

Biokompatibilis nano- és mezorendszerek tervezése és fejlesztése amiloid-szálképzés alapján

VEKOP-2.3.2-16-2017-00014

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar,
Szerves Kémia Tanszék
1117 Budapest, Pázmány Péter sétány 1/a

Tárgy: Biokompatibilis nano- és mezorendszerek tervezése és fejlesztése amiloid-szálképzés alapján kutatás II. szakmai beszámoló

1. Eredmény megnevezése

Az amiloid- és amiloid-szerű szerkezetek párhuzamos béta-redőinek szekvencia-alapú elemzése. Egyes gyógyszerhatóanyag analóg minifehérjék és polipeptidek aggregációs hajlamának spektroszkópai vizsgálata. Fluid határfelületi rétegben elhelyezkedő peptid/fehérje filmek esetében kétdimenziós reológiai paraméterek, valamint reflexiós infravörös spektroszkópia segítségével másodlagos szerkezet meghatározása. Fágmid vektorok létrehozása, melyek alkalmasak arra, hogy a megfelelő körülmények között amiloid filamentumot képző H5 minifehérjét megjelenítsék az M13 bakteriofág felszínén. Egy új, nagy hatékonyságú géncsendesítő (RNS interferencia) módszer kifejlesztése, illetve az öregedési folyamat mechanizmusának feltárása. Az amiloid fragmensek fundamentális kölcsönhatását megalapozó modellek vizsgálata: potenciális energia hiperfelülete a metán-víz, metán és víz dimer komplexeknek, valamint rezgési energiaszintek meghatározása és az alagúthatás értelmezése.

2. Eredmény leírása

Az előző évben létrehozott PDB_Amyloid web-alapú eszköz (<http://pitgroup.org/amyloid/>) segítségével meghatároztuk az adathalmazban levő közeli, párhuzamos béta redők kezdő- és végszeglétit (prefix, szuffix), mivel a globuláris fehérjékben az amiloidszerű párhuzamos béta-redők eleje és vége különösen érdekes. Tanulmányoztuk a biomolekulák esetében előforduló legfőbb gyenge kölcsönhatások alkalmas modelljeit nagy pontosságú számítások segítségével: CH₄.H₂O homo- és heterodimerek. Ezek a magas szintű kvantumkémiai (elektronszerkezet és magmozgás) számítások lehetővé tették az eddig kísérletileg nem értelmezhető spektroszkópai ujjlenyomatok értelmezését. Az alagúthatás észlelésénél tudományos szempontból még érdekesebb az alagúthatás kontrolljának lehetősége, mely feladat megvalósításában részleges sikereket értünk el. Az amiloid képződés okának és mechanizmusának megértéséhez további analóg fehérjéket terveztünk, amelyek előállítását szilárdfázisú peptid szintézissel és fehérje expresszióval végeztük el. Ezt követően ECD-, NMR-

spektroszkópiai mérések, illetve molekula dinamikai szimuláció segítségével ezen minifehérjék amiloid képződési kondíciójának feltérképezését hajtottuk végre. Emellett minifehérje amiloidképződési folyamatának követéséhez elektron- és atomerő mikroszkópos felvételeket, valamint fluoreszcencia és IR spektroszkópiai, továbbá felületi feszültség mérési eredményeket vetettünk össze az ECD spektroszkópiai vizsgálatok eredményeivel. Tanulmányoztuk e folyamat reverzibilitását is. Az eredmények értelmezéséhez modellfehérjén, lizozimon végzett méréseket is felhasználtunk. Az új géncsendesítő módszer kifejlesztésével és transzgenikus megoldással (Piwi szomatikus expresszióval) sikerült inaktíválni aktív mobilis genetikai elem családokat állati genomokban. Ezek a genetikai innovációk jelentős élettartam növekedést eredményeztek a kezelt organizmusokban. Az autofágiát gátló myotubularin-típusú foszfatázok gátlása ugyancsak megnövelte az állatok élettartamát.

