

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**A burgonyabogár eredetű α -amiláz aktív centrum szerkezetének és
transzfer aktivitásának tanulmányozása**

Hámori Csaba

Témavezető: Dr. Gyémánt Gyöngyi



DEBRECENI EGYETEM

Kémiai Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2022

1. Bevezetés és célkitűzések:

Napjainkban globális probléma, hogy a megfelelő mennyiségű és minőségű élelmiszer elérhető legyen mindenki számára. A problémák enyhítésének egyik lehetősége a mezőgazdasági károk mérséklése, például a kártevő rovarok által okozott pusztítások csökkentése. Az ellenük való védekezés többféle módon megvalósítható, kémiai vagy biológiai megközelítéssel. A növényevő rovarok egy része a növények termését fogyasztja, míg vannak levélkártevők, mint például a burgonyabogár. A burgonyabogár jól alkalmazkodik táplálékforrás, és klíma szempontjából és a rovarölő szerekhez is és Európában kevés természetes ellensége fordul elő, így a biológiai növényvédelem hatástalannak bizonyul vele szemben, ezért vizsgálata kiemelt jelentőséggel bír. A burgonyabogár elleni védekezés egyik lehetősége a fő emésztő enzim, az α -amiláz gátlása. Ez a védekezési módszer kiegészíti és ötvözi a mostanáig alkalmazott növényvédelmi stratégiákat. Számos, a természetben fellelhető vegyületről bizonyították, hogy α -amiláz inhibitor lehet, tehát olyan vegyületeket használhatunk a védekezés során, melyek szelektívek, természetben is megtalálhatók és így nem károsak. A megfelelő inhibitorok kutatásához elengedhetetlen a burgonyabogár α -amiláz (LDAmy) aktív centrum szerkezetének ismerete, melynek felderítését tűztem ki célul a doktori munkámban. Az amilázok transzfer aktivitása általában kimértékű, de több példa van az irodalomban arra, hogy mutációval növelhető. Az előzetes vizsgálatok azt mutatták, hogy az LDAMY vad típusa is képes a transzglykozilezési reakciót katalizálni. Ahhoz, hogy a maximális szintézis irányú aktivitást elérjem vizsgáltam a pH és a szerves oldószer koncentráció hatását, mivel ezen paraméterek jelentősen befolyásolhatják az enzim működését.

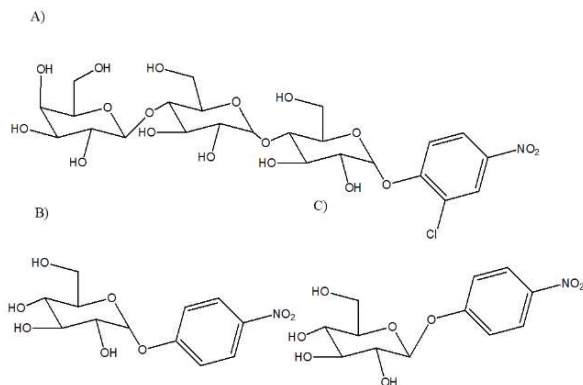
2. Anyagok és módszerek:

2. 1. A burgonyabogár bél kivonatának preparálása:

A burgonyabogár lárvákat és imágókat a Debreceni Egyetem Mezőgazdaság-Élelmiszertudomány és Környezetgazdálkodási Kar Növényvédelmi Intézetének munkatársai gyűjtötték be. A rovar emésztőszervét kipreparálták, majd 250, illetve 500 μ l fiziológias sóoldatba (0,9% NaCl) helyezték. A bél kivonatot tartalmazó oldatot ezután 30 másodpercig vortexelték, majd öt percre centrifugálták 1000 g-vel 5 °C hőmérsékleten. A felülúszót elválasztották és a vizsgálatokig -20, illetve -80 °C hőmérsékleten tárolták.

