

Összefoglaló gondolatok. A pályázat öt éves futamideje alatt (2011.11-től 2016.12.-ig) elvégzett kutatómunkánkból közétett közel **40 angol nyelvű szakközlemény** közül hármat **érdemes az elején külön kiemelni**. Az **egyik** - a *Nature Genetics*-ben (IF>32) megjelent - munkánkat azért, mert egy olyan genetikai és fehérjetudományi kutatásról számol be, mely **egy konkrét fehérje térszerkezetének problémájára fókuszálva** közvetlenül kapcsolódik a klinikai gyógyítás napi gyakorlatához. Egy adott szteroid-rezisztens vesebetegség kezelése során derült ugyanis fény arra, hogyan okozhatnak gyakori genetikai variánsokról átiródott fehérjék ritka ám végzetes betegséget. A gyermekgyógyász (Tory Kálmán, SE) betegágy mellett tett megfigyeléseiből kiindulva előbb az asszociált fehérje sejten belüli lokalizációját, majd térszerkezetét vizsgáltuk. Alapkutatás jellegű eredményeink mára visszacsatolódnak a gyakorlati orvosláshoz, pozitívan megváltoztatva a korábbi genetikai tanácsadás kimenetelét. **Másik munkánk beszámoló** a *Chemistry A European Journal*-ban 2013- és 2016-ban (IF~6) jelentek meg és kerültek címlapra. **E két dolgozatunk egy-egy módszertani fejlesztésünkről** számol be, mely során fehérje konformer-keverékek újszerű kvantitatív elemzését oldottuk meg. Míg az első NMR-rel végzett eljárásunk aminosav-specifikus, a második - kiroptikai elektron-spektroszkópiái (közeli-UV ECD) eljárásan alapuló - globális és jól kvantifikálható térszerkezeti információt ad a fehérjék hődenaturációjának fontos jelenségéről. Anfinsen 1972-es Nobel-díja óta közismert, hogy a fehérjék, ha elveszítik natív, leggyakrabban globuláris téralkatukat (**F**-állapot) és denaturálódnak (**U**-állapot), akkor biológiai funkciójuk is kárvallott lesz. Figyelembe véve, hogy a polipeptidek és fehérjék mintegy 13-16 nagyságrendet átölelő időskálán ($f \rightarrow s \rightarrow h$) végeznek belső mozgást (fehérje-dinamika), sem a „képzőalkotás”, sem a minor formák meghatározása, sem pedig az aminosav szintű (dinamikus) paraméterek megadása nem lebecsülendő feladat. Mind elméletibb jellegű dolgozataink, mind az egy-egy polipeptidhez vagy fehérjéhez kapcsolódó térszerkezeti eredményeink, fehérje feltekeredtségére vonatkozó adataink, stabilitásértékeink, hasznos és fontos részletei a fehérjekutatás egyre jelentősebbé váló gyakorlati és ipari aspektusának. Ma már nemcsak alapkutatás, de a gyógyszeripar vezető fehérjemolekulái miatt – melyek piaci részesedése napjainkban csak az USA-ban már több mint 50-70 Milliárd \$/év – e kérdésekre adott válaszok komoly ipari jelentőséggel rendelkeznek. A modern szerkezeti kémia és biológia nagy kihívása továbbra is egy-egy fehérje fel- és letekeredési útvonalának meghatározása, az ($[U] \leftrightarrow [I] \leftrightarrow [F]$) folyamat termodinamikai és kinetikai feltérképezése. Spektroszkópiái (NMR, CD, IR), diffrakciós, molekula modellezési és elméleti módszerek kombinált alkalmazása jelenti a megoldást, mely technikák alkalmazása, fejlesztése és esetenkénti szolgáltatása határozza meg kutatócsoportunk (<http://prot.chem.elte.hu>) alap és napi tevékenységét.

A korszerű fehérje szerkezetkutatás elengedhetetlen része a bioinformatika, mely nagymértékben segít kiválasztani, kontextualizálni és validálni az aminosav sorrendre, azok térszerkezetet befolyásoló tulajdonságaira vonatkozó információkat. A bioinformatika és az alkalmazott molekula modellezés – mely történhet QM, MM, MD, QM/MM, stb. elméleti szinteken – egymást kölcsönösen segítő módszerek szinergiája teszi lehetővé a szintetikus és spektroszkópia feladatokat megelőző modelltervezést, a legalkalmasabb polipeptid szekvenciák megválasztását, egyes reakciók értelmezését. A kutatásunk fókuszában álló másodlagos szerkezeti elemek preferenciája, polipeptidláncok kölcsönhatás-vizsgálata, a 3D-téralkat kialakulásának megértése, racionális módosítása, stb. során rendre felhasználtuk a racionális tervezés lehető legszélesebb körét. A használt eszközöket és módszereket csak kivonatossan, az elért tudományos eredményeket tömören és fókuszáltnan ismertetjük alább.

A) Fehérje másodlagos szerkezeti elemek belső stabilitása, fel- és letekeredési potenciálja, amiloidképzése, α -hélixek és β -redők tervezhetősége

Az amiloidot felépítő β -redőzött rétegek mellett az α -hélixek meghatározó jelentőségű másodlagos szerkezeti elemek. Éppen a prion fehérjékre igaz, hogy egy helikális régió válik β -redőzött réteg jellegűvé, mely konformációs átmenet egyik fontos lépése az α -hélixek inherens stabilitásának mélyebb megértése. A fehérjéket felépítő α -hélixek legtöbbször, ha a fehérje elveszti 3D-téralkatát, maga is szétszilárdodik, noha egyes rendezetlen fehérje (IDP/IUP) esetében az első megjelenő rendeződési motívum éppen az α -hélix (pl. ERD14 lásd alább). A **magányos töltött α -hélix** egy újonnan azonosított fehérjeszerkezeti motívum, amelyet korábban éppen kutatócsoportunk munkatársa Gáspári Zoltán írt le. Két módszer konszenzusán alapuló predikciós eljárásunk alapján kimutattuk, hogy ez a motívum bár ritka - az emberi fehérjéknek alig 0,2 %-át érinti, - de jelen van. Az érintett fehérjék leggyakrabban RNS-molekulákhoz kötődve fontos biokémiai folyamatokban vesznek részt. Megfigyeltük, hogy a magányos töltött α -hélix motívumok nem tűnnek az evolúciós időskálán konzerválnak. Egy predikciós web-szervert készítettünk ([Gáspári_2012_Biochem. Biophys. Acta](#)).

Vizsgáltuk a **3₁₀-hélix** és a **β -réteg** térszerkezeti elemek belső stabilitását, kooperativitásának és kompaktságának mértékét különböző, a szokásosnál jóval hosszabb (pl. $n=34$) polipeptid modellek esetében: HCO-(Xxx)_n-NH₂ Xxx=Gly és L-Ala, ahol $n \leq 34$, a B3LYP és RHF elméleti szinten, dzp bázison (pl. 6-31G(d)). Megállapítottuk ezen „extrém hosszú” térszerkezeti elemek feltekeredési preferenciáját, kvantitatív módon megadtuk a hosszfüggő kooperativitásuk mértékét, az oldalláncok által meghatározott kompaktság jellemzőit ([Jakli_2013_ChemPhysLett](#)).

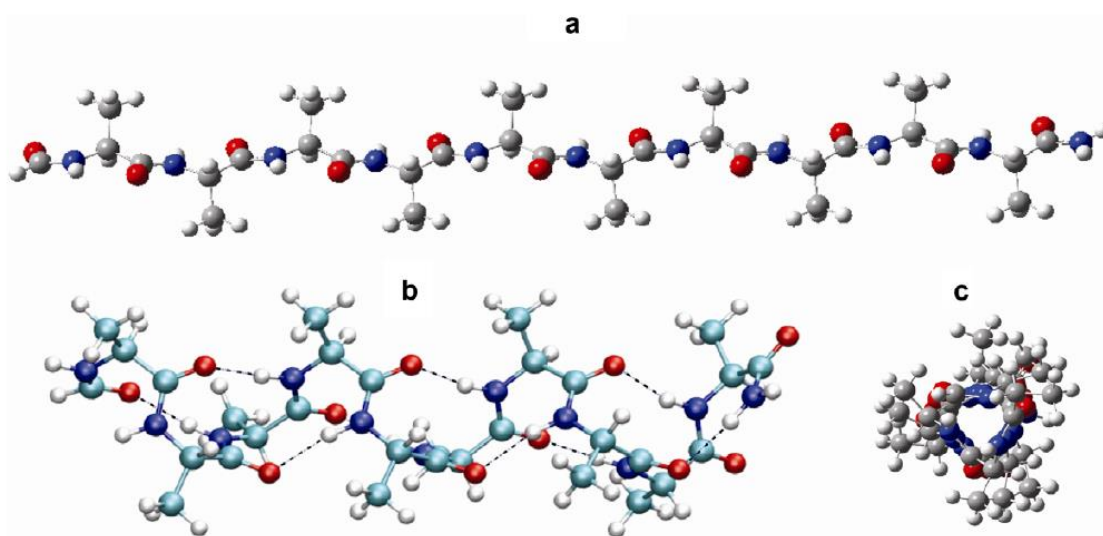


Figure 1: A nyújtott és helikális téralkatot felvevő decapeptid For-(L-Ala)₁₀-NH₂

Fehérjék másodlagos szerkezeti elemének (**α -hélix, β -redő, stb.) hatékony meghatározásának** talán legegyszerűbb módja a távoli UV tartományba eső **ECD** mérés. Egyik módszerfejlesztésünk célja egy gyors, mégis pontos ECD alapú enantiomer többlet meghatározás volt ([Nemes_2015_JOrgChem](#)).

