

ITC módszer alkalmazása a glikogén foszforiláz enzim vizsgálatára



Szabó Kármén

Vegyész MSc hallgató TDK dolgozata

Témavezető: Dr. Gyémánt Gyöngyi

Készült a Debreceni Egyetem Természettudományi és
Technológiai Kar, Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékén

Debrecen-2014

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	3
2. Irodalmi áttekintés	4
2.1. Glikogén foszforiláz enzim	4
2.2. Glikogén, mint a glikogén foszforiláz enzim természetes szubsztrátja	5
2.3. Glikogén lebontása a szervezetben	6
2.4. Glikogén foszforiláz b aktivitás mérési módszerei	7
2.5. Enzimkinetika	8
2.6. Izotermális Titrációs Kalorimetria (ITC)	11
3. Felhasznált anyagok és módszerek	14
3.1. Felhasznált anyagok	14
3.2. Eszközök és módszerek	16
4. Eredmények és értékelésük	18
4.1. Szubsztrát koncentráció függés vizsgálata	18
4.2. Aktiválás és gátlásvizsgálat	27
4.2.1. AMP aktiváló hatása	27
4.2.2. Gátlásvizsgálat	28
5. Összefoglalás	32
6. Hivatkozások	33

1. Bevezetés

Munkám során a glikogén foszforiláz enzimnek a kinetikai és gátlási vizsgálatával foglalkoztam, amely glikogénen ható enzim fontos szerepet tölt be a humán anyagcserében. A glikogén foszforiláz reverzibilis folyamatot katalizál. Fiziológiás körülmények között, az energiatároló vegyületeként funkcionáló glikogén lebontását végzi, miközben glükóz-1-foszfát (G-1-P) szabadul fel, de *in vitro* képes a fordított irányú reakció katalizálására is. G-1-P jelenlétében az $\alpha(1,4)$ glikozidos kötés kialakításával glükóz egységeket kapcsol megfelelő oligomer akceptorra miközben szervetlen foszfát is keletkezik. A glikogén foszforiláz enzim a cukorbetegség terápiájában potenciális célpontnak számít, ugyanis ezen enzim inhibíciója a kettes típusú cukorbetegség kezelésére alkalmazható módszer lehet. A Nemzetközi Diabétesz Szövetség (IDF) felmérése szerint 2012-ben a világ lakosságának körülbelül 8,4 %-át, vagyis mintegy 371 millió embert érintett ez a betegség, amely szám 2013-ra 382 millióra növekedett. Az IDF becslései szerint 2035-re megközelítőleg 55 % növekedésre számíthatunk, vagyis a betegséggel élők száma 592 millióra emelkedhet [1], emiatt az ismert gátlószerek pontosabb megismerése illetve a potenciális inhibitorok felkutatása nagy jelentőséggel bír, hiszen ezek a vizsgálatok lehetővé tehetik, új, hatékonyabb terápiák kidolgozását. Az enzim vizsgálatokban elterjedőben van egy új módszer, az izotermális titrációs kalorimetria (ITC) alkalmazása, amelynek a fő előnye, hogy lehetővé teszi az enzim természetes szubsztrátján történő közvetlen vizsgálatát. Munkám során a korábban humán nyál alfa-amilázon (HSA) beállított módszerek segítségével a glikogén foszforiláz b enzim kinetikáját, és néhány szintézissel előállított inhibitor gátlási tulajdonságát vizsgáltam. A korábban ITC-vel vizsgált enzim egy *endo* enzim (HSA) volt, melynél a kötés hasítása a szubsztrát cukoregységei között hidrolízissel, a szénhidrátláncon belül történik. Ezzel szemben a glikogén foszforiláz b egy *exo* enzim, vagyis működése során a szénhidrátlánc végéről hasít le egységeket. Az enzim működésének és kinetikájának vizsgálatát különböző hosszúságú természetes és mesterséges szubsztrátokon végeztem.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Glikogén foszforiláz enzim

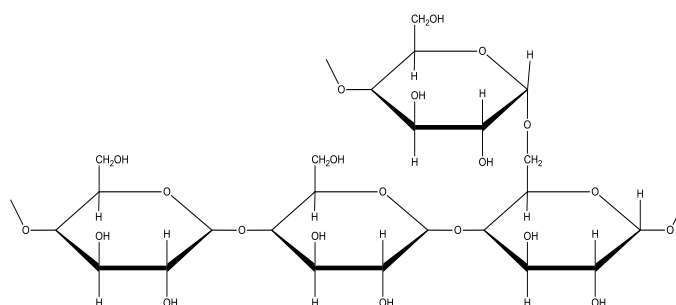
A glikogén foszforiláz enzim (EC 2.4.1.1) a glikogén lebontását katalizálja a sejtekben [1]. A glikogén foszforiláz, 842 aminosavból álló fehérje, ami inaktív monomer és tetramer [2] formában is előfordul, az élő szervezetekben azonban két azonos alegységből felépülő dimerként van jelen [3]. A dimer enzim egy alegységének molekulatömege 97 kDa. A dimer foszforiláz esetében megfigyelhető, hogy egy alegység két nagyobb doménre osztható fel, amelyeknek a találkozásánál található az aktív centrum. A glikogén foszforiláz enzim számos biológiai szempontból jelentős kötőhelyet tartalmaz, mint a katalitikus helyek, glikogén kötőhelyek, regulátor helyek és a szerin oldallánc, mely reverzibilisen foszforilálható. Minden alegység tartalmaz egy pridoxál-5'-foszfát prosztetikus csoportot [4]. A glikogén foszforiláz enzim szabályozása történhet allosztérikusan vagy kovalens módosítással. A kovalens módosítás, vagyis a foszforiláció, hormonhatásra (pl. epinefrin, inzulin) megy végbe a két alegységből álló inaktív glikogén foszforiláz b (GPb) enzim egy-egy Ser-OH csoportján, a foszforiláz b kináz enzim hatására, így alakul ki a biológiailag aktív glikogén foszforiláz a (GPa). A GPb kialakulása a GPa defoszforilációján keresztül megy végbe, melyet a foszforiláz-a-foszfataz enzim katalizál. A GPa hatására keletkező G-1-P az izomban foszfoglukomutáz enzim segítségével glükóz-6-foszfáttá (G-6-P) alakul, majd a glikolízisbe kerül, amelynek eredményeként fokozódik az ATP-termelés, ami biztosítja az aktív izommunka energiaigényét. A kovalens modifikációval történő szabályozás néhány másodperc alatt megy végbe, hormonok (vázizomban elsősorban adrenalin) hatására. A májban a G-6-P egy foszfataz enzim hatására glükózzá alakul és a keringésbe kerül.

A szabályozásnak másik típusa a foszforiláció mellett az allosztérikus szabályozás [5], az enzim allosztérikusan is aktiválható adenzin-monofoszfát (AMP) által. A GPb rendelkezik AMP-kötőhellyel, amelynek jelentősége az, hogy a csekélyebb aktivitással rendelkező enzim AMP hatására a másodperc töredéke alatt aktívvá válik [6]. Az allosztérikus szabályozás gyorsabb, mint a kovalens módosítással történő reguláció. Intenzív izommunka esetén fokozódik az ATP (adenozin-trifoszfát) bontása, melynek hatására az AMP koncentráció növekedni kezd. Az AMP aktiválja a GFb-t, és így fokozza a glikolízissel történő ATP

termelést. Mivel az ATP gátolja az AMP kötődését az allosztérikus kötőhelyre, ezért a magas ATP koncentráció esetén az AMP nem aktiválja az enzimet. Ezekből levonhatjuk azt a konklúziót, hogy ez a szabályozás nagymértékben függ az AMP/ATP aránytól [7].

2.2. Glikogén, mint a glikogén foszforiláz enzim természetes szubsztátja

Az enzim felépítésének, működésének és jelentőségének ismertetéséhez szükséges néhány szót ejteni magáról a glikogénről. A glikogén olyan poliszacharid, mely a szervezet számára az egyik legjelentősebb módja a táplálék útján felvett glükóz tárolásának, amelyből ha szükséges nagy mennyiségű energia szabadítható fel. Az emberi szervezetben a legtöbb glikogén az izomban található (~500 g) kisebb mennyiség a májban (~100 g). A glikogén koncentráció ugyanakkor a májban nagyobb, a glikogén 10%-a a máj tömegének, a vázizmokban kisebb a koncentráció (1%). Emellett az agy bizonyos sejtjei is képesek kismértékű glikogén raktározásra [8]. A glikogén szerkezetét tekintve hasonlóságot mutat a növényekben megtalálható amilopektinnel a keményítő egyik alkotórészeivel. A keményítőt kétféle polimer alkotja: az amilóz és az amilopektin. Az amilózt több száz vagy több ezer α -D-glükóz egység építi fel, melyek $\alpha(1-4)$ glikozidos kötéssel kapcsolódnak, helikális szerkezetet kialakítva. Az amilopektin szerkezete annyiban tér el az amilóztól, hogy a láncot képező minden 24-30 glükóz egységnél egy-egy elágazás jön létre. Az elágazásokra $\alpha(1-6)$ glikozidos kötés jellemző. A glikogén struktúrája (1. ábra) nagyon hasonló az amilopektin szerkezetéhez, de még több elágazást tartalmaz, ezek minden 8-12 glükóz egységnél előfordulnak [9].



1. ábra: Glikogén poliszacharid szerkezetének egy részlete

A glikogénben az elágazások miatt újabb láncok alakulnak ki, melyeken ugyanolyan (8-12 egységenként) gyakorisággal fejlődnek ki további elágazások, létrehozva ezzel egy faágra

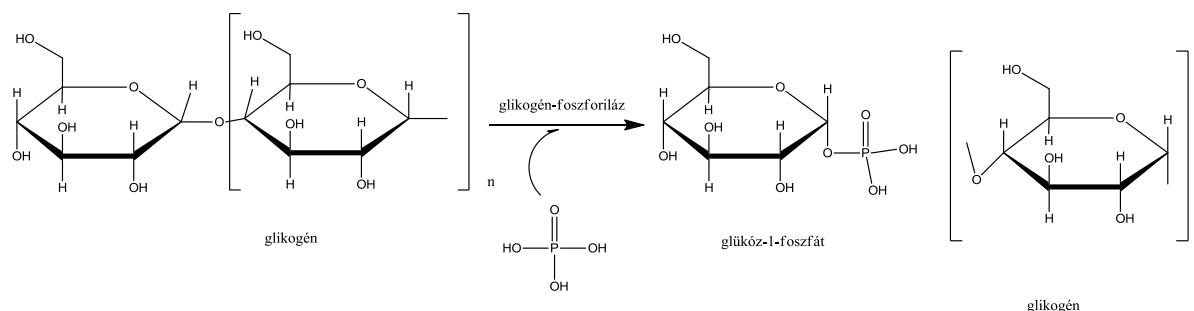
emlékeztető szerkezetet. A glikogén egyetlen molekulája akár 120000 glükóz monomer egységet is tartalmazhat. A glükózból történő glikogénképzést glikogenezisnek, míg az azzal ellentétes folyamatot, tehát a glikogén lebontását glükózzá, glikogenolízisnek nevezzük [8]. A glikogén szerkezetére továbbá jellemző, hogy egyetlen olyan vége van, ahol a glikozidos OH szabad (redukáló vég, amely egy fehérjéhez kapcsolódik), és számos úgynevezett nem-redukáló véggel rendelkezik, ahol a láncvégi glükóz glikozidos OH csoportja a glikozidos kötésben vesz részt.

