

Kölcsönhatási hálózatok és dinamikai sajátságok vizsgálata élettani szempontból jelentős fehérjékben

Karancsiné Menyhárd Dóra

Tézisek



**Eötvös Loránd Tudományegyetem, Kémia Intézet
Szerkezeti Kémia és Biológia Laboratórium
HUN-REN-ELTE Fehérjemodellező Kutatócsoport
2025**

Bevezetés

Bio-makromolekuláris rendszerek természetét és térbeliségét szerkezet és dinamika szinergizmusa, a feltekeredési mintázat és a mintázatra épülő képlékeny, fluktuáló felszínek és a környezeti változásokra érzékeny kölcsönhatási hálózatok közösen alakítják ki, funkcionalitásukat pedig leginkább a kölcsönhatásra való - szintén dinamikusan változó - hajlamuk. Kvantumkémiailag számításokat, a molekulamodellizálás eszköztárát, valamint szerkezetmeghatározási módszereket alkalmazva vizsgáltam a szervezetünket alkotó molekulák egészséges működésének szerkezeti és dinamikai vonatkozásait és azt, hogy ezek az élettani szempontból jelentős rendszerek hogyan romolhatnak el és korrekciójukra miként lehet lehetőség.

A dolgozatban bemutatott munkák időrendben szerepelnek, amely azért is bizonyult különösen hasznosnak, mert rávilágít a tudományos életutam során bekövetkezett szemléletváltásra is: míg az első fejezetben összegyűjtött munkák során az irodalomban fellelt érdekes kérdésekre fókuszáltunk, irodalmi adatsorokat, kísérleti eredményeket kíséreltünk meg értelmezni, ez később megváltozott. Hamar világossá vált ugyanis, hogy egy kérdést igazán jól körüljárni a kísérleteket végző kollégákkal szoros együttműködésben, vagy a kísérletek aktív résztvevőjeként lehet, amikor a számítások eredményei alapján mód nyílik kísérletek tervezésére, és azok eredményei alapján pedig az elméleti modellek pontosítására vagy újra-alkotására. Ezek közül a munkák közül mutatok be néhány példát a dolgozat lényegi részét alkotó fejezetekben.

1. Hem fehérjék vizsgálata

Munkám kezdeti szakaszában olyan hem fehérjék működését vizsgáltam, amelyek egymástól eltérő módon ugyan, de mind részt vesznek a nitrogén-monoxid endogén kölcsönhatásaiban. A nitrogén-monoxid kulcsfontosságú hírvivő és védelmi citotoxin az ideg-, izom-, szív-, ér- és immunrendszerünkben.

A nitrogén-monoxid-szintázok (NOS-ok) L-argininből állítanak nitrogén-monoxidot elő, kétlépcsős mechanizmus szerint. Az első lépésben az L-Arg szubsztrát $N\omega$ -hidroxi-L-argininná (NHA) alakul, amiből, egy második oxidációs lépés során képződnek a nitrogén-monoxid és L-citrullin termékek. Én az első lépés során lejátszódó elektrontranszfer folyamatot vizsgáltam az enzim hem csoportjához kötött oxigén, az aktív helyen horgonyzott L-Arg szubsztrát és a redoxifolyamat elektron-forrása, a tetrahidrobiopterin kofaktor között. A kofaktor aktív és inaktív variánsainak gyök-képződési folyamatainak keresztül igyekeztem QM számításokat alkalmazva feltárni az aktív centrum és a kofaktorok közötti elektron és proton-átadás feltételeit.

Vérszívó rovarok hem fehérjéket alkalmaznak, hogy a szervezetünkbe juttassák és ott felszabadítsák a nitrogén-monoxidot, ahol az értágulatot indukál, valamint gátolja a vérlemezkék aggregációját, míg a megüresedett hem hisztamint megkötve késlelteti az immunválaszt. A rovar nyálában található hem fehérjék, a nitrophorinok ennek a rendszernek a kulcsfontosságú elemei. A nitrogén-monoxid szoros kötődését a rovar nyálában, valamint annak könnyű felszabadítását az áldozatban az nitrophorinok és a nitrogén-monoxid közötti affinitás pH-érzékenysége biztosítja: az NO felszabadulása magasabb pH-értékeknél sokkal gyorsabb. A pH megváltozása nem közvetlenül a hem csoport működését, hanem az azt befogadó fehérjemátrix viselkedését módosítja. Munkánk célja ennek a módosulásnak azonosítása volt, hogy

a tapasztalt affinitás-különbség szerkezeti magyarázatára javaslatot tehesünk.

