

## ZÁRÓ SZAKMAI BESZÁMOLÓ

OTKA pályázat címe: **Fehérjék ligandumfelismerésének vizsgálata spektroszkópiai módszerekkel**

Vezető kutató: **Zsila Ferenc**

Csatlakozott kutatók: **nincs**

OTKA azonosító: **K69213**

Futamidő: **2007. 07. 01. – 2010. 12. 31.**

### 1. A PÁLYÁZAT TÉMÁJÁBAN ELÉRT EREDMÉNYEK

A pályázati munka során az OTKA Műszaki és Természettudományi Kollégium engedélyével részleges témamódosítás történt. A „*Foszfolipáz A<sub>2</sub> és biológiailag aktív kismolekulák nem-kovalens komplexeinek vizsgálata*” című téma kidolgozása helyett új humán dajkafehérjék (ún. chaperonok) kimutatására irányuló vizsgálatok történtek. A változtatás indoka az volt hogy a „*Molekuláris felismerés a calycin fehérjecsaládban*” című résztema kidolgozása során az egyik vizsgált fehérjének, az  $\alpha_1$ -savas glikoproteinnek (AAG) addig teljesen ismeretlen chaperon aktivitására derült fény.

A pályázat időtartamának fél éves meghosszabbítását kértem az avidin ligandumkötésének további jellemzése érdekében végzendő molekulamodellelési számításokhoz, az eredmények értékeléséhez, ill. a mindehhez szükséges alapfokú jártasság megszerzéséhez.

#### 1.1 Molekuláris felismerés a calycin fehérjecsaládban.

##### 1.1.1 Az avidin ligandumkötő tulajdonságainak vizsgálata

A kivételes erősségű biotin-avidin kölcsönhatás miatt az avidin fehérjéket igen széleskörűen alkalmazzák a biotechnológiában. Az alkalmazások körének szélesítése érdekében szükség van az avidin biotintól eltérő szerkezetű vegyületekre vonatkozó molekuláris felismerőképességének tanulmányozására is. Az avidin  $\beta$ -hordó architektúrájának centrumában elhelyezkedő ligandumkötőhely felépítésében részt vevő három triptofán aminosav (Trp70, Trp97, Trp110) jó lehetőséget biztosított a cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia alkalmazására. A ligandumkötődést a fehérje saját CD spektrumában fellépő jellegzetes változások kísérik. A távoli UV tartományban 228 nm-nél mérhető erős pozitív CD sáv intenzitáss nő avagy csökken, továbbá a sáv maximumhelye alacsonyabb vagy magasabb hullámhosszak felé tolódik el. Ezen jelenségek magyarázata az, hogy a központi

üregbe kötődő ligandum kromofórjának  $\pi-\pi^*$  elektronátmenetei intermolekuláris exciton csatolás révén kölcsönhatásba lépnek a kötőhely triptofán oldalláncainak elektronátmeneteivel, ami a 228 nm-es CD sáv intenzitásának és/vagy spektrális helyzetének módosulásában nyilvánul meg [1]. A közeli UV tartományban, 250 nm felett mért különbségi CD spektrumokban a ligandumkötődése a triptofán oldalláncok  $^1L_b$  elektronátmenetéhez tartozó, 292 és 286 nm körüli pozitív sávok megjelenését idézte elő [2]. A sztérikus kölcsönhatások miatt egy kismolekula kötődése a kötőhelyet alkotó aminosav oldalláncok konformációs mozgékonyságának csökkenésével jár. Az így előálló komplexben az avidin CD spektrumát dominánsan meghatározó triptofánok spektrális hozzájárulása megnő, hasonlóan egy szerkezetileg flexibilis királis molekula CD spektrumában erős lehűtés hatására észlelhető változásokhoz. A közeli UV tartományban mért CD spektrum változásai optikailag transzparens ligandumok avidinkötődésének kimutatását is lehetővé tették (pl. liponsav, mirisztinsav) [2]. A harmadik jelenség ami a 250 nm feletti tartományban fényabszorpcióra képes kromofórokkal rendelkező ligandumok esetében volt mérhető az ún. indukált CD sávok megjelenése a spektrumban. Ezek fellépése egyrészt az avidinkötőhely sztereokémiája által meghatározott királis ligandumkonformációra vezethető vissza (pl. bilirubin), másrészt a triptofán oldalláncok és a vendégmolekula kromofórjai közötti királis exciton csatolásra (pl. egyes festékek). Mindezen spektrális jelenségek mérésével több, szerkezetileg eltérő gyógyszermolekula, természetes vegyület és szintetikus festék avidinkötődését sikerült kimutatni, részleteiben vizsgálni és a kötődési állandókat kiszámítani [2]. Biotin felhasználásával végzett leszorításos CD mérések igazolták ezen vegyületeknek az avidin központi üregében való elhelyezkedését.