2.3. Glikogén lebontása a szervezetben

A tartalék szénhidrátok, mint a glikogén vagy a keményítő, lebontása a sejtekben foszforolízis útján valósul meg, melyet a foszforiláz enzim katalizál. A glikogén lebontása az emberi és állati szervezetek számára igen nagy jelentőséggel bír, ugyanis fokozott izommunka esetén vagy stressz hatására nagyobb mennyiségű glükóz felhasználása válhat szükségessé. Mivel a monoszacharidok csak igen kis koncentrációban lehetnek jelen a szövetekben, ezért a szervezet poliszacharidok formájában tárolja a táplálék útján felvett glükóz egy részét. Amennyiben pedig szükség van rá, a glikogén visszaalakításával nagy mennyiségű energiát tud gyorsan felszabadítani. A raktározott polimer szénhidrát mozgósítása a glükóz polimer terminális, nem redukáló végén lévő $\alpha(1-4)$ glikozidos kötés foszforolitikus hasítása révén megy végbe.

Ennek eredményeként egy egységgel rövidebb $(\text{glükóz})_{n-1}$ és G-1-P keletkezik, a reakcióhoz anorganikus foszfátra van szükség (2. ábra). A foszforolízis folyamatát a Cori-házaspár vizsgálta behatóbban, és ők voltak azok, akik kimutatták, hogy a glikogén foszforolízisének elsődleges terméke a G-1-P [11].

A folyamat, tehát a glükózegységek foszforolitikus hasítása, mindaddig folytatódik, amíg az enzim a láncban az elágazást jelentő $\alpha(1-6)$ kötések megelőző negyedik glükóz egységig nem ér. Ennek oka, hogy a glikogén foszforilázban a szubsztrát kötődése a katalitikus helytől távolabb található glikogén kötőhelyre történik. Az elágazásokat két másik enzim, az úgynevezett oligo- $(\alpha \rightarrow 6)$ - $(\alpha \rightarrow 4)$ -glukán transzferáz (elágazást hasító enzim) és egy alfa-glikozidáz szünteti meg [8].



2. ábra: Glikogén lebontásának sematikus ábrája glikogén foszforiláz enzim hatására

A folyamat során keletkezett G-1-P G-6-P formába alakul át, melyet a foszfoglukomutáz enzim katalizál. A képződött G-6-P a glikolízisben továbbalakul az izomban, illetve a glükóz-6-foszfát hatására a májban glükózzá alakul, majd a keringésbe jut. A glikogén foszforiláz létezhet mind foszforilált (GP_a), mind pedig foszforilálatlan (GP_b) formában. A GP_b önmagában inaktív, viszont aktivátorok hatására (pl. AMP, IMP) már enzimatis aktivitást mutat. A GP_a, mely mindkét alegységén foszforilálva van, már önmagában is aktív. Az enzim nyugalmi állapotban javarészt a kevésbé aktív GP_b.

2.4. Glikogén foszforiláz b aktivitás mérési módszerei

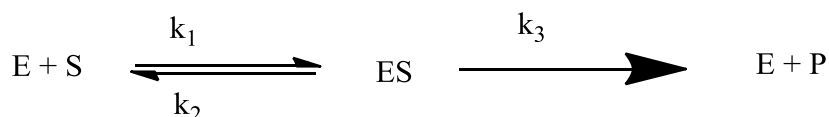
A glikogén foszforiláz aktivitás mérésére sok ismert módszer létezik. A lebontási reakcióban glikogén és foszfát szubsztátokat használnak 2 segédenzimes rendszerben. A felszabaduló NADPH-t spektrofotometriás módszerrel meghatározzák meg [11]. Ezzel két probléma van: a glikogén nem jól definiált szubsztát, valamint a két segédenzim jelenléte miatt (foszfoglukomutáz és G-6-P-dehidrogenáz), amelyekre az inhibitorok szintén gyakorolhatnak gátló hatást, gátlások vizsgálatára ez a rendszer kevésbé alkalmas. Használnak még differenciál spektropolarimetriát [12] és folyadékkromatográfiát amperometriás detektálással [13]. Ezeknek hátránya, hogy speciális készülékeket igényelnek, amelyek nem mindenhol érhetőek el. A többi módszer a szintézis irányában vizsgálja az enzimet, ami nem egyezik meg a fiziológiai reakcióval. A leggyakrabban alkalmazott módszer a glikogén szintézis során felszabaduló foszfát színreakcióval történő meghatározásán alapul [14].

Ez a színreakció nagyon érzékeny, de sok paraméter befolyásolja a színintenzitást, ami a pontosságot rontja. A radioaktív mérések, amivel szintén a szintézist lehet követni, speciális berendezéseket igényelnek. 2009-ben írtak le egy olyan aktivitásmérést, amiben

piridinaminálással előállított kromoforos szubsztrátok G-1-P jelenlétében történő lánchosszabbításának folyadékkromatográfiás nyomon követése vált lehetővé [15].

2.5. Enzimkinetika

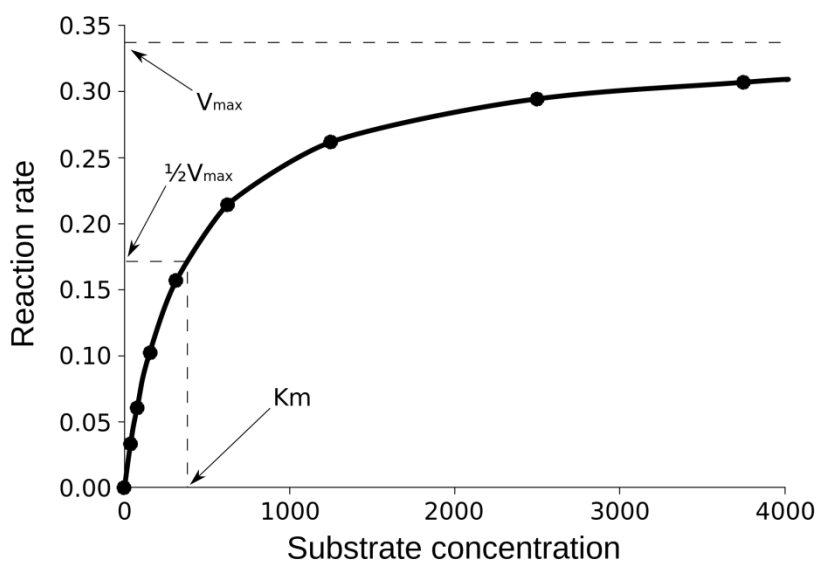
Az enzimeket biokatalizátor néven is szokták emlegetni. A „katalizátor” arra utal, hogy az enzimek képesek meggyorsítani egy reakciót az aktiválási energia csökkentése révén, azáltal, hogy új reakcióutakat nyitnak meg, míg a „bio” előtag azt jelzi, hogy ezek a reakciók az élő szervezetben játszódnak le és a katalizátorok biomolekulák, fehérjék. Az enzimek által katalizált legegyszerűbb reakció modellje (3. ábra) Leonor Michaelistól és Maud Mententől származik [16]. A modell értelmében a katalízis során létrejön egy specifikus enzim-szubsztrát komplex (ES), mely a szabad enzimből (E) és szabad szubsztrátból (S) jön létre k_1 sebességi állandóval. Az ES komplex kialakulása reverzibilis folyamat, ami azt jelenti, hogy a komplex széteshet szabad enzimre illetve szubsztrátra k_2 sebességi állandóval. Amennyiben azonban a kialakult enzim-szubsztrát komplex nem disszociál, átalakul k_3 sebességi állandóval enzimre és termékre (produktumra), amely folyamat már egyirányúnak tekinthető. A fentebb leírt reakció egyszerűsített egyenlete [15]:



3. ábra: A Michaelis-Menten kinetikai modell

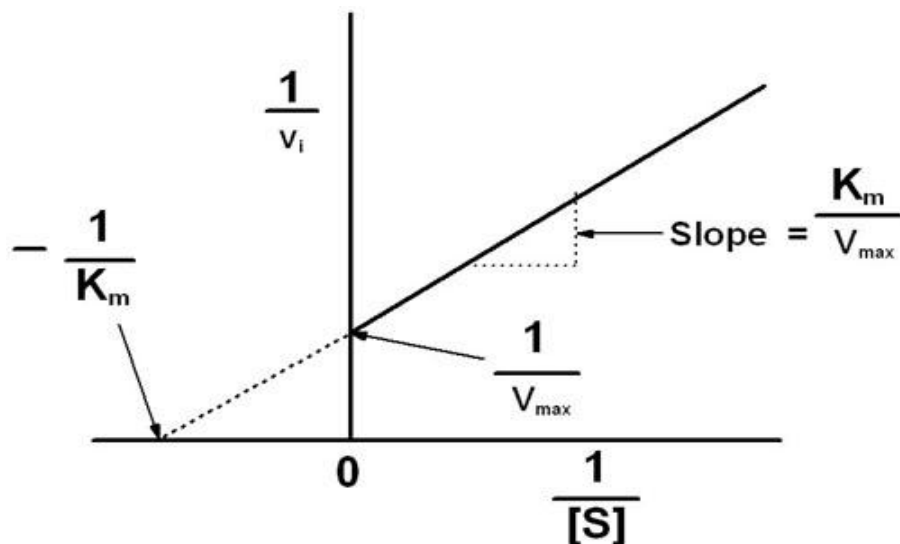
Mint minden modellnek, a Michaelis–Menten modellnek is vannak feltételei illetve korlátai. A legfontosabb feltételek egyike, hogy a szubsztrát koncentrációjának az enzim koncentrációjánál nagyságrendekkel nagyobbnak kell lennie, illetve, hogy az alatt az időtartam alatt, ameddig a vizsgálatokat folytatjuk, csak elhanyagolható mennyiségű szubsztrát alakuljon át a kezdeti szubsztrátkoncentrációhoz képest. A modell alkalmazásának korlátai közé tartozik többek között az a tény, hogy a modell és annak felhasználásával levezetett egyenlet a legegyszerűbb enzimreakciókra vonatkozik, vagyis egyetlen szubsztrátot feltételez. Valójában csak nagyon kevés olyan enzim van, amely csupán egyetlen szubsztrát átalakulását katalizálja, az esetek többségében legalább két szubsztrát vesz részt a reakcióban. Az enzimműködésre jellemző paraméterek megállapítása érdekében úgy lehet eljárni, hogy az

állandó enzimkoncentráció alkalmazása mellett változtatjuk a szubsztrátkoncentrációt, és mérjük a reakció sebességét (időegység alatt a szubsztrát fogyását vagy a termék keletkezését). Ha ábrázoljuk az enzimreakció sebességét a szubsztrátkoncentráció függvényében, akkor egy hiperbolát kapunk (4.ábra). Azaz kezdetben, a kis szubsztrátkoncentrációk esetén, a koncentráció növelésével arányosan növekszik a reakciósebesség is, majd a növekedés mértéke fokozatosan csökken, végül pedig a nagy szubsztrátkoncentrációknál -az enzim telítése esetén- a sebesség a V_{max} határértéket közelíti. [16]



4. ábra: K_M meghatározása a különböző szubsztrát koncentráció mellett mért reakciósebességek alapján [27]

A Michaelis-Menten összefüggés linearizálását több módon elvégezték. Ezek közül a Lineweaver-Burk linearizációt (5. ábra) ma is alkalmazzák, elsősorban a gátlás típusának egyszerű eldöntésére, és a másodlagos ábrázolásokból a gátlási állandók számításához.

