

Záró szakmai beszámoló

Sejtpermeabilis, peptid alapú kalpain inhibitorok fejlesztése PD-83923

1. Előzmények, célok

A kalpainok intracelluláris – sejten belül található - cisztein proteázok, melyek működéséhez Ca^{2+} -ion szükséges. A két legrégebben ismert és valamennyi szövetben megtalálható enzim az m- és μ -kalpain. Az aktivált enzim a szubsztrátfehérjéket, csak néhány helyen hasítja el, ezáltal beindítva vagy gátolva azok működését. E szabályozási funkción keresztül számos fiziológiai folyamatban játszanak szerepet, pl. sejtmozgás, sejtosztódás és differenciálódás, apoptózis (1). Ha a működésük szabályozatlanná válik, akkor a fokozott vagy csökkent kalpain aktivitás betegségek kialakulásához vezethet. A túlaktiválódott kalpain több fehérjét hasít el, fokozva azok működését és így többek között szerepet játszik neurodegeneratív betegségekben, mint az Alzheimer-, a Huntington-kór, de ez áll a háttérben a traumás agy- és gerincvelő-sérülés hatására bekövetkező idegsejt-pusztulásnak is (2, 3). A kalpain enzimmel kapcsolatban számos kutatás irányul mind hatékonyabb és szelektívebb inhibitorok előállítására (4).

A kutatásunk során újfajta megközelítés alkalmazásával minél hatékonyabb és szelektívebb kalpain inhibitorok előállítását tűztük ki célul. Az általunk korábban leírt TPLKSPPPSPR (5) szekvenciájú szubsztrát peptidből kiindulva terveztünk peptid-alapú kalpain inhibitorokat előállítani. A megközelítésünk az volt, hogy használjuk fel a szubsztrát molekulát az ideális kölcsönhatás kialakításához, de módosítsuk úgy, hogy az eredetileg szubsztrát molekula gátolja az enzimet. Ehhez olyan módosítást – azaglicin (Agly), epoxiszukcinil-csoport (Eps) és ketometilén-csoport - terveztünk beépíteni a P_1 pozícióban található lizin (Lys) helyett/után, mely reverzibilis vagy irreverzibilis kötést alakít ki az enzim aktív centrumában található cisztein tiol-csoportjával és megengedi, hogy mind a P mind a P' helyeken lévő aminosavakat beépíthessük az inhibitor molekulánkba.

2. Eredmények

2.1. Azapeptidek

A szubsztrát szekvencia módosítása során a P_1 helyen található Lys aminosavat azaglicinre cseréltük. Habár a lizin oldalláncának fontos szerepe van a szubsztrát kötődésében (6), az Agly beépítését azalizin helyett két okból választottuk. A C-atom N-atomra történő cseréje jelentősen módosíthatja az oldallánc térállását a lizinhez képest és ez rossz illeszkedést eredményezhet az S_1 kötőhelyen. A másik ok az azaglicin egyszerű beépíthetősége a szilárd fázison felépítendő peptidláncba.

A szubsztrát szekvenciából kiindulva különböző hosszúságú, és összetételű azapeptidet állítottunk elő, vizsgálandó az azapeptidek hosszának és egyes aminosavaknak a hatását az enzimgátló képességre és szelektivitásra. Az azapeptideket szilárd fázisú peptidszintézissel építettük fel. Az azaglicin kialakítása szilárd fázison történt Boc-hidrazid és 1,1'-karbonildiimidazol felhasználásával (7). Az azapeptideket hidrogén-fluoriddal hasítottuk le a gyantáról és liofilizálás után RP-HPLC-val tisztítottuk. A peptidek tisztaságát analitikai RP-HPLC-val vizsgáltuk, míg azonosításuk ESI-MS-rel történt.

A szubsztrát szekvenciával megegyező azapeptid (H -ThrProLeuAglySerProProProSerProArg- NH_2) gátolta az m-kalpaint ($K_i = 20,3 \mu\text{M}$). Ez az eredmény alátámasztotta azon elgondolásunkat, hogy elő lehet állítani inhibitor tulajdonságú származékot a szubsztrát peptidből, ha egy azaaminosavat beépítünk annak P_1 helyére. Az

oldallánc hiánya pedig egyáltalán nem befolyásolta az azapeptid kötődését, ugyanis annak K_i értéke kisebb, mint az eredeti szubsztrát enzimkötődését jellemző K_M érték ($K_M=93 \mu\text{M}$) (5). Ha acetileztük az *N*-terminális aminosocsoportot, akkor egy még jobb hatású inhibitorot kaptunk (*Ac*-ThrProLeuAglySerProProProSerProArg-*NH*₂, $K_i=7,2 \mu\text{M}$). A továbbiakban az azapeptidek *N*-terminális aminosocsoportját minden esetben acetileztük. A *C*-terminális felől rövidítve a peptideket azt tapasztaltuk, hogy a „PR” dipeptiddel történő rövidítés nem befolyásolja az enzimgátló képességet (*Ac*-ThrProLeuAglySerProProProSer-*NH*₂, $K_i=8,7 \mu\text{M}$). Azonban, további rövidítés a peptid *C*-terminálisa felől a hatás elvesztésével járt. Az *N*-terminális felől akár csak egy aminosav eltávolítása is gátló hatással nem rendelkező származékot eredményezett (*Ac*-ProLeuAglySerProProProSer-*NH*₂, $K_i>100 \mu\text{M}$). Ez a P helyeken található aminosavak kötődésben játszott fontos szerepére utalnak. Az optimalizált 9 tagszámú azapeptidet alapul véve a P₂, P₃ és P₁'₂' helyeken található aminosavak kötődésben betöltött szerepét vizsgáltuk. Az eredeti szekvenciában található aminosavakat a szubsztrát szekvencia meghatározásához használt preferencia mátrixban (5) a 2. és 3. legnagyobb pontszámot kapott aminosavakkal helyettesítettük. Ha a P₂ helyen lévő Leu-t valinra vagy treoninra cseréltük, akkor a gátlóképesség megszűnt. Ez az eredmény jó egyezést mutat az irodalmi adatokkal, melyek a Leu erős preferenciáját mutatják ezen helyen (8, 9). Habár a peptid-szubsztrátokkal végzett vizsgálatok a Val preferenciáját is jelezték e helyzetben (8). A P₃ pozícióban történő változtatás (a prolin triptofánra vagy szerinre történő cseréje) nem befolyásolta a gátló hatást. Ez a nagymértékű tolerancia a különböző oldalláncokkal szemben azzal magyarázható, hogy ezen oldallánc az oldószer felé irányulva kifelé áll a szubsztrát-kötő zsebből (6). A P' helyeken végzett aminosav szubsztitúció a gátlóhatás elvesztését eredményezte.

E szerkezet-hatás összefüggés vizsgálat után az m-kalpain gátlóhatással rendelkező inhibitorok szelektivitását vizsgáltuk. Ehhez μ -kalpainra és katepszin B-re kifejlesztett hatásukat mértük. Valamennyi inhibitor közepes gátló hatást mutatott ($K_i \sim 43-70 \mu\text{M}$) katepszin B enzimen. A legjobb inhibitor (*Ac*-ThrSerLeuAglySerProProProSer-*NH*₂, $K_i=3,5 \mu\text{M}$) így 20-szoros szelektivitást mutatott az m-kalpainra. Az izoformák megkülönböztetésében csak egy inhibitor esetén mértünk jelentős eredményt. A nem acetilezett, a szubsztrát szekvenciával megegyező inhibitor csak kis mértékben gátolta a μ -kalpait ($K_i=169,9 \mu\text{M}$) és mutatott 7,4-szeres szelektivitást az m-kalpain felé. A többi azapeptid ugyan olyan mértékben gátolta mind az m- mind a μ -kalpait.