2.2. A rovarbél extraktum enzimaktivitás mérése:

A rovarbél extraktum szénhidrátbontó enzimeinek (α -amiláz, α - és β -glükózidáz) aktivitásmérése Jasco V-550 spektrofotométerrel történt 2-klór-4-nitrofenil-4-*O*- β -D-galaktopiranozilmaltozid (GalG₂CNP), p-nitrofenil- α - és β -D-glükopiranozid szubsztrátokon (1. ábra)



1. ábra: A rovarbél extraktum enzim aktivitásának méréséhez alkalmazott szubsztrátok szerkezete: A) GalG₂CNP B) p-nitrofenil- α -D-glükopiranozid C) p-nitrofenil- β -D-glükopiranozid.

Az aktivitásmérések 50 mM 2-(N-morfolino)-etánszulfonsav (MES), 5 mM kalcium-acetát, 51,5 mM nátrium-klorid és 152 mM nátrium-azid tartalmú pufferben (pH6) történtek 37 fokon. A reakcióelegy 200 µl MES pufferben oldott 5 mM szubsztrátot, 290 µl MES puffert és 10 µl rovarbél extraktumot tartalmazott. Az abszorbancia változását 400 nm hullámhosszon, a p-nitrofenol elnyelési maximumán követtem 3 percig.

2.3. A rovarbél extraktum bontási képének vizsgálata:

Az LDAmY bontási képének vizsgálata során keletkező termékek elválasztását Agilent 1260 infinity II (kvaterner pumpa, automata injektor, diódasoros detektor) HPLC rendszerrel valósítottam, amihez egy ESA Corona CAD detektor is volt csatolva. A reakcióelegyek 1 mg szubsztrátot tartalmaztak 1ml pufferben. A reakciót 5 µl rovar emésztőnedv hozzáadásával indítottam. Az elválasztást Accucore-aQ (150x2,1 mm, 2,6 µm, Thermo) oszlopon végeztem Security Guard Cartridge C₁₈ (4x3,0 mm) elötét oszloppal, az áramlási sebesség 0,4 ml/perc az injektálási térfogat 5 µl volt. A CNPG_n bontása során keletkező termékeket izokratikus elúcióval választottam el ACN:víz 7:93 (V/V)% elegyével, a BnIG_nPNP hidrolízis termékeinek elválasztásához gradiens elúciót használtam. A detektálási hullámhossz 200 és 302 nm volt.

2. 4. Az LDAmY tisztítása:

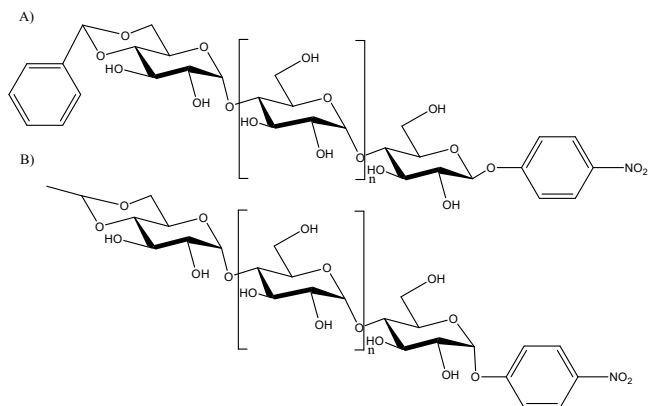
Az LDAmY elválasztását affinitás kromatográfiás módszerrel valósítottam meg. A fiziológias sóoldatban lévő extraktum 5 ml részletét 30K ultraszűrővel 5 °C hőmérsékleten és 10000 g-n töményítettem és ennek a mintának 200 µl részletét injektáltam a keményítőgél tartalmú oszlopra. Az elválasztás alatt 1 ml térfogatú frakciókat gyűjtöttem. Az összes fehérje koncentrációt a frakciókban 280 nm hullámhosszon követtem spektrofotometriával. A frakciók α-amiláz aktivitását a rovarbél extraktum

vizsgálatakor alkalmazott módszerrel azonos módon határoztam meg. A felviteli puffer 1 M acetát puffer volt, mely 1 M ammónium-szulfátot tartalmaz (pH5,2), elúciós pufferként 1 M acetát puffert (pH5,2) alkalmaztam, mely 10 mg/ml maltózt tartalmazott. A burgonyabogár α -amiláz tisztaságát SDS-PAGE módszerrel ellenőriztük.

2.5. Az LDAmY szintézis irányú reakciójának vizsgálata:

Az LDAmY szintézis irányú reakcióját CNP- β -D-glükopiranozid, PNP- β -D-galaktopiranozid, PNP- β -D-mannopiranozid, PNP- β -D-glükozaminid és PNP- β -D-xilopiranozid akceptorok, valamint vízdoldható keményítő, glükóz, maltóz, maltotrióz és egy maltooligoszacharid keverék donorok jelenlétében valósítottam meg. A szintézis irányú reakciót a tisztított enzim bontási kép vizsgálatához használt kromatográfiás módszerrel követtem. A donor molekulák vizsgálatához 1% keményítő oldatot, 10 mM glükózt, 10 és 25 mM maltózt, 25 mM maltotriózt vagy 10 mg/ml G₅-G₇ keveréket használtam azidmentes MES pufferben oldva. A reakciót minden esetben 1 μ l 18 μ M koncentrációjú LDAmY oldatának hozzáadásával indítottam. A transzglykozilezési reakció pH optimumának meghatározásához azidmentes MES oldatot használtam, melyek pH-ját 4, 5, 6, 7 és 8 értékre állítottam. A 1 ml térfogatú reakcióelegyek 10 mg/ml G₅-G₇ keveréket, valamint 10 mM CNPG-t tartalmaztak. A szintézis irányú reakció szerves oldószer tartalom hatásának vizsgálatához olyan mintákat állítottam össze, amelyek 10 mg/ml G₅-G₇ elegyet és 10 mM CNPG donort tartalmaztak, oldószerként pedig azidmentes MES puffert (pH6) és acetonitrilt (ACN) alkalmaztam, melyek végső térfogata 1 ml volt. A PNP- β -D-mannopiranozid tartalmú reakcióelegyben keletkező termékek „preparatív” elválasztását Supelcosil LC-18 (250*4,6mm, 5 μ m, Supelco) oszlopon valósítottam meg 1,5 ml/perc áramlási sebességgel. A

kolonnatér hőmérséklete 40 °C, az eluens összetétele ACN:víz 10:90 (V/V)%, az injektált térfogat 25 µl volt. A nem redukáló végi védőcsoport minőségének a transzglykozilezési reakcióra való hatását BnIG₇PNP és etilidén-4-nitrofenil- α -D-maltoheptaoszid (Et-4-G₇-NP, SORACHIM,) szubsztrátokon vizsgáltam (2. ábra).



2. ábra: A BnIG₇PNP (A) és az Et-4-G₇-NP (B) szubsztrátok szerkezete

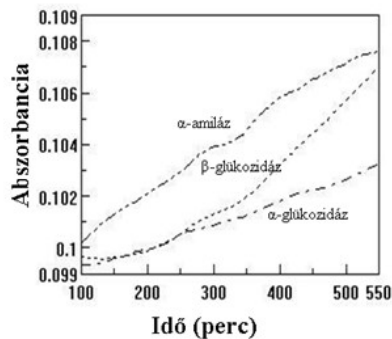
2.6. Az LDAm_y bontási képének meghatározása HPLC módszerrel:

A tisztított LDAm_y bontási képének vizsgálatát CNPG_n (n=4-8) szubsztrátokon hatottam végre. A reakcióelegy ~100 µM szubsztrátot tartalmazott 1 ml azid-mentes MES pufferben. Az enzim reakció indítása 1 µl 18 µM koncentrációjú LDAm_y oldattal történt. A vizsgálatokhoz használt folyadékkromatográfiás módszer a következő volt: Venusil AQ_C18 (150*4,6mm, 3 µm, Agela) oszlop; 0,6 ml/perc áramlási sebesség; eluens összetétel: ACN:Víz 18:82 (V/V)%; injektált térfogat: 5 µl; detektálási hullámhossz: 302 nm; mérési idő: 20 perc.

3. Új tudományos eredmények

3.1. Igazoltam, hogy a burgonyabogár bélkivonat szénhidrát emésztő enzimei az α -amiláz, α -glükozidáz, és β -glükozidáz.

A rovarbél extraktum α -amiláz szubsztrátra optimált körülmények között elvégzett spektrofotometriás vizsgálata során specifikus szubsztrátok segítségével igazoltam a glükóz egységekből felépülő összetett cukrok bontását végző enzimek jelenlétét (3. ábra).



3. ábra: A burgonyabogár középbél extraktum α -amiláz, illetve α - és β -glükozidáz aktivitásának vizsgálata

3.2. Vizsgáltam a burgonyabogár bél kivonat szénhidrát bontását kromofor tartalmú maltooligoszacharid szubsztrátokon. Megállapítottam, hogy a három enzimnek nagyságrendileg azonos a reakciósebessége az egyes szubsztrátok, illetve a belőlük keletkező termékek esetében.

Meghatároztam a rovarbél extraktum bontási képét és összehasonlítottam a már korábban vizsgált, más szervezetből származó α -amilázok bontási képével. A bontási kép meghatározásokat CNPG₇ és n=4-8 glükóz egységet tartalmazó

BnIG_nPNP szubsztrátokon végeztem el. Mivel a CNPG₇ az α -glükózidáznak is szubsztrátja, így az a reakció kezdetétől konszekutív módon bontja nem redukáló vég felől a kiindulási szubsztrátot és az amiláz által felszabadított termékeket is. A BnIG₇PNP esetében a redukáló vég felőli hidrolízis termékek szubsztrátjai α -glükózidáznak, de az elsődleges hidrolízis termékek kizárólag az α -amiláz termékei. A kinetikai modell elkészítéséhez mindhárom enzim aktivitását figyelembe vettem. A kisebb tagszámú szubsztrátok esetében az LDAm_y és a PPA kötéshasítási frekvencia értékei jelentősen eltértek egymástól, tehát a két enzim aktív centruma eltérő. Emellett BnIG₈PNP bontási vizsgálata során olyan termékek voltak detektálhatók, amelyek arra utaltak, hogy a hidrolitikus reakciók mellett történt szintézis irányú reakció is.

3.3. Sikeresen kinyertem az LDAm_y-t a rovar bélkivonatból affinitás kromatográfiás módszerrel keményítő gél állófázison.

Az affinitás állófázist vízzoldható keményítő keresztkötésével állítottam elő, az affinitás elúcióhoz a rovar α -amiláz enzimhez kompetitíven kötődő maltózt használtam. Az LDAm_y tisztaságát SDS-PAGE módszerrel és a szénhidrátbontó enzimek spektrofotometriás aktivitás mérésével igazoltam.

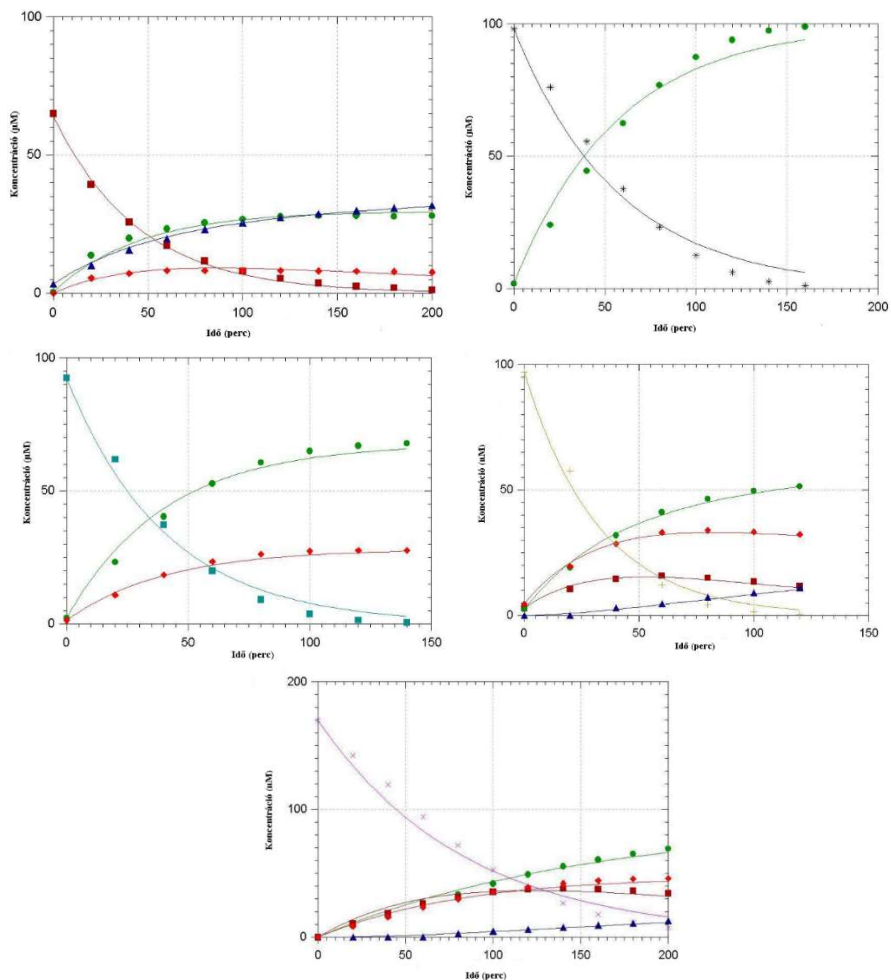
3.4. Megállapítottam, hogy az LDAm_y rendelkezik transzglykozidáz aktivitással, vizsgáltam a transzfer reakció körülményeinek hatását a reakció lefutására.