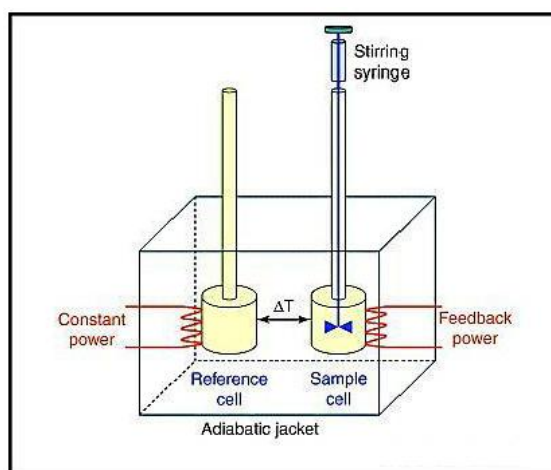


5. ábra: Lineweaver-Burk ábrázolás [27]

Ha az enzimreakció sebességét megmérjük több különböző inhibitor és szubsztrát koncentráció esetén is, akkor a gátlószer többféle koncentrációjának megfelelően a Lineweaver-Burk ábrázolásnál több egyenest kapunk. Amennyiben ábrázoljuk az előbb említett egyenesek meredekségeit a hozzájuk tartozó inhibitor koncentráció függvényében, akkor egy új görbét kapunk, amelynek a meredekségéből kiszámítható a gátlási állandó (K_i). [17] A K_i mellett a másik fontos érték, mely az inhibitorok jellemzésére alkalmazható, az IC_{50} , amely azt az inhibitor koncentrációt jelenti, ami ahhoz szükséges, hogy az enzimreakció sebessége felére csökkenjen. Az IC_{50} meghatározásának lényege azonos a K_i esetén leírtakéval, annyi különbséggel, hogy az IC_{50} meghatározásához egyetlen szubsztrát koncentráció mellett változtatjuk a gátlószer koncentrációját és számítjuk az 50 % reakciósebesség eléréséhez szükséges inhibitor koncentrációt. [18]

2.6. Izotermális Titrációs Kalorimetria (ITC)

Minden kémiai reakciót vagy fizikai változást hő- vagy entalpiaváltozás kísér. Az így leadott vagy felvett hő mennyisége közvetlen kapcsolatban áll a reakció sebességével és a reakcióra jellemző entalpiaváltozással. A kaloriméter emiatt kiválóan használható a reakció követésére olyan esetekben is, ahol például optikai elnyelés hiányában nincs lehetőségünk a folyamat fotometriás vizsgálatára. A titrálásos kalorimetria módszere az egyensúlyi állandó és entalpiaváltozás meghatározására már 1966 óta fellelhető az irodalomban [19]. A módszert eredetileg gyenge sav-bázis egyensúlyok, fém-komplexek képződésének vizsgálatára alkalmazták. Az első biológiai rendszerrel végzett kötődési vizsgálatot Beaudett és Langerrman publikálta 1978-ban [20]. Az ITC technikát ma már rutinszerűen alkalmazzák biokémiai kötődések termodinamikai vizsgálatára, hiszen a mai modern készülékek képesek $0,4 \mu\text{J}$ energia mérésére is, amivel 10^8 - 10^9 mol^{-1} kötési állandók is meghatározhatóak. Az ITC módszert enzimkinetikai mérésekre az utóbbi években kezdték el alkalmazni, köszönhetően annak, hogy a modern ITC készülékek alkalmasak akár $0,1 \mu\text{cal/s}$ nagyságrendű hőmennyiség változás mérésére. Ez lehetővé teszi a 10^{-12} mol/s tartományba eső reakciósebességek és 10^{-2} - $10^{-3} \mu\text{M}$ K_M értékek meghatározását is. [21]

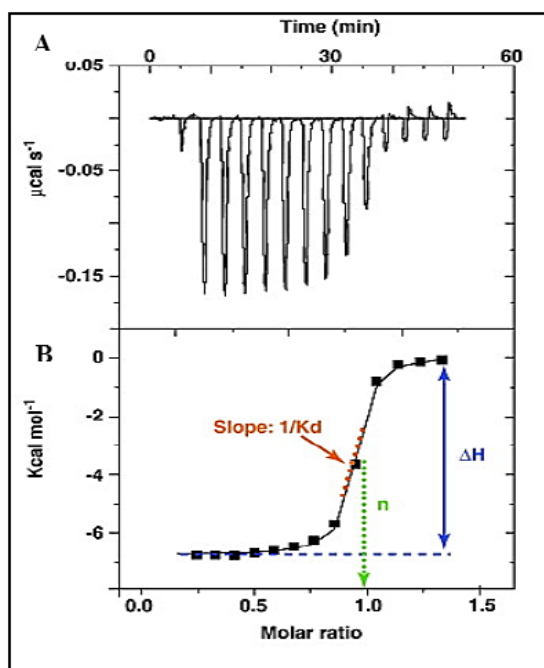


6. ábra: ITC készülék felépítése [22]

Az ITC készülék (6. ábra) két cellával illetve egy injektorral van ellátva. A két cella közül az egyik egy referenciacella, mely többnyire vizet vagy puffert tartalmaz, míg a mérőcellában

található az a reakcióelegy, amelyben a ligandumnak az injektorból történő hozzáadását követően, hőváltozás következik be. A kötődési vizsgálatok során a mérőcellában általában makromolekulák, míg az injektorban kismolekulák találhatóak [23]. Ezzel szemben az enzimkinetikai mérések során a makromolekula (enzim) az injektorban, míg a szubsztrát – illetve inhibíciós vizsgálatok során a szubsztrát és az inhibítor – a mérőcellában található.

Az izoterm titrációs kaloriméter működésének az alapja, hogy a két cellát azonos hőmérsékletre termosztáljuk, és a mérés ideje alatt ezt az állandó hőmérsékletet kell tartani. Az injektálást követően a mérőcellában végbemegy a reakció, (tehát a szubsztrát terméké alakul), aminek eredményeképp a mérőcellában megnő (exoterm reakció esetén), vagy lecsökken (endoterm reakció esetén) a hőmérséklet a referenciacella hőmérsékletéhez képest. Az ITC módszernél azt a befektetett energiamennyiséget mérjük, ami ahhoz szükséges, hogy ezt a hőváltozást kompenzálni tudja, vagyis aminek a segítségével az izoterm körülmény fenntartható. [24]



7. ábra: Termodinamikai paraméterek meghatározása az ITC módszer segítségével [22]

A mérés során kapott nyers adat a hőváltozást adja meg a reakcióidő függvényében (dQ/dt). Ha a csúcs alatti területeket integráljuk, és a kapott pontokra görbét illesztünk, egy szigmoid görbét kapunk (7. ábra). Ennek segítségével a következő paraméterek meghatározására van lehetőség: entalpiaváltozás, a reakció sztöchiometriája és a kötési állandó, amelyekből az entrópiaváltozás illetve a Gibbs-féle szabadenergiaváltozás is kiszámítható a

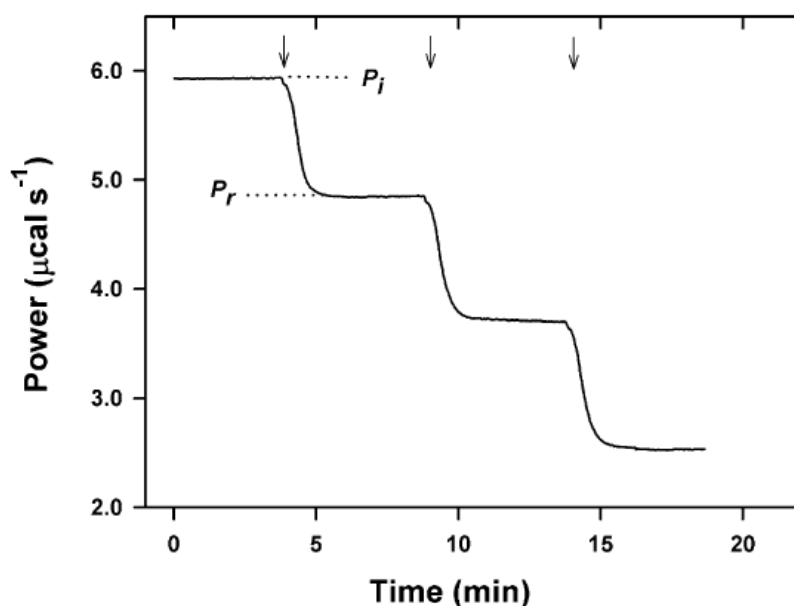
$$\Delta G = -RT \ln K_a = \Delta H - T\Delta S \quad (1)$$

összefüggés alapján.

Ha az enzim koncentrációja kellően alacsony, steady-state állapot alakul ki. Ebben az esetben a cellabeli hőváltozás (Q_r) idő szerinti deriváltja egyenesen arányos az enzimreakció sebességével (v). [25]

$$v = Q_r/t = P_r - P_i \quad (2)$$

A reakciósebességet akkor kapjuk meg, hogyha a kaloriméter termosztálásához szükséges teljesítményt (P_i) kivonjuk a mérőcellában generált hőteljesítményből (P_r).



8. ábra: Enzimreakció sebességének meghatározása többszöri titrálás módszerének alkalmazásával [26]

A 8. ábra mutatja egy tipikus ITC titrálás görbét, ahol a három lépcső a három titrálási pontnak felel meg. Egy-egy lépcső azt a hőváltozást szemlélteti, amelyet az injektálás során a rendszerbe juttatott enzim által kiváltott reakció eredményez, míg az azt követő vízszintes szakaszok a steady-state állapotokat jelölik, amikor az enzimreakció konstans sebességgel zajlik. Így a (2) egyenletnek megfelelően a reakció sebességét a két lépcső közötti különbség fogja megadni.