3. Az eredmény nem számszerűsíthető, egyéb tulajdonsága

Világossá vált számunkra, hogy egyes modellrendszerek potenciális energia hiperfelületeinek a jellemzéséhez szükséges nemcsak a minimumok, de az első (és magasabb rendű) átmeneti állapotok meghatározása is, melyhez kapcsolódó program megírása folyamatban van. A fehérjékre és így az amiloid állapotra is jellemző hidrofób-hidrofil kcs.-ok alkalmas modelljeit vizsgáltuk, nevezetesen a metán-víz klaszterek modellezését, amely alkalmas lehet a gyengén kötött rendszerekre vonatkozó párpotenciálok (pl. metán klaszterek, fehérje „magok”) viselkedésének mélyebb megértésére. Emellett az időfüggő Schrödinger-egyenlet megoldására kidolgozott, az anyagsugárzás kölcsönhatást is kiválóan kezelő, hatékony algoritmusunk, számítógépes programunk segítségével további érdekes az amid-amid rendszerekben is fellépő alagúthatás effektusok megfigyelésére és befolyásolására nyílt lehetőség. A PDB_Amyloid listában található fehérjék béta-redőzött rétegeinek a N- és C-végein található aminosav-szekvenciákat elemeztük: ezeket kigyűjtöttük és megkerestük egyéb előfordulásait is a PDB-ben. Az egyik gyakran előforduló prefix a QKLVF (-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-) alegység például a 2MPZ amiloid struktúrában több esetben is előfordul. Irodalmi adatok alapján látható, hogy pl. a Major Histocompatibility Complex-1 (MHC-1)-ben a fenti szekvencia előfordul és ezért az MHC-1 peptid amiloiddá válhat. Másik fontos találatunk a -GEYFT-, amely nem fordul elő ismert amiloidokban a PDB szerint, de a PDB_Amyloid listában szerepel viszont, és jellemző a p53 fehérjékre (pl. 1OLG) is. 2017 óta ismert, hogy a p53 fehérje rákos elváltozást okozó hatása összefüggésben van a p53 prionszerű, illetve amiloiddá történő szerkezeti átalakulásával. A predikációs programok alkalmazásával létrehoztunk ún. aggregációs core promotereket, rövid peptideket, amelyek vizsgálata további információval szolgálhat az aggregációs folyamat megértéséhez. Kísérleti módszerrel meghatároztunk egyes kationos peptidek (és konjugátumaik) molekuláris kölcsönhatásának mértékét a felületi lipid réteggel. A membránaffinitás a lipidréteg által kiváltott konformáció változással hozható összefüggésbe. Új ECD spektroszkópiai módszert dolgoztunk ki az amiloidképződés során, az asszociálódó nanorendszerek béta-redőzött réteg tartamán keresztül, az amiloidképződési folyamat kvantitatív értelmezésre (pl. a H5 fehérje esetében). Egyes polipeptidek térszerkezet-stabilitásának és amiloid képző tulajdonságának összefüggéseit keresve létrehoztunk alkalmas fágmid vektorokat. Ugyanis a H5 minifehérjével együtt megjelenített epitóp címke és az azt felismerő specifikus monoklonális ellenanyag kölcsönhatását kiaknázva egy akár több milliárd variánst tartalmazó H5-fág könyvtárból kiválogathatjuk a fehérjebontó enzimeknek ellenálló formákat. Ezek a

vektorok alkalmazhatók arra is, hogy szintén irányított evolúciós módszertannal, a H5-fág könyvtárból a H5-ből képzett amiloid filamentumokhoz kötő változatokat válogassunk ki, majd megvizsgáljuk, hogy van-e ezek között az amiloid keletkezést befolyásoló, a folyamatot gátló forma. Feltártuk az öregedési folyamat mechanizmusát, annak genetikai alapját. Eredményeink szerint az eukarióta genomok jelentős részét alkotó mobilis genetikai elemek (MGE-k) életkorral egyre aktívabbak a szomatikus sejtekben. A MGE-k mutagenizáló hatása genomi instabilitást okoz idősebb korban (amikor is a konformációs betegségek és az amiloid képződés egyre jelentősebbé válik), ami az érintett sejtek pusztulásához vezethet. Azonosítottunk továbbá az agy öregedése mögött meghúzódó új genetikai faktorokat: myotubularin-szerű lipid foszfatázok életkorral egyre erősebben expresszálódnak, és ezzel egyre erősebben gátolják az autofág önmegújító folyamatot. Eredményeink olyan gyógyszer-célpontokat jelölnek ki (MGE-k aktivitását gátló Piwi fehérjék és autofágiát gátló MTMR foszfatázok), amelyek farmakológiai gátlása elvezethet a rák, az amiloidképződés és egyes neurodegeneratív betegségek kezeléséhez.

4. Összefoglalás

Az elmúlt évben tovább folytattuk a kémikusok számára érdekes gyengén kötött kémiai rendszerek és az alagúthatás kvantumkémiai eszközökkel történő részletes vizsgálatát. Bár komoly kutatómunkára van még szükség ahhoz, hogy a fehérjékben és amiloidokban oly fontos diszperziós kölcsönhatások, nagyobb rendszereken is vizsgálhatók legyenek, a diszperziós és a H-kötés kölcsönhatásokhoz tartozó párpotenciálok már modell molekulák (pl. metán, víz) esetében sikerrel határoztuk meg. A PDB_Amyloid szekvencia-lista elemzése rámutatott arra, hogy a közeli béta-redők kezdő- és végszekvenciáinak mibenléte kulcsfontosságú lehet az amiloidképződés kialakulása szempontjából. Több olyan rendszert is azonosítottunk így, amelyekről az utóbbi időben kiderült, hogy amiloiddá alakulhatnak (pl. MHC-1, p53). Geometriai elemzéssel olyan jellemzőket (pre-, suffixek) találtunk, amelyek a béta-redők végein fontos információval bírnak. Létrehoztunk fágmid vektorokat a cukorbetegség kapcsán használt Exenatid analóg H5 minifehérje kapcsán, melyek e molekula amiloid-kötő és amiloid-képző tulajdonságának irányított evolúciós megközelítésű vizsgálatát teszik hamarosan lehetővé. Megvizsgáltuk a H5 minifehérje stabilitásának, fehérjebontó enzimekkel szembeni ellenálló képességének és az amiloid-képző tulajdonságainak összefüggéseit is, szintén irányított evolúciós módszertannal. Követtük a fehérjék határfelületen való adszorpciója során bekövetkező konformáció változást (feletekeredett → amiloid) több vizsgálati technika (PM-IRRAS, tenziometria, AFM, határfelületi reológia) összehangolt alkalmazásával. Igazoltuk a mobilis genetikai elemek alapvető szerepét az öregedés meghatározásában, illetve feltártuk az agy öregedése mögött rejlő új szabályozó mechanizmust (a sejtes károsodások eltávolításában esszenciális szerepet játszó autofágia kapacitása életkor-függő módon hanyatlik az agyi neuronokban a folyamatot gátló myotubularin-szerű lipid foszfatázok egyre erősödő expressziója következtében).

Megjelent cikkek, PUBLIKÁCIÓK

C. Fábri, R. Marquardt, A. G. Császár, M. Quack, Controlling Tunneling in Ammonia Isotopomers, *J. Chem. Phys.* **2019**, *150*, 014102 (Editor's pick).

J. Šmydke, C. Fábri, J. Sarka, A. G. Császár, Rovibrational Quantum Dynamics of the Vinyl Radical and its Deuterated Isotopologues, *Phys. Chem. Chem. Phys.* (Challenges in spectroscopy: Accuracy versus interpretation from isolated molecules to condensed phases Themed Issue) **2019**, *21*, 3453-3472.

