

Szerkezeti biológiai kutatások az ABÉT Biostruct laboratóriumban

NYÍRI Kinga,^{a,b,*} NAGY Gergely Nándor,^{a,b,*} LEVELES Ibolya,^{a,b} KÖHEGYI Bianka,^c TÓTH Zoé,^{a,b}
PEREY-SIMON Viktória,^{a,b} INCZE Dániel,^d MOLNÁR Zsófia,^{b,e} BATA Zsófia,^d POPPE László^e és
VÉRTESSY G. Beáta^{a,b}

^a BME VBK, Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszer tudományi Tanszék, Műegyetem rkp. 3., 1111 Budapest, Magyarország

^b HUN-REN TTK, Molekuláris Élettudományi Intézet, Magyar tudósok körútja 2., 1117 Budapest, Magyarország

^c Szentágotthai János Kutatóközpont, Pécsi Tudományegyetem, 7624 Pécs, Magyarország

^d Dr. Bata Zrt., 2364 Ócsa, Magyarország

^e BME VBK, Szerves Kémia és Technológia Tanszék, Műegyetem rkp. 3., 1111 Budapest, Magyarország

1. A szerkezeti biológia fejlődése az elmúlt évtizedben

A sejtben lévő makromolekulák szerkezetének pontos ismerete elengedhetetlen a működésük megértéséhez. A szerkezeti biológia nagyszámú kísérletes és számítási eljárást kínál a biomolekulák szerkezeti megismeréséhez, mely kapcsolódó kísérletes vizsgálatokkal együtt az élő szervezetek működésének jobb megértését célozza. Az elmúlt évtized során a szerkezeti biológiai módszerek kiemelkedő fejlődésének lehettünk tanúi. A kísérletes módszerek, valamint neurális hálózatok által vezérelt, mesterséges intelligencián alapuló adatelemzési és számítási innovációk új távlatokat biztosítottak összetettebb biológiai folyamatok szerkezeti alapú megértésében, és rendkívül megnövelték a szerkezetmeghatározás folyamatainak hatékonyságát. Érdemes számba vennünk e fejlődési folyamat néhány lényeges mérföldkővét, a röntgenkristallográfia, a kriogenikus elektron-mikroszkópia és mesterséges intelligencia alapú szerkezeti modellezés terén.

A **röntgenkristallográfia**, a biomolekulák és röntgen-sugarak diffrakciós kölcsönhatásán alapuló képalkotó eljárás már hagyományos szerkezeti biológiai technikának tekinthető. A krio-EM és a mesterséges intelligencia alapú szerkezetmodellezés ugrásszerű fejlődése ellenére a szinkrotron röntgenkristallográfia továbbra is a nagy felbontású szerkezetmeghatározás fontos módszere. Ez utóbbi módszer széles körben való elterjedését a közelmúlt technológiai fejlesztései is elősegítették, amik növelték az áteresztőképességet, a felbontást, megoldást kínáltak a kihívást jelentő kristályok mérésére, valamint felhasználóbarátabbá tették a szerkezetmeghatározást. Az új, negyedik generációs szinkrotronok nagyobb intenzitású és koherenciájú röntgen sugárzást biztosítanak a kísérletes vizsgálatokhoz.¹ Mindez, a mikrofókusz sugárforrások fejlődésével,² valamint a korábbinál gyorsabb adatkiolvasást és alacsonyabb zajszintet biztosító hibrid pixel detektorok (EIGER, PILATUS) alkalmazásával³ együttesen teszi lehetővé az eredményes adatgyűjtést

és a korábban kihívást jelentő mikrokristályok, inhomogén egykristályok, valamint rosszabbul diffraktáló kristályok esetén is. A röntgen szabadelektron-lézerek fejlődése (X-ray Free Electron Laser, XFEL) hatékonyabb időfelbontás elérését, valamint a sorozatos femtoszekundumos krisztallográfia (SFX) révén sugárzás okozta károsodás nélküli szerkezeti vizsgálatokat tett lehetővé. A szinkrotron forrásoknál elterjedő automatizált valós-idejű adatfeldolgozási és modellépítési szoftvercsomagok (pl. DIALS, xia2 3dii, AutoPROC) jelentősen csökkentették a kristálytól a szerkezetig jutáshoz szükséges időt. Szintén a szerkezeti biológusok munkáját egyszerűsítheti, hogy a közelmúltban a Diamond szinkrotron bevezette a teljesen felügyelet nélküli adatgyűjtési módot (Unattended Data Collection, UDC), amely a helyszíni, illetve távoli kapcsolat során a felhasználók által vezérelt adatgyűjtési módot válthatja ki. A szerkezetmegoldó szoftvercsomagok fejlődése emellett a röntgenkristallográfia, krio-EM és Alphafold szerkezeti modellezés módszereinek integrálását is biztosítja.⁴⁻⁶

A **kriogén elektronmikroszkópia** (krio-EM) a biomolekulák natív konformációjának megfigyelését teszi lehetővé a minták gyors lefagyasztását követő elektronszóródás kölcsönhatás nagy felbontású szerkeztelemzése révén. A módszer az elmúlt évtizedben rendkívül jelentős fejlődésen ment keresztül és mostanra a szerkezeti biológiai közösség egyik, ha nem leghatékonyabb módszerének tekinthető. A krio-EM áteresztőképessége, és az elérhető felbontás javulása egyaránt rendkívül látványos, köszönhetően a hardver, a mintaelőkészítés, az adatgyűjtés és a számítógépes elemzés terén elért szinergikus fejlesztéseknek. A hardver oldaláról érdemes megemlíteni az úgynevezett direkt elektron detektorokat, melyek forradalmasították a technikát. Ezek segítségével „filmeket” tudunk rögzíteni, amelyek alkalmasak arra, hogy számításon kiküszöböljük a molekulák mozgásából eredő homályosságot⁷. A felbontóképesség robbanásszerű fejlődésének (ún. resolution revolution)⁸ és a technika széles körű elérhetőségének⁹ köszönhetően a jó

* Főszerzők. E-mail: nyiri.kinga@vbk.bme.hu, nagy.gergely.nandor@vbk.bme.hu

felbontású szerkezetek krio-EM-mel történő meghatározása rutinszerűvé vált a szerkezeti biológusok széles közösségének. Az egyrészecske kriogén elektron-mikroszkópia során eddig elért legnagyobb felbontás $1,09 \text{ \AA}^{10}$, ami valódi atomi szintű feloldóképességet jelez. Az egész sejtekről való krio-EM képalkotás és az *in situ* szerkezeti vizsgálatokat célzó krio-elektromográfia (krio-ET) szintén rendkívüli fejlődésen ment keresztül és várhatóan további áttörés küszöbén áll, lehetővé téve a komplex biológiai rendszerek működésének szerkezeti alapú megismerését.¹¹

A kísérletes szerkezeti módszereket kiegészítve meghatározó szerepet nyert a szerkezetbecslés is. A DeepMind 2020-ban bemutatott AlphaFold **szerkezeti modellezés** az ismert szekvencia és szerkezeti információkra támaszkodva mesterséges intelligencia segítségével közel kísérleti pontosságot ért el a szerkezet előrejelzésében.¹² Jelenleg számos továbbfejlesztett, felhasználók számára elérