

HIVATALOS BÍRÁLAT

Dr. Gyémánt Gyöngyi, PhD

„SZÉNHIDRÁTOKON AKTÍV ENZIMEK SZERKEZETE, AKTIVITÁSA ÉS GÁTLÁSA”

címmel elkészített akadémiai doktori értekezéséről

Dr. Gyémánt Gyöngyi doktori értekezését 100 gépelt oldalon készítette el, és azt 2023-ban nyújtotta be a Magyar Tudományos Akadémia Doktori Tanácsához az akadémiai doktori cím elnyerése érdekében.

A tudományos munkásság egy átfogó jellegű biokémiai vonatkozású téma, a szénhidrátátalakító enzimek szerkezetének és működésének minél alaposabb megismerésére szolgál. A munka során különböző amiláz enzimek szerkezeti tulajdonságainak megvilágításával, szubsztrátok kemoenzimatiszintézisével, és enzim-aktivitás gátlók jellemzésével foglalkozott.

Az értekezés fejezetei, a *Címlapot* követve, *Rövidítések jegyzéke* 1 oldal, *Tartalomjegyzék* 1 oldal, *Bevezetés, célkitűzés* 2 oldal, *Irodalmi áttekintés, előzmények* 16 oldal, *Vizsgálati módszerek* 1 oldal, *Tudományos eredmények* 61 oldal, *Összefoglalás* 3 oldal, *Irodalomjegyzék* 13 oldal, *Köszönetnyilvánítás* 1 oldal. Az értekezés 55 számozott ábrát és 15 számozott táblázatot tartalmaz.

Az értekezés, a felsorolt fejezet-címeket megfigyelve, formáját tekintve bizonyos fokig eltér az általánosságban szokásos alaki szerkezetektől, elsősorban bizonyos fejezetek határozott megformálásának hiánya miatt, ugyanakkor tartalmában is egy – véleményem szerint – *sajátos szöveges leírását* adja az elvégzett munkának, és azok értékelésének.

Az értekezés mellett egy 11 gépelt oldalt tartalmazó *TÉZISEK* is készült, amely a *Bevezetés és célkitűzés, Kísérleti módszerek, Új tudományos eredmények, Az eredmények hasznosíthatósága* fejezeteket tartalmazza. Ebben a tézisfüzetben olyan összefoglalása szerepel az eredményeknek, amely hasonló módon nem szerepel az értekezésben, valamint (csak) itt található *Az értekezés alapjául szolgáló közleményeknek* a (megjelenés időrendjében megadott) jegyzéke is. E két utóbbi

fejezetnek az értekezésbe történő belefoglalása előnyösen segíthetné (segíthette volna) a kimondottan nagyszámú kísérlet áttekintését és értelmezését.

A *Bevezetéssel* összekapcsolt *célkitűzések* jól visszaadják a több évtizedes kutatásban tervezett feladatokat. Az *Irodalmi áttekintés, előzmények* fejezetben a szénhidráton ható enzimek osztályozásához és elemzéséhez szükséges szakirodalmi háttérrel tartalmazza, így a tárgyalja glikozid-hidrolázok általános jellemzését, a szénhidrát-átalakító enzimek aktív helyének korábbi leírását, és a vizsgált enzimek biológiai funkcióját és szerkezetét. Egy önálló alfejezet a jelölt és munkatársai által kidolgozott alhely-térképezéshez kifejlesztett, a katalitikus hely pozíciójának és az alhelyek számának meghatározásához, illetve az alhelyek kötési energiájának számításához használt SUMA (Subsite Mapping of α -Amylases) programot írja le. Itt jegyzem meg, hogy az egész értekezésben – így ebben a részben is – hiányoznak a felhasznált ábrák hivatkozásai, amelyeknek megadása lényegesen könnyebbé tenné a tartalom nyomon követését és pontos értelmezését.

A *Vizsgálati módszerek* fejezet a kísérleti és elméleti munkában felhasznált módszereknek és kísérleti körülményeknek a közleményekben megadott leírásaira tesz nagyon rövid és nem részletezett utalást. A kísérleti munka során kinetikai, kalorimetriás, spektrofotometriás, nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC), tömegspektrometriás (MALDI-TOF-MS, ESI-MS) és NMR alapú vizsgálati eljárások kidolgozása és alkalmazása történt.

Az értekezés *Tudományos eredmények* fejezete négy részre bontva taglalja a kiválasztott enzimek szerkezeti tulajdonságait és felépítését leíró eredményeket, néhány enzim katalitikus alkalmazása során megfigyelt folyamatokat, a glikoenzimek kinetikai aktivitásméréseihez kifejlesztett új módszerek alkalmazását, s végül az iparilag is hasznosítható enzim-gátlási folyamatokkal kapcsolatos eredményeket. Az értekezés törzsanyagát ez a fejezet adja, amely összesen tizenhárom alfejezetre oszlik. A megírás során a jelölt az adott témát elbeszélés-szerűen fogalmazta meg, amely tartalmazza a megtervezett célt, a végrehajtott kísérleteket, a kapott eredményeket, és azok rövid értékelését. E fejezet mutatja meg egyértelműen, hogy a jelölt a kutatási témák felvetésében, kidolgozásában és értékelésében mély és széleskörű ismeretekkel rendelkezik. Itt a bíráló kénytelen újból megemlíteni, hogy a közleményekre, elsősorban

a saját közleményekre való hivatkozás nem követhető egykönnyen, különösen jellemző ez a bemutatott ábrákra és táblázatokra.

Az *Összefoglalás* a kísérleti eredményekre történő részletes utalások és értékelés nélkül röviden összefoglalja a négy kutatási területen kapott eredményeket.

A formára és tartalomra utaló megállapításaim arra utalnak, hogy egy olyan, összefoglaló jellegű munka, mint amelyet most a kezünkben tartunk, valószínűleg könnyebben forgatható lett volna egy különálló, *Az eredmények megbeszélése* fejezettel, amelynek tartalmát most részleteiben találhatjuk meg a *sajátos szerkesztésű*, előzményeket és eredményeket felsoroló, valamint az összefoglaló részekben.

A bíráló az értekezés áttanulmányozása után elsődlegesen azt tudja megállapítani, hogy nagyon nagy számú, és a témában felvetett munkához majdnem áttekinthetetlen változatosságú körülmények között végzett kísérleteknél kellett a jelöltnek az összefüggéseket megtalálnia, és egyúttal „*rendet teremtenie*”. Meg kell még említeni azt is, hogy az értekezés témájával kapcsolatos tudományos munkájának csak egy részét tartalmazza az értekezés. A kutatások nem elhanyagolható része széleskörű hazai és nemzetközi együttműködésben zajlott.

A jelölt főbb tudományos eredményeinek ismerem el a következőket.

1. Kimutatta egyes aminosavak meghatározó szerepét a szubsztrátok megkötésében és hidrolízisében poliszacharid hidrolázokban, az árpa AMY1 α -amiláz izoenzimében. Mutációs eljárásokkal létrehozott enzim-variánsokkal, az alhely-térképek segítségével kimutatta a glikon kötőhelyek specificitás változását. Kimutatta, hogy célzott mutációval létrehozott enzimekkel a tetramer szubsztrátok hidrolízise nagyobb sebességgel történik, mint a heptamereké.

2. Árpa α -amiláz izoenzimek esetében kimutatta, hogy a másodlagos kötőhely aminosavainak cseréje hatással lehet a termékarányokra, és az aktív és másodlagos kötőhelyen is mutációt hordozó enzim-variánsok esetében az aktív hely mutáció módosító hatása érvényesül.

3. Megállapította, hogy a burgonyabogár szénhidrát emésztésében létfontosságú α -amiláz enzim (LdAmy) az emlős és a *Tenebrio molitor* rovar amiláz szerkezetéhez hasonló szerkezetű.

4. Az exo hatásmódú édesburgonya β -amiláz enzim esetében kimutatta a láncvégi maltóz hasítást és transzfert, valamint leírta a maltóz transzferét inverziós glikozidáz esetén.

5. A biofilmeket bontó DispersinB enzim működése során igazolta az aktív hely aromás aminosavainak a hidrolízisben betöltött szerepét.

6. Összefüggést talált a szekvencia eltérései és a transzfer aktivitás mértéke között a burgonyabogár α -amiláz transzglykozilezési aktivitása esetén.

7. Kidolgozta és sikeresen alkalmazta az *izotermikus titrálási kalorimetriát* (ITC) α -amiláz enzimek aktivitásmérésére. Az egyszeres és többszörös titrálás előnyeit kombináló módszerben a hőmennyiségváltozás arányos a reakciósebességgel, és így alkalmas az enzim-aktivitás mérésére. A módszer alkalmas az amilázok természetes szubsztrátján történő gátlás vizsgálatára akkor is, ha az inhibitor színe nem teszi lehetővé a spektrofotometriás mérést.

8. Az *izotermikus titrálási kalorimetria* alapú aktivitásmérés módszerét alkalmazta megfordítható reakciókat is biztosító glikogén foszforiláz enzim esetében a szintézis és a foszforolízis irányában is. A módszer alkalmazásával gátlási vizsgálatokat végzett kompetitív és allosztérikus gátlószerek jelenlétében

9. Egy általa kidolgozott HPLC elválasztási módszerrel a nyál α -amiláz aktivitásának mérését és gátlásának vizsgálatát alkalmazta hidrolízis termékek koncentráció változásának követésére.

10. Többirányú és fontos vizsgálatokat folytatott többféle α -amiláz enzim aktivitásának gátlására alkalmas vegyületek azonosítására, és a gátló hatás igazolására. In vitro vizsgálatokkal igazolta nem cukor-alapú inhibitorokként használható, úgynevezett „drug-like” molekulák α -amiláz gátló hatását. Több célponton is ható specifikus és aggregáció alapú inhibitorokat azonosított.

Az eredményeknek jelentős agrártudományi és humán gyógyászati vonatkozása is lehet. Az árpa amiláz szerkezetével kapcsolatos új eredmények megteremtik a lehetőséget az ipari jelentőségű enzimek specificitásának megváltoztatására az aktív hely, vagy a másodlagos kötőhely aminosavainak célzott mutációjával. A burgonyabogár amilázának gátlása a rovar elleni védekezés egy új megközelítése lehet, mert szekvenciájának és szerkezetének eltérései az emlős enzimektől, valamint a

szerkezet funkció közötti kapcsolatok feltárása iránymutató lehet megnövelt transzfer aktivitással bíró amilázok létrehozásakor. Az igazolt amiláz-gátló hatás a tea, fahéj, bogyós gyümölcsök levelei és színanyagok esetében különböző táplálékkiegészítők és funkcionális élelmiszerek létrehozását inspirálhatja az elhízás vagy akár a cukorbetegség megelőzésére és kezelésére.

Mindezek alapján a témaválasztás időszerűnek tekintendő és alkalmas arra, hogy a jelölt az elkészített értekezés sikeres megvédésével bizonyítsa kutatói kvalitásait. A jelölt a téma elismert kutatója, amit jelez a közleményekre kapott több mint 1200 független hivatkozás (az ISI adatai alapján).

Az értekezést kétféle szempontból lehet értékelni. Az enzimek szerkezetének tanulmányozására alkalmazott módszerek kiválasztása és továbbfejlesztése szempontjából milyen eredményeket ért el a jelölt, illetve a szerkezetvizsgálat és az enzim-aktivitás tanulmányozására feltett kérdésekre megfelelően alkalmazta-e azokat. Meg kell állapítanom, hogy jelölt munkája e két szempontból megfelel a követelményeknek.

Az értekezés sokágú, tartalmas munka eredményeit közli, de néhány megjegyzésem van mind formai, mind tartalmi vonatkozásban. Ezeken kívül kérdéseim lesznek a kísérletes kutatómunka eredményeivel kapcsolatban.

Néhány formai megjegyzés.

A gépelt értekezés gyakorlatilag betűhiba-mentes, csak néhány ilyen jellegű megjegyzésem lehet (pl. *felületi plazmon rezonancia*; *robosztusság*; hibás [78] hivatkozás a szövegben). Néhány érdekes szó-formázás is előfordul (pl. helyesen „*optimalizált*”). Az ábrákhoz írt szövegekkel kapcsolatban csak az a megjegyzésem, hogy az ábrák teljes aláírásai a korábbi közlések során a közleményekben megjelennek, de éppen ezért hasznos (vagy még inkább szükséges) mindig megadni a hivatkozást, miután a kísérleti körülményeket csak a közleményekben lehet megtalálni.

A tartalommal kapcsolatos észrevételek.

Számomra nagyon impresszív volt a különböző körülmények között végzett vizsgálatok háttérének magyarázata. Azt gondolom azonban, hogy egy ilyen összefoglaló jellegű munka, részleteiben átfogó értekezés esetében nem kell, és nem is szabad minden egyes kis részletre kiterjedő kérdés-sorozatot feltenni. Ezért én azt az

utat választottam, hogy néhány, számomra és valószínűleg a szakmai közösség számára is érdekesnek, és így fontosabbnak ítéltető eredménnyel, tervvel kapcsolatban szeretnék kérdéseket feltenni a jelöltnek.

1. A jelölt és munkatársai által kidolgozott és alkalmazott SUMA programmal jellemzett (számított) alhelyek száma nagy intervallumban változik az értekezésben is felsorolt enzimek esetében, akár *pl.* 12 alhelyet is meg lehet különböztetni. Lehet-e a fehérje-mérettel kapcsolatba hozni a lehetséges alhelyek számát és a kiszámítható *látszólagos kötési energia-értékek* nagyságrendjét?
2. Lényeges hatása van az enzimek aktivitására és működésére az aminosavak célzott mutációjával létrehozott cseréje. Szeretném megkérdezni, hogy az ilyen cserék esetén az esetlegesen bekövetkező *izoelektromos pont*-beli változás az elsődleges ok-e, vagy inkább más tulajdonságokban történő változásokat kell figyelembe venni az enzimek működésében?
3. Az értekezésben feltüntetett ábrák és ábraaláírások, sajnálatos módon, nem mindig adják meg az ábrán megjelenő értékek, jelek, spektrum-komponensek pontos azonosítását. Egy kiragadott, de fontosnak és jellemzőnek mondható ábráról szeretnék kérdezni. Bár a hivatkozott közleményekben általában kideríthetők az utalások és értelmezések, a pontos értelmezés a [11]-es hivatkozásból kiemelt 18. ábrán szükséges lenne a tömegspektrumban megjelenő mindegyik komponens azonosításával. Megköszönöm, ha ezt röviden felvázolná, miután az édesburgonya béta-amiláz enzimének működése tényleg különleges, amelyet a tömegspektrumon is megjelenő komponensek jelenléte igazolhat.
4. Az értekezésben bemutatott munka egyik legfontosabb eredménye, amely újabb lehetőségeket nyit a területen, a különböző enzim-gátló folyamatok követésének és jellemzésének jövőbeni kifejtése. Az alkalmazott és kidolgozott folyadékromatográfiás eljárások, valamint a izotermikus titrálási kalorimetria ebben a munkában elsősorban a *glikoenzimek* vizsgálatára irányultak. Véleménye szerint az enzim-inhibitorok kutatásában, másfajta enzimek működési területein lehetséges-e ezen technikának az alkalmazása?

Összességében megállapításaim a következők.

Megállapítom, hogy jelölt az értekezésben leírt munkát magas színvonalon, a kitűzött céloknak megfelelően, és következetesen hajtotta végre. Munkájával bemutatta és alátámasztotta a glikoenzimek szerkezeti és funkcionális tulajdonságai összefüggéseinek megvilágítására kitűzött célokat.

A jelölt témaválasztása korszerű. A tudományos eredmények újak, és ezekről a jelölt a nemzetközi folyóiratokban közölt publikációkban részletesen beszámolt. Az értekezés elfogadható, mint a pályázó magas szintű, tudományos kutatásra való alkalmasságát bizonyító munka. Ezért a Doktori Tanácsnak javaslom, hogy az értekezést nyilvános vitára bocsássa, és sikeres védés esetén a tudomány doktora címet a jelöltnek megadja.

Pécs, 2024 július 12.



Dr. Kilar Ferenc
a biológiai tudomány doktora