Mivel az egyes aminosavak jelentősen befolyásolták a gátlóhatást, megvizsgáltuk, hogy ez összefüggésbe hozható-e az oldatbeli térszerkezeteikkel, vagy csak az enzim felszínéhez kötődés során jelentkeznek a különbségek hatása. Vizsgáltuk a natív szekvenciának (*H*-TPLKSPPPS-*NH*₂), gátló hatással rendelkező azapeptideknek (*Ac*-TPLAglySPPPS-*NH*₂, *Ac*-TWLAglySPPPS-*NH*₂, *Ac*-TSLAglySPPPS-*NH*₂) és gátló hatással nem rendelkező származékoknak (*Ac*-TPTAglySPPPS-*NH*₂, *Ac*-PLAglySPPPS-*NH*₂) a másodlagos szerkezetét különböző hőmérsékleten, vízben és trifluoretanolban (TFE) ECD spektroszkópiával. A spektrumok nem mutattak lényeges különbséget a szubsztrát peptid és az azapeptidek térszerkezetében sem vízben, sem a rendezett struktúrákat indukáló TFE-ben. Egyik esetben sem jelent meg kitüntetett rendezett szerkezet, csak néhány konformáció egyensúlyi állapota volt kimutatható (rendezetlen, PPII és β -kanyar). Ugyan erre az eredményre jutottunk a gátló és nem gátló vegyületek spektrumainak összehasonlítása során is. Azt megállapíthattuk, hogy az azaglicinnek nincs hatása az eredeti szubsztrát szekvencia másodlagos szerkezetére.

2.2. Epoxiszukcinil-peptidek

Az azapeptidekkel kapott eredmények alapján a lizin helyén transz-epoxiszukcinil-csoportot tartalmazó (L/D-Eps) peptid-származékokat is előállítottunk. Szemben az azaaminosav

beépítésével, az epoxiszukcinil-csoport jelenléte irreverzibilis inhibitor eredményez. Az elsőként leírt ilyen inhibitor az E-64 molekula (transz-L-epoxiszukcinil-L-leucilamido-4-guanidino-bután) szelektív cisztein proteáz gátlóként viselkedett (10). Ha tehát ezt az egységet építjük a molekulába, akkor szelektíven csak a cisztein proteázokra ható vegyületeket kaphatunk. Vizsgálatainkhoz előállítottuk az azapeptidek estén vizsgált szekvenciáknak megfelelő epoxiszukcinil-analógokat mind L-, mind D- epoxiszukcinil-csoporttal. Ez a módosítás több változtatást eredményez a molekulákon, mint az azaglicin beépítése. A peptid gerinc egy atommal hosszabb lesz, és az *N*-terminális felé eső aminosavak (P₄-P₂ helyeken) kapcsolódása megfordul az eredeti szekvenciában található C-N irányhoz képest.

A 18 analóg előállításához szilárd fázison felépítettük a *C*-terminális pentapeptideket (P₁'-P₅' helyek) és az *N*-terminális tripeptideket (P₄-P₂ helyek) Fmoc/^tBu stratégiával. Az epoxiszukcinil-csoport beépítése a szilárd fázison lévő pentapeptid *N*-terminális aminocsoportjára történt. A jellemzett peptideket oldatfázisban konjugáltuk.

Első lépésként a vegyületek gátló hatását mértük *m*-kalpain enzimen (1. táblázat).

1. Táblázat Epoxiszukcinil-peptidek enzimgátló képessége

Epoxiszukcinil-peptidek	<i>K_i</i> (μM)		
	<i>m</i> -kalpain	μ-kalpain	katapszin B
1. NH ₂ -Thr-Pro-Leu-(L-Eps)-Ser-Pro-Pro-Pro-Ser-NH ₂	>50	12,5	>50
2. NH ₂ -Thr-Trp-Leu-(L-Eps)-Ser-Pro-Pro-Pro-Ser-NH ₂	4,1	14,9	6,6
3. NH ₂ -Thr-Ser-Leu-(L-Eps)-Ser-Pro-Pro-Pro-Ser-NH ₂	14,3	21,9	>50
4. NH ₂ -Thr-Pro-Thr-(L-Eps)-Ser-Pro-Pro-Pro-Ser-NH ₂	>100	>100	>100
5. NH ₂ -Thr-Pro-Val-(L-Eps)-Ser-Pro-Pro-Pro-Ser-NH ₂	29,2	>50	>100
6. NH ₂ -Thr-Pro-Leu-(L-Eps)-Arg-Pro-Pro-Pro-Ser-NH ₂	41,0	23,7	>50
7. NH ₂ -Thr-Pro-Leu-(L-Eps)-Thr-Pro-Pro-Pro-Ser-NH ₂	>50	8,38	12,1
8. NH ₂ -Thr-Pro-Leu-(L-Eps)-Ser-Ser-Pro-Pro-Ser-NH ₂	>100	>100	>100
9. NH ₂ -Thr-Pro-Leu-(L-Eps)-Ser-Gln-Pro-Pro-Ser-NH ₂	>100	>100	>100
10. NH ₂ -Thr-Pro-Leu-(D-Eps)-Ser-Pro-Pro-Pro-Ser-NH ₂	>50	>100	>50
11. NH ₂ -Thr-Trp-Leu-(D-Eps)-Ser-Pro-Pro-Pro-Ser-NH ₂	21,8	3,0	4,5
12. NH ₂ -Thr-Pro-Thr-(D-Eps)-Ser-Pro-Pro-Pro-Ser-NH ₂	nincs adat	nincs adat	nincs adat
13. NH ₂ -Thr-Pro-Val-(D-Eps)-Ser-Pro-Pro-Pro-Ser-NH ₂	>100	>50	>100
14. NH ₂ -Thr-Ser-Leu-(D-Eps)-Ser-Pro-Pro-Pro-Ser-NH ₂	nincs adat	nincs adat	nincs adat
15. NH ₂ -Thr-Pro-Leu-(D-Eps)-Arg-Pro-Pro-Pro-Ser-NH ₂	>50	41,9	>100
16. NH ₂ -Thr-Pro-Leu-(D-Eps)-Thr-Pro-Pro-Pro-Ser-NH ₂	4,2	>50	>50
17. NH ₂ -Thr-Pro-Leu-(D-Eps)-Ser-Ser-Pro-Pro-Ser-NH ₂	>100	>100	>100
18. NH ₂ -Thr-Pro-Leu-(D-Eps)-Ser-Gln-Pro-Pro-Ser-NH ₂	>100	>100	>100

Az L-Eps csoportot tartalmazó és a szubsztrát szekvenciának megfelelő származék nem mutatott gátlást. Ha azonban a prolint triptofánra vagy szerinre cseréltük a P₃ helyen (2-es és 3-as vegyület), akkor inhibitor molekulát kaptunk. A Trp tartalmú származék az egyik legjobb hatású vegyület volt. Szintén gátló hatású vegyületet eredményezett a Leu cseréje valinra a P₂ helyen és a Ser cseréje argininre a P₁' helyen (5-ös és 6-os vegyület). Ha a szubsztrát szekvenciába D-Eps csoportot építettünk be, akkor gátló hatást kaptunk (11-es vegyület). A másik leghatékonyabb inhibitorban D-Eps-csoport volt beépítve, és a szerint a P₁' helyen treoninra cseréltük (16-os vegyület).

A szelektivitást vizsgálandó mértük a vegyületeink enzimgátló képességét μ-kalpain és katapszin B enzimen is (1. táblázat). Az L-Eps-csoportot tartalmazó analógok közül az 1, 2, 3, 6 és 7 analóg gátolta a μ-kalpaint, míg csak a 2-es és 7-es vegyület gátolta a katapszin B enzimet. A vizsgált D-Eps-csoportot tartalmazó analógok közül csak a 11-es és 15-ös vegyület gátolta a μ-kalpaint és csak a 11 vegyület mutatott gátlást a katapszin B-n.