A nitrogén-monoxid másodlagos hírvivő szerepét az oldható guanilát-ciklázhoz (sGC) kötődve tölti be. Az sGC GTP-ből cGMP-t állít elő, ezt a katalitikus folyamatot teszi nitrogén-monoxid jelenléte kétszázszor hatékonyabbá. A cGMP szintén egy hírvivő molekula, több létfontosságú folyamat iniciátora – aktivációs jelének specificitása tehát döntő jelentőségű. Az sGC szempontjából ez azt jelenti, hogy az nitrogén-monoxidot ezerszeres oxigén túlsúly mellett is, szelektíven és hatékonyan kell megkötnie. Az oxigén-kizárás molekuláris részleteinek jobb megértése felé igen jelentős lépés volt a bakteriális H-NOX fehérjék felfedezése, amelyek az sGC hem-tartalmú, nitrogén-monoxid-kötő doménjéhez hasonló feltekeredési mintázatot (fold) mutattak, de levegőn stabil oxigén-komplexeke képeznek. Az sGC hem doménjének aktív zsebe teljesen apoláris, míg a *Thermoanaerobacter tengcongensis* H-NOX-ban a hemhez kötött oxigén részleges negatív töltését a katalitikus zseb egy Tyr oldallánca stabilizálja. Munkám során azt szerettem volna tisztázni, hogy előfeltétele-e a Tyr (vagy bármely más H-kötés donor) jelenléte a disztális hem zsebben az oxigén kötődésének és hogy esetleges hiánya garantálja-e a szelektivitást.

Az 1. fejezethez tartozó tézisek:

- Csatolt elektron és protontranszfer útvonalakat vizsgáltunk a nitrogén-monoxid-szintáz enzim hem csoportjához kötött oxigén, az aktív helyen horgonyzott L-Arg szubsztrát és a redoxifolyamat elektronforrása, a tetrahidrobiopterin kofaktor között. Megmutattuk, hogy a kofaktor kötődése az alkalmazott modellrendszerben nem elégséges feltétele az elektrontranszportnak, ellenben a kofaktor deprotonálásával kiváltható az elektron-átadás és a hemhez koordinálódott oxigén aktiválódása (S1, S2).

- A rablópoloska nitrophorin 4 fehérjéje esetében azonosítottunk egy Asp oldalláncot, amely a vérszívó rovar nyálának megfelelő savas pH-n protonált és H-híd donorként járul hozzá a hemhez kötött NO ligandum szoroson pakolódott kötőhelyének kiépítéséhez. A humán fiziológiának megfelelő neutrális pH-n ez az oldallánc deprotonálódik és a felszabadított flexibilis hurkok egymástól eltávolodva kieresztik a csapdázódott NO molekulát, mely értágító hatást fejt ki a csípés környezetében. (S3)

- Megmutattuk, hogy különböző H-NOX fehérjék – melyek a másodlagos hírvivő cGMP-t előállító humán sGC enzim bakteriális modellrendszerei – eltérő oxigén-affinitását miként befolyásolja a nyugalmi állapotot leíró konformációs sokaság. Azt találtuk, hogy oxigén kötésre csak azok a variánsok alkalmasak, amelyek a nyugalmi állapotban olyan módon koordinálnak vízmolekulákat, hogy azok a fehérjemátrixot az oxigén megkötésére alkalmas konformációban rögzítik (S4).

- Az oxigén, a nitrogén-monoxid és a szénmonoxid ligandumok vándorlását vizsgáltuk H-NOX fehérjék esetében. Kidolgoztunk egy modellrendszert, mely a szimulációk alapján nem csak a fehérjemátrixokat átszövő útvonalak és tranzienst kötőhelyek felderítését, hanem a diffúzió sebességének becslését is lehetővé teszi. (S5)

2. Betegségkókozó mutációk hatása egy pszeudouridináz működésére

Az uridin pszeudouridinné (Ψ) történő izomerizációja az RNS leggyakoribb poszttranszkripciósi módosulása. Ψ -k nagyon sokféle RNS-ben (tRNS-ekben, rRNS-ekben, snRNS-ekben és mRNS-ekben) fordulnak elő, gyakran az RNS-ek funkcionálisan fontos régióiban,

elágazásokban, aktív helyek közelében. Több ribonukleoprotein (fehérje-RNS) komplex, például a riboszóma és a spliceoszóma hatékony működéséhez elengedhetetlen az RNS komponensek bizonyos pontjain szelektíven lejátszódó pszeudouridiláció. A pszeudouridilációs ($U \rightarrow \Psi$) átalakulás során a cukor egység és az uracil gyűrű közti C-N kötés felhasad, a bázis elfordul és egy C-C kötést kialakítva kötődik vissza. Ψ -k fokozzák az RNS-ek szerkezeti- és hő-stabilitását, és elősegítik az összetett térszerkezetek és kötőzsebek kialakítását. A pszeudouridiláció enzimkatalizált folyamat, pszeudouridilázok (PSUk) végzik. Az általunk vizsgált box H/ACA PSU négy fehérjeláncból (diszkerin, Nop10, Nhp2, Gar1) és egy vezérlő RNS-ből épül fel. A szubsztrát-RNS-ek koordinációját és pozícionálását ezekben az enzimkomplexekben a vezérlő RNS, egy kis sejtmagvacskas RNS (snoRNS) végzi, az izomerizációt pedig a fehérjekomponensek – az katalitikus centrumot a diszkerin fehérje és a snoRNS közösen alakítja ki. Együttműködő partnereink a box H/ACA PSU komplex két fehérjéjének olyan mutációit azonosították melyek vese-, szem-, bél- és hallási problémákkal jellemezhető eddig nem leírt, új fenotípussal társulnak. Közös munkánk arra irányult, hogy megértsük milyen szerkezeti változások következnek be a mutációk folytán és hogy ezek az enzimműködés mely folyamataira lehetnek hatással. A feladatot különösen izgalmassá tette, hogy az már a rendszer homológia modelljének felépítésekor kiderült, hogy a mutációk az aktív helytől igen távol történnek, egy fehérje-fehérje kontakt-felszín illeszkedését módosítják. Ezért, hogy hatásukat értelmezni tudjuk, a teljes – 6 molekulából álló – katalitikus gépezet egymásra gyakorolt hatásáról, kölcsönhatási mintázatáról kellett átfogó képet nyernünk, QM, QM/MM és molekulamodelllezési módszerekkel, hogy a páciensek körében gyűjtött, zebrahal modellekben igazolt kísérleti eredményekhez racionális molekuláris modellt szolgáltatassunk.

A 2. fejezethez tartozó tézisek:

- Megmutattuk, hogy a box H/ACA pszeudouridináz komplex diszkerin és Nop10 fehérjéi esetében a katalitikus helytől távol eső betegségokozó mutációk a pszeudouridilációs reakció hatékonyságát csökkentik. Bakteriális analógokat felhasználva elkészítettük a humán pszeudouridináz modelljét és annak szerkezetét molekuladinamikai szimulációkkal optimaltunk. Azonosítottuk az aktív helyet és az enzimkomplexum fehérje-fehérje kölcsönhatási felszínét összekötő kölcsönhatási hálózatokat és megmutattuk, hogy az aktív helytől távol eső mutációk is katalitikusan szignifikáns változásokat indukálhatnak az aktív helyen (S6).
- Megmutattuk, hogy a szubsztrát-RNS közel szekvenciafüggetlen módon kötődik az aktív hely környezetében, mely alapján javaslatot tettünk a pszeudouridilációs átalakítás terápiás felhasználhatóságára (S6).
- MD szimulációkkal igazoltuk, hogy a vad típusú enzim esetében a szubsztrát uridin torzult konformációban kötődik az enzim aktív helyén. Mivel ez a kötődési mód az inaktív enzimvariánsok esetében nem alakul ki, feltételeztük, hogy katalitikus jelentőséggel bír. Munkánk igazolta, hogy a torzult kiindulási konformáció jelentősen csökkenti a katalitikus folyamat sebességét meghatározó C-N kötésfelhasadás energiáját (S7, S8).

