

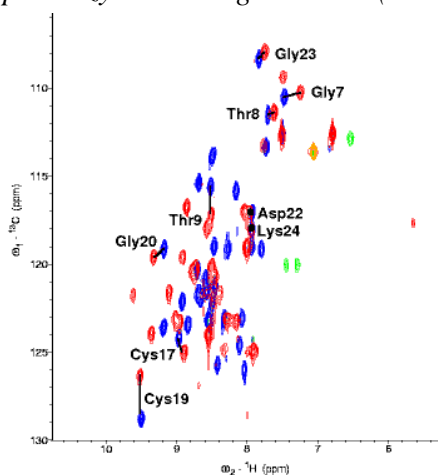
**OTKA Nyilvántartási szám: T046994 (T047186)**

A téma megnevezése: **Peptidek és moduláris fehérjék szerkezetvizsgálata NMR-spektroszkópiai és elméleti módszerek segítségével**

***SGCI titrálása kimotripszinnel***

A sivatagi vándorsásából származó SGCI (*Schistocerca gregaria* chymotrypsin inhibitor) szerinproteáz-inhibítort NMR-spektroszkópiával követve szarvasmarha kimotripszinnel telítésig titráltuk. A titrálás során megállapítottuk, hogy a molekulának nem csupán az enzimmel kölcsönhatásban lévő, hanem attól térben távol eső részei is változásokat mutatnak. Ezen változások egy része magyarázható kisebb konformációs átmenetekkel, más részük azonban nem, ezek feltehetően a molekula belső dinamikájával, illetve annak változásával hozhatók összefüggésbe.

**Kapcsolódó közlemény:** Zoltán Gáspári, Borbála Szenthe, András Patthy, William M. Westler, László Gráf, András Perczel: *Local binding with globally distributed changes in a small protease inhibitor upon enzyme binding. FEBS J. (2006) 273:1831-1842.*



A szabad (kék) és kimotripszinnel komplexált (piros) SGCI HSQC spektrumának összevetése. Néhány, mindkét spektrumban jól elkülönülő csúcs a hozzá tartozó aminosavval jelölve.

***Komplement fehérjék spektroszkópiai vizsgálata***

A C1r, a veleszületett immunrendszer legelső szerin proteáza, autokatalízist követően aktiválja a komplementrendszer klasszikus útvonalát. Az enzim felépítése révén lehetővé teszi egyes moduljainak önálló vizsgálatát is, ezáltal ideális modellvegyületként szolgál NMR-spektroszkópiai vizsgálatokhoz, különös tekintettel a fehérje dinamikai viselkedésre. Vizsgálataink során elvégeztük a második CCP (komplement kontroll fehérje) teljes gerinc–amid jelhozzárendelését, 2D- és 3D-spektrumok segítségével, egyszeresen illetve duplán jelölt minta felhasználásával. A CCP2 és a tandem modulok (CCP1,2) összevetése alapján megállapítható, hogy a CCP2 gerinc–amidjait az első modul döntően csak a kontakt felszínnél perturbálja, mely jelentős mértékű intermoduláris kölcsönhatásra utal. Részlegesen elvégeztük az első modul jelhozzárendelését, mely bizonyos mértékű rendezett szerkezetre utal. Ilyen régiók többségében a modulhatárhoz közel esnek. Amid-relaxációs eredményeink szerint a CCP2 különösen mozgékony aminosavai zömében a modul hurok régióin találhatóak.

**Kapcsolódó közlemény:** *előkészületben*

Minifehérjék térszerkeztének és dinamikájá vizsgálata NMR-spektroszkópiával

Racionális tervezéssel előállítottuk a Tc5b minifehérje szobahőmérsékleten stabil variánsát, melynek térszerkeztét NMR-spektroszkópiával meghatározva igazoltuk a feltételezett szerkezetsabilizáló kölcsönhatások fontosságát.