3. Felhasznált anyagok és módszerek

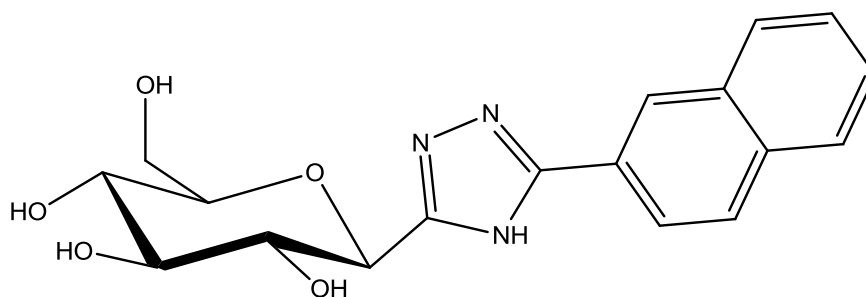
3.1. Felhasznált anyagok

Szubsztrátok:

A mérések során szubsztrátként glikogént, 2-klór-4-nitrofenil kromoforcsoportot aglikonként tartalmazó maltoheptaozidot (CNP-G7), maltoheptaózt (G7) illetve maltopentaózt (G5) használtam, melyek mindegyike analitikai tisztaságú volt (Sigma Aldrich). A törzsoldatok koncentrációja a G5, G7 illetve a CNP-G7 esetén egyaránt 30 mM volt, a glikogén esetén pedig 20 mg/ml törzsoldatból kiindulva végeztem el a megfelelő hígításokat.

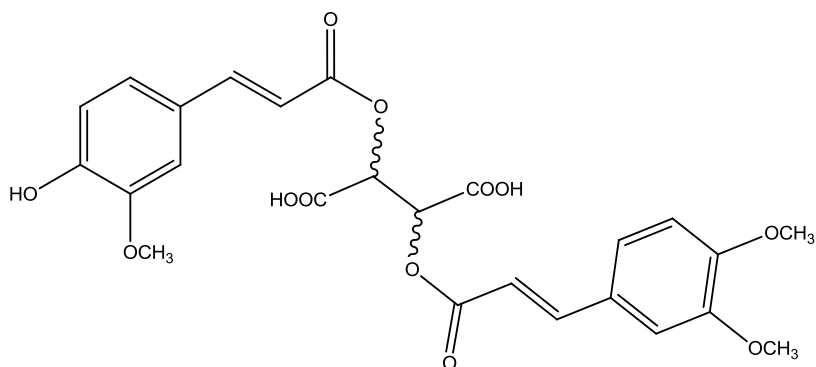
Inhibitorok:

A vizsgálatok során két inhibítort alkalmaztam, a 3- (β -D- glükopiranozil)-5-(2-naftil)-1,2,4-triazolt **1** (M=357,36g/mol, 9. ábra), illetve a (2R,3S)-2,3-bisz-[{(2E)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)prop-2-enoil}oxi]-bután-1,4-disavat **2** (M=502,11g/mol, 10. ábra), melyeket a Debreceni Egyetem Szerves Kémiai Tanszéke bocsátott rendelkezésünkre. Mindkét inhibítor esetén 1 mg/ml koncentrációjú törzsoldatból készítettem el a méréseimhez a megfelelő hígításokat.



9. ábra 3- (β -D- glükopiranozil)-5-(2-naftil)-1,2,4-triazol szerkezete

1.



10. ábra: (2R,3S)-2,3-bis-[(2E)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)prop-2-en-1-yl]bután-1,4-disav szerkezete

2.

Pufferek

Az enzimet, a szubsztrátot illetve az inhibitort egyaránt foszfát pufferben oldottam, illetve az ITC készülék referencia celláját is pufferrel töltöttem fel, melyet a következőképp állítottam össze:

14,2 g/100 ml Na_2HPO_4 (1M) + 12 g /100 ml NaH_2PO_4 (1M), amelyeket 1:1 arányban elegyítettünk. 100 ml puffer 76 mg EDTA-t, 156,4 mg AMP-t illetve 70 μl merkaptotetanolt tartalmazott. Az ilyen módon elkészített puffer pH-ja 6.8.

Enzim:

Munkám során nyúl vázizom glikogén foszforiláz b enzimet használtam (Sigma Aldrich)

Az enzimnek 20 μM koncentrációjú törzsoldatát alkalmaztam a mérések során.

3.2. Eszközök és Módszerek

Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC)

A termékanalízishez diódasoros detektorral, automata mintaadagolóval illetve számítógépes adatkiértékeléssel ellátott Hewlett- Packard 1090 II folyadékkromatográfot (11. ábra) alkalmaztam. A komponenseket Supelcosil C18 oszlopon (15cm * 4.6 mm, 5 µm) acetonitril: víz (MeCN: H₂O) 88:12 arányú izokratikus elúciójával választottam el 1 ml/perc áramlási sebesség mellett. Az injektált térfogat 3 µl volt. A detektálás 302 nm hullámhosszon történt (Ref 450 nm). Az acetonitril gradiens tisztaságú volt, a tisztított víz pedig egy ioncserélővel valamint egy szénshűzővel ellátott tisztítórendszerből származott (Millipore, Bedford, MA, USA).



11. ábra: A analitikai és enzimes vizsgálatok során alkalmazott HPLC készülék

ITC



12. ábra: ITC készülék

A vizsgálatokat MicroCal iTC200 típusú izotermális titrációs kaloriméteren végeztem (12. ábra). A referencia cellában minden esetben a mintának megfelelő összetételű és koncentrációjú puffer került, míg a mérőcella tartalmazta a vizsgálandó szubsztrátot. A titrálást a glikogén foszforiláz enzimmal végeztem. A kísérletek során a mérő cellát 200 μ l kívánt koncentrációjú szubsztrát oldattal töltöttük fel, melyhez a szubsztrátot ugyanabban a foszfát pufferben oldottuk, amit az enzim oldásához is használtunk. A mérés során ehhez adtam megfelelő térfogatú enzim törzsoldatot, majd mértem azt a hőváltozást, mely annak hatására keletkezett, hogy a szubsztrát terméké alakult át. Az enzim törzsoldat minden esetben azonos volt, az injektált térfogatot úgy választottam meg, hogy jól mérhető hőeffektust kapjak. A mérések során csak egy injektálás történt, majd meghatároztam az alapvonal és a csúcs maximuma közötti különbséget, és a (2) egyenlet alapján számítottam ki a reakciósebességeket. A K_M és IC_{50} értékeket a Grafit® szoftver segítségével határoztam meg a kísérletsorozat során kapott adatpontokra történő görbe illesztésével.

4. Eredmények és értékelésük

4.1. Szubsztrát koncentráció függés vizsgálata

Munkám során a glikogén foszforiláz enzim kinetikai paramétereit határoztam meg négy különböző szubsztráton. Valamennyi mérés során a fiziológiás, G-1-P keletkezéssel járó folyamatot alkalmaztam, amit a puffer foszfát tartalmával biztosítottam.

Négyféle szubsztrátot használtam a méréseim során, mégpedig a G5, G7, CNP-G7 illetve a glikogén szubsztrátokat. A G5-re azért esett a választásom, mert - ahogy korábbi tanulmányokból is kiderül - ez a GPb enzim legrövidebb szubsztrátja, mivel a maltopentaóz csak egyetlen, az enzim számára hasítható kötést tartalmaz [26]. A G7-t azért választottam, mert vizsgálni szerettem volna, hogy egy hosszabb, vagyis több glükózegységből felépülő szubsztrát esetén milyen változás következik be a kinetikában. A CNP-G7 tartalmaz egy kromofor csoportot, aminek a vizsgálatát egyrészt azért preferáltam, mert így alkalmam nyílt megfigyelni, hogy a kromofor csoport befolyásolja-e az egyes kinetikai paramétereket, másrészt pedig azért, mert a CNP lehetővé tette a reakció kromatográfiás követését HPLC módszerrel, UV detektálás mellett. A méréseket elvégeztem glikogénen is, hiszen ez a GPb enzim természetes szubsztrátja, és a gátlások vizsgálatát a fiziológiához hasonló körülmények mellett terveztem.

Maltopentóz (G5)

Az ITC mérések során a G5-t különböző koncentrációkban (0.5-30 mM) alkalmaztam, ugyanabban a pufferben oldva, mint amit az enzim oldásához illetve a referenciacella feltöltéséhez is használtam. A kalorimetriás vizsgálatok során alkalmazott paramétereket az 1. táblázat tartalmazza.

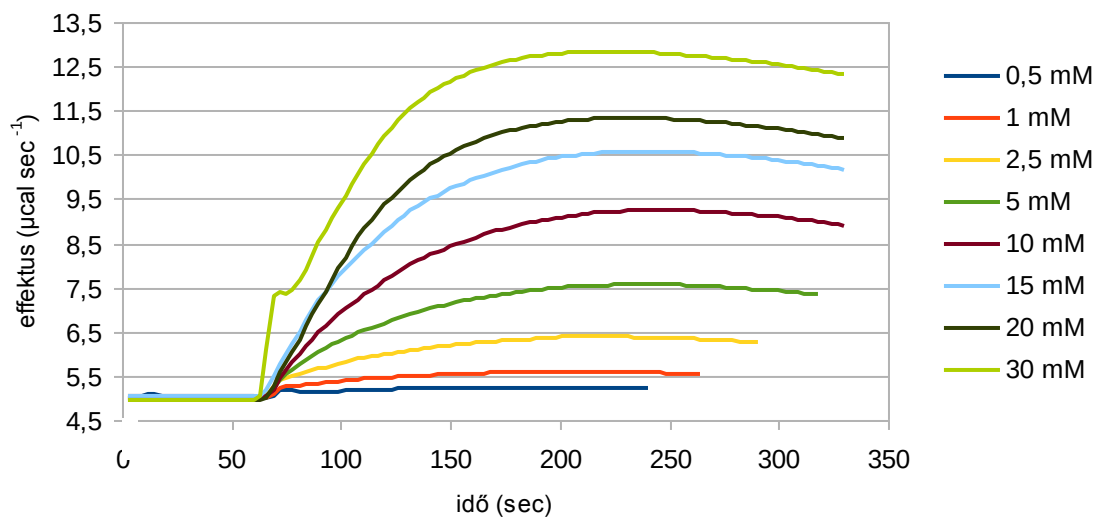
1. táblázat: ITC mérések során alkalmazott paraméterek

<i>Injektor tartalma: 0,02 μM GFb</i>	<i>Injektált térfogat.: 3-5 μl</i>
<i>Hőmérséklet.: 37°C</i>	<i>Keverés: 800 rpm</i>
<i>Injektilás időtartama: 2 sec</i>	<i>Késleltetés: 1800 sec</i>
<i>Referencia teljesítmény: 5 μcal/sec</i>	<i>Feedback: alacsony</i>