Megállapítottam, hogy a reakcióban donor molekulaként funkcionálhat a maltóz, valamint nagyobb tagszámú maltooligoszacharidok, kivéve a maltotriózt, mely gátolja a transzglykozilezett termékek keletkezését. A transzglykozilezési reakció pH optimuma pH=6, savasabb pH értékeken

termékarány változása, valamint az összes termék mennyiségének minimális csökkenése volt megfigyelhető, míg a semleges és lúgos tartományban drasztikusan csökkent a termékek mennyisége. A szerves oldószer jelenléte jelentősen befolyásolja a transzglykozilezési reakcióban a termékarányt, 20% ACN biztosít legnagyobb a szintézis/hidrolízis arányt. Az átmeneti fémionok csak kismértékű hatást gyakorolnak a reakcióra. Akceptorként csak a CNP- β -D-glükopiranozid és a PNP- β -D-xilopiranozid alkalmazásával tapasztaltam termékek keletkezését. A nem redukáló végi védőcsoport minősége nem befolyásolja a termékek arányát és mennyiségét.

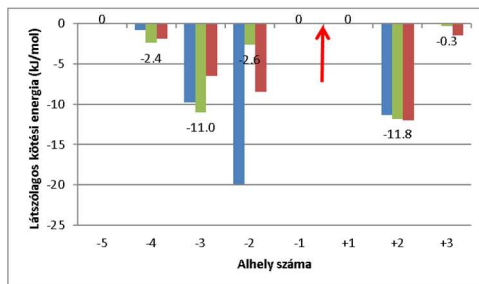
3.5. Meghatároztam az LDAm_y bontási képét 4-8 glükóz egységet tartalmazó kromofor csoport tartalmú maltooligoszacharidok segítségével HPLC termékanalízissel.

A hidrolízis reakciót a CNP maltooligomerek hidrolízise során keletkező, redukáló végi termékek HPLC elválasztása során kapott csúcsok területének változásával követtem. A kapott eredményekből a hidrolízis modell alapján meghatároztam a kinetikai állandókat a kinetikai görbék szoftveres illesztésével (4. ábra).



4. ábra: A CNP maltooligomerek bontási kép vizsgálata. Kiindulási szubsztrát és a termékek koncentrációjának időbeni változása, valamint az illesztett kinetikai görbék (CNPG₈: X, CNPG₇: +, CNPG₆: ■, CNPG₅: *, CNPG₄: ■, CNPG₃: ◆, CNPG₂: ●, CNP: ▲).

3.6. Meghatároztam a kötőhasítási frekvenciák értékét. Felállítottam az enzim alhely modelljét és összehasonlítottam más szervezetekből származó α -amilázok alhely térképével.



5. ábra: Az LDAmY (zöld), a HSA (kék) és a PPA (piros) alhely térképe. A számok az LDAmY látszólagos kötési energiáinak értékei, a piros nyíl a hidrolízis helyét jelöli.