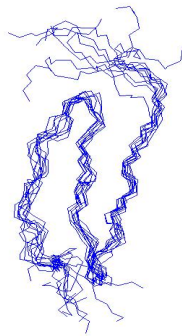
Az  $^{15}\text{N}$ -dúsított minifehérjékről N–H relaxációs méréseket is készítettünk. A felvett spektrumsorozatot feldolgoztuk és értékeltük. A kapott dinamikai paraméterekkel a minifehérjék térbeli és időbeli jellemzését adtuk meg. A különböző hőmérsékleten végzett relaxációs kísérletekből arra következtettünk, hogy a minifehérje másodlagos szerkezetei ( $\alpha$ -hélix,  $\beta$ -turn, Trp-kalitka) eltérő dinamikai viselkedésűek. A fűtés további hatása, hogy egyes aminosavak ( $\beta$ -turn, Trp-kalitka) elsőként a  $\mu\text{s}$ – $\text{ms}$  időskálájú mozgásukat veszítik el (277K  $\Rightarrow$  282K), majd magasabb hőmérsékleten (282K  $\Rightarrow$  300K) megjelenik a gyors időskálájú lokális mozgás (ps–ns időskálán). A Trp-kalitka aminosavai ugyanakkor a fűtés hatására egyenletesen alakulnak át lassú mozgásból gyors mozgásba. A Tc6b hasonló vizsgálatait folyamatban vannak.

**Kapcsolódó közlemény:** Péter Hudáky, Pál Stráner, Viktor Farkas, Györgyi Váradi, Gábor Tóth, András Perczel: Cooperation between a salt bridge and the hydrophobic core triggers fold stabilization in a Trp-cage miniprotein *Biochemistry* (2008) 47:1007-1016.

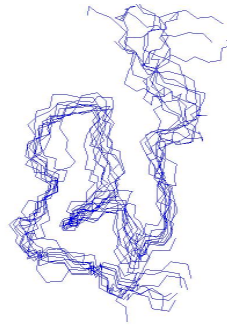
Szerkeztstabilizálás és funkció viszonya az SGTI proteázinhibitor esetében

Az ELTE Biokémiai Tanszék kutatóival való együttműködésben előállítottuk az SGTI proteázinhibitor egy olyan variánsát, amely a vad típusú SGTI-vel ellentétben hatékonyan gátolja a szarvasmarha tripszint. Elvégeztük ezen variáns előzetes térszerkezt-vizsgálatát is NMR-spektroszkópiával. Eredményeink azt mutatják, hogy a 2. és 3. b-szál között elvégzett aminosavcserek jelentősen megváltoztatták az adott hurokrégió térszerkeztét, azonfelül átrendezték, meggyengítették a molekulát stabilizáló triptofán-lizin kölcsönhatást is. A nem várt változásokat mutató térszerkezt ellenőrzése, további finomítása folyamatban van.

**Kapcsolódó közlemény:** előkészületben



Az SGTI 10, adatbázisba letett konformere (PDB ID 1KJ0)



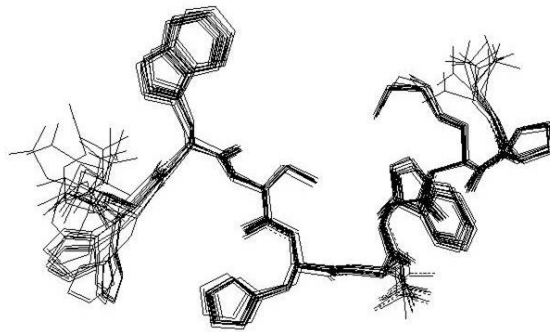
Az SGTI 10 legalacsonyabb energiájú számított konformere