A kísérletes munka során azonosított avidin ligandumok közül néhány esetében a kötődés molekuláris részleteinek megismerése érdekében molekulamodelllezési számítások történtek. Az avidin kristályszerkezetének üregébe dokkolt kismolekulák nem-kovalens kölcsönhatásainak vizsgálata arra utalt, hogy a kötőüreg alján található poláris aminosavakkal (Asn12, Ser16, Tyr33, Thr35) létrejövő hidrogénhidkötések meghatározóak a ligandumok stabilizálásában [2]. A legjobb energiájú dokkolási eredmények ugyanis azok voltak amelyeknél a ligandum hidrofil csoportja (pl. flurbiprofen, mirisztinsav, flufénaminsav) az üreg alja felé nézett, ahol az említett oldalláncokkal többszörös H-hidat alakított ki. Ez a kötődési mód elsősorban olyan kismolekulák sajátja amelyek konformációjára a megnyúlt, lineáris forma jellemző, míg a kiterjedtebb, kettőnél több aromás/alifás gyűrűvel rendelkező vegyületek funkciós csoportjai sztérikus okok miatt a lefelé szűkülő üreg alját nem tudják elérni. Utóbbiak (pl. fenilbutazon, indometacin) feltehetően az üreg hurkokkal szegélyezett szélesebb bejáratának közelében kötődhetnek. A dokkolási eredmények minden esetben azt

mutatták hogy a dokkolt molekula aromás gyűrűi a kötőhely triptofán oldalláncait kevesebb mint 4 Å távolságra közelítik meg, ami jól alátámasztja a CD spektrumok elemzéséből levont következtetéseket [2].

Az avidin kötőhelyének jellegzetes aromás aminosav összetétele nemcsak az avidin, hanem a vele szoros szerkezeti rokonságot mutató sztreptavidin és egyéb avidinszerű fehérjék ligandumkötő sajátosságainak CD spektroszkópiás vizsgálatára is lehetőséget nyújt. A mérések során azonosított új avidin ligandumok kiindulásul szolgálhatnak a fehérje biotechnológiai alkalmazásainak kiterjesztéséhez. A távoli UV tartomány CD sávjának felhasználása a ligandumkötődés kimutatására [1] felhasználható lehet olyan, gyógyszercélpontként is ismert emberi (pl. komplement faktor, karbonsav-anhidráz B) állati (pl. kígyóméreg toxinok), bakteriális (pl. ribonukleáz), és virális fehérjéknél amelyek távoli UV CD spektruma az avidinéhoz hasonló.

### *1.1.2 Humán $\alpha_1$ -savanyú glikoprotein ligandumkötő tulajdonságainak vizsgálata*

A bilirubin-avidin kölcsönhatás vizsgálata során nyert tapasztalatok [2] adtak ötletet az avidinnel azonos fehérjecsaldába tartozó plazmafehérje, az  $\alpha_1$ -savanyú glikoprotein (AAG) epepigment kötésének tanulmányozására. Az AAG jelenlétében mért intenzív indukált CD spektrumok bizonyították a biliverdin és dimetil észtere erős kötődését, amely az AAG két fő genetikai variánsa közül az ún. 'F1/S' frakcióhoz rendelhető [3]. A bilirubin AAG kötődésének részletes vizsgálata a gyenge, erősen zajos CD sávok és aggregációs jelenségek miatt nem történt meg. CD leszorításos vizsgálatok igazolták hogy a pigmentek a fehérje központi üregében kötődnek. A számos biokémiai folyamatban fontos mediátornak tekintett biliverdin AAG kötődésének igazolása teljesen új eredmény amely hozzájárulhat a biliverdin biológiai aktivitása szabályozásának jobb megértéséhez.

