

**Zárójelentés**  
**a**  
**T043499 nyilvántartási számú**  
**Kutatások a MALDI-TOF tömegspektrometria szénhidrátkémiai alkalmazási**  
**lehetőségeinek kiszélesítésére**  
**című**  
**OTKA pályázatról**

A tömegspektrometria rendkívül hasznos eszköz vegyületek azonosítására, szerkezetük meghatározására. A MALDI technikával, ellentétben a klasszikus ionizálási módszerekkel, molekulaionok keletkeznek, a fragmentáció elhanyagolható, így a molekulatömeg egyszerűen meghatározható. Ugyanakkor lehetőség van a fragmentációk tanulmányozására is egy speciális üzemmódban reflektoron alkalmazásával, ami lehetővé teszi egy kiválasztott ion fragmentjeinek elkülönítését és így a szerkezet felderítéshez szolgáltat adatokat. Maga a MALDI módszer nagyon fiatal, a 80-as évek végén dolgozták ki nagy molekulatömegű, érzékeny biomolekulák gázfázisba juttatására és ionizálására. Szénhidrátok vizsgálatára a kilencvenes évek elejétől alkalmazták, elsősorban glikoproteinek, glikolipidek és természetes forrásból származó szabad oligoszacharidok esetében. Mi főleg szintetikus előállított oligoszacharidok mérésére akartuk alkalmazni a módszert, amelyek a szintézisek megkövetelte legkülönbözőbb védőcsoportokat hordoznak. Irodalmi hivatkozást ilyen típusú anyagok mérésére alig találtunk. A MALDI technika alkalmazásáról szénhidrátok körében részletes összefoglaló jelent meg néhány éve (D.J. Harvey, *Mass Spectrometry Reviews* 1999, **18**, 349-450.), amelyben a szerző tárgyalja a különféle alkalmazásokat, használható mátrix anyagokat, mint a előkészítési technikákat. A 100 oldalas, több mint 350 hivatkozást tartalmazó cikkben egy rövid bekezdés foglalkozik mindössze a szintézissel előállított oligoszacharidok MALDI meghatározásával, ezek a szintézisek is főként enzimikus módszerrel történtek, tehát védőcsoportokat nem tartalmaztak. Egy másik rövid bekezdésben kerül megemlítésre a fehérjéhez kötött oligoszacharidok meghatározása, a neoglikoproteinek mérése. Ez bátorított arra, hogy ezen a kevésbé felderített területen kezdjünk olyan vizsgálatokba, amelyek jól kiegészítik a Biokémiai Tanszéken és MTA-DE Szénhidrátkémiai Kutatócsoportban eredményesen folytatott enzimes és szintetikus szénhidrátkémiai kutatásokat.

Az elvégzett munka összefoglalása a munkatervben megadott témák szerint:

## I. Szulfonilezett mono- és oligoszacharidok vizsgálata:

A DE-MTA Szénhidrátkémiai Kutatócsoportban a következő vegyületcsoportok szintézisét végezték el:

- Ramnozidok szulfonsav és szulfát észter származékai
- Laktóz szulfonsav származékok
- Anomer pozícióban szulfonsav csoportot tartalmazó vegyületek.

A szulfonsavakat sók (Na, K, tetrabutilammónium, tetraetilammónium) vagy észterek (etil) formájában állították elő védőcsoportokat (benzil, acetil, benzilidén, izopropilidén) vagy szabad hidroxil csoportokat tartalmazó glikozidok (p-metoxifenil, metil) formájában. A vizsgálatok során közel száz vegyület MALDI spektrumát vettük fel, amelyek a legkülönbözőbb szerkezettel rendelkeztek. A szulfonsav csoport kapcsolódhatott a cukor valamelyik szénatomjához (C1, C2, C4, C6) közvetlenül, vagy  $=\text{CH}-$ ,  $-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$  és  $-(\text{CH}_2)_3\text{O}-$  csoporton keresztül C1, C3 vagy C4 pozícióban. Szulfát észterek esetében a kapcsolódás oxigénen keresztül a C4 pozícióban történt.