Eredményeink azt mutatják, hogy a szubsztrátból inhibitor molekula elmélet az epoxiszukcinil-csoport beépítésével is megvalósítható. Az egyes analógokat összehasonlítva elmondhatjuk, hogy mind az epoxiszukcinil-csoport térállása, mind az egyes aminosavak milyenség befolyásolja az enzimgátló képességet. Érdekes eredmény, hogy a szubsztrát szekvencián alapuló analóg egyáltalán nem gátolta az m-kalpait, csak μ -kalpain gátlást mutatott annak L-Eps analógja. Mivel ez a katepszin B enzimet sem gátolta elmondhatjuk, hogy sikerült egy μ -kalpain szelektív inhibitorát előállítanunk. Az aminosav-szubsztitúciók eredményeként sikerült előállítanunk két hatékony m-kalpait inhibitorát (2-es és 16-os vegyület), mely utóbbi m-kalpait szelektivitást is mutatott. Az adatok azt mutatták, hogy azok a vegyületek, melyek gátolták a katepszin B enzimet, minden esetben gátolták a μ -kalpain is. Fontos megjegyeznünk, hogy az egyes aminosavak hatása a gátlóképességre eltért az azapeptidek és epoxiszukcinil-analógok esetében. Ennek hátterében a fentebb részletezett eltérések állhatnak.

Hogy jobban megértsük a gátló hatások közötti különbségeket molekulamodellezést végeztünk az egyik hatékony m-kalpait inhibitor (2-es vegyület, L-Eps) és annak kevésbé hatékony analógjával (11-es vegyület, D-Eps). A két inhibitor molekulát az m-kalpait-kalpasztatin komplex (11) aktív helyére illesztettük kétféle elhelyezésben. A számoláshoz a komplexben mutált Ser105 aminosavat visszaállítottuk Cys-re. Az L-Eps-csoportot tartalmazó 2-es vegyület legkedvezőbb illeszkedése a tervezett orientációban történt. Azaz az egyes aminosavak a megfelelő szubsztrát kötőhelybe illeszkedtek, kivéve a P₂ Leu-t és P₁' Ser-t. Ugyanis a Ser foglalta el az S₂ kötőhelyet. Ezzel szemben a D-Eps-csoportot tartalmazó 11-es vegyület kedvezőbb illeszkedése fordított orientációban valósult meg. Az eredetileg P helyekre tervezett aminosavak a P' helyekre kerültek a kötődés során. De még ez a fordított kötődés is sokkal gyengébb volt, mint a hatékonyabb származék esetén számított.

2.3. Ketometilén analógok

Két a szubsztrát szekvencián alapuló ketometilén analóg szintézisét végeztük el: a) *Ac-ThrProLeu-Gly* ψ *[COCH₂]Gly-ProProProSer-NH₂* és b) *Ac-ThrProLeu-Lys* ψ *[COCH₂]Gly-ProProProSer-NH₂*. Az „a” analógot az azapeptidek eredményei alapján terveztük, míg a „b” analóggal a lizin szerepét kívántuk vizsgálni. A két származékban a hasítási helyen található amid-kötés NH-csoportját metilén-csoportra cseréljük. Mindkét esetben szerin helyett glicint tartalmaztak a tervezett analógok.

Az Fmoc-Lys(Z) ψ [COCH₂]Gly-OH és Fmoc-Gly ψ [COCH₂]Gly-OH építőelemeket a megfelelő aminosav-származékból (Fmoc-Lys(Z)-OH és Fmoc-Gly-OH) kiindulva, klórmetilketon intermediéren keresztül állítottuk elő, malonészter szintézissel. Majd a tisztított és jellemzett dipeptid analógokat építettük be szilárdfázison a peptidláncba.

Az *Ac-ThrProLeu-Gly* ψ *[COCH₂]Gly-ProProProSer-NH₂* analógot szilárd fázisú peptidszintézissel, Fmoc/^tBu stratégiát alkalmazva állítottuk elő. Az *Ac-ThrProLeu-Lys* ψ *[COCH₂]Gly-ProProProSer-NH₂* analógot szintén szilárd fázisú peptidszintézissel, de Boc/Bzl stratégiát alkalmazva építettük fel.