3. Onkogén mutációk hatása a K-Ras szerkezetére és dinamikájára

A K-Ras a szervezetünk egyik leggyakrabban mutálódó onkoproteinje: az emberi rákos megbetegedések ~15%-ában megjelenő mutációi gyakran kísérik vastagbél-, hasnyálmirigy- és tüdőrák kialakulását. Molekuláris kapcsolóként működik, amely a sejtnövekedéssel és a

prolifrációval kapcsolatos útvonalakat szabályozza. A K-Ras egy membránlokalizált GTPáz enzim, katalitikus doménje Rossmann-fold szerkezetű, amely további két jól elkülönülő részre oszlik: az effektor és az alloszterikus régiókra. Az effektor régió kommunikál a downstream partnerekkel, míg az alloszterikus régió a membrán felé nyúlik, és a membránhoz kapcsolódó HVR szegmensben végződik, amely a Ras fehérjét a membránhoz horgonyozza. Az effektor régióban található effektor- és nukleotidkötő helyek részben átfednek, a switch I-nek (I. kapcsolónak) nevezett hurok ellentétes oldalain helyezkednek el. A nukleotid koordinálásában a foszfátkötő P-hurok és egy további kapcsoló-hurok, a switch II, vesz még részt, valamint az allosztérius régió nukleobázis-kötő hurkai. Így a rövid és meglehetősen merev P-hurkot leszámítva az enzim katalitikus helyét elsősorban rugalmas szegmensek alkotják, amelyek - a nukleotiddal való közös asszociációjuk révén - az egyes régiók közötti kapcsolatot is megteremtik. A P-hurok egy másik szempontból is igen jelentős: a K-Ras onkogén mutációinak több mint 80%-a ennek a szegmensnek a G12 pozíciójában fordul elő. A K-Ras tehát egy kisméretű fehérje, amelynek funkció szempontjából legfontosabb szegmensei flexibilisek, így a szerkezetvizsgálatára leginkább az NMR spektroszkópia alkalmas. Részletes spektroszkópiai elemzést végeztünk vad típusú és onkogén mutációt hordozó variánsok GDP és GTP kötött formái esetében, natív és Mg^{2+} -mentes környezetben, a dinamikai sajátságok változásaira fókuszálva. A kísérletek tervezése és az eredmények értékelése QM/MM számítások és molekuladinamikai szimulációk tanulságai alapján történt.

A 3. fejezethez tartozó tézisek:

- NMR mérések, MD szimulációk és QM/MM számítások segítségével igazoltuk, hogy a rákos megbetegedések jelentős hányadéért felelős K-Ras fehérje GTP-kötött aktív formája és a GDP-kötött nyugalmi állapota közti egyik legjelentősebb szerkezeti eltérés a

flexibilis switch-I régióban található Tyr32 irányultsága: az oldallánc átfordulása és a GTP γ -foszfát csoportjához való kötődése katalitikusan jelentős átrendeződéseket von maga után. A switch-I alakja és polaritása megváltozik, valamint a Tyr32 részt vesz a katalitikus víz molekula a hasítandó foszfát-csoport közelében való rögzítésében. Így a Tyr32 a WT rendszer esetében növekedési jel továbbításának hatékonyságát és időbeli korlátoltságát is meghatározza. Onkogén mutációk jelenlétében a K-Ras fehérje ez utóbbi funkciót kevésbé hatékonyan látja el, ami hozzájárul azok betegségek okozó hatásához. (S9, S10)

- Megállapítottuk, hogy a K-Ras GDP-kötött nyugalmi állapotában, különösen a Mg^{2+} -kofaktor távollétében, olyan konformációkat mintavételez, amely a nukleotidcsere által bekövetkező aktiválódáshoz készítik elő a rendszert. A katalitikus ciklusba illeszthető minor formák esetében a switch-régiók fellazulnak és a nukleotidkötő-hely oldószer-hozzáférhetősége megnő. A változások mutáció-szenzitívek, azaz lehetőséget teremtenek az onkogén variánsok specifikus megcélzására (S11, S12)

4. A podocin szerepe a vese szűrőrendszerében

A vese szűrőfunkcióját ellátó résmembrán bonyolult szerkezetét nagyszámú fehérje együttese tartja fenn: a podocin, nefrin, CD2-vel asszociált fehérje (CD2AP), tranziens receptorpotenciál kationcsatorna alcsalád C-tag 6 (TRPC6), zonula occludens-1 (ZO-1) és a nefrinszerű fehérje (NEPH1) makromolekuláris komplexe. A podocin egy intracelluláris, membránhoz horgonyzott szerkezeti fehérje, amely a podocita sejten belül rögzíti az extracelluláris térben a résmembrán szűrőhálóját kialakító transmembrán nefrin szálat. A nefrin podocinhoz kötődő intracelluláris része felelős azért is, hogy soktagú fehérje komplexum a podocita sejtek citoszkeletonjához kapcsolódjon,

valamint jelátviteli platformként is szolgál. A podocin és a nefrin betegség-okozó mutációi közül némelyek a fehérjék az endoplazmatikus retikulumban való visszatartását eredményezik, míg mások a membránhoz kötött podocin-nefrin párosok rendeződését zavarják meg - mindkettő súlyos, gyakran halálos következményekkel jár. A podocin szteroidrezisztens nefrotikus szindrómát okozó mutációival kapcsolatban együttműködő partnerünk megállapította, hogy a betegség mutációfüggő recesszív mintázatban öröklődik. Az, hogy az egyik szülőttől örökölt mutáció betegségokozó hatása csak akkor érvényesül, ha a másik szülőttől egy a szomszédos exonon mutációt hordozó allélt örököl az utód, arra utalt, hogy ezekből a fehérje-variánsokból egyes párok alakulnak ki, amelyek a vad típusú pároktól eltérő tulajdonságokkal bírnak, azaz feltételezhetően más szerkezetűek. Azt a hipotézist alakítottuk ki, hogy a podocin oligomerek azon túl, hogy rögzítik a transzmembrán nefrin szálak intracelluláris szakaszát, stabilitást biztosítva a szűrőrendszert kialakító molekulák számára, egyúttal azok szabályos rendeződéséért is felelhetnek. Ezt a rendet zavarhatják meg a torzult szerkezetű podocin párok. Célkitűzésem ezzel a munkával kapcsolatban az volt, hogy ennek az komplex rendszernek a szerkezetét és rendező-elveit molekulamodelllezési eszközökkel felderítsem, valamint, hogy segítsek értelmezni betegségokozó mutációk hatásmechanizmusát, hogy esetleges korrekciójukra javaslatot tehesünk.

A 4. fejezethez tartozó tézisek:

- Megmutattuk, hogy a podocin polimorf R229Q mutációt hordozó variánsával patogén társulásokat képző ún. asszociált mutációk a WT rendszertől eltérő dimer párokat hoznak létre és ezt javasoltuk betegségokozó hatásuk magyarázatául. A podocin monomer szerkezetét homológia modellezéssel becsültük. A dimer párok felépülését coiled-coil asszociációnak tételeztük fel, a betegségokozó mutációk helyzetéből kiindulva, szerkezetüket MD szimulációkkal

optimáltuk. Sikerült megmutatni, hogy a patogén társulásokhoz tartozó dimer párok eltérő szerkezetűek, de erősebben kötöttek, mint a nem-patogén asszociációk, melyben meghatározó szerepet játszik az R229Q mutáció a monomer szerkezetre gyakorolt merevítő hatása, mely annak szerkezeti heterogenitását és képlékenységét csökkenti. Eredményünk az első példa egy autoszomális recesszív rendellenesség esetében tapasztalható klinikailag is meghatározó interallelikus kölcsönhatásra (S13, S14).

- A számított dimer modell szerkezetét felhasználva új útmutatót dolgoztuk ki a szteroid rezisztens nefrózissal kapcsolatos genetikai tanácsadáshoz (S15).