A vegyületek MALDI MS vizsgálata alapján a következő megállapításokat tettük:

1. Valamennyi vizsgált vegyület esetén jól értékelhető spektrumot kaptunk pozitív ionizálási módban 2,5-dihidroxi-benzoészter (DHB) mátrix alkalmazásával.
2. A szulfonsavak Na vagy K sóinak vizsgálatakor pozitív módban  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ,  $[\text{M}+\text{K}]^+$  és  $[\text{M-kation}+2\text{K}]^+$  ionok képződése figyelhető meg a MALDI körülményei között.
3. Sók esetében negatív ionizálási módban is van lehetőség a mérésre, ekkor  $[\text{M-kation}]^-$  csúcs jelenik meg a spektrumban.
4. A szulfonsav származékok észter formáinak MALDI spektruma csak pozitív módban mérhető, ekkor  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  és  $[\text{M}+\text{K}]^+$  ionok képződnek.
5. Sikeresen alkalmaztuk az oligoszacharidok szulfonsav származékainak szerkezetigazolására a PSD módszert. A fő kötéshasadás a glikozidos kötésnél történt, a spektrumban a redukáló és nem redukáló végi fragment is megjelent. Ezen kívül megfigyeltük a benzil védőcsoportok lehasadását in source és post source fragmentációval is.
6. A MALDI spektrumok segítségével azonosítottunk több mellékterméket, ezek közül a leggyakrabban képződő eliminációs termék szerkezetét NMR spektroszkópiával is igazoltuk.
7. MALDI spektroszkópiával sikerült kimutatni szabad mono-, di- és triszacharid szulfonsavak esetében nem kovalens kölcsönhatással létrejövő di- és trimer asszociátumok képződését. A di- és trimerek jelenlétét oldatban is igazoltuk ESI MS segítségével.

Eredményeinkről a 1<sup>st</sup> Austrian-Hungarian Carbohydrate Conference-n számoltunk be. A nem kovalens molekula komplexek további tanulmányozását tervezzük.

A MALDI vizsgálatok segítették a szintézistermékek azonosítását, sok esetben a melléktermékek azonosításával és a reakciókörülmények változtatásával a kitermelés növelését. A ramnozidok szulfonsav származékainak szintézisét az ARKIVOC elektronikus folyóiratban megjelent közleményben foglaltuk össze. A vegyületcsoport szintézisével kapcsolatos eredmények Sajtos Ferenc PhD dolgozatában és két másik PhD dolgozatban is szerepelnek (Lázár László 2005, Májer Gábor (összeállítás alatt)).

## **II. Az enzimátikus transzglykozilezések:**

### **II.1. Transzglykozilezés humán nyál $\alpha$ -amiláz Tyr151Met mutánsával**

Az enzim hidrolitikus aktivitása a mutáció eredményeként jelentősen lecsökkent, transzglykozilezési aktivitása viszont megnőtt. Vizsgáltuk az enzim transzglykozilezési reakcióit különböző donorok (maltotetraóz, maltoheptaóz, amilóz) és különböző kromofor csoportot tartalmazó akceptorok (p-nitrofenil-glükózid (PNP-G), -tio-glükózid, -xilozid, -mannozid, -Nac-glükózaminid, glüko-spirotiohidantoin) alkalmazásával. A termékek azonosításához, majd a preparatív méretben is elvégzett PNP-S-G<sub>x</sub> előállításnál a termékek szerkezetigazolásához MALDI tömegspektrometriát alkalmaztunk az NMR spektroszkópia mellett. Erről a munkáról diplomadolgozatok készültek (Cziránku Beatrix 2003, Matúz Krisztina 2004), a 1st Austrian-Hungarian Carbohydrate Conference-n előadás hangzott el és az eredményeket közlemény formájában is megjelentettük. (Organic Letters 2003).