Az AAG ligandumkötőhely szerkezeti sajátosságainak jobb megismerésében előrelépést jelentett az ismert AAG ligandumoktól mind szerkezetben mind méretben teljesen eltérő szerves aranykomplexek kötődésének CD spektroszkópiás kimutatása, amit a királis konformációban kötődő komplexek intramolekuláris exciton CD aktivitása tett lehetővé [4]. Az AAG központi üregében kötődő komplexek jelentős méretüknél (13×14×14 Å) fogva mintegy "kirajzolják" a kötőhely molekuláris dimenzióit. Ez egyben jelezte azt is hogy a kötőhely plaszticitása jóval nagyobb mint ahogyan azt az addigi fehérjemodellek leírták. Ebből kiindulva egy új AAG homológiamodellt állítottunk elő amelybe sikeresen dokkoltuk az aranykomplexeket. Mivel aranykomplexeket terápiás célból is alkalmaznak gyulladássos és daganatos betegségekben amelyekre jellemző az AAG szérumszintjének jelentős emelkedése, nagy affinitású aranykomplekxkötő képessége ( $K_a \approx 10^6 \text{ M}^{-1}$ ), ami pl. a szérumszint

albuminnál hiányzik, felveti az AAG arany-transzporterként való gyakorlati alkalmazásának lehetőségét.

Ugyancsak az AAG esetében vizsgáltuk kinolin és akridin típusú antimaláriás gyógyszerek kötődését, amelyet albuminhoz viszonyítva szelektívnek és nagy affinitásúnak találtunk [5]. Felismertük és jellemeztük a mefloquin enantiomerek AAG kötődésének sztereoszelektivitását. Igazoltuk az amodiakin, primakin és a kinakrin szelektív kötődését az AAG genetikai variánsain. Az eredmények gyakorlati vonatkozását az adja hogy maláriás megbetegedésekben jelentősen megnő az ún. akut fázis fehérjék szintézise. Mivel az AAG is ebbe a csoportba tartozik, megnövekedett szérumszintje módosíthatja az antimaláriás gyógyszerek biológiai hozzáférhetőségét, hatásosságát.

Az AAG gyógyszerkötőképességének további vizsgálata során egy farmakológiai szempontból kiemelkedő csoportot, a kinázgátló szereket tanulmányoztuk. Összesen 26, már a piacon ill. kísérletes fázisban lévő, jellegzetes szerkezeti típusokat képviselő kinázgátló AAG kötődésének CD spektroszkópiás vizsgálata történt meg [6]. Az esetek túlnyomó részében az optikailag inaktív gyógyszerek AAG kötődése indukált CD sávok megjelenéséhez vezetett amelyet felhasználtunk a kötődési állandók kiszámítására. A plazmafehérjekötődés teljesebb jellemzése érdekében a vegyületek szérum albumin kötődését is megmértük (affinitáskromatográfia ill. CD spektroszkópia). Az így kapott, a szakirodalomban eddig nem közölt adatok segítséget nyújtanak a különböző kinázgátlók farmakokinetikai viselkedésének jobb megértéséhez és ezzel az optimális terápiás protokoll kialakításához. A kinázgátlók AAG kötődésének fontosságát hangsúlyozza egy újabb megfigyelés, mely szerint daganatos sejtek is képesek termelni ezt a fehérjét, így nemcsak a vérplazmában hanem lokálisan a tumorszövetben is számolni kell az AAG jelenlétével és a daganatterápiában alkalmazott kinázgátlók szöveti szabad szintjére gyakorolt hatásával [7].

Fitos Ilona kolléganóm kezdeményezésére az anxiolitikus hatású magyar fejlesztésű (EGIS) deramciklan gyógyszermolekula AAG kötődésének CD spektroszkópiás vizsgálatában vettem részt, amely hozzájárult annak igazolásához hogy a vegyület egyaránt kötődik az AAG mindkét genetikai variánsához [8]. Az 'F1/S' frakcióhoz való kötődés dikumarol jelenlétében egy terner komplex kialakulásához vezet, amelyet a dikumarol indukált CD sávjainak előjelinverziója kísér, bizonyítva hogy az 'F1/S' variáns kötőzsebe képes két ligandum egyidejű befogadására. A CD titrálási adatok feldolgozása azt mutatta, hogy a terner komplexben a deramciklan AAG affinitása mintegy négyszeresére nő a dikumarol mentes állapotéhoz képest. Az eredmények arra hívják fel a figyelmet, hogy a fenti mechanizmussal váratlan gyógyszerkötődési interakciók léphetnek fel, amelyek különösen az AAG-hoz specifikusan, nagy affinitással kötődő gyógyszerek szabad vérszintjét befolyásolhatják.

## 1.2 Szérum akut-fázis fehérjék chaperon aktivitásának vizsgálata

A „*Molekuláris felismerés a calycin fehérjecsaldban*” című kutatási altéma kidolgozása során a plazma akut-fázis fehérjék közé tartozó AAG egy eddig teljesen ismeretlen, új sajátosságára derült fény. Az AAG képes más fehérjék fizikai és kémiai stresszhatások által kiváltott aggregációjának kivédésére, azaz ún. chaperon aktivitást mutat. A chaperonok (dajkafehérjék) kutatása ezidáig csaknem kizárólag a sejten belüli környezet fehérjéire irányult és csak a legutóbbi évek eredménye hogy az extracelluláris térben (vérplazma, szövetközi folyadék) is fellelhetők fehérjeaggregációt gátló chaperonok. Eddig csupán kevés ilyen fehérje vált ismertté (haptoglobin, kluszerin,  $\alpha_2$ -makroglobulin, fibrinogén) noha fontos szerepet töltenek be olyan folyamatokban mint pl. a gyulladáshoz és daganatos megbetegedések [9]. Az AAG az albumin mellett a vérplazma legfontosabb gyógyszerkötő fehérjéje, pontos élettani szerepe azonban nem ismert. Hasonlóan a plazma többi pozitív akut-fázis fehérjéjéhez, koncentrációja többszörösére növekszik a szervezetet ért különböző stresszhatások következtében. Mivel az eddig felismert extracelluláris chaperonok közül a haptoglobin, a fibrinogén és az  $\alpha_2$ -makroglobulin ugyancsak akut-fázis fehérje, ezért kézenfekvő feltételezésnek tűnt hogy az AAG szintén rendelkezhet ilyen aktivitással. Ennek kimutatására általánosan használt, hőindukált ill. kémiai úton előidézett (ditiotreitolt), fényszórásméréssel követett in vitro fehérjeaggregációs kísérleteket végeztem. Az AAG hatékonyan bizonyult különféle hőérzékeny enzimek (pl. aldoláz, kataláz, enoláz) és transzportfehérjék (ovotranszferrin, laktoglobulin) hőmérsékletemeléssel hatására bekövetkező aggregációjának gátlásában [10]. A fizikai stressz következményének kivédése mellett az AAG az inzulin kémiai úton kiváltott aggregációját is képes volt megakadályozni. Amint az a 10 Å átmérőnél nagyobb, közelítőleg gömb alakú szerves aranyvegyületekkel korábban végzett kötődési vizsgálatokból kiderült, az AAG molekula központi hidrofób ligandumkötő üregének bemeneti része meglehetősen tág [4]. Ez felvetette annak lehetőségét hogy a központi üreg szerepet játszik a fehérjeaggregáció gátlásában a kitekeredő polipeptidláncok felszínre kerülő apoláros szakaszaival való kölcsönhatás révén. Ennek ellenőrzésére a megismételt aggregációs kísérletek előtt az AAG kötőhelyét a fehérje egyes nagy affinitású ligandumaival telítettem. Az eredmények azt mutatták hogy az ilyen módon előkezelt AAG antiaggregációs hatékonysága teljesen megszűnt vagy drasztikusan csökkent, alátámasztva az előbbi feltételezést [10]. Az AAG chaperon aktivitásának kimutatása egy újabb taggal bővíti az extracelluláris dajkafehérjék csoportját és egyben hozzásegít ezen fehérje meglehetősen szerteágazó, különösen stresszállapotban betöltött élettani és patológiai szerepének

megértéséhez. Felhívja a figyelmet arra is hogy a lipokalin fehérjecsalád ahová az AAG tartozik további, ma még fel nem ismert dajkafehérjék forrása lehet. Itt említendő, hogy egy másik lipokalin, a prosztaglandin-D szintetáz chaperon aktivitásáról már korábban beszámoltak [11]. Az AAG chaperon aktivitásának felismerésével kapcsolatban egy gyakorlati hasznosíthatóság lehetősége is felmerül. Nevezetesen, a gyógyászatban alkalmazott terápiás fehérje és peptidkészítmények (pl. inzulin, kalcitonin, glukagon) tárolás során fellépő, a hatásosságot csökkentő önaggregációjának kivédése humán AAG hozzáadásával [12]. Ez nyilvánvalóan előnyösebb megoldás volna a jelenleg alkalmazott testidegen, különféle allergiás reakciók veszélyét hordozó kémiai aggregációgátlókkal szemben (pl. poliszorbát 80, PEG).