5. Multimerizáció és flexibilitás hatása az acil-aminoacil peptidázok működésére

A humán acil-aminoacil peptidáz (AAP) egy homotetramer szerin-proteáz enzim, amely a szervezetünkben elsősorban a rosszul feltekeredett vagy oxidatív károsodást szenvedett fehérjék lebontásában játszik szerepet, a proteaszóma kulcsfontosságú upstream modulátora. A humán AAP mindenekelőtt exopeptidáz, N-acetilezett aminosavak eltávolítását katalizálja oligopeptidek és fehérjék N-terminusáról azonban szubsztrátköre nagyon tág és változatos. Irreverzibilisen gátolható például karbapenem antibiotikumokkal és organofoszfát peszticidekkel, hasítani képes egyes glukuronát metabolitokat és foszfonsav-antibiotikumok lipofil észtereit is. Az emlős enzim tetramer felépítése is egyedi, hiszen a bakteriális AAP-k dimer vagy hexamer szerkezeteket preferálnak. Ezek a tulajdonságok különlegessé teszik az emlős AAP-t nem csak szűkebb családján – az oligopeptidázokon – belül, hanem a szerin proteázok népes nemzetségében is. Az emlős AAP esetében a természet egy jól bevált katalitikus apparátus – a Ser-His-Asp triád – funkcionalitását

diverzifikálta, a hatékonyság megzavarása nélkül. Szerettük volna megérteni, hogy miként válik egy szűk specificitású enzim, szubsztrátok széles körével reakcióképes detoxifikáló ágenssé. Ezeken túl, az AAP működésének jobb megértése élettani szempontból is igen fontos, farmakológiai célpontként jelölték meg a petefészek, csont, bőr, vastagbél-, tüdő-, vese- és prosztaták bizonyos típusaiban, és az érintett betegek sugárterápiájának sikerében is szerepet játszik. Az AAP monomerek több mint 700 aminosavat tartalmaznak, ezért multimer struktúráik krisztallográfiával és krio-elektronmikroszkópiával vizsgálhatók. Mi minkét módszerrel tanulmányoztuk mind a bakteriális, mind az emlős változatokat az eredményeket pedig QM/MM és molekulamodellzési számításokkal egészítettük ki és értelmeztük.

Az 5. fejezethez tartozó tézisek:

- Krisztallográfiai és molekulamodellzési módszerekkel igazoltuk, hogy a dimer formában aktív *Aeropyrum pernix* AAP nyugalmi állapota nyitott és csukott formák dinamikus egyensúlyaként képzelhető el, valamint, hogy a domének felnyílását és összezáródását a dimerizáció nem akadályozza. Megmutattuk, hogy a nyitott forma katalitikusan inaktív, azaz a domének közti kölcsönhatások alakítják ki a katalitikus triád aktív elrendeződését. MD szimulációk segítségével azonosítottuk azokat a szerkezeti elemeket, amelyek peptid ligandumok esetében a doménmozgásokat gátolják, illetve elősegítik (S16, S17).
- A hexamer szerkezetű *Pyrococcus horikoshii* AAP esetében krisztallográfiai módszerekkel igazoltuk, hogy a merev monomerekből felépülő komplex enzimstruktúra olyan csatornarendszert tartalmaz, amely alkalmas a szubsztrátok méret és összetétel alapú szelekciójára. MD szimulációk eredményei alátámasztották, hogy a monomerek önmagukban stabilak, így a hexamerizáció szerepe a funkcióval függhet össze, valamint, hogy a katalitikus triád a monomerként szolvatált rendszerekben látens elrendeződésben található, melyet a szubsztrát

specifikus kötődése vagy a hexamer forma részlegesen deszolvatált állapota rendezhet aktív konformációba (S18).

- Krio-EM módszerrel felderítettük az emlős AAP enzim (sertésmájából izolált pAAP) tetramer szerkezetét és azonosítottuk a kölcsönhatási felszínek kialakításában szerepet játszó, emlős-specifikus szerkezeti elemeket. MD szimulációk alapján arra a feltételezésre jutottunk, hogy az enzim katalitikus apparátusa inaktív konformációkat is mintavételez. Ez a kísérletileg meghatározott töltéssűrűségi térképeken is felismerhető volt, és elvezetett az aktív triád relaxációját lehetővé tévő emlős-specifikus kölcsönhatási központ azonosításához. (S19)
- Krio-EM méréssel és MCMM konformációs analízis, molekuladinamikai szimulációk és QM/MM számítások segítségével meghatároztuk a meropenem karbapenem antibiotikum pAAP-hez való kötődési konformációját. Az asszociáció létrejöttének feltételeként az aktív hely szokatlan flexibilitását és fokozottan eltemetett jellegét javasoltuk. A meropenem megkötődése az enzim irreverzibilis gátlásával jár – ezt a katalitikus triád His oldalláncának a komplex képzés során történő kibillenésével, azaz a katalitikus triád inaktiválódásával magyaráztuk. Ez az első olyan szerkezet, amely egy emlős forrásból származó, a homeosztázis szempontjából jelentős enzim és egy karbapenem antibiotikum kötődését igazolja, és komplexének szerkezetét bemutatja. (S20)
- Krio-EM szerkezet-meghatározással és QM/MM számításokkal jellemeztük a pAAP klasszikus szerin-proteáz inhibitorokkal képzett komplexeit és megállapítottuk, hogy az pAAP aktív helye szokatlanul tágas és képlékeny, melyet az aktív hely relaxációját is lehetővé tévő P506 jelenlétének szerteágazó szerkezeti hatásával magyaráztunk. (S21)

A tézisek alapjául szolgáló közlemények

S1. Menyhárd* DK. Electron transfer between the heme bound oxygen and the tetrahydrobiopterin cofactor of nitric oxide synthase: a DFT study. *Chem. Phys. Lett.* **2004**, 392: 439.

S2. Menyhárd* DK. Comparative computational analysis of active and inactive cofactors of nitric oxide synthase. *J Phys Chem B.* **2009**, 113: 3151.

S3. Menyhárd DK, Keserű* GM. Protonation state of Asp30 exerts crucial influence over surface loop rearrangements responsible for NO release in nitrophorin 4 *FEBS Lett* **2005**, 579: 5392.

S4. Menyhárd* DK. Conformational selection mechanism governs oxygen ligation to H-NOX proteins. *Bioorg Med Chem Lett.* **2011**, 21: 3523.

S5. Rozza AM, Menyhárd* DK, Oláh* J. Gas Sensing by Bacterial H-NOX Proteins: An MD Study. *Molecules.* **2020**, 25: 2882.

S6. Balogh E, Chandler JC, Varga* M, Tahoun M, Menyhárd DK, Schay G, Goncalves T, Hamar R, Légrádi R, Szekeres Á, Gribouval O, Kleta R, Stanescu H, Bockenbauer D, Kerti A, Williams H, Kinsler V, Di WL, Curtis D, Kolatsi-Joannou M, Hammid H, Szócs A, Perczel K, Maka E, Toldi G, Sava F, Arrondel C, Kardos M, Fintha A, Hossain A, D'Arco F, Kaliakatsos M, Koeglmeier J, Mifsud W, Moosajee M, Faro A, Jávorszky E, Rudas G, Saied MH, Marzouk S, Kelen K, Götte J, Reusz G, Tulassay T, Dragon F, Mollet G, Motameny S, Thiele H, Dorval G, Nürnberg P, Perczel A, Szabó AJ, Long DA, Tomita K, Antignac C, Waters* AM, Tory* K. Pseudouridylation defect due to DKC1 and NOP10 mutations causes nephrotic syndrome with cataracts, hearing impairment, and enterocolitis. *Proc Natl Acad Sci USA.* **2020**, 117: 15137.

S7. Kiss DJ, Oláh J, Tóth G, Menyhárd DK, Ferenczy* GG. Quantum chemical calculations support pseudouridine synthase reaction through a glycol intermediate and provide details of the mechanism. *Theor. Chem. Acc.* **2018**, 137: 162.

S8. Kiss DJ, Oláh J, Tóth G, Varga M, Stirling A, Menyhárd* DK, Ferenczy* GG The Structure-Derived Mechanism of Box H/ACA Pseudouridine Synthase Offers a Plausible Paradigm for Programmable RNA Editing. *ACS Catalysis* **2022**, 12: 2756.