### **II.2. Transzglykozilezés Bacillus stearothermophilus maltogén $\alpha$ -amilázzal**

Az enzimet, bontási képének és alhely térképének elkészítése után, egy hatékony  $\alpha$ -amiláz inhibitor, az akarbóz spirotiohidantoin származékának előállítására használtuk fel. Mivel ilyen vegyületet még nem állítottak elő az azonosítást ebben az esetben is MALDI MS-el végeztük. Sikert a reakcióelegyből kimutatni az előállítani kívánt vegyülettel egyező molekulatömegű csúcsot. A reakciót HPLC-vel követve azt tapasztaltuk, hogy több termék is képződik. A két fő termék molekulatömege a MALDI spektrumuk alapján azonosnak adódott, ezért feltételeztük, hogy ezek helyzeti izomerek. Feltételezésünket preparatív méretű reakció, és a termékek kinyerése utáni MALDI és NMR vizsgálatokkal igazoltuk (Carbohydr. Res. 2005). A szerkezetigazolás után a vegyületet, mint inhibitor kinetikai vizsgálatokra alkalmaztuk (BBRC, 334. (2005) 824-828).

Ezekkel a vizsgálatokkal párhuzamosan más akceptorokat (benzilalkohol, riboflavin, szalicin, amigdalin) és donorokat (maltotrióz, maltoheptaóz) is kipróbáltunk.

A termékazonosítást ezekben az esetekben is a MALDI-val meghatározott molekulatömeg segítségével végeztük el. Ily módon sikerült előállítani benzil-maltozidot, riboflavin-glükozidot, szalicin-maltozidot, az amigdalin és az N-benzil-N-glükozil-karbamid akarbóz származékát.

Eredményeinket a 2006-ban Budapesten rendezett 1<sup>st</sup> European Chemistry Congress poszter szekciójában mutattuk be.

A MALDI-TOF MS nélkülözhetetlennek bizonyult az enzimés szintézisek során képződő vegyületek azonosításában, hiszen ezeket a heterooligoszacharidokat korábban nem állították elő. A MALDI spektrumok alapján azonosíthatók a termékek, így a reakciókörülmények változtatásával optimalizálhatjuk a kitermelést.

### **III. Poliszacharid vizsgálatok**

III. 1. Vizsgáltuk poliszacharidok savas hidrolízisét és acetolízisét a hidrolízis idő, hőmérséklet, sav koncentráció függvényében. Modell vegyületként a keményítő, kitin és 4-O-metil-glükurono-xilán poliszacharidok mellett maltoheptaozidot alkalmaztunk. Növényi eredetű inulin minták hidrolizátumainak oligoszacharid összetételét határoztuk meg a hidrolízis követése céljából.

4-O-metil-glükurono-xilán savas hidrolízisét vizsgáltuk a poliszacharidot felépítő oligoszacharidok összetételének megállapításához. Csak pentózokból felépülő oligoszacharidokat nem találtunk. A legtöbb spektrumban megjelenő csúcs pentóz-hexóz egyidejű jelenlétére utal. Felmerült a karboxil vesztés lehetősége a hidrolízis vagy a MS közben ezért a kísérletek további folytatását tervezzük.

III. 2. Poliszacharid molekulatömeg meghatározásokhoz gélikromatográfiával molekulatömeg szerint elválasztott dextransz frakciókat (4000, 15000, 30000) alkalmaztunk modell vegyületként. Vizsgáltuk a mátrix vegyület minőségének, a mátrix/minta arányának, a minta koncentrációnak és a felcseppentés módjának hatását a spektrumra és a mérhető legnagyobb molekulatömegekre. Az ionizációt ammónium-fluorid, ammónium-klorid vagy lítium-klorid alkalmazásával segítettük elő. A nagyobb molekulatömegű anyagok mérésekor több probléma is felmerül. Egyrészt ezek a poliszacharid frakciók egyszerre tartalmaznak kisebb és nagyobb molekulatömegű molekulákat, emiatt a lézer energiája megoszlik. A kisebb

molekulatömegűek könnyebben kerülnek gázfázisba, vagyis a mért molekulatömeg eloszlás torzulhat a valódi eloszláshoz képest, hiszen a kisebb tömegű molekulák valódi részarányuknál intenzívebb csúcsot adnak a spektrumon. A nagyobb molekulatömegű frakciókat csak úgy sikerült megmérni, ha a kis tömegű ionok detektorba jutását megakadályoztuk (levágás). A legnagyobb molekulatömeg, amit sikerült meghatározni poliszacharid esetén 6000 Da, ami 36 glükózból felépülő dextransnak felel meg. Az eredmények szerepelnek Vig Attila diplomadolgozatában (2005).

#### **IV. Védőcsoportok stabilitása különböző mátrixok használata esetén**

A védőcsoportok stabilitása MALDI körülmények között különösen azon csoportok esetén okoz problémát, amelyek UV spektruma átfedést mutat az alkalmazott lézer 337 nm-es hullámhosszával. Ilyen pl. a 4-nitro-fenil és a 2-Cl-4-nitro-fenil csoport, amelyeket az enzimes szintéziseknél kromofor csoportként alkalmaztunk. Ezért modellvegyületként a 2-Cl-4-nitrofenil-maltoheptaoidot választottuk. Vizsgáltuk a mátrix minőségének (THAP, DHB, SA, Harmaline, ACCA), az alkalmazott lézer energiának és a mátrix minta arányának a hatását a fragmentációra. A CNP-glikozid elnyelési maximuma 302 nm-nél van, emiatt a lézer energiáját képes elnyelni, ami forrásban történő (In Source Decay) fragmentációt okoz. Ez a spektrumban a molekulaion  $[M+Na^+]$  csúcsa mellett 16 Da tömegegység eltéréssel új csúcs megjelenésével jár, melynek intenzitása DHB mátrix esetén nagyobb, mint a molekulaioné. A THAP mátrixal készült spektrumon az előző esettel ellentétben megváltozik a molekulaion és a fragment csúcsok aránya, a molekulaion intenzívebb csúcsot ad. Ez a jelenség a mátrixok kémiai tulajdonságaiból eredő különbségekkel magyarázható. A THAP több energiát nyel el az ionizációs fázisban, s így jobban védi a vizsgált molekulát a fragmentálódástól. A vizsgált többi mátrix a CNP-G7-el a DHB-hoz hasonló spektrumokat adott, s kivételt csak a THAP képezett.

Fragmentáció, vagy védőcsoport lehasadás figyelhető meg acetyl-, benzil- és azid- csoportot tartalmazó oligoszacharidok esetében is, főként DHB mátrixban történő méréskor. Annak tisztázása, hogy ez a jelenség a mátrix savas karaktere, vagy esetleg a lézer gerjesztő hatása miatt következik be még további méréseket igényel.

#### **V. Post source decay (PSD) fragmentációk vizsgálata**

Bár a MALDI kéméletes ionizálási technika, amely segítségével főként molekulaionok keletkeznek, kismértékű fragmentáció mindig történik. A repülési csőben bekövetkező fragmentáció lineáris TOF készülékben nem okoz új csúcsokat, míg a reflektoronnal felszerelt

készülékben PSD módban a fragmentáció vizsgálható. Oligoszacharidok esetében a glikozidos kötések hasítása viszonylag kis energiával megvalósítható. A töltést hordozó rész a redukáló végi vagy a nem redukáló végi fragment egyaránt lehet, sőt belső fragment ion is keletkezhet, ha mindkét végről hasadás történik. Ez lehetőséget ad oligoszacharidok szekvenálására. Kutatásaink ezen a területen kémiai és enzimatisz szintézissel előállított vegyületek, valamint természetes eredetű amiláz inhibitorok szerkezetfelfedését eredményezték.

- Több lépéses szintézissel előállítottak egy olyan elágazó tetraszacharidot (Oktil-(4-O-acetil-3,6-di-O-benzil-2-deoxy-2-ftálimido- $\beta$ -D glükopiranozil-(1-2)-3,4,6-di-O-benzil- $\alpha$ -D-mannopiranozil)-(1-3) (2,3,4,6-tetra-O-benzil- $\alpha$ -D mannopiranozil)-(1-6)-2,4-di-O-benzil- $\beta$ -D-mannopiranozil), ami N-glikánok oktil hídmolekulával ellátott oligoszacharid komponense. A hídmolekula a fehérjéhez való kapcsolást teszi lehetővé, míg maga a tetraszacharid további enzimatisz glikozilezések akceptoraként szerepelhet.

A PSD spektrumban főként Y típusú hasítással kapott fragmentek csúcsait figyelhettük meg. Leginkább a két mannóz egység közötti alfa(1-3) kötés hasad, két diszacharidot eredményezve, úgy, hogy a glikozidos O és a töltés a redukáló végi fragmenten marad. Kisebb intenzitással a nem redukáló végi monomerek hasadása is megfigyelhető és B típusú fragmentáció is történik. A PSD spektrum alapján az oligoszacharid szekvenciája igazolható volt.

- Az enzimatisz szintézisekhez kapcsolódóan is végeztünk PSD méréseket. A BSMA enzimmel katalizált reakcióban előállított termékek és a kiindulási donor akarbóz szerkezet igazolását végeztük el PSD fragmentációs vizsgálattal. A vizsgált 4 vegyület:
  - Akarbóz
  - akarviozinil-izomaltozil-spirotiohidantoin
  - N-akarviozinil-(izo)maltozil-N-benzil-karbamid
  - N-fenilacetil-akarviozinil-glukozil-glukozilamin

Valamennyi vizsgált vegyületnél Y és B típusú fragmentációt figyeltünk meg, néhány kis intenzitású C típusú fragment csúcsa is megjelent. A mérések alapján egyértelműen megállapítható volt, hogy az akceptor az akarbóz redukáló végi glükóz egysége helyére kapcsolódott. A legintenzívebb fragment csúcs az  $Y_2$  hasadáshoz tartozik. Az eredményeket a hannoveri First German-Hungarian Workshop-on elhangzott előadásban mutattuk be (2004) és közlemény összeállítását is tervezzük.

- Tanszékünkön folynak kinetikai vizsgálatok természetes eredetű amiláz inhibitorokkal. Ezek közül tanninok szerkezet felderítésére használtunk PSD módszert. A különböző eredetű tannin minták eltérő inhibíciós erősségének értelmezéséhez kerestünk és találtunk szerkezeti magyarázatot a minták komponenseinek PSD analízisével. Sikerült kimutatni, hogy a központi poliolhoz galluszsav dimer és trimer is kapcsolódhat. Vizsgáltunk kinasav és glükóz központi molekulát tartalmazó galotanninokat és pentagalloil-glükózt. Az eredmények közleményben történő összefoglalása folyamatban van.

## **VI. A neoglikoproteinek MALDI MS vizsgálata**

A Biokémiai Tanszéken és a DE-MTA Szénhidrátkémiai Kutatócsoportban az elmúlt években számos biológiai aktivitással rendelkező oligoszacharid szintézisét oldották meg. Ezek közül számos baktériumok sejtfalának építőeleme. Ezek az oligoszacharidok immunológiai szempontból haptének és makromolekuláris hordozókhoz kapcsolva antigénként funkcionálhatnak. Az oligoszacharidot a fehérjéhez (BSA, HSA...) kapcsoló hidmolekula kialakítható a fehérjén vagy az oligoszacharidon, esetleg mindkettőn. Így a fehérjét és a haptént egyaránt megóvó, enyhe körülmények között elvégezhető kapcsolással mesterséges bakteriális antigént hozhatunk létre. Meghatároztuk különböző neoglikoproteinek oligoszacharid tartalmát, amely meghatározó a sikeres immunválasz kiváltásában. Hidmolekula kialakítása a fehérjén:

- A fehérje amino csoportjainak felhasználásával telítetlen dikarbonsav imid származék állítható elő. Ehhez az oligoszacharidon kialakított konjugált kettős kötéssel végződő hidmolekula segítségével az oligoszacharid enyhe körülmények között kapcsolható. MALDI-MS méréssel meghatároztuk a fehérjén kialakított spacerok számát majd a sikeresen hozzákapcsolt oligoszacharidok (hexaszacharid) számát is.
- A fehérje amino csoportjainak felhasználásával bróm-acetamido csoportokat alakítottak ki, amihez a modellvegyületként használt oligoszacharidokat kapcsolták. Vizsgáltuk a kísérleti körülmények hatását a sikeresen fehérjéhez kötött cukorrészek számára. Ezzel a módszerrel maximum 25 cukormolekulát sikerült BSA-hoz kötni. A munkából diplomadolgozat készült (Farkas Katalin 2004).

Hidmolekula kialakítása az oligoszacharidon: A neoglikoproteinek szintézisét modellvegyületek segítségével Szurmai Zoltán és munkatársai vizsgálták olyan kísérleti körülményeket keresve, amelyek segítségével a kívánt számú oligoszacharid köthető a

fehérjéhez. Az általuk szintetizált neoglikoproteinek hordozó-epitop arányát mértük MALDI TOF módszerrel.

- Karboxil csoporttal végződő hidmolekula a fehérje amino csoportjaihoz kapcsolható. Modellvegyületként laktózt használtunk.
- Amino csoporttal végződő spacer a fehérje karboxil csoportjaihoz kapcsolható. A modellvegyület glükóz volt.
- Izotiocianát hidmolekula a BSA amino csoportjaihoz köthető. *Mycobacterium avium* oligoszacharidokat (két di-, egy trimer) kapcsolunk BSA-hoz. Vizsgáltuk a reakciókörülmények hatását a kapcsolt cukorrészek számára. Maximum 42 diszacharid kötődését sikerült elérni.
- Reduktív alkilezéssel a redukáló végi aldehid csoport felhasználásával a BSA amino csoportjaihoz köthető az oligoszacharid. A hidmolekula ilyenkor a "feláldozott" redukáló végi cukor pl. glükóz. Modellvegyületként cellobiózt használtunk. A kísérleti körülményektől függően 9-26 mól glükózt sikerült a fehérjéhez kötni.
- Ebből a munkából is egy diplomadolgozat készült (Sasi-Szabó Éva 2004).

Az eredményeket a 1st European Chemistry Congress poszter szekciójában is bemutattuk.

A *Mycobacterium* oligoszacharidok szintéziséről és fehérjéhez kapcsolásáról közlemény készül.

## **VII. A minta előkészítés és felvitel valamint a kísérleti paraméterek változtatásának hatása a spektrumra**

Ezekhez a vizsgálatokhoz a szabad oligoszacharidok modellvegyületeként  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  ciklodextrinek (CD) elegyét alkalmaztuk. A CD-ek vizes oldata viszonylag hosszú idő elteltével is stabil, jól kristályosodik a legtöbb anyaggal s jó intenzitású csúcsokat szolgáltat.

Mátrixként a következő vegyületeket vizsgáltuk: 2,5-dihidroxi-benzoészav, (DHB), 2,4,6-trihidroxi-acetofenon (THAP), 3,4-dihidro-7-metoxi-1-metil-9H-pirido-{3,4-b}-indol (egy  $\beta$ -Carboline származék későbbiekben Harmaline),  $\alpha$ -cyano-4-hidroxi-fahéjsav (ACCA), 3,5-dimetoxi-4-hidroxi-fahéjsav (SA).

A CD elegyet két különböző minta előkészítési módszerrel vizsgáltuk minden mátrix esetében (Dried-Droplet DD = Szárítósos cseppentéses és Fast evaporating Thin Layer FETL = Gyors szárítósos vékony rétegű technikák).

Összefoglalva elmondható, hogy a gyors szárítósos technikával (FETL módszer) a Harmaline és a THAP mátrixok adtak megfelelő tömegpontosságú, jó felbontású, kellően intenzív spektrumokat a ciklodextrinekkel. Ezzel ellentétben a másik, szárítósos-cseppentéses



technikával (DD módszer) az ACCA és DHB adott mind pontosság, mind felbontás szempontjából jól értékelhető spektrumokat.

Reflektron feszültség hatásának vizsgálata: Vizsgálataink során a már ismertetett CD elegyet DHB mártix alkalmazásával vittük fel a mintatartóra, s a minta előkészítésnél a Gyors szárításos=Vékony rétegű (FETL) módszert alkalmaztuk. Eredményeink szerint a reflektion-detektor feszültség növelésével intenzitás növekedés érhető el, de a felbontás romlik. Ezt a módszert kis koncentrációban jelenlévő komponensek mérésekor érdemes alkalmazni, amelyek kisebb feszültség használata mellett talán meg se jelennek a spektrumban.

Az OTKA pályázat beadásakor a Biokémiai Tanszék mellett működött az MTA-DE Szénhidrátkémiai Kutatócsoport több fiatal kutatóval, akik főként új szénhidrátszármazékok szintézisével foglalkoztak Dr. Lipták András professzor irányításával. A pályázat kutatási munkatervére az ő munkájukra is számítva készült, közülük négyen a közreműködő kutatók között is szerepeltek. A pályázati anyag értékelésében a fiatal kutatók bevonását, mint pozitívumot emelte ki az egyik bíráló. Sajnos az elmúlt években szembesülni kellett ennek hátrányaival is. A fiatal kollégák közül ketten PhD dolgozatuk megvédése után külföldre mentek posztdoktori ösztöndíjjal (Tóth Anikó 2004, Sajtos Ferenc 2005), egyikük szülés miatt nem folytatta tervezett kutatómunkáját (Csávás Magdolna 2004). Remenyik Judit szerződése 2005 decemberében lejárt, 2006 januárjától új munkahelyen teljesen más területtel foglalkozik. A változások egy részét részjelentéseimben már jeleztem. Nagy volumenű és eredményes munkát végzett a pályázat témaköréhez kapcsolódóan Víg Attila, aki diplomadolgozó hallgatóként 2004-ben kapcsolódott be a munkába, majd diplomamunkájának megvédése után a 2005/2006 tanévben demonstrátorként is folytatta ezt a munkát.

Kedvezőtlenül érintette a kutatások folytatását a Debreceni Egyetem Természettudományi Karán 2005 nyarán hozott intézkedés, amely szerint a 62 évet betöltött oktatókat nyugdíjba küldték. Tanszékünkön ez két oktatót is érintett, egyikük Dr. Kandra Lili jelen pályázatnak is résztvevője volt. A kutatásokban nyugdíjasként is részt vett. Ez az intézkedés magával vonta oktatási terheink növekedését és egyúttal a kutatásra fordítható idő csökkenését is.

Mindezen problémák mellett hátráltatta kutatásainkat a készülék meghibásodása (2004) és a Tanszék új épületbe költözése (2005). Mindkét esemény a nyári hónapokat érintette, többhónapos kiesést jelentve akkor, amikor az oktatási szünetben egyébként intenzívebb kutatómunkára van lehetőség. Ennek ellenére igyekeztem a munkatervben foglalt feladatokat elvégezni. Nem tudtuk lezárni a nem kovalens kölcsönhatások tanulmányozását, valamint a

védőcsoportok stabilitásának vizsgálatát különböző mátrixok jelenlétében. Számos próbálkozás ellenére a poliszacharidok molekulatömeg meghatározása területén is csak részeredményeket sikerült elérni. 6000 Da molekulatömeg felett nem tudunk poliszacharid molekulatömeget mérni, bár ebben az esetben a feladat nehézségét jelzi, hogy a szakirodalomban sincs ilyen tárgyú közlemény.