Az AAG mellett a vérplazma egy másik jellegzetes akut-fázis komponense a szerin-proteáz gátló (szerpín) fehérjecsaláddhoz tartozó szialoglikoprotein, az  $\alpha_1$ -antitripszin (AAT). Egyéb fehérjékkel együtt az AAT gyakran kimutatott összetevője az ún. konformációs betegségekben keletkező kóros fehérjeaggregátumoknak (pl. Alzheimer-kór), amit az endogén chaperon kapacitás kimerülésével hoznak összefüggésbe [13]. Ez a tény, és az AAG-val végzett sikeres antiaggregációs kísérletek adták az ösztönzést az AAT chaperon aktivitásának vizsgálatára. Az AAG-nál alkalmazott, némileg módosított eljárással (ditiotreitolt helyett acetitrilt felhasználva az aggregáció kiváltására) az AAT antiaggregációs sajátsága egyértelműen kimutatható volt. Az AAT nyolc különböző enzim és egy szerkezeti fehérje hőindukált és két enzim kémiai úton előidézett aggregációját egyaránt hatékonyan gátolta [13]. Feltehetően az AAT metastabil konformációjának fontos szerepe lehet a chaperon aktivitásban ugyanis sok dajkafehérje közös jellegzetessége a laza, plasztikus szerkezet amely lehetővé teszi a különféle, eltérő térszerkezetű károsodott fehérjékkel való kölcsönhatást. Mivel ez a metastabil szerkezet a több mint ezer, állatokban, rovarokban, növényekben, baktériumokban, sőt még vírusokban is megtalálható fehérjét magában foglaló szerpín család általános jellegzetessége, elképzelhető hogy a család más tagjai is képesek a fehérjeaggregáció gátlására. Ebbe az irányba mutatnak azok az adatok melyek szerint a fentebb említett konformációs betegségekre jellemző fehérjelerakódásokban további szerpínek, pl. antitrombin,  $\alpha_1$ -antikimotripszin, neuroszerpín is kimutathatók [13]. Az AAT mellett a szerpínek közül eddig egyedül a 47 kDa molekulatömegű hősokkfehérje (Hsp47) kollagénspecifikus chaperon funkciója ismert [14]. A pályázat pénzügyi kerete nem tette lehetővé további, meglehetősen drága humán szerpín fehérjék beszerzését a vizsgálatok kiterjesztése céljából.

### 1.3 A pályázati célkitűzésekhez szorosan nem kapcsolódó egyéb kutatási eredmények

#### 1.3.1 Új CD spektroszkópiás megközelítés az $\alpha$ -kimotripszin katalitikus helyén kötődő vegyületek kimutatására

A szerin proteázok jellegzetes képviselője az  $\alpha$ -kimotripszin, amely katalitikus centrumának része az ún S1-zseb, amelybe a szubsztrát peptidok aromás oldalláncai illeszkednek. A CD spektroszkópia kiváló eszköznek bizonyult aromás molekulák S1-zseb kötődésének kimutatására, mely vegyületek egyben az enzim potenciális gátlószerei is. Indukált CD sávok mérésével a kimotripszin eddig leírt szintetikus gátlószereitől merőben eltérő, növényi alkaloidok (berberin, szangvinarin, keleritrin, ellipticin, stb.) enzimkötődését sikerült igazolni és a kötődési állandókat meghatározni [15]. A CD módszer alkalmazásának az veti meg az alapját hogy az S1-üreg közvetlen közelében két triptofán oldallánc található (Trp172 és Trp215), melyek indolgyűrűi ún. nem-degenerált, királis exciton kölcsönhatásba lépnek a zsebbe kötődő molekulák aromás kromofórjaival. Mivel a két triptofán közül az egyik mindig megtalálható a rokon szerkezetű szerin proteázokban is (pl. trombin, tripszin) ezért a módszer kiterjeszhető ezen fehérjék ligandumkötésének tanulmányozására is. A tripszin esetében ennek bizonyítása meg is történt. A spektroszkópiai adatokból levonható következtetéseket molekulamodellelési számításokkal (dokkolás) egészítettük ki.

#### 1.3.2 Bilirubin-enzim kötődés CD spektroszkópiás vizsgálata

A hemoglobin katabolizmusának termékeként naponta jelentős mennyiségben keletkező bilirubin élettani és kóros folyamatokban (pl. bilirubin enkefalopátia) játszott szerepének molekuláris részletei javarészt ismeretlenek. Indukált CD spektrumok mérésével sikerült igazolni hogy a bilirubin specifikusan képes kötődni különféle enzimekhez [16]. Az intramolekuláris exciton csatolás útján fellépő CD sávok NADH hozzáadására mért intenzitáscsökkenése és eltűnése (alkohol dehidrogenáz, kataláz) a bilirubin és a koenzim közös kötőhelyért való vetélkedését jelezték, míg a glutamát dehidrogenáz és alkalikus foszfatáz esetében a NADH-bilirubin és AMP-bilirubin alloszterikus kötődési interakciók az indukált CD sávok inverzióját, ill. kismértékű csökkenését eredményezték. Az indukált CD aktivitás mérése gyors és egyszerű módszer a bilirubin-enzim kölcsönhatások vizsgálatára. A NADH-val tapasztalt kompetíció felveti annak lehetőségét hogy fiziológiai és kóros körülmények között a bilirubin az enzimek NADH (vagy katalitikus, pl.  $\alpha$ -kimotripszin) kötőhelyére kapcsolódva befolyásolja azok működését.

### 1.3.3 Atovakon és természetes hidroxinaftokinon vegyületek albuminkötődésének vizsgálata

Az antimaláriás hatású atovakon emberi szérum albumin (HSA) kötődésének CD és fluoreszcencia spektroszkópiás vizsgálata szerint a molekula nagy erősségű ( $K_a \approx 2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ) kötésében a HSA mindkét fő gyógyszerkötőhelye részt vesz [17]. A rendkívül rossz vízoldékonyságú atovakont a HSA kiválóan szolubilizálja amelyet az indukált CD sávok megjelenése mellett az abszorpciós spektrum feltűnő átalakulása is kísér. Az indukált CD sávok viselkedése arra utalt hogy a fehérje IIA és IIIA aldóménjeiben elhelyezkedő kötőzsebek mérete és plaszticitása lehetővé teszik az atovakon mellett más gyógyszermolekulák egyidejű kötődését is. Az atovakonnal szerkezetileg rokon két természetes eredetű hidroxinaftokinon vegyület (lapakol és lawson) gyengébb HSA kötődése a hidrofób kölcsönhatások fontosságára hívta fel a figyelmet.

### 1.3.4

Egy újonnan izolált növényi ekdiszteroid sztereokémiájának tisztázásában vettem részt CD spektrumok összehasonlító elemzése és az ún. oktánszabály alkalmazása révén [18].

### 1.3.5 Könyvfejezetek

Felkérésre a Wiley kiadónál elérhető „*Pharmaceutical Sciences Encyclopedia: Drug Discovery, Development, and Manufacturing*” című on-line referenciamű CD spektroszkópiáról szóló fejezetét írtam meg [19]. 2011-ben várható a fejezet megjelenése nyomtatásban is a „*Handbook of Analysis and Pharmaceutical Quality*” című kötetben.

A fehérjék ligandumfelismerésének témakörében egy könyvfejezet megírásában vettem részt, amelyben a likopin emberi és állati fehérjékhez való kötődésére vonatkozó ismereteket foglaltam össze [20].

## 2. A PÁLYÁZATHOZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓS EREDMÉNYEK

11 eredeti közlemény és 2 könyvfejezet jelent meg. További 2 kézirat bírálat alatt van.