S9. Menyhárd DK, Pálffy G, Orgován Z, Vida I, Keserű* GM, Perczel* A. Structural impact of GTP binding on downstream KRAS signaling. *Chem Sci.* **2020**, 11: 9272.

S10. Pálffy G, Menyhárd* DK, Perczel* A. Dynamically encoded reactivity of Ras enzymes: opening new frontiers for drug discovery. *Cancer Metastasis Rev.* **2020**, 39: 1075.

S11. Pálffy G, Menyhárd DK, Ákontz-Kiss H, Vida I, Batta G, Tóke O, Perczel* A. The Importance of Mg²⁺-Free State in Nucleotide Exchange of Oncogenic K-Ras Mutants. *Chemistry.* **2022**, 28: e202201449.

S12. Gadanez M, Fazekas Z, Pálffy G, Menyhárd DK, Perczel* A. NMR-Chemical-Shift-Driven Protocol Reveals the Cofactor-Bound, Complete Structure of Dynamic Intermediates of the Catalytic Cycle of Oncogenic KRAS G12C Protein and the Significance of the Mg²⁺ Ion. *Int J Mol Sci.* **2023**, 24: 12101.

S13. Tory* K, Menyhárd DK, Woerner S, Nevo F, Gribouval O, Kerti A, Stráner P, Arrondel C, Huynh Cong E, Tulassay T, Mollet G, Perczel A, Antignac* C. Mutation-dependent recessive inheritance of NPHS2-associated steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet.* **2014**, 46: 299.

S14. Stráner P, Balogh E, Schay G, Arrondel C, Mikó Á, L'Auné G, Benmerah A, Perczel A, Menyhárd DK, Antignac C, Mollet G, Tory* K. C-terminal oligomerization of podocin mediates interallelic interactions. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* **2018**, 1864: 2448.

S15. Mikó Á, Menyhárd DK, Kaposi A, Antignac C, Tory* K. The mutation-dependent pathogenicity of NPHS2 p.R229Q: A guide for clinical assessment. *Hum Mutat.* **2018**, 39: 1854.

S16. Harmat V, Domokos K, Menyhárd DK, Palló A, Szeltner Z, Szamosi I, Beke-Somfai T, Náray-Szabó G, Polgár* L. Structure and catalysis of acylaminoacyl peptidase: closed and open subunits of a dimer oligopeptidase. *J Biol Chem.* **2011**, 286: 1987.

S17. Menyhárd DK, Orgován Z, Szeltner Z, Szamosi I, Harmat* V. Catalytically distinct states captured in a crystal lattice: the substrate-bound and scavenger states of acylaminoacyl peptidase and their implications for functionality. *Acta Cryst. D Biol. Crystallogr.* **2015**, 71(Pt 3): 461.

S18. Menyhárd DK, Kiss-Szemán A, Tichy-Rács É, Hornung B, Rádi K, Szeltner Z, Domokos K, Szamosi I, Náray-Szabó G, Polgár L, Harmat* V. A self-compartmentalizing hexamer serine protease from *Pyrococcus horikoshii*: substrate selection achieved through multimerization. *J Biol Chem.* **2013**, 288: 17884.

S19. Kiss-Szemán AJ, Stráner P, Jákli I, Hosogi N, Harmat V, Menyhárd* DK, Perczel* A. Cryo-EM structure of acylpeptide hydrolase reveals substrate selection by multimerization and a multi-state serine-protease triad. *Chem Sci.* **2022**, 13: 7132.

S20. Kiss-Szemán AJ, Takács L, Orgován Z, Stráner P, Jákli I, Schlosser G, Masiulis S, Harmat* V, Menyhárd* DK, Perczel* A. A carbapenem antibiotic inhibiting a mammalian serine protease: structure of the

acylaminoacyl peptidase-meropenem complex. *Chem Sci.* **2022**, 13: 14264.

S21. Kiss-Szemán AJ, Takács L, Jákli I, Bánóczy Z, Hosogi N, Traore DAK, Harmat V, Perczel* A, Menyhárd* DK. Ligand binding Pro-miscuity of acylpeptide hydrolase, structural analysis of a detoxifying serine hydrolase. *Protein Sci.* **2025**, 34: e70320