Az a LDAmY a PPA és a HSA alhely térképének összehasonlítása alapján míg az alhelyek száma megegyezik, a glikon kötő alhelyeknél jelentős energia különbségek figyelhetők meg (5. ábra). Ezek eltérések a három enzim aminosav szekvencia különbségeiből adódnak. Szekvencia összevetést végeztem az LDAmY a HSA a PPA és a TMA enzimekre. Az alhely térkép mutatta energia eltérések minden esetben köthetőek a szekvenciában megjelenő olykor jelentős polaritásbeli eltérésekhez. Az LDAmY -4 alhelyén egy OH tartalmú treonint tartalmaz, míg a HSA negatív töltésű aszparaginsav oldalláncot. A -3 kötőhelynél a HSA szerin oldalláncot tartalmaz, míg a LDAmY apoláris valint, hasonlóan a PPA és a TMA-hoz. A legnagyobb különbség a -2 alhely kötési energiájában van, ahol a HSA bázikus hisztidint, az LDAmY pedig negatív töltésű aszparaginsav oldalláncot tartalmaz.

4. Az eredmények hasznosításának lehetőségei:

A kapott az eredmények segítségével szolgálhatnak természetes inhibitorok keresésében, valamint szintetikus gátlószerek tervezésében és kifejlesztésében. A rovar α -amiláz transzfer aktivitásának felismerése, és az ezt feltehetően okozó szekvenciabeli eltérések feltárása lehetőséget teremt nagyobb transzferáz aktivitás bevezetésére más α -amilázok esetében is.

Tudományos publikációk

Konferencia előadások:

1. Hámori Csaba, Rovar eredetű α -amiláz tisztítása és jellemzése. XXIII. Tavaszi Szél Konferencia, Budapest 2020. ISBN: 978-615-5586-70-5
2. Hámori Csaba, Szénhidráton ható enzimek aktivitásmérése HPLC módszerrel. XXII. Tavaszi Szél Konferencia, Budapest 2019. ISBN 978-615-5586-42-2
3. Hámori Csaba, A kolorádóbogár szénhidrát emésztésének vizsgálata. PEME XVII. PhD – Konferencia Budapest 2018.

Konferencián bemutatott poszterek:

1. C. Hámori, L. Kandra, G. Gyémánt, α -Amylase as the main enzyme in the digestive tract of a leaf-consuming insect Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*, Say). 7th Symposium on the Alpha-Amylase Family, Smolenice, 2019.
2. K. Szabó, C. Hámori, G. Gyémánt, Study on the aggregation tendency of tannins – or are tannins specific α -amylase inhibitors? 7th Symposium on the Alpha-Amylase Family, Smolenice, 2019.



Nyilvántartási szám: DEENK/432/2022.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Hámori Csaba
Doktori Iskola: Kémiai Tudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10069158

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (3)

1. **Hámori, C.**, Kandra, L., Gyémánt, G.: LDAm, an α -amylase from Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) with transglycosylation activity.
Biotcatal. Biotransform. [Epub ahead of print], 2022. ISSN: 1024-2422.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/10242422.2022.2050707>
IF: 2.325 (2021)
2. **Hámori, C.**, Gálné Remenyik, J., Kandra, L., Gyémánt, G.: Colorado potato beetle alpha-amylase: Purification, action pattern and subsite mapping for exploration of active centre.
Int. J. Biol. Macromol. 168, 350-355, 2021. ISSN: 0141-8130.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.071>
IF: 8.025
3. Szilágyi, E., **Hámori, C.**, Bíró Molnár, P., Kandra, L., Gálné Remenyik, J., Gyémánt, G.: Cooperation of enzymes involved in carbohydrate digestion of Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*, Say).
Bull. Entomol. Res. 11, 1-6, 2019. ISSN: 0007-4853.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1017/S0007485319000099>
IF: 1.814

További közlemények

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (3)

4. Jósza, I., Balogh, C. A., **Hámori, C.**, Molnár, D., Forgács, V., Rubleczy, B., Trencsényi, G.: Determination of Total Radiochemical Purity of [18F]FDG and [18F]FET by High-Performance Liquid Chromatography Avoiding TLC Method.
Chromatographia. 85, 469-479, 2022. ISSN: 0009-5893.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10337-022-04155-x>
IF: 2.213 (2021)