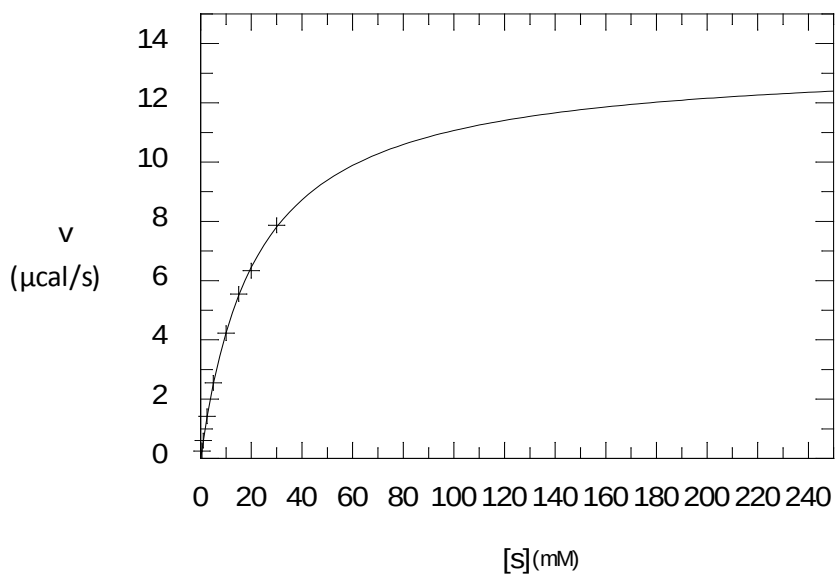
Ahogy azt már korábban leírtam, minden mérésem esetében ugyanazt az enzim oldatot (20 μ M) tartalmazta az injektor. Az enzim törzsoldat 1 mg GPb enzim 250 μ l foszfát pufferben való oldásával készült. Mivel az egyes mérések során csupán 5 μ l-t injektáltam a szubsztrátot tartalmazó mérőcellába, így biztosítani tudtam, hogy egy méréssorozatban ugyanazt az enzim oldatot használjam minden méréshez. Az enzim instabilitása nem teszi lehetővé az adott enzimhígítás több napon keresztül történő alkalmazását, mivel az enzim aktivitása csökken még az alacsonyabb hőmérsékleten való tárolás során is.

Azt tapasztaltam, hogy minél nagyobb volt a szubsztrát koncentrációja, annál nagyobb volt a hőváltozás mértéke (13. ábra). Már az Irodalmi áttekintés című fejezetemben is említést tettem arról, hogy az ITC módszer lehetőséget ad arra, hogy meghatározzuk egy reakcióról, hogy endoterm, vagy exoterm. Mivel a G5 volt az első szubsztrát, amelyet vizsgáltam ezzel a módszerrel, ezért itt tapasztaltam először, hogy az általunk vizsgált reakció endoterm.

A mért hőváltozások alapján a (2) egyenlet felhasználásával kiszámoltam a reakciósebességeket, majd ezeket az értékeket ábrázoltam a szubsztrát koncentrációk függvényében, és a Grafit program segítségével görbét illesztettem a pontokra, amely görbe alapján, meghatároztam a K_M értéket (14. ábra).



3. ábra: A hőeffektus ábrázolása az idő függvényében különböző koncentrációjú maltopentaóz esetén

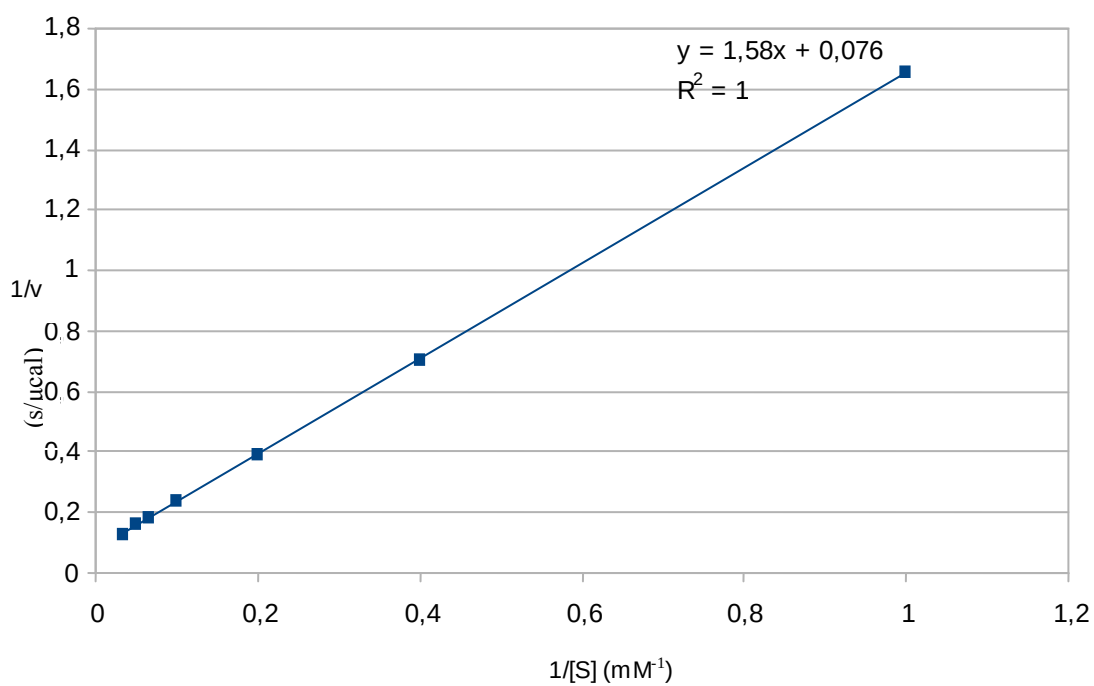


14. ábra: A reakciósebesség ábrázolása a szubsztrát koncentráció függvényében maltopentaóz szubsztrát esetén Gfb katalizálta reakcióban

$$V_{\max} = 13,4744 \mu\text{cal/s}$$

$$K_M = 21,7566 \text{ mM}$$

Látható, hogy oldékonysági korlátok miatt nem tudtam elérni a telítési szubsztrát koncentrációt, ami megközelítőleg 200 mM, ezért az értékelést Lineweaver-Burk linearizációval is elvégeztem.

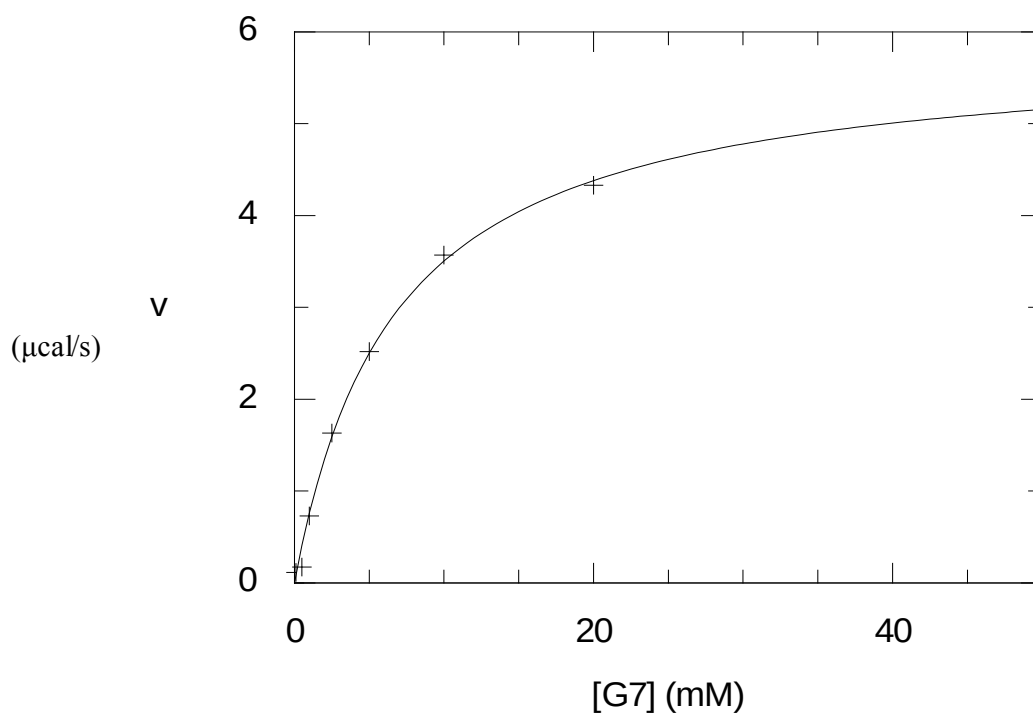


15. ábra: Lineweaver-Burk ábrázolás a kinetikai paraméterek meghatározására G5 szubsztrát esetén

Meghatároztam a $V_{\max}$ illetve a K_M értékeket a G5-tel végzett reakcióra nézve a Lineweaver-Burk ábrázolás alapján is (15. ábra). Az ilyen módon számított értékek jó egyezést mutatnak a nem lineáris illesztéssel kapott értékkel.

Maltoheptaóz (G7)

A G7-tel végzett kísérletek során az injektor tartalmazta a glikogén foszforiláz b enzimet 20 μM koncentrációban, amelyből minden mérés alkalmával 5 μl -t injektáltunk a szubsztrátot tartalmazó mérőcellához. Ebben a méréssorozatban a szubsztrát koncentrációkat 0,5-20 mM közötti tartományban alkalmaztam. A reakciósebességeket a szubsztrát koncentrációk függvényében ábrázolva, a kapott telítési görbe alapján (16. ábra) meghatároztam a $V_{\max}$ és a K_M értékét.



