

Doktori (PhD) értekezés tézisei

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

Kiss Mariann

Témavezetők: Dr. Somsák László, Dr. Barna Teréz



DEBRECENI EGYETEM

Kémiai Tudományok Doktori Iskola

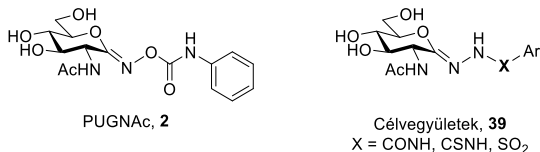
Debrecen, 2022.

1. Az értekezés előzményei és célkitűzései

A fehérjék egyik poszt-transzlációs módosítása során egyetlen *N*-acetyl-D-glükózamin kapcsolódik szerin vagy treonin hidroxil csoportjához β -glikozidos kötéssel. Ezt a módosítást egyetlen enzim pár katalizálja: az uridin difoszfó-*N*-acetylglükózamin:polipeptid *N*-acetyl- β -D-glükózaminil-transzferáz (OGT), amely felelős a monoszacharid egység fehérjéhez kapcsolásáért, míg a [protein]-3-*O*-(*N*-acetyl- β -D-glükózaminil)-L-szerin/treonin *N*-acetylglükózaminil hidroláz (OGA) a hasítást katalizálja. A központi idegrendszer egyes fehérjéinek aberráns hipo-*O*-(*N*-acetyl-glükózaminilezése) mutatható ki neurodegeneratív betegségekben, mint pl. Alzheimer kórban. Ezért előtérbe került az *O*-GlcNAc homeosztázis helyreállítása az OGA enzim gátlásával. A PUGNAc (2)* az egyik első inhibitora az OGA enzimnek ($K_i = 46$ nM), azonban hasonló erősséggel gátolja a lizoszómális hexóزامинидázokat (HexA és HexB), melyek terminális *N*-acetyl-glükózamint hasítanak különböző glikokonjugált szubsztrátok oligoszacharid egységéről. Szelektív OGA inhibitorok alkalmazásával lehetőség nyílt a fent említett neurodegeneratív betegségek terápiás kezelésére, így az OGA inhibitorainak vizsgálata és új inhibitorok fejlesztése jelentős figyelmet kap napjainkban. Ezen doktori munka során a PUGNAc-ot (2) választottuk vezérszerkezetnek új OGA inhibitorok tervezéséhez. Korábban vizsgálták a PUGNAc aromás gyűrűjének szubsztituáltságát, de méretének növelését nem, valamint megállapították, hogy 2-es helyzetben hosszabb *N*-acil láncok alkalmazása növeli szelektivitását hexóзаминидázokkal 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 az 1. 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. Ahhoz, hogy a szintetizált vegyületek inhibíciós tulajdonságait vizsgálni tudjuk, terveztük a hOGA enzim heterológ expressziójának kidolgozását *E. coli* expressziós rendszerben, valamint a rekombináns enzim biokémiai jellemzését. A vegyületek szelektivitásának

* A tézisfüzetben a doktori dolgozattal azonos vegyületszámokat alkalmazom.

vizsgálata érdekében az inhibíciós tulajdonságokat nemcsak OGA enzimmal szemben, hanem hexóزامинидázokkal szemben is vizsgálni szükséges.



1. ábra A PUGNAc (**2**) és a célvegyületek (**39**) szerkezete

2. Az alkalmazott vizsgálati módszerek

Kutatómunkánk során a modern szintetikus szerves kémia mikro-, félmikro- és makromódszereit alkalmaztuk. A reakciók előrehaladásának követésére vékonyréteg kromatográfiát (VRK) alkalmaztunk, a reakcióelegyek tisztítása oszlopkromatográfiával vagy kristályosítással történt. A szintetizált vegyületek tisztaságát VRK-val, valamint ¹H és ¹³C NMR spektrumaik alapján határoztuk meg. Az új vegyületek jellemzéséhez meghatároztuk fizikai állandóikat (olvadáspont, optikai forgatóképesség), szerkezetüket ¹H és ¹³C NMR spektrumaik alapján, valamint tömegspektrumuk alapján igazoltuk.