M. P. Metz, K. Szalewicz, J. Sarka, R. Tóbiás, A. G. Császár, 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, 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, J. Sarka, Quasistructural molecules, *WIREs CMS*, **2019**, e1432.

R. Tóbiás, T. Furtenbacher, J. Tennyson, and **A. G. Császár**, Accurate Empirical Rovibrational Energies and Transitions of H₂¹⁶O, *Phys. Chem. Chem. Phys.* (Challenges in spectroscopy: Accuracy versus interpretation from isolated molecules to condensed phases Themed Issue) **2019**, *21*, 3473-3495.

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]

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]

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]

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: MetaHMM: A Webserver for Identifying Novel Genes with Specified Functions in Metagenomic Samples; *Genomics*, Vol. 111, No. 4, pp. 883-885, (2019) <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2018.05.016> [impact factor 3.16]



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)

É. Kiss, G. Gyulai, E. Pári, K. Horváti, Sz. Bősze
Membrane affinity and fluorescent labelling: comparative study of monolayer interaction, cellular uptake and cytotoxicity profile of carboxyfluorescein-conjugated cationic peptides
Amino Acids 50, (11) 1557–1571 2018
DOI [10.1007/s00726-018-2630-7](https://doi.org/10.1007/s00726-018-2630-7)

KISS Éva, GYULAI Gergő, ÁBRAHÁM Ágnes, PÁRI Edit, MASSIGNAN Flavio
Biokompatibilitás és membránaffinitás, határfelületi kölcsönhatások tanulmányozása modell rendszereken
Magyar Kémiai Folyóirat 125 (1) 19-24 2019.
DOI: [10.24100/MKF.2019.01.19](https://doi.org/10.24100/MKF.2019.01.19)

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
Express Polymer Letters 14 (1) 90-101 2020
DOI: [10.3144/expresspolymlett.2020.8](https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2020.8)

Boros, Eszter; Sebák, Fanni; Héja, Dávid; Szakács, Dávid; Zboray, Katalin; Schlosser, Gitt ; Micsonai, András; Kardos, József; Bodor, Andrea; Pál, Gábor
Directed Evolution of Canonical Loops and Their Swapping between Unrelated Serine Proteinase Inhibitors Disprove the Interscaffolding Additivity Model
JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY **431** : 3 pp. 557-575., 19 p. (2019)
Szakács, Dávid ; Kocsis, Andrea ; Szász, Róbert ; Gál, Péter ; Pál, Gábor
Novel MASP-2 inhibitors developed via directed evolution of human TFPI1 are potent lectin pathway inhibitors
JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY **294** : 20 pp. 8227-8237., 11 p. (2019)

Sturm Á, Saskői É, Kovács T, Weinhardt N, Vellai T. Highly efficient RNAi and Cas9-based auto-cloning systems for *C. elegans* research. *Nucleic Acids Res.* 46(17):e105 (2018). doi: [10.1093/nar/gky516](https://doi.org/10.1093/nar/gky516).

Barna J, Csermely P, Vellai T. Roles of heat shock factor 1 beyond the heat shock response. *Cell Mol Life Sci.* 75(16):2897-2916 (2018). doi: [10.1007/s00018-018-2836-6](https://doi.org/10.1007/s00018-018-2836-6).

Kosztelnik M, Kurucz A, Papp D, Jones E, Sigmond T, Barna J, Traka MH, Lorincz T, Szarka A, Banhegyi G, Vellai T, Korcsmaros T, Kapuy O. Suppression of AMPK/aak-2 by NRF2/SKN-1 down-regulates autophagy during prolonged oxidative stress. *FASEB J.* 33(2):2372-2387 (2019). doi: [10.1096/fj.201800565RR](https://doi.org/10.1096/fj.201800565RR).

Kerepesi C, Daróczy B, Sturm Á, Vellai T, Benczúr A. Prediction and characterization of human ageing-related proteins by using machine learning. *Sci Rep.* 8(1):4094 (2018). doi: [10.1038/s41598-018-22240-w](https://doi.org/10.1038/s41598-018-22240-w).



Kapuy O, Papp D, Vellai T, Bánhegyi G, Korcsmáros T. Systems-Level Feedbacks of NRF2 Controlling Autophagy upon Oxidative Stress Response. *Antioxidants* (Basel). 7(3). pii: E39 (2018). doi: 10.3390/antiox7030039.

Kovács D, Sigmond T, Hotzi B, Bohár B, Fazekas D, Deák V, Vellai T, Barna J. HSF1Base: a comprehensive database of HSF1 (heat shock factor 1) target genes. *Int J Mol Sciences*. In press (2019).

Dániel Horváth, Dóra K. Menyhárd, András Perczel: Protein Aggregation in a Nutshell: The Splendid Molecular Architecture of the Dreaded Amyloid Fibrils. *Curr Protein Pept Sci*; 20(11): 1077-1088, (2019)

Nóra Taricska, Dániel Horváth, Dóra K. Menyhárd, Hanna Ákontz-Kiss, Masahiro Noji, Masatomo So, Yuji Goto, Toshimichi Fujiwara, András Perczel: The route from the folded to the amyloid state: exploring the potential energy surface of a drug-like miniprotein. *Chemistry A European Journal* doi.org/10.1002/chem.201903826 (2019)

Dániel Horváth, Nóra Taricska, Ernő Keszei, Pál Stráner, Viktor Farkas, Gábor K. Tóth, András Perczel: Compactness of Protein Folds Alters Disulfide-Bond Reducibility by Three Orders of Magnitude: A Comprehensive Kinetic Case Study on the Reduction of Differently Sized Tryptophan Cage Model Proteins. *ChemBioChem* 1-16 | doi.org/10.1002/cbic.201900470 (2019)

Bírálat/revízió alatt lévő kéziratok:

Sturm Á, Saskói É, Hotzi B, Tarnóci A, Barna J, Bodnár J, Perczel A, Ivics Z, Vellai T. Downregulation of transposable elements extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Commun*. Under revision (2019).

Manzéger A, Tagscherer K, Lőrincz P, Szaker H, Lukácsovich T, Pilz P, Kméczik R, Csikós G, Sass M, Kovács T, Vellai T, Billes VA. Condition-dependent functional shift of two *Drosophila* Mtmr lipid phosphatases in autophagy control. *J Cell Biol*. Under review (2019).

Kovács T, Szinyákovics J, Billes VA, Murányi G, Bjelik A, Légrádi Á, Szabó M, Sándor S, Kubinyi E, Paracky P, Lőke J, Mulder J, Gulyás B, Gulya K, Maglóczky Z, Vellai T. EDTP/MTMR14 lipid phosphatases promote brain aging by progressively downregulating autophagy throughout adulthood. *Proc Natl Acad Sci USA*. Under review (2019).

Technical Reports:

Máté Fellner, Bálint Varga, Vince Grolmusz: [The Frequent Complete Subgraphs in the Human Connectome](#), **arXiv preprint** arXiv:1903.05979

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](#), **arXiv preprint** arXiv:1811.07423 (2018)

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

Takacs, K., B. Varga, and V. Grolmusz. “An automatically refreshed public list of amyloid and pre-amyloid structures from the PDB.” *FEBS OPEN BIO*. Vol. 8. 111 RIVER ST, HOBOKEN 07030-5774, NJ USA: WILEY, 2018.

Grolmusz, Vince, Kristof Takacs, and Balint Varga. “Amyloids and pre-amyloids from the PDB.” *FASEB JOURNAL*. Vol. 32. No. 1. 9650 ROCKVILLE PIKE, BETHESDA, MD 20814-3998 USA: FEDERATION AMER SOC EXP BIOL, 2018.