Hogy megértsük az amiloidképzés, a fehérjeláncok asszociációjának molekuláris hátterét, 3D-térszerkezeti adatbázisok felhasználásával vizsgáltuk az aminosavak pár preferenciáját fehérjéket felépítő **β -redőzött rétegek** alapján. Azt találtuk, hogy a **párpreferencia** mértéke a leggyakoribb aminosav párok esetében megbízható, ám a kevésbé gyakori párok esetében, a széles körben alkalmazott χ^2 teszt túlbecsüli a korrelációt. A homológia szűrés hatásának számszerűsítéséhez három eltérő módszert teszteltünk: CD-HIT, PDSelect és a PISCES

programokat alkalmaztuk. Kimutattuk, hogy nemcsak a szűrési határértékek, de az adatbázisokat felépítő fehérjék is nagyban befolyásolják a kapott párpreferencia adatbázist. Létrehoztunk egy új NMR méréseken alapuló aminosav párpreferencia adatbázist. Kifejlesztettünk egy, a β -rétegek kialakulásának „hajtóerejét” az aminosav sorrend függvényében meghatározó programot, amelyet a β -redő / hajtú-kanyar rendszerek szintézisét megelőző tervezés során alkalmazhatunk a jövőben ([Jákli_2017_beküldés alatt](#)).

Az Alzheimer kór kialakulása amiloidogén polipeptidek oligomerizációjához és polimerizációjához köthető. Az amiloid-szerű aggregátumokban talált fehérje-domének vizsgálata aminosav szekvencia függést nem mutat, tehát az amiloid téralkatba való átalakulás hajtóereje a főlánc-konformációjának belső sajátossága kell, hogy legyen. QM módszerekkel - teljes geometria optimalizálás és vibrációs analízist követően különböző méretű parallel és antiparallel **β -redőket** tanulmányoztunk, – vizsgáltuk az amiloid képzés folyamatának termodinamikai jellemzőit. Kimutattuk, hogy az oligomerizáció ezen esetekben termodinamikailag kedvező folyamat. Az antiparallel redők stabilabbak a paraleleknél, az asszociáció révén **entrópia csökkenés** jelentkezik, amely kedvezőtlen részfolyamatot az **entalpikus nyereség** kompenzálja. Rávilágítottunk arra, hogy az antiparallel redők entrópia járuléka a lánchossz (aminosav darabszám) növekedésével miért vesz fel lépcső-függvény alakot ([Pohl_2012_PhysChemChemPhys](#)). QM-számításokon keresztül vizsgáltuk a diszulfid hidak β -rétegek stabilitására gyakorolt hatását. Kvantitatív módon jellemeztük a β -szálon belüli és a szálak közötti diszulfidhidak szerkezetstabilizáló hatását ([Galant_2014_ChemPhysLett](#)).

Az előbb említett β -szálak, rétegek és végeredményben az amiloid-képzés a fehérjegerinc konformációs „szűkülése”, mely során a *Ramachandran*-felület egy régiója válik meghatározottá. A *Ramachandran*-térkép kettős „torus” **reprezentációja** a lehető legkorrektebben mutatja a gerinckonformációt leíró mindkét független változó, a φ és a ψ értékekhez rendelhető potenciális-energia **felület folytonos jellegét**. Ez a transzformáció hitelesen alkalmazható bármely polipeptid és fehérje fel- és letekeredésének bemutatására, mivel a „kettős torus” leírás mód esetén egyedül igaz hogy a potenciálisenergia felület minden pontjának értelmezhető környezete van, hogy nincsenek „megtévesztő” élek és „peremek”, amelyek megtörik a felület valódi topológiára jellemző folytonosságot ([Jakli_2012_Chem. Phys. Lett](#)).

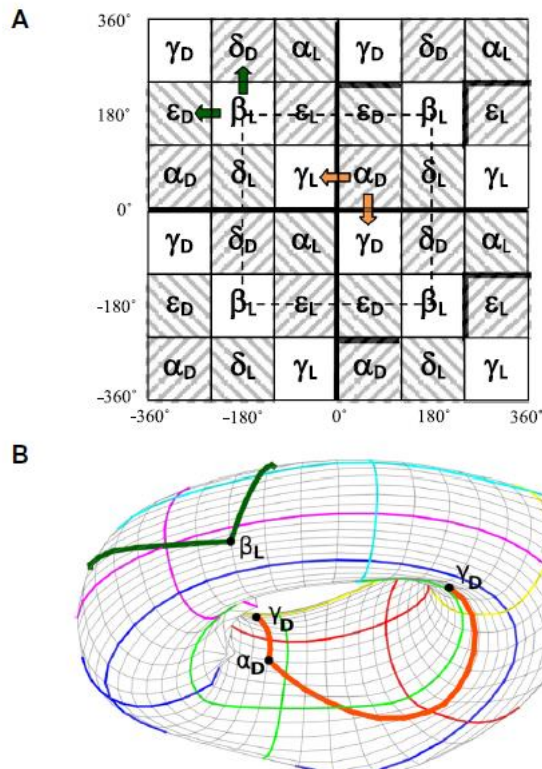


Figure 2: A Ramachandran-térkép „kalsszikus” és „torus” reprezentációja

Mint más esetekben az amiloidképzésre fogékony szekvenciák esetében is az evolúciós konzerválás háttérben szerkezeti és dinamikai vonatkozások vélelmezhetők. Mivel az amiloid állapot, mint végeredmény egy merev, enzimatisz uton megbonthatatlan és ezért recirkulálhatatlan nanostruktúra, az evolúció során szelekciós nyomás irányul(hat) a fehérjék aggregációs hajlamának csökkentésére. Ugyanakkor egyre inkább elfogadott tény, hogy új gének, fehérjék *de novo* keletkezhetnek korábban nem kódoló DNS-szakaszok átírása és lefordítása révén. Azt vizsgáltuk, hogy különböző **GC-tartalmú**, véletlenszerű **DNS-szakaszok** által kódolt hipotetikus fehérje esetében vajon milyen rendezetlenségi, **amiloid**-, aggregációs-, és transzmembrán-hélix **képző hajlammal** rendelkező aminosav-sorrendet kaphatunk. Azt találtuk, hogy ezek a tulajdonságok erősen függenek a kódoló DNS-szakasz relatív GC-arányától. A 40-50-60%-os GC-tartalmú régiók esetében az aggregációs hajlam az emberi fehérjékre jellemző tartományon belülré esik. A jelenleg ismert három, egyértelműen elfogadottan *de novo* létrejött, emberre jellemzően egyedi fehérje tulajdonságai összhangban vannak a megfigyelt tendenciákkal. Ez végeredményben azt kell, hogy jelentse, hogy egy fehérje – akár fokozott - aggregációs hajlama nem akadályozza új fehérjék képződését, tehát az amiloidképzés ellen evolúciós nyomás vélhetőleg nem állt és áll fent ([Ángyán_2012_FEBS Lett](#)).

B) A másodlagos és harmadlagos téralkatot stabilizáló gyenge kölcsönhatások mélyebb megértése, ritka konformerek és állapotok azonosítása

Makromolekulák, s ezen belül a polipeptidek és fehérjék másodlagos és harmadlagos szerkezeti elemeit gyakran stabilizálják az aromás rendszerekkel (Phe, Tyr, Trp) közvetlenül kölcsönható töltött aminosav-oldalláncok (Lys(+), Arg(+), Asp(-), Glu(-)) és ionok (pl. H(+), Cl(-),...). Ilyen intra- és intermolekuláris kölcsönhatások, bár ismertek és fehérje szinten részben analizáltak, egységesen a kölcsönhatások relatív súlya és nagysága szerint nem voltak meghatározottak. Ezért alkalmas modellrendszeren vizsgáltuk az **ion-aromás rendszerek**

kölcsönhatási energiáit az $X^- / M^{+} / C_6H_6 / C_6F_6$ rendszereken: ahol $X = H, F, Cl$ és $M = H, Li$ és Na . Az aromás rendszerekben megfigyelhető négy lehetséges kölcsönhatási forma az aromás-anion (AA), kation- π (CP), anion- π (AP), és kation-aromás (CA). Mindegyiket egy közös keretrendszer részeként vizsgáltuk és kvantitatív szinten jellemeztük. Az egyensúlyi szerkezetek mellett egyes esetekben az első- és másodrendű átmeneti állapotokat is sikerült azonosítanunk „befagyasztott héjak” (FC) közelítést alkalmazva sűrűség illesztett (DF)-MP2/aug-cc-pVDZ igen magas elméleti szinten. Míg az AA és CA kölcsönhatások esetében kétféle sík elrendeződést azonosítottunk, addig az AP és CP esetekben az ion mindig az aromás gyűrű felett helyezkedik el a térben. A peptid fragmensekhez közelebb álló „poliatomos ionok” (pl. NH_4^+ , $CH_3NH_3^+$, $HCOO^-$, CH_3COO^-) vizsgálata rámutatott arra, hogy a kölcsönhatások erőssége CP, CA, AP, AA sorrendben csökken, nagyságrendjük a 10 kcal/mol tartományba is eshet, azaz jelentős (Papp JCompChem 2017).