Molekuláris biológiai, mikrobiológiai módszerekkel állítottuk elő azokat a transzformáns *E. coli* törzseket, amelyek hordozták a teljes hosszúságú humán OGA izoenzim kódoló gént tartalmazó vektorkonstrukciót. Az intracellulárisan termelődő vad-típusú hOGA enzim expressziójára ható körülményeit optimalizáltuk kis - és nagyléptékű sejtenyészetekben. A sejteket ultrahangos és enzimikus kezeléssel tártuk fel, általunk kidolgozott lízis pufferben. Affinitás kromatográfiás eljárással izoláltuk az enzimet. Bioanalitikai módszerekkel követtük és határoztuk meg az enzim túltermelésének és a tisztítási lépések hatékonyságát: denaturáló közegű poliakrilamid gélelektroforézissel és kromofór csoportot tartalmazó szubsztráton alapuló enzim aktivitás esszével.

Steady-state kinetikai mérésekkel meghatároztuk a rekombináns hOGA, a borjú veséből származó HexA/HexB és a hHexB enzimek kinetikai paramétereit. A szintetizált inhibitorok gátlóképességét leíró inhibíciós állandóit (*K_i*) a hOGA és a borjú veséből származó HexA/HexB enzimekre Dixon módszerrel határoztuk meg. Hasonlóan, gátlási kinetikai mérésekkel állapítottuk meg az egyes inhibitorok hHexB enzimre adott inhibíciós állandóit.

3. Új tudományos eredmények

3.1 *Ötlépéses, jó összhozamú, egyszerű szintézismódszert dolgoztunk ki 2-acetamido-2-dezoxi-D-glükono-1,5-lakton hidrazon származékok, mint új OGA inhibitorok szintézisére*

A **39a** célvegyület megtalálható az irodalomban, ezért a szintézis ennek a publikált eljárásnak az adaptációján alapult (1. táblázat). A **33** irodalomból ismert vegyületet kereskedelmi, illetve irodalmi módszerekkel előállított 4-arilszemikarbazidokkal (**35a-h**), valamint arilszulfonil-hidrazidokkal (**35i-n**) reagáltattuk 10 mol% p-toluolszulfonsav jelenlétében kloroformban forralva.

A **35a-g** szemikarbazidokkal elvégzett reakciók esetében a várt **36a-g** vegyületek mellett a **37a-g** nyílt láncú tautomerek képződése 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 elválasztás nélkül továbbvittük a következő reakcióba. A **36** és **37** tautomer keverékek oxidációja CrO_3 -piridin komplex-szel jó hozammal eredményezte az **38a-g** lakton szemikarbazonokat, míg a **36h** tioszemikarbazid és a szulfonilhidrazinok (**36i-n**) esetében a MnO_2 bizonyult hatékonynak a kívánt **38h-n** vegyületek előállításában.

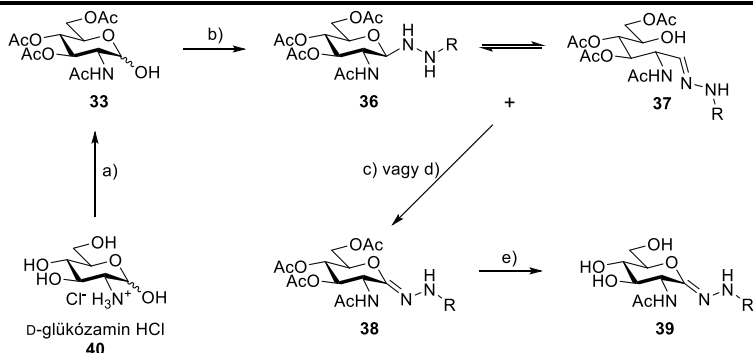
Az O-acetil védőcsoportok eltávolítását ammóniával telített metanolban végeztük, mely a megfelelő **39** lakton hidrazonokat eredményezte. Ezeknek az ötlépéses szintézis-szekvenciáknak az összhozama 15-55 % közé esik.

3.2 *E. coli Rosetta expressziós törzsre optimalizáltuk a teljes hosszúságú, rekombináns hOGA enzim termeltetését, módosítottuk az izolálási és tisztítási módszereket, és körülményeket dolgoztunk ki az enzim hosszú idejű tárolásának biztosítására*

3.2.1 *A hOGA termeltetésének optimalizálása E. coli expressziós törzsben*

A teljes hosszúságú hOGA izoenzimet kódoló gént inzertként tartalmazó pET28b vektorkonstrukciót D. J. Voadlo (Simon Fraser Egyetem, Burnaby, Kanada) bocsájtotta rendelkezésünkre. A vektorkonstrukcióval transzformált *E. coli* expressziós törzsek közül öt esetében, *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, vizsgáltuk a hOGA enzim expresszióját.