16. ábra: A reakciósebesség ábrázolása a szubsztrát koncentráció függvényében maltoheptaóz szubsztrát esetén GFb katalizálta reakcióban

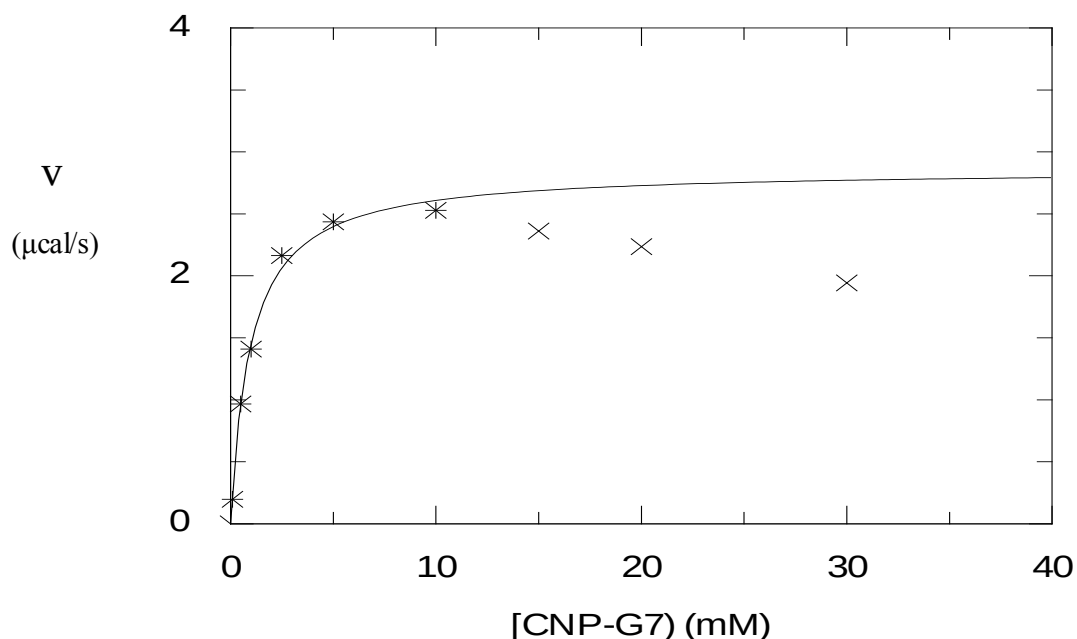
A maltoheptaóz Michaelis-állandó illetve a maximális sebesség értékei:

$$V_{\max} = 5,4 \mu\text{cal/s}$$

$$K_M = 6,68 \text{ mM}$$

CNP-G7

A szubsztrátfüggés vizsgálatának harmadik szakaszaként CNP-G7-tel is elvégeztem az előbbieken tárgyalt méréseket. Az enzimet 0,297 μM koncentrációban alkalmaztam, mivel a mérés során 3 μl -t injektáltam az enzim törzsoldatból a 200 μl reakcióelegyhez. A vizsgálat során a szubsztrát koncentrációit 0,5-30 mM tartományon belül változtattam. A reakciósebességeket ebben az esetben is ábrázoltam a koncentrációk függvényében.



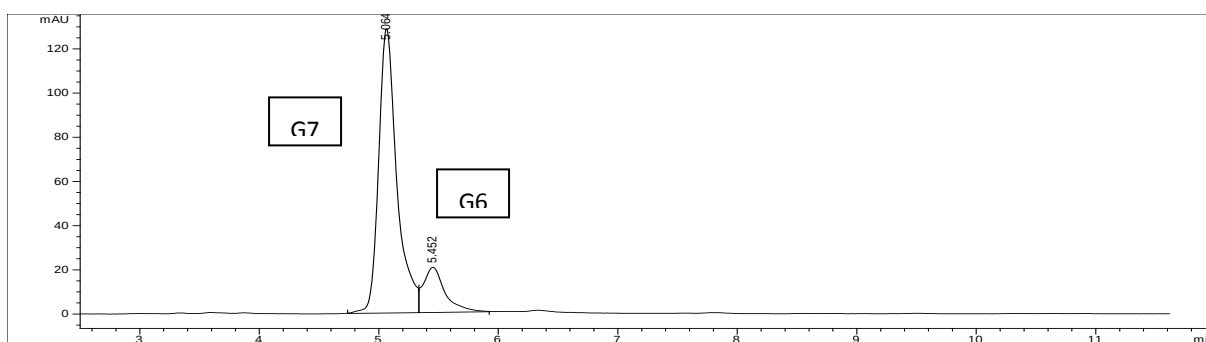
17. ábra: A reakciósebesség ábrázolása a szubsztrát koncentráció függvényében CNP-G7 szubsztrát esetén GFb katalizálta reakcióban

A 17. ábrán látható, hogy 10 mM felett a koncentráció növelésével a hőeffektus csökkenni kezdett, aminek hátterében szubsztrát gátlás állhat. Ez a gátlás kialakulhat egyrészt akkor, ha a nagy koncentrációban alkalmazott szubsztrát nemcsak az aktív centrumhoz, hanem „nem-kompetitív” módon, más helyekhez is tud kötődni, másrészt pedig akkor, ha a szubsztrát komplexet képez az aktivátorral. A nagy szubsztrát koncentráció ezen felül az ionerősség növekedését is okozhatja, ami által aspecifikusan gátolhatja az enzimet. A K_M és V_{max} meghatározása a csillaggal jelölt pontokra történő görbe illesztéssel történt, mely során a következő eredményt kaptam:

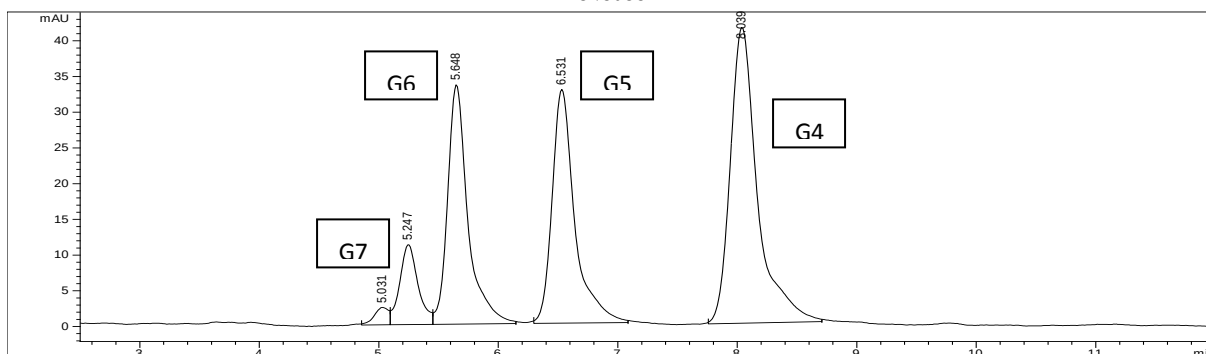
$$V_{\text{max}} = 2,8 \mu\text{cal/s}$$

$$K_M = 0,97 \text{ mM}$$

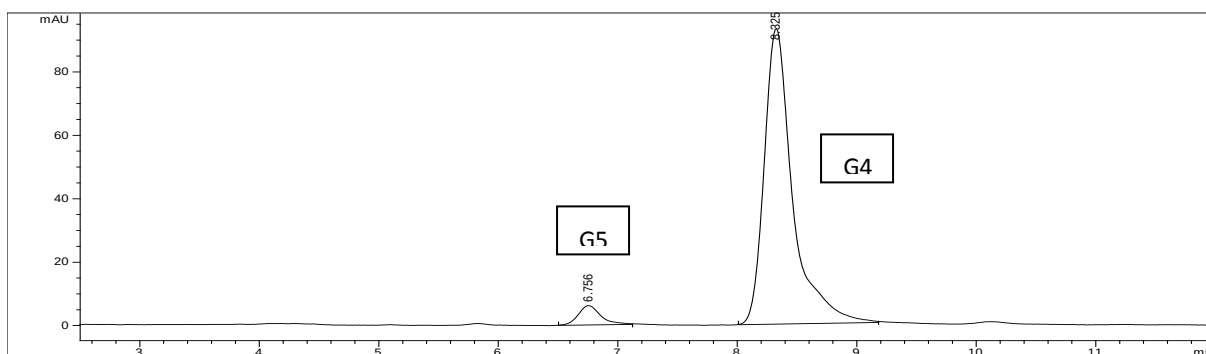
Mivel a CNP-G7 esetén, a G7-hez egy kromofor csoport kapcsolódik, kromatográfiás vizsgálatok végzése is lehetővé válik. Így ebben az esetben lehetőségem volt arra, hogy a reakciót az ITC módszer mellett HPLC segítségével is kövessem. A kalorimetriás mérésekkel azonos módon összeállított (2,5 mM CNP-G7 szubsztrátot tartalmazó) reakcióelegyet 120 s reakcióidő után injektáltam fordított fázisú oszlopra injektálva, és a kromofor csoport elnyelési maximumán (302 nm) detektálva vizsgáltam, hogy a reakció milyen mértékben játszódott le. A 18.a ábrán látható a HPLC mérés eredményeként kapott kromatogram. A reakciót HPLC-vel követtem a teljes átalakulásig (18. b és c ábra)



18.a ábra: Reakció követése HPLC segítségével 2,5mM CNP-G7 szubsztrát esetén 2 perc inkubálást követően



18.b ábra: Reakció követése HPLC segítségével 2,5mM CNP-G7 szubsztrát esetén 30 perc inkubálást követően



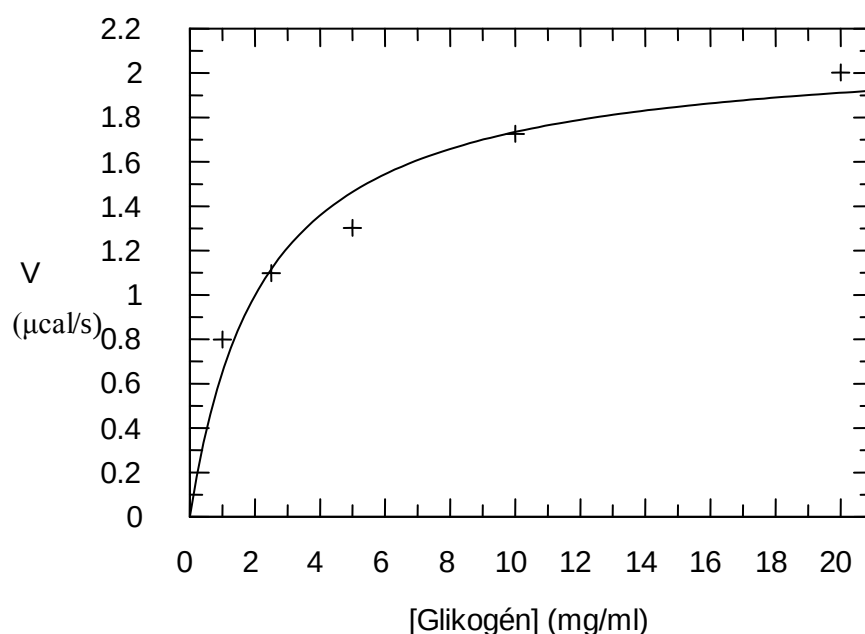
18.c ábra: Reakció követése HPLC segítségével 2,5mM CNP-G7 szubsztrát esetén 90 perc inkubálást követően

Ahogy a kromatogramon is látható, a kiindulási szubsztrát (CNP-G7) mellett megjelent a CNP-G6 termék $\sim 10\%$ mennyiségben, a kiindulási szubsztráthoz viszonyítva. Ezzel igazoltam, hogy méréseimmel a kezdeti sebességet határoztam meg. A teljes reakció lejátszódásához az adott koncentráció viszonyok mellett megközelítőleg 90 percre van szükség (18.c ábra).