Sajnos egyik analóg sem mutatott m- vagy μ -kalpain gátlást. Mivel nem teljesen azonos a szekvenciája a két analógnak az azapeptidekével, vagy az epoxiszukcinil-peptidekkel, ezért nem vonható le következtetés arra vonatkozólag, hogy a származék nem kötődik, vagy a ketometilén-csoport nem lép reakcióba az aktív centrumban lévő tiol-csoporttal.

2.4. Sejtpermeabilis származékok

A szubsztrát peptid sejtbejutásának vizsgálata azt mutatta, hogy az nem képes bejutni a sejtekbe, ezért oktaargininnel alkotott sejtperentráló konjugátumát állítottuk elő és vizsgáltuk (12). A szubsztrát C-terminálisát egy heptaarginin egységgel meghosszabbítva már képes volt

bejutni a sejtekbe, és az heptaarginin rész nem rontotta a szubsztrát tulajdonságokat. Ezekből az eredményekből kiindulva két azapeptid oktaargininnel képzett konjugátumát állítottuk elő - *Ac-TSLAglySPPPSR₈-NH₂* és *Ac-TPLAglySPPPSR₈-NH₂*. A sejtbejutás mértékének vizsgálatához karboxifluoreszcinnel (Cf) jelölt származékokat is előállítottunk - *Cf-TPLAglySPPPS-NH₂* és *Cf-TPLAglySPPPSR₈-NH₂*.

Mindkét konjugátum rendelkezett gátló hatással. Az *Ac-TSLAglySPPPSR₈-NH₂* ($K_i=2,3 \mu\text{M}$) az eredeti azapeptiddel (*Ac-TSLAglySPPPS-NH₂*, $K_i=3,5 \mu\text{M}$) azonos mértékben gátolta az m-kalpaint. Tehát akár csak a szubsztrát estében itt sem rontotta az eredeti azapeptid gátló hatását az oktaarginin jelenléte. Ezzel szemben az *Ac-TPLAglySPPPSR₈-NH₂* ($K_i=0,21 \mu\text{M}$) az eredeti azapeptidhez (*Ac-TSLAglySPPPS-NH₂*, $K_i=8,7 \mu\text{M}$) képest sokkal jobb inhibitornak bizonyult. Ebben az esetben az oktaarginin beépítése a molekulába nem csak nem rontotta, de jelentősen javította is az eredeti azapeptid m-kalpain gátló hatását. E származék esetén megnéztük a μ -kalpain gátló hatást is. Ez is javult az oktaarginin hatására, de nem olyan mértékben, mint az m-kalpain esetén (konjugátum $K_i=5,4 \mu\text{M}$, azapeptid $K_i=16,0 \mu\text{M}$). A konjugátum két enzimen mutatott K_i értékeit vizsgálva azt látjuk, hogy ez a konjugátum 25-szörös szelektivitást mutat m-kalpainra.

Hasonlóan az azapeptidekhez előállítottuk a két hatékony m-kalpain gátló epoxiszukcinil-peptid oktaarginint tartalmazó konjugátumát - *NH₂-Thr-Trp-Leu-(L-Eps)-Ser-Pro-Pro-Pro-Ser-(Arg)₈-NH₂* és *NH₂-Thr-Pro-Leu-(D-Eps)-Thr-Pro-Pro-Pro-Ser-(Arg)₈-NH₂*. Meghatároztuk a két konjugátum μ -kalpainra kifejtett gátló hatását. A *NH₂-Thr-Trp-Leu-(L-Eps)-Ser-Pro-Pro-Pro-Ser-NH₂* analóg rendelkezett μ -kalpain gátlással ($K_i=14,9 \mu\text{M}$), azonban a konjugátuma még hatékonyabbnak bizonyult ($K_i=0,74 \mu\text{M}$). Hasonló eredményt kaptunk a másik peptid és konjugátum esetén is. A *NH₂-Thr-Pro-Leu-(D-Eps)-Thr-Pro-Pro-Pro-Ser-NH₂* epoxiszukcinil-peptid nem gátolta a μ -kalpint ($K_i>50 \mu\text{M}$), míg a konjugátuma jelentősen ($K_i=4,99 \mu\text{M}$). A konjugátumok szelektivitásának meghatározása még folyamatban van.