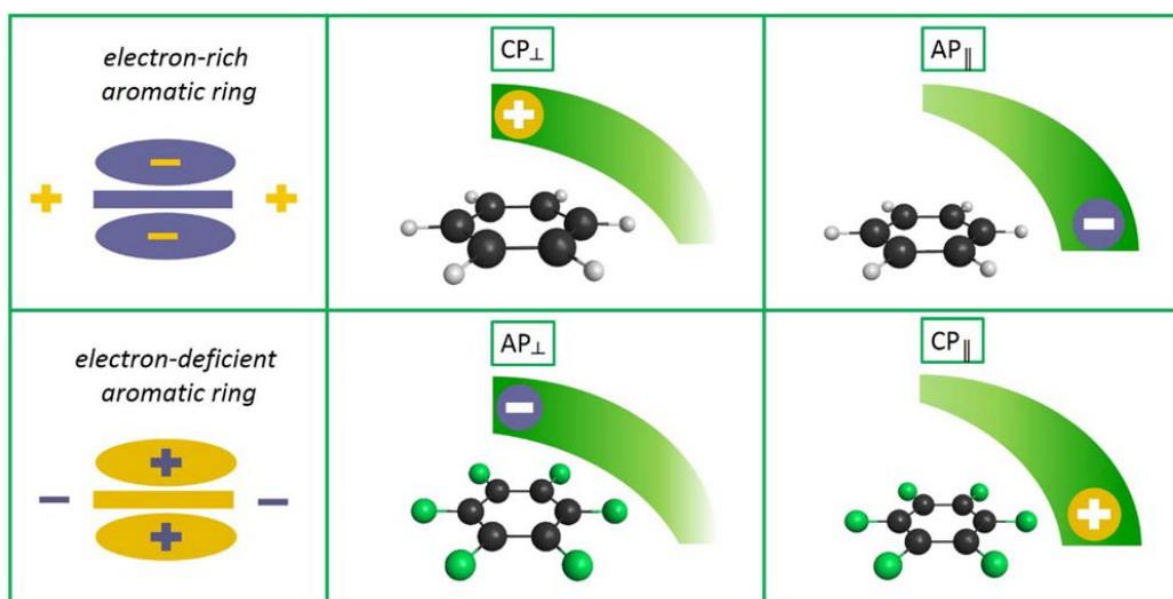


Figure 3: Az aromás rendszerekben megfigyelhető négy lehetséges kölcsönhatási forma az aromás-anion (AA), kation- π (CP), anion- π (AP), és kation-aromás (CA).

Az imént említett ionos- π kölcsönhatásoknál gyengébbek a **CH- π típusú diszperziós erők**, amelyek akár peptidek, akár szénhidrátok esetében bírnak jelentőséggel, a téralkatot, de akár a reaktivitást is befolyásoló tényezők lehetnek. *In silico* módszerekkel vizsgálták a gyenge O-H és szupergyenge C-H savak komplexképző tulajdonságait, a kölcsönhatások stabilitását és geometriai sajátosságát. Kimutattuk, hogy szemben az O-H savakkal, amelyek Brønsted savként alkotnak komplexet, a szupergyenge C-H savak Lewis savként vesznek részt komplexeikben (Szaniszlo_2017_StructChem).

A *glycoscience*, a glikopeptidek előretörése szükségessé teszi a szénhidrátok konformációs hiperfelületeinek jobb megértését, a legvalószínűbb konformerek racionális feltérképezését. Ezért elkészítettünk a folyamatosan bővülő, fehérjék szerkezeti paramétereit feldolgozó programkönyvtár mellé egy, a **hexopiránókok konformációs tulajdonságait** tömörítő JAVA API könyvtárat is. Ennek segítségével elemezni kezdtük a monoszacharidok vizes oldatban jelenlevő, a leggyakrabban vélelmezett 4C_1 és 1C_4 „szék” formák mellett a töbttucat csavart gyűrűs téralkat mibenlétét és QM-alapú modellezhetőségét (Jakli_2017_előkészületben).

Az oxidatív stressz a fehérjékben gyökök képződéséhez vezethet, amelyek felelőssé tehetőek a molekuláris öregedést jelző D-aminosavak feldúsulásáért. Kvantumkémiai számításokkal vizsgáltuk azt a reakciót, amelyben N-Ac-L-Xxx-N-HMe-ből (Xxx= Gly, Ala, Asp) egy hidroxil gyök (HO[•]) hatására a hidrogénatom honnan és milyen módon távozik. Először mutattuk ki peptidek esetében, hogy a legstabilabb gyök az α H-atom leszakadásával keletkezik, hogy a visszamaradó „aminosav” gyök akirális, ha Xxx = Gly vagy Ala, de királis ha más bonyolultabb oldalláncot tartalmaz: tengelyes kiralitás jelenik meg, amely az atropizoméria megjelenését vonja maga után. Az így kialakuló nyújtott „gerinc-konformációjú” két enantiomer molekula-gyök egymásba való konformációs átalakulásának útjait egy alkalmas 4D-Ramachandran potenciálisenergia hiperfelületen követtük (Gerlei_2013_JPhysChemB) és (Gerlei_2014_ChemPhysLett).

C) α/β -kiméra, β -peptidek, foldamerek tervezése, új β -aminosavak szintézise.

A fehérjékben genetikailag kódolt 20 fajta α -aminosav mellett, a szintetikus peptid és foldamerkémia előszeretettel használja a biokompatibilis β -aminosavakat, amelyekből felépülő α/β -kiméra és β -peptidek változatos másodlagos térszerkezeti elemeket eredményezhet. A királis β -aminosavakon e tulajdonsága befolyásolható a konfiguráció variálásán keresztül. A korábban felfedezett és leírt apoláris β -redő térszerkezet stabilitásának szisztematikus vizsgálatát elvégezve - heterokirálisan diszubsztituált β -aminosavakat felhasználva – olyan modelleket terveztünk, amelyek redőképző hajlama nagy. A konformerek QM alapon számolt termodinamikai stabilitása alapján kedvező „lego” építőelemekké válhatnak. A korábbi feltételezésekkel szemben, a homokirálisan diszubsztituált rendszerek stabil β -redő téralkatot hozhatnak létre, mely alapon orientált β -peptidek racionális tervezését kezdtük meg. E kedvező, időátlagban egységesnek mutakozó „foldamerek” konformációs tulajdonságaik alapján α -aminosavak alkotta amiloidok azonosítására, illetve e folyamat szabályozására / gátlásra lehetnek a jövőben esetleg felhasználhatók (Pohl_2012_Amino Acids).

A közismertebb amino-ciklohexánkarbonsavak (AHPC) és aminociklopentánkarbonsavak (ACPC) ciklusos β -aminosavak legkisebb és legmerevebb képviselője a 2-aminociklobután-1-karbonsav (röviden ACBA). Kooperáció keretében felépítettünk 2-4 tagú β -oligopeptideket, s vizsgáltuk a lehetséges konformerek térszerkezetét (NMR), majd stabilitását QM-alapon. Az azonos vagy különböző abszolút és relatív konfigurációjú egységek kombinációjakor a monomerek lokális konformációs preferenciája megmarad, így új foldamerek, jól definiált másodlagos szerkezetű oligomerek racionális tervezésére nyílnak lehetőségek a monomer ACBA egységek, legó-szerű kombinációjával. A kiralitáson szabályozott foldamerek új csoportját állítottuk így elő, majd jellemeztük azokat. Rámutatva arra, hogy melyek lehetnek a jövőben biokompatibilis biopolimerképzők (Gorrea_2012_J. Org. Chem). Mátrix izolációs IR spektroszkópiával (kb. -255°C) megmértük az 2-aminociklobután-1-karbonsav származékok, X-(ACBA)_n-Y kiralitás által vezérelt lokális konformációs preferenciáját. Kimutattuk, hogy részben a *cisz* és *transz* konformerek által létrehozott „cikkakk”, részben egy helikális konformer van jelen. A számolás és molekula modellezés mellett tehát világossá vált, hogy ezeknél a -(ACBA)_n- oligopeptideknél a β -aminosav lokális konfigurációja önmagában meghatározhatja a feltekeredés jellegét, amely tulajdonságuk alapján foldamerekké válhatnak (Pohl_2013_AminoAcids).

Öt- és hattagú gyűrűs cukor- β -aminosavak prekursorainak szintézisét kezdtük meg és vittük részben sikerre az elmúlt évek során, mivel azt tapasztaltuk hogy az ACBC, ACPC és az ACHC túlságosan hidrofób aminosavak. Erre akkor figyeltünk fel, amikor a 39 aminosavból álló, és a II-es típusú cukorbetegség gyógyítására sikerrel használt, Exendin-4 variálható

szakaszába foldamerként egy 5 ACPC hosszú alegységet építettünk be. Előállítottunk így egy 25db α - és 5db ciklikus β -aminosavból felépülő 30 aminosav hosszú α/β kiméra peptidet. (E molekula szintézise során összehasonlítottuk a manuális és a mikrohullámú peptidszintézis stratégiai lehetőségeit is.) Azonban amikor e makromolekula szerkezetvizsgálatába fogtunk, akkor döbrentünk rá hogy az $-(ACPC)_5$ - alegység túlzottan hidrofób, a molekula vízdoldhatósága gyenge, konformációs tulajdonságai romlanak. E felfedezések inspiráltak minket arra, hogy belekezdjünk az alább röviden ismertetendő cukoraminosavak méretnövelhető totálszintézisébe. Feltételezésünk szerint az akár részlegesen védett cukoraminosavak beépítésével várhatóan nő majd a módosított foldamerek/fehérjék vízdoldhatósága, és javulhat ezek farmakodinamiai tulajdonsága. A hattagú, piranózgyűrűs cukoraminosavak egyik választott modellje a 2-amino-2-dezoxi- β -D-glükopiranozil-karbonsav, amelyben az amino- és a karboxilcsoport *transz*-állású. A glikozil-karboxamid előállítását a megfelelően védett glikozil-cianidon keresztül oldottuk meg. Esetenként anomer keverékek képződését tapasztalva. Az izomer 2-amino-2-dezoxi-D-mannopiranozil-karbonsav szintéziséhez, melyben az amino- és karboxil-csoport *cisz*-helyzetben van, új, gazdaságos módszer kidolgozását kezdtük el. Az öttagú, furanózgyűrűs béta-aminokarbonsavak esetében előállítottuk mindkét típust, azaz az amino- és a karboxil-csoportot *cisz*- ill. *transz* helyzetben tartalmazó modellvegyületek megfelelően védett származékait, nevezetesen a 3-amino-3-dezoxi-D-ribofuran-uronsav további kapcsolásokra alkalmas védett származékát, valamint ennek sztereoiszomer 3-azido-3-dezoxi-D-xilofuran-uronsav származékát.

Preparatív kémiai megfontolások által vezérelve, olyan furanóz- és piranózgyűrűs β -cukoraminosav származékok előállításába kezdtünk, amelyek kiindulási anyaga egyszerű és olcsón beszerezhető monoszacharid, amely konformációs sajátságai miatt alkalmas építőegységként lesz alkalmazható. *Cisz*-, és *transz*-furanuronsav származékot készítettünk, amelyek aminocsoportja a C-3, karboxilcsoportja a C-4 helyzetben lett kiépítve. C-1 és C-2 hidroxilcsoportjai izopropilidén védőcsoporttal lettek ellátva, melyek a beépítést követően eltávolíthatók lehetnek. Ehhez azonban ki kellett dolgoznunk a **ciklikus β -aminosavak** gazdaságos és méretnövelhető szintézisét (tipikusan 7-10 lépéses totálszintézis). A kutatócsoportban kidolgoztuk két cukor-aminosav, a 3-amino-3-dezoxi-ribofuranuronsav (H-tX-OH) és C-3 epimerjének, a 3-amino-3-dezoxi-xilofuranuronsavnak (H-cX-OH) **költséghatékony szintézisét** és tisztítását D-glükózból kiindulva. Elkészítettük a foldamer szintézis során kapcsolásra alkalmazható származékokat (-X-OMe, -X-OiPr, -X-NHMe, Fmoc-X-OH), valamint -Aaa-tX-Aaa- és -Aaa-tX-tX-Aaa- típusú foldamer építőelemeket ([Nagy_2017_AminoAcids](#)). Előállítottuk a H-Gly-Gly-X-Gly-Gly-OH α/β pentapeptid szintéziséhez alkalmazott furanózgyűrűs cukor-aminosavakat, Fmoc-védőcsoportot tartalmazó és azido-származékait. Az azido-származékok alkalmazása esetén a redukciós lépést a *Staudinger*-reakcióval végeztük, amely során a *cisz*-sztereoiszomerből egy meglepően stabil intermedier keletkezett. A stabilitás szerkezeti alapjait röntgendiffrakciós és NMR mérésekkel, valamint molekuladinamikai szimulációkkal derítettük ki ([Csordas_2016_AminoAcids](#)). Igazoltuk és feltérképeztük a **cukor-arilhidrazonok** gyűrűs formájának a stabilitásért felelős hidrogénhid hálózatát. E vizsgálatokat különböző konfigurációjú D-hexóz arilhidrazonokon (D-glüko-, D-galakto-, D-manno- és D-talo-származék), hexózamin-fenilhidrazonok és -4-nitro-fenilhidrazonok családjára terjesztettük sikerrel ki ([Göz_2016_Glycochemistry](#)).

Ahogy azt fent említettük az Exendin-4 variálható szakaszába foldamerek beépítését tűztük ki korábban célul, amely molekula bioaktív, a B-alsóosztályba tartozó GPC receptorhoz kötődő téralkatának kialakítását annak Trp-kalitka része „vezérli”. Exenatid-4, röviden Ex-4, egy GLP-1 agonista. A Tc5b egy mindössze 20 aminosavból felépülő Trp-kalitka minifehérje,

melyet az Exenatid-4 szisztematikus rövidítésével és alakításával hoztak létre mintegy 15 évvel ezelőtt, s vált mára a fehérjekutatók kedvenc tesztfehérjéjévé.

D) Fehérjék 3D-foldja, a Trp-kalitka, és további feltekeredett nano-rendszerek

A Trp-kalitka (mini)fehérjék egyik kulcs szerkezetstabilizáló eleme az Asp⁹-Arg¹⁶ sóhíd (számozás Tc5b szerint), amely szerepét a fehérje feltekeredésében - mindkét aminosav szisztematikus cseréjével - feltérképeztük, az oldalláncok interakciós-hálózatát megvizsgáltuk. Az ECD- és NMR-módszerrel kapott eredményeink szerint mindkét aminosav többféle fehérjestabilizáló kölcsönhatásban vehet részt, egy komplex interakciós hálózat részeként. Kimutattuk, hogy a Trp-kalitka minifehérje feltekeredése nem két-állapotú folyamat, hanem intermediér képződésen keresztül történik (Rovo_2011_J.Pept.Sci). NMR módszerekkel történő vizsgálatok során felderítettük, és atomi szinten vizsgáltuk a fehérje több lépésben történő fel- és letekeredésének mechanizmusát. Dekonvolúciós eljárást dolgoztak ki a spektrumok kiértékelésére, és jellemezni tudtuk az egymással gyorsan cserélődő, s ezért tiszta formáikban „láthatatlan” fel- és letekeredett, valamint közbülső állapotokat. Feltártuk a fehérjegerinc belső mozgékonyágának és a téralkat-átrendeződésnek molekuláris hátterét, valamint meghatároztuk a többlépéses feltekeredési folyamat termodinamikai paramétereit. A publikáció, amelyet 2012-ben fogadtak el, címlapra került a Chemistry folyóiratban (Rovó_2013_ChemEurJ).

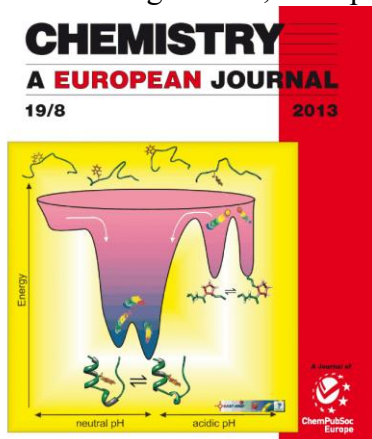


Figure 4: Fehérjék „rejtett” állapotainak meghatározása heterokorrelációs NMR adatok alapján

Ezzel párhuzamosan három különböző hosszúságú Trp-kalitka hőmérséklet- és koncentrációfüggő konformációs átalakulásait (α -hélix \rightarrow β -szál átalakulás), feltekeredéstől függő aggregációs készségét vizsgálták ECD-, VCD-, és FT-IR spektroszkópiai módszerekkel. E kutatás érdekessége hogy kontrollálható és reverzibilis módon egyes Ex-4 rövidített peptidekből (25 aminosavas polipeptidek) amiloidot tudunk előállítani. Így tehát a Trp-kalitka, mint a legkisebb fehérje tulajdonsági készlete, kiegészült a fel- és letekeredés mellett az amiloidképzéssel (Farkas_2013_EurJOrgChem). **A kémiai módosítás vezérelte aggregációt** vizsgáltuk a Tc5b és foszforilált variánsai körében NMR, CD, FT-IR módszerekkel és molekuladinamikai szimulációk alkalmazásával. Kimutattuk, hogy a foszforiláció a szekvencia bizonyos pontjain letekeredést majd amiloid-képződést eredményez. Egy kitüntetett pozícióban azonban a foszfát csoport megjelenése egy alternatív aggregálódási mechanizmust eredményezett: időszakosan kollagén-típusú hármas hélix szerkezet alakult ki. Tehát a foszforiláció mértéke és helye egyfajta „konformációs-kapcsolóként” működhet egyes fehérjék esetében (Kardos_2015_JPhysChemB). Elemeztük a víz szerepét a fehérjék **'coiled-coil'** szerkezeti elemeinek a stabilitásában. Leírtuk, hogy a víz elősegítheti a coiled-coil régió feltekeredését, stabilizálhatja azt, de bizonyos esetekben a motívum lebomlását propagálhatja, vagy az amiloid-képződéshez vezető fatális konformáció-átalakulási és oligomerizációs folyamatokhoz járulhat hozzá (Vajda_2016_BioMolConcept).

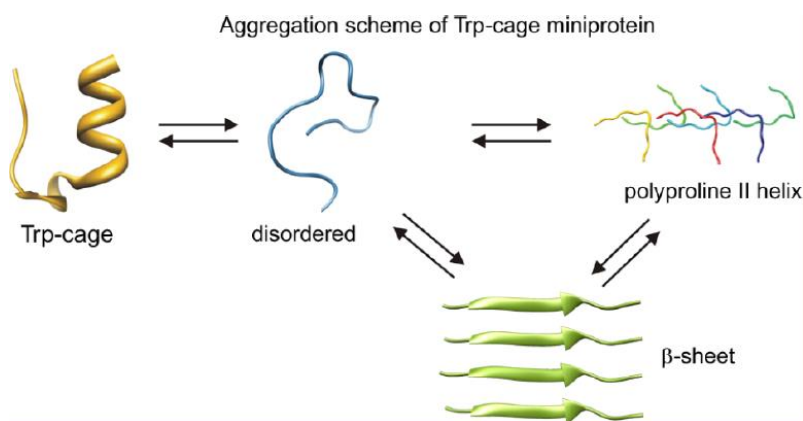


Figure 5: Egyes Trp-kalitka fehérjék aggregációs folyamatának szerkezeti lépései

Összehasonlító szintetikus munkát és analízist végeztünk egyes mini fehérjék szilárd-fázisú és bakteriális expressziós előállítására, analitikai tisztaságuk és költséghatékonyságuk vonatkozásában. Különböző G-fehérje kapcsolt receptorral kölcsönható peptidek szintézisét, mind szilárd fázisú peptidszintézissel, mind bakteriális expresszióval, megoldottunk, többször megismételtünk, majd összehasonlító elemzésben értékeltük ezeket a tisztítás, az $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ izotópjelölés gazdaságossága és a környezet terhelése szempontjából. Megállapítottuk, hogy a két módszer nem kompetitív, hanem komplementer jellegű. (Straner 2016_CurrProtPeptSci).

Kimutattuk, hogy az ECD vizsgálati módszerben az aromás aminosavak (**Tyr, Trp**) **L_b sávja** a fehérje **feltekeredtségét jelző szenzorként** is alkalmazható. Az ezen alapuló új közeli-UV tartományba eső ECD módszert dolgoztunk ki, melyet már ismert NMR szerkezetű triptofán-kalitka minifehérjék segítségével kalibráltunk, majd validáltunk, munkánk címlapra került (Farkas_2016_ChemAEurJ).



Figure 6: Közeli-UV ECD spektrum mint egyes fehérjék feltekeredtségének szenzora

A fent leírt megfigyelések és kutatási eredményeink lehetővé tették, hogy racionális térszerkezet alapú tervezést követően megjavítsuk az Ex-4 gyengébb vízoldhatóságát. Analóg minifehérjék konformációs stabilizálásán keresztül, a helikális régió hosszának szisztematikus

változtatásán át jutottunk el - a fehérjék konformációját és dinamikáját ECD és NMR spektroszkópiai mérések segítségével igazolva - ahhoz, hogy kedvezőbb farmakodinámiájú molekulát hozzunk létre. Analógjaink inzulin-szekrécióna gyakorolt hatását vizsgálva sikerrel állítottunk elő egy 39 aminosavas fehérjét, amelynek nagyobb lett a hélix-tartalma, s ezáltal megnőtt a vízdoldhatósága, úgy hogy eközben az Ex-4-hez hasonló bioaktivitását megőrizte ([Rovo_2014_Biochemistry](#)). Az Ex-4 analóg minifehérjék hélix-tartalmának és biostabilitásának fokozása céljából megkezdjük további alkalmas foldamerek kémiai szintézisének előkészítését. Összefoglaló monográfiát publikáltunk a víz szerepéről a fehérjék feltekeredése, stabilitása, oligomerizációja és aggregációja kapcsán ([Vajda_2014_JPeptSci](#)).

Az Ex-4 et megkötő GLP-1 receptor extracelluláris doménjének bakteriális expressziója során mutatkozó *refolding* problémát, hosszú évek sikertelen próbálkozásait követően 2017-re sikerült végre oldanunk. A különböző fúziós partnerek (GST, MBP, SUMO), és diszulfidhíd izomerázok alkalmazásával sikerült előállítanunk a helyes diszulfidhíd párosodást tartalmazó fehérjét, melyet HPLC tisztítást követő mikroszekvenálással határoztunk meg. A nagybani előállítása folyamatban van, a közlemény előkészületben ([Stráner_2017_előkészületben](#)).

E) További biokatív peptidek és fehérjék

A **penetratin** származékok együtműködésben végzett vizsgálata során antibakteriális hatású származékok (RQIKIWFQNRRM[O]KWKK-NH₂ és RQIKIFFQNRRM[O]KFKK-NH₂ metionin-szulfoxid származékok) konformációs vizsgálatát végeztük el több módszer kombinációjával az antibakteriális aktivitás jobb megértése céljából. ([Garro_2013_ChemBiolDrugRes](#)) és ([Parravicini_2016_ArchPharmChemLifeSci](#)). CD spektroszkópiai vizsgálatokat és molekuladinamikai szimulációkat végeztünk vízben és trifluoroetanol/víz elegyében, s ez alapján egyes szekvenciák bioaktivitásának térszerkezet függését tudtuk megadni.

NMR-rel vizsgáltuk gyógyszervegyületek sejtbe juttatásában szerepet játszó **NGR** (Asn-Gly-Arg részletet tartalmazó) **ciklopeptidek** stabilitását. Az Asn-Gly tartalmú peptidek vizes oldatban spontán dezamidálódnak, s ezért gyógyszerek irányított célba juttatásban játszott szerepük megváltozik. Kimutattuk, hogy a reaktáns csoportok távolsága korrelál a peptidek stabilitásával. Az Asn oldallánc térállása és H-hídiban történő megkötése csökkenti a konformációs szabadságot, így növelve a peptid kémiai stabilitását ([Enyedi_2015_JMedChem](#)). Általában az Asn és Asp (**Asx**) tartalmú peptidekben lejátszódó addíciós-eliminációs reakciók révén izopeptid kötések alakulnak ki. Védett és nem védett Asx-Gly részletet tartalmazó tetrapeptidek kémhatás- és hőmérsékletfüggő NMR stabilitásvizsgálatával bizonyítottuk, hogy a magasabb pH és a magasabb hőmérséklet kedvez ennek az átalakulásnak. A pozitív töltést tartalmazó peptidek kevésbé kemostabilak, a negatív töltés ezzel szemben jelentősen lassítja ugyanezt az izomerizációs folyamatot. A keletkező termékek aránya az átalakulás köztitermékének szterikus és elektronikus jellemzőitől függ. A fehérje szerkezeti adatbázis (PDB) elemzése alapján kimutattuk, hogy az Asx ψ és χ_1 torziós szögeinek értéke befolyásolja döntően a reagáló csoportok távolságát, s ezáltal magát az izomerizációt. Az izopeptid keletkezését kimutattuk és a terméket, NMR spektroszkópiával jellemeztük a Tc5b feltekeredett minifehérje Asn-Gly tartalmú pontmutánsa esetén ugyanúgy, mint alkalmas globuláris (pl. SH3), vagy rendezetlen (pl. ERD14) fehérje esetében ([Láng_2017_beküldés alatt](#)).

F) Nagy rendszerek, fehérje komplexek térszerkezetvizsgálata, globuláris és belsőleg rendezetlen fehérjék, komplexeik, inhibitoraikkal alkotott funkcionális egységeik

Alább röviden néhány olyan fehérje kapcsán elért tudományos eredményeinkről számolunk be, melyek molekulatömege nagy, térszerkezetük NMR-el és/vagy röntgen diffrakcióval vizsgálható és elsődleges motivációnk a bioaktivitás konformációs hátterének megadása volt.

A **MASP-1 és MASP-2** fehérjék a komplement aktiválódás lektin útjának korai enzimei, ezáltal a veleszületett immunitásban töltenek be fontos szerepet. A kutatócsoport együttműködő partnerei *in vitro* evolúciós technikával kifejlesztettek a MASP-1 és MASP-2 enzimekre specifikus inhibitorpárt, amelyekkel funkcionális tesztekben bizonyították a MASP-1 elsődleges fontosságát a komplement aktiválódás lektin útján. Meghatároztuk mindkét enzim/inhibitor komplex kristályszerkezetét, amelyek feltárták az inhibitor-specifititás szerkezeti hátterét (Heja_2012_J.Biol.Chem.). Meghatároztuk a zimogén MASP-1 kristályszerkezetét. A zimogén és aktivált szerkezetek összehasonlítása rávilágított arra, hogy a MASP-1 nagyobb aktivitásának egyik oka, hogy a hosszabb és polárisabb 2. hurokrégiója megkönnyíti a dinamikus átmenetet a nyitott és csukott konformációs állapotok között. (Megyeri_2013_J.Biol.Chem). A veleszületett immunitásban fontos szerepet játszó enzimaszkád rendszer, a *komplement* aktiválódásának egyik korai enzimének, a **MASP-2-nek** a röntgendiffrakciós szerkezetvizsgálata során az egyláncú proenzim egy új konformációját fedeztük fel, ami segíthet a flexibilitás proenzim aktiválódásban játszott szerepének részletesebb megértésében. Az uridin pszeudouridinná történő átalakítását vezérlő komplex fehérje/RNS enzim szerkezetét és működési mechanizmusát *in silico* módszerekkel tanulmányoztuk. Létrehoztuk és optimaltunk az emberi enzim és betegséget okozó mutánsai homológia modelljét. A fehérje-fehérje határfelületre eső mutációról megmutattuk, hogy az enzim aktív helyén is jelentős szerkezeti változásokat indukál, így valószínűleg megakadályozza a pszeudo-uridinációs reakció lejátszódását. Az enzimreakció QM/MM vizsgálata során kimutattuk, hogy a mutáció hatására átrendeződő Asp-Arg aminosav-pár a katalitikus reakcióban kritikus szereppel bír.

A **dUTPáz** a preventív DNS javításban résztvevő esszenciális enzim, a dUTP hidrolízisét katalizálja. A reakciómechanizmus felderítését célzó kutatásokhoz kapcsolódóan a reakciót *in situ* ³¹P NMR spektroszkópiai mérésekkel követtük. Megállapítottuk, hogy a reakció lefutásában a Mg²⁺ ion szerepet játszik, jelenlétében a nukleofil támadás az α foszfor atomon történik. A spektrumok kvantitatív kiértékelésével kinetikai modellt állítottunk fel. *Staphylococcus* fágból származó dUTPáz enzimek *moonlighting* fehérjéknek adódtak. Részt vettünk a ϕ 11 fág dUTPáz szerkezetének megoldásában és felderítettük a fágokra jellemző inszert motívum szerkezeti szerepét, a stabilizáló minidomén Mg²⁺ kötő funkcióval együtt. (Barabas_2013_NuclAcidRes) és (Leveles_2013_BiolCrystalActaCrysSecD). Ennek az esszenciális enzimnek, a ϕ 11-ben jelen levő speciális kiterjesztésének, a szerkezet-funkció közötti összefüggés megértése hozzásegíthet minket a jövőben szelektíven ható gátló molekulák kifejlesztéséhez.

Az **acilpeptid-hidroláz** (APH) két doménből álló szerin-proteáz, az oligopeptidázok családjába tartozik. Krisztallográfiai vizsgálataink során az enzim két különböző globális konformerét figyeltük meg, amelyek segítségével megállapítottuk, hogy kettős funkciójukat (méretszelektivitás és katalízis) „konformációs szelektív mechanizmussal” valósítják meg. Az **oligopeptidázok** funkciója szempontjából fontos szubsztrát méretszelektív új mechanizmusát fedeztük fel a *Pyrococcus horikoshii* acilaminoacil peptidáz szerkezetvizsgálata során. Az enzim szimmetrikus hexamerjeiben a szubsztrát egy csatornarendszeren végighaladva éri el az aktív helyet, ezáltal az csak teljesen letekeredett, oligopeptid méretű szubsztrátok számára hozzáférhető. Szerkezeti összefüggést fedeztünk fel a méretszelektív típusa és a hidroláz doménben található β -redő aggregációra hajlamos élének védelme között. (Menyhard_2013_JBiolChem). Az **oligopeptidázok** szerkezetvizsgálata során egy kovalens

inhibitor segítségével igazoltuk, hogy az *A. pernix* acilaminoacil-peptidáz (AAP) szubsztrát-méret szelektivitása, valóban a két doménes enzimnek egy katalitikusan inaktív nyitott és egy aktív csukott állapotán keresztül valósul meg. Kristallográfiai és molekuladinamikai vizsgálatokkal igazoltuk, hogy kis ligandumok bejuthatnak a csukott formába is, nagyobb szubsztrátok (oligopeptidek) bejutása viszont a nyitott formán keresztül valószínű (Menyhard_2015_BiolCrystalActaCrysSecD). Emlős AAP szerkezetvizsgálatában először sikerült olyan kristályt előállítani, amelynek röntgendiffrakciós mérésével lehetővé vált a térszerkezet megoldása. Jelenleg a szerkezetfinomítást végezzük. Kristallográfiával vizsgáltuk két fajból (ember és a malária kórokozója: *Plasmodium falciparum*) származó univerzális kalcium-szenzor fehérjének, a kalmodulinnak ugyanazzal a célpeptiddel alkotott komplexét és jellegzetes különbségeket találtunk a kölcsönhatás-mintázatban, a peptid konformációban és horgonyzó oldalláncokban is.

A szteroid-rezisztens nefrotikus szindróma (SRNS) kialakulásáért felelős egyik fehérjét, a **podocint** vizsgáltuk a SE kutatóival kooperációban. Együttműködő partnereink szokatlan öröklési arányokat találtak, és felfedezték, hogy a jelenség hátterében az áll, hogy az R229Q variáns különböző allélekkel kombinálódva különböző (beteg/egészséges) fenotípust eredményez. A kutatócsoportban a podocin különböző (homo- és hetero-) dimerjeinek modellezésével jellegzetes különbségeket fedeztünk fel a betegséget hordozó és nem hordozó formák között. A **Nature Genetics** cikkünkben elsőként adtuk meg e jelenség molekuláris magyarázatát (Tory_2014_NatGen). A szteroid rezisztens nefrózis egyik okozója a podocitákban kifejeződő **podocin** fehérje pontmutációiban keresendő. Különböző podocin fragmentumokat állítottak elő *E. coli* expressziós rendszerben szerkezetvizsgálati célokra (kristallográfia, NMR, ECD). A kristályosítási kísérletek jelenleg is zajlanak, az ECD vizsgálatok eredményeiből azonban már kimutathatóak a letális és nem letális mutánsok hatásai.

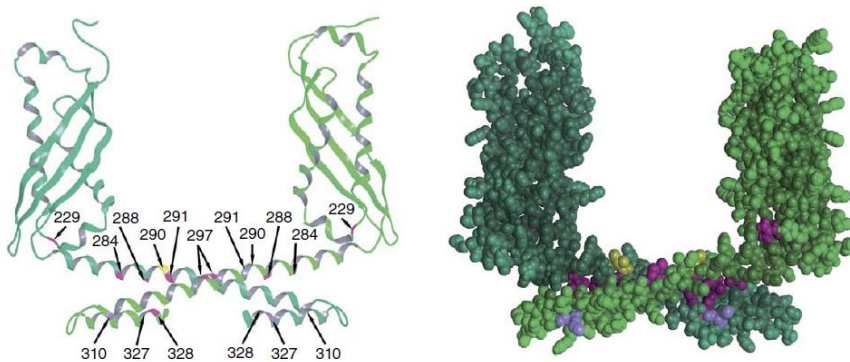


Figure 7: A podocin homo- és hetero-dimerjeinek modelljei jellegzetesen eltérőek a betegséget hordozó és nem hordozó formák között.

Az **LC8 dinein** könnyűlánc (DLC) csomóponti fehérje, mely számos, különböző funkcióval rendelkező fehérjéhez képes kötődni és ezáltal szabályozni azok működését. Röntgen-diffrakcióval meghatároztuk egy *in vitro* evolúcióval kifejlesztett, minden eddiginél erősebben kötődő peptiddel alkotott komplexének térszerkezetét és vizsgáltuk a fehérje által kialakított specifikus kölcsönhatásokat. Részt vettünk az LC8 dinein, egy csomóponti dimer fehérje könnyűláncának (DYNLL) és egy szállításért felelős motorfehérje (miozin 5a) kötőrégiójának jellemzésében. NMR módszerrel jellemeztük a miozin peptidet szabad és DYNLL-hez kötött formáit. Meghatároztuk, hogy szabad állapotban a peptid rendezetlen (a kötőrégióban kis hélixképző hajlammal), míg kötött formában a peptidszakasz β -szál térszerkezetet vesz fel (Bodor_2014_Biochemistry).

A Ca-ion aktivációt követően az **S100A4** fehérje számos más fehérjével hat kölcsön, s mint ilyen a metasztázis kialakulásában is szerephez jut. A jobb megértés érdekében a C-terminálisán elhelyezkedő rendezetlen szakasz funkcionális szerepét vizsgáltuk és azt találtuk, hogy Ca^{2+} ion jelenlétében a rendezetlen szakasz kiegyenesedik, mely tény NMR mérésekkel és MD szimulációkkal is alátámasztottuk. Feltételezhető hogy éppen ez a konformációs változás teszi lehetővé az S100A4 fehérje más fehérjékkel való intenzív kölcsönhatását is. (Duelli_2014_PlosOne) és (Palfy_2016_ChemBioChem) Hasonló megfontolásból vizsgáltuk az S100B fehérjét is (Gogl_2016_JBiolChem).

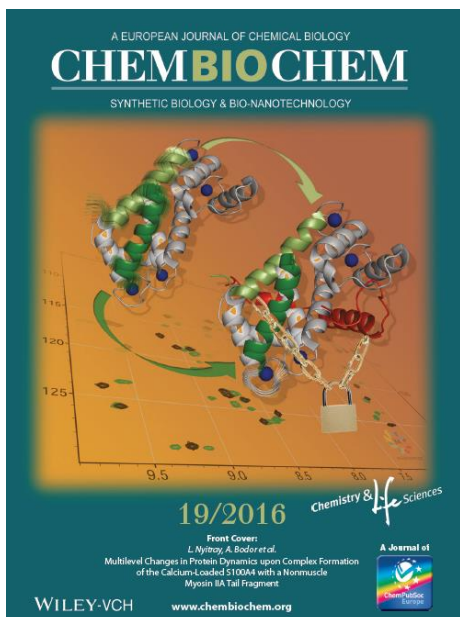


Figure 8: Az S100A4 fehérje komplexképzésének többszintű dinamikája

Más kinázokat aktiváló mitogén-aktivált protein kináz (**MAPKs**) regulációja rövidebb, vélhetőleg kevésbé rendezett fehérjeszakaszokon keresztül valósul meg. NMR módszerekkel vizsgáltuk a mérhető relatív kémiai-eltolódásokból kiolvasható térszerkezeti adatokat és segítettük megérteni a kötődés molekuláris hátterét (Alexa_2015_PNAS).

Az **ERD14** a dehidrinek családjába tartozó növényi stresszfehérje, korábbi vizsgálatok szerint szerkezet nélküli fehérje (intrinsically disordered protein, IUP). Elvégeztük az 185 aminosav hosszú fehérje NMR asszignációját, és kimutattuk, hogy a teljes fehérje rendezetlen, de néhány rövid szakaszon a konformációs mozgás korlátozott, 5-25% hélix kialakítási hajlammal. Ezek valószínűleg a funkcionális kölcsönhatásokhoz részlegesen előre formált elemek a fehérjén belül (Agoston_2017_Cell beküldés alatt).

Az idegrendszeret érintő **Parkinson betegségben** kimutatható, hogy az alfa-synuclein és a **TPPP/p25** rendezetlen fehérjék patológiás kölcsönhatása aggregációt eredményez és a betegség kialakulását. Ez a kölcsönhatás eltérő a fiziológiás tubulin és TPPP/p25 közötti kölcsönhatástól, így a gyógyszertervezés stratégiája a patológiás kölcsönhatás megszüntetésére összpontosít. Nemcsak a fő 147-156-os TPPP/p25 kötőrégió, hanem másodlagos kötőrégiók is (pl. 59-62) hozzájárulnak ehhez a kölcsönhatáshoz, melyben az ú.n. kaméleon fehérjék - így a TPPP/p25 - konformációs plaszticitása tükröződik.

További kiegészítő adatok és információk kutatómunkánkról:

- 1) Az **NK101072 pályázat futamideje alatt futó, benyújtott és elnyert kutatási támogatásaink** között említünk több OTKA (K72973, NK67800, NK100769, PD101095), több EUs (EAST-NMR (228461), COST CM0803, CPR-ICGEB ICGEB09-03,

Horizon 2020 programban iNEXT és Biostruct-X BAG) és egy ipari (Sanofi/Frankfurt) kutatási támogatást. MTA pályázati keretéből kaptunk támogatást 500 MHz-es Bruker NMR DRX berendezés elektronikájának teljes cseréjére, az MTA MedInProt programjának köszönhetően a kutatócsoport több tagjának kisebb támogatást, illetve az NKFIH Vekop keretében a 700 MHz-es NMR egy hideg mérőfej vásárlására.

- 2) **Kutatócsoportunk hazai tudományos kapcsolatai** szerteágazóak. Ezek közül a legfontosabbakat foglaljuk alább össze: BMGE Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék (dUTPáz), Peptidkémiai Kutatócsoport (kalpain), ELTE Biokémiai Tanszék (MASP, DLC); ELTE Fiziológia és Neurobiológiai Tanszéke és Számítógéptudományi Tanszék (dUTPáz); MTA-ELTE Peptidkémiai (NGR, MASP), MTA TTK Enzimológiai Intézet Genom Metabolizmus (dUTPáz), Funkcionálisan Rendezetlen Fehérjék (ERD14), Proteáz (APH) és Sejt Architektúra (TPPP/p25) (MASP, cukor-aminosavak) laboratóriumok, MTA Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont (magányos töltött α -hélixek), Semmelweis Egyetem I. Gyerekgyógyászati Klinika (Ex-4, podocin), SZTE Kémiai Informatika Tanszéke (atropizomerizáció Ramachandran térkép), SZTE Gyógyszerkémiai Intézete, Gyulai Megyei Kórház (benzotiazin-származékok), SZTE Orvosi Vegytani Intézete (Trp-kalitka, gombaölő peptidek penetratin), MTA Alkaloid Kémiai Kutatócsoport (koronaéterek), MTA Alkaloid Kémiai Kutatócsoport és a Richter Gedeon gyógyszergyár.
- 3) **Kutatócsoportunk nemzetközi tudományos kapcsolatai** összetettek és sokrétűek, alább csak a legfontosabbak kerülnek felsorolásra: Aarhus-i Egyetem (Ramachandran térkép), Novo Nordisk, (II-típusú cukorbetegség) Dánia, San Luis-i Nemzeti Egyetem, Argentína (gombaölő hatású peptidek, aggregáció), Torontói Egyetem, Kanada (β -peptidek atropizomerizáció, hélixek, Ramachandran térkép) és Universitat Autònoma de Barcelona, Spanyolország (β -peptidek), Wisconsini Egyetem USA (rubredoxin), EMBL-Hamburg (MASP), Frankfurti Goethe Egyetem (GPCR), Göteborgi Egyetem (DYNLL2) Sanofi Frankfurt (aggregáció) Németország, King's College London, UK (dUTPáz), Descartes Egyetem, Párizs (podocin), Lyoni Egyetem CRMN (NMR-módszerfejlesztés), Franciaország és Oszaka Egyetem, Japán (MAS-NMR).
- 4) **Tudományt népszerűsítő**, ismeretterjesztő, párbeszédet a tudomány terén elsegítő munkáink kapcsán elért szakmai eredményeink kivonatosan: legalább 30 tudományt népszerűsítő előadást tartottunk és írtunk több ismeretterjesztő magyar nyelvű cikket az elmúlt 5 év során. Több kollégával (Buday László és Nyitray László) közösen létrehoztuk előbb az „*Open Laboratory of Protein Science*” formációt, majd az MTA támogatásával 2014-től házigazdái vagyunk a MedInProt Kiválósági Együttműködési Programnak, illetve a Szent-Györgyi előadás sorozatnak. Több mint 400 európai kutató számára EuChems konferenciát „*4th European Conference on Chemistry for Life Sciences*” és szatelit eseményeket szerveztünk, a krisztallográfia nemzetközi éve alkalmából. Rendszeres előadói vagyunk a szegedi majd miskolci helyszínű kémiai nyári iskoláknak melyen a Torontói Egyetemről érkező diákok számára tartottunk előadásokat. A kutatócsoport vezetőjének adományozták 2011-ben a Bolyai alkotói díjat, mely elismerés kapcsán tucatnál több tudományt népszerűsítő előadást tartott (pl. az Alkímia Ma előadássorozat 100. előadását), TV, rádió, internet előadáson vett részt, írt ismeretterjesztő cikket. A kutatócsoport vezetője a fehérjék vizsgálati módszereit és esettanulmányokat összefoglaló átfogó, tankönyvként is használható fehérjetudományi

szakkönyv írásába kezdett szerkesztőként Buday László és Nyitray László kollégáival, melynek több fejezetét kutatócsoportunk munkatársai írták.

- 5) **PhD hallgatóink közül 5** végzett az elmúlt 5 évben és 14 kezdte meg vagy fejezi be hamarosan disszertációja elkészítését.

Megjelent tudományos közlemények (közül azokra, melyek a jelen pályázat által támogatottak a fenti szövegtörzsében piros színnel hivatkozzuk)

Alexa A, Gógl G, Glatz G, Garai Á, Zeke A, Varga J, Dudás E, Jeszenői N, Bodor A, Hetényi C, Reményi A (2015) Structural assembly of the signaling competent ERK2–RSK1 heterodimeric protein kinase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 112(9):2711-2716.

Ángyán AF, Perczel A, Gáspári Z (2012) Estimating intrinsic structural preferences of de novo emerging random-sequence proteins: is aggregation the main bottleneck? *FEBS Lett.* 586(16):2468-2472.

Barabás O, Grolmusz VI, Szabadka Z, Zagyva I, Kele Z, Rosta E, Perczel A (2013) Catalytic mechanism of α -phosphate attack in dUTPase is revealed by X-ray crystallographic snapshots of distinct intermediates, ³¹P-NMR spectroscopy and reaction path modelling. *Nucleic Acids Res.* 41:10542–10555.

Beke-Somfai T, Csizmadia IG, Perczel A (2012) *Amino Acids* 43:735-749.

Jákli I, Jensen SJK, Csizmadia IG, Perczel A (2012) *Chem. Phys. Lett.* 547:82-88.

Bodor A, Radnai L, Hetényi C, Rapali P, Láng A, Kövér KE, Perczel A, Wahlgren WY, Katona G, Nyitray L (2014) DYNLL2 dynein light chain binds to an extended linear motif of myosin 5a tail that has structural plasticity. *Biochemistry* 53(45):7107-7122.

Csordás B, Nagy A, Harmat V, Zsoldos-Mády V, Leveles I, Pintér I, Farkas V, Perczel A (2016) Origin of problems related to Staudinger reduction in carbopeptoid syntheses. *Amino Acids* 48: 2619-2633.

Duelli A, Kiss B, Lundholm I, Bodor A, Petoukhov MV, Svergun DI, Nyitray L, Katona G (2014) The C-terminal random coil region tunes the Ca²⁺-binding affinity of S100A4 through conformational activation. *PLoS One* 9(5):e97654.

Enyedi KN, Czajlik A, Knapp K, Láng A, Majer Z, Lajkó E, Kőhidai L, Perczel A, Mező G (2015) Development of Cyclic NGR Peptides with Thioether Linkage: Structure and Dynamics Determining Deamidation and Bioactivity. *J Med Chem.* 58:1806-1817.

Farkas V, Csordás B, Hegyi O, Tóth GK, Perczel A (2013) Foldamer Stability Coupled to Aggregation Propensity of Elongated Trp-Cage. *Eur. J. Org. Chem.* 13:3513-3522.

Farkas V, Jákli I, Tóth GK, Perczel A (2016) Aromatic cluster sensor of protein folding: near-UV ECD bands assigned to fold compactness. *Chemistry A Eur. J.* 22:13871-13883.

Galant NJ, Song HC, Jákli I, Viskolcz B, Csizmadia IG, Knak Jensen SJ, Perczel A (2014) A theoretical study of the stability of disulfide bridges in various β -sheet structures of protein segment models. *Chem. Phys. Lett.* 593:48-54.

Garro AD, Olivella MS, Bombasaro JA, Lima B, Tapia A, Feresin G, Perczel A, Somlai C, Penke B, López Cascales J, Rodríguez AM, Enriz RD (2013) Penetratin and derivatives acting as antibacterial agents. *Chem Biol Drug Des.* 82(2):167-177.

Gerlei KZ, Jákli I, Szóri M, Jensen SJK, Viskolcz B, Csizmadia IG, Perczel A (2013) Atropisomerism of the Asn α Radicals Revealed by Ramachandran Surface Topology. *J. Phys. Chem. B* 117:12402-12409.

Gerlei KZ, Élő L, Fiser B, Owen MC, Jákli I, Knak Jensen SJ, Csizmadia IG, Perczel A, Viskolcz B (2014) Impairment of a model peptide by oxidative stress: Thermodynamic stabilities of asparagine diamide C α -radical foldamers. *Chem. Phys. Lett.* 593: 104-108.

Gógl G, Alexa A, Kiss B, Katona G, Kovács M, Bodor A, Reményi A, Nyitray L (2016) Structural basis of Ribosomal S6 Kinase 1 (RSK1) inhibition by S100B Protein: modulation of the Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK) signaling cascade in a calcium-dependent way. *J Biol Chem.* 291(1):11-27.

Goldschmidt Góz V, Pintér I, Csámpai A, Jákli I, Zsoldos-Mády V, Perczel A (2016) Hydrogen-Bonding Network Anchors the Cyclic Form of Sugar Arylhydrazones. *Eur J Org Chem.* 20:3419-3426.

Harmat V, Domokos K, Menyhárd DK, Palló A, Szeltner Z, Szamosi I, Beke-Somfai T, Náráy-Szabó G, Polgár L (2011) Structure and Catalysis of Acylaminoacyl Peptidase: Closed and Open Subunits of a Dimer Oligopeptidase. *J. Biol. Chem.* 286: 1987-1998.

Héja D, Harmat V, Fodor K, Wilmanns M, Dobó J, Kékesi KA, Závodszy P, Gál P, Pál G (2012) *J. Biol. Chem.* 287:20290-20300.

Jákli I, Jensen JK, Csizmadia IG, Perczel A (2012) Variation of conformational properties at a glance. True graphical visualization of the Ramachandran surface topology as a periodic potential energy surface. *Chem Phys Lett.* 547:82-88.

Jákli I, Fejér SN, Farkas Ö, Viskolcz B, Jensen SJK, Csizmadia IG, Perczel A (2013) Helix compactness and stability: Electron structure calculations of conformer. *Chem. Phys. Lett.* 563:80-87.

Kardos J, Kiss B, Micsónai A, Rovó P, Menyhárd DK, Kovács J, Váradi G, Tóth GK, Perczel A (2015) Phosphorylation as Conformational Switch from the Native to Amyloid State - Trp-Cage as Protein Aggregation Model. *J Phys Chem B* 119(7): 2946-2955.

Leveles I, Németh V, Szabó JE, Harmat V, Nyíri K, Bendes ÁÁ et al (2013) Structure and enzymatic mechanism of a moonlighting dUTPase. *Acta Crystallogr.* D69:2298-2308

Megyeri M, Harmat V, Major B, Végh Á, Balczer J, Héja D, Szilágyi K, Datz D, Pál G, Závodszy P, Gál P, Dobó J (2013) Quantitative characterization of the activation steps of mannan-binding lectin (MBL)-associated serine proteases (MASPs) points to the central role of MASP-1 in the initiation of the complement lectin pathway. *J Biol Chem.* 288(13):8922-8934.

Menyhárd DK, Kiss-Szemán A, Tichy-Rács É, Hornung B, Rádi K, Harmat V et al. (11): A self-compartmentalizing hexamer serine protease from *Pyrococcus horikoshii*: substrate selection achieved through multimerization *J Biol Chem*, 288: 17884-17894 (2013)

Menyhárd DK, Orgován Z, Szeltner Z, Szamosi I, Harmat V (2015) Catalytically distinct states captured in a crystal lattice: the substrate-bound and scavenger states of acylaminoacyl peptidase and their implications for functionality. *Acta Crystallogr. D-Biol. Crystallogr.* 71:461-472.

Menyhárd_2017_JChemInfModel

Nagy A, Zsoldos-Mády V, Csordás B, Pintér I, Farkas V, Perczel A (2016) C-3 epimers of sugar amino acids as foldameric building blocks: improved synthesis, useful derivatives, coupling strategies. *Amino Acids* 49:223-230.

Nemes A, Csóka T, Béni Sz, Farkas V, Rabai J, Szabó D (2015) Chiral recognition studies of alpha-(nonafluoro-tert-butoxy)carboxylic acids by NMR spectroscopy. *J Org Chem.* 80: 6267-6274.

Pálfy G, Kiss B, Nyitray L, Bodor A (2016) Multilevel Changes in Protein Dynamics upon Complex Formation of the Calcium-Loaded S100A4 with a Nonmuscle Myosin IIA Tail Fragment. *Chembiochem.* 17(19):1829-1838.

Parravicini O, Somlai C, Andujar SA, Garro AD, Lima B, Tapia A, Feresin G, Perczel A, Tóth G, Cascales JL, Rodríguez AM, Enriz RD (2016) Small Peptides Derived from Penetratin as Antibacterial Agents. *Arch Pharm (Weinheim).* 349(4):242-251.

Perczel_2017_Molecules

Pohl G, Jákli I, Csizmadia IG, Papp D, Matias GF, Perczel A (2012) Phys. Chem. Chem. Phys. 14:1507-1516.

Pohl G, Gorrea E, Branchadell V, Ortuño RM, Perczel A, Tarczay Gy (2013) Foldamers of β -peptides: conformational preference of peptides formed by rigid building blocks. The first MI-IR spectra of a triamide nanosystem. *Amino Acids* 45:957-973.

Rovó P; Farkas V; Hegyi O; Szolomajer-Csikós O; Tóth GK; Perczel A (2011) Cooperativity network of Trp-cage miniproteins: probing salt-bridges. *J. Pept. Sci.* 17: 610-619.

Rovó P, Stráner P, Láng A, Bartha I, Huszár K, Nyitray L, Perczel A (2013) Chem. Eur. J. 19:2628-2640.

Rovó P, Farkas V, Stráner P, Szabó M, Jermendy Á, Hegyi O, Tóth G K, Perczel A (2014) Rational Design of α -Helix-Stabilized Exendin-4 Analogues. *Biochemistry* 53(22):3540-3552.

Stráner P, Taricska N, Szabó M, Tóth GK, Perczel A (2016) Bacterial expression and/or solid phase peptide synthesis of 20-40 amino acid long polypeptides and miniproteins, the case study of Class B GPCR ligands. *Curr Protein Pept Sci.* 17(2):147-55.

Szaniszló Sz, Csizmadia IG, Perczel A (2017) How weak an acid can be? Variations of H-bond and/or van der Waals interaction of weak acids. *Struct Chem.* 28:371-378.

Szenasi_2017_BBA

Tory K, Menyhárd DK, Woerner S, Nevo F, Gribouval O, Kerti A, Stráner P, Arrondel C, Cong EH, Tulassay T, Mollet G, Perczel A, Antignac C: Mutation-dependent recessive inheritance of NPHS2-associated steroid-resistant nephrotic syndrome. *NATURE GENETICS*, 46 (3): 299-304. 8 (2014)

Vajda T, Perczel A (2014) Role of water in protein folding, oligomerization, amyloidosis and miniprotein. *J Pept Sci.* 20(10):747-759.