1. táblázat Célvegyületek szintézise

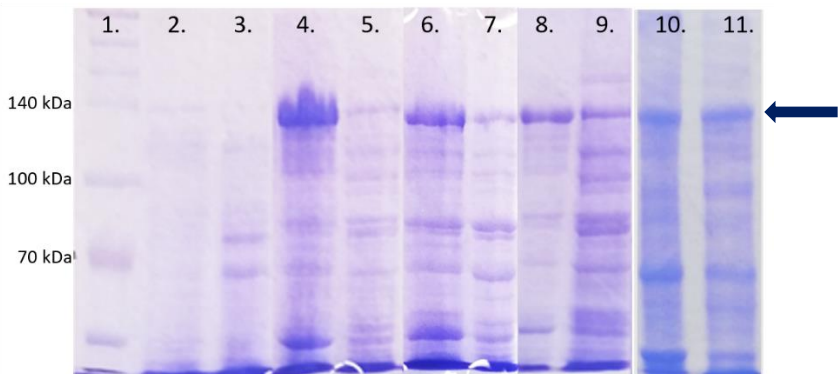


Reagensek és körülmények: a) 1. Ac₂O, absz. piridin, r.t.; 2. 4Å MS, vízmentes MeOH, r.t. (83 % két lépésre); b) NH₂NHR (35), 0.1 ekv. pTsOH·H₂O, CHCl₃, reflux; c) **a-g** esetében: CrO₃-piridin, vízmentes CH₂Cl₂, 0°C → r.t.; d) **h-n** esetében: MnO₂, vízmentes CH₂Cl₂, reflux; e) NH₃/MeOH, r.t.

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.

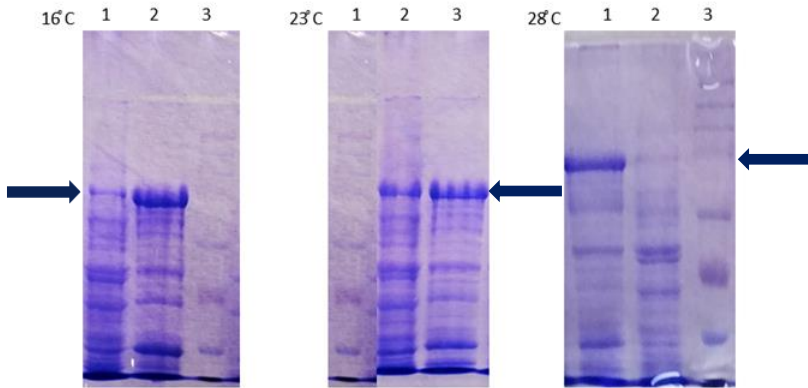
A kis léptékű expressziós kísérletekben nagy mennyiségű zárványtest aggregátumok képződése, a szolubilis fázisban pedig a különböző mértékben fellépő proteolitikus aktivitás csökkentette jelentősen az intakt, hosszú hOGA izoforma termelődését (2. ábra). Az utóbbi szempontból legrosszabbul teljesítő törzs a BL21(DE3) volt, ahol alig termelődik teljes hosszúságú rekombináns fehérje (2. ábra). A Star és a pLysS törzsek termelékenysége nagyon hasonló volt a tenyészetek hOGA enzimaktivitásai alapján, azonban a törzsek nagy proteolitikus aktivitása szerényebb mennyiségű, teljes méretű rekombináns hOGA enzim termelést eredményezett. Két törzs, a RIPL és a Rosetta fokozott rekombináns enzimtermelést mutatott, azonban a Rosetta törzs esetében kisebb zárványképződés és csökkent proteolitikus aktivitás következtében kedvezőbb túlermeltetése valósult meg a funkcionális és teljes hosszúságú hOGA enzimnek (2. ábra).



2. 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.