Összességében elmondható, hogy a konjugálás nem rontja, sőt néhány esetben jelentősen javítja is az eredeti inhibitorok gátlókéességét, vagy akár szelektivitását.

Az azapeptidek esetén vizsgáltuk az azapeptid és konjugátumának sejtbejutását MCF-7 mellrák sejteken. A sejteket 1 és 10 μM -os oldatokkal kezeltük, és mértük az egyes sejtek fluoreszcenciáját áramlási citométerrel. Alacsony koncentráció esetén mindkét vegyület azonos internalizációt mutatott. Azonban növelve a koncentrációt a konjugátum sejtbejutása jelentősen növekedett, míg az azapeptidé nem változott.

A konjugátumok *in vitro* hatásának vizsgálata során csak néhány előkísérletet végeztünk és a mérési módszer beállításánál tartunk.

3. Az eredményekből született publikációk

Az azapeptidekkel kapcsolatos eredményeket folyóirat cikkben publikáltuk:

Bánóczy Z; Tantos A; Farkas, A; Majer, Zs; Dókus, LE; Tompa, P; Hudecz, F (2013) New m-calpain substrate-based azapeptide inhibitors. *J. Pept. Sci.*, 19, 370-376.

Az epoxiszukcinil-peptidekkel kapcsolatos eredményeinket összefoglaló közlemény összeállítás alatt van.

A sejtpermeabilis konjugátumokkal kapcsolatos eredményekből, további vizsgálatok után tervezünk közleményt összeállítani.

A kutatási eredményeket bemutató egyéb közlemények:

Magyar nyelvű közlemények

1. **Bánóczy Z**; Kalpain inhibitorok: szubsztrát peptidből inhibitor molekula. Élet és Tudomány Ismeretterjesztő Cikkpályázat 2013, beküldve
2. **Bánóczy Z**; Gyógyulást hordozó peptidek. *Természet Világa*, 144, 346-349.

Konferencia kiadványok

1. **Bánóczy Z**; Dókus E.L; Tantos Á; Tompa P; Friedrich P; Hudecz F Azapeptide calpain inhibitors In: Peptides 2012: Proceedings of the 32nd European Peptide Symposium (Ed.:Kokotos G, Constantinou-Kokotou V, Matsoukas J) , European Peptide Society, 2012, 100-101.
2. **Bánóczy Z**; Dókus E. L; Tantos Á; Tompa P; Friedrich P; Hudecz F (2012) New azapeptide calpain inhibitors, *J. Pept. Sci.* 18 (S1), 47-47
3. **Bánóczy Z**; Dókus E.L; Tantos Á; Hudecz F. Modulation and analysis of intracellular calpain activity by peptide conjugates. In Peptide Science 2010, Proceedings of the Fifth International Peptide Symposium, (Ed.: Fujii, N., Kiso, Y.), The Japanese Peptide Society, 2011, 39-39.

Előadás/poszter nemzetközi vagy hazai konferencián

1. Dókus E. L; Tantos Á; **Bánóczy Z**; Hudecz F Epoxysuccinyl based calpain inhibitors: structure and activity. 5th European Conference on Chemistry for Life Sciences, Barcelona, Spain 10-12 June 2013
2. **Bánóczy Z**; Dókus E. L; Tantos Á; Tompa P; Friedrich P; Hudecz F New azapeptide calpain inhibitors. 32nd European Peptide Symposium, Athens, Greece 2-7 September, 2012
3. **Bánóczy Z**; Dókus E. L; Tantos Á; Tőke O; Majer Zs; Tompa P; Friedrich P; Hudecz F Azapeptide and epoxysuccinyl-peptide analogues as new calpain inhibitors. 4th European Conference on Chemistry for Life Sciences, Budapest, Hungary, 31 August-3 September, 2011
4. **Bánóczy Z**; Farkas A; Tőke O; Alexa A; Tantos Á; Világi I; Friedrich P; Hudecz F Modulation of intracellular calpain activity by peptide-conjugates. 5th International Peptide Symposium, 47th Japanese Peptide Symposium, Kyoto, Japan, December 4 – 9, 2010
5. **Bánóczy Z**; Dókus E.L; Tantos Á; Hudecz F Azaamniósavat és epoxiszukcinil-csoportot tartalmazó kalpain inhibitorok. MKE Vegyészkonferencia, Hajdúszoboszló, 2013 június 26-28.
6. **Bánóczy Z**; Dókus E. L; Tantos Á; Majer Zs; Tőke O; Tompa P; Friedrich P; Hudecz F Új kalpain inhibitorok: aktivitás és szerkezet. MKE 1. Nemzeti Konferencia Sopron, 2011. május 22-25.