5. Nagy-Szabó, K. A., **Hámori, C.**, Gyémánt, G.: Gallotannins are Non-Specific Inhibitors of α -Amylase: Aggregates are the Active Species taking part in Inhibition.
Chem. Biol. Drug Des. 97 (2), 349-357, 2021. ISSN: 1747-0277.
DOI: <https://doi.org/10.1111/cbdd.13787>
IF: 2.873
6. Király, A., **Hámori, C.**, Gyémánt, G., Kövér, K. E., Pócsi, I., Leiter, É.: Characterization of gfdB, putatively encoding a glycerol 3-phosphate dehydrogenase in *Aspergillus nidulans*.
Fungal Biology. 124 (5), 352-360, 2020. ISSN: 1878-6146.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2019.09.011>
IF: 3.099

Egyéb folyóiratközlemények (1)

7. Jósztai, I., **Hámori, C.**, Balogh, B., Pótári, N., Mikecz, P.: Simultaneous analysis of FDG, CIDG and radiochemical components in [^{18}F]FDG preparation by a new NP-HPLC method (P-392).
J. Labelled Comp. Rad. 56 (Suppl.), S-479, 2013. ISSN: 0362-4803.

Magyar nyelvű absztrakt kiadványok (3)

8. Király, A., **Hámori, C.**, Gyémánt, G., Kövér, K. E., Pócsi, I., Leiter, É.: A glicerin-3-foszfát dehidrogenáz (gfdB) gén szerepe az *Aspergillus nidulans* és *Aspergillus glaucus* oxidatív stresszválaszában.
In: Biotechnológia a Debreceni Egyetemen Tudományos szimpózium: Program és összefoglalók, Debreceni Egyetem Természettudományi Kar, Debrecen, 20, 2019.
9. Balogh, C. A., **Hámori, C.**, Jósztai, I.: Az O-(2-[^{18}F]fluoroetil)-L-tirozin tartalmú PET diagnosztikum radiokémiai tisztaságvizsgálata új folyadékkromatográfiás eljárással.
In: Őszi Radiokémiai Napok 2017 Tudományos Program 2017. október 25 - 27., Szerk.: Szentmihályi László, Magyar Kémikusok Egyesülete, Budapest, 37-42, 2017.
10. **Hámori, C.**, Jósztai, I.: A [^{18}F]FDG gyógyszerkészítmény radiokémiai tisztaságának vizsgálatáa hidrofíli kölcsönhatási folyadékkromatográfia (HILIC) segítségével.
In: Őszi Radiokémiai Napok 2016 Balatonszárszó, 2016. október 10-12 : a konferencia programja és előadás kivonatai. Szerk.: Szentmihályi László, Magyar Kémikusok Egyesülete, Budapest, 43-46, 2016.

Idegen nyelvű absztrakt kiadványok (4)

11. Király, A., Molnár, A., Bodnár, V., **Hámori, C.**, Gyémánt, G., Kövér, K. E., Leiter, É., Pócsi, I.: Glycerol-3-phosphate dehydrogenase GfdB in the oxidative stress defense of *Aspergillus nidulans*.
In: Annals of the International Symposium on Fungal Stress : ISFUS : Book of Abstracts, Even3, Sao Paulo, 69-70, 2019. ISBN: 9788557222106





12. Józsa, I., **Hámori, C.**: HILIC-UPLC for fast determination of radiochemical purity of [^{18}F]FDG.
J. Label. Compd. Radiopharm. 60 (1), S478, 2017. ISSN: 0362-4803.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jlcr.3506>
13. **Hámori, C.**, Balogh, C. A., Józsa, I.: Significance of pH control in determination of radiochemical purity of f-18 labeled tracers using liquid chromatography.
Nuc. Med. Rev. 20 (2), 111, 2017. ISSN: 1506-9680.
14. Józsa, I., **Hámori, C.**, Balogh, B., Pótári, N., Mikecz, P.: Simultaneous determination of radiochemical and chemical purity of [^{18}F] FDG by new normal phase HPLC method (P4).
Nucl. Med. Rev. Cent. E. Eur. 16 (Suppl.), A21, 2013. ISSN: 1506-9680.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 20,349

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):
12,164**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománytermetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2022.10.04.

