékok gátlási állandóit a 8. táblázat foglalja össze. Ezen vegyületek közül a legjobb inhibíciós hatást a **39e** és **39g** vegyületek mutatták, míg a leggyengébb inhibitornak a **39h** tio-származék bizonyult. Valamivel magasabb K_i értékeket kaptunk a HexA/HexB enzim esetén, jelentős szelektivitás a két enzim között nem figyelhető meg. Érdekes megjegyezni, hogy a **39f** és **39g** naftil-származékok gátlásában jelentős különbség van, amelyek közül a 2-naftil (**39g**) több mint egy nagyságrenddel erősebb, mint az 1-naftil (**39f**). Másrészt a **39f** szelektívebb a HexA/HexB enzimmel szemben.

8. táblázat A 2-acetamido-2-dezoxi-D-glükono-1,5-lakton szemikarbazon származékok (**39a-h**) inhibíciós állandói a hOGA és a borjú veséből származó HexA/HexB enzimek esetén (K_i [μ M])

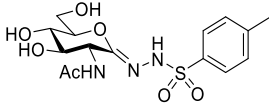
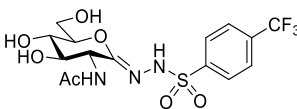
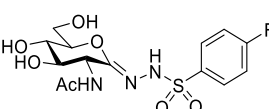
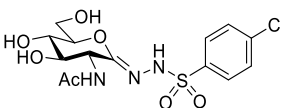
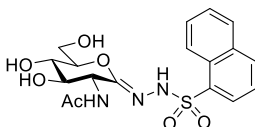
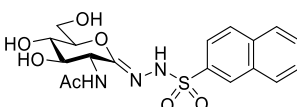
	Vegyület	hOGA	HexA/HexB
39a		0.190 ± 0.008	0.205 ± 0.014 (ir.: 0.130 ± 0.020) ⁹⁹
39b		0.155 ± 0.003	0.332 ± 0.017
39c		0.167 ± 0.006	0.125 ± 0.004
39d		0.270 ± 0.010	0.413 ± 0.014
39e		$0.083 \pm 0.004^\ddagger$	0.170 ± 0.004
39f		0.506 ± 0.020	0.154 ± 0.006
39g		$0.036 \pm 0.001^\ddagger$	0.047 ± 0.002
39h		27 ± 3	30 ± 2

[‡] 4-MU-GlcNAc szubsztrátot alkalmaztunk

A **39i-n** lakton szulfonilhidrazon származékok hOGA enzimmel szemben jobb inhibitoroknak bizonyultak, mint a **39a-h** lakton szemikarbazonok (9. táblázat). A legerősebb inhibitorok a **39m** és **39n** naftil-származékok, míg a leggyengébbnek az **39j** bizonyult. Másrészt a hHexB enzimmel szemben egy kivétellel az összes vegyületnél alacsonyabb K_i értékeket kaptunk, ami azt jelzi, hogy ezek a vegyületek jobban gátolják a hHexB-t, mint a hOGA-t. A **39m** szulfonilhidrazon mindkét enzim legerősebb inhibitora, és a **39j** után a legszelektívebb a hHexB-vel szemben (a **39j** a legkevésbé erős inhibitor mindkét enzim számára).

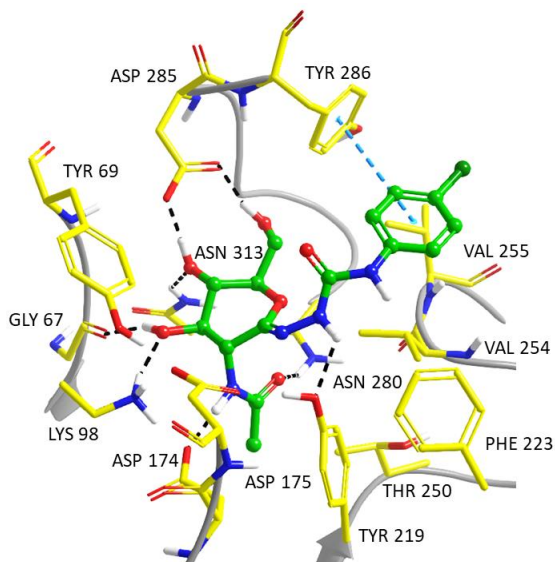
Annak érdekében, hogy megértsük a vegyületek hOGA enzimhez való kötődési tulajdonságait és relatív gátló hatékonyságát, J. M. Hayes és munkatársai a Közép-Lancashire-i Egyetem Gyógyszerészeti és Orvosbiológiai Tudományok Karán *in silico* számításokat végeztek kvantum-mechanika/molekuláris mechanika (QM/MM) módszerekkel a hOGA_{57-400/544-705}-PUGNAc komplex (PDB kód: 5UHO) modell alkalmazásával.^{108, 109} A **39a-h** lakton szemikarbazon származékok esetében a 17. ábrán látható hidrogén-hidak kialakulása feltételezhető. A **39a-e** vegyületek esetében a Tyr286 oldallánca és a fenilgyűrű között úgynevezett „edge-to-face” T-alakú π - π kölcsönhatások kialakulására van lehetőség. Megfigyelték továbbá a kötőhely hurokban lévő Val255 NH - π kölcsönhatást is, mely főleg a naftil-származékok esetében jelentős. A **39h** tioszármazék kötődése a leggyengébb. Bár a fehérje-ligandum kölcsönhatása erősnek számít, a kötődés deszolvatációs költsége a legmagasabb volt az összes inhibitor közül. A **39e** vegyület nagy affinitását magyarázza a halogén - hidrogén-kötés donor (Hlg - HBD) kölcsönhatás, amely a vegyületben lévő -Cl atom és a Val255 NH egysége között alakul ki.

9. táblázat A 2-acetamido-2-dezoxi-D-glükono-1,5-lakton szulfonilhidrazon származékok (**39i-n**) inhibíciós állandói a hOGA és a hHexB enzimek esetén (K_i [nM]).

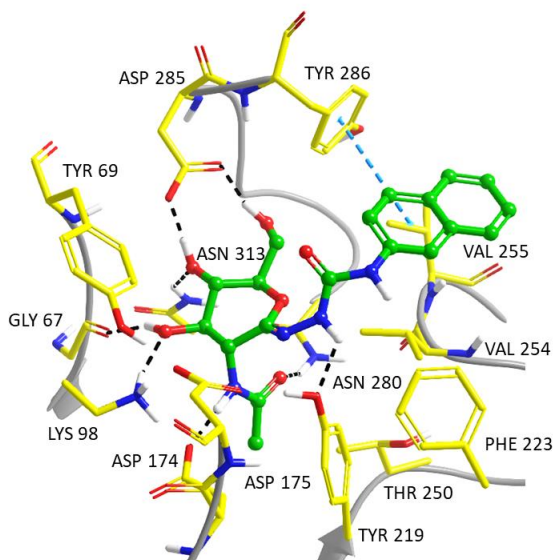
	Vegyület	hOGA	hHexB
39i		78 ± 1	21 ± 2
39j		230 ± 17	48 ± 4
39k		95 ± 11	45 ± 3
39l		70 ± 3	39 ± 2
39m		27 ± 7	6.8 ± 1.8
39n		30 ± 2	30 ± 3

A legerősebben kötődő lakton szemikarbazon a 2-naftil szubsztituenst tartalmazó **39g** inhibitor ($K_i = 36$ nM), amely jobban kihasználta a kölcsönhatásokat (beleértve az NH - π és a T alakú $\pi - \pi$ „stacking”) a környező hidrofób részekkel. Habár mindkét naftil származékra (**39g** és **39f**) erős affinitást jósoltak a számítások, a **39f** vegyület mégis az egyik leggyengébb inhibitor.

(A)



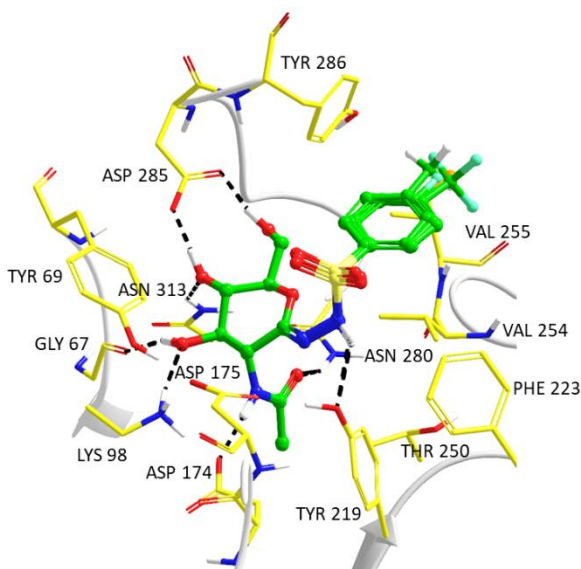
(B)



17. ábra Modellezett komplexek QM/MM és QM/MM-PBSA számítások alapján: **(A)** hOGA-**39e** és **(B)** hOGA-**39g**.

A **39i-l** lakton szulfonilhidrazon származékok kötődése hasonló, mint a **39a-e** szemikarbazonok esetén (18. ábra). A fenilgyűrű szubsztituensei és a Tyr286 és Val255 hidrofób oldalláncai között kölcsönhatás alakul ki. A CF₃ csoport (**39j**) eltolódik a Tyr286-től, ez összefüggésbe hozható annak alacsonyabb hOGA-gátló

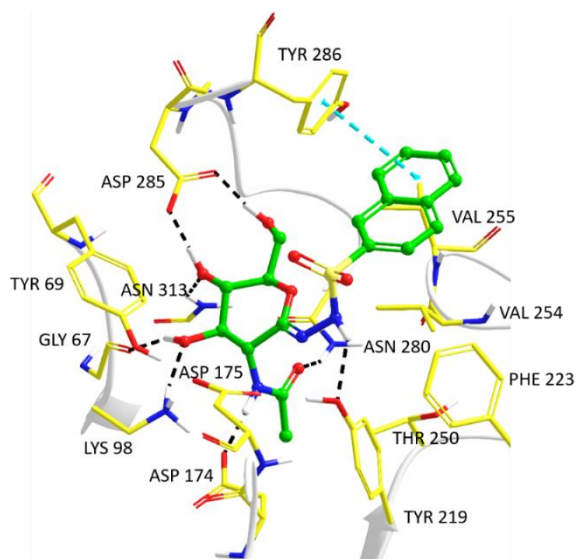
hatásával ($K_i = 230$ nM); míg a metil-szubsztituált **39i** ($K_i = 78$ nM) jó CH - π kölcsönhatást tud kialakítani a Tyr286 oldalláncának aromás gyűrűjével. A **39k** és **39l** vegyületek esetében NH - halogén kölcsönhatás tud kialakulni a Val255 NH egységével.



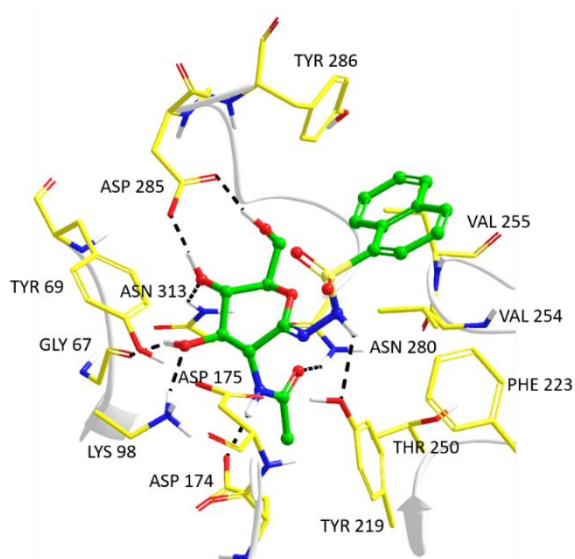
18. ábra A **39i-l** szubsztituált fenil analógok számított, modellezett komplexei. A fluor atomok világoskékkel, a klór atomok narancssárgával vannak jelölve.

A **39m** és **39n** naftil származékok bizonyultak a legjobb inhibitoroknak ($K_i \sim 30$ nM). Mindkét ligandum képes kedvező kölcsönhatásokat kialakítani a Val255 NH egységével (19. ábra). A **39n** 2-naftil származék a Tyr286 oldalláncának aromás gyűrűjével T-alakú $\pi - \pi$ kölcsönhatásokat képes kialakítani. A **39m** vegyület esetében az 1-naftalin gyűrű 180°-os átbillentése az S-C(Ar) kötés körül alternatív $\pi - \pi$ kölcsönhatásokhoz vezethet a Phe223 oldalláncának aromás gyűrűjével.

(A)



(B)



19. ábra Számított, modellezett komplexek: **(A)** hOGA-39n és **(B)** hOGA-39m.

3.7 Az eredmények értékelése, kitekintés

A doktori munka során az új inhibitorok tervezéséhez a PUGNAc-ot (2) választottuk vezérszerkezetnek, mely az egyik legrégebbi, szoros kötődésű OGA inhibitor. Az irodalomban korábban már vizsgálták, hogy az *N*-fenil-karbamát egység aromás részének szubsztituáltsága befolyásolja-e a gátló hatást, azonban számottevő effektust nem tapasztaltak. Vizsgálták továbbá, hogy 2-es helyzetben hosszabb *N*-acil láncok hogyan befolyásolják a szelektivitását hexóزامинидázokkal szemben, és meghatározták a szelektivitás szempontjából optimális lánchosszúságot és összetételt. Arra azonban nem található irodalmi példa, hogy vizsgálták volna a cukorgyűrű és az aromás rész közötti imino-karbamát egység izosztér helyettesítését és egyéb módosítását, valamint az aromás rész méretének változtatását. Munkánk során izosztér cserével olyan 2-acetamido-2-dezoxi-D-glükono-1,5-lakton aril(tio)szemikarbazon (**39a-h**) származékokat állítottunk elő, melyek a PUGNAc (2) imino-karbamát egységének „O”-jét „NH”-val helyettesítik, így lehetőség nyílik további H-kötések létrejöttére. A C=O csoport oxigénjének cseréje kénre (C=S) a **39h** származékban rontotta a vegyület kötődését az aktív centrumhoz. A legjobb gátló hatással a **39e** *p*-klórfenil származék, és a **39g** 2-naftil származék rendelkezik, mely vegyületek esetében további stabilizáló kölcsönhatások alakulnak ki a ligand-enzim komplexben. A 2-acetamido-2-dezoxi-D-glükono-1,5-lakton arilszulfonilhidrazon (**39i-n**) származékokban a szulfonil egység megváltoztatja az aromás rész orientációját az aktív centrum aromás oldalláncjaihoz, ezáltal szorosabb kötődést eredményez. A **39a-n** vegyületek többsége hasonló gátló hatással rendelkezik, mint a PUGNAc (2), és bár számottevő szelektivitást nem mutatnak hexóзаминидázokkal szemben, előállításuk egyszerűbb és jobb összhozamú, mint a PUGNAc (2) esetében. A szelektivitás növelésére az irodalmi analógiák alapján várhatóan lehetőség van a 2-es helyzetben lévő *N*-acetyl csoport lecserélésével, melyre irányuló kísérletek jelenleg is folynak kutatócsoportunkban (a kezdeti szintetikus eredményeket egy diplomamunka tartalmazza).¹²³

A szintetizált vegyületek gátlási tulajdonságainak meghatározásához heterológ expressziós rendszert dolgoztunk ki a humán teljes hosszúságú OGA izoenzim túltermeltetésére. A módszerrel, az *E. coli* BL21(DE3) Rosetta expressziós törzs számottevő mértékben fejezte ki intakt, funkcionális formában a rekombináns enzimet. A további enzim izolálási lépésekhez és a kinetikai mérésekhez a hOGA enzim féléletidejének jelentős növelésére volt szükség. Ehhez feltártuk az enzimet stabilizáló körülményeket (megfelelő redukáló ágens, tenzid, ionerősség, kation és anion minőség), amelyeket alkalmazva és irodalmi összevetésben is, nagy katalitikus hatékonyságú, homogén enzim preparátumot állítottunk elő. Az irodalmi közleményekben rendre hiányoznak az elektroforetikus analízis ábrái a tisztított hOGA fehérjéről, csupán a Western-blot képét mutatják be. A 3.4 *A hOGA enzim izolálása és tisztítása* fejezetben a hOGA enzim gélelektroforetikus felvételei igazolják, hogy a kidolgozott stabilizáló körülmények között tárolva a tisztított fehérje akár két évig is megőrizte homogenitását, az enzim aktivitás esszék pedig igazolták az enzim funkcionalitásának megőrzését. Az enzim minta nagy fokú stabilitása reményt adhat a jövőbeni szerkezetvizsgálatokra.

Az előállított **39a-n** 2-acetamido-2-dezoxi-D-glükono-1,5-lakton hidrazon származékok inhibíciós állandóit spektrofotometriás és fluorimetriás kinetikai mérésekkel határoztuk meg mesterséges szubsztrátokra (*p*NP-GlcNAc és 4-MU-GlcNAc). Az inhibitorok kötődését az enzimhez más módszerrel is meg lehet határozni, mint pl. izoterm titrációs kalorimetriával (ITC), ami a kezdeti tervek között szerepelt, azonban az időkorlátok miatt kivitelezésére már nem került sor. Az enzim denaturációs kinetikájának meghatározásához differenciális pásztázó kalorimetria (DSC) alkalmazása adhat plusz információt. A hOGA enzim oligomerizációját észleltük oldatvizsgálatainkban, amelynek meghatározását több módszerrel is terveztük (keresztkötő reagensek alkalmazása, MS, SAXS). Terveztük továbbá természetes, fehérje szubsztrát jelenlétében történő tesztelését a szintetizált vegyületeinknek.

4. Kísérleti rész

4.1 Szintézis

Az olvadáspontok korrigálatlanok, meghatározásuk Kofler típusú fűthető tárgyasztalú mikroszkóppal történt. Az optikai forgatóképesség értékeit szobahőmérsékleten, Perkin-Elmer 241, illetve Jasco P-2000 polariméterrel állapítottuk meg. Az NMR-méréseket Bruker DRX 360 (^1H : 360 MHz; ^{13}C : 90 MHz) vagy Bruker DRX 400 (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz) készülékeken végeztük. A kémiai eltolódások (δ [ppm]) értékeit Me_4Si -ra, illetve a megfelelő oldószer jelére vonatkoztatva adtuk meg. Az MS méréseket Bruker micrOTOF-Q és maXis II UHR ESI-QTOF MS készülékekkel végeztük pozitív ion módban ESI, illetve APCI ionizációs módszerekkel. A vékonyréteg kromatográfiához DC-Alurolle, Kieselgel F₂₅₄ (Merck) típusú lemezeket használtunk, a kromatogramokat UV-fény segítségével ($\lambda_1 = 254$ nm), illetve hevítéssel vagy kénsavas előhívó alkalmazásával tettük láthatóvá [absz. EtOH (95 ml), cc H_2SO_4 (5 ml), ánizsaldehid (1 ml)]. Az oszlopkromatográfiás elválasztások során Kieselgel 60 (Merck, szemcseméret: 0.063-0.200 mm) típusú szilikagél állófázist alkalmaztunk. A szerves oldatokat vízmentes magnézium-szulfáttal szárítottuk, majd csökkentett nyomáson, 30-60 °C-os vízfürdőn pároltuk be. A felhasznált vegyszerek a.t. vagy a.l.t. minőségűek voltak, az oldószereket a szokásos eljárásokkal tisztítottuk.

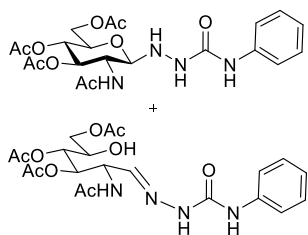
A kiindulási anyagokat és reagenseket irodalmi módszerek szerint állítottuk elő:

- 2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetil-2-dezoxi- α,β -D-glükopiranoz (**33**)^{104, 105}
- 4-arilszemikarbazidok (**35b-g**)¹⁰⁶
- arilszulfonil-hidrazidok (**35j-n**)¹⁰⁷

4.1.1 Általános eljárás 1-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-dezoxi- β -D-glükopiranozil)-4-aryl(tio)szemikarbazidok (36a-h) és 1-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-dezoxi- β -D-glükopiranozil)-2-(arilszulfonil)-hidrazinok (36i-n) előállítására

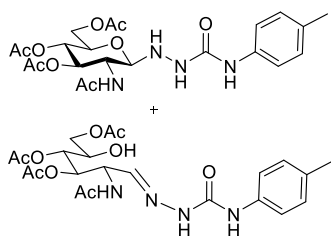
Reflux hőmérsékleten reagáltattunk 200 mg (0.58 mmol) 2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-dezoxi- α,β -D-glükopiranozt (**33**), 0.87 mmol (tio)szemikarbazidot (**35a-h**) vagy szulfonilhidrazidot (**35i-n**), és 0.058 mmol *p*-toluol-szulfonsavat 4 ml kloroformban. A reakció lejátszódását vékonyréteg kromatográfiával követtük (eluens: aceton : hexán = 3 : 2). A reakció lejátszódása után a lombikot jeges vízben hűtöttük, a csapadékot kiszűrtük. Abban az esetben, ha a reagens szennyezte a csapadékot, oszlopkromatográfiásan tisztítottuk (eluens: aceton : hexán = 1 : 1).

1-(2-Acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-dezoxi- β -D-glükopiranozil)-4-fenilszemikarbazid (**36a**) és 2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-dezoxi-D-glükóz 4-fenilszemikarbazon (**37a**)



A 4.1.1 általános eljárás szerint 200 mg (0.58 mmol) **33** és 130 mg (0.87 mmol) 4-fenilszemikarbazid (**35a**) reakciójából. 201 mg (72 %) fehér porszerű szilárd anyagot szűrtünk ki, ami a **36a** és **37a** anyag keveréke. A spektrális adatok az irodalmi értékekkel megegyeznek⁹⁹.

1-(2-Acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-dezoxi- β -D-glükopiranozil)-4-(*p*-metilfenil)-szemikarbazid (**36b**) és 2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-dezoxi-D-glükóz 4-(*p*-metilfenil)-szemikarbazon (**37b**)



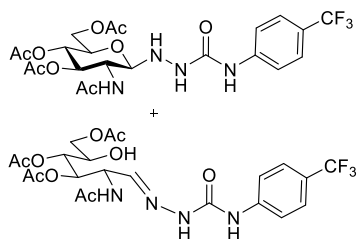
A 4.1.1 általános eljárás szerint 200 mg (0.58 mmol) **33** és 144 mg (0.87 mmol) 4-(*p*-metilfenil)-szemikarbazid (**35b**) reakciójából. Oszlopkromatográfia után 239 mg (83 %) fehér porszerű anyagot kaptunk, ami a **36b** és

37b anyag keveréke. APCI-MS pozitív mód (m/z): $C_{22}H_{30}N_4O_9$ -re (494.20) számított $[M + H]^+ = 495.21$, talált: $[M + H]^+ = 495.33$.

36b: 1H NMR (DMSO- d_6) δ (ppm): 8.16 (s, 1H, NH), 8.10 (d, $J = 8.5$ Hz, NH), 7.56 (d, 1H, $J = 9.5$ Hz, NH), 7.30 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 7.05 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 5.87 (d, 1H, $J = 6.0$ Hz, NH), 5.13 (pt, 1H, $J = 9.9$ Hz, H-3), 4.82 (pt, 1H, $J = 9.7$ Hz, H-4), 4.29 (pt, 1H, $J = 9.4$ Hz, H-1), 4.20 (dd, 1H, $J = 4.6, 12.2$ Hz, H-6a), 4.00 (dd, 1H, $J = 2.2, 12.2$ Hz, H-6b), 3.86-3.78 (m, 2H, H-2, H-5), 2.22 (s, 3H, CH_3), 1.99, 1.97, 1.92, 1.80 (4 s, 12H, 4 CH_3). ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ (ppm): 170.08, 169.67, 169.56, 169.30 (C=O), 156.03 (C=O), 136.77, 130.53, 129.00, 118.12 (Ar), 89.50 (C-1), 73.41, 71.67, 68.62 (C-3, C-4, C-5), 62.16 (C-6), 50.86 (C-2), 22.71 (CH_3), 20.49, 20.39, 20.37, 20.28 (4 CH_3).

37b: 1H NMR (DMSO- d_6) δ (ppm): 10.57 (s, 1H, NH), 8.55 (s, 1H, NH), 8.10 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, NH), 7.46 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, Ar), 7.16 (d, $J = 3.9$ Hz, $CH=N$), 7.09 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, Ar), 5.60-5.45 (m, 2H, H-3, H-4), 5.05 (dd, 1H, $J = 4.3, 7.0$ Hz, H-2), 4.77-4.67 (m, 1H, H-5), 4.05-3.93 (m, 2H, H-6a, H-6b), 3.87 (bs, 1H, OH), 2.25 (s, 3H, CH_3), 2.04, 2.03, 1.99, 1.88 (4 s, 12H, 4 CH_3). ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ (ppm): 171.50, 171.41, 171.06, 170.62 (C=O), 157.18 (C=O), 139.39 ($CH=N$), 136.43, 133.09, 129.77, 120.59 (Ar), 74.54, 72.77, 69.63 (C-3, C-4, C-5), 62.87 (C-6), 50.87 (C-2), 23.21 (CH_3), 21.30, 21.23, 21.15 (4 CH_3).

1-(2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetil-2-dezoxi- β -D-glükopiranozil)-4-(*p*-trifluorometilfenil)-szemikarbamid (36c) és 2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetil-2-dezoxi-D-glükóz 4-(*p*-trifluorometilfenil)-szemikarbazon (37c)



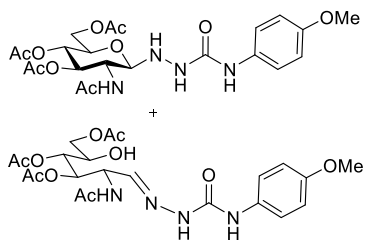
A 4.1.1 általános eljárás szerint 200 mg (0.58 mmol) **33** és 190 mg (0.87 mmol) 4-(*p*-trifluorometilfenil)-szemikarbamid (**35c**) reakciójából. Oszlopkromatográfia után 257 mg (81 %) fehér porszerű anyagot kaptunk, ami a **36c** és **37c** anyag

keveréke. APCI-MS pozitív mód (m/z): $C_{22}H_{27}F_3N_4O_9$ -re (548.17) számított: $[M + H]^+ = 549.18$, talált: $[M + H]^+ = 549.16$.