Glikogén

Az utolsó szubsztrát, amelyet vizsgáltam, a glikogén foszforiláz enzim természetes szubsztrátja, a glikogén volt. A mérések alkalmával a mérőcella különböző koncentrációjú glikogén oldatot tartalmazott melyhez a $20\ \mu\text{M}$ koncentrációjú enzim törzsoldatból $5\ \mu\text{l}$ -t injektáltam, ami a reakcióelegyben $0,49\ \mu\text{M}$ koncentrációt jelent.

A glikogén esetében nem lehet megadni a pontos moláris koncentrációt, ugyanis a glikogén szerkezetét tekintve egy hosszú polimerlánc, mely esetén nem lehet egyértelműen meghatározni a moláris tömeget. Ezért a 19. ábra x tengelyén a glikogén koncentrációi mg/ml koncentráció egységben szerepelnek.



**19. ábra: A reakciósebesség ábrázolása a szubsztrát koncentráció függvényében glikogén szubsztrát esetén
GFb katalizálta reakcióban**

A glikogén szubsztrát kinetikai vizsgálata során meghatározott enzim kinetikai paraméterek értékei:

$$V_{\max} = 1,98 \text{ } \mu\text{cal/s}$$

$$K_M = 1,54 \text{ mg/ml}$$

Ha összevetjük a kapott K_M értékeket a vizsgált szubsztrátok esetén, több következtetést is le tudunk vonni. Egyrészt megállapítható, hogy a három oligomer szubsztrát közül a CNP-G7 esetében szükséges a legkisebb szubsztrátkoncentráció a maximális sebesség eléréséhez, és a G5 esetén a legnagyobb, mivel előbbi rendelkezik a legalacsonyabb, míg utóbbi a legmagasabb K_M értékkel. Korábban maltooligomereken (G5-G7) szintén mM nagyságrendű K_M értékeket mértek [26]. Másrészt az eredmények alapján azt a következtetést is le tudtam vonni, hogy a kromofor csoport hatással van a kinetikára, ugyanis a CNP-t tartalmazó, illetve az azzal nem rendelkező G7 K_M értékei jelentős eltérést mutattak. Ennek hátterében az állhat, hogy az enzim fehérje apoláris/aromás aminosav-oldalláncai illetve a kromofor csoport aromás gyűrűje között kölcsönhatás alakulhat ki, ami kedvezően befolyásolhatja a szubsztrát kötődését..

A 2. táblázat összefoglalja a szubsztrát koncentráció függés vizsgálata során kapott eredményeket.

2. táblázat: Michaelis-Menten állandók összefoglalása a vizsgált négy szubsztrát esetén

Szubsztrát	K_M értékek	
	mM	mg/ml
G5	21,75	8,02
G7	6,68	7,69
CNP-G7	0,97	1,26
glikogén	-	1,54

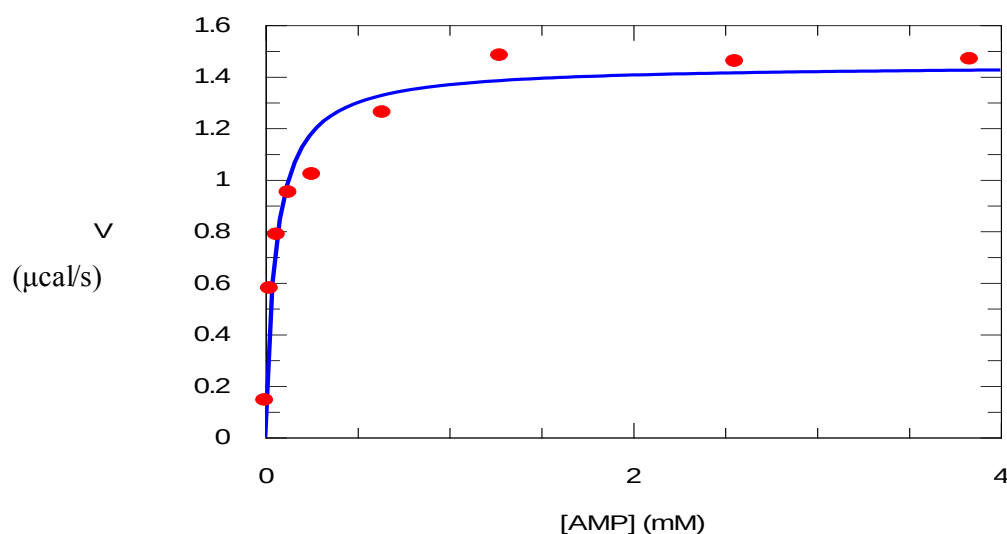
A glikogénnel való összevetéshez mg/ml koncentráció egységben is megadtam a K_M értékeket. Látható, hogy a CNP-G7 és a glikogén közel azonos koncentrációja elegendő a maximális sebesség felének eléréséhez.

4. 2. Aktiválás és gátlásvizsgálat

4.2.1. AMP aktiváló hatása

A glikogén foszforiláz enzim nem foszforilált *b* formája (GFb) önmagában inaktív, katalitikus aktivitása csak AMP vagy IMP jelenlétében mutatható ki. Az AMP a glikogén foszforiláz allosztérikus aktivátora. Ez egy olyan nukleotid, amely képes hozzákötődni az enzim felületéhez, szerkezeti változást létrehozva ezzel.

A méréseim során alkalmazott puffer, amelyet korábban végzett tanulmányok alapján állítottam össze, 4 mM koncentrációban tartalmazta az AMP-t. Mivel az allosztérikus helyre kötődő inhibítorral is terveztem méréseket, fontos volt megismerni az AMP hatásos aktiváló koncentrációját (20. ábra). A CNP-G7 és foszfát szubsztrátok nagy koncentrációját (2,5 mM illetve 1 M) alkalmaztam, így a reakciósebességet csak az AMP koncentráció befolyásolta.



20. ábra: GPb enzim aktivitásának AMP-függés vizsgálata 2,5 mM CNP-G7 szubsztrát esetén

A félhatásos aktivátor koncentráció (EC_{50}) meghatározása formailag az enzim-szubsztrát komplex K_M értékének meghatározásával analóg.

Az AMP-re kapott EC_{50} érték:

$$EC_{50} = 50 \mu M$$

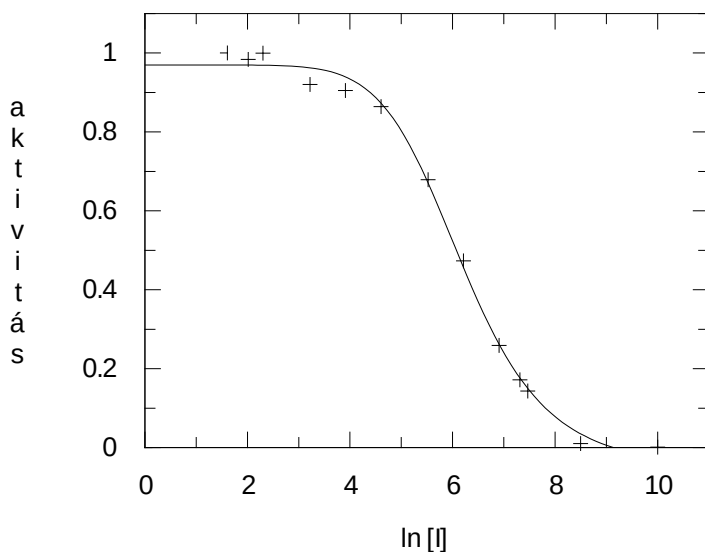
A 20. ábrából látható, hogy megközelítőleg 1 mM koncentráció felett már nem következett be jelentős változás a reakciósebességben, tehát az AMP-t elegendő 1 mM koncentrációban alkalmazni ahhoz, hogy teljesen aktiválja a GFb enzimet.

4. 2.2. Gátlás vizsgálat

Ahogy azt már korábban említettem, a glikogén foszforiláz enzim egy potenciális célmolekula a gyógyászatban, mivel a vércukorszint szabályozásáért felelős glikogén foszforiláz enzim gátlásán keresztül lehetőség nyílik a 2-es típusú cukorbetegség kezelésére.

Dr. Somsák László és kutatócsoportja már régóta foglalkozik a glikogén foszforiláz enzim gátlásához szükséges inhibitorok szintetizálásával.

Ez a kutatócsoport rendelkezésünkre bocsátott két inhibitort, melyek gátló hatását korábban a glikogén szintézis irányában lejátszódó enzimreakción vizsgálták. Ennek a két gátlószernek végeztem el a vizsgálatát, azonban nem a glikogén szintézis, hanem a lebontás irányában. Az egyik inhibitor a 3- (β -D- glükopiranozil)-5-(2-naftil)-1,2,4-triazol **1** volt, mely a vizsgálatok alapján az aktív centrumhoz kötődik [28]. A mérés során a mérőcella 5 mg/ml koncentrációjú glikogén szubsztrátot, 1M foszfát puffert illetve a vizsgálni kívánt inhibitort tartalmazta. Az ITC mérések során kapott hőeffektusokból, amelyet egy inhibitort nem tartalmazó referenciamintán mért hőváltozáshoz viszonyítottam, meghatároztam az enzim maradék aktivitását. Ezt követően az aktivitásokat ábrázoltam (21. ábra) az inhibitor-koncentrációk természetes alapú logaritmusának a függvényében, mely során egy szigmoid görbét kaptam. A görbe inflexiós pontja adja meg az inhibitor IC_{50} értékét. $IC_{50} = 49,5 \mu M$.



21. ábra: 3- (β-D- glükopiranozil)-5-(2-naftil)-1,2,4-triazol IC_{50} értékének meghatározása GPb enzim katalizálta glikogén bontási reakcióban

Mivel a 3- (β-D- glükopiranozil)-5-(2-naftil)-1,2,4-triazol egy olyan inhibitor, amely kompetitív módon fejti ki a gátló hatását, ezért az IC_{50} érték a Cheng-Prushof egyenlet szerint (3. egyenlet) számítható át inhibíciós állandóvá.

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[S]}{K_m}} \quad (3)$$

Tehát mivel $IC_{50} = 49,5 \mu M$, $[S] = 5 \text{ mg/ml}$, $K_m = 1,54 \text{ mg/ml}$ ezért $K_i = 11,7 \mu M$.