### 3. IRODALOMJEGYZÉK

- [1] F. Zsila, Novel circular dichroism spectroscopic approach for detection of ligand binding of proteins: avidin as example, *Anal. Biochem.* 391 (2009) 154-156.
- [2] F. Zsila, Aromatic side-chain cluster of biotin binding site of avidin allows circular dichroism spectroscopic investigation of its ligand binding properties, *J. Mol. Recogn.* submitted.
- [3] F. Zsila, G. Mády, Biliverdin is the endogenous ligand of human serum  $\alpha_1$ -acid glycoprotein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 372 (2008) 503-507.
- [4] F. Zsila, Z. Bikádi, E. Hazai, Á. Simon, I. Fitos, G. Mády, Organogold complexes probe a large  $\beta$ -barrel cavity for human serum  $\alpha_1$ -acid glycoprotein, *Biochim. Biophys. Acta* 1784 (2008) 1106-1114.
- [5] F. Zsila, J. Visy, G. Mády, I. Fitos, Selective plasma protein binding of antimalarial drugs to  $\alpha_1$ -acid glycoprotein, *Bioorg. Med. Chem.* 16 (2008) 3759-3772.
- [6] F. Zsila, I. Fitos, G. Bencze, G. Keri, L. Orfi, Determination of human serum  $\alpha_1$ -acid glycoprotein and albumin binding of various marketed and preclinical kinase inhibitors, *Curr. Med. Chem.* 16 (2009) 1964-1977.
- [7] S.Y. Lee, J.W. Lim, Y.M. Kim, Effect of  $\alpha_1$ -acid glycoprotein expressed in cancer cells on malignant characteristics, *Mol. Cells.* 11 (2001) 341-345.
- [8] I. Fitos, J. Visy, M. Simonyi, G. Mády, F. Zsila, Selective binding interactions of deramciclone to the genetic variants of human  $\alpha_1$ -acid glycoprotein, *Biochim. Biophys. Acta* 1800 (2010) 367-372.
- [9] M.R. Wilson, J.J. Yerbury, S. Poon, Potential roles of abundant extracellular chaperones in the control of amyloid formation and toxicity, *Mol. Biosyst.* 4 (2008) 42-52.
- [10] F. Zsila, Chaperone-like activity of the acute-phase component human serum  $\alpha_1$ -acid glycoprotein: Inhibition of thermal- and chemical-induced aggregation of various proteins, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20 (2010) 1205-1209.
- [11] T. Kanekiyo, T. Ban, K. Aritake, Z.L. Huang, W.M. Qu, I. Okazaki, I. Mohri, S. Murayama, K. Ozono, M. Taniike, Y. Goto, Y. Urade, Lipocalin-type prostaglandin D synthase/ $\beta$ -trace is a major amyloid  $\beta$ -chaperone in human cerebrospinal fluid, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 (2007) 6412-6417.
- [12] T. Rasmussen, R. Tantipolphan, M. van de Weert, W. Jiskoot, The molecular chaperone  $\alpha$ -crystallin as an excipient in an insulin formulation, *Pharm. Res.* 27 (2010) 1337-1347.
- [13] F. Zsila, Inhibition of heat- and chemical-induced aggregation of various proteins reveals chaperone-like activity of the acute-phase component and serine protease

- inhibitor human  $\alpha_1$ -antitrypsin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 393 (2010) 242-247.
- [14] J.J. Sauk, N. Nikitakis, H. Siavash, Hsp47 a novel collagen binding serpin chaperone, autoantigen and therapeutic target, *Front. Biosci.* 10 (2005) 107-118.
- [15] F. Zsila, J. Kámán, B. Bogányi, D. Józsvai, Binding of alkaloids into the S1 specificity pocket of  $\alpha$ -chymotrypsin: Evidence from induced circular dichroism spectra *Org. Biomol. Chem.* submitted.
- [16] F. Zsila, Circular dichroism spectroscopy is a sensitive tool for investigation of bilirubin-enzyme interactions, *Biomacromolecules* 12 (2011) 221-227.
- [17] F. Zsila, I. Fitos, Combination of chiroptical, absorption and fluorescence spectroscopic methods reveals multiple, hydrophobicity-driven human serum albumin binding of the antimalarial atovaquone and related hydroxynaphthoquinone compounds, *Org. Biomol. Chem.* 8 (2010) 4905-4914.
- [18] M. Takács, A. Simon, E. Liktor-Busa, M. Báthori, F. Zsila, Z. Bikádi, P. Horváth, G. Veress, A. Gergely, G. Tóth, Structure and stereochemistry of novel ecdysteroids from the roots of *Serratula wolffii*, *Magn. Reson. Chem.* 48 (2010) 386-391.
- [19] F. Zsila, Electronic Circular Dichroism Spectroscopy, in: S. Gad (Ed.), *Pharmaceutical Sciences Encyclopedia: Drug Discovery, Development, and Manufacturing*, John Wiley & Sons, Inc., 2010, p. 61.
- [20] Z. Bikádi, P. Hári, E. Hazai, S. Lockwood, F. Zsila, Non-covalent Binding of Lycopene and Lycophyll, in: V. Preedy, R. Watson (Eds.), *Lycopene: Nutritional, Medicinal and Therapeutic Properties*, Science Publishers, 2009, pp. 65-81.