

Biokompatibilis nano- és mezorendszerek tervezése és fejlesztése

amiloid-szálképzés alapján

VEKOP-2.3.2-16-2017-00014

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar

Tárgy: lezáró beszámoló

1. Eredmény megnevezése

Mesterséges intelligenciabeli módszerekkel létrehoztuk a Budapest Amiloid Prediktort (<https://pitgroup.org/bap>) és ebből amiloid- és nem-amiloid mintákat azonosítottunk a hexapeptid terén. Az öregedési folyamat mechanizmusának feltárása, egy hatékony géncsendesítő (RNS interferencia) módszer kifejlesztése, és az epigenetikai DNS diagnosztika technológiai alapjának kifejlesztése. Fehérjék/peptidek és amiloid szerkezetük kialakulásával kapcsolatos felületi kötődési (adszorpciós) folyamatok tanulmányozása. Új fágmid konstrukció, amely a H5 minifehérjét M13 fág felszínén sikeresen megjelenítve lehetővé teszi a H5 fehérje amiloidképzésének irányított fehérjeevolúciós alapú vizsgálatát és befolyásolását. Aggregációra és amiloidképződésre hajlamos gyógyszerhatóanyag analóg minifehérjék előállításának és spektroszkópiai vizsgálata.

2. Eredmény leírása

A létrehozott prediktorokat kiegészítettük az SVM alapú Budapest Amiloid Prediktor elemzésével és azonosítottuk az összes amiloid- és nem amiloid hexapeptid mintát a hexapeptid 64 millió tagot számláló terében. Genetikai eszközökkel igazoltuk, hogy az öregedő sejtekre általánosan jellemző genomi instabilitást az aktív mobilis genetikai elemek okozzák. Ezen elemek aktiválódását az élettartam során egy specifikus DNS metilációs folyamat idézi elő. A DNS metiláció detektálására egy új módszert fejlesztettünk ki. Eredményeink nagyrészt kis molekulákra jellemző alagúthatások megfigyelésére és értelmezésére, az alagúthatást mutató molekulák dinamikájának leírására, valamint gyenge kölcsönhatások által kötött molekuláris rendszerek vizsgálatára irányultak. Szilárd/folyadék határfelületen *in situ* (QCM) technikával határoztuk meg a natív és az amiloid állapotú fehérjék/minifehérje adszorpciójának mértékét, és következtetést vontunk le az adszorpció lehetséges mechanizmusára. Összevetettük a fluid határfelületen képződő filmek reológiai tulajdonságait, melyből a minifehérje erőteljes határfelületi gél képzésére következtettünk. Létrehoztunk egy fágmid vektort, amely a H5 minifehérjét megjeleníti M13 fág felszínén. A sikeres fág-bemutatást H5-höz fuzionált címke elleni ellenanyaggal, ELISA-val igazoltuk. A fágmidal megvalósítható a H5 irányított, kombinatorikus mutagenézise, és több milliárdos méretű H5 variáns könyvtár létrehozása a H5 amiloidképzésének irányított fehérjeevolúciós

alapú vizsgálatára és befolyásolására. Kutatásunkat az amiloidképződésért felelős ún. aggregációs mag vizsgálatára is kiterjesztettük. Ezen rövidebb peptid szekvenciák széles pH tartományban és különböző oldószer összetételben történő vizsgálatát végeztük el ECD spektroszkópiával. Eredményeinket kiegészítettük AFM mérésekkel, mellyel a szálképződést igazoltuk illetve számos esetben röntgendiffrekciós mérések segítségével atomi szintű szerkezet meghatározást is végeztünk.

3. Az eredmény nem számszerűsíthető, egyéb tulajdonsága

A minták közül kiemelünk néhányat: Az x betűk helyére akármilyen aminosavat is helyettesítünk be, a Budapest Amiloid Prediktor azt jóslja, hogy amiloidot kapunk: VIVlxx VIVLxx VIVFxx VIVCxx VIVWxx VIVYxx VYFlxx VYCVxx VYLVxx VVIVxx VVIlxx VVILxx, a következőkben pedig mindig nem-amiloidokat kapunk: PxPxxx PxDxxx xxPPxx xxPDxx xxPGxx xxPKxx xxPQxx xxDPxx xxDDxx xxDGxx xxDKxx xxDQxx.

Kifejlesztettünk egy új géncsendesítő (RNS interferencia) módszert, amellyel nagy kópiaszámú genetikai elemek kifejeződését is hatékonyan lehet gátolni, valamint kifejlesztettünk egy új DNS metilációt detektáló módszert, amellyel tetszőleges genomi pozícióban lehet pontosan meghatározni egy vizsgált szövetminta DNS metilációs szintjét. Ezek segítségével igazoltuk, hogy aktív mobilis genetikai elemcsaládok gátlása élettartam növekedést okoz fonalférgekben, és ezen elemek aktiválódása az élettartam során egy specifikus DNS metilációs folyamat eredménye. Meghatároztuk azokat a célfehérjéket, melyek blokkolása elvezethet egy potens rákterápia kifejlesztéséhez, ill. az egészséges élettartam növekedéséhez. A reakciók lefolyását nem csupán a termodinamika és a kinetika, hanem az alagúthatás is tudja kontrollálni. Az alagúthatást mutató reakciók kontrollálhatók lézertény segítségével, ezzel közelebb hozva a reakciók kontrolljának egy újabb lehetőségét, melynek a kémikusok szempontjából sok területen lehet jelentősége. Különösen érdekes az alagúthatás kontrollja az alagúthatásban direkt módon részt nem vállaló atomok szubsztitúciója segítségével, hiszen így lehetőségünk van az alagúthatás ki- és bekapcsolására is. Gyengén kötött dimerek kvantumkémiailag vizsgálatával megállapítottuk, hogy a dihidrogén kontaktusok kölcsönhatási energiája nem elhanyagolható, s ezért nagyobb biomolekulák szerkezetére jelentős stabilizáló hatást fejthetnek ki. A szubsztitúciós vizsgálatok kimutatták, hogy a külső ligandumok cseréje legtöbbször csak kis mértékben befolyásolja a kölcsönhatási energiát, szimmetrikusan elhelyezett szívócsoportok esetén viszont a stabil szerkezetek elvesztik minimum karakterüket. Az elektronsűrűség analízisével a másodlagos kötések jellegét is próbáltuk azonosítani: az így kapott kötésutak alapján a H-H kölcsönhatás mellett egyéb kontaktusok (X-H és X-Y, ahol X, Y = Si, C) jelenléte is valószínűsíthető. Az általunk kifejlesztett kód lehetővé teszi, hogy megkötéses optimumot keressünk (pl. merev monomerek esete), majd az így előállított geometrián végezzük el a harmonikus frekvencia analízist. Kimutattuk, hogy ahhoz, hogy korrekt harmónikus frekvenciákat kapjunk, az erőállandókat a szerkezeten fellépő (maradék) erővel korrigálnunk kell. Bár ez a korrekció többféle séma szerint is megvalósítható, megfelelő választás esetén a különböző sémák kellően pontos frekvenciákat

szolgáltatnak. A minifehérje esetén összefüggést állapítottunk meg az amiloid képződési (kezelési) idő, valamint az amiloid képződés molekul szerkezeti (CD) és morfológiai (AFM) változásának lépései között. Kísérletet tettünk az arany felületen bekövetkező adszorpció molekuláris hajtóerejének megismerésére az oldat pH-jának és a felület polaritásának szisztematikus változtatása révén. A minifehérje felületi gél képzését a felületi tulajdonságainak (zeta-potenciál, felületi hidrofobitás ANS-sel) változásával értelmeztük. Irányított fehérjeevolúcióval egyfelől feltárhatók, hogy a tanulmányozott fehérje vizsgált tulajdonságát mely aminosav csoportok, és mekkora egyedi hozzájárulással teszik lehetővé, másrészt a vizsgált tulajdonság mértéke, jellege módosítható is az irányított evolúció által. A konkrét esetben feltárhatók a H5 fehérje amiloidképző tulajdonságáért felelős aminosavak, és ezek módosításával egyben módosítható a H5 amiloidképző tulajdonsága is. A konstrukció lehetővé teszi olyan H5 variánsok kifejlesztését, amelyek beépülnek az eredeti H5 által létrehozott amiloidba, de megátolják az amiloid további növekedését.

4. Összefoglalás

Mesterséges intelligenciabeli módszerekkel létrehoztuk a Budapest Amiloid Prediktort (<https://pitgroup.org/bap>) és ebből amiloid- és nem-amiloid mintákat azonosítottunk a hexapeptid terén. Az így létrehozott prediktorok elemzését kiegészítettük az SVM alapú Budapest Amiloid Prediktor elemzésével és azonosítottuk az összes amiloid- és nem amiloid hexapeptid mintát a hexapeptid 64 millió tagot számláló terében.

Eredményeink szerint a genomi instabilitást okozó mobilis genetikai elemek specifikus gátlása élettartam növekedést eredményez. Ezzel új biológiai funkciót rendeltünk a humán genom több mint felét alkotó mobilis genetikai elem szekvenciákhoz: fontos szerepük van az öregedési folyamat kialakulásában és öregkori betegségek (pl. Alzheimer kór) kialakulásához vezető fehérje patológiák kifejlődésében.

Amiloid képző modell fehérjék (lizozim, ovalbumin, béta-laktoglobulin) és egy minifehérje (E5) vizsgálatával összehasonlítást tettünk az amiloid képzést meghatározó külső körülmények és a szerkezetek felületaktivitása, határfelületi felhalmozódása között. Meghatároztuk az adszorpció mértékét és a kialakult rétegbeli kölcsönhatásokat. Ez, további molekul szerkezeti vizsgálatokkal kiegészítve hozzájárulhat az átalakítást irányító folyamatok jobb megértéséhez.

A H5 amiloidképző képességének irányított evolúciós vizsgálatához/manipulálásához létrehoztunk egy fágmid konstrukciót, amely a H5 C-terminusát M13 fág p3 fehérjéhez fuzionálja, miközben a H5 N-terminusát epitóp címkével látja el. Igazoltuk, hogy a H5 fehérje kifejeződik M13 felszínén, és önálló fehérjeként is sikeresen állítottuk elő a H5 epitóp címkés, linkerekkel ellátott verzióját.

Az amiloidképződés okának és mechanizmusának megértése céljából kutatásunkat az amiloidképződésért felelős ún. aggregációs mag vizsgálatára is kiterjesztettük. Ezen rövidebb peptid szekvenciák (6-8 aminosav tagszámú) széles pH tartományban és különböző oldószer összetételben történő vizsgálatát végeztük el ECD spektroszkópiával.

Szabadalom: Egy AI predikciós eszköz szabadalmaztatása

Szekvencia alapú amiloid prediktorokat fejlesztettünk ki, elsősorban mesterséges neurális hálózatok (ANN-ok) felhasználásával.

A cikkben bemutatunk egy lineáris Support Vector Machine (SVM) alapú előre jelzőt a hexapeptidekhez, amelynek pontossága meghaladja a 84%-ot – azaz legalább olyan jó, mint a legjobban publikált ANN-alapú eszközök.

Megjelent cikkek, PUBLIKÁCIÓK

Kapuy O, et al., Systems-Level Feedbacks of NRF2 Controlling Autophagy upon Oxidative Stress Response. *Antioxidants (Basel)* 5;7(3):39 (2018). PMID: 29510589

Kerepesi C, et al., Prediction and characterization of human ageing-related proteins by using machine learning. *Sci. Rep.* 6;8(1):4094 (2018). PMID: 29511309

Hotzi B, et al. Sex-specific regulation of aging in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 17(3):e12724 (2018). PMID: 29493066

Barna J, et al. Roles of heat shock factor 1 beyond the heat shock response. *Cell. Mol. Life Sci.* 75(16):2897-2916 (2018). PMID: 29774376

Sturm Á, et al., Highly efficient RNAi and Cas9-based auto-cloning systems for *C. elegans* research. *Nucleic Acids Res.* 46(17):e105 (2018). PMID: 29924347

Kosztelnik M, et al., Suppression of AMPK/aak-2 by NRF2/SKN-1 down-regulates autophagy during prolonged oxidative stress. *FASEB J.* 33(2):2372-2387 (2019). PMID: 30277819

Kovács D, et al., HSF1Base: A Comprehensive Database of HSF1 (Heat Shock Factor 1) Target Genes. *Int. J. Mol. Sci.* 20(22):5815 (2019). PMID: 31752429

Vellai T. How the amino acid leucine activates the key cell-growth regulator mTOR. *Nature* 596(7871):192-194 (2021). PMID: 34290413

Manzéger A, et al., Condition-dependent functional shift of two *Drosophila* Mtmr lipid phosphatases in autophagy control. *Autophagy* 17(12):4010-4028 (2021). PMID: 33779490

Sturm A, Vellai T. How does maternal age affect genomic stability in the offspring? *Aging Cell* 21(5):e13612 (2022). PMID: 35426971

László Keresztes, Evelin Szögi, Bálint Varga, Viktor Farkas, András Perczel and Vince Grolmusz: The Budapest Amyloid Predictor and its Applications, **Biomolecules**, 11(4) 500, (2021) <https://doi.org/10.3390/biom11040500> [impact factor: 4.082]

Kristóf Takács, Bálint Varga, Vince Grolmusz: PDB_Amyloid: An Extended Live Amyloid Structure List from the PDB, **FEBS Open Bio**, Vol. 9, No. 1. pp. 185-190, 2019. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12524> [impact factor 2.101]

Kristóf Takács, Vince Grolmusz: On the Border of the Amyloidogenic Sequences: Prefix Analysis of the Parallel Beta Sheets in the PDB_Amyloid Collection, **Journal of Integrative Bioinformatics**, Pre-published online July 26, 2021, <https://doi.org/10.1515/jib-2020-0043>

Balázs Szalkai, Vince Grolmusz: SCARF: A Biomedical Association Rule Finding Webserver, **Journal of Integrative Bioinformatics**, published online February 4, 2022 (an invited paper), <https://doi.org/10.1515/jib-2021-0035>

Kristóf Takács, Vince Grolmusz: The multiple alignments of very short sequences, **FASEB BioAdvances**, 2021;3:523-530, <https://doi.org/10.1096/fba.2020-00118>

D. Papp, P. Rovó, I. Jákli, **A. G. Császár**, and **A. Perczel**, Four Faces of the Interaction between Ions and Aromatic Rings, *J. Comp. Chem.* **2017**, *38*, 1762–1773.

C. Fábri and **A. G. Császár**, Vibrational Quantum Graphs and Their Application to the Quantum Dynamics of CH₅⁺, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2018**, *20*, 16913–16917.

C. Fábri, R. Marquardt, **A. G. Császár**, and M. Quack, Controlling Tunneling in Ammonia Isotopomers, *J. Chem. Phys.* **2019**, *150*, 014102.

J. Šmydke, C. Fábri, J. Sarka, and **A. G. Császár**, Rovibrational Quantum Dynamics of the Vinyl Radical and its Deuterated Isotopologues, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2019**, *21*, 3453–3472.

M. P. Metz, K. Szalewicz, J. Sarka, **R. Tóbiás**, **A. G. Császár**, and E. Mátyus, Molecular Dimers of Methane Clathrates: *ab initio* Potential Energy Surfaces and Variational Vibrational States, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2019**, *21*, 13504–13525.

I. Simkó, T. Szidarovszky, and **A. G. Császár**, Toward Automated Variational Computation of Rovibrational Resonances, Including a Case Study of the H₂ Dimer, *J. Chem. Theory Comput.* **2019**, *15*, 4156–4169.

A. G. Császár, C. Fábri, and J. Sarka, Quasistructural Molecules, *WIREs Comput. Mol. Sci.*, **2020**, *10*, e1432.

A. G. Császár, I. Simkó, T. Szidarovszky, G. C. Groenenboom, T. Karman, and A. van der Avoird, Rotational-Vibrational Resonance States, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2020**, *22*, 15081-15104.

A. G. Császár and C. Fábri, From Tunneling Control to Controlling Tunneling, in *Tunnelling in Molecules*, eds. Sebastian Kozuch and Johannes Kaestner, Royal Society of Chemistry: London, **2021**, 146-166.

R. Tóbiás and **A. G. Császár**, Normal-Mode Vibrational Analysis of Weakly-Bound Oligomers at Constrained Stationary Points of Arbitrary Order, **2021**, *J. Comput. Chem.*, to be submitted

R. Tóbiás and **A. G. Császár**, Dihydrogen (H:H) Contacts without Contacts?, **2021**, *J. Comput. Chem.*, to be submitted

N. Zs. Nagy, Z. Varga, J. Mihály, Gy. Kasza, B. Iván, É. Kiss
Highly efficient encapsulation of curcumin into and pH-controlled drug release from poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles stabilized with a novel amphiphilic hyperbranched polyglycerol
Expr Polym Lett 14 (1) 90-101 2020 DOI: 10.3144/expresspolymlett.2020.8

Edit Pári, Kata Horváti, Szilvia Bősze, Beáta Biri-Kovács, Bálint Szeder, Ferenc Zsila and Éva Kiss
Drug Conjugation Induced Modulation of Structural and Membrane Interaction Features of Cationic Cell-Permeable Peptides
Int. J. Mol. Sci. 2020, 21, 2197; doi:10.3390/ijms21062197

Nagy, N.Z.; Varga, Z.; Mihály, J.; Domján, A.; Fenyvesi, É.; Kiss, É. Highly Enhanced Curcumin Delivery Applying Association Type Nanostructures of Block Copolymers, Cyclodextrins and Polycyclodextrins. *Polymers* **2020**, *12*, 2167.
Special Issue [Polymers and Drug Delivery Systems](#)
doi:10.3390/polym12092167

I. Vida, Zs. Fazekas, G. Gyulai, D. Fazekas, Gy. Pálffy, P. Stráner, É. Kiss and A. Perczel
Bacterial expression and isotope labeling improved even for amyloidogenic proteins: a cost-effective fermentation in *Escherichia coli*
Microbial Biotechnology (2021) 0(0), 1–13
doi:10.1111/1751-7915.13778

R. Borbás, É. Kiss: Emulsion gel formation in three phase partitioning
In: Three Phase Partitioning (Eds: Munishwar, Gupta; Ipsita, Roy) Chp. 6
Elsevier, Amsterdam 2021 pp. 111-132.

Zoltán Attila Nagy, Dávid Szakács, Eszter Boros, Dávid Héja, Eszter Vígh, Noémi Sándor, Mihály Józsi, Gábor Oroszlán, József Dobó, Péter Gál, Gábor Pál (2019). Ecotin, a microbial inhibitor of serine proteases, blocks multiple complement dependent and independent microbicidal activities of human serum. *PLoS Pathog* **15(12)**: e1008232.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008232>

Az agygráfok témájában:

Bálint Varga, Vince Grolmusz: The braingraph.org Database with more than 1000 Robust Human Structural Connectomes in Five Resolutions, **Cognitive Neurodynamics** Vol. 15 No. 5, pp. 915-919, (2021) <https://doi.org/10.1007/s11571-021-09670-5> [impact factor: 3.925]

Balázs Szalkai, Bálint Varga, Vince Grolmusz: The Graph of our Mind; **Brain Sciences**, Vol. 11, No. 3. 342 (2021) <https://doi.org/10.3390/brainsci11030342> [impact factor 3.332]

László Keresztes, Evelin Szögi, Bálint Varga, Vince Grolmusz: Introducing and Applying Newtonian Blurring: An Augmented Dataset of 126,000 Human Connectomes at braingraph.org, **Scientific Reports**, 12:3102 (2022), <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06697-4> [impact factor: 4.379]

László Keresztes, Evelin Szögi, Bálint Varga, Vince Grolmusz: Identifying Super-Feminine, Super-Masculine and Sex-Defining Connections in the Human Braingraph, **Cognitive Neurodynamics**, Vol. 15. No. 6. pp. 949-959 (2021) <https://doi.org/10.1007/s11571-021-09687-w> [impact factor: 3.925],

Máté Fellner, Bálint Varga, Vince Grolmusz: The Frequent Subgraphs of the Connectome of the Human Brain, **Cognitive Neurodynamics** Vol. 13, No. 5, pp. 453-460 (2019) <https://doi.org/10.1007/s11571-019-09535-y> <https://rdcu.be/bAHoe> [impact factor 3.021]

Máté Fellner, Bálint Varga, Vince Grolmusz: The Frequent Complete Subgraphs in the Human Connectome, **PLOS ONE** 15(8): e0236883 (2020) <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236883> [impact factor 2.740]

Máté Fellner, Bálint Varga, Vince Grolmusz: Good Neighbors, Bad Neighbors: The Frequent Network Neighborhood Mapping of the Hippocampus Enlightens Structural Factors of the Human Intelligence; **Scientific Reports** Vol. 10. 11967 (2020) <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68914-2> [impact factor 4.011]

Máté Fellner, Bálint Varga, Vince Grolmusz: The Frequent Network Neighborhood Mapping of the Human Hippocampus Shows Much More Frequent Neighbor Sets in Males Than in Females; **PLOS ONE** 15(1): e0227910 (2020). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227910> [impact factor 2.776]

Balázs Szalkai, Csaba Kerepesi, Bálint Varga, Vince Grolmusz: High-Resolution Directed Human Connectomes and the Consensus Connectome Dynamics, **PLOS ONE**, Vol. 14 No. 4,,: e0215473 (2019) <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215473> [impact factor 2.776]

Balázs Szalkai, Bálint Varga, Vince Grolmusz: Comparing Advanced Graph-Theoretical Parameters of the Connectomes of the Lobes of the Human Brain, **Cognitive Neurodynamics**,

Vol. 12, No. 6, pages 549-559 (2018), <https://doi.org/10.1007/s11571-018-9508-y>
<https://rdcu.be/8Gwh> . [impact factor 3.021]

Balázs Szalkai, Bálint Varga, Vince Grolmusz: Mapping Correlations of Psychological and Connectomical Properties of the Dataset of the Human Connectome Project with the Maximum Spanning Tree Method, **Brain Imaging and Behavior** Vol. 13, No. 5, pp. 1185-1192 (2019), <https://doi.org/10.1007/s11682-018-9937-6> , also available freely [at this link](#). [impact factor 3.719]

Balázs Szalkai, Vince Grolmusz: Human Sexual Dimorphism of the Relative Cerebral Area Volumes in the Data of the Human Connectome Project; **European Journal of Anatomy**, Vol. 22, No. 3. pp. 221-225 (2018)

Bírálat alatt:

Sturm A, és mtsi., Downregulation of transposable elements extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Commun.* Kézirat revízió alatt – eredeti benyújtás: 2018 (2022).

Sturm A, és mtsi., N6-methyladenine progressively accumulates in mitochondrial DNA during aging. *Nucleic Acids Res.* Kézirat revízió alatt (NAR-03716-M-2021) – eredeti benyújtás: 2021 (2022).

Konferencia közlemények:

Máté Fellner, Bálint Varga, Vince Grolmusz, “The Frequent Complete Subgraphs in the Human Connectome”, In: Rojas I., Joya G., Catala A. (eds) *Advances in Computational Intelligence. IWANN 2019. Lecture Notes in Computer Science*, vol 11507. pp. 908-920, Springer

Dolgozatok, melyek témája kapcsolódik a pályázathoz

Miklós Katona
Effect of amyloid formation on protein adsorption
MSc Thesis Materials Science
ELTE Budapest 2021

Nóra Zsuzsanna Nagy
Polymer based colloidal drug carriers for hydrophobic drug agents
PhD Thesis
ELTE Budapest 2021

Edit Pári
Experimental investigation of the interaction of bioactive materials with model membranes
PhD Thesis
ELTE Budapest 2021

