

## Gyémánt Gyöngyi

“Szénhidrátokon aktív enzimek szerkezete, aktivitása és gátlása”

című MTA doktori értekezésének bírálata

A doktori értekezés középpontjában a poliszacharid hidrolázok, illetve ezek szintetikus alkalmazásai és a glikoenzimek aktivitásának mérési módszerei állnak.

A glikoenzimek, amelyek a glikánok (cukorláncok) szintézisében és módosításában vesznek részt, jelentős ipari és terápiás jelentőséggel bírnak. Az iparban kulcsfontosságúak a bioüzemanyagok, a biológiailag lebomló műanyagok és különféle élelmiszer-adalékanyagok előállításában, összetett szénhidrátok lebontásával. A glikán szerkezetek módosítására való képességük miatt elengedhetetlenek a gyógyszerek, különösen a fehérjealapú gyógyszerek hatékonyságának és stabilitásának javításában.

Terápiás szempontból a glikoenzimek fontos szerepet játszanak a glikoengineering területén, ahol glikoproteinek és más biomolekulák módosítására használják őket a jobb gyógyszertervezés és -szállítás érdekében. Részvételük a rák, cukorbetegség és lizoszomális tárolási betegségekhez kapcsolódó anyagcsere útvonalakban tovább hangsúlyozza potenciáljukat mint terápiás célpontok. Emellett a glikoenzimek alapvetőek a diagnosztikai eszközök fejlesztésében, lehetővé téve specifikus betegségjelzők glikánprofilozás általi kimutatását. Összességében a glikoenzimek kulcsfontosságúak a biotechnológia és az orvostudomány fejlődésében. Ennek alapján a bemutatott kutatások alapvető célkitűzéseit messzemenően alátámasztottnak látom.

Az értekezéshez közvetlenül 26 közlemény kapcsolódik, ebből 9 utolsó szerzős. A közlemények a 2007-2023-ig terjedő periódust ölelik fel. Hét cikk az utolsó öt évben született jelezve a folyamatosan aktív kutatásokat. A dolgozat 99 oldal terjedelmű, ábrákkal és táblázatokkal gazdagon illusztrálva. A szakirodalmi áttekintés tömör, kifejezetten a területen járatos olvasó számára készült. Az irodalmi áttekintés 15 oldalából öt oldalt az alhelytérképezés módszertanával kapcsolatos előzetes eredmények bemutatásának szenteli. Az eredményekben kulcsszerepet betöltő kalorimetriáról és a glikoenzimek gyógyszerkémijáról nem olvashatunk. A kísérleti rész egyetlen oldalt kapott hivatkozva a terjedelmi korlátokra. Igaz, a eredményeknél fellelhetünk ezzel kapcsolatos adatokat. Ezzel együtt az értekezés a terjedelmi felosztását tekintve arányosnak tekinthető, a zömét az új eredmények teszik ki, amit jól olvasható stílusban prezentál. Gépelési hibát maximum elvétve találhatunk. A dolgozat formailag megfelel az MTA doktori értekezésekkel szemben támasztott követelményeknek.

Az eredményeket három négy fő fejezetben tárgyalja: (i) Poliszacharid hidrolázok szerkezetének felderítése, (ii) Enzimes szintézisek, (iii) Glikoenzimek új aktivitásmérési módszerei, (iii)  $\alpha$ -Amiláz gátlása. Ezek a kutatások egymásra épülők, így a doktori mű

egységes keretet alkot. Az alábbiakban foglalom össze nagyon tömören a dolgozat tézispontjait, amelyeket a jelölt jól tervezett kísérletekkel és számításokkal alaposan alátámasztott, meggyőzően bemutatott és megfelelő újdonságtartalommal bíralt közleményekben publikált.

1. Az árpa AMY1 izoenzimében a Val47 és Ser 48 oldalláncok meghatározó szerepet játszanak a szubsztrátok megkötésében és hidrolízisében.
2. Az árpa AMY1 másodlagos kötőhely aminosavainak cseréje is hatással lehet a termékarányokra.
3. Egy  $\alpha$ -amiláz enzim (LdAmy) alhely szerkezete.
4. Az exo hatásmódú édesburgonya  $\beta$ -amiláz enzimre igazolták a nem redukáló láncvégi maltóz hasítást és transzfert, valamint a processzív működést.
5. A PNAG mátrixú biofilmeket bontó DispersinB enzim működése.
6. Az AMY1 V47F mutáns alkalmazása fluorofor metil-umbelliferon aglikont tartalmazó  $\alpha$ -amiláz szubsztrátok szintézisére.
7. Leírták a burgonyabogár  $\alpha$ -amiláz transzglykozilezési aktivitását mindkét végén aromás védőcsoportot tartalmazó szubsztrátokkal. Összefüggést találtak a szekvencia és a transzfer aktivitás között.
8.  $\alpha$ -amiláz aktivitásának és gátlásának mérése ITC-vel.
9. A glikogén foszforiláz enzim ITC alapú aktivitásmérésének módszere a megfordítható reakció szintézis és foszforolízis irányában.
10. Humán nyál  $\alpha$ -amiláz aktivitás és gátlás mérése HLPC és UV detektálással.
11. Táplálék összetevők HSA gátló hatásai.
12.  $\alpha$ -amiláz gátló hatás kimutatása *in silico* szűréssel kiválasztott könyvtárban.
13. Gallotanninok promiszkuitásának kimutatása és PPA enzimen, és azok aggregáció-alapú gátló mechanizmusa.
14. 2-tioxo-4-tiazolidinon származékok között azonosítottak specifikus és aggregáció alapú inhibitorokat.

Az alábbiakban a kérdéseimet, megjegyzéseimet és javaslataimat az oldalszám megjelölésével adom meg (pN).

p15: Hosszabb próbaszekvenciáknál nincsenek párhuzamos reakciók? Vagy ezt a SUMA egyidejűleg illeszti a  $\Delta G$  additivitás feltételezésével?

p17 és mindenütt a szövegben: A DP rövidítés definícióját nem találtam a rövidítésjegyzékben. Feltételezem, hogy a polimer kémiában használatos polimerizáció fokra utal. Ez a területen járatlan olvasó számára nem nyilvánvaló. Különösen amiatt zavaró, hogy a "DP N tagszámú" formátumot használja, ami redundáns. Ezt javaslom DP N-re vagy N-tagszámú jelölésre módosítani.

p28: Megdöbbenő, hogy egy egyszerű szerkezeti minimalizálás ennyire prediktívnek bizonyult. Szerencsés lett volna néhány grafikont bemutatni az adatok illeszkedéséről a statisztikai adatokon túl, hogy az olvasó kaphasson egy grafikus képet a valós illeszkedésről esetleges kilógó pontokról.

p28: Mi lehet az oka a töltött oldalláncok kilógásának a predikcióból? Oldószer modell figyelembevétele javított volna ezen?

p30: Nagyon érdekes, hogy az oligoszacharid próba hidrolízisének a hasonlósága a LdAmy és PPA fehérjék szerkezetének hasonlóságával is együtt jár. Itt csak a katalitikus felszín a hasonló vagy a teljes fehérje?

p42: A sebességi állandók értékeit nem szemléltette az ábrán, de az látszik, hogy párhuzamos reakcióutak jelen vannak. Mennyire unikális az elméleti modell? Hogyan zárható ki, hogy más modell is illeszkedik a kísérleti adatokra?

p43: "Az is kiderült, hogy a hidrogénkötés önmagában nem magyarázza nagyobb stabilitást, ehhez a hidrofób (van der Waals) kölcsönhatások is nagymértékben hozzájárulnak." Vizes közegben hatékony kötődés soha sem lehetséges kizárólag hidrogén kötésekkel, a hidrofób kölcsönhatások és azok kooperatív H-kötés árnyékoló hatása nélkülözhetetlen. Hogyan érvényesült ez a modellezett DspB komplexnél?

p46, 25. ábra: A HPLC kromatogramokat annotáció nélkül ábrázolja, ami nehezíti a megértést. Az elegyek összetétele alapján megállapítja, hogy a DspB enzimet exo mechanizmusú enzimként azonosították. Ez a megfogalmazás kizárólagosságot sugall. Ugyanakkor az eredmény nem zár ki egy párhuzamos endo folyamatot. Ezt a következő lépésekben be is mutatja a korábbi megállapítással ellentétben. Javaslom az említett szöveg finomítását, elkerülendő az olvasó nem kívánt irányba történő terelését.

p49, 29. ábra: "A szubsztrátok fogyása alapján kapott kezdeti sebesség mérések azt mutatták, hogy a tetramer és pentamer szubsztrátok között már nincs jelentős különbség a hidrolízis kezdeti sebességében." Az ábrán észrevehetően a DP5 kisebb bomlási sebességet mutat. Mi lehet erre a magyarázat?

p52, 30. ábra: Az ábra aláírás nem definiálja, mit jelentenek a számok az ábrán. Reakciósebességre vonatkoznak? Relatív specificitás? Ha igen, akkor ennek a mennyiségnek mi a definíciója?

p53: Általános az az összefüggés, hogy ha nincs jelen hosszú oligo, akkor a rövidekkel transzglykozilezés történik? Elég rontani a hosszúak kötődését mutációval?

p55, 35. ábra: Az ábra minősége, értelmezhetősége és a feliratok olvashatósága nem megfelelő.

p58: Az ITC mérési eredményeket így vezeti fel: "...módszerek, amelyek lehetővé teszik a természetes szubsztráton és körülmények között való mérést a folyamatba való beavatkozás nélkül." Igaz ugyan, hogy a komponensek viselkedését nem befolyásoljuk kémiai jelöléssel, de az ITC tisztított komponenseket és optimalizált körülményeket igényel (pH, puffer, hőmérséklet) a megfelelő DH előidézéséhez. Emiatt az ITC minden előnyével együtt sem tekinthető általánosan beavatkozás-mentes módszernek.

p60: A  $DQ/Dt$  kifejezés véges differencia hányadost jelöl. A leírt ITC mérésben a cellában termelődő/elnyelődő hőteljesítményt mérjük, amit matematikailag differenciáhányados  $dQ/dt$  helyesebben ragad meg. A szövegben így is találjuk.

p61, 8. tábl.: A  $K_m$  értékek becsült kísérleti hibái hiányoznak a táblázatból, ami ITC mérések esetében jellemzően nem elhanyagolható. Így a  $K_m$  értékek alapján tett megállapításokat óvatosan kell kezelnünk.

p69, 10. tábl.: Az inhibíciós állandókat nem egységes mértékegységgel adja meg. Javasolom a moláris koncentrációk megadását minden esetben. A táblázatban lévő adatoknál nincs feltüntetve, hogy melyek irodalmi eredmények.

p70: Megállapítja, hogy detergens hatására nőtt az inhibíciós állandó, amit a tannin fehérje aggregációt növelő hatásával magyaráz. Történtek-e kiegészítő részecskeméret mérések az aggregáció alátámasztására hasonlóan a 82. oldalon bemutatott mérésekhez (pl. méretkizárásos kromatográfia, dinamikus fényszórás, diffúziós NMR)? Hogyan zárták ki a közvetlen detergens-enzim kölcsönhatást, mint az egyik lehetséges, nem aggregáció-alapú magyarázatot a 47. ábrán bemutatott eredményekre?

p79, 14. tábl.: A gyógyszerkémiai tesztek a kismolekulás találatok és keményítő esetén magas mikromólos  $IC_{50}$ -et mutattak, ami sajnos nem ad jó kiindulópontokat egy kismolekulás fejlesztéshez. Egyrészt a korábbi vizsgálataik azt mutatták, hogy több alkotóhely együttes működése képes kialakítani a megfelelő kölcsönhatást az enzimekkel. Ezzel összhangban a referencia akarbóz is nagyobb molekula. Valószínűsíthető, hogy az enzim nagyfelületre

kiterjedő, de sekély kötőhellyel rendelkezik. Lehetséges az, hogy a talált kismolekulák különböző alkötőhelyekkel hatnak kölcsön és fragmens-alapú ligálásuk jó inhibitorhoz vezetne?

Összefoglalva, a számos felmerült kérdéssel és megjegyzéssel együtt tartom az értekezést értékesnek és elgondolkodtatónak. A felsorolt tézispontokat új tudományos eredményeknek fogadom el. Az eredmények sokasága és minősége lehetővé tette, hogy a követelményeknek megfelelő doktori értekezés szülessen. Mindennek alapján a doktori művet nyilvános vitára alkalmasnak tartom, és sikeres védés esetén javaslom a doktori cím odaítélését.

Szeged, 2024. augusztus 15.



Dr. Martinek Tamás  
egyetemi tanár, az MTA doktora