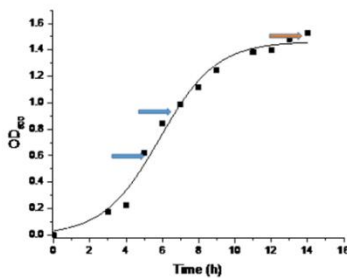
A tenyésztési paramétereket a Rosetta törzsre optimalizáltuk. A hőmérséklet nagy mértékben befolyásolta a tenyészetek rekombináns fehérje termelését, amely csak 30°C alatt adott kiértékelhető eredményt. A tenyésztési hőmérséklet további csökkentése csak 23°C-on kedvezett a teljes hosszúságú és

aktív enzim termelésének. Alacsonyabb hőmérsékleten (16°C) a humán enzim nem nyerte el natív szerkezetét.

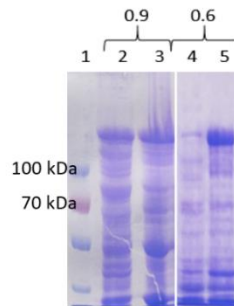


3. ábra Különböző hőmérsékleten növesztett *E. coli* Rosetta expressziós tenyészetekből nyert sejtlizátumok 8%-os SDS-PAGE analízise.

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)

4. ábra a) Az *E. coli* BL21(DE3) Rosetta tenyészet növekedési görbéje 23 °C-on. A kék nyilak az indukciós fázist jelzik (OD₆₀₀ = 0,6 és 0,9), a narancssárga nyíl pedig a tenyésztés leállítását. b) A sejtlizátumok 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.

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 ($OD_{600} = 0,6$ helyett 0,9), akkor 50%-kal magasabb hozamot érthetünk el anélkül, hogy tapasztaltunk volna jelentősebb proteolitikus bomlást vagy zárványtest-aggregátumok képződését (4. ábra).

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

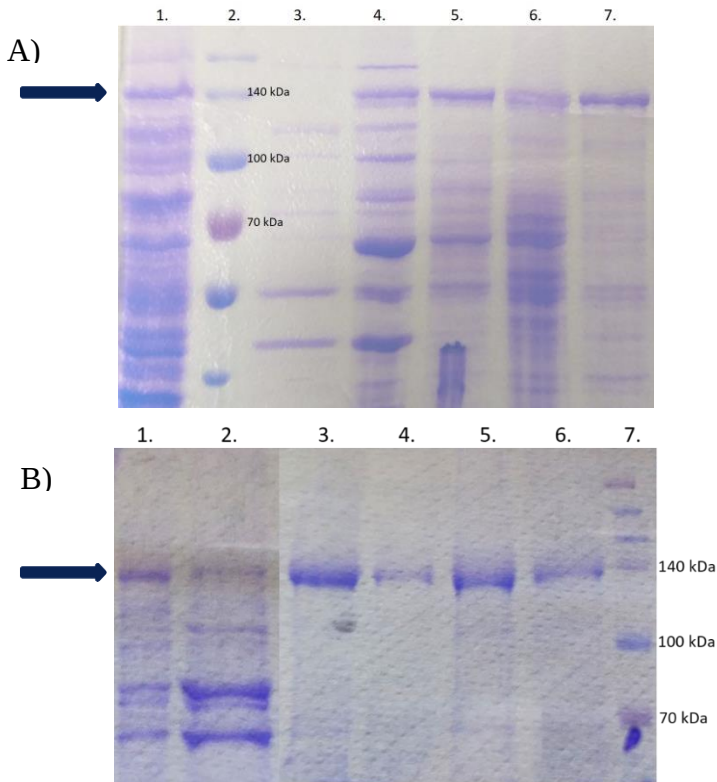
3.2.2 hOGA izolálási körülményeinek optimalizálása és a stabilizáló körülmények megtalálása

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 összeállítása és a szonikálás fizikai paraméterei. A megfelelő stabilitást jelentő puffer összetétele: 50 mM kálium-foszfát puffer, pH 7,5, amely tartalmaz: 1 mM 2-hidroxi-1-metántiolt, 0,5 % Tween 20-t, proteáz inhibitor koktélt (P8849, Sigma Aldrich, Magyarország).