GnRH-III peptidhormon NMR-spektroszkópiai vizsgálata

Az orsóhalban (*Petromyzon marinus*) található GnRH-III (gonadotropin-releasing hormon III, Glp-His-Trp-Ser-His-Asp-Trp-Lys-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>) GnRH variáns közvetlen daganatgátló hatását vizsgáltuk néhány tumor sejtvonalon. Azért hogy növeljük a hormon enzimátikus stabilitását, és szelektívebbé tegyük ezt, azaz csökkentjük az endokrin hatását, dimer analógokat állítottunk elő diszulfidhíd létrehozásával. A tervnek

## OTKA Nyilvántartási szám: T046994 (T047186)

megfelelően ezen dimer GnRH-III származékok daganatgátló hatása és enzimikus stabilitása magasabbnak, LH hormon felszabadító hatásuk alacsonyabbnak mutatkozott, mint a GnRH-III molekuláé. Végül a molekulák konformációja és biológiai hatása közötti kapcsolat tanulmányozásának céljából a monomer és dimer peptidek térszerkezetét dimetil-szulfoxidos és vizes közegben meghatároztuk ECD, VCD, FT-IR és NMR spektroszkópiai módszerekkel.

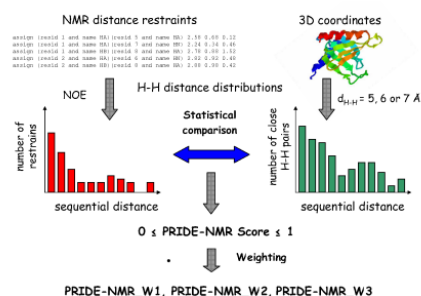


A GnRH-III dimer acetilezett származéka dimetil-szulfoxidos közegben 300 K fokon. A számolt 50 szerkezetből a domináns konformer családhhoz tartozó 35-öt mutatjuk be egymásra illesztve. A dimer két szimmetrikus peptidlánc közül csak az egyiket ábrázoljuk.

**Kapcsolódó közlemény:** Gábor Mező, András Czajlik, Marilena Manea, Annamária Jakab, Viktor Farkas, Zsuzsa Majer, Elemér Vass, Andrea Bodor, Bence Kapuvári, Marian Boldizsár, Borbála Vincze, Orsolya Csuka, Magdolna Kovács, Michael Przybylski, András Perczel, Ferenc Hudecz: Structure, enzymatic stability and antitumor activity of sea lamprey GnRH-III and its dimer derivatives. *Peptides* (2007) 28(4): 806-820.

### Térszerkezetbecslés NMR kényszerfeltételek alapján

Ezen túlmenően kifejlesztettünk egy egyszerű és gyors módszert fehérjeszerkezetek gyors becslésére távolság jellegű NMR-kényszerfeltételek alapján. A módszer PRIDE-NMR néven elérhető webszerver formájában a világhálón: <http://net.icgeb.org/pridenmr>. Az eljárás alkalmazható a szerkezetmeghatározás során arra, hogy a akutató egy kezdeti tippet kapjon a vizsgált fehérje szerkezetéről, illetve, ismert szerkezet esetében arról, hogy a rendelkezésre álló kényszerfeltételek elegendőek-e a nagyfelbontású szerkezetszámoláshoz.



A PRIDE-NMR eljárás folyamatábrája

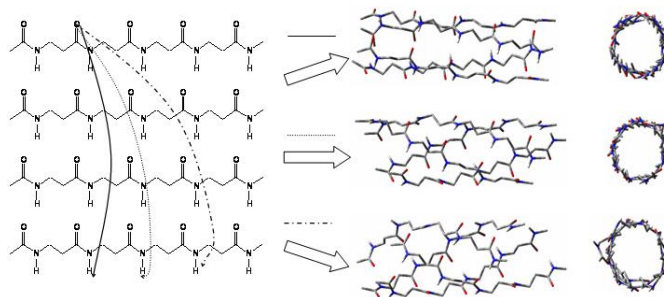
*$\alpha$ - és  $\beta$ -peptid oligomerek  $\beta$ -redőzött rétegek konformációjának és stabilitásának vizsgálata kvantumkémiai módszerekkel*