Diplomamunka - témavezetés

1. Szuromi Veronika: Sejtpenetráló kalpain inhibitorok szintézise és vizsgálata. Osztatlan vegyész, ELTE TTK Kémia Intézet, 2013
2. Dókus E. Levente: Peptid alapú kalpain inhibitorok szintézise és vizsgálata. Osztatlan vegyész, ELTE TTK Kémia Intézet, 2012
3. Kiss Enikő: Peptidkonjugátumok alkalmazása kalpain enzim vizsgálatában. Osztatlan vegyész, ELTE TTK Kémia Intézet, 2011

4. Együttműködések, résztvevők

A szintetikus munkában részt vett 3 MSc hallgató, akik munkáikból szakdolgozatot is írtak. Dókus E. Levente PhD hallgatóként bekapcsolódott a szintetikus munkába és az izolált enzimekkel végzett kísérletekbe. Az izolált enzimekkel végzett kísérleteket az MTA-TTK

Enzimológiai Intézetben végeztük Dr. Tantos Ágnes segédletével. Az azapeptidek térszerkezet vizsgálatát CD-spektroszkópiával Dr. Majer Zsuzsa (ELTE Kémiai Intézet, Szerves Kémiai Tanszék) végezte. Az epoxiszukcinil-peptidek enzimkötődésének molekulamodellézését Dr. Karancsiné Dr. Menyhárd Dóra (ELTE Kémiai Intézet, Szerkezeti Kémia és Biológia Laboratórium) végezte.

5. Irodalomjegyzék

1. Croall DE, Ersfeld K. *Genome Biol.* 2007; 8: 218.
2. Huang Y, Wang KK. *Trends Mol. Med.* 2001; 7: 355–362.
3. Saez EM, Ramirez-Lorca R, Moron JF, Ruiz A. *Drug Discov. Today* 2006; 11: 917–923.
4. Donkor OI. *Expert Opin. Ther. Patents* 2011; 21: 601–636.
5. Tompa P, Buzder-Lantos P, Tantos A, Farkas A, Szilágyi A, Bánóczy Z, Hudecz F, Friedrich P. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 20775–20785.
6. Moldoveanu T, Campbell LR, Cuerrier D, Davies LP. *J. Mol. Biol.* 2004; 343: 1313–1326.
7. Wiczerzak E, Drabik P, Łankiewicz L, Ołdziej S, Grzonka Z, Abrahamson M, Grubb A, Brömme D. *J. Med. Chem.* 2002; 45: 4202–4211.
8. Sasaki T, Kikuchi T, Yumoto N, Yoshimura N, Murachi T. *J. Biol. Chem.* 1984; 259: 12489–12494.
9. Hirao, T, Takahashi, K. *J. Biochem. (Tokyo)* 1984; 96: 775–784.
10. Hanada K, Tamai M, Yamagishi M, Ohmura S, Sawada J, Tanaka I. *Agric. Biol. Chem.* 1978, 42: 523–528.
11. Hanna RA, Campbell RL, Davies PL. *Nature* 2008; 456: 409-412.
12. Bánóczy Z, Alexa A, Farkas A, Friedrich P, Hudecz F. *Bioconjugate Chem.* 2008; 19: 1375-1381.