Az elvégzett kísérleti munka közleményekben való összefoglalása sem történt meg minden esetben, további publikálási terveinket a jelentésben jeleztem. A jelentés végén megtalálható azon előadások és dolgozatok jegyzéke amelyek konferencia kiadványban vagy elektronikus formában nem érhetők el.

A költségtervtől minden esetben az OTKA Iroda engedélyével tértem el: szervíz költségre, számítógép és nyomtató beszerzésére, valamint az utolsó évben dologi kiadásokra történő átcsoportosításra kértem és kaptam engedélyt. A fentebb felsorolt személyi változások miatt a személyi juttatások jóval alatta maradtak a tervezettnek.

#### **A pályázat témakörével kapcsolatos az irodalomjegyzékben fel nem tüntetett előadások:**

*1<sup>st</sup> Austrian-Hungarian Carbohydrate Conference 2003.09.24. Stadt Schlaining, Ausztria*

G. Gyémánt: Analysis of carbohydrates by MS. (előadás)

*First German-Hungarian Workshop 2004. június 5-6. Hannover*

Dr. Kandra Lili: Synthesis a novel inhibitor specific for human amylases (előadás)

Dr. Gyémánt Gyöngyi: Analysis of natural and synthetic  $\alpha$ -amylase inhibitors by MALDI-TOF MS. (előadás)

*Kémiai előadói napok 2004, október 25-27. Szeged*

Remenyik Judit, Kandra Lili, Lipták András: Oligoszacharidok szintézise a humán nyál amiláz Y151M mutáns enzimével (előadás)

*MTA Szénhidrátkémiai Munkabizottsági ülés, 2004. November 5. Debrecen*

Remenyik Judit, Kandra Lili, Gyémánt Gyöngyi, Lipták András, Somsák László, Batta Gyula: Akarbóz analógok szintézise Bacillus stearothermophilus amilázzal (előadás)

*Vegyészkonferencia 2005 Hajdusoboszló*

Remenyik J., Kandra L., Gyémánt Gy., Somsák L. Batta Gy., Kwan Hwa Park, Lipták A.  
Bacillus stearotherophilus maltogén amiláz (BSMA) katalizálta glikozilezések. (poszter)

*2<sup>nd</sup> Austrian Hungarian Carbohydrate Conference, Somogyaszaló 2005. 07. 24-26.*

Judit Remenyik, Lili Kandra, Gyöngyi Gyémánt, László Somsák, András Lipták

Towards the enzymatic synthesis of alpha-amylase inhibitors. (előadás)

G. Gyémánt, L. Kandra,

Hydrolytic and transferase activity of alpha-amylases. (előadás)

**A pályázat témakörével kapcsolatos diplomadolgozatok:**

Cziránku Beatrix: Enzimatis transzglykozilezések Bacillus licherniformis alfa-amiláz enzimmel 2003.

Sasi-Szabó Éva: Neoglikoproteinek előállítása és vizsgálata MALDI-TOF tömegspektrometriával 2004.

Farkas Katalin: Fehérje-szénhidrát konjugátumok előállítása 2004.

Matúz Krisztina: Mutáns alfa-amiláz katalizálta transzglykozilezés tanulmányozása 2004

Víg Attila: Szénhidrátok vizsgálata lágyionizációs tömegspektrometriai módszerrel 2005

Lengyel László: Alfa-amiláz inhibitorok szerkezetvizsgálata MALDI-TOF fragmentációs mérésekkel 2007 (összeállítása most történik).