36c: 1H NMR (DMSO- d_6) δ (ppm): 8.61 (s, 1H, NH), 8.11 (d, $J = 8.8$ Hz, NH), 7.92 (s, 1H, NH), 7.66 (d, 2H, $J = 9.0$ Hz, Ar), 7.60 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz, Ar), 5.99 (d, 1H, $J = 3.1$ Hz, NH), 5.12 (pt, 1H, $J = 9.9$ Hz, H-3), 4.84 (pt, 1H, $J = 9.7$ Hz, H-4), 4.36 – 4.24 (m, 1H, H-1), 4.19 (dd, 1H, $J = 4.5, 12.1$ Hz, H-6a), 3.99 (dd, 1H, $J = 1.7, 12.2$ Hz, H-6b), 3.91-3.77 (m, 2H, H-2, H-5), 1.98, 1.97, 1.91, 1.78 (4 s, 12H, 4 CH_3). ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ (ppm): 170.11, 169.73, 169.70, 169.36 (C=O), 155.79 (C=O), 143.14, 125.92 (q, $^3J_{CF} = 7.2$ Hz, $^4J_{CF} = 3.4$ Hz), 124.59 (q, $^1J_{CF} = 277$ Hz), 121.73 (q, $^2J_{CF} = 32$ Hz), 117.83 (Ar), 89.18 (C-1), 73.47, 71.72, 68.61 (C-3, C-4, C-5), 62.21 (C-6), 50.72 (C-2), 22.76, 20.51, 20.43, 20.39 (4 CH_3).

37c: A jelátfedések miatt a teljes hozzárendelés nem volt lehetséges.

1-(2-Acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-dezoxi- β -D-glükopiranozil)-4-(*p*-metoxifenil)-szemikarbamid (36d) és 2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-dezoxi-D-glükóz 4-(*p*-metoxifenil)-szemikarbazon (37d)



A 4.1.1 általános eljárás szerint 200 mg (0.58 mmol) **33** és 156 mg (0.87 mmol) 4-(*p*-metoxifenil)-szemikarbamid (**35d**) reakciójából. Oszlopkromatográfia után 258 mg (87 %) fehér porszerű anyagot kaptunk, ami a **36d** és **37d** anyag

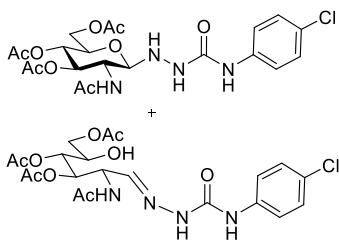
keveréke. ESI-MS pozitív mód (m/z): $C_{22}H_{30}N_4O_{10}$ -re (510.20) számított: $[M + H]^+ = 511.20$, talált: $[M + H]^+ = 511.33$.

36d: 1H NMR (DMSO- d_6) δ (ppm): 8.12 (d, $J = 8.4$ Hz, NH), 8.08 (s, 1H, NH), 7.51 (d, 1H, $J = 9.4$ Hz, NH), 7.33 (d, 2H, $J = 8.2$ Hz, Ar), 6.84 (d, 2H, $J = 8.2$ Hz, Ar), 5.86 (d, 1H, $J = 5.9$ Hz, NH), 5.12 (pt, 1H, $J = 9.9$ Hz, H-3), 4.83 (pt, 1H, $J = 9.9$ Hz, H-4), 4.28 (pt, 1H, $J = 9.4$ Hz, H-1), 4.20 (dd, 1H, $J = 4.6, 12.0$ Hz, H-6a), 3.99 (dd, 1H, $J = 1.9, 12.0$ Hz, H-6b), 3.90-3.77 (m, 2H, H-2, H-5), 3.70 (s, 3H, OCH_3), 1.99, 1.97, 1.92, 1.79 (4 s, 12H, 4 CH_3). ^{13}C NMR (DMSO- d_6)

δ (ppm): 170.54, 170.14, 170.01, 169.83 (C=O), 156.62 (C=O), 154.84, 132.92, 120.21, 114.29 (Ar), 89.97 (C-1), 73.90, 72.15, 69.09 (C-3, C-4, C-5), 62.63 (C-6), 55.61 (OCH₃), 51.33 (C-2), 23.19, 21.15, 21.06, 20.87 (4 CH₃).

37d: ¹H NMR (DMSO-d₆) δ (ppm): 10.54 (s, 1H, NH), 8.53 (s, 1H, NH), 8.19 (d, 1H, J = 8.8 Hz, NH), 7.46 (d, 2H, J = 9.0 Hz, Ar), 7.16 (d, J = 3.7 Hz, CH=N), 6.88 (d, 2H, J = 8.7 Hz, Ar), 5.59-5.43 (m, 2H, H-3, H-4), 5.05 (dd, 1H, J = 4.3, 6.8 Hz, H-2), 4.77-4.67 (m, 1H, H-5), 3.96-3.89 (m, 2H, H-6a, H-6b), 3.78 (bs, 1H, OH), 3.72 (s, 3H, OCH₃), 2.04, 2.03, 1.99, 1.95 (4 s, 12H, 4 CH₃). ¹³C NMR (DMSO-d₆) δ (ppm): 170.63, 170.60, 169.76, 169.42 (C=O), 155.36 (C=O), 153.47 (Ar), 139.45 (CH=N), 132.43, 121.65, 114.23 (Ar), 71.78, 70.39, 67.02 (C-3, C-4, C-5), 65.27 (C-6), 55.61 (OCH₃), 50.41 (C-2), 23.02, 21.13, 20.98, 20.84 (4 CH₃).

1-(2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetil-2-dezoxi- β -D-glükopiranozil)-4-(*p*-klór-fenil)-szemikarbazid (36e) és 2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetil-2-dezoxi-D-glükóz 4-(*p*-klór-fenil)-szemikarbazon (37e)



A 4.1.1 általános eljárás szerint 200 mg (0.58 mmol) **33** és 108 mg (0.87 mmol) 4-(*p*-klór-fenil)-szemikarbazid (**35e**) reakciójából.

Oszlopkromatográfia után 229 mg (77 %) fehér porszerű anyagot kaptunk, ami a **36e** és **37e** anyag

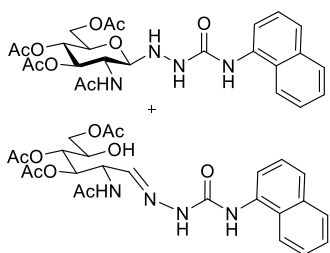
keveréke. ESI-MS pozitív mód (m/z): C₂₁H₂₇ClN₄O₉-re (514.15) számított: $[M + H]^+ = 515.15$, talált: $[M + H]^+ = 515.25$.

36e: ¹H NMR (DMSO-d₆) δ (ppm): 8.36 (s, 1H, NH), 8.09 (d, J = 8.5 Hz, NH), 7.73 (d, 1H, J = 9.8 Hz, NH), 7.47 (d, 2H, J = 8.9 Hz, Ar), 7.29 (d, 2H, J = 8.9 Hz, Ar), 5.91 (bs, 1H, NH), 5.12 (pt, 1H, J = 9.9 Hz, H-3), 4.83 (pt, 1H, J = 9.7 Hz, H-4), 4.30 (pt, 1H, J = 8.7 Hz, H-1), 4.20 (dd, 1H, J = 4.6, 12.2, Hz, H-6a), 3.99 (dd, 1H, J = 1.9, 12.2, Hz, H-6b), 3.98-3.78 (m, 2H, H-2, H-5), 1.98, 1.97, 1.91, 1.78 (4 s, 12H, 4 CH₃). ¹³C NMR (DMSO-d₆) δ (ppm): 170.05, 169.66, 169.59, 169.28 (C=O), 155.87 (C=O), 138.39, 128.41, 125.23, 119.60 (Ar), 89.25 (C-1),

73.43, 71.68, 68.60 (C-3, C-4, C-5), 62.17 (C-6), 50.75 (C-2), 22.73, 20.49, 20.40, 20.36 (4 CH₃).

37e: ¹H NMR (DMSO-d₆) δ (ppm): 10.68 (s, 1H, NH), 8.75 (s, 1H, NH), 8.17 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz, NH), 7.64 (d, 2H, *J* = 8.9 Hz, Ar), 7.35 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz, Ar), 7.19 (d, *J* = 3.9 Hz, CH=N), 5.57-5.48 (m, 2H, H-3, H-4), 5.05 (dd, 1H, *J* = 4.4, 6.9 Hz, H-2), 4.37 (dd, 1H, *J* = 1.7, 11.6 Hz, H-5), 3.94 (dd, 2H, *J* = 5.4, 11.0 Hz, H-6a, H-6b), 3.79 (bs, 1H, OH), 2.08, 2.01, 1.94, 1.87 (4 s, 12H, 4 CH₃). ¹³C NMR (DMSO-d₆) δ (ppm): 171.14, 170.93, 170.75, 170.35 (C=O), 157.34 (C=O), 143.72 (CH=N), 138.20, 129.19, 127.24, 122.00 (Ar), 71.78, 71.68, 70.45 (C-3, C-4, C-5), 63.00 (C-6), 50.85 (C-2), 23.03, 21.27, 21.23, 21.15 (4 CH₃).

1-(2-Acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-dezoxi-β-D-glükopiranozil)-4-(1-naftil)-szemikarbazid (36f) és 2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-dezoxi-D-glükóz 4-(1-naftil)-szemikarbazon (37f)



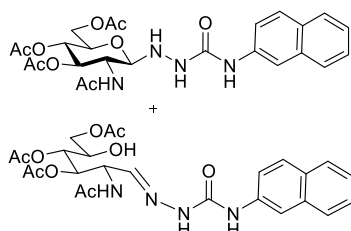
A 4.1.1 általános eljárás szerint 200 mg (0.58 mmol) **33** és 175 mg (0.87 mmol) 4-(1-naftil)-szemikarbazid (**35f**) reakciójából. Oszlopkromatográfia után 290 mg (94 %) fehér porszerű anyagot kaptunk, ami a **36f** és **37f** anyag keveréke. APCI-MS pozitív mód (*m/z*): C₂₅H₃₀N₄O₉-re (530.20) számított: [M + H]⁺ = 531.21, talált: [M + H]⁺ = 531.25.

36f: ¹H NMR (DMSO-d₆) δ (ppm): 8.75 (s, 1H, NH), 8.19 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, Ar), 8.03 (d, 1H, *J* = 7.4 Hz, NH), 7.97 – 7.81 (m, 3H, NH, Ar), 7.61 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, Ar), 7.56 – 7.51 (m, 2H, Ar), 7.45 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz, Ar), 6.12 (d, 1H, *J* = 5.9 Hz, NH), 5.14 (pt, 1H, *J* = 9.9 Hz, H-3), 4.88 (pt, 1H, *J* = 9.7 Hz, H-4), 4.51 – 4.31 (m, 1H, H-1), 4.23 (dd, 1H, *J* = 4.4, 12.1 Hz, H-6a), 4.01 (dd, 1H, *J* = 1.8, 12.2 Hz, H-6b), 3.97-3.87 (m, 2H, H-2, H-5), 1.97, 1.94, 1.92, 1.69 (4 s, 12H, 4 CH₃). ¹³C NMR (DMSO-d₆) δ (ppm): 170.08, 169.70, 169.66, 169.33 (C=O), 156.15 (C=O), 133.86, 133.62, 128.45, 125.87, 125.74, 125.70, 125.41, 122.60, 120.54,

116.39 (Ar), 89.45 (C-1), 73.50, 71.73, 68.63 (C-3, C-4, C-5), 62.18 (C-6), 50.81 (C-2), 22.77, 20.44, 20.40, 20.36 (4 CH₃).

37f: A jelátfedések miatt a teljes hozzárendelés nem volt lehetséges.

1-(2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetil-2-dezoxi-β-D-glükopiranozil)-4-(2-naftil)-szemikarbazid (36g) és 2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetil-2-dezoxi-D-glükóz 4-(2-naftil)-szemikarbazon (37g)



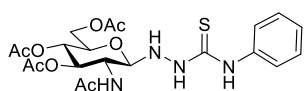
A 4.1.1 általános eljárás szerint 200 mg (0.58 mmol) **33** és 175 mg (0.87 mmol) 4-(2-naftil)-szemikarbazid (**35g**) reakciójából. Oszlopkromatográfia után 246 mg (80 %) fehér porszerű anyagot kaptunk, ami a **36g** and **37g** anyag keveréke. APCI-MS pozitív mód (m/z):

C₂₅H₃₀N₄O₉-re (530.20) számított: [M + H]⁺ = 531.21, talált: [M + H]⁺ = 531.19.

36g: ¹H NMR (DMSO-d₆) δ (ppm): 8.48 (s, 1H, NH), 8.17 (d, 1H, J = 8.7 Hz, Ar), 8.06 (s, 1H, Ar), 7.86 – 7.68 (m, 4H, NH, Ar), 7.49 (dd, 1H, J = 8.9, 1.7 Hz, Ar), 7.44 (t, 1H, J = 7.4 Hz Ar), 7.35 (t, 1H, J = 7.4 Hz, Ar), 5.98 (d, 1H, J = 5.9 Hz, NH), 5.15 (pt, 1H, J = 9.9 Hz, H-3), 4.86 (pt, 1H, J = 9.7 Hz, H-4), 4.38 – 4.31 (m, 1H, H-1), 4.22 (dd, 1H, J = 4.5, 12.2 Hz, H-6a), 4.02 (dd, 1H, J = 1.5, 12.1 Hz, H-6b), 3.93-3.81 (m, 2H, H-2, H-5), 1.99, 1.98, 1.93, 1.83 (4 s, 12H, 4 CH₃). ¹³C NMR (DMSO-d₆) δ (ppm): 170.5, 169.75, 169.73, 169.38 (C=O), 156.14 (C=O), 137.03, 133.65, 129.11, 128.27, 127.46, 126.89, 126.36, 123.94, 119.69, 113.23 (Ar), 89.42 (C-1), 73.49, 71.75, 68.67 (C-3, C-4, C-5), 62.23 (C-6), 50.87 (C-2), 22.79, 20.54, 20.44, 20.41 (4 CH₃).

37g: A jelátfedések miatt a teljes hozzárendelés nem volt lehetséges.

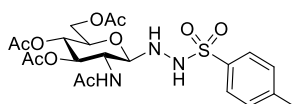
1-(2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetil-2-dezoxi-β-D-glükopiranozil)-4-feniltio-szemikarbazid (36h)



A 4.1.1 általános eljárás szerint 200 mg (0.58 mmol) **33** és 146 mg (0.87 mmol) 4-feniltioszemikarbazid (**35h**)

reakciójából. 251 mg (87 %) fehér porszerű anyagot szűrtünk ki a reakcióelegyből. Op: 204-205 °C; $[\alpha]_D = -19$ ($c = 0,52$, CH₃OH). ¹H NMR (DMSO-d₆) δ (ppm): 9.33 (s, 1H, NH), 9.01 (s, 1H, NH), 8.14 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz, NH), 7.62 (d, 2H, $J = 7.8$ Hz, H_o), 7.32 (t, 2H, $J = 7.8$ Hz, H_m), 7.12 (t, 1H, $J = 7.4$ Hz, H_p), 6.31 (d, 1H, $J = 6.8$ Hz, NH), 5.14 (pt, 1H, $J = 9.8$ Hz, H-3), 4.85 (pt, 1H, $J = 9.8$ Hz, H-4), 4.32 (dd, 1H, $J = 7.1, 9.4$ Hz, H-1), 4.21 (dd, 1H, $J = 4.6, 12.2$ Hz, H-6a), 4.02 (dd, 1H, $J = 1.6, 12.2$ Hz, H-6b), 3.90 (ddd, 1H, $J = 2.3, 4.3, 9.9$ Hz, H-5), 3.82 (q, 1H, $J = 9.6$ Hz, H-2), 1.98, 1.97, 1.93, 1.76 (4 s, 12H, 4 CH₃). ¹³C NMR (DMSO-d₆) δ (ppm): 179.64 (C=S), 169.99, 169.84, 169.61, 169.25 (C=O), 138.74, 128.13, 124.41, 122.90 (Ar), 88.72 (C-1), 73.13, 71.78, 68.57 (C-3, C-4, C-5), 62.08 (C-6), 50.91 (C-2), 22.65, 20.44, 20.34, 20.31 (4 CH₃). ESI-MS pozitív mód (m/z): C₂₁H₂₈N₄O₈S-re (496.16) számított: $[M + H]^+ = 497.17$, talált: $[M + H]^+ = 497.33$.

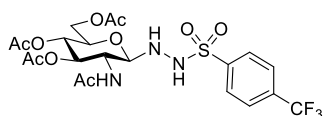
1-(2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetil-2-dezoxi- β -D-glükopiranozil)-2-(*p*-toluolszulfonil)-hidrazin (36i)



A 4.1.1 általános eljárás szerint 200 mg (0.58 mmol) **33** és 160 mg (0.87 mmol) *p*-toluolszulfonil-hidrazid (**35i**) reakciójából. A reagens feleslegét kiszűrtük a reakcióelegyből, majd az oldószert lepároltuk. 230 mg (77 %) fehér porszerű anyagot izoláltunk. Op: 172 - 174 °C; $[\alpha]_D = -60$ ($c = 0.43$, CHCl₃). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm): 7.72 (d, 2H, $J = 7.7$ Hz, Ar), 7.31 (d, 2H, $J = 7.6$ Hz, Ar), 6.65 (s, 1H, NH), 6.13 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, NH), 5.28 (pt, 1H, $J = 9.8$ Hz, H-3), 4.98 (pt, 1H, $J = 9.6$ Hz, H-4), 4.41 (pt, 1H, $J = 8.4$ Hz, H-1), 4.28 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz, NH), 4.19 (dd, 1H, $J = 3.8, 12.1$ Hz, H-6a), 4.09 (dd, 1H, $J = 1.8, 12.1$ Hz, H-6b), 3.86 (ddd ('q'), 1H, $J = 9.4$ Hz, H-2), 3.70 – 3.66 (m, 1H, H-5), 2.43 (s, 3H, CH₃), 2.08, 2.03, 2.02, 1.99 (4 s, 12H, 4 CH₃). ¹³C NMR (CDCl₃) δ (ppm): 171.19, 171.09, 170.84, 169.54 (C=O), 144.42, 134.77, 129.68, 128.15 (Ar), 90.10 (C-1), 73.10, 72.59, 68.63 (C-3, C-4, C-5), 62.16 (C-6), 51.97 (C-2), 23.30, 21.68, 20.83, 20.77, 20.69 (5 CH₃). ESI-MS pozitív mód

(m/z): C₂₁H₂₉N₃O₁₀S-re (515.16) számított: [M + H]⁺ = 516.16, talált: [M + H]⁺ = 516.92.

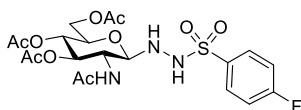
1-(2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetil-2-dezoxi-β-D-glükopiranozil)-2-(p-trifluorometilbenzolszulfonil)-hidrazin (36j)



A 4.1.1 általános eljárás szerint 200 mg (0.58 mmol) **33** és 209 mg (0.87 mmol) *p*-trifluormetilbenzolszulfonil-hidrazid (**35j**) reakciójából. A reagens feleslegét

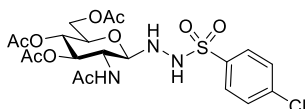
kiszűrtük a reakcióelegyből, majd az oldószert lepároltuk. A maradékot oszlopkromatográfiával tisztítottuk. 281 mg (85 %) fehér porszerű anyagot izoláltunk. Op: 185 - 187 °C (bomlik); [α]_D = - 41 (c = 0.32, CH₂Cl₂). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm): 7.98 (d, 2H, *J* = 7.7 Hz, Ar), 7.79 (t, 2H, *J* = 7.7 Hz, Ar), 6.85 (s, 1H, NH), 6.08 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, NH), 5.23 (pt, 1H, *J* = 9.7 Hz, H-3), 5.00 (pt, 1H, *J* = 9.4 Hz, H-4), 4.46 – 4.28 (m, 2H, H-1, NH), 4.19 (dd, 1H, *J* = 2.9, 11.7 Hz, H-6a), 4.11 (dd, 1H, *J* = 1.3, 12.2 Hz, H-6b), 3.87 (ddd ('q'), 1H, *J* = 8.8 Hz, H-2), 3.77 – 3.62 (m, 1H, H-5), 2.08, 2.04, 2.03, 1.98 (4 s, 12H, 4 CH₃). ¹³C NMR (CDCl₃) δ (ppm): 171.32, 171.16, 170.85, 169.51 (C=O), 141.58, 134.94 (q, ²*J*_{CF} = 33.6 Hz), 128.63, 126.26 (q, ⁴*J*_{CF} = 3.6 Hz, Ar) 126.07 (q, ¹*J*_{CF} = 280.6 Hz, CF₃), 90.47 (C-1), 73.37, 72.52, 68.45 (C-3, C-4, C-5), 62.10 (C-6), 52.13 (C-2), 23.33, 20.87, 20.79, 20.71 (4 CH₃). ESI-MS pozitív mód (m/z): C₂₁H₂₆F₃N₃O₁₀S-re (569.13) számolt: [M + H]⁺ = 570.14, talált: [M + H]⁺ = 570.17.

1-(2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetil-2-dezoxi-β-D-glükopiranozil)-2-(p-fluor-benzolszulfonil)-hidrazin (36k)



A 4.1.1 általános eljárás szerint 200 mg (0.58 mmol) **33** és 165 mg (0.87 mmol) *p*-fluorbenzolszulfonil-hidrazin (**35k**) reakciójából. A reagens feleslegét kiszűrtük a reakcióelegyből, majd az oldószert lepároltuk. A maradékot oszlopkromatográfiával tisztítottuk. 259 mg (86 %) fehér porszerű anyagot izoláltunk. Op: 187 - 190 °C; $[\alpha]_D = -38$ ($c = 0.30$, CH_2Cl_2). ^1H NMR (CDCl_3) δ (ppm): 7.86 (dd, 2H, $J = 5.0, 8.7$ Hz, Ar), 7.20 (t, 2H, $J = 8.5$ Hz, Ar), 6.63 (s, 1H, NH), 6.04 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, NH), 5.24 (pt, 1H, $J = 9.9$ Hz, H-3), 5.00 (pt, 1H, $J = 9.7$ Hz, H-4), 4.40 (pt, 1H, $J = 9.1$ Hz, H-1), 4.30 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz, NH), 4.20 (dd, 1H, $J = 4.5, 12.3$ Hz, H-6a), 4.09 (dd, 1H, $J = 1.2, 12.0$ Hz, H-6b), 3.86 (ddd ('q'), 1H, $J = 9.5$ Hz, H-2), 3.68 (ddd, 1H, $J = 2.2, 4.2, 9.9$ Hz, H-5), 2.08, 2.04, 2.03, 1.98 (4 s, 12H, 4 CH_3). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ (ppm): 171.28, 171.08, 170.83, 169.52 (C=O), 165.66 (d, $^1J_{\text{CF}} = 255.8$ Hz), 133.86, 130.92 (d, $^3J_{\text{CF}} = 9.3$ Hz), 116.41 (d, $^2J_{\text{CF}} = 22.7$ Hz, Ar), 90.34 (C-1), 73.29, 72.52, 68.44 (C-3, C-4, C-5), 62.11 (C-6), 52.10 (C-2), 23.36, 20.88, 20.81, 20.73 (4 CH_3). ESI-MS pozitív mód (m/z): $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{FN}_3\text{O}_{10}\text{S}$ -re (519.13) számított: $[\text{M} + \text{H}]^+ = 520.14$, talált: $[\text{M} + \text{H}]^+ = 520.17$.

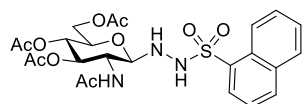
1-(2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetil-2-dezoxi-β-D-glükopiranozil)-2-(p-klór-benzolszulfonil)-hidrazin (36l)



A 4.1.1 általános eljárás szerint 200 mg (0.58 mmol) **33** és 180 mg (0.87 mmol) *p*-klórbenzolszulfonil-hidrazin (**35l**) reakciójából. A reagens feleslegét kiszűrtük a reakcióelegyből, majd az oldószert lepároltuk. A maradékot oszlopkromatográfiával tisztítottuk. 277 mg (89 %) fehér porszerű anyagot izoláltunk. Op: 195 - 198 °C (bomlik); $[\alpha]_D = -42$ ($c = 0.23$, CH_2Cl_2). ^1H NMR (CDCl_3) δ (ppm): 7.77 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz, Ar), 7.49 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz,

Ar), 6.46 (s, 1H, NH), 5.85 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, NH), 5.22 (pt, 1H, $J = 10.0$ Hz, H-3), 5.01 (pt, 1H, $J = 9.7$ Hz, H-4), 4.39 (pt, 1H, $J = 9.1$ Hz, H-1), 4.26 (d, 1H, $J = 8.9$ Hz, NH), 4.20 (dd, 1H, $J = 4.6, 12.4$ Hz, H-6a), 4.10 (dd, 1H, $J = 1.9, 12.3$ Hz, H-6b), 3.86 (ddd ('q'), 1H, $J = 9.6$ Hz, H-2), 3.66 (ddd, 1H, $J = 2.4, 4.6, 10.2$ Hz, H-5), 2.09, 2.04, 2.03, 1.98 (4 s, 12H, 4 CH₃). ¹³C NMR (CDCl₃) δ (ppm): 171.34, 171.00, 170.78, 169.49 (C=O), 140.22, 136.38, 129.55, 129.47 (Ar), 90.41 (C-1), 73.43, 72.52, 68.35 (C-3, C-4, C-5), 62.08 (C-6), 52.18 (C-2), 23.40, 20.90, 20.81, 20.74 (4 CH₃). ESI-MS pozitív mód (m/z): C₂₀H₂₆ClN₃O₁₀S-re (535.10) számított: $[M + H]^+ = 536.11$, talált: $[M + H]^+ = 536.17$.