A másik inhibitor, amellyel dolgoztam a (2R,3S)-2,3-bisz-[(2E)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)prop-2-enoil]oxi]-bután-1,4-disav, a gátlószerek egy másik csoportjába tartozik. Ellentétben az előbb leírt triazol inhibitorral, amely az aktív centrumon fejti ki gátló hatását, ez a gátlószer az allosztérikus helyre kötődő inhibitorok közé tartozik [29]. Ahogy már a 4.2.1. fejezetben tárgyaltam, az AMP egy olyan aktivátor, mely az allosztérikus helyhez kötődve aktiválja a GPb enzimet. A vizsgált inhibitor azonban az AMP-vel kompetitív módon bekötődik az allosztérikus helyre, kiszorítva ezáltal az AMP-t, ami így nem tudja kifejteni az aktiváló hatását. A (2R,3S)-2,3-bisz-[(2E)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)prop-2-enoil]oxi]-bután-1,4-disav inhibitor esetén az inhibitor koncentrációjának fokozatos növelése ellenére

sem tapasztaltam változást, tehát az inhibitor nem, vagy csak nagyon kis mértékben fejtett ki gátló hatást. Ennek az oka az aktivátor és az inhibitor között kompetíció van. Mivel az AMP koncentrációja többszörös volt az inhibitoréhoz képest, ezért az AMP kiszoríthatta az inhibitor a kötőhelyről, és ezért nem tudott gátló hatást kifejteni.

Az első mérésorozatban 4 mM AMP koncentráció mellett végeztem el a gátlási vizsgálatot, majd majd a méréseket megismétltem 1 mM AMP jelenlétében is, mely során a 3. táblázatban összefoglalt értékeket kaptam.

3. táblázat: Összefüggés az inhibitor koncentráció és az aktivitás között a 2. inhibitor esetén, 1 mM AMP-t alkalmazva

Inhibitor koncentráció (μM)	Mért maradék aktivitás (%)
0,05	100
0,1	100
0,5	99,7
33	72,3
100	43,5
200	38,8
300	33

Az adatokra nem sikerült megfelelő görbét illesztem, de látható, hogy megközelítőleg 85 μM okoz 50% gátlást.

Méréseim szerint a két inhibitor közül a kompetitív gátlást okozó 1 gátlószer a hatékonyabb, amennyiben csak az IC_{50} értékeket hasonlítom össze, ugyanis az allosztérikus helyre kötődő 2 inhibitor esetén az IC_{50} érték a 1 triazolhoz képest közel duplája volt, ami azt jelenti, hogy ugyanazon gátló hatás kifejtéséhez nagyobb inhibitor koncentrációra van szükség a 2 inhibitor alkalmazásakor.

Figyelembe kell azonban venni az alkalmazott mérési körülményeket is. Esetünkben a szubsztrátok koncentrációja azonos volt mindkét mérési sorozatban, de az 1 inhibitor a keletkező G-1-P-tal vagy a glikogénnel verseng a kötőhelyért, a 2 inhibitor viszont 1 mM AMP-vel van kompetícióban [29]. Még nehezebb az összevetés a szintézis irányában végzett vizsgálatok során meghatározott inhibíciós állandókkal.

A gátlás vizsgálatok eredményét a 4. táblázatban foglaltam össze a korábban közölt adatokkal együtt.

4. táblázat: A vizsgált inhibitorok gátlási paramétereinek összevetése az irodalmi értékekkel

Inhibitor	IC ₅₀ érték a lebontás irányában CNP-G7 szubsztráton	K _i értékek a lebontás irányában	K _i értékek a szintézis irányában
<u>1</u>	49,5 µM	12,1 µM	0,41 µM G-1-P szubsztráton [28]
<u>2</u>	~85 µM	~85 µM	2 µM AMP-hez viszonyítva[29]

Az 1 inhibitor esetében a 0,41µM gátlási állandót G-1-P-on mérték szintézis irányú mérések során. Ahogy az enzimek esetén az aktivitás erősen függ az alkalmazott szubsztráttól, ugyanúgy a gátlás meghatározásánál sem mindegy, milyen szubsztráton vizsgáljuk a hatást. Ugyanaz a kompetitív gátlószer kisebb koncentrációban tudja hatékonyan gátolni egy gyengébb (nagyobb K_M értékkel rendelkező) szubsztrát reakcióját. Sajnos, a glikogén foszforiláz esetében ritkán közölnek olyan adatokat, amikor mindkét reakció irányban elvégezték a gátlás vizsgálatot [30], így általános következtetések nem vonhatók le. Ha figyelmen kívül hagyom azt, hogy a lebontás és a szintézis irányú gátlási vizsgálatok nem ugyanazon körülmények között lettek elvégezve, akkor a kapott értékek összehasonlítása alapján megállapítható, hogy azok az inhibitorok, amelyek a szintézis irányában történő gátlásvizsgálatok során hatékony gátlószereknek bizonyultak, a lebontás irányában már nem mutattak ugyanilyen kimagasló eredményeket, hiszen nagyságrendekkel nagyobb értékeket kaptam a gátlási állandóra a lebontás irányú mérések során. A pontos összevetés természetesen további méréseket igényel, hiszen nemcsak a reakció iránya volt eltérő, hanem az alkalmazott szubsztrátok és más paraméterek is.

5. Összefoglalás

Munkám során a glikogén foszforiláz enzim kinetikai és gátlásvizsgálatát végeztem izotermális titrációs kalorimetria, röviden ITC módszer segítségével. Mivel az ITC alkalmazása enzimkinetikai vizsgálatokhoz viszonylag új iránynak számít, így a glikogén foszforiláz enzimen végzett méréseim potenciálisan új eredményeket adhatnak. Méréseim során kihasználtam, hogy az enzimet természetes szubsztrátján vizsgálhatom, illetve a módszer lehetővé teszi a reakciósebesség direkt módon történő meghatározását.

A kinetikai vizsgálatokat négy szubsztráton (G5, G7, CNP-G7, glikogén) végeztem el, melyeknél rendre meghatároztam a Michaelis-Menten állandókat (K_M). Ezen értékek összehasonlításával meg tudtam állapítani a glikogén foszforiláz enzim aktivitás mérése és gátlásvizsgálata számára a megfelelő körülményeket.

Ezt követően gátlásvizsgálatokat végeztem két olyan inhibitorral, melyet a Szerves Kémiai Tanszék bocsátott rendelkezésünkre. Mind a két gátlószer esetén a glikogén lebontás irányában végeztem méréseket, mely során meghatároztam az inhibitorok IC_{50} értékeit. A két IC_{50} értéket összevetettem egymással, illetve a dr. Somsák László és kutatócsoportja által, a szintézis irányában végzett gátlásvizsgálatok eredményeivel is. Azt tapasztaltam, hogy az aktív centrumhoz kötődő triazol inhibitor IC_{50} értéke kisebb volt, mint az allosztérikus helyre kötődő inhibitoré, vagyis az előbbi hatékonyabb gátlószernek bizonyult a lebontás irányában történő vizsgálatok során, ellentétben a korábban közölt eredményekkel, amelyek azonos nagyságrendbe estek. A szintézis irányú gátlásvizsgálatok során kapott eredményekkel való összehasonlítás során azt láttam, hogy ugyanazon inhibitor nem egyenlő mértékben fejti ki gátló hatását a lebontás illetve a szintézis irányában. Előbbi estén nagyságrendekkel nagyobb IC_{50} értékeket kaptam, tehát az általam alkalmazott két inhibitor a lebontás irányában végzett vizsgálatok során nem bizonyult ugyanolyan hatékony gátlószernek, mint a szintézis irányában. Az eredmények pontosítása és általános következtetések levonása érdekében további vizsgálatokat végzünk.

6. Hivatkozások

- [1]: <http://www.idf.org/worlddiabetesday/toolkit/gp/facts-figures>
- [2]: Livanova NB, Chebotareva NA, Eronina TB, Kurganov BI (2002). *Biochemistry (Moscow)* **67**(10): 1089–1998.
- [3]: D. Bradford' And L.N. Johnson (1992). *The Protein Society* **I**, 472-493.
- [4]: Browner MF, Fletterick RJ (1992). *Trends in Biochemical Science* **17** (2): 66–71
- [5]: Johnson LN (1992) *FASEB Journal* **6** (6): 2274–82.
- [6]: Johnson and David Barford, *The Journal of Biological Chemistry*. **265**(5): 2409-2412
- [7]: Newgard CB, Hwang PK, Fletterick, RJ (1989) *Critical Reviews Biochemistry and Molecular Biology* **24** (1): 69–99.
- [8]: Sergei V. Klinov, Boris I. Kurganov, *Biophysical Chemistry* 92 Ž2001. 89-102
- [9]: Ádám Veronika: Orvosi biokémia, Medicina Könyvkiadó RT, Budapest, 2001
- [10]: Berg, Tymoczko & Stryer (2012). *Biochemistry* **7**: 338.
- [11]: Cori GT, Green AA (1943) *Journal of Biological Chemistry* **151** (1): 21–29.
- [12]: Merle Mason (1971) *Analytical Biochemistry* **43**, 57-65
- [13]: Nora Alonso-Casaju's, David Dauville'e, Alejandro Miguel Viale, Francisco Jose' M (2006) *Journal of Bacterology*, **188** (14): 5266–5272
- [14]: Saheki S, Takeda A, Shimazu T.(1985), *Analytical Biochemistry* **148**(2): 277-81.
- [15]: Makino Y., Omichi K., (2009) *Journal of Biological Chemistry* **146**(1): 71-6
- [16]: Menten, L.; Michaelis, M.I. (1913), *Biochem* **49**: 333–369
- [17]: Elődi Pál: Biokémia, Akadémiai Kiadó, Budapest, 1983
- [18]: Lili Kandra, Gyöngyi Gyémánt, Ágnes Zajác, Gyula Batta (2004), *Biochemical and Biophysical Research Communications* **319**: 1265-71
- [19]: Christensen, J.J., Izatt, R.M., Hansen L. D. and Partridge, J. M. (1966) *J. Phys.Chem.* **70**, 2003-2010[20]
- [20]: Beaudette, N. V., nad Langerman, N. (1978) *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY* **90**, 693-704.
- [21]: M.W. Freyer, E.A. Lewis (2008) *Methods in Enzymology* **84** 79-113
- [22]: <http://pharmaxchange.info/press/2012/08/isothermal-titration-calorimetry-application-in-drug-discovery/>
- [23]: <http://www.malvern.com/en/products/product-range/microcal-range/microcal-itc-range/microcal-itc200/default.aspx>
- [24]: Liang, Y. (2006) *Journal of the Iranian Chemical Society*, Vol. 3, No. 3, September 2006, pp. 209-219.
- [25]: S. D'Amico, J.S. Sohler and G. Feller (2006). *Journal of Biological Chemistry* **358**, 1296-1304
- [26]: S. Tanabe, M. Kobayashi, K. Matsuda (1988) *Agricultural Biological chemistry* **52**, 757-764
- [27]: <http://themedicalbiochemistrypage.org/enzyme-kinetics.php>
- [28]: Éva Bokor, Tibor Docsa, Pál Gergely, László Somsák (2013) *ACS Medicinal Chemistry Letters* **4**, 612-615
- [29]: Gergely Varga, Tibor Docsa, Pál Gergely, László Juhász, László Somsák (2013) *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **23** 1789-1792
- [30]: L.Somsák, V.Nagy, T.Docsa, Zs.Hadady, P.Gergely (2003) *Current Pharmaceutical Design* **9**, 1177-1189