3.2.3 A hOGA enzim tisztítása

Az N-terminális 6 hisztidint (His₆-tag) 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 Ni²⁺ ion a mi esetünkben jelentős enzimaktivitás csökkenést eredményezett. Ezért több fémionnal próbálkoztunk, mint Cu²⁺ és Co²⁺, 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 (5. 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 való hozzáadásával.



5. 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.

3.3 *Meghatároztuk a gátlási vizsgálatok során alkalmazott enzimek kinetikai paramétereit*

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. A hHexB-vel végzett kísérleteket lehetőségem volt Prágában elvégezni Prof. Vladimír Křen kutatócsoportjában.* A Michaelis-Menten kinetikai mérésekhez mindhárom enzim esetében *p*NP-GlcNAc szubsztrátot használtunk. A hOGA enzim kálium-foszfát pufferben (pH 7,5) meghatározott katalitikus állandója ($k_{\text{cat}} = 1,6 \text{ s}^{-1}$) jól korrelál a korábban, más körülmények között megállapított értékkel (2. táblázat). Ellenben, az enzim jóval nagyobb affinitással ($K_M = 20 \text{ }\mu\text{M}$) kötötte meg a *p*NP-GlcNAc szubsztrátot az általunk alkalmazott körülmények között.

A borjú veséből származó HexA/HexB enzim és a humán rekombináns HexB enzim *p*NP-GlcNAc szubsztrát jelenlétében meghatározott Michaelis-Menten állandója közel azonosnak adódott ($K_M = 1,1 \text{ mM}$) annak ellenére, hogy a kinetikai vizsgálatok a HexA/HexB dimer enzimmél kálium-foszfát pufferben (pH 5,8), a hHexB enzimmél citrát-foszfát (pH 5,0) pufferben folytak.

A szoros kötődésű inhibitorok kinetikai vizsgálata megkövetelte fluoreszcens szubsztrát alkalmazását, amelyhez a 4-MU-GlcNAc-t választottuk. A fluoreszcens módszer nagyobb érzékenysége miatt az enzimkoncentráció jelentősen csökkenthető. A fluorometriás kinetikai mérések, amelyeket kálium-foszfát pufferben (pH 7,5) és 4-MU-GlcNAc szubsztrát jelenlétében végeztünk el, a hOGA enzimre 12 μM -os K_M értéket adtak.

2. táblázat A hOGA enzim Michaelis-Menten kinetikai paramétereit *p*NP-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	0,5 M citrát/foszfát puffer, pH 6,5
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.

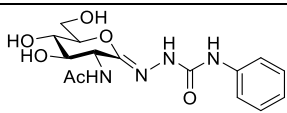
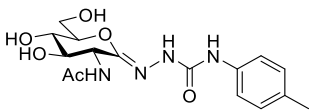
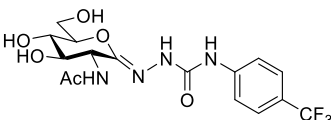
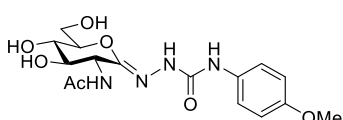
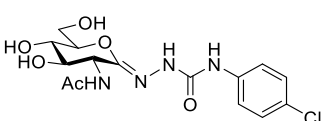
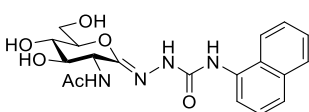
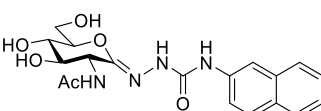
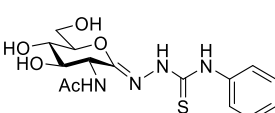
3.4 *Megvizsgáltuk az új inhibitorok enzimgátló hatását, megállapítottuk, hogy a vegyületek többsége a hOGA, a borjú vese HexA/HexB és a hHexB enzimeket kompetitíven gátolja a nanomólos tartományban*

Valamennyi szintetizált vegyület hOGA, HexA/HexB, és hHexB enzimekre kifejtett gátlási módja kompetitív. A **39a-h** lakton szemikarbazonok esetében pNP-GlcNAc szubsztrátot alkalmaztunk a hOGA enzimmel szembeni inhibíciós állandók meghatározásához, kivéve az erősen kötődő **39e** és **39g** származék esetén, ahol a szubsztrát a fluoreszcens 4-MU-GlcNAc volt, hasonlóan mint a **39i-n** lakton szulfonilhidrazon származékoknál.

A **39** vegyületek gátlási állandói hOGA enzimmel szemben az alacsony μM -os, illetve a nM -os tartományba esnek. A **39a-h** lakton szemikarbazonok gátlási állandóit a 3. 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. Érdemes 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.

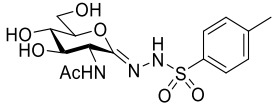
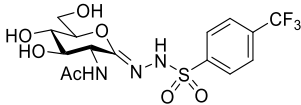
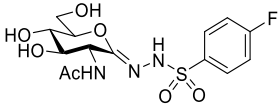
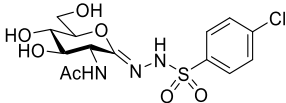
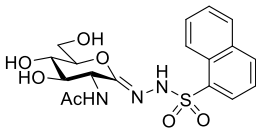
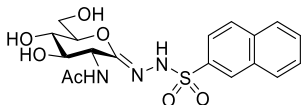
A **39i-n** lakton szulfonilhidrazonok hOGA enzimmel szemben jobb inhibitoroknak bizonyultak, mint a **39a-h** lakton szemikarbazonok (4. táblázat). A legerősebb inhibitorok a **39m** és **39n** naftil-származékok, míg a leggyengébbnek az **39j** bizonyult. Másrészt a hHexB enzimmel szemben egy kivétellel 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).

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

	Vegyület	hOGA	HexA/HexB
39a		0.190 ± 0.008	0.205 ± 0.014 (ir.: 0.130 ± 0.020)
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

4. táblázat A 2-acetamido-2-dezoxi-D-glükono-1,5-lakton szulfonilhidrazon származékok (**39i-n**) gátlási 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

4. Az eredmények alkalmazási lehetőségei

Az új inhibitorokra általunk kidolgozott ötlépéses szintézisút egyszerű, könnyen kivitelezhető reakciókörülményeket alkalmaz, legtöbb esetben ~ 40 %-os vagy nagyobb összhozammal eredményezve a célvegyületeket. Ez a szintézisút lehetővé teszi további változatosan szubsztituált hasonló szerkezetű vegyületek előállítását.

A szintetizált **39** célvegyületek hasonlóan jó inhibitorai az OGA enzimnek, mint a PUGNAc (**2**), bár jelentős szelektivitással ezek sem rendelkeznek hexóزامинидázokkal szemben. Az egyszerű szintézisút megteremti a lehetőséget a szelektivitást várhatóan fokozó módosítások kialakítására, amely vizsgálatok jelenleg is folynak a kutatócsoportunkban. Ha ezek eredménnyel járnak, azaz sikerül szelektív inhibitorokat előállítani, azok később szintetikus és biokémiai vezérszerkezetekként szolgálhatnak.

E. coli expressziós rendszer kidolgozásával megoldottuk a teljes hosszúságú, funkcionális rekombináns hOGA enzim termeltetését. Feltártuk azon stabilizáló körülményeket, amellyel a hOGA enzim félideje jelentősen növelhető volt. Ennek eredményeként reprodukálhatóak a kinetikai mérések és alkalmasak a szoros kötődésű inhibitorok gátlási módjának megállapítására is. Az optimalizált összetételű pufferben, a megnövekedett stabilitású hOGA enzim alkalmas lehet szerkezet vizsgálati célokra. Ezeket az eljárásokat várhatóan más kutatók is alkalmazni fogják, és ezzel egyszerűbbé válhat az enzim és további új inhibitorok vizsgálata, illetve ezek orvosi biológiai alkalmazása.



Nyilvántartási szám: DEENK/331/2022.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Kiss Mariann
Doktori Iskola: Kémiai Tudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10083958

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (2)

1. **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. 23 (3), 1-18, 2022. ISSN: 1661-6596.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23031037>
IF: 5.923 (2020)
2. **Kiss, M.**, Szabó, E., Bocskai, 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. 223, 1-14, 2021. ISSN: 0223-5234.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113649>
IF: 6.514 (2020)





További közlemények

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (1)

3. 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. 177, 198-210, 2017. ISSN: 0162-0134.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.08.033>

IF: 3.063

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 15,5

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
12,437**

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

Debrecen, 2022.06.09.



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 aldono-1,5-lactone 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 nikkel(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 enzimmal 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.