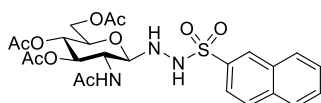
1-(2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetil-2-dezoxi- β -D-glükopiranozil)-2-(1-naftil-szulfonil)-hidrazin (36m)



A 4.1.1 általános eljárás szerint 200 mg (0.58 mmol) **33** és 193 mg (0.87 mmol) 1-naftilszulfonil-hidrazid (**35m**)

reakciójából. A reagens feleslegét kiszűrtük a reakcióelegyből, majd az oldószert lepároltuk. A maradékot oszlopkromatográfiával tisztítottuk. 285 mg (89 %) színtelen amorf anyagot izoláltunk. $[\alpha]_D = -19$ ($c = 0.22$, CH₂Cl₂). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm): 8.64 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz, Ar), 8.24 (dd, 1H, $J = 1.1, 7.4$ Hz, Ar), 8.11 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, Ar), 7.95 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz, Ar), 7.67 (td, 1H, $J = 1.4, 7.1$ Hz, Ar), 7.61 (td, 1H, $J = 1.2, 8.1$ Hz, Ar), 7.53 (t, 1H, $J = 7.6$ Hz, Ar), 6.96 (s, 1H, NH), 5.99 (d, 1H, $J = 8.9$ Hz, NH), 5.14 (pt, 1H, $J = 10.0$ Hz, H-3), 4.87 (pt, 1H, $J = 9.7$ Hz, H-4), 4.33 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, NH), 4.26 (t, 1H, $J = 9.0$ Hz, H-1), 4.05 (dd, 1H, $J = 4.5, 12.4$ Hz, H-6a), 4.00 (dd, 1H, $J = 2.5, 12.4$ Hz, H-6b), 3.79 (ddd ('q'), 1H, $J = 9.2$ Hz, H-2), 3.54 (ddd, 1H, $J = 2.6, 4.3, 10.1$ Hz, H-5), 2.06, 2.00, 1.99, 1.90 (4 s, 12H, 4 CH₃). ¹³C NMR (CDCl₃) δ (ppm): 171.15, 171.05, 170.80, 169.47 (C=O), 135.23, 134.27, 132.55, 131.58, 129.24, 128.59, 128.43, 127.11, 124.65, 124.02 (Ar), 89.94 (C-1), 73.06, 72.58, 68.49 (C-3, C-4, C-5), 62.12 (C-6), 51.83 (C-2), 23.23, 20.85, 20.75, 20.67 (4 CH₃). ESI-MS pozitív mód (m/z): C₂₄H₂₉N₃O₁₀S-re (551.16) számított: $[M + H]^+ = 552.16$, talált: $[M + H]^+ = 552.08$.

1-(2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetil-2-dezoxi-β-D-glükopiranozil)-2-(2-naftil-szulfonil)-hidrazin (36n)



A 4.1.1 általános eljárás szerint 200 mg (0.58 mmol) **33**

és 193 mg (0.87 mmol) 2-naftilszulfonil-hidrazid (**35n**)

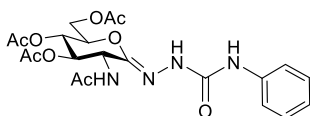
reakciójából. A reagens feleslegét kiszűrtük a reakcióelegyből, majd az oldószert lepároltuk. A maradékot oszlopkromatográfiával tisztítottuk. 243 mg (76 %) fehér porszerű anyagot izoláltunk. Op: 145 - 148 °C; $[\alpha]_D = -33$ ($c = 0.23$, CH_2Cl_2). ^1H NMR (CDCl_3) δ (ppm): 8.41 (s, 1H, Ar), 7.97 – 7.86 (m, 3H, Ar), 7.80 (dd, 1H, $J = 1.8, 8.7$ Hz, Ar), 7.65 (td, 1H, $J = 1.6, 6.8$ Hz, Ar), 7.60 (td, 1H, $J = 1.2, 6.5$ Hz, Ar), 6.99 (s, 1H, NH), 6.30 (d, 1H, $J = 8.9$ Hz, NH), 5.26 (pt, 1H, $J = 10.1$ Hz, H-3), 4.96 (pt, 1H, $J = 9.8$ Hz, H-4), 4.45 – 4.37 (m, 2H, H-1, NH), 4.15 (dd, 1H, $J = 4.5, 12.4$ Hz, H-6a), 4.06 (dd, 1H, $J = 2.2, 12.3$ Hz, H-6b), 3.86 (ddd ('q'), 1H, $J = 9.3$ Hz, H-2), 3.66 (ddd, 1H, $J = 2.3, 4.3, 10.0$ Hz, H-5), 2.04, 2.02, 2.00, 1.95 (4 s, 12H, 4 CH_3). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ (ppm): 171.22, 171.07, 170.87, 169.54 (C=O), 135.17, 134.66, 132.09, 129.84, 129.33, 129.30, 129.20, 128.06, 127.73, 122.95 (Ar), 90.17 (C-1), 73.05, 72.62, 68.62 (C-3, C-4, C-5), 62.11 (C-6), 51.94 (C-2), 23.25, 20.80, 20.75, 20.67 (4 CH_3). ESI-MS pozitív mód (m/z): $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{S}$ -re (551.16) számított: $[\text{M} + \text{H}]^+ = 552.16$, talált: $[\text{M} + \text{H}]^+ = 552.08$.

4.1.2 Általános eljárás oxidációra CrO_3 - piridin komplex-szel

2 Ekvivalens króm-trioxidot, 4 ekvivalens vízmentes piridint és 2 ml vízmentes diklórmetánt. 20 percig szobahőmérsékleten kevertettük. Jeges fürdővel lehűtöttük, majd 100 mg anyagot 3 ml vízmentes diklórmetánban szuszpendálva egy részletben hozzáadtunk és tovább kevertettük, miközben lassan hagytuk szobahőmérsékletűre melegedni. A reakció lejátszódását vékonyréteg kromatográfiával ellenőriztük (eluens: acetón : hexán = 1 : 1). A reakcióelegyhez 4 ml dietil-étert adtunk, a kivált csapadékot szűrtük, kevés diklórmetánnal mostuk. A szűrletet bepároltuk, a maradékot oszlopkromatográfiásan tisztítottuk (eluens: acetón : hexán = 1 : 2).

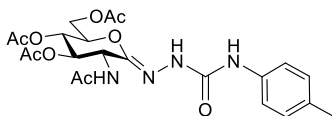
**2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetil-2-dezoxi-D-glükono-1,5-lakton
szemikarbazon (38a)**

4-fenil-



36a és **37a** vegyületek keverékéből a 4.1.2 általános eljárás alapján. Oszlopkromatográfia után 83 mg (83 %) fehér porszerű anyagot kaptunk. Op: 96 - 98 °C, Op_{ir.}⁹⁹: 103 °C. A spektrális adatok az irodalmi értékekkel megegyeznek⁹⁹.

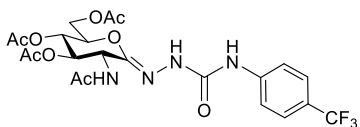
**2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetil-2-dezoxi-D-glükono-1,5-lakton 4-(p-metilfenil)-
szemikarbazon (38b)**



36b és **37b** vegyületek keverékéből a 4.1.2 általános eljárás alapján. Oszlopkromatográfia után 92 mg (92 %) fehér porszerű anyagot kaptunk. Op: 184 - 187 °C;

$[\alpha]_D = +38$ ($c = 0,50$, CHCl_3). ^1H NMR (CDCl_3) δ (ppm): 8.24 (s, 1H, NH), 7.78 (s, 1H, NH), 7.30 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 7.11 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 6.51 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, NH), 5.34- 5.23 (m, 2H, H-3, H-4), 4.92-4.79 (m, 1H, H-2), 4.40-4.26 (m, 3H, H-6a, H-6b, H-5), 2.30 (s, 3H, CH_3), 2.11, 2.07, 2.06, 1.92 (4 s, 12H, 4 CH_3). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ (ppm): 170.55, 170.45, 170.31, 169.18 (C=O), 153.05 (C=O), 142.24 (C=N), 135.24, 133.47, 129.79, 119.63 (Ar), 76.42, 71.85, 67.50 (C-3, C-4, C-5), 61.59 (C-6), 50.07 (C-2), 22.85 (CH_3), 20.84, 20.73, 20.62 (4 CH_3). ESI-MS pozitív mód (m/z): $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_9$ -re (492.19) számított: $[\text{M} + \text{H}]^+ = 493.19$, talált: $[\text{M} + \text{H}]^+ = 493.42$.

**2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetil-2-dezoxi-D-glükono-1,5-lakton 4-(p-trifluor-
metilfenil)-szemikarbazon (38c)**

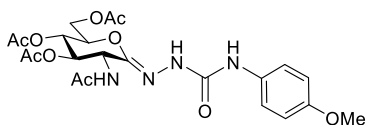


36c és **37c** vegyületek keverékéből a 4.1.2 általános eljárás alapján. Oszlopkromatográfia után 26 mg (26 %) fehér porszerű anyagot kaptunk.

Op: 204 - 206 °C; $[\alpha]_D = +31.67$ ($c = 0.204$, CH_2Cl_2). ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 9.86 (s, 1H, NH), 9.08 (s, 1H, NH), 8.39 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, NH), 7.74

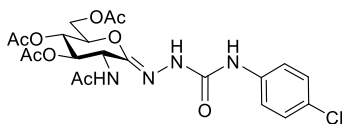
(d, 2H, $J = 8.8$ Hz, Ar), 7.65 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz, Ar), 5.29 (pt, 1H, $J = 9.2$ Hz, H-3), 5.19 (pt, 1H, $J = 9.1$ Hz, H-4), 4.80 (pt, 1H, $J = 8.9$ Hz, H-2), 4.48 – 4.31 (m, 3H, H-5, H-6a, H-6b), 2.06, 2.01, 1.97, 1.92 (4 s, 12H, 4 CH₃). ¹³C NMR (DMSO-d₆) δ (ppm): 170.08, 169.77, 169.48, 169.03 (C=O), 152.28 (C=O), 142.94 (Ar), 142.85 (C=N), 127.70, 126.06 (d, $^4J_{\text{CF}} = 3.2$ Hz), 124.4 (q, $^1J_{\text{CF}} = 277$ Hz), 122.1 (q, $^2J_{\text{CF}} = 32$ Hz), 118.26 (Ar), 75.21, 72.19, 67.12 (C-3, C-4, C-5), 61.12 (C-6), 49.27 (C-2), 22.56, 20.54, 20.45, 20.37 (4 CH₃). APCI-MS pozitív mód (m/z): C₂₂H₂₅F₃N₄O₉-re (546.16) számított: $[M + H]^+ = 547.16$, talált: $[M + H]^+ = 547.03$.

2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetil-2-dezoxi-D-glükono-1,5-lakton 4-(*p*-metoxifenil)-szemikarbazon (38d)



36d és 37d vegyületek keverékéből a 4.1.2 általános eljárás alapján. Oszlopkromatográfia után 86 mg (86 %) sárgás fehér porszerű anyagot kaptunk. Op: 97 - 102°C; $[\alpha]_D = +19$ (c = 0,42, CH₃OH). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm): 8.23 (s, 1H, NH), 7.70 (s, 1H, NH), 7.32 (d, 2H, $J = 8.9$ Hz, Ar), 6.86 (d, 2H, $J = 8.9$ Hz, Ar), 6.48 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, NH), 5.28 (2 pt, 2H, $J = 8.2$ Hz, H-3, H-4), 4.88 (pt, 1H, $J = 8.5$ Hz, H-2), 4.41-4.33 (m, 1H, H-5), 4.33-4.24 (m, 2H, H-6a, H-6b), 3.78 (s, 1H, OCH₃), 2.12, 2.08, 2.07, 1.96 (4 s, 12H, 4 CH₃). ¹³C NMR (CDCl₃) δ (ppm): 170.52, 170.38, 170.32, 169.18 (C=O), 156.35 (C=O), 153.20 (Ar), 142.35 (C=N), 130.74, 121.81, 114.46 (Ar), 76.54, 71.96, 67.46 (C-3, C-4, C-5), 61.61 (C-6), 55.64 (OCH₃), 50.13 (C-2), 23.02, 20.78, 20.65 (4 CH₃). ESI-MS pozitív mód (m/z): C₂₂H₂₈N₄O₁₀-re (508.18) számított: $[M + H]^+ = 509.19$, talált: $[M + H]^+ = 509.25$.

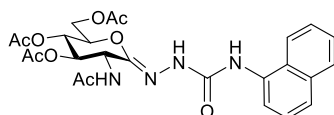
2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetil-2-dezoxi-D-glükono-1,5-lakton 4-(*p*-klórifenil)-szemikarbazon (38e)



36e és 37e vegyületek keverékéből a 4.1.2 általános eljárás alapján. Oszlopkromatográfia után 76 mg

(78 %) fehér porszerű anyagot kaptunk. Op: 193-194 °C; $[\alpha]_D = + 40$ (c = 0.53, CHCl₃). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm): 8.21 (s, 1H, NH), 7.85 (s, 1H, NH), 7.37 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, Ar), 7.26 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, Ar), 6.38 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, NH), 5.31 (pt, 1H, *J* = 8.5 Hz, H-3), 5.25 (pt, 1H, *J* = 8.5 Hz, H-4), 4.90 (pt, 1H, *J* = 8.7 Hz, H-2), 4.38-4.32 (m, 3H, H-6a, H-6b, H-5), 2.12, 2.08, 2.08, 2.02 (4 s, 12H, 4 CH₃). ¹³C NMR (CDCl₃) δ (ppm): 170.50, 170.34, 169.17 (C=O), 152.64 (C=O), 142.35 (C=N), 136.43, 129.21, 128.77, 120.72 (Ar), 76.76, 71.78, 67.40 (C-3, C-4, C-5), 61.62 (C-6), 50.16 (C-2), 23.08, 20.75, 20.64 (4 CH₃). ESI-MS pozitív mód (m/z): C₂₁H₂₅ClN₄O₉-re (512.13) számított: $[M + H]^+ = 513.14$, talált: $[M + H]^+ = 513.25$.

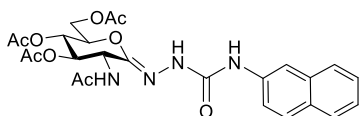
2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetil-2-dezoxi-D-glükono-1,5-lakton 4-(1-naftil)-szemikarbazon (38f)



36f és 37f vegyületek keverékéből a 4.1.2 általános eljárás alapján. Oszlopkromatográfia után 64 mg (64 %) fehér porszerű anyagot kaptunk.

Op: 237 °C (bomlik); $[\alpha]_D = + 19.77$ (c = 0.204, CH₂Cl₂). ¹H NMR (DMSO-d₆) δ (ppm): 9.95 (s, 1H, NH), 8.97 (s, 1H, NH), 8.50 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz, NH), 8.03 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz, Ar), 7.99 – 7.90 (m, 2H, Ar), 7.66 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, Ar), 7.61 - 7.52 (m, 2H, Ar), 7.49 (t, 1H, *J* = 7.9 Hz, Ar), 5.33 (pt, 1H, *J* = 9.3 Hz, H-3), 5.27 (pt, 1H, *J* = 9.6 Hz, H-4), 4.88 (pt, 1H, *J* = 8.9 Hz, H-2), 4.50 -4.31 (m, 3H, H-6a, H-6b, H-5), 2.07, 2.02, 1.99, 1.96 (4 s, 12H, 4 CH₃). ¹³C NMR (DMSO-d₆) δ (ppm): 170.10, 169.70, 169.52, 169.07 (C=O), 152.84 (C=O), 142.68 (C=N), 133.71, 133.55, 128.54, 126.05, 125.90, 123.28, 120.82, 117.30 (Ar), 75.23, 71.93, 67.17 (C-3, C-4, C-5), 61.03 (C-6), 49.28 (C-2), 22.57, 20.55, 20.38 (4 CH₃). APCI-MS pozitív mód (m/z): C₂₅H₂₈N₄O₉-re (528.19) számított: $[M + H]^+ = 529.19$, talált: $[M + H]^+ = 529.21$.

2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetil-2-dezoxi-D-glükono-1,5-lakton 4-(2-naftil)-szemikarbazon (38g)

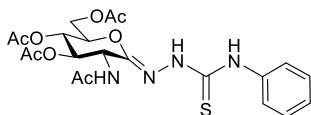


36g és 37g vegyületek keverékéből a 4.1.2 általános eljárás alapján. Oszlopkromatográfia után 93 mg (94 %) fehér porszerű anyagot kaptunk. Op: 212 °C (bomlik); $[\alpha]_D = +34.93$ ($c = 0.202$, CH_2Cl_2). ^1H NMR (DMSO-d_6) δ (ppm): 9.78 (s, 1H, NH), 8.90 (s, 1H, NH), 8.42 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, NH), 8.17 (s, 1H, Ar), 7.88 – 7.75 (m, 3H, Ar), 7.57 (dd, 1H, $J = 8.9$ Hz, 1.6 Hz, Ar), 7.45 (t, 1H, $J = 7.6$ Hz, Ar), 7.37 (t, 1H, $J = 7.4$ Hz, Ar), 5.31 (pt, 1H, $J = 9.1$ Hz, H-3), 5.21 (pt, 1H, $J = 9.2$ Hz, H-4), 4.83 (pt, 1H, $J = 8.9$ Hz, H-2), 4.48-4.34 (m, 3H, H-6a, H-6b, H-5), 2.07, 2.02, 1.98, 1.96 (4 s, 12H, 4 CH_3). ^{13}C NMR (DMSO-d_6) δ (ppm): 170.08, 169.81, 169.50, 169.04 (C=O), 152.61 (C=O), 142.38 (C=N), 136.80, 133.61, 129.29, 128.38, 127.46, 127.03, 126.39, 124.14, 119.99, 113.89 (Ar), 75.20, 72.24, 67.18 (C-3, C-4, C-5), 61.12 (C-6), 49.30 (C-2), 22.59, 20.54, 20.47, 20.37 (4 CH_3). APCI-MS pozitív mód (m/z): $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_9$ -re (528.19) számított: $[\text{M} + \text{H}]^+ = 529.19$, talált: $[\text{M} + \text{H}]^+ = 529.15$.

4.1.3 Általános eljárás oxidációra MnO_2 -dal

100 mg anyagot oldottunk 4 ml vízmentes diklórmetánban majd hozzáadtuk az aktivált MnO_2 -ot. Reflux hőmérsékleten kevertettük. A reakció lejártszódását vékonyréteg kromatográfiával ellenőriztük (eluens: acetón : hexán = 1 : 1). A MnO_2 -ot celiten kiszűrtük, a szűrletet oszlopkromatográfiásan tisztítottuk (eluens: acetón : hexán = 1 : 2)

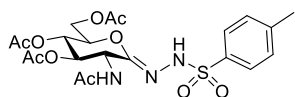
2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetil-2-dezoxi-D-glükono-1,5-lakton 4-feniltioszemikarbazon (38h)



A 4.1.3 általános eljárás alapján **36h** vegyületből (100 mg, 0.201 mmol) 105 mg (1.21 mmol) aktivált MnO_2 -dal. 78 mg (78 %) sárga amorf anyag.

^1H NMR (CDCl_3) δ (ppm): 9.00 (s, 1H, NH), 8.89 (s, 1H, NH), 7.62 (d, 2H, $J = 7.6$ Hz, H_o), 7.39 (t, 2H, $J = 7.9$ Hz, H_m), 7.24 (t, 1H, $J = 7.4$ Hz, H_p), 6.19 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz, NH), 5.34 (pt, 1H, $J = 8.7$ Hz, H-3), 5.28 (pt, 1H, $J = 9.1$ Hz, H-4), 4.91 (pt, 1H, $J = 9.0$ Hz, H-2), 4.41-4.26 (m, 3H, H-6a, H-6b, H-5), 2.16, 2.09, 2.08, 2.02 (4 s, 12H, 4 CH_3). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ (ppm): 175.55 (C=S), 170.62, 170.52, 170.26, 169.16 (C=O), 143.32 (C=N), 137.95, 129.01, 126.26, 123.98 (Ar), 77.37, 71.70, 67.21 (C-3, C-4, C-5), 61.42 (C-6), 50.18 (C-2), 23.19, 20.80, 20.75, 20.64 (4 CH_3). ESI-MS pozitív mód (m/z): $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_8\text{S}$ -re (494.15) számított: $[\text{M} + \text{H}]^+ = 495.15$, talált: $[\text{M} + \text{H}]^+ = 495.33$.

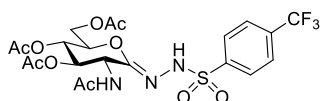
2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-dezoxi-D-glükono-1,5-lakton *p*-toluolszulfonil-hidrazon (38i)



A 4.1.3 általános eljárás alapján **36i** vegyületből (100 mg, 0.194 mmol) 340 mg (3.88 mmol) aktivált MnO_2 -dal.

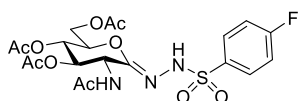
69 mg (69 %) fehér porszerű anyag. Op: 137-141 $^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D = 15$ ($c = 0.48$, CHCl_3). ^1H NMR (CDCl_3) δ (ppm): 8.07 (s, 1H, NH), 7.75 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz, Ar), 7.31 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz, Ar), 6.15 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz, NH), 5.29 (pt, 1H, $J = 9.2$ Hz, H-3), 5.19 (pt, 1H, $J = 9.2$ Hz, H-4), 4.76 (dd, 1H, $J = 8.7, 9.2$ Hz, H-2), 4.30-4.21 (m, 3H, H-6a, H-6b, H-5), 2.43 (s, 3H, CH_3), 2.08, 2.04, 2.04, 2.00 (4 s, 12H, 4 CH_3). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ (ppm): 170.51, 170.47, 170.42, 169.19 (C=O), 146.12 (C=N), 144.55, 134.97, 129.74, 127.99 (Ar), 77.05, 71.81, 67.19 (C-3, C-4, C-5), 61.29 (C-6), 50.20 (C-2), 23.09, 21.74, 20.73, 20.60 (5 CH_3). ESI-MS pozitív mód (m/z): $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{S}$ -re (513.14) számított: $[\text{M} + \text{H}]^+ = 514.15$, talált: $[\text{M} + \text{H}]^+ = 514.25$.

2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetil-2-dezoxi-D-glükono-1,5-lakton *p*-trifluormetil-benzolszulfonil-hidrazon (38j)



A 4.1.3 általános eljárás alapján **36j** vegyületből (100 mg, 0.176 mmol) 306 mg (3.52 mmol) aktivált MnO₂-dal. 60 mg (60 %) fehér porszerű anyag. Op: 182 - 185 °C (bomlik); $[\alpha]_D = 16$ (c = 0.25, CH₂Cl₂). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm): 8.21 (s, 1H, NH), 8.01 (d, 2H, J = 8.2 Hz, Ar), 7.79 (d, 2H, J = 8.4 Hz, Ar), 6.12 (d, 1H, J = 8.6 Hz, NH), 5.29 (pt, 1H, J = 9.5 Hz, H-3), 5.22 (pt, 1H, J = 9.6 Hz, H-4), 4.73 (dd, 1H, J = 8.7, 9.7 Hz, H-2), 4.38-4.25 (m, 3H, H-6a, H-6b, H-5), 2.07, 2.05, 2.05, 1.99 (4 s, 12H, 4 CH₃). ¹³C NMR (CDCl₃) δ (ppm): 170.60, 170.56, 170.43, 169.20 (C=O), 146.95 (C=N), 141.63, 135.06 (q, ²J_{CF} = 33.3 Hz), 128.50, 126.24 (q, ⁴J_{CF} = 3.4 Hz, Ar), 123.26 (q, ¹J_{CF} = 271.7 Hz, CF₃), 77.13, 71.50, 67.25 (C-3, C-4, C-5), 61.31 (C-6), 50.31 (C-2), 22.99, 20.67, 20.55 (4 CH₃). ESI-MS pozitív mód (m/z): C₂₁H₂₄F₃N₃O₁₀S-re (567.11) számított: [M + H]⁺ = 568.12, talált: [M + H]⁺ = 568.14.

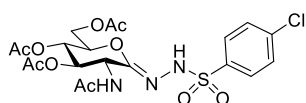
2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetil-2-dezoxi-D-glükono-1,5-lakton *p*-fluorbenzolszulfonil-hidrazon (38k)



A 4.1.3 általános eljárás alapján **36k** vegyületből (100 mg, 0.193 mmol) 336 mg (3.86 mmol) aktiált MnO₂-dal. 72 mg (72 %) színtelen amorf anyag. $[\alpha]_D = 14$ (c = 0.24, CH₂Cl₂). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm): 8.16 (s, 1H, NH), 7.89 (dd, 2H, J = 5.0, 8.9 Hz, Ar), 7.19 (t, 2H, J = 8.6 Hz, Ar), 6.20 (d, 1H, J = 8.6 Hz, NH), 5.30 (pt, 1H, J = 9.1 Hz, H-3), 5.21 (pt, 1H, J = 9.6 Hz, H-4), 4.75 (dd, 1H, J = 8.7, 10.0 Hz, H-2), 4.38-4.22 (m, 3H, H-6a, H-6b, H-5), 2.08, 2.05, 2.04, 2.00 (4 s, 12H, 4 CH₃). ¹³C NMR (CDCl₃) δ (ppm): 170.55, 170.48, 170.45, 169.19 (C=O), 146.48 (C=N), 165.68 (d, ¹J_{CF} = 256.1 Hz), 134.01 (d, ⁴J_{CF} = 3.1 Hz), 130.80 (d, ³J_{CF} = 9.4 Hz), 116.41 (d, ²J_{CF} = 22.7 Hz, Ar), 77.12, 71.61, 67.23 (C-3, C-4, C-5), 61.30 (C-6), 50.26 (C-2),

23.07, 20.73, 20.69, 20.59 (4 CH₃). ESI-MS pozitív mód (m/z): C₂₀H₂₄FN₃O₁₀S-re (517.12) számított: [M + H]⁺ = 518.12, talált: [M + H]⁺ = 518.17.

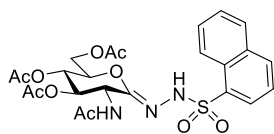
2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetil-2-dezoxi-D-glükono-1,5-lakton p-klórbenzol-szulfonil-hidrazon (38l)



A 4.1.3 általános eljárás alapján **36l** vegyületből (100 mg, 0.187 mmol) 325 mg (3.74 mmol) aktivált MnO₂-dal.

77 mg (77 %) színtelen amorf anyag. $[\alpha]_D = 24$ (c = 0.25, CH₂Cl₂). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm): 8.19 (s, 1H, NH), 7.80 (d, 2H, J = 8.6 Hz, Ar), 7.49 (d, 2H, J = 8.6 Hz, Ar), 6.21 (d, 1H, J = 8.7 Hz, NH), 5.30 (pt, 1H, J = 9.1 Hz, H-4), 5.22 (pt, 1H, J = 9.6 Hz, H-3), 4.74 (dd, 1H, J = 8.7, 9.6 Hz, H-2), 4.36-4.20 (m, 3H, H-6a, H-6b, H-5), 2.08, 2.05, 2.04, 2.00 (4 s, 12H, 4 CH₃). ¹³C NMR (CDCl₃) δ (ppm): 170.49, 170.43, 170.37, 169.14 (C=O), 146.58 (C=N), 140.10, 136.39, 129.36, (Ar), 77.02, 71.49, 67.14 (C-3, C-4, C-5), 61.23 (C-6), 50.21 (C-2), 23.01, 20.66, 20.64, 20.53 (4 CH₃). ESI-MS pozitív mód (m/z): C₂₀H₂₄ClN₃O₁₀S-re (533.09) számított: [M + H]⁺ = 534.09, talált: [M + H]⁺ = 534.08.

