



BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM

Szerves Kémia és Technológia Tanszék

Prof. Poppe László

BÍRÁLAT

GYÉMÁNT GYÖNGYI

“SZÉNHIDRÁTOKON AKTÍV ENZIMEK SZERKEZETE, AKTIVITÁSA ÉS GÁTLÁSA”

című MTA Doktori értekezéséről

(Debreceni Egyetem,

Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszék, 2023)

BÍRÁLÓ: DR. POPPE LÁSZLÓ, egyetemi tanár

(MTA doktora, BME Szerves Kémia és Technológia Tanszék)

DR. GYÉMÁNT GYÖNGYI a Debreceni Egyetem, Természettudományi és Technológiai Kar, Kémiai Intézet, Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék egyetemi tanáráként nyújtotta be MTA Doktori értekezését, ahol vezetésével folyik a szénhidrát anyagcserében résztvevő enzimek tanulmányozása. A kutatócsoportja által vizsgált α - és β -amilázok és további glikoenzimek a cukorbetegség, fogszuvasodás, elhízás és hiperlipémia kezelésének célpontjai lehetnek.

DR. GYÉMÁNT GYÖNGYI munkásságáról egy 99 oldal terjedelmű, magyar nyelven megírt értekezésben számol be. Az értekezés felépítése a kémiai és biokémiai területekről szóló közleményeknek megfelelő: *1. Bevezetés, célkitűzés* – *2. Irodalmi áttekintés, előzmények* – *3. Vizsgálati módszerek* – *4. Tudományos eredmények* – *5. Összefoglalás* – *6. Irodalomjegyzék* részekre tagolt. Az értekezés alapját a PhD fokozat megszerzése után nemzetközi folyóiratban megjelent 36 közlemény közül a 2006 után megjelent 26 közlemény képezi. A tartalom és a tudományos eredmények összefoglalását egy tízoldalas téziszűzet segíti, amely tartalmazza a szakterületnek megfelelő szcientometriai mutatók táblázatos összefoglalását.

Az értekezés az *1. Bevezetés, célkitűzés* fejezet után a *2. Irodalmi áttekintés, előzmények* fejezet öt alfejezetében (*2.1. Szénhidráton ható enzimek – CAZy (Carbohydrate Active enZyme) adatbázis; 2.2. Glikozid-hidrolázok, a szénhidráton ható enzimek legnagyobb családja; 2.3. Szénhidrát átalakító enzimek aktív helyének topológiája; 2.4. A vizsgált enzimek biológiai funkciója, szerkezete, csoportosítása; 2.5. Alhely térkép az enzimek aktív hely szerkezetének jellemzésére*) 16 oldalon, 151 releváns irodalmi hivatkozás felhasználásával összefoglalja a kapcsolódó eredményeket és tömören vázolja a célkitűzéseket. Ezt követően a *3. Vizsgálati módszerek* fejezet 1 oldalon ismerteti az értekezéshez kapcsolódó fehérjék, szubsztrátok és inhibitorok előállítási és vizsgálati módszereit (ennek rövideje és átfogó jellege indokolt, hiszen a felhasznált 26 közleményben a kísérleti leírások részletesen megtalálhatóak). A *4. Tudományos eredmények* fejezet négy alfejezetében (*4.1. Poliszacharid hidrolázok szerkezetének felderítése; 4.2. Enzim katalizálta szintézisek; 4.3. Glikoenzimek új aktivitásmérési módszerei; 4.4. α -Amilázok gátlásának vizsgálata*) tárgyalja a munka négy, egymással csak lazán összefüggő területeit. Bíráló egyetért a tematikai szempontok alapján történő négy alfejezetre bontással. Az értekezés lezárásaként az *5. Összefoglalás* fejezet három oldalon, az egyes területeknek megfelelő négy pontban foglalja össze a munka eredményeit.

Az öt, a munkával összefüggő alfejezetet tartalmazó „*Irodalmi áttekintés, előzmények*” elsőként a szénhidráton ható enzimek átfogó bevezetését célozza a CAZy (Carbohydrate Active enZyme) adatbázis bemutatásával, amely elsősorban szerkezeti és működésmechanizmus alapú szempontok alapján épül fel. Az adatbázisban megkülönböztetett csoportok a glikozid hidrolázok (GH), a glikozil-transzferázok (GT) a poliszacharid liázok (PLs), a szénhidrát észterázok (CEs) és a kiegészítő aktivitások (AAs). Megállapítja, hogy a fehérjék feltekeredése (folding) jobban konzervált, mint a szekvenciáik, tehát

vannak olyan szekvenciák melyek egynél több családnak kapcsolódnak, és a szerkezeti meghatározások a különböző családok tagjai közötti hasonlóságot mutattak. Ez az oka annak, hogy például a GH enzimek közé tartozó α -amilázok a GH13 családba tartoznak, együtt néhány, az EC besorolás szerint nem hidroláz enzimmel, mint pl. a trehalóz szintáz (EC 5.4.99.16) vagy a szukróz foszforiláz (EC 2.4.1.7). A második alfejezet a glikozid-hidrolázokat, mint a szénhidrátokon ható enzimek legnagyobb családját ismerteti, bemutatva a glikozidos kötés sav katalízissel történő enzimikus hidrolízis Koshland szerinti két fő mechanizmusát, melyek (a) az anomer konfiguráció inverzióját vagy (b) retencióját eredményezik. A harmadik alfejezet és a 4. ábra a szénhidrátokon ható enzimek aktív/kötőhelyek topológiáját (zseb / árok / alagútszerű / és alagút) mutatja be. Az ezt követő negyedik alfejezetben foglalkozik a vizsgált enzimek biológiai funkciójuk és szerkezetük szerinti csoportosításával, Ebbe az alfejezetbe kerültek az α -amilázokkal, a biofilm képződéssel kapcsolatba hozható enzimek, elsősorban a β -N-acetil-glükózaminidázokkal, valamint a glikogén foszforiláz enzimekkel kapcsolatos információk is. Az ötödik, a bevezető részt záró alfejezet mutatja be az enzimek aktív hely szerkezetének jellemzésére alkalmas alhely térkép készítési módszert, melynek elkészítéséhez a szubsztrátokból és modellszubsztrátokból képződő termékegyek analízise szolgált alapul. A módszer alapján fejlesztették ki szabadon elérhető SUMA (SUbsite Mapping of α -Amylases) számítógépes programot. Bemutatta a program alkalmazhatóságát sertés pankreász α -amiláz (PPA), rizs α -amiláz (Amy3D), és árpa α -amiláz izoenzim (AMY1) különböző mutánsainak elemzése során. Az irodalmi előzmények bemutatása logikus sorrendet követ és alkalmas arra, hogy bevezesse az olvasót a ténylegesen elért eredmények értelmezésébe.

A 4. Tudományos eredmények fejezet négy fő részben mutatja be az elért eredményeket. Az első „Poliszacharid hidrolázok szerkezetének felderítése” alfejezet címe kissé félrevezető, hiszen az itt bemutatott esetekben az enzimek és mutánsaik vizsgálata során nem szerkezetfelderítés, hanem inkább szerkezet-hatás összefüggések felderítése volt a cél. Az olvasás során öröndetes volt látni, hogy a kísérletes analitikai módszereket hogyan ötvözték e munkák során különböző együttműködések felhasználásával a mutációkat eredményező molekuláris genetikai módszerekkel és röntgenkristallográfiai szerkezetmeghatározással, valamint számítógépes molekulamodelllezési módszerekkel. Ez utóbbi igen ígéretes lehetőség arra, hogy a fehérjeszerkezetek jóslását elősegítő programok (AlphaFold) erőteljes fejlődésével generálható 3D szerkezeteket a SUMA programmal kombinálva térbeli alhelytérképek hozhatók létre. Bemutatta, hogyan alkalmazta ezeket a módszereket a burgonyabogár α -amiláz (LdAmy) működésének pontosabb megismeréséhez, a kísérletekhez a rovarból izolált enzimet felhasználva. Az eredmények szerkezeti értelmezéséhez az LdAmy AlphaFold modellt a humán nyál α -amiláz (HSA) ismert szerkezetével vetette össze. Ezután ismertette az *exo* hatásmódú édesburgonya eredetű β -amiláz (EC 3.2.1.2) hasonló módszerekkel történt vizsgálatait során elért eredményeket. A hasítási képek alapján felállított kinetikai reakció modellekkel előre jelzett értékek jó egyezést mutattak a kísérleti értékekkel. Végezetül betekintést kaphatunk egy másik az *exo* hatásmódú enzim, az *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* szájban előforduló patogén mikroorganizmus által termelt Dispersin B hidrolitikus hatásának vizsgálatába. Mivel a Dispersin B a biofilmet felépítő N-acetil-glükózamin (GlcNAc) egységekből álló poliszacharid lebontására képes, fontos szerepet játszhat a mikroorganizmus biofilmből történő kiszabadulása során. A Debreceni Egyetem-MTA Szénhidrátkémiai Kutatócsoporttal együttműködve vizsgálták jelölt oligomerek hasítását NMR, HPLC és MALDI-TOF mérésekkel. A hasítási képek alapján felállított kinetikai reakció modell jól felhasználható volt további vizsgálatokban.

A második, „Enzim katalizálta szintézisek” alfejezet az amiláz enzimek mutánsainak hidrolitikustól eltérő aktivitását vizsgálja, amely egy újabb felhasználási lehetőségként ezen enzimek oligoszacharid szintézisekhez történő alkalmazását célozza. Ezt a lehetőséget az árpa AMY1 izoenzim különböző mutánsai között a hidrolízis vizsgálatok során fellelt, kiemelkedő transzglykozilezési aktivitású variáns alapozta meg. A transzfer reakcióban metil-umbelliferil (MUB)- β -Glc akceptort használva vizsgálták az akceptor koncentráció, a pH, a donor tagszáma, és koncentrációja, valamint a szerves oldószer (DMSO) koncentráció hatását. Az izolált 2-5 tagszámú α -MUB aglikont tartalmazó termékeket BSMA, HSA és BLA enzimek tanulmányozása során lehetett felhasználni. Hasonlóképpen vizsgálták az LdAmy

burgonyabogár α -amiláz szintetikus (transzferáz) aktivitását is. Szekvencia és szerkezeti adatok felhasználásával értelmezték a rovar eredetű enzimek megnövekedett transzferáz aktivitásának okát.

A harmadik „*Glikoenzimek új aktivitásmérési módszerei*” alfejezet a szénhidrát manipuláló enzimek körében alkalmazott újszerű vizsgálati módszerek alkalmazásával foglalkozik. Az ITC módszereket elterjedten használják kötődési vizsgálatokra, de enzimkinetikai mérésekre kevesebb példa van. Ezt a lehetőséget vizsgálta az α -amilázok keményítő bontásának ITC módszerrel történő kinetikai vizsgálataiban. Szabad oligomerek és aromás csoporttal módosított oligomerek enzimreakció sebességének ITC-alapú mérésével meghatározott kinetikai konstansok jó egyezése jelezte, hogy a módszer felhasználható jelölésmentes oligomerekkel történő vizsgálatokra. Hasonlóan vetette össze a glükóz egységek hidroxil csoportjain reaktív antrakinon festékekkel (Remazol Brilliant Blue) kovalensen módosított oligomerek hidrolízisét a szabad oligomerekkel, és megállapította, hogy itt az aromás festékanyag kötőset javító hatása jelentősen gyorsítja a hidrolízist, így az jelentősen gyorsabbá válik a szabad oligomerekhez képest. Az ITC módszer végezetül hasznos eszköznek bizonyult egy megfordítható reakciót katalizáló enzim (nyúl vázizom eredetű glikogén foszforiláz, rmGFb) esetében is aktivitásmérésre és gátlás vizsgálatokra. Itt kifejezetten előnyös a jelölésmentes szubsztrátok alkalmazhatósága a megfordítható reakció mindkét irányában, mivel kimutatható volt, hogy a 2-klór-4-nitrofenil (CNP) jelölő funkció szubsztrát gátlást okozhat. Ezek után ismerteti a CNP jelölő funkcióval ellátott oligomerek felhasználását α -amiláz HPLC-alapú aktivitásmérésen alapuló kinetikai és gátlási vizsgálatokra.

Ezek a módszerek szolgálták alapul a negyedik „ *α -Amilázok gátlásának vizsgálata*” alfejezet vizsgálataihoz, amelyek szénhidrát manipuláló enzimek gátlását célozták. A vizsgálatok közt említést érdemel a tannin komponens pentagalloyl-glükóznak (PGG) HSA fehérjéhez kötődési sajátságainak vizsgálata kinetikai analízissel, felületi plazmarezonanciás (SPR) kötődési vizsgálattal és telítés átviteli különbség mérésen (STD) alapuló NMR mérésekkel. Mivel a tanninok sokféle fehérjével képesek kölcsönhatásba lépni, felmerült a nem specifikus gátlás lehetősége, pl. tannin aggregáció alapú hatások miatt is. Ezt a lehetőséget a PPA példáján több biokémiai módszerrel is behatóan tanulmányozta. A gátló hatás detergens jelenlétében történő csökkenése az ITC alapú mérések során aggregáció-alapú hatásra utalt. Az ITC aktivitásmérés kedvező tulajdonságait felhasználva vizsgálta számos olyan vizes növényi kivonat gátló hatását, melyek fizikai jellemzői (pl. szín, rossz oldékonyság) lehetetlenné teszik a szokásos spektrofotometriás módszerek alkalmazását. A vizsgált 25 fűszernövény közül 22 gátolta a HSA-t, 15 esetben mérhető IC_{50} értékkel. Az eredmények értelmezéséhez a HSA kísérleti szerkezet (1MFV) akarbózzal alkotott komplexét használva alapul, dokkolási vizsgálatokat végeztek a cianidin-3-glükozid és -rutinozid, valamint a malvidin-3,5-diglükozid ligandumokkal és értelmezték az eltérő kötődési módokat. Végezetül molekuláris dokkoláson alapuló virtuális szűrést használtak új gátlószerkezet azonosítására. A kutatások során több gátlószer és amiláz felhasználásával farmakofór modelleket készítettek, majd a modellek segítségével 1.346.275 vegyületből kiszűrt 299 jelöltet dokkolták a humán pankreasz amiláz (HPA PDB: 3OLE) szerkezetbe. A dokkolások alapján kiválasztott 7 vegyületből 5 esetben kaptak μ M nagyságrendű gátlási állandókat HSA enzim és GalG2CNP szubsztrát alkalmazásával. A vizsgált vegyületekből azonban csak egy (a **19** számú tiazol származék) mutatott $IC_{50}= 100 \mu$ M gátlást ITC alapú keményítő mérés során, ami jelezte a kismolekulás szűrések korlátait és ellenőrzésük szükségességét. Mivel a találatok közt szereplő tiazol és tiazolidindion vegyületeket korábban már több célponton is hatékony gátlószernek találták, hét, ilyen szerkezetet tartalmazó (5-arilidén-4-oxo-2-tioxotiazolidin-3-il)ecetsavszármazékot vizsgáltak a PPA mellett α -glükozidázzal is, a közvetlen gátlás mellett az aggregációs viselkedést is figyelembe véve. A vizsgált vegyületek közül a leghatékonyabb $IC_{50}= 62-66 \mu$ M gátlást mutatott mindkét enzimmel, aggregációs hatás nélkül.

Az alfejezetek nagyjából megfelelnek a jelölt közleményiben vizsgált kérdésköröknek. Megállapítható volt, hogy a vizsgált területeken felmerülő, jól kiválasztott témákat igényes, sokoldalú megközelítéssel alapuló módszerekkel vizsgálta és a vizsgálatok alapján érdemi és előremutató következtetéseket vont le. Ezekkel kapcsolatban különösebb formai kifogásom sincs, csupán a bírálat végén megfogalmazott észrevételek / kérdések merültek fel bennem.

Apróbb formai észrevételek az értekezéssel kapcsolatban:

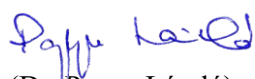
- Az atomtípusokra utaló rövidítések dőltek: pl. 5. oldal: ... *N*-acetil ..., 6. oldal ... *O*-glikozidázok ... *N*-glikozidázok ... *S*-glikozidázok ... és későbbi esetek;
- Az **1. ábra**, **2. ábra** esetében saját készítésű, jobb felbontású ábrák elegánsabbak lettek volna, az 1. ábra félig kitakart magyarítása sem elegáns;
- Kicsit elnagyolt a hivatkozások formázása, pl. a 45. hivatkozás címében „*A*-Amylase ...”, az „*α*-Amylase ...” helyett.

Felmerült észrevételek és kérdések:

1. A prokarióta és eukarióta eredetű enzimek közt jelentős eltérést okoz(hat) az eukarióta enzimek nagyobb fokú poszttranszlációs módosulása (pl. nagyobb fokú glikoziláltság). Van-e valamilyen információ erről a vizsgált α -amilázok (és további enzimek) esetében? (Ennek lehet jelentősége abban az esetben, ha a vizsgálatokhoz felhasznált enzim rekombináns bakteriális expressziós eredetű).
2. Mennyire stabilak ezek az enzimek a termék-eloszlási vizsgálatok során? Befolyásolhatja-e az eredményeket inaktíválódott, ám kötésre még képes formák jelenléte?
3. A saját munkák harmadik alfejezetében először bemutatja, hogy a 2-klór-4-nitrofenil (CNP) jelölő funkció a nyúl vázizom eredetű glikogén foszforiláz (rmGFb) vizsgálatához felhasznált oligomer szubsztrátok esetében szubsztrát gátlást okozhat. Ezek után ismerteti a CNP jelölő funkcióval ellátott oligomerek felhasználását α -amiláz HPLC-alapú aktivitásmérésen alapuló kinetikai és gátlási vizsgálatokra. Itt nem számít a módosító? Mennyire vizsgálták?
4. A gátlószerek vizsgálatai során több esetben is alkalmaztak nagyméretű, viszonylag flexibilis ligandumokat. Mennyire érvényesül a Koshland féle indukált illeszkedés ezeknél az enzimeknél és hogyan kezelték az enzimet a dokkolások során? Saját tapasztalat alapján nagyobb konformációs teret fed le nagy és flexibilis ligandumok dokkolása esetén az eljárás, ha több kiinduló konformációból, több dokkolási sorozat készül. Az értekezésben bemutatott esetekben hogyan jártak el (ez inkább az értelmező munka, mint a virtuális szűrés esetén fontos)?

Az értekezés hozzám eljutott példányában sajtóhibát, apróbb formai, stilisztikai hibákat és fogalmazásbéli pontatlanságot csak mérsékelt számban találtam (ezekből csak néhányat említettem). A bevezető elemzésből és a kísérletek leírásból kitűnik, hogy az értekezés komoly, igényes, összetett és önálló elemző és kísérleti munkán alapul. A frissen lekért és a tézisfüzet táblázatában szereplő adatok szerint Dr. Gyémánt Gyöngyi PhD fokozatának megszerzése óta 82 közleményt jelentetett meg (IF >159; 67 SCI közlemény, ebből 18 esetben levelező szerző), 1 szabadalomban társhelfaláló. Önhivatkozások nélküli idézettsége 1326, az öt legmagasabb idézettségű munkájára önhivatkozások nélkül 397 hivatkozást kapott, összidézettség alapján számított H-indexe 22. Ezek az adatok messze meghaladják a Szerves és biomolekuláris kémia terület minimumkövetelményeit (SCI publikációk és szabadalmak száma >35; IF >80; független SCI idézetek >200), tehát az értekezés tudományos tartalmának mennyisége megkérdőjelezhetetlen. Az értekezésben foglaltakat tudományos tartalmukat illetően is értékesnek és igen tiszteletre méltó teljesítménynek tartom. Az értekezés MTA Doktora cím megszerzéséhez szükséges nyilvános vitára bocsájtását és sikeres védést követően az MTA Doktora cím odaítélését melegen javaslom.

Budapest, 2024. október 17.



(Dr. Poppe László)