A béta-redőzött rétegek hidrogénkötésekkel összetartott építő-egységeiből kiindulva egyre nagyobb polialanin modellszerkezeteket építettünk fel, majd ezeket kvantumkémiai módszerekkel, különböző elméleti szinteken (RHF-321G, RHF-6311G++G(d,p)) optimaltunk. Megállapítottuk, hogy a paralel béta-redőzött rétegek inherensen stabilabbak az antiparaleleknél, valamint, hogy az antiparalelekben elkülöníthető kétféle hidrogénkötött alegység (jelölésünkben S10 és S14) közül csak a nagyobbik, 14 atomos hidrogénkötött pszeudogyűrűt tartalmazó S14 létrejötte jár számottevő energianyereséggel. Eredményeinket kísérletileg meghatározott fehérjeszerkezetek elemzésével is alátámasztottuk.

Különböző számú és hosszú oligo- $\alpha$ - és oligo- $\beta$ -peptidekből összeállított nanoszálakat, nanofilmeket, valamint nanocsöveket vizsgálatát végeztük el kvantum kémiai számítások segítségével. Az egyes nanoszerkezeteket rövidebb elemekből rekonstruáltuk, *Lego*-típusú megközelítéssel, melyhez termoneutrális izodezmikus reakciókat használtunk fel. A vizsgált nanoszerkezetek teljes energiájait elfogadható hibahatáron belül sikerült meghatározni.

Egyszerű  $\beta$ -peptidek belső konformációs tulajdonságait is feltérképeztük kvantumkémiai és NMR spektroszkópiai módszerekkel. A különböző szerkezetek megkülönböztetéséhez egy konformer-alapú nomenklatúrát vezettünk be. A másodlagos szerkezet preferencia ábrázolásához az egyes szerkezetek relatív stabilitását vizsgáltuk a peptid hosszának függvényében. Elméleti számításaink eredményeit összevetettük az  $H^1$ -NMR mérések, valamint a korábbi kísérleti eredményeivel. Megfigyeléseink szerint a lokális konformációs preferencia nagymértékben meghatározza a globális feltekeredést, mind oldószerben, mind gázfázisban.

$\beta$ -peptidek paralel, másnéven poláris nyújtott szálai spontán önszerveződés útján nanocsövekké állnak össze. A szisztematikus szerkezeti vizsgálathoz elméleti kémiai módszereket használtunk. A  $[CH_3CO-(\beta-Ala)_k-NHCH_3]_l$  ( $1 \leq k \leq 4$ ,  $2 \leq l \leq 4$ ) modellek különböző elrendeződésű hidrogénhidakkal összekötött nanocső szerkezetei közül a legnagyobb modell ( $k=l=4$ ) legstabilabb cső szerkezetének relatív energiája több, mint  $40 \text{ kcal.mol}^{-1}$ -al alacsonyabb, mint a nyitott referencia szerkezeté. Feltételezhető, hogy megfelelő körülmények esetén ez az önszerveződés oldat fázisban is könnyedén lejátszódhat.



*Paralel elrendeződésű  $\beta$ -peptid szálak önszerveződése nanostruktúrákká*

**Kapcsolódó közlemények:** Tamás Beke, András Czajlik, Imre G. Csizmadia és András Perczel: oligomers of  $\alpha$ - and  $\beta$ -peptides as potential nanostructures *Physical Biology Special Issue on Nanobiology* (nyomdában)

András Perczel, Zoltán Gáspári, Imre G. Csizmadia: Structure and stability of  $\beta$ -pleated sheets. *J. Comput. Chem* (2005) 26: 1155-1168.

Tamás Beke, Imre G. Csizmadia és András Perczel: Theoretical study on tertiary structural elements of  $\beta$ -peptides: Nanotubes formed from parallel-sheet- *Tamás Beke, Csaba Somlai és András Perczel: Toward a rational design of  $\beta$ -peptide structures...J. Comput. Chem.* (2006) 27:20-38.

András Perczel, Péter Hudáky and Villő Pálfi: Dead-end street of protein folding: thermodynamic rationale of amyloid fibril formation. *J. Am. Chem. Soc.*, 129(48):14959-14965.

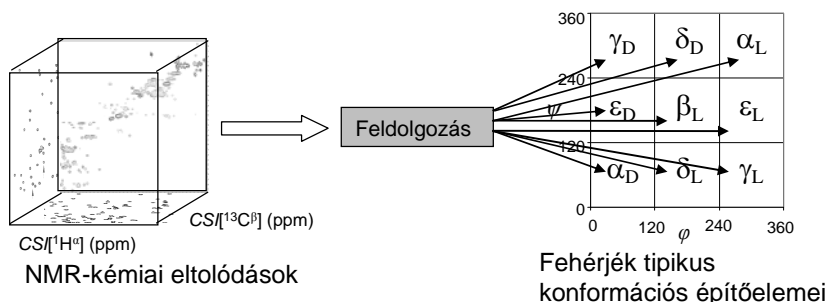
Gábor Pohl, Tamás Beke, János Borbély and András Perczel: Prediction of folding preference of 10kDa silk-like proteins using a lego-approach and ab initio calculations. *J. Am. Chem. Soc.*, (2006) 128:14548-14559.

Tamás Beke, Imre G. Csizmadia and András Perczel: Theoretical study on tertiary structural elements of  $\beta$ -peptides: Nanotubes formed from parallel-sheet-derived assemblies of  $\beta$ -peptides. *J. Am. Chem. Soc.* (2006) 128:5158-5167.

A hisztidinek kelátképző és koordinációs képességét befolyásoló protonálódás  $pK_a$  értékének és kémiai eltolódásának szerkezetfüggése

A hisztidin fontos szerepet játszik fehérjékben illetve enzimekben, amelyet sokszor a kelátképző és fém-koordinációs tulajdonságának köszönhet. Ezt a tulajdonságot jelentősen befolyásolja a hisztidin protonáltsági állapota, ami pedig jelentős részben – legalábbis a felszínhez közeli hisztidinek esetében – a pH függvénye. Feltérképeztük a hisztidin protonaffinitásának térszerkezet-függését. Eltérő pH-n kristályosított fehérjékben megállapítottuk, hogy az alacsony és magas pH-jú szerkezet közötti különbségért a hisztidin protonálódása tehető felelőssé, ami eltérő kötésrendszer kialakulásához is vezethet.

Elsőként határoztuk meg a kémiai eltolódás – térszerkezet összefüggését egy aromás, poláris aminosav esetében, amely pozitív töltést is viselhet, valamint semleges töltésű is lehet. Egyes torziós szögek és a kémiai eltolódás között jelentős lineáris korrelációs koefficiensek találhatók, amivel egyes esetekben 80%-os pontossággal meg lehet határozni a hisztidin térszerkezeti besorolását az atomjai kémiai eltolódása segítségével. A számolásokat GIAO-RB3LYP/6-311++G(2d,2p) elméleti szinten végeztük. A vizsgálat alapján lehetővé vált a kémiai eltolódás adataiból nyerhető helyi térszerkezeti paraméterek meghatározása.



*A kémiai eltolódások elemzésének sematikus rajza*

**Kapcsolódó közlemények:** Hudáky, P., Perczel, A. *Conformation dependence of  $pK(a)$ : Ab initio and DFT investigation of histidine* J. Phys. Chem. A **108**, 29: 6195-6205 (2004).  
P. Hudáky, A. Perczel *Toward direct determination of conformations of protein building units from multidimensional NMR experiments VI. Chemical shift analysis of his to gain 3D structure and protonation state information* J. Comput. Chem. (2005) 26 (13) 1307-1317

Oldószermodell alkalmazása a peptidek kvantumkémiai vizsgálatában

A kvantumkémiai számolások eredményeinek alkalmazhatósága függ az alkalmazott elméleti szint jóságától is, „hogy a számításokat vákuumban vagy adott dielektromos állandójú közegben „végezzük-e el”. A PCM oldószermodell alkalmazhatóságát vizsgáltuk egyszerű királis modellpeptid segítségével (HCO-L-Ala-NH<sub>2</sub>), RHF/3-21G, RHF/6-31+G(d), B3LYP/6-31+G(d) és B3LYP/PCM/6-311++G(d,p) elméleti szinteken. Az eredményeket a PDB Select fehérje-krisztallográfiai adatbázisban található térszerkezetek adataival vetettük össze, és megállapítottuk, hogy a PCM alkalmazásával kapott relatív energiaértékekből visszszámított elvi relatív gyakoriságok ebben az esetben közelebb állnak a fehérjékben található szerkezeti elemek gyakoriságához, a gáz-fázisú számolások eredményei esetében.

**Kapcsolódó közlemény:** Hudáky, I., Hudáky, P., Perczel, A. *Solvation model induced structural changes in peptides. A quantum chemical study on ramachandran surfaces and conformers of alanine diamide using the polarizable continuum model.* J. Comp Chem 25: 12: 1522-1531 (2004)

A kimotripszin enzim mechanizmusának kvantumkémiai szintű vizsgálata

A kimotripszin katalitikus működésének energiaprofilját vizsgáltuk egy alkalmas modell segítségével. Építettünk egy 18 aminosavat tartalmazó modell rendszert, amely teljes ab initio energiaoptimalizálás során is megtartja természetes térszerkezetét, azaz önstabilizáló tulajdonsággal rendelkezik. A teljes katalitikus reakciót 127 elemi optimalizációs lépésen keresztül vizsgáltuk, melynek során meghatároztuk a katalitikus folyamatban fellépő aktiválási energiákat. Vizsgáltuk továbbá az egyes összetevők hiányának hatását, mellyel megállapítottuk, az anion-zseb, a katalitikus aszpartát és a szubsztrát merevségének hatását a katalitikus folyamatra. Az eredmények alapján megállapítottuk, hogy az épített modell viselkedése sokkal jobban hasonlít a kimotripszinéra, mint a vízben zajló referenciareakcióéra.

**Kapcsolódó közlemények:** P. Hudáky, A. Perczel *Proteins A self-stabilized model of the chymotrypsin catalytic pocket. The energy profile of the overall catalytic cycle.* Proteins (2006) 62:749-759.

Péter Hudáky and András Perczel:  *$pK_a$  optimized catalysis in serine proteinases, an ab initio study on the catalytic His.* Int. J. Quantum Chem. 107(11):2178-2183

A metionin aminosav konformációanalízise kvantumkémiai módszerrel

A fehérjékben előforduló metionint modellező N-formil-L-metioninamid peptid konformációs terének feltérképezését végeztük el kvantumkémiai módszerrel (DFT) két bázisszinten [6-31G(d) ill. 6-311G++(2d,2p)]. Megmutattuk a forrásigényes Møller-Plesset és a sűrűségfüggő elmélet (DFT) alkalmazásának feltételeit a konformáció függvényében. Eredményeink szerint a legstabilabb konformer gerinc-diéderes szögei

## OTKA Nyilvántartási szám: T046994 (T047186)

szokatlan módon a poláros aminosavakkal mutat hasonlóságot.

**Kapcsolódó közlemény:** *András Láng, Imre G. Csizmadia, András Perczel: Peptide Models XLV: Conformational Properties of N-Formyl-L-Methioninamide and Its Relevance to Methionine in Proteins. Proteins (2005) 58: 571–588.*

### A kollagén tripla helix stabilitása

A kollagén a már jól ismert tripla-helikális szálaból áll, melyet a fehérjeláncok közötti hidrogénkötések stabilizálnak. A kollagén tripla helix és a  $\beta$ -redőzött réteg stabilitását hasonlítottuk össze ab initio számítások segítségével különböző aminosav-összetételekre. Az összesen 18 aminosavat tartalmazó modelleknél 6-féle aminosav-összetételt alkalmaztunk: i, csak L-alanin, ii, csak glicin, iii, L-alanin és glicin, iv, L-alanin és D-alanin, v, L-prolin és glicin, vi, L-prolin, L-hidroxi-prolin és glicin. Az utolsó kettő (v és vi) a kollagén legszorosabb, legjobban kötött részét modellezi, míg ii, iii, és iv a kötővagy felismerő régiókat. i pedig a Gly  $\rightarrow$  Ala mutációt, mely súlyos, akár halálos is lehet. A számított tripla-hélix affinitások ( $\beta$ -redőzött réteghez képest) jól korrelálnak a kísérletileg meghatározott olvadáspont-értékekkel. A számított stabilitás érték a [(-Pro-Hyp-Gly-)<sub>2</sub>]<sub>3</sub> aminosav összetételre 2,1 kcal·mol<sup>-1</sup> tripletenként a kollagén javára, míg a [(-Ala-Ala-Gly-)<sub>2</sub>]<sub>3</sub> aminosav összetételre 4.8 kcal·mol<sup>-1</sup> tripletenként a redő javára.

**Kapcsolódó közlemény:** *Villő K. Pálfi, András Perczel, How stable is a collagen triple helix? An ab initio study on various collagen and  $\beta$ -sheet forming sequences. J. Comput. Chem, nyomdában*

### A peptidok legegyszerű építőkövei: az Ac-Gly-NHMe, az Ac-Ala-NHMe és Ac-Pro-NHMe mátrixizolációs vizsgálata

Az Ac-Gly-NHMe és az Ac-Ala-NHMe dipeptidek infravörös spektrumát vizsgáltuk DCM, DMSO-d<sub>6</sub> oldószerekben, valamint Ar és Kr mátrixban. A spektrumokat elméleti kémiai számítások alapján asszignáltuk. A kísérleti adatok alapján két hidrogénkötéses konformert azonosítottunk és találtunk egy kis mennyiségben jelenlevő egyértelműen nem kimutatható harmadik konformert is. Az alaninszármazékról mátrixizolációs VCD spektrumot is felvettünk, amivel alátámasztottuk az IR spektrum asszignációját, és kimutattuk, hogy néhány rezgés esetén a rotátorerősség nagyban függ a gerinc torziós szögeitől.

Az Ac-Pro-NHMe dipeptidek infravörös spektrumát vizsgáltuk DCM, DMSO-d<sub>6</sub> oldószerekben, valamint Ar és Kr mátrixban. A spektrumokat elméleti kémiai számítások alapján asszignáltuk. A spektrumban főleg a transz- $\gamma_L$ + konformer jeleit láttuk, de nyomnyi mennyiségben cisz- $\alpha_L$ + konformer is jelen volt. Eredményeink alátámasztják, hogy a prolin konformációs zárként funkcionál, hisz a peptidgerinc meghatározóan transz- $\gamma_L$  szerkezetet vesz fel.

**Kapcsolódó közlemények:** *Gábor Pohl, András Perczel, Elemér Vass, Gábor Magyarfalvi and György Tarczay: A matrix isolation study on Ac-Gly-NHMe and Ac-L-Ala-NHMe, the simplest chiral and achiral building blocks of peptides and proteins. Phys. Chem. Chem. Phys. 9:4698-4708.*

*Gábor Pohl, András Perczel, Elemér Vass, Gábor Magyarfalvi and György Tarczay: A matrix isolation study on Ac-L-Pro-NH<sub>2</sub>, a frequent structural element of  $\beta$ - and  $\gamma$ -turns of peptides and proteins. Tetrahedron (2008) 64(9):2126-2133.*