2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetil-2-dezoxi-D-glükono-1,5-lakton 1-naftilszulfonil-hidrazon (38m)

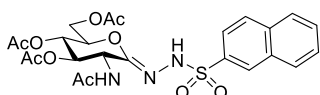


A 4.1.3 általános eljárás alapján **36m** vegyületből (100 mg, 0.181 mmol) 315 mg (3.62 mmol) aktivált MnO₂-dal. 66 mg (66 %) színtelen amorf anyag. $[\alpha]_D = -19$ (c = 0.22, CH₂Cl₂).

¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm): 8.76 (d, 1H, J = 8.6 Hz, Ar), 8.49 (s, 1H, NH), 8.29 (dd, 1H, J = 1.1, 7.4 Hz, Ar), 8.11 (d, 1H, J = 8.3 Hz, Ar), 7.95 (d, 1H, J = 7.5 Hz, Ar), 7.71 - 7.51 (m, 3H, Ar), 6.09 (d, 1H, J = 8.6 Hz, NH), 5.23 (pt, 1H, J = 9.1 Hz, H-4), 5.10 (pt, 1H, J = 9.9 Hz, H-3), 4.68 (dd, 1H, J = 8.7, 10.0 Hz, H-2), 4.33-4.20 (m, 2H, H-6a, H-6b), 4.16 (ddd, 1H, J = 2.8, 5.8, 9.2 Hz, H-5), 2.03, 2.00, 1.98, 1.86 (4 s, 12H, 4 CH₃). ¹³C NMR (CDCl₃) δ (ppm): 170.47, 170.32, 170.29, 169.14 (C=O), 146.16 (C=N), 135.24, 134.29, 133.34, 130.82, 129.21,

128.58, 128.45, 127.06, 124.75, 124.21 (Ar), 76.99, 71.94, 67.16 (C-3, C-4, C-5), 61.25 (C-6), 49.97 (C-2), 22.96, 20.67, 20.64, 20.54 (4 CH₃). ESI-MS pozitív mód (m/z): C₂₄H₂₇N₃O₁₀S-re (549.14) számított: [M + H]⁺ = 550.15, talált: [M + H]⁺ = 550.20.

2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetil-2-dezoxi-D-glükono-1,5-lakton 2-naftilszulfonil-hidrazon (38n)

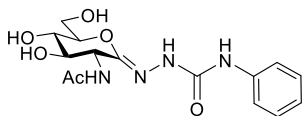


A 4.1.3 általános eljárás alapján **36n** vegyületből (100 mg, 0.181 mmol) 315 mg (3.62 mmol) aktivált MnO₂-dal. 56 mg (56 %) színtelen amorf anyag. [α]_D = 26 (c = 0.25, CH₂Cl₂). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm): 8.47 (s, 1H, Ar), 8.06 (s, 1H, NH), 8.00 - 7.88 (m, 3H, Ar), 7.84 (dd, 1H, J = 1.8, 8.7 Hz, Ar), 7.70 – 7.57 (m, 2H, Ar), 6.01 (d, 1H, J = 8.7 Hz, NH), 5.26 (pt, 1H, J = 9.0 Hz, H-4), 5.17 (pt, 1H, J = 9.6 Hz, H-3), 4.72 (dd, 1H, J = 8.8, 9.7 Hz, H-2), 4.33-4.16 (m, 3H, H-6a, H-6b, H-5), 2.04, 2.03, 2.01, 1.94 (4 s, 12H, 4 CH₃). ¹³C NMR (CDCl₃) δ (ppm): 170.50, 170.43, 169.18 (C=O), 146.26 (C=N), 135.35, 134.92, 132.22, 129.65, 129.47, 129.39, 129.31, 128.14, 127.79, 122.88 (Ar), 77.21, 71.78, 67.22 (C-3, C-4, C-5), 61.33 (C-6), 50.28 (C-2), 23.06, 20.70, 20.60 (4 CH₃). ESI-MS pozitív mód (m/z): C₂₄H₂₇N₃O₁₀S-re (549.14) számított: [M + H]⁺ = 550.15, talált: [M + H]⁺ = 550.17.

4.1.4 Általános eljárás az O-acetil védőcsoportok eltávolítására ammóniával

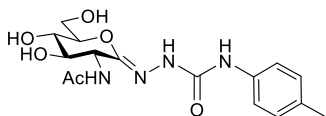
100 mg anyagot feloldottunk 1 ml MeOH-ban, majd 1 ml NH₃-val telített MeOH-t adtunk hozzá és szobahőmérsékleten kevertettük. A reakció lejárásdát vékonyrétegekromatográfiával követtük (eluens: CHCl₃ : MeOH 7:3). A reakcióelegyet bepároltuk és a maradékot oszlopkromatográfiával tisztítottuk vagy MeOH-ból átkristályosítottuk.

2-acetamido-2-dezoxi-D-glükono-1,5-lakton 4-fenil-szemikarbazon (39a)



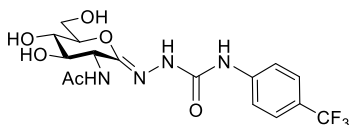
A 4.1.4 általános eljárás szerint **38a** vegyületből (100 mg, 0.209 mmol). A nyersterméket MeOH-ból átkristályosítva 58 mg (79 %) fehér porszerű anyagot kaptunk. Op: 217-218 °C, Op_{ir}⁹⁹: 210 °C. A spektrális adatok az irodalmi értékekkel megegyeznek⁹⁹.

2-acetamido-2-dezoxi-D-glükono-1,5-lakton 4-(p-metilfenil)-szemikarbazon (39b)



A 4.1.4 általános eljárás szerint **38b** vegyületből (100 mg, 0.203 mmol). A nyersterméket MeOH-ból átkristályosítva 64 mg (86 %) fehér porszerű anyagot kaptunk. Op: 207 °C (bomlik); $[\alpha]_D = +60$ (c = 0,52, DMSO). ¹H NMR (DMSO-d₆) δ (ppm): 9.59 (s, 1H, NH), 8.36 (s, 1H, NH), 8.15 (d, 1H, J = 8.2 Hz, NH), 7.37 (d, 2H, J = 8.2 Hz, Ar), 7.09 (d, 2H, J = 8.2 Hz, Ar), 5.43 (d, 1H, J = 5.1 Hz, OH), 5.39 (d, 1H, J = 5.1 Hz, OH), 5.10 (dd, 1H, J = 8.7, 2.9 Hz, OH), 4.35 (pt, 1H, J = 8.6 Hz, H-2), 3.79 (ddd, 1H, J = 1.3, 8.7, 10.4 Hz, H-6a), 3.71 (ddd, 1H, J = 2.0, 7.6, 9.8 Hz, H-5), 3.60 (ddd, 1H, J = 4.3, 6.2, 11.2 Hz, H-6b), 3.48 (td, 1H, J = 5.1, 8.7, Hz, H-3), 3.40-3.36 (m, 1H, H-4), 2.24 (s, 3H, CH₃), 1.94 (s, 3H, CH₃). ¹³C NMR (DMSO-d₆) δ (ppm): 169.63 (C=O), 152.75 (C=O), 144.67 (C=N), 136.45, 131.03, 129.15, 118.56 (Ar), 82.01, 73.48, 69.42 (C-3, C-4, C-5), 61.58 (C-6), 51.95 (C-2), 22.80 (CH₃), 20.33 (CH₃). ESI-HRMS pozitív mód (m/z): C₁₆H₂₂N₄O₆-ra (366.1539) számított: $[M + Na]^+ = 389.1432$, talált: $[M + Na]^+ = 389.1429$.

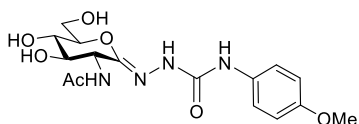
2-acetamido-2-dezoxi-D-glükono-1,5-lakton 4-(p-trifluormetilfenil)-szemikarbazon (39c)



A 4.1.4 általános eljárás szerint **38c** vegyületből (100 mg, 0.183 mmol). A nyersterméket MeOH-ból

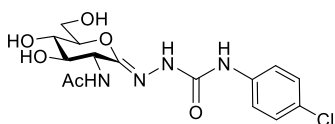
átkristályosítva 67 mg (87 %) fehér porszerű anyagot kaptunk. Op: 261 – 263 °C; $[\alpha]_D = + 49.65$ ($c = 0.212$, DMSO). ^1H NMR (DMSO- d_6) δ (ppm): 9.83 (s, 1H, NH), 8.89 (s, 1H, NH), 8.19 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, NH), 7.74 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz, Ar), 7.64 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, Ar), 5.47 (d, 1H, $J = 5.7$ Hz, OH), 5.43 (d, 1H, $J = 4.9$ Hz, OH), 5.11 (dd, 1H, $J = 8.7, 4.0$ Hz, OH), 4.37 (pt, 1H, $J = 8.4$ Hz, H-2), 3.87 – 3.71 (m, 2H, H-6a, H-5), 3.61 (ddd, 1H, $J = 4.2, 6.4, 11.1$ Hz, H-6b), 3.50 (td, 1H, $J = 5.4, 8.3$ Hz, H-3), 3.42-3.38 (m, 1H, H-4), 1.94 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ (ppm): 169.69 (C=O), 152.52 (C=O), 145.52 (C=N), 142.87, 126.01 (q, $^3J_{\text{CF}} = 7.2$ Hz, $^4J_{\text{CF}} = 3.9$ Hz), 124.4 (q, $^1J_{\text{CF}} = 272$ Hz), 122.1 (q, $^2J_{\text{CF}} = 32$ Hz), 118.28 (Ar), 82.02, 73.52, 69.40 (C-3, C-4, C-5), 61.52 (C-6), 52.01 (C-2), 22.84 (CH_3). ESI-HRMS pozitív mód (m/z): $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_6$ -ra (420.1257) számított: $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 443.1149$, talált: $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 443.1147$.

2-acetamido-2-dezoxi-D-glükono-1,5-lakton 4-(*p*-metoxifenil)-szemikarbazon (39d)



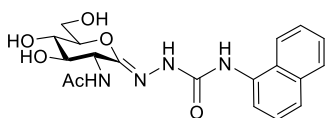
A 4.1.4 általános eljárás szerint **38d** vegyületből (100 mg, 0.197 mmol). A nyersterméket MeOH-ból átkristályosítva 62 mg (83 %) fehér porszerű anyagot kaptunk. Op: 231-233 °C; $[\alpha]_D = + 60$ ($c = 0,46$, DMSO). ^1H NMR (DMSO- d_6) δ (ppm): 9.55 (s, 1H, NH), 8.31 (s, 1H, NH), 8.14 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, NH), 7.38 (d, 2H, $J = 9.0$ Hz, Ar), 6.87 (d, 2H, $J = 9.0$ Hz, Ar), 5.45 (d, 1H, $J = 5.7$ Hz, OH), 5.39 (d, 1H, $J = 5.0$ Hz, OH), 5.12 (dd, 1H, $J = 4.1, 9.2$ Hz, OH), 4.35 (pt, 1H, $J = 8.6$ Hz, H-2), 3.79 (ddd, 1H, $J = 1.4, 9.9, 11.2$ Hz, H-6a), 3.73-3.69 (m, 4H, H-5, OCH_3), 3.59 (ddd, 1H, $J = 4.0, 6.2, 12.2$ Hz, H-6b), 3.48 (td, 1H, $J = 5.1, 8.4$ Hz, H-3), 3.40-3.38 (m, 1H, H-4), 1.94 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ (ppm): 169.62 (C=O), 152.92 (C=O), 144.56 (C=N), 132.06, 120.35, 113.96 (Ar), 81.97, 73.56, 69.47 (C-3, C-4, C-5), 61.61 (C-6), 55.18 (OCH_3), 51.97 (C-2), 22.82 (CH_3). ESI-HRMS pozitív mód (m/z): $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_7$ -re (382.1488) számított: $[\text{M} + \text{K}]^+ = 421.1120$, talált: $[\text{M} + \text{K}]^+ = 421.1113$.

2-acetamido-2-dezoxi-D-glükono-1,5-lakton 4-(p-klórfenil)-szemikarbazon (39e)



A 4.1.4 általános eljárás szerint **38e** vegyületből (100 mg, 0.195 mmol). A nyersterméket MeOH-ból átkristályosítva 56 mg (74 %) fehér porszerű anyagot kaptunk. Op: 222 °C (bomlik); $[\alpha]_D = +64$ ($c = 0,55$, DMSO). ^1H NMR (DMSO- d_6) δ (ppm): 9.70 (s, 1H, NH), 8.62 (s, 1H, NH), 8.15 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, NH), 7.55 (d, 2H, $J = 8.9$ Hz, Ar), 7.33 (d, 2H, $J = 8.9$ Hz, Ar), 5.45 (d, 1H, $J = 5.7$ Hz, OH), 5.40 (d, 1H, $J = 5.0$ Hz, OH), 5.10 (dd, 1H, $J = 4.1, 9.1$ Hz, OH), 4.36 (pt, 1H, $J = 8.5$ Hz, H-2), 3.83-3.70 (m, 2H, H-6a, H-5), 3.60 (ddd, 1H, $J = 4.4, 6.5, 12.0$ Hz, H-6b), 3.49 (td, 1H, $J = 5.1, 8.2$ Hz, H-3), 3.42-3.36 (m, 1H, H-4), 1.94 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ (ppm): 169.63 (C=O), 152.65 (C=O), 145.12 (C=N), 138.11, 128.57, 125.71, 120.10 (Ar), 81.97, 73.54, 69.42 (C-3, C-4, C-5), 61.54 (C-6), 51.97 (C-2), 22.81 (CH_3). ESI-HRMS pozitív mód (m/z): $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{ClN}_4\text{O}_6$ -ra (386.0993) számított: $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 409.0885$, talált: $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 409.0886$.

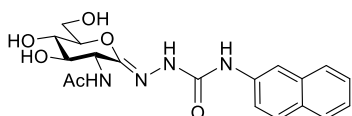
2-acetamido-2-dezoxi-D-glükono-1,5-lakton 4-(1-naftil)-szemikarbazon (39f)



A 4.1.4 általános eljárás szerint **38f** vegyületből (100 mg, 0.189 mmol). A nyersterméket MeOH-ból átkristályosítva 63 mg (83 %) halvány rózsaszín porszerű anyagot kaptunk. Op: 234 - 236 °C; $[\alpha]_D = +60.70$ ($c = 0.228$, DMSO). ^1H NMR (DMSO- d_6) δ (ppm): 9.98 (s, 1H, NH), 8.96 (s, 1H, NH), 8.34 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, NH), 8.09 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz, Ar), 7.98 – 7.90 (m, 2H, Ar), 7.65 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, Ar), 7.59 – 7.54 (m, 2H, Ar), 7.48 (t, 1H, $J = 7.9$ Hz, Ar), 5.53 (d, 1H, $J = 5.8$ Hz, OH), 5.47 (d, 1H, $J = 5.1$ Hz, OH), 5.20 (dd, 1H, $J = 3.7, 9.6$ Hz, OH), 4.43 (pt, 1H, $J = 9.1$ Hz, H-2), 3.83 (t, 1H, $J = 10.6$ Hz, H-6a), 3.76 – 3.69 (m, 1H, H-5), 3.63 (ddd, 1H, $J = 3.8, 6.3, 10.9$ Hz, H-6b), 3.52 (td, 1H, $J = 5.2, 9.2$ Hz, H-3), 3.44-3.40 (m, 1H, H-4), 1.99 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ (ppm):

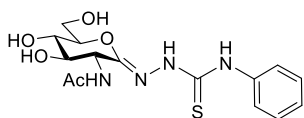
171.48 (C=O), 153.89 (C=O), 145.77 (C=N), 134.37, 133.61, 129.40, 126.98, 126.68, 126.32, 124.27, 120.87, 118.15, 117.99 (Ar), 82.66, 73.33, 69.53 (C-3, C-4, C-5), 61.86 (C-6), 52.43 (C-2), 23.31 (CH₃). ESI-HRMS pozitív mód (m/z): C₁₉H₂₂N₄O₆-ra (402.1539) számított: [M + Na]⁺ = 425.1432, talált: [M + Na]⁺ = 425.1433.

2-acetamido-2-dezoxi-D-glükono-1,5-lakton 4-(2-naftil)-szemikarbazon (39g)



A 4.1.4 általános eljárás szerint **38g** vegyületből (100 mg, 0.189 mmol). A nyersterméket MeOH-ból átkristályosítva 56 mg (74 %) halványsárga porszerű anyagot kaptunk. Op: 256 °C (bomlik); [α]_D = + 27.41 (c = 0.210, DMSO). ¹H NMR (DMSO-d₆) δ (ppm): 9.76 (s, 1H, NH), 8.69 (s, 1H, NH), 8.21 (d, 1H, J = 8.1 Hz, NH), 8.15 (s, 1H, Ar), 7.89 – 7.75 (m, 3H, Ar), 7.54 (d, 1H, J = 1.3, 8.5 Hz, Ar), 7.45 (t, 1H, J = 7.2 Hz, Ar), 7.37 (t, 1H, J = 7.4 Hz, Ar), 5.48 (d, 1H, J = 5.5 Hz, OH), 5.44 (d, 1H, J = 4.9 Hz, OH), 5.14 (dd, 1H, J = 3.6, 8.7 Hz, OH), 4.39 (pt, 1H, J = 8.6 Hz, H-2), 3.86 – 3.71 (m, 2H, H-6a, H-6b), 3.68 – 3.56 (m, 1H, H-5), 3.56 (m, 1H, H-3), 3.45-3.37 (m, 1H, H-4), 1.98 (s, 3H, CH₃). ¹³C NMR (DMSO-d₆) δ (ppm): 169.72 (C=O), 152.83 (C=O), 145.05 (C=N), 136.70, 133.62, 129.29, 128.44, 127.47, 127.03, 126.41, 124.14, 119.93, 113.79 (Ar), 82.06, 73.52, 69.44 (C-3, C-4, C-5), 61.59 (C-6), 52.01 (C-2), 22.88 (CH₃). ESI-HRMS pozitív mód (m/z): C₁₉H₂₂N₄O₆-ra (402.1539) számított: [M + Na]⁺ = 425.1432, talált: [M + Na]⁺ = 425.1434.

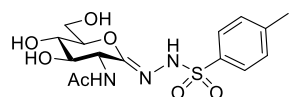
2-acetamido-2-dezoxi-D-glükono-1,5-lakton 4-fenil-tioszemikarbazon (39h)



A 4.1.4 általános eljárás szerint **38h** vegyületből (100 mg, 0.202 mmol). Oszlopkromatográfia (eluens: CHCl₃ : MeOH 5:1) után 67 mg (90 %) halvány rózsaszín porszerű anyagot kaptunk. Op: 137-143 °C; [α]_D = + 70 (c = 0,48, CH₃OH). ¹H NMR (DMSO-d₆) δ (ppm): 10.22 (s, 1H, NH), 8.33 (d, 1H, J = 8.0 Hz, NH),

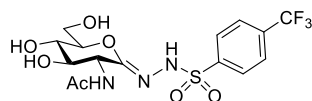
7.58 (d, 2H, $J = 7.7$ Hz, H_o), 7.33 (t, 2H, $J = 7.9$ Hz, H_m), 6.98 (t, 1H, $J = 8.2$ Hz, H_p), 5.23 (s, 1H, NH), 5.71 (d, 1H, $J = 7.4$ Hz, OH), 4.49 (dd, 1H, $J = 6.6, 11.0$ Hz, OH), 5.10 (dd, 1H, $J = 8.7, 2.9$ Hz, OH), 4.34 (td, 1H, $J = 2.0, 7.3$ Hz, H-3), 4.13 (pt, 1H, $J = 7.3$ Hz, H-2), 3.56 (ddd, 1H, $J = 3.4, 5.5, 10.7$ Hz, H-6a), 3.45 (ddd, 1H, $J = 3.3, 5.8, 8.9$ Hz, H-5), 3.37 (dd, 1H, $J = 5.6, 11.0$ Hz, H-6b), 3.27 (td, 1H, $J = 2.1, 7.9$ Hz, H-4), 1.87 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ (ppm): 169.28 (C=S), 164.42 (C=O), 160.48 (C=N), 140.78, 129.03, 121.65, 117.24 (Ar), 71.31, 70.63, 70.47 (C-3, C-4, C-5), 63.29 (C-6), 51.79 (C-2), 22.61 (CH_3). ESI-HRMS pozitív mód (m/z): $C_{15}H_{20}N_4O_5S$ -re (368.1154) számított: $[M + Na]^+ = 391.1047$, talált: $[M + Na]^+ = 391.1044$.

2-acetamido-2-dezoxi-D-glükono-1,5-lakton *p*-toluolszulfonil-hidrazon (39i)



A 4.1.4 általános eljárás szerint **38i** vegyületből (100 mg, 0.195 mmol). Oszlopkromatográfia (eluens: $CHCl_3$: MeOH 20:1) után 71 mg (94 %) fehér porszerű anyagot kaptunk. Op: 165 - 166 °C; $[\alpha]_D = 55$ ($c = 0.55$, MeOH); 1H NMR (MeOD- d_4) δ (ppm): 7.73 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz, Ar), 7.34 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ar), 4.31 (d, 1H, $J = 10.1$ Hz, H-2), 3.98 (dd, 1H, $J = 5.8, 10.4$ Hz, H-5), 3.76 – 3.64 (m, 2H, H-6a, H-6b), 3.56 (dd, 1H, $J = 9.0, 10.0$, Hz, H-3), 3.45 (t, 1H, $J = 9.2$ Hz, H-4), 2.41 (s, 3H, CH_3), 2.02 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (MeOD- d_4) δ (ppm): 174.08 (C=O), 149.44 (C=N), 145.53, 136.57, 130.58, 128.70 (Ar), 82.84, 74.18, 70.24 (C-3, C-4, C-5), 62.50 (C-6), 53.46 (C-2), 22.83 (CH_3), 21.56 (CH_3). ESI-HRMS pozitív mód (m/z): $C_{15}H_{21}N_3O_7S$ -re (387.1100) számított: $[M + Na]^+ = 410.0992$, talált: $[M + Na]^+ = 410.0989$.

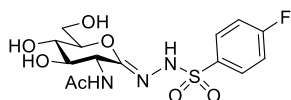
2-acetamido-2-dezoxi-D-glükono-1,5-lakton *p*-trifluormetilbenzolszulfonil-hidrazon (39j)



A 4.1.4 általános eljárás szerint **38j** vegyületből (100 mg, 0.176 mmol). Oszlopkromatográfia (eluens: $CHCl_3$: MeOH 20:1) után 65 mg (83 %) fehér porszerű anyagot kaptunk. Op: 175 - 176 °C

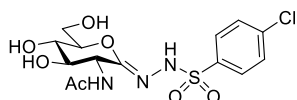
(bomlik); $[\alpha]_D = 59$ ($c = 0.35$, MeOH); ^1H NMR (MeOD- d_4) δ (ppm): 8.04 (d, 2H, $J = 8.2$ Hz, Ar), 7.87 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz, Ar), 4.31 (d, 1H, $J = 10.1$ Hz, H-2), 3.99 (dd, 1H, $J = 1.3, 11.7$ Hz, H-5), 3.81 – 3.65 (m, 2H, H-6a, H-6b), 3.59 (dd, 1H, $J = 9.1, 10.0$, Hz, H-3), 3.46 (t, 1H, $J = 9.2$ Hz, H-4), 2.02 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (MeOD- d_4) δ (ppm): 173.66 (C=O), 149.60 (C=N), 144.60, 135.12 (q, $^2J_{\text{CF}} = 32.6$ Hz), 129.52, 127.06 (q, $^4J_{\text{CF}} = 3.6$ Hz, Ar) 121.92 (q, $^1J_{\text{CF}} = 271.9$ Hz, CF_3), 83.16, 74.30, 70.54 (C-3, C-4, C-5), 62.88 (C-6), 53.65 (C-2), 22.76 (CH_3). ESI-HRMS pozitív mód (m/z): $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_7\text{S}$ -re (441.0818) számított: $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 464.0710$, talált: $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 464.0708$.

2-acetamido-2-dezoxi-D-glükono-1,5-lakton *p*-fluorbenzolszulfonil-hidrazon (39k)



A 4.1.4 általános eljárás szerint **38k** vegyületből (100 mg, 0.193 mmol). Oszlopkromatográfia (eluens: CHCl_3 : MeOH 20:1) után 64 mg (85 %) fehér porszerű anyagot kaptunk. Op: 175 - 177 °C; $[\alpha]_D = 78$ ($c = 0.44$, MeOH); ^1H NMR (MeOD- d_4) δ (ppm): 7.90 (dd, 2H, $J = 5.2, 8.6$ Hz, Ar), 7.28 (t, 2H, $J = 8.7$ Hz, Ar), 4.32 (d, 1H, $J = 10.1$ Hz, H-2), 4.00 (dd, 1H, $J = 7.2, 10.9$ Hz, H-5), 3.79 – 3.65 (m, 2H, H-6a, H-6b), 3.60 (dd, 1H, $J = 8.3, 10.6$, Hz, H-3), 3.47 (t, 1H, $J = 9.0$ Hz, H-4), 2.03 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (MeOD- d_4) δ (ppm): 173.64 (C=O), 149.34 (C=N), 166.57 (d, $^1J_{\text{CF}} = 252.6$ Hz), 136.46 (d, $^4J_{\text{CF}} = 3.1$ Hz), 131.69 (d, $^3J_{\text{CF}} = 9.5$ Hz), 116.96 (d, $^2J_{\text{CF}} = 23.0$ Hz, Ar), 83.09, 74.34, 70.55 (C-3, C-4, C-5), 62.85 (C-6), 53.58 (C-2), 22.78 (CH_3). ESI-HRMS pozitív mód (m/z): $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{FN}_3\text{O}_7\text{S}$ -re (391.0849) számított: $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 414.0742$, talált: $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 414.0738$.

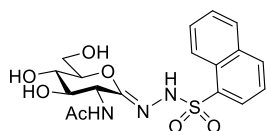
2-acetamido-2-dezoxi-D-glükono-1,5-lakton *p*-klórbenzolszulfonil-hidrazon (39l)



A 4.1.4 általános eljárás szerint **38l** vegyületből (100 mg, 0.188 mmol).

Oszlopkromatográfia (eluens: CHCl₃ : MeOH 20:1) után 60 mg (78 %) fehér porszerű anyagot kaptunk. Op: 180 - 182 °C (bomlik); [α]_D = 78 (c = 0.22, MeOH); ¹H NMR (MeOD-d₄) δ (ppm): 7.82 (d, 2H, J = 8.8 Hz, Ar), 7.56 (d, 2H, J = 8.8 Hz, Ar), 4.30 (d, 1H, J = 10.1 Hz, H-2), 3.97 (dd, 1H, J = 8.3, 10.5 Hz, H-5), 3.78 – 3.65 (m, 2H, H-6a, H-6b), 3.58 (dd, 1H, J = 9.0, 10.1, Hz, H-3), 3.46 (t, 1H, J = 9.2 Hz, H-4), 2.02 (s, 3H, CH₃). ¹³C NMR (MeOD-d₄) δ (ppm): 173.66 (C=O), 149.42 (C=N), 140.17, 139.07, 130.46, 130.17 (Ar), 83.16, 74.36, 70.58, (C-3, C-4, C-5), 62.90 (C-6), 53.63 (C-2), 22.76 (CH₃). ESI-HRMS pozitív mód (m/z): C₁₄H₁₈ClN₃O₇S-re (407.0554) számított: [M + Na]⁺ = 430.0446, talált: [M + Na]⁺ = 430.0440.

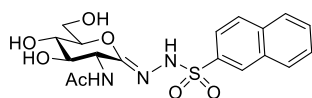
2-acetamido-2-dezoxi-D-glükono-1,5-lakton 1-naftilszulfonil-hidrazon (39m)



A 4.1.4 általános eljárás szerint **38m** vegyületből (100 mg, 0.182 mmol). Oszlopkromatográfia (eluens: CHCl₃ : MeOH 20:1) után 62 mg (80 %) fehér porszerű anyagot kaptunk.

Op: 145 - 147 °C; [α]_D = 58 (c = 0.26, MeOH); ¹H NMR (MeOD-d₄) δ (ppm): 8.81 (d, 1H, J = 8.5 Hz, Ar), 8.25 (d, 1H, J = 7.4 Hz, Ar), 8.16 (d, 1H, J = 8.2 Hz, Ar), 7.99 (d, 1H, J = 8.0 Hz, Ar), 7.72 – 7.55 (m, 3H, Ar), 4.25 (d, 1H, J = 9.8 Hz, H-2), 4.00 (dd, 1H, J = 5.2, 9.9 Hz, H-5), 3.75 – 3.66 (m, 2H, H-6a, H-6b), 3.47 (dd, 1H, J = 8.9, 9.9, Hz, H-3), 3.40 (t, 1H, J = 8.9 Hz, H-4), 1.90 (s, 3H, CH₃). ¹³C NMR (MeOD-d₄) δ (ppm): 173.48 (C=O), 148.44 (C=N), 135.76, 135.66, 135.59, 131.46, 129.91, 129.84, 128.96, 127.84, 126.23, 125.23 (Ar), 83.27, 74.70, 70.62 (C-3, C-4, C-5), 63.08 (C-6), 53.46 (C-2), 22.70 (CH₃). ESI-HRMS pozitív mód (m/z): C₁₈H₂₁N₃O₇S-re (423.1100) számított: [M + Na]⁺ = 446.0992, talált: [M + Na]⁺ = 446.0992.

2-acetamido-2-dezoxi-D-glükono-1,5-lakton 2-naftilszulfonil-hidrazon (39n)



A 4.1.4 általános eljárás szerint **38n** vegyületből (100 mg, 0.182 mmol).

Oszlopkromatográfia (eluens: CHCl₃ : MeOH 20:1) után 58 mg (75 %) fehér porszerű anyagot kaptunk. Op: 172 - 173 °C; [α]_D = 68 (c = 0.21, MeOH); ¹H NMR (MeOD-d₄) δ (ppm): 8.44 (d, 1H, J= 1.2 Hz, Ar), 8.06 – 7.92 (m, 3H, Ar), 7.85 (dd, 1H, J= 1.8, 8.7 Hz, Ar), 7.71 – 7.58 (m, 2H, Ar), 4.29 (d, 1H, J = 10.0 Hz, H-2), 3.98 (dd, 1H, J = 1.3, 11.6 Hz, H-5), 3.78 – 3.65 (m, 2H, H-6a, H-6b), 3.54 (dd, 1H, J = 9.0, 10.0, Hz, H-3), 3.43 (t, 1H, J= 9.2 Hz, H-4), 1.92 (s, 3H, CH₃). ¹³C NMR (MeOD-d₄) δ (ppm): 173.59 (C=O), 149.28 (C=N), 137.42, 136.38, 133.51, 130.34, 130.04, 129.95, 129.92, 128.96, 128.53, 124.08 (Ar), 83.12, 74.48, 70.55 (C-3, C-4, C-5), 62.91 (C-6), 53.62 (C-2), 22.73 (CH₃). ESI-HRMS pozitív mód (m/z): C₁₈H₂₁N₃O₇S-re (423.1100) számított: [M + Na]⁺ = 446.0992, talált: [M + Na]⁺ = 446.0991.

4.2 Biokémiai anyagok és módszerek

4.2.1 Mikroorganizmusok és tenyésztési körülmények

Öt különböző *Escherichia coli* törzset alkalmaztunk a hOGA hosszú (“long”) izoformájának termeltetésére: *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* BL21(DE3) pLysS (Novagen), *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL (Stratagene), *E. coli* BL21 STAR(DE3) (Invitrogen) és *E. coli* BL21(DE3) Rosetta. A hOGA-t kódoló gént a pET28b plazmid hordozza NdeI és XhoI restrikciós hasítóhelyek között inzertként, amelyet David J. Vocadlo (Burnaby, Kanada) bocsájtotta rendelkezésünkre.⁶⁸ A hOGA-t hordozó vektorkonstrukciót hősokk módszerrel¹²⁴ transzformáltuk az öt *E. coli* törzsbe, majd a különböző törzsekből származó transzformáns sejtek növekedési paramétereit változtatva vizsgáltuk a rekombináns hOGA fehérje expresszióját.

4.2.2 A humán OGA heterológ expressziója *E. coli*-ban

Kis léptékű fehérje expresszió

Kis léptékű expressziót végeztünk 250 ml Luria broth (LB) tápoldatban, amely 50 µg/ml kanamicin antibiotikumot tartalmazott, 1000 ml-es Erlenmeyer-lombikokban. A tenyészeteket 1 ml-es különböző *E. coli* törzsek minikultúráival oltottuk be, melyeket egy éjszakán át egyetlen telepről tenyésztettünk 37 °C-on. A kis léptékű sejtenyészeteket 37°C-on növesztettük 220 rpm rázatást alkalmazva és időben követtük a növekedést az OD₆₀₀ (optikai sűrűség) mérésével. Miután az OD elérte a középexponenciális tartományt (OD₆₀₀=0,6 vagy 0,9), a tenyészetet 0,4 mM IPTG (izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranozid) hozzáadásával indukáltuk, a hőmérsékletet pedig csökkentettük. Három különböző termeltetési hőmérsékletet vizsgáltunk 16 - 37°C között: 16°C, 23°C és 28°C. 16 óra elteltével a növesztett sejteket centrifugálással összegyűjtöttük (4°C-on 6000 rpm-en 20 percig), majd a pelleteket (~1,2-1,6 g) -20°C-on tároltuk.

A megfagyott pelleteket felszuszpendáltuk 15 ml lízis pufferben (50 mM kálium-foszfát puffer, pH 7,5, amely tartalmaz: 1 mM 2-hidroxi-1-metántiólt, 0,5 % Tween 20-t, proteáz inhibitor koktélt (P8849, Sigma Aldrich, Magyarország) és 0,1 mg/ml lizozimot) majd ezt a szuszpenziót jégen tartottuk 40 percig. A sejtek feltárását Ultrasonic Homogenizer UW 2070 (Bandelin Electronic) típusú szonikátorral végeztük, állandó jeges-vizes hűtés mellett. A kezelés 40 ciklusból állt: 10 mp szonikálást 50 mp szünet követett. A feltárt sejteket centrifugálással (10 000 rpm, 50 perc, 10°C) választottuk el a szolubilis fehérjét tartalmazó felülúszótól, amelyet 4°C-on tároltunk a kromatográfiás tisztításig. A felülúszó fehérje tartalmát Bradford-reagenssel határoztuk meg BSA kalibrációs görbét alkalmazva.¹²⁵ A felülúszót és a csapadékot gélelektroforézissel analizáltuk.

Nagy léptékű fehérje expresszió

Az *E. coli* Rosetta (DE3) törzsből minikultúrát (7x2 ml) készítettünk, amivel beoltottunk 500 ml kanamycin tartalmú (50 µg/ml) LB tápoldatot Erlenmeyer

lombikokban (7x500 ml). A tenyészeteket 37°C-on növesztettük, majd miután az OD elérte a középexponenciális tartományt ($OD_{600}=0,9$), a tenyészetet 0,4 mM IPTG hozzáadásával indukáltuk, a hőmérsékletet pedig 23°C-ra csökkentettük. 16 óra elteltével a növesztett sejteket centrifugálással összegyűjtöttük (4°C-on 6000 rpm-en 20 percig). A pelleteket (~27 g) -20°C-on tároltuk. A sejtek feltárását a kis léptékű fehérje expresszió során leírtak alapján végeztük (27 g pelletet 400 ml lízispufferben szuszpendáltunk).

4.2.3 A hOGA kromatográfiája

A hOGA fehérje hosszú izoformáját fúziós fehérjeként fejeztük ki, hisztidin-hexapeptidet tartalmazó N-terminális His-taggal. A tisztítást Co^{2+} -ionnal töltött HiPrep IMAC Fast Flow (átmérő: 16mm, hossz: 10mm; GE-Healthcare) oszloppal végeztük, melyet előkezeltünk a kötő („binding”) pufferrel: 20 mM kálium-foszfát puffer, pH=7,7, ami tartalmaz: 0,5 M KCl-t, 50 mM imidazolt és 0,5 % Tween 20-t. A fehérje elúcióját 13 x 20 mL imidazol-gradienssel végeztük (100-500 mM imidazol) 20 mM kálium-foszfát pufferben, pH=7,7, ami 0,5 M KCl-t tartalmazott. A frakciókban ellenőriztük az *N*-acetilglükózaminidáz aktivitást és a fehérjetartalmat. Azokat, amelyek a legnagyobb aktivitást mutatták összeöntöttük és ultraszűrőssel (Amicon Ultra - 100 kDa, Merck Millipore) lecseréltük a puffert 50 mM kálium-foszfát pufferre, pH=7,5 ami tartalmaz: 1mM PMSF-t, 1mM DTT-t, 1mM EDTA-t és 30% glicerint. Az enzim ilyen körülmények között -20°C-on legalább két évig eltartható volt.

4.2.4 *N*-acetil-glükózaminidáz aktivitási vizsgálat

A hOGA enzim *N*-acetil-glükózaminidáz aktivitását *p*NP-GlcNAc szubsztrát segítségével határoztuk meg. Az enzimreakció során a hOGA *p*-nitrofenolt hasít a szubsztrátról. Az enzimreakciót erős lúgos oldat hozzáadásával megállítva a felszabaduló *p*-nitrofenolát mennyiségét abszorbancia méréssel 400 nm-en határoztuk meg. Az aktivitási vizsgálatokat 200 µl 50 mM kálium-foszfát pufferben, pH = 7,5, 0,2 mM *p*NP-GlcNAc szubsztrát jelenlétében 37°C-on

végeztük. Az enzimreakciókat 50 μ l enzimet tartalmazó minta hozzáadásával indítottuk, majd 5 perc elteltével 500 μ l 0,5 mM borát-puffer, pH = 10 hozzáadásával állítottuk le, és a reakcióelegyet spektrofotometriásan 400 nm-en vizsgáltuk. Kvantitatív termék felszabaduláshoz a *p*-nitrofenolát kalibrációs görbét olyan oldatban határoztuk meg, amely egy térfogat vizsgálati puffert és két térfogat 0,5 M borát-puffer, pH = 10 oldatot tartalmazott.

4.2.5 Michaelis-Menten kinetikai állandók meghatározása hOGA és HexA/HexB (szarvasmarha veséből, Sigma Aldrich) enzimekre

A Michaelis-Menten kinetikai állandók meghatározása hOGA enzimre két szubsztrát jelenlétében történtek: *p*NP-GlcNAc és 4-MU-GlcNAc. Az enzimreakciókat 50 mM kálium-foszfát pufferben, pH = 7,5, 1 ml végtérfogatban 37°C-on végeztük, a szubsztrátkoncentrációt 5 μ M és 2 mM között változtatva mindkét szubsztrát esetében, 33 nM és 82 nM enzimkoncentrációt alkalmazva *p*NP-GlcNAc esetében, és 3 nM enzimkoncentrációt alkalmazva 4-MU-GlcNAc esetében. A reakciót *p*NP-GlcNAc szubsztrát jelenlétében 1 ml-es küvettákban hajtottuk végre, AnalytikJena Specord 250 plusz kétsugaras spektrofotométer termosztált cellatartójában. A szubsztrát hozzáadása után a reakciókat 400 nm-en folyamatosan követtük. A fluoreszcens 4-MU-GlcNAc szubsztrát jelenlétében végzett reakciókat fluoreszcens küvettában végeztük, Jasco FP-8200 fluoriméter termosztált cellatartójában 37 °C-on. A reakciókat 4-MU-GlcNAc hozzáadásával indítottuk el, és a felszabaduló fluoreszcens terméket, a 4-metilumbelliferont Xe lámpás fényforrással 360 nm-es gerjesztéssel követtük, és 450 nm-nél 10 percen keresztül 10 másodpercenként detektáltuk az emissziót.

A Michaelis-Menten kinetikai állandók meghatározása HexA/HexB enzimre *p*NP-GlcNAc szubsztrát jelenlétében történt 50 mM kálium-foszfát pufferben, pH = 5,8, 1 ml végtérfogatban 37°C-on. A szubsztrátkoncentráció 60 μ M és 5 mM között változtattuk 5,0 mU HexA/HexB enzim jelenlétében.

A kezdeti sebességeket a reakció előrehaladási görbék lineáris tartományán belül számítottuk ki, majd meghatároztuk a Michaelis-Menten kinetikai

paramétereket: a kezdeti sebességeket a szubsztrátkoncentráció függvényében ábrázoltuk, a mérési pontokra hiperbolát illesztettünk nemlineáris regressziós analízissel Origin-Pro-8 (OriginLab Corp. Northampton, MA, USA) programot használva. A kezdeti sebességekhez az egy másodperc alatt felszabaduló termék koncentrációját μM -ban fejeztük ki, amelyet a kalibrációs görbékből határoztunk meg. Minden mérési pont három párhuzamos mérés átlaga.

4.2.6 Enzimgátlási vizsgálatok

Valamennyi célvegyület gátló hatását vizsgáltuk hOGA, illetve HexA/HexB (szarvasmarha veséből, Sigma Aldrich), valamint hHexB enzimekre.

A hOGA enzim esetében három különböző szubsztrát-koncentrációt alkalmazva végeztük a reakciókat (20 μM , 40 μM és 75 μM pNP-GlcNAc esetében és 7,5 μM (7,0 μM), 12,5 μM (12 μM) és 25 μM 4-MU-GlcNAc esetében) 50 mM kálium-foszfát pufferben, pH = 7,5. Az alkalmazott enzimkoncentráció 33 nM pNP-GlcNAc szubsztrát esetében, 3 nM 4-MU-GlcNAc esetében. Az inhibitor-koncentrációkat annak függvényében választottuk meg, hogy az előkísérletek során milyen K_i érték volt feltételezhető (0 - 3 μM , 0 - 200 μM , 0 - 750 nM).

HexA/HexB (szarvasmarha veséből, Sigma Aldrich) esetében pNP-GlcNAc szubsztrát jelenlétében végeztük a reakciókat, három szubsztrát-koncentrációt alkalmazva: 0,5 mM, 1,0 mM és 1,5 mM, vagy 0,8 mM, 1,0 mM és 1,5 mM. Az inhibitor-koncentráció 0 - 1 μM , és 0 - 50 μM között változott.

Ezekben az esetekben az enzimet és az inhibitorokat 37°C-on előinkubáltuk. A reakciókat a szubsztrát hozzáadásával indítottuk el, és a kinetikai görbéket a fent leírtak szerint rögzítettük. A kezdeti sebességek reciprokát az inhibitor-koncentrációk függvényében ábrázoltuk. Minden mérési adat három párhuzamos mérés átlaga. A gátlási állandókat (K_i) a Dixon-diagramok¹²¹ adatainak lineáris regressziójával határoztuk meg. A gátlás módját a vizsgált vegyületekre a Cornish-Bowden módszerrel¹²² határoztuk meg.

A hHexB enzim esetében Michaelis-Menten kinetikai görbéket vettünk fel pNP-GlcNAc szubsztrát jelenlétében. A reakciókat Eppendorf csövekben végeztük

400 μ l végtérfogatban 50 mM citrát-foszfát pufferben, pH = 5,0. A reakcióelegyek 24 nM hHexB enzimet, 0,1-3 mM szubsztrátot és 0-300 nM inhibitort tartalmaztak. Az enzimreakciókat 35°C-on inkubáltuk, majd 60 másodpercenként 50 μ l mintát vettünk és 150 μ l 0,1M Na₂CO₃ oldathoz adtuk, mely leállította a reakciót. Az így kapott oldatok abszorbanciáját 420 nm-en mértük Tecan Sunrise plate reader (Männedorf, Svájc) segítségével. Az adatpontokból lineáris illesztéssel határoztuk meg a kezdeti sebességeket, majd nemlineáris regressziós elemzéseket végeztünk a kompetitív gátlási modell segítségével a K_i értékek kiszámításához. A számításokhoz GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, San Diego, California, USA) szoftvert használtunk. Minden mérési adat három párhuzamos mérés átlaga.

5. Összefoglalás

A fehérjék *O*-(*N*-acetyl-glükózaminilezés)-sel történő poszt-transzlációs módosulása teljesen egyedi az egyéb glikozilezésekhez képest, hiszen egyetlen monoszacharid egység, az *N*-acetyl-D-glükózamin (GlcNAc) kapcsolódik a fehérjék szerin és treonin oldalláncának -OH csoportjához β -glikozidos kötéssel. Ezzel szemben az extracelluláris és membránfehérjék *N*- és *O*- kapcsolt glikozilezése során összetett glikán szerkezetek jönnek létre. Az *O*-(*N*-acetyl-glükózaminilezés) közvetlen kapcsolatban áll a foszforilezéssel, melynek target aminosavai szintén a szerin és a treonin. Azonban míg a foszforilezést több száz protein kináz és több tucat foszfatáz katalizálja, addig az *O*-(*N*-acetyl-glükózaminilezés)-ért egyetlen enzimpár felelős: az *O*-GlcNAc transzferáz (OGT) a monoszacharid kapcsolását, míg az *O*-GlcNAc hidroláz (OGA) a hasítást végzi. Az *O*-(*N*-acetyl-glükózaminilezés) rendkívül sokféle fehérjét szabályoz, ezáltal kapcsolatba hozható olyan betegségekkel, mint pl. a cukorbetegség, egyes rákos megbetegedések és neurodegeneratív elváltozások.

A lizoszómális β -*N*-acetylhexóزامинидázok (HexA és HexB) láncvégi *N*-acetylglükózamint és *N*-acetylgalaktózamint hasítanak összetett glikánszerkezetekről. Ezeknek a GH20 családba tartozó enzimeknek a katalitikus mechanizmusa megegyezik a GH84 családba tartozó OGA enzim mechanizmusával, valamint aktív centrumuk szerkezete is hasonló, ezért az OGA inhibitorok gátolhatják a GH20 enzimeket is. Az aberráns HexA és HexB működés felelős a Tay-Sachs és Sandhoff-szindróma kialakulásáért, tehát szükség van szelektív inhibitorok alkalmazására a nem kívánt mellékhatások kiküszöbölésére.

A PUGNAc (2) az egyik leggyakrabban alkalmazott OGA inhibitor, melynek bár nanomólos gátlási állandója van, de nem mutat szelektivitást β -*N*-acetylhexóزامинидázokkal szemben. Doktori munkám során új PUGNAc analóg OGA inhibitorokat állítottunk elő, valamint heterológ expressziós módszert dolgoztunk ki a humán OGA termeltetésére *E. coli* expressziós rendszerben és vizsgáltuk a szintetizált vegyületek gátló tulajdonságát OGA és HexA/HexB enzimekkel szemben.

Az előállított 14 vegyület közül egy megtalálható volt az irodalomban, így ennek a publikált szintézismódszernek az adaptálásával szintetizáltuk a **39a-n** 2-acetamido-2-dezoxi-D-glükono-1,5-lakton hidrazon származékokat. Az ötlépéses szintézisszekvencia a **40** D-glükózamin-hidrokloridból indul ki, melyből két lépéssel irodalmi módszerek alapján állítottuk elő a **33** 2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-dezoxi- α,β -D-glükopiranózt. A **33** laktol származékot **35a-h** 4-aril-(tio)szemikarbazidokkal, valamint **35i-n** arilszulfonil-hidrazidokkal reagáltattuk *p*-toluolszulfonsav jelenlétében forrásban lévő kloroformban. A **36a-g** 1-(2-

acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-dezoxi- β -D-glükopiranozil)-4-aryl szemikarbazidok mellett a **37a-g** nyílt láncú tautomerek képződését is tapasztaltuk. A CrO₃-piridin komplex-szel végzett oxidációs reakció sikeresen végrehajtható volt a tautomerek keverékéből, így kaptuk a **38a-g** 2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-dezoxi-D-glükono-1,5-lakton 4-arilszemikarbazonokat. A **35h** 4-fenil-tioszemikarbazid és **35i-n** arilszulfonil-hidrazidokkal végzett reakciók során nem tapasztaltuk a nyílt láncú tautomer képződését. A CrO₃-piridin komplex-szel végzett oxidációs reakció azonban ezen vegyületek esetében nem hozott eredményt, így más módszereket próbáltunk ki. Végül aktivált MnO₂-dal diklórmetánban sikerült előállítani a **38h-n** 2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-dezoxi-D-glükono-1,5-lakton arilhidrazonokat. Végül az *O*-acetyl védőcsoportok eltávolítását ammóniás metanollal végeztük.

A szintetizált **39a-n** vegyületek biokémiai teszteléséhez kidolgoztuk a teljes hosszúságú humán OGA izoenzim, heterológ expresszióját *E. coli* expressziós rendszerben, valamint a rekombináns enzim izolálási és tisztítási lépéseit. Ehhez a D. J. Vocadlo által rendelkezésünkre bocsájtott hOGA-t kódoló pET28 vektorkonstrukciót öt különböző *E. coli* expressziós törzsbe transzformáltuk és az expressziós körülményeket úgy optimalizáltuk, hogy a transzformánsok túltermeltetése szolubilis, intakt és aktív rekombináns hOGA enzimet eredményezzen. A törzsekben a hOGA expresszióját különböző mértékű zárványképződés és jelentős proteolitikus aktivitás kísért. A legjobban teljesítő törzsnek a ritka kodonhasználatot is lehetővé tevő *E. coli* BL21(DE3) Rosetta törzs bizonyult, így a termeltetést erre a törzsre optimalizáltuk. A tenyésztési hőmérséklet és a hOGA expresszió indukciójának fázisa lényeges befolyással bírt funkcionális rekombináns fehérje képződéséhez. Az *E. coli* expressziós rendszerekben, emlős fehérje túltermeltetésénél oly sokszor alkalmazott 16°C-os tenyésztési hőmérséklet itt nem volt megfelelő, ellenben 23°C-on szolubilis, nagy aktivitású enzim termelődött. A rekombináns hOGA stabilitására ható faktorokat feltártuk, amelyek alkalmazása eredményes izolációs eljárásához, valamint reprodukálható kinetikai, illetve gátlás tanulmányokhoz vezetett. A rekombináns hOGA *N*-terminális His₆ szekvenciáját kihasználva IMAC affinitás kromatográfiával, Co²⁺ ionok alkalmazásával és a körülmények finomításával egylépésben homogén hOGA enzim preparátumot állítottunk elő.

A teljes hosszúságú rekombináns humán OGA enzimnek meghatároztuk a Michaelis-Menten kinetikai paramétereit *p*NP-GlcNAc és 4-MU-GlcNAc szubsztrátokra. A *K_M* értékek 50 mM kálium-foszfát pufferben 7,5-ös pH-n 37°C-on sorrendben 20 μ M-nak és 12 μ M-nak adódtak. Vizsgáltuk továbbá a kereskedelmi forgalomban kapható szarvasmarha veséből izolált HexA/HexB enzimeket (*K_M* (*p*NP-GlcNAc) = 1,1 mM; kálium-foszfát puffer, pH = 5,8),

valamint a prágai kutatók által rendelkezésünkre bocsájtott humán HexB enzimet is (K_M (pNP-GlcNAc) = 1,1 mM; citrát-foszfát puffer, pH = 5,0).

A szintetizált **39a-n** vegyületek gátló hatását meghatároztuk hOGA és hexóزامинидáz enzimekre, kinetikai vizsgálatokban. Minden vegyület kompetitív inhibitora mind a humán OGA enzimnek, mind a HexA/HexB vagy hHexB enzimnek. A **39a-h** lakton (tio)szemikarbazon származékok közül a leggyengébb gátlást a **39h** tioszármazék adta, míg a legjobb gátló tulajdonsággal a **39e** *p*-klórphenil és a **39g** 2-naftil származékok rendelkeztek. A **39f** és **39g** naftil-származékok gátlásában jelentős különbség van, a **39g** 2-naftil származék több mint egy nagyságrenddel erősebb, mint a **39f** 1-naftil származék. HexA/HexB enzimmel szemben kevés szelektivitást mutatott a **39f** 1-naftil származék. A **39i-n** lakton szulfonilhidrazon származékok hOGA enzimmel szemben jobb inhibitoroknak bizonyultak, mint a **39a-h** lakton szemikarbazonok. A legerősebb inhibitorok a **39m** és **39n** naftil-származékok, míg a leggyengébbnek a **39j** trifluormetilphenil származék bizonyult. Azonban ezek a vegyületek jobban gátolják a hHexB-t, mint a hOGA-t. A **39m** 1-naftilszulfonilhidrazon mindkét enzim legerősebb inhibitora, és a **39j** trifluormetilphenil származék után a legszelektívebb a hHexB-vel szemben.

6. Summary

O-GlcNAcylation is a unique post-translational modification (PTM) of proteins. Unlike the complex *N*-linked and *O*-linked glycans decorating the cell surface, the single *O*-linked β -*N*-acetyl glucosamine (*O*-GlcNAc) modified proteins reside in the cytosol and nucleus. This PTM is a highly dynamic process that modifies thousands of proteins and occurs in an analogous fashion to protein phosphorylation. Phosphorylation, which modifies a similar number of proteins and often directly competes for *O*-GlcNAc sites, is mediated by hundreds of protein kinases and dozens of protein phosphatases. In contrast, *O*-GlcNAc modification is catalyzed by only two enzymes: *O*-GlcNAc transferase (OGT) catalyses the incorporation of β -*O*-GlcNAc moiety using the donor substrate UDP-GlcNAc, while the enzyme *O*-GlcNAcase (OGA) catalyses the removal of *O*-GlcNAc from the glycosylated substrates. As a nutrient sensor, human *O*-GlcNAc glycosylation underlies the fundamental mechanisms of chronic diseases related to metabolism and aging, such as diabetes, cancer and neurodegeneration.

Lysosomal β -*N*-acetylhexosaminidases (HexA and HexB) cleave *N*-acetylglucosamine and *N*-acetylgalactosamine from complex glycan structures. The catalytic mechanism of these enzymes, belonging to the GH20 family, is the same as that of the OGA enzyme mechanism (belonging to the GH84 family), and the structure of their active site is similar, so that OGA inhibitors can also inhibit GH20 enzymes. The function of aberrant HexA and HexB is responsible for the development of Tay-Sachs and Sandhoff syndrome, so it is important to use selective inhibitors to eliminate unwanted side-effects.

PUGNAc (**2**) is one of the most commonly used OGA inhibitors, although it has a nanomolar inhibition constant but exhibits no selectivity against β -*N*-acetylhexosaminidases. During my doctoral work new PUGNAc (**2**) analog OGA inhibitors were synthesized and a heterologous expression method for the production of human OGA was developed in *E. coli* expression system, in addition, the inhibitory properties of the synthesized compounds were evaluated against OGA and HexA/HexB enzymes.

One of the 14 compounds prepared was found in the literature, so 2-acetamido-2-deoxy-D-glucono-1,5-lactone hydrazone derivatives (**39a-n**) were synthesized by adapting this published synthetic method. The five-step synthesis sequence starts from D-glucosamine hydrochloride (**40**), from which 2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy- α,β -D-glucopyranose (**33**) was prepared in two steps according to literature methods. The lactol derivative **33** was reacted with 4-aryl-(thio)semicarbazides (**35a-h**) and arylsulfonyl hydrazides (**35i-n**) in the presence of *p*-toluenesulfonic acid in boiling chloroform. In addition to the 1-(2-acetamido-

3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl)-4-aryl semicarbazides (**36a-g**), the formation of open chain tautomers **37a-g** was also observed. The oxidation reaction with the CrO₃-pyridine complex could be successfully performed from the mixture of tautomers to give 2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-D-glucono-1,5-lactone 4-arylsemicarbazones (**38a-g**). No open-chain tautomer was observed during the reactions with 4-phenylthiosemicarbazide **35h** and arylsulfonyl hydrazides **35i-n**. However, the oxidation reaction with the CrO₃-pyridine complex did not give these compounds, so other methods were tried. Finally, 2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-D-glucono-1,5-lactone arylhydrazones **38h-n** were prepared with activated MnO₂ in dichloromethane. The *O*-acetyl protecting groups were removed with ammonia in methanol.

For biochemical testing of the synthesized compounds **39a-n**, we developed heterologous expression of the human OGA enzyme in an *E. coli* expression system followed by working out an isolation protocol that provided functional and homogeneous recombinant enzyme. To this end, the pET28 vector construct carrying the gene encoding hOGA enzyme (provided by D. J. Vocadlo) was transformed into five different *E. coli* expression strains and the expression conditions were optimised to lead soluble, intact and active recombinant hOGA enzyme production. The greatest problem during the hOGA expression was to overcome the substantial inclusion-body formation and the significant proteolytic activity. In this respect, *E. coli* BL21(DE3) Rosetta strain was proved to be the best performing strain, so the expression was optimized for this strain. The most influential factors in functional hOGA production were the growth temperature and the phase of induction. For the subsequent biochemical methods including proteins isolation steps, kinetic examination required for us to elucidate the stabilization factors for the recombinant hOGA enzyme sample. Applying this knowledge we compiled such a buffer, whose compositions significantly increased the half-life of the enzyme. By an improved single-affinity chromatographic procedure, we were able to gain homogeneous hOGA enzyme. The biochemical characterisation proved the high catalytic efficiency of the enzyme compared to the literature data.

The Michaelis-Menten kinetic parameters of the full-length recombinant human OGA enzyme were determined for *p*NP-GlcNAc and 4-MU-GlcNAc substrates. K_M values in 50 mM potassium phosphate buffer at pH 7.5 at 37°C were 20 μ M and 12 μ M, respectively. We also tested HexA/HexB enzymes from bovine kidney (K_M (*p*NP-GlcNAc) = 1.1 mM; potassium phosphate buffer, pH 5.8) as well as the human HexB enzyme provided by researchers in Prague (K_M (*p*NP-GlcNAc) = 1.1 mM; citrate phosphate buffer, pH 5.0).

The synthesized compounds **39a-n** were tested against the hOGA and hexosaminidase enzymes. Each compound is a competitive inhibitor of both the human OGA and the HexA/HexB or hHexB enzyme. From the lactone (thio)semicarbazone derivatives **39a-h**, the weakest inhibition was shown by thiosemicarbazone **39h**, while the best inhibitory properties were observed for the *p*-chlorophenyl **39e** and the 2-naphthyl **39g** derivatives. There is a significant difference in the inhibition of naphthyl derivatives **39f** and **39g**, as the 2-naphthyl derivative **39g** is more than an order of magnitude stronger than the 1-naphthyl derivative **39f**. The 1-naphthyl derivative **39f** showed moderate selectivity against HexA/HexB. Lactone sulfonylhydrazones **39i-n** have been shown to be better inhibitors of hOGA than lactone semicarbazones **39a-h**. The strongest inhibitors were the naphthyl derivatives **39m** and **39n**, while the weakest was the trifluoromethylphenyl derivative **39j**. However, these compounds inhibit hHexB stronger than hOGA. 1-Naphthylsulfonylhydrazone **39m** is the strongest inhibitor of both enzymes and is the most selective against hHexB after the trifluoromethylphenyl derivative **39j**.

7. Irodalomjegyzék

1. Varki, A., Biological roles of glycans. *Glycobiology* **2017**, 27, 3-49.
2. Schjoldager, K. T.; Narimatsu, Y.; Joshi, H. J.; Clausen, H., Global view of human protein glycosylation pathways and functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.* **2020**, 21, 729-749.
3. Ma, J.; Wu, C.; Hart, G. W., Analytical and Biochemical Perspectives of Protein O-GlcNAcylation. *Chem. Rev.* **2021**, 121, 1513-1581.
4. Torres, C. R.; Hart, G. W., Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc. *J. Biol. Chem.* **1984**, 259, 3308-3317.
5. Holt, G. D.; Hart, G. W., The subcellular distribution of terminal N-acetylglucosamine moieties. Localization of a novel protein-saccharide linkage, O-linked GlcNAc. *J. Biol. Chem.* **1986**, 261, 8049-8057.
6. Hanover, J. A.; Cohen, C. K.; Willingham, M. C.; Park, M. K., O-linked N-acetylglucosamine is attached to proteins of the nuclear pore. Evidence for cytoplasmic and nucleoplasmic glycoproteins. *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 9887-9894.
7. Holt, G. D.; Snow, C. M.; Senior, A.; Haltiwanger, R. S.; Gerace, L.; Hart, G. W., Nuclear pore complex glycoproteins contain cytoplasmically disposed O-linked N-acetylglucosamine. *J. Cell. Biol.* **1987**, 104, 1157-1164.
8. Snow, C. M.; Senior, A.; Gerace, L., Monoclonal antibodies identify a group of nuclear pore complex glycoproteins. *J. Cell. Biol.* **1987**, 104, 1143-1156.
9. Kelly, W. G.; Hart, G. W., Glycosylation of chromosomal proteins: Localization of O-linked N-acetylglucosamine in Drosophila chromatin. *Cell* **1989**, 57, 243-251.
10. Ma, J.; Liu, T.; Wei, A.-C.; Banerjee, P.; O'Rourke, B.; Hart, G. W., O-GlcNAc Profiling Identifies Widespread O-Linked β -N-Acetylglucosamine Modification (O-GlcNAcylation) in Oxidative Phosphorylation System Regulating Cardiac Mitochondrial Function *J. Biol. Chem.* **2015**, 290, 29141-29153.
11. Haltiwanger, R. S.; Holt, G. D.; Hart, G. W., Enzymatic addition of O-GlcNAc to nuclear and cytoplasmic proteins. Identification of a uridine diphospho-N-acetylglucosamine:peptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase. *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 2563-8.
12. Haltiwanger, R. S.; Blomberg, M. A.; Hart, G. W., Glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins. Purification and characterization of a uridine diphospho-N-acetylglucosamine:polypeptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase. *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 9005-13.
13. Hanover, J. A.; Yu, S.; Lubas, W. B.; Shin, S. H.; Ragano-Caracciola, M.; Kochran, J.; Love, D. C., Mitochondrial and nucleocytoplasmic isoforms of O-linked GlcNAc transferase encoded by a single mammalian gene. *Arch. Biochem. Biophys.* **2003**, 409, 287-297.

14. Dong, D. L.; Hart, G. W., Purification and characterization of an O-GlcNAc selective N-acetyl- β -D-glucosaminidase from rat spleen cytosol. *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 19321-19330.
15. Copeland, R. J.; Bullen, J. W.; Hart, G. W., Cross-talk between GlcNAcylation and phosphorylation: roles in insulin resistance and glucose toxicity. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **2008**, 295, E17-E28.
16. Vaidyanathan, K.; Wells, L., Multiple Tissue-specific Roles for the O-GlcNAc Post-translational Modification in the Induction of and Complications Arising from Type II Diabetes *J. Biol. Chem.* **2014**, 289, 34466-34471.
17. Slawson, C.; Hart, G. W., O-GlcNAc signalling: implications for cancer cell biology. *Nat. Rev. Cancer* **2011**, 11, 678-684.
18. Hanover, J. A.; Chen, W.; Bond, M. R., O-GlcNAc in cancer: An Oncometabolism-fueled vicious cycle. *J. Bioenerg. Biomembr.* **2018**, 50, 155-173.
19. Zhu, Y.; Shan, X.; Yuzwa, S. A.; Vocadlo, D. J., The emerging link between O-GlcNAc and Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* **2014**, 289, 34472-34481, 11 pp.
20. Gong, C.-X.; Liu, F.; Iqbal, K., O-GlcNAcylation: A regulator of tau pathology and neurodegeneration. *Alzheimer's Dementia* **2016**, 12, 1078-1089.
21. Wani, W. Y.; Chatham, J. C.; Darley-USmar, V.; McMahon, L. L.; Zhang, J., O-GlcNAcylation and neurodegeneration. *Brain Res. Bull.* **2017**, 133, 80-87.
22. Harwood, K. R.; Hanover, J. A., Nutrient-driven O-GlcNAc cycling – think globally but act locally. *J. Cell. Sci.* **2014**, 127, 1857-1867.
23. Kreppel, L. K.; Blomberg, M. A.; Hart, G. W., Dynamic Glycosylation of Nuclear and Cytosolic Proteins: Cloning and characterization of a unique O-GlcNAc transferase with multiple tetratricopeptide repeats. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 9308-9315.
24. Lubas, W. A.; Hanover, J. A., Functional Expression of O-linked GlcNAc Transferase. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 10983-10988.
25. Love, D. C.; Kochan, J.; Cathey, R. L.; Shin, S.-H.; Hanover, J. A., Mitochondrial and nucleocytoplasmic targeting of O-linked GlcNAc transferase. *J. Cell. Sci.* **2003**, 116, 943-943.
26. Trapannone, R.; Mariappa, D.; Ferenbach, Andrew T.; van Aalten, Daan M. F., Nucleocytoplasmic human O-GlcNAc transferase is sufficient for O-GlcNAcylation of mitochondrial proteins. *Biochem. J.* **2016**, 473, 1693-1702.
27. Sacoman, J. L.; Dagda, R. Y.; Burnham-Marusich, A. R.; Dagda, R. K.; Berninsone, P. M., Mitochondrial O-GlcNAc Transferase (mOGT) Regulates Mitochondrial Structure, Function, and Survival in HeLa Cells. *J. Biol. Chem.* **2017**, 292, 4499-4518.
28. Liu, L.; Li, L.; Ma, C.; Shi, Y.; Liu, C.; Xiao, Z.; Zhang, Y.; Tian, F.; Gao, Y.; Zhang, J.; Ying, W.; Wang, P. G.; Zhang, L., O-GlcNAcylation of

- Thr¹²/Ser⁵⁶ in short-form O-GlcNAc transferase (sOGT) regulates its substrate selectivity. *J. Biol. Chem.* **2019**, 294, 16620-16633.
29. Stephen, H. M.; Adams, T. M.; Wells, L., Regulating the Regulators: Mechanisms of Substrate Selection of the O-GlcNAc Cycling Enzymes OGT and OGA. *Glycobiology* **2021**, 31, 724-733.
 30. Gao, Y.; Wells, L.; Comer, F. I.; Parker, G. J.; Hart, G. W., Dynamic O-Glycosylation of Nuclear and Cytosolic Proteins: Cloning and characterization of a neutral, cytosolic β -N-acetylglucosaminidase from human brain. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 9838-9845.
 31. Cui, Y.; Xie, R.; Zhang, X.; Liu, Y.; Hu, Y.; Li, Y.; Liu, X.; Yu, X.; Wu, C., OGA is associated with deglycosylation of NONO and the KU complex during DNA damage repair. *Cell Death Dis.* **2021**, 12, 622.
 32. Carbohydrate Active Enzymes database. <http://www.cazy.org/>
 33. Drula, E.; Garron, M.-L.; Dogan, S.; Lombard, V.; Henrissat, B.; Terrapon, N., The carbohydrate-active enzyme database: functions and literature. *Nucleic Acids Res.* **2022**, 50, D571-D577.
 34. Macauley, M. S.; Whitworth, G. E.; Debowski, A. W.; Chin, D.; Vocadlo, D. J., O-GlcNAcase Uses Substrate-assisted Catalysis: kinetic analysis and development of highly selective mechanism-inspired inhibitors. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 25313-25322.
 35. Çetinbaş, N.; Macauley, M. S.; Stubbs, K. A.; Drapala, R.; Vocadlo, D. J., Identification of Asp174 and Asp175 as the Key Catalytic Residues of Human O-GlcNAcase by Functional Analysis of Site-Directed Mutants. *Biochemistry* **2006**, 45, 3835-3844.
 36. He, Y.; Macauley, M. S.; Stubbs, K. A.; Vocadlo, D. J.; Davies, G. J., Visualizing the Reaction Coordinate of an O-GlcNAc Hydrolase. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 1807-1809.
 37. Li, B.; Li, H.; Lu, L.; Jiang, J., Structures of human O-GlcNAcase and its complexes reveal a new substrate recognition mode. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2017**, 24, 362-369.
 38. Shen, D. L.; Gloster, T. M.; Yuzwa, S. A.; Vocadlo, D. J., Insights into O-Linked N-Acetylglucosamine (O-GlcNAc) Processing and Dynamics through Kinetic Analysis of O-GlcNAc Transferase and O-GlcNAcase Activity on Protein Substrates. *J. Biol. Chem.* **2012**, 287, 15395-15408.
 39. Yang, Y. R.; Song, M.; Lee, H.; Jeon, Y.; Choi, E.-J.; Jang, H.-J.; Moon, H. Y.; Byun, H.-Y.; Kim, E.-K.; Kim, D. H.; Lee, M. N.; Koh, A.; Ghim, J.; Choi, J. H.; Lee-Kwon, W.; Kim, K. T.; Ryu, S. H.; Suh, P.-G., O-GlcNAcase is essential for embryonic development and maintenance of genomic stability. *Aging Cell* **2012**, 11, 439-448.
 40. Gorelik, A.; Bartual, S. G.; Borodkin, V. S.; Varghese, J.; Ferenbach, A. T.; van Aalten, D. M. F., Genetic recoding to dissect the roles of site-specific protein O-GlcNAcylation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2019**, 26, 1071.
 41. Hu, Y.; Belke, D.; Suarez, J.; Swanson, E.; Clark, R.; Hoshijima, M.; Dillmann, W. H., Adenovirus-Mediated Overexpression of O-GlcNAcase

- Improves Contractile Function in the Diabetic Heart. *Circ. Res.* **2005**, *96*, 1006-1013.
42. Keembiyehetty, C.; Love, D. C.; Harwood, K. R.; Gavrilova, O.; Comly, M. E.; Hanover, J. A., Conditional Knock-out Reveals a Requirement for O-Linked N-Acetylglucosaminase (O-GlcNAcase) in Metabolic Homeostasis *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 7097-7113.
 43. Abramowitz, L. K.; Harly, C.; Das, A.; Bhandoola, A.; Hanover, J. A., Blocked O-GlcNAc cycling disrupts mouse hematopoietic stem cell maintenance and early T cell development. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 12569.
 44. Muha, V.; Fenckova, M.; Ferenbach, A. T.; Catinozzi, M.; Eidhof, I.; Storkebaum, E.; Schenck, A.; van Aalten, D. M. F., O-GlcNAcase contributes to cognitive function in Drosophila. *J. Biol. Chem.* **2020**, *295*, 8636-8646.
 45. Hart, G. W.; Slawson, C.; Ramirez-Correa, G.; Lagerlof, O., Cross Talk Between O-GlcNAcylation and Phosphorylation: Roles in Signaling, Transcription, and Chronic Disease. *Annu. Rev. Biochem.* **2011**, *80*, 825-858.
 46. Ma, J.; Hart, G. W., Protein O-GlcNAcylation in diabetes and diabetic complications. *Expert Rev. Proteomics* **2013**, *10*, 365-380.
 47. Bond, M. R.; Hanover, J. A., O-GlcNAc cycling: a link between metabolism and chronic disease. *Annu. Rev. Nutr.* **2013**, *33*, 205-229.
 48. Zhu, Y.; Hart, G. W., Targeting O-GlcNAcylation to develop novel therapeutics. *Mol. Aspects Med.* **2021**, *79*, 100885.
 49. Magini, A.; Mencarelli, S.; Tancini, B.; Ciccarone, V.; Urbanelli, L.; Hasilik, A.; Emiliani, C., Identification and characterization of mature β -hexosaminidases associated with human placenta lysosomal membrane. *Biosci. Rep.* **2008**, *28*, 229-237.
 50. Hou, Y.; Tse, R.; Mahuran, D. J., Direct Determination of the Substrate Specificity of the α -Active Site in Heterodimeric β -Hexosaminidase A. *Biochemistry* **1996**, *35*, 3963-3969.
 51. Maier, T.; Strater, N.; Schuette, C.; Klingenstein, R.; Sandhoff, K.; Saenger, W., The X-ray Crystal Structure of Human β -Hexosaminidase B Provides New Insights into Sandhoff Disease. *J. Mol. Biol.* **2003**, *328*, 669-681.
 52. Mark, B. L.; Mahuran, D. J.; Cherney, M. M.; Zhao, D.; Knapp, S.; James, M. N. G., Crystal Structure of Human β -Hexosaminidase B: Understanding the Molecular Basis of Sandhoff and Tay–Sachs Disease. *J. Mol. Biol.* **2003**, *327*, 1093-1109.
 53. Yamada, K.; Takado, Y.; Kato, Y. S.; Yamada, Y.; Ishiguro, H.; Wakamatsu, N., Characterization of the mutant β -subunit of β -hexosaminidase for dimer formation responsible for the adult form of Sandhoff disease with the motor neuron disease phenotype. *J. Biochem.* **2013**, *153*, 111-119.
 54. Elbatrawy, A. A.; Kim, E. J.; Nam, G., O-GlcNAcase: Emerging Mechanism, Substrate Recognition and Small-Molecule Inhibitors. *ChemMedChem* **2020**, *15*, 1244-1257.
 55. Bartolomé-Nebreda, J. M.; Trabanco, A. A.; Velter, A. I.; Buijnsters, P., O-GlcNAcase inhibitors as potential therapeutics for the treatment of

- Alzheimer's disease and related tauopathies: analysis of the patent literature. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2021**, *31*, 1117-1154.
56. Alteen, M. G.; Tan, H. Y.; Vocadlo, D. J., Monitoring and modulating O-GlcNAcylation: assays and inhibitors of O-GlcNAc processing enzymes. *Current opinion in structural biology* **2021**, *68*, 157-165.
 57. Hanover, J. A.; Lai, Z.; Lee, G.; Lubas, W. A.; Sato, S. M., Elevated O-Linked N-Acetylglucosamine Metabolism in Pancreatic β -Cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **1999**, *362*, 38-45.
 58. dos Santos, J. P. A.; Vizuite, A.; Hansen, F.; Biasibetti, R.; Gonçalves, C.-A., Early and Persistent O-GlcNAc Protein Modification in the Streptozotocin Model of Alzheimer's Disease. *J. Alzheimer's Dis.* **2018**, *61*, 237-249.
 59. Lee, J. H.; Sancar, A., Regulation of apoptosis by the circadian clock through NF- κ B signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, *108*, 12036-12041.
 60. Yang, W. H.; Kim, J. E.; Nam, H. W.; Ju, J. W.; Kim, H. S.; Kim, Y. S.; Cho, J. W., Modification of p53 with O-linked N-acetylglucosamine regulates p53 activity and stability. *Nat. Cell Biol.* **2006**, *8*, 1074-1083.
 61. Macauley, M. S.; Bubb, A. K.; Martinez-Fleites, C.; Davies, G. J.; Vocadlo, D. J., Elevation of Global O-GlcNAc Levels in 3T3-L1 Adipocytes by Selective Inhibition of O-GlcNAcase Does Not Induce Insulin Resistance. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 34687-34695.
 62. Stubbs, K. A.; Zhang, N.; Vocadlo, D. J., A divergent synthesis of 2-acyl derivatives of PUGNAc yields selective inhibitors of O-GlcNAcase. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 839-845.
 63. Hattie, M.; Cekic, N.; Debowski, A. W.; Vocadlo, D. J.; Stubbs, K. A., Modifying the phenyl group of PUGNAc: reactivity tuning to deliver selective inhibitors for N-acetyl-D-glucosaminidases. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 3193-3197.
 64. Knapp, S.; Vocadlo, D.; Gao, Z.; Kirk, B.; Lou, J.; Withers, S. G., NAG-thiazoline, An N-Acetyl- β -hexosaminidase Inhibitor That Implicates Acetamido Participation. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6804-6805.
 65. Rao, F. V.; Dorfmüller, H. C.; Villa, F.; Allwood, M.; Eggleston, I. M.; van Aalten, D. M., Structural insights into the mechanism and inhibition of eukaryotic O-GlcNAc hydrolysis. *EMBO J.* **2006**, *25*, 1569-1578.
 66. Knapp, S.; Fash, D.; Abdo, M.; Emge, T. J.; Rablen, P. R., GlcNAc-Thiazoline conformations. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 1831-1836.
 67. Kim, C.; Nam, D. W.; Park, S. Y.; Song, H.; Hong, H. S.; Boo, J. H.; Jung, E. S.; Kim, Y.; Baek, J. Y.; Kim, K. S.; Cho, J. W.; Mook-Jung, I., O-linked β -N-acetylglucosaminidase inhibitor attenuates β -amyloid plaque and rescues memory impairment. *Neurobiol. Aging* **2013**, *34*, 275-285.
 68. Macauley, M. S.; Stubbs, K. A.; Vocadlo, D. J., O-GlcNAcase Catalyzes Cleavage of Thioglycosides without General Acid Catalysis. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17202-17203.

69. Yuzwa, S. A.; Macauley, M. S.; Heinonen, J. E.; Shan, X.; Dennis, R. J.; He, Y.; Whitworth, G. E.; Stubbs, K. A.; McEachern, E. J.; Davies, G. J.; Vocadlo, D. J., A potent mechanism-inspired O-GlcNAcase inhibitor that blocks phosphorylation of tau in vivo. *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 483-490.
70. Yuzwa, S. A.; Shan, X.; Macauley, M. S.; Clark, T.; Skorobogatko, Y.; Vosseller, K.; Vocadlo, D. J., Increasing O-GlcNAc slows neurodegeneration and stabilizes tau against aggregation. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 393-399.
71. Yu, Y.; Zhang, L.; Li, X.; Run, X.; Liang, Z.; Li, Y.; Liu, Y.; Lee, M. H.; Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K.; Vocadlo, D. J.; Liu, F.; Gong, C.-X., Differential effects of an O-GlcNAcase inhibitor on tau phosphorylation. *PLoS One* **2012**, *7*, e35277.
72. Borghgraef, P.; Menuet, C.; Theunis, C.; Louis, J. V.; Devijver, H.; Maurin, H.; Smet-Nocca, C.; Lippens, G.; Hilaire, G.; Gijssen, H.; Moechars, D.; Van Leuven, F., Increasing Brain Protein O-GlcNAc-ylation Mitigates Breathing Defects and Mortality of Tau.P301L Mice. *PLoS One* **2013**, *8*, e84442.
73. Graham, D. L.; Gray, A. J.; Joyce, J. A.; Yu, D.; O'Moore, J.; Carlson, G. A.; Shearman, M. S.; Dellovade, T. L.; Hering, H., Increased O-GlcNAcylation reduces pathological tau without affecting its normal phosphorylation in a mouse model of tauopathy. *Neuropharmacology* **2014**, *79*, 307-313.
74. Ding, N.; Ping, L.; Shi, Y.; Feng, L.; Zheng, X.; Song, Y.; Zhu, J., Thiamet-G-mediated inhibition of O-GlcNAcase sensitizes human leukemia cells to microtubule-stabilizing agent paclitaxel. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *453*, 392-397.
75. Cekic, N.; Heinonen, J. E.; Stubbs, K. A.; Roth, C.; He, Y.; Bennet, A. J.; McEachern, E. J.; Davies, G. J.; Vocadlo, D. J., Analysis of transition state mimicry by tight binding aminothiazoline inhibitors provides insight into catalysis by human O-GlcNAcase. *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 3742-3750.
76. Selnick, H. G.; Hess, J. F.; Tang, C. Y.; Liu, K.; Schachter, J. B.; Ballard, J. E.; Marcus, J.; Klein, D. J.; Wang, X. H.; Pearson, M.; Savage, M. J.; Kaul, R.; Li, T. S.; Vocadlo, D. J.; Zhou, Y. X.; Zhu, Y. B.; Mu, C. W.; Wang, Y. D.; Wei, Z. Y.; Bai, C.; Duffy, J. L.; McEachern, E. J., Discovery of MK-8719, a Potent O-GlcNAcase Inhibitor as a Potential Treatment for Tauopathies. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 10062-10097.
77. Shanmugasundaram, B.; Debowski, A. W.; Dennis, R. J.; Davies, G. J.; Vocadlo, D. J.; Vasella, A., Inhibition of O-GlcNAcase by a gluco-configured nagstatin and a PUGNAc-imidazole hybrid inhibitor. *Chem. Commun.* **2006**, 4372-4374.
78. Dorfmueller, Helge C.; Borodkin, Vladimir S.; Schimpl, M.; van Aalten, Daan M. F., GlcNAcstatins are nanomolar inhibitors of human O-GlcNAcase inducing cellular hyper-O-GlcNAcylation. *Biochem. J.* **2009**, *420*, 221-227.
79. Dorfmueller, H. C.; Borodkin, V. S.; Schimpl, M.; Zheng, X.; Kime, R.; Read, K. D.; van Aalten, D. M. F., Cell-Penetrant, Nanomolar O-GlcNAcase Inhibitors Selective against Lysosomal Hexosaminidases. *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 1250-1255.

80. Li, T.; Guo, L.; Zhang, Y.; Wang, J.; Li, Z.; Lin, L.; Zhang, Z.; Li, L.; Lin, J.; Zhao, W.; Li, J.; Wang, P. G., Design and synthesis of *O*-GlcNAcase inhibitors via 'click chemistry' and biological evaluations. *Carbohydr. Res.* **2011**, *346*, 1083-1092.
81. Igual, M. O.; Nunes, P. S. G.; da Costa, R. M.; Mantoani, S. P.; Tostes, R. C.; Carvalho, I., Novel glucopyranoside C2-derived 1,2,3-triazoles displaying selective inhibition of *O*-GlcNAcase (OGA). *Carbohydr. Res.* **2019**, *471*, 43-55.
82. Nishimura, Y., Gem-diamine 1-*N*-iminosugars as versatile glycomimetics: synthesis, biological activity and therapeutic potential. *J. Antibiot.* **2009**, *62*, 407-423.
83. Stütz, A. E.; Wrodnigg, T. M., Chapter 4 - Imino sugars and glycosyl hydrolases: Historical context, current aspects, emerging trends. In *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, Horton, D., Ed. Academic Press 2011; Vol. 66, pp 187-298.
84. Liang, P.-H.; Cheng, W.-C.; Lee, Y.-L.; Yu, H.-P.; Wu, Y.-T.; Lin, Y.-L.; Wong, C.-H., Novel Five-Membered Iminocyclitol Derivatives as Selective and Potent Glycosidase Inhibitors: New Structures for Antivirals and Osteoarthritis. *ChemBioChem* **2006**, *7*, 165-173.
85. Ayers, B. J.; Glawar, A. F. G.; Martínez, R. F.; Ngo, N.; Liu, Z.; Fleet, G. W. J.; Butters, T. D.; Nash, R. J.; Yu, C.-Y.; Wormald, M. R.; Nakagawa, S.; Adachi, I.; Kato, A.; Jenkinson, S. F., Nine of 16 Stereoisomeric Polyhydroxylated Proline Amides Are Potent β -*N*-Acetylhexosaminidase Inhibitors. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 3398-3409.
86. Crabtree, E. V.; Martínez, R. F.; Nakagawa, S.; Adachi, I.; Butters, T. D.; Kato, A.; Fleet, G. W. J.; Glawar, A. F. G., Synthesis of the enantiomers of XYLNac and LYXNac: comparison of β -*N*-acetylhexosaminidase inhibition by the 8 stereoisomers of 2-*N*-acetylamino-1,2,4-trideoxy-1,4-iminopentitols. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 3932-3943.
87. Rountree, J. S. S.; Butters, T. D.; Wormald, M. R.; Boomkamp, S. D.; Dwek, R. A.; Asano, N.; Ikeda, K.; Evinson, E. L.; Nash, R. J.; Fleet, G. W. J., Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Enantiomeric β -*N*-Acetylhexosaminidase Inhibitors LABNac and DABNac as Potential Agents against Tay-Sachs and Sandhoff Disease. *ChemMedChem* **2009**, *4*, 378-392.
88. Storer, R.; Tinsley, J. M.; Wilson, F. X.; Horne, G.; Wren, S. P.; Dorgan, C. R.; Well, R. M. v.; Fowler, L.; Czemerlys, L. Pyrrolidine derivatives as selective glycosidase inhibitors and uses thereof. WO2012117219A1, 2012.
89. Bergeron-Brlek, M.; Goodwin-Tindall, J.; Cekic, N.; Roth, C.; Zandberg, W. F.; Shan, X.; Varghese, V.; Chan, S.; Davies, G. J.; Vocadlo, D. J.; Britton, R., A Convenient Approach to Stereoisomeric Iminocyclitols: Generation of Potent Brain-Permeable OGA Inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 15429-15433.

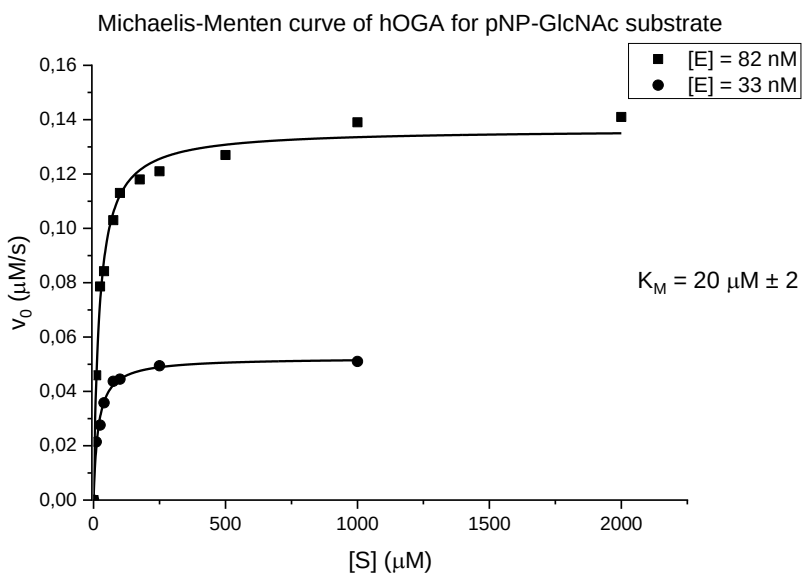
90. Dorfmüller, H. C.; van Aalten, D. M. F., Screening-based discovery of drug-like O-GlcNAcase inhibitor scaffolds. *FEBS Lett.* **2010**, *584*, 694-700.
91. Yu, H.; Liu-Bujalski, L.; Johnson, T. L. Glycosidase inhibitors. WO2014159234A1, 2014.
92. Abdel-Magid, A. F., Inhibition of O-GlcNAcase (OGA): A Potential Therapeutic Target to Treat Alzheimer's Disease. *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, *5*, 1270-1271.
93. Bartolomé-Nebreda, J. M.; Trabanco-Suárez, A. A.; Viturro, C. M. M. OGA inhibitor compounds. WO2018141984A1, 2018.
94. Rosse, G., Diazaspirononane Inhibitors of O-GlcNAc Hydrolase for the Treatment of Central Nervous System Diseases. *ACS Med. Chem. Lett.* **2019**, *10*, 147-147.
95. Beer, D.; Maloisel, J.-L.; Rast, D. M.; Vasella, A., Synthesis of 2-Acetamido-2-deoxy-D-gluconhydroximolactone- and Chitobionhydroximolactone-Derived *N*-Phenylcarbamates, Potential Inhibitors of β -*N*-Acetylglucosaminidase. *Helv. Chim. Acta* **1990**, *73*, 1918-1922.
96. Mohan, H.; Vasella, A., An Improved Synthesis of 2-Acetamido-2-deoxy- D-gluconohydroximolactone (PUGNAc), A Strong Inhibitor of β -*N*-Acetylglucosaminidases. *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83*, 114-118.
97. Beer, D.; Vasella, A., Aldonhydroximolactones. Preparation and Determination of Configuration. *Helv. Chim. Acta* **1985**, *68*, 2254-2274.
98. Roth, W.; Pigman, W., Glycosides of 2-Acetamido-2-deoxy-D-glucosamine and Benzylidene Derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 4608-4611.
99. Wolk, D. R.; Vasella, A.; Schweikart, F.; Peter, M. G., Synthesis and Enzyme-Inhibition Studies of Phenylsemicarbazones derived from D-glucono-1,5-lactone and 2-acetamido-2-deoxy-D-glucono-1,5-lactone. *Helv. Chim. Acta* **1992**, *75*, 323-334.
100. Schimpl, M.; Schüttelkopf, Alexander W.; Borodkin, Vladimir S.; van Aalten, Daan M. F., Human OGA binds substrates in a conserved peptide recognition groove. *Biochem. J.* **2010**, *432*, 1-12.
101. Kim, E. J.; Kang, D. O.; Love, D. C.; Hanover, J. A., Enzymatic characterization of O-GlcNAcase isoforms using a fluorogenic GlcNAc substrate. *Carbohydr. Res.* **2006**, *341*, 971-982.
102. Elsen, N. L.; Patel, S. B.; Ford, R. E.; Hall, D. L.; Hess, F.; Kandula, H.; Kornienko, M.; Reid, J.; Selnick, H.; Shipman, J. M.; Sharma, S.; Lumb, K. J.; Soisson, S. M.; Klein, D. J., Insights into activity and inhibition from the crystal structure of human O-GlcNAcase. *Nat. Chem. Biol.* **2017**, *13*, 613-615.
103. Roth, C.; Chan, S.; Offen, W. A.; Hemsworth, G. R.; Davies, G. J.; Willems, L. I.; King, D. T.; Varghese, V.; Britton, R.; Vocadlo, D. J., Structural and functional insight into human O-GlcNAcase. *Nat. Chem. Biol.* **2017**, *13*, 610-612.
104. Chaplin, D.; Crout, D. H. G.; Bornemann, S.; Hutchinson, D. W.; Khan, R., Conversion of 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranose (*N*-

- acetylglucosamine) into 2-acetamido-2-deoxy- β -D-galactopyranose (*N*-acetylgalactosamine) using a biotransformation to generate a selectively deprotected substrate for SN2 inversion. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1992**, 235-237.
105. Ravindranathan Kartha, K. P.; Mukhopadhyay, B.; Field, R. A., Practical de-O-acylation reactions promoted by molecular sieves. *Carbohydr. Res.* **2004**, 339, 729-732.
 106. Aboul-Enein, M. N.; El-Azzouny, A. A.; Attia, M. I.; Maklad, Y. A.; Amin, K. M.; Abdel-Rehim, M.; El-Behairy, M. F., Design and synthesis of novel stiripentol analogues as potential anticonvulsants. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, 47, 360-369.
 107. Zhang, G.; Fan, Q.; Wang, H.; Zhao, Y.; Ding, C., NaHSO₃-Mediated Direct Synthesis of Sulfinic Esters from Sulfonyl Hydrazides under Transition-Metal-Free Conditions. *Adv. Synth. Catal.* **2021**, 363, 833-837.
 108. Kiss, M.; Szabó, E.; Bocska, B.; Sinh, L. T.; Fernandes, C. P.; Timári, I.; Hayes, J. M.; Somsák, L.; Barna, T., Nanomolar inhibition of human OGA by 2-acetamido-2-deoxy-D-glucono-1,5-lactone semicarbazone derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, 223, 113649.
 109. Kiss, M.; Timári, I.; Barna, T.; Mészáros, Z.; Slámová, K.; Bojarová, P.; Křen, V.; Hayes, J. M.; Somsák, L., 2-Acetamido-2-deoxy-D-glucono-1,5-lactone Sulfonylhydrazones: Synthesis and Evaluation as Inhibitors of Human OGA and HexB Enzymes. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, 23, 1037.
 110. Thiele, C. M.; Petzold, K.; Schleucher, J., EASY ROESY: Reliable Cross-Peak Integration in Adiabatic Symmetrized ROESY. *Chem. Eur. J.* **2009**, 15, 585-588.
 111. Goff, S. A.; Casson, L. P.; Goldberg, A. L., Heat shock regulatory gene *htpR* influences rates of protein degradation and expression of the *lon* gene in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1984**, 81, 6647.
 112. Tsilibaris, V.; Maenhaut-Michel, G.; Van Melderren, L., Biological roles of the Lon ATP-dependent protease. *Res. Microbiol.* **2006**, 157, 701-713.
 113. Luo, S.; McNeill, M.; Myers, T. G.; Hohman, R. J.; Levine, R. L., Lon protease promotes survival of *Escherichia coli* during anaerobic glucose starvation. *Arch. Microbiol.* **2008**, 189, 181-185.
 114. Wells, L.; Gao, Y.; Mahoney, J. A.; Vosseller, K.; Chen, C.; Rosen, A.; Hart, G. W., Dynamic O-Glycosylation of Nuclear and Cytosolic Proteins: Further characterization of the nucleocytoplasmic β -*N*-acetylglucosaminidase, O-GlcNAcase. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 1755-1761.
 115. Butkinaree, C.; Cheung, W. D.; Park, S.; Park, K.; Barber, M.; Hart, G. W., Characterization of β -*N*-Acetylglucosaminidase Cleavage by Caspase-3 during Apoptosis. *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 23557-23566.
 116. Wadhawan, S.; Gautam, S., Rescue of *Escherichia coli* cells from UV-induced death and filamentation by caspase-3 inhibitor. *Int. Microbiol.* **2019**, 22, 369-376.

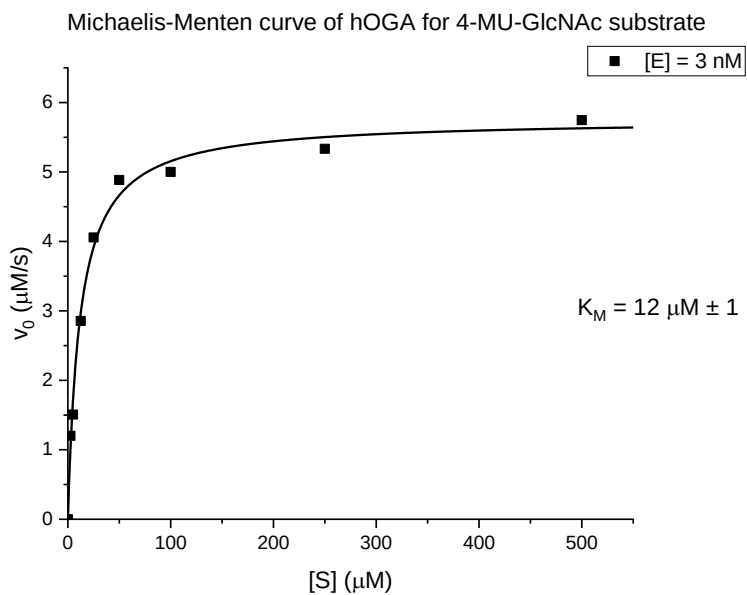
117. Bayles, K. W., Bacterial programmed cell death: making sense of a paradox. *Nat. Rev. Microbiol.* **2014**, *12*, 63-69.
118. Francis, D. M.; Page, R., Strategies to Optimize Protein Expression in *E. coli*. *Curr. Protoc. Protein Sci.* **2010**, *61*, 5.24.1-5.24.29.
119. Sinh, L. T. Optimizing the heterologous expression of human O-GlcNAcase and the following isolation procedures. Debreceni Egyetem 2019.
120. Krejzová, J.; Kulik, N.; Slámová, K.; Křen, V., Expression of human β -N-acetylhexosaminidase B in yeast eases the search for selective inhibitors. *Enzyme Microb. Tech.* **2016**, *89*, 1-6.
121. Dixon, M., The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem. J.* **1953**, *55*, 170-171.
122. Cornish-Bowden, A., A simple graphical method for determining the inhibition constants of mixed, uncompetitive and non-competitive inhibitors. *Biochem. J.* **1974**, *137*, 143-144.
123. Bocska, B. 2-(N-szubsztituált-amino)-2-dezoxi-D-glükono-1,5-lakton fenilszemikarbazonok előállítása. Debreceni Egyetem, 2022.
124. Froger, A.; Hall, J. E., Transformation of plasmid DNA into *E. coli* using the heat shock method. *JOVE-J. Vis. Exp.* **2007**, 253.
125. Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248-254.

8. Függelék

8.1 A hOGA és a HexA/HexB Michaelis-Menten görbái

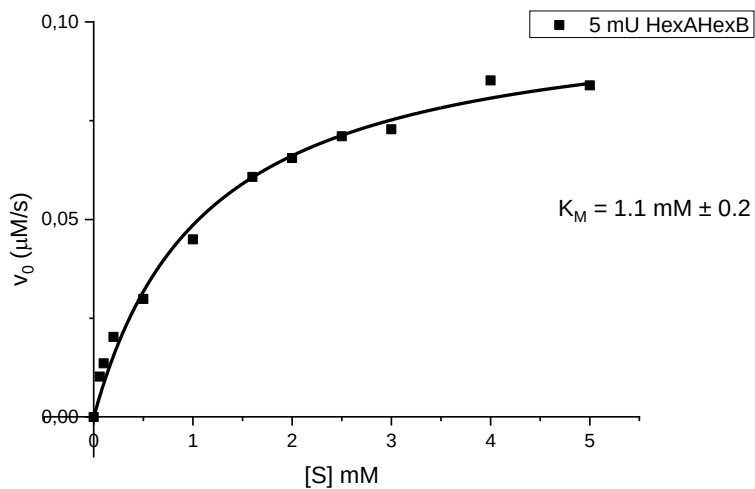


50 mM kálium-foszfát puffer (pH = 7,5) 37°C-on



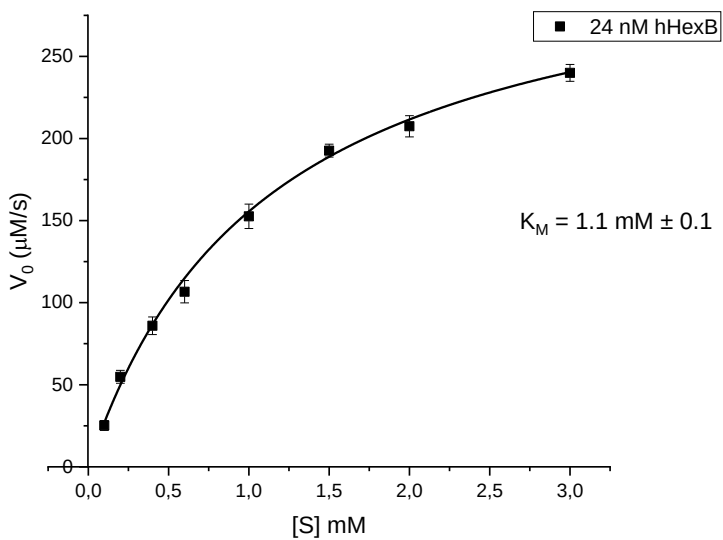
50 mM kálium-foszfát puffer (pH = 7,5) 37°C-on

Michaelis-Menten curve of HexAHexB for pNP-GlcNAc substrate



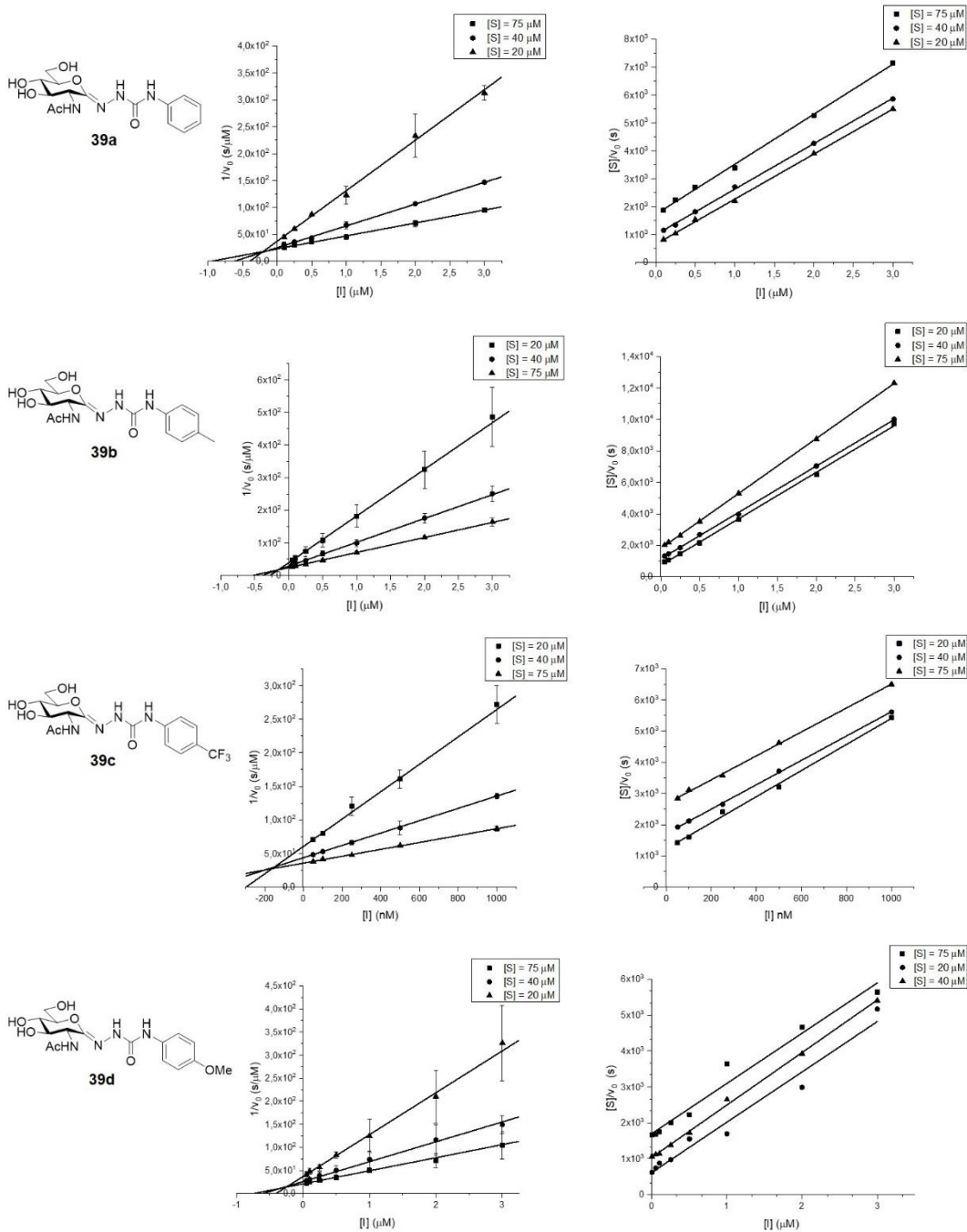
50 mM kálium-foszfát puffer (pH = 7,5) 37°C-on

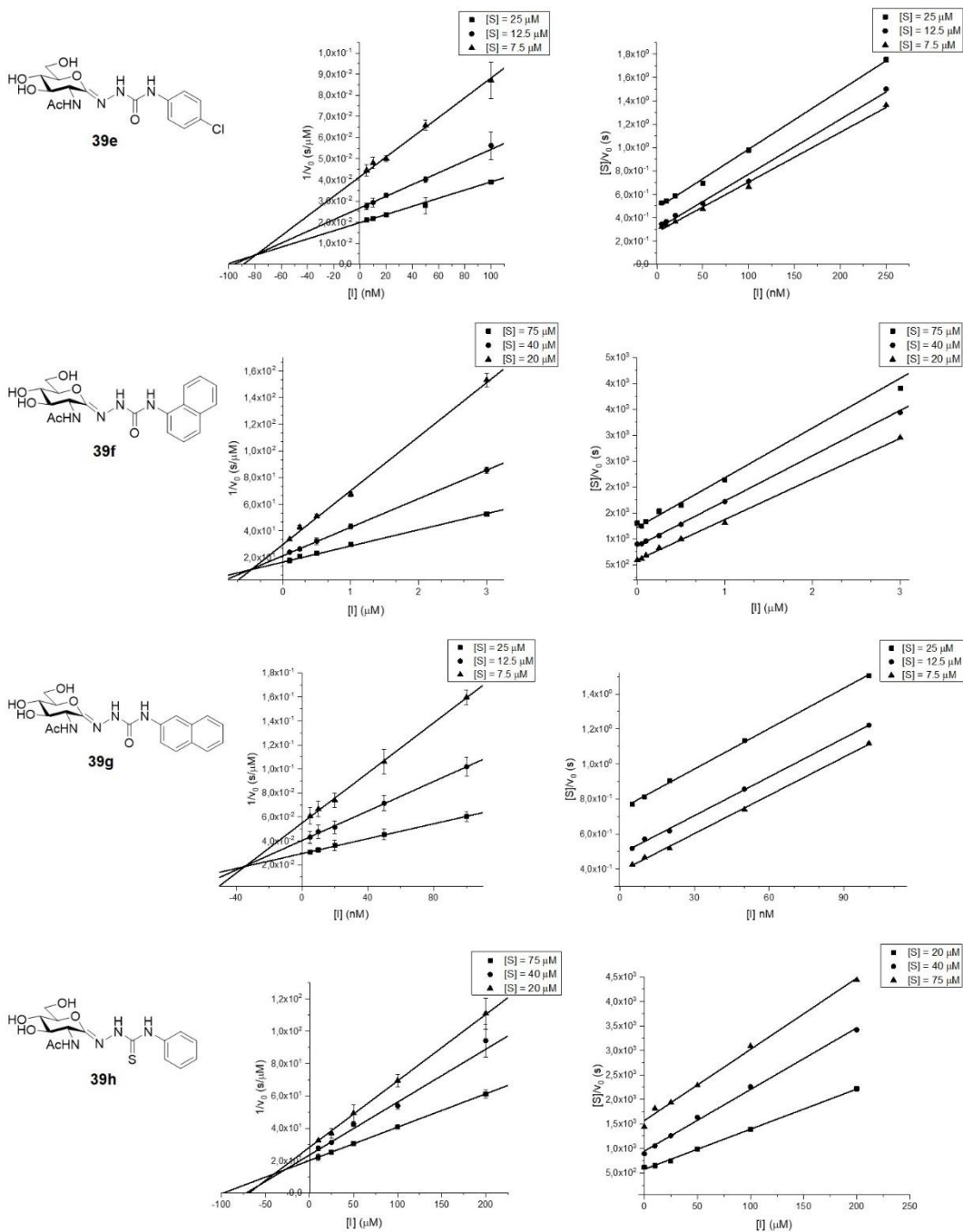
Michaelis-Menten curve of hHexB for pNP-GlcNAc substrate

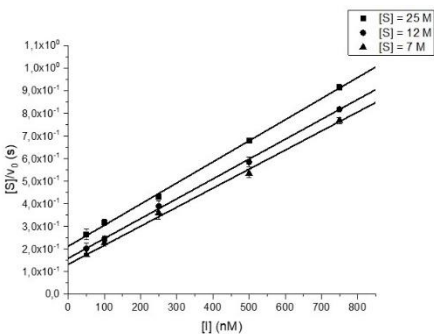
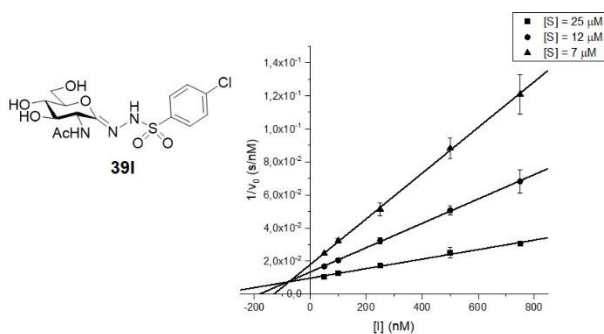
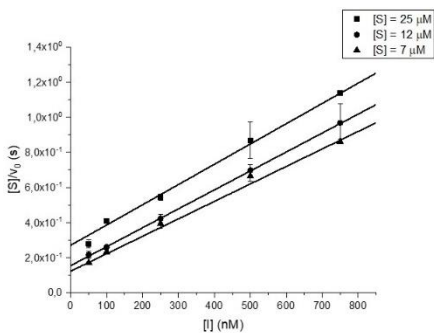
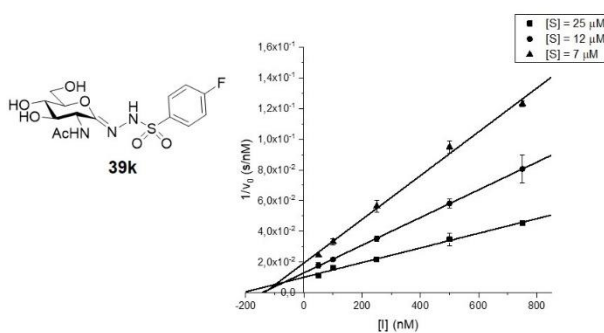
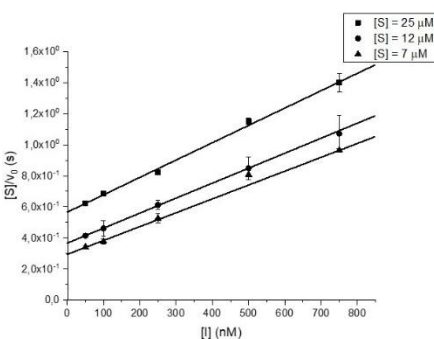
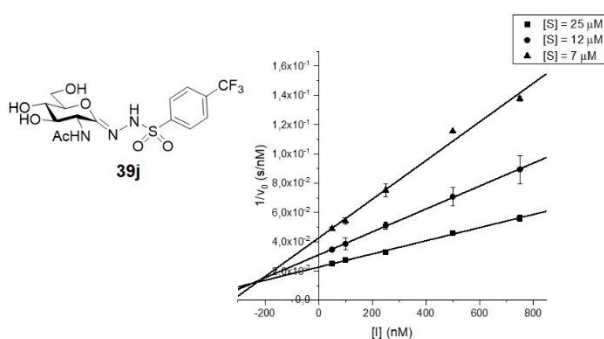
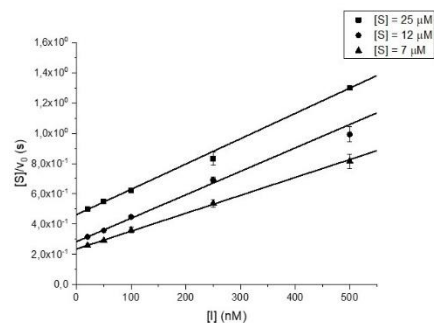
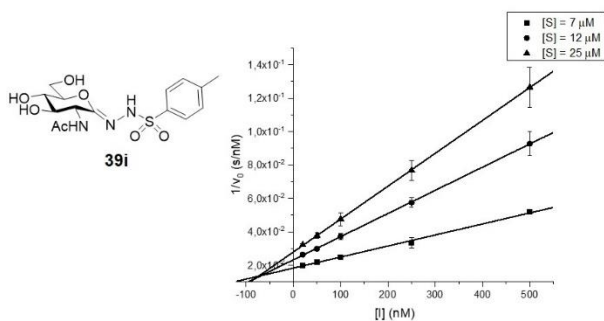


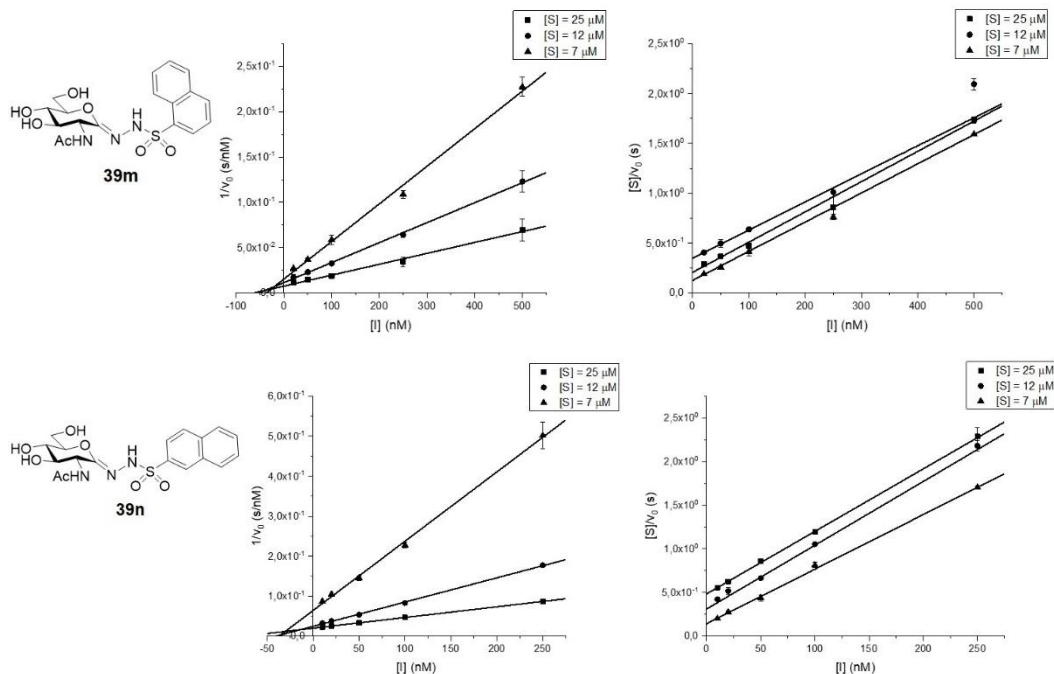
50 mM citrát-foszfát puffer (pH = 5,0) 35°C-on

8.2 A hOGA gátlási adatok Dixon és Cornish-Bowden diagramja

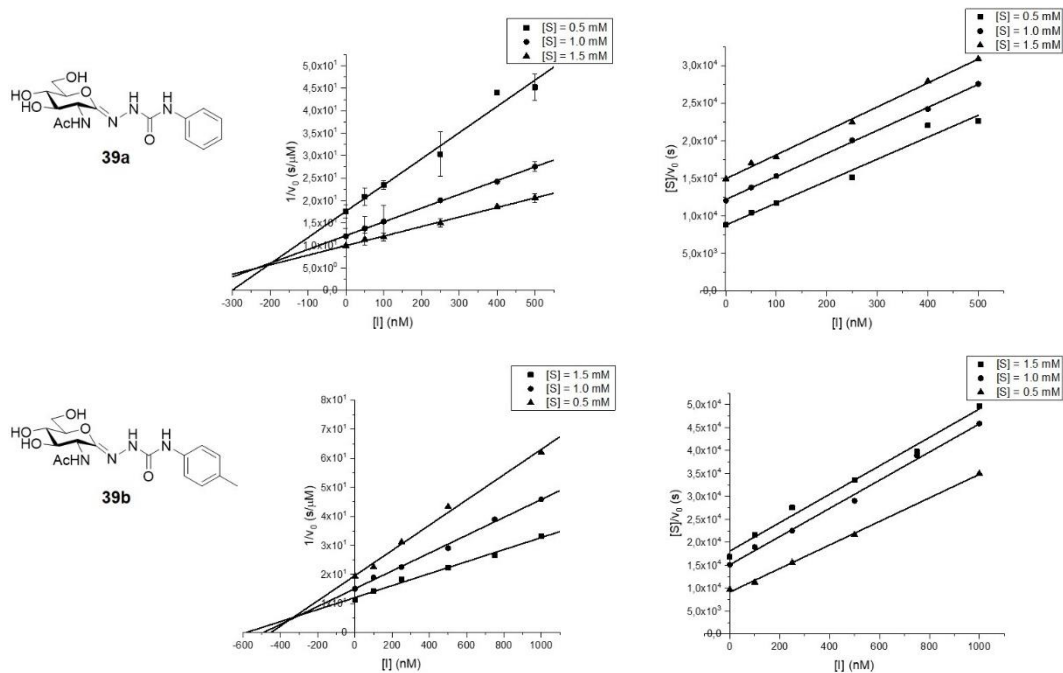


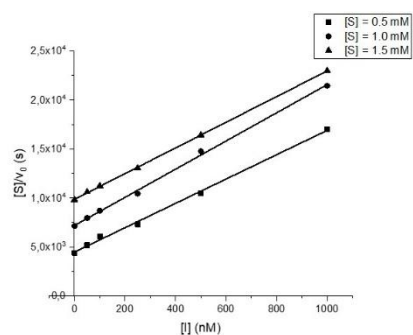
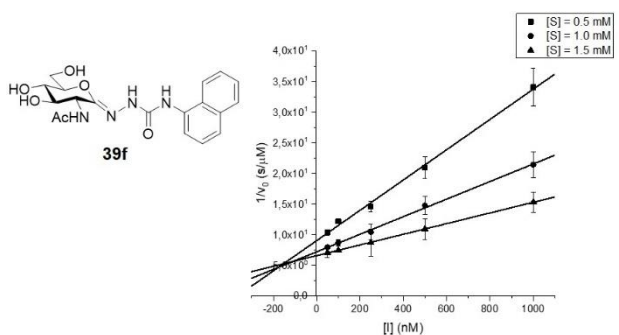
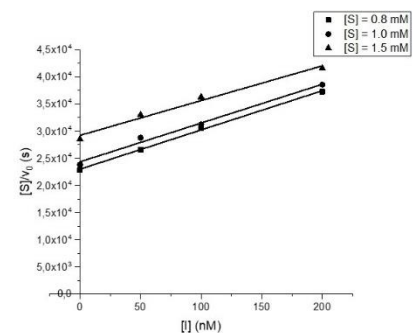
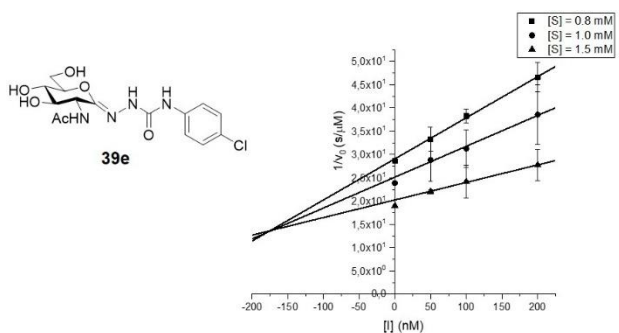
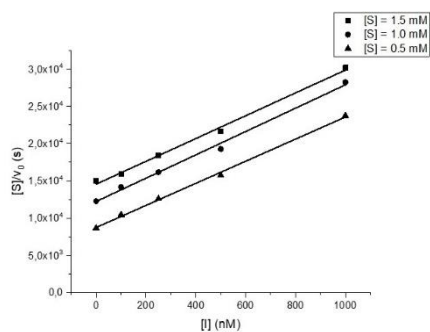
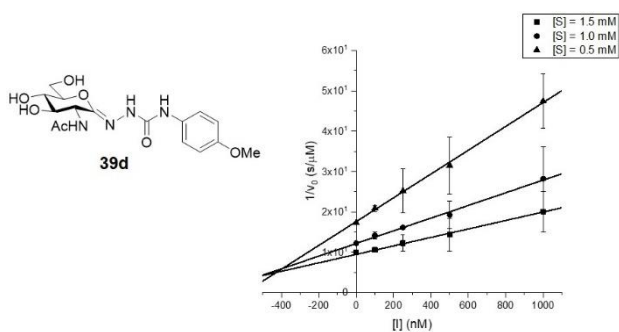
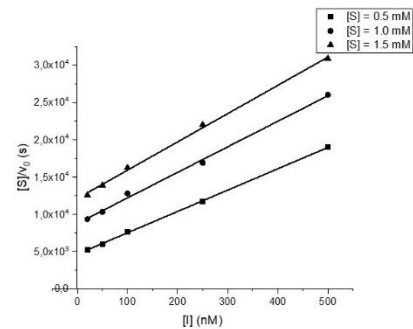
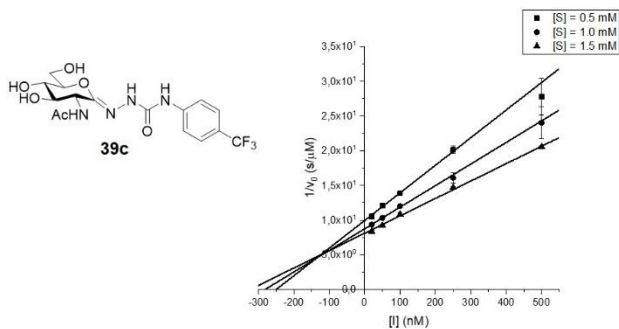


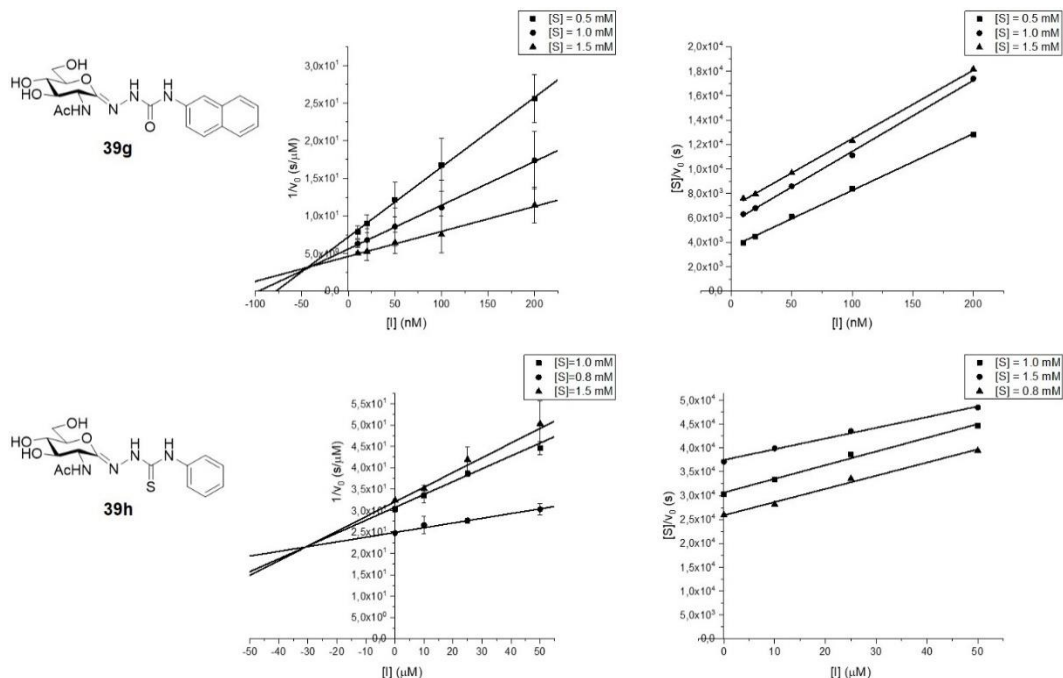




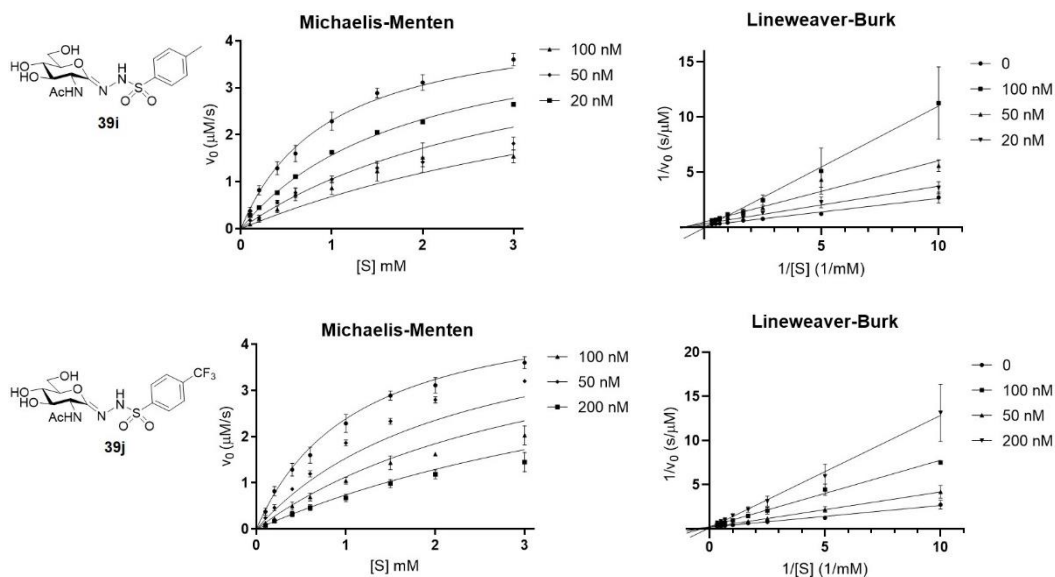
8.2 A HexA/HexB gátlási adatok Dixon és Cornish-Bowden diagramja

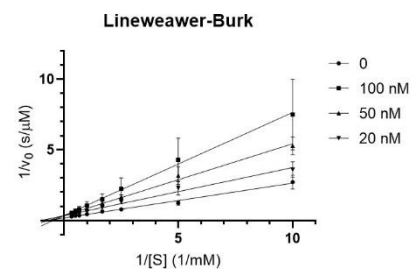
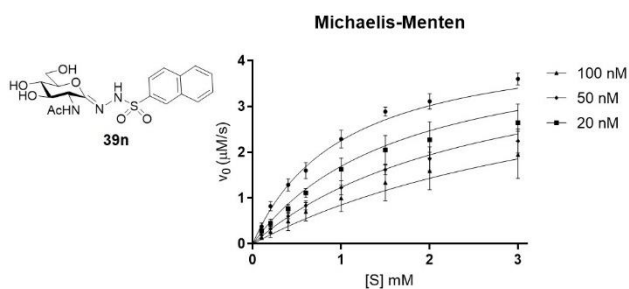
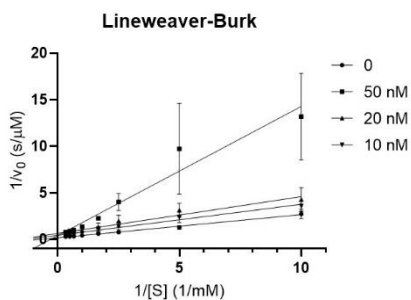
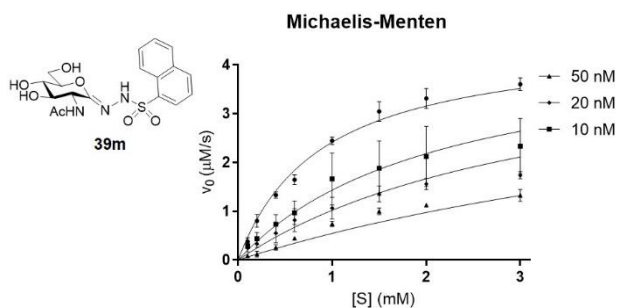
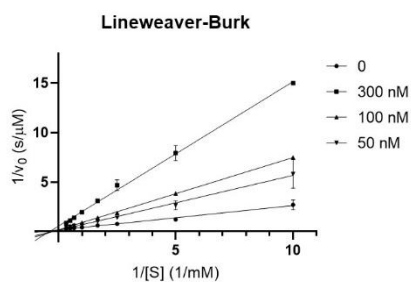
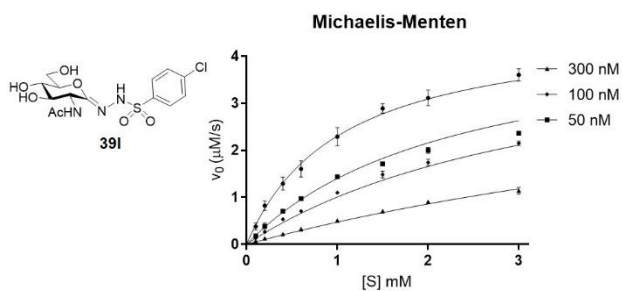
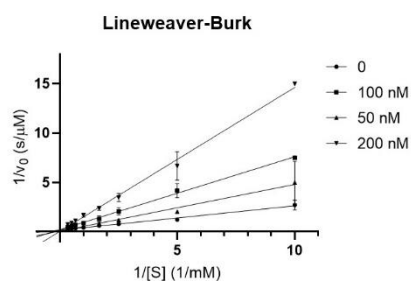
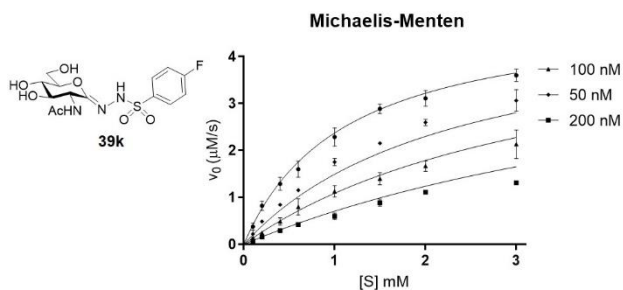






8.3 A hHexB gátlási adatok Michaelis-Menten kinetikai görbéi és Lineweaver-Burk diagramja





9. Publikációs lista

Az értekezés alapját képező közlemények

1. **Kiss, M.**; Szabó, E.; Bocska, B.; Sinh, L. T.; Fernandes, C. P.; Timári, I.; Hayes, J. M.; Somsák, L.; Barna, T., Nanomolar inhibition of human OGA by 2-acetamido-2-deoxy-D-glucono-1,5-lactone semicarbazone derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, 223, 113649. **IF: 6.514**
2. **Kiss, M.**; Timári, I.; Barna, T.; Mészáros, Z.; Slámová, K.; Bojarová, P.; Křen, V.; Hayes, J. M.; Somsák, L., 2-Acetamido-2-deoxy-D-glucono-1,5-lactone Sulfonylhydrazones: Synthesis and Evaluation as Inhibitors of Human OGA and HexB Enzymes. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, 23, 1037. **IF: 5.923**

Az értekezés témájához nem kapcsolódó közlemények

1. Csire, G.; Timári, S.; Asztalos, J.; Király, J. M.; **Kiss, M.**; Várnagy, K., Coordination, redox properties and SOD activity of Cu(II) complexes of multihistidine peptides. *J. Inorg. Biochem.* **2017**, 177, 198-210. **IF: 3.063**

Konferencia előadások az értekezés témájában

1. **Kiss M.** Potenciális OGA inhibitorok szintézise. XXXIX. Kémiai Előadói Napok, Szeged, 2016. október 17-19.
2. **Kiss, M.**; Barna, T.; Somsák, L. Inhibition of wild type human OGA enzyme by 2-acetamido-2-deoxy-D-glucono-1,5-lactone semicarbazones. MTA Szénhidrát, Nukleinsav és Antibiotikumkémiai Munkabizottsági ülés 2017. Mátraháza, 2017. május 31 - június 2.
3. **Kiss M.**; Barna T.; Somsák L. A humán OGA enzim inhibíciós vizsgálata a szerkezet-funkció kapcsolatának feltárására. II. Debreceni Röntgendiffrakciós Kerekasztal, Debrecen, 2018. január 18-19.
4. **Kiss, M.**; Barna, T.; Somsák, L. Potent inhibition of wild-type human OGA by aldonolactone hydrazone derivatives. Annual meeting of the Working

Committee for Carbohydrates, Nucleic Acids and Antibiotics, Mátrafüred, 2018. május 23-25.

5. **Kiss, M.**; Somsák, L.; Barna, T. Nanomolar inhibition of human OGA by 2-acetamido-2-deoxy-D-glucono-1,5-lactone hydrazone derivatives. 29th International Carbohydrate Symposium, Lisszabon (Portugália), 2018. július 14-19.

Az értekezés témájához nem kapcsolódó konferencia előadás

1. **Kiss M.** A szuperoxid-dizmutáz (SOD) enzimet modellező peptidek réz(II)- és nikkell(II)-komplexei. XXXI. Országos Tudományos Diákköri Konferencia, Kémiai és Vegyipari Szekció, Eger 2013. április 4-6.

Poszterek az értekezés témájában

1. **Kiss M.**; Barna T.; Somsák L. A humán OGA enzim inhibíciós vizsgálata 2-acetamido-2-dezoxi-D-glükono-1,5-lakton hidrazon származékokkal. I. Fiatal Kémikusok Fóruma Szimpózium, Debrecen, 2019. április 3-5.
2. **Kiss M.**; Barna T.; Somsák L. N-Acyl-glükózamin származékok szintézise és inhibíciós vizsgálata humán OGA enzimmel szemben. MKE Vegyészkonferencia 2019, Eger, 2019. június 24-26.
3. **Kiss, M.**; Barna, T.; Somsák, L. Synthesis of N-acyl-glucosaminyll derivatives for inhibition of human OGA. Eurocarb XX. Leiden (Hollandia), 2019. június 30 - július 4.

Nem az értekezés témájához kapcsolódó poszter

1. Várnagy, K.; Timári, S.; Serfőző, D.; Asztalos, J.; **Kiss, M.** Coordination ability of small multihistidine peptides. International Symposium on Metal Complexes, Lisszabon (Portugália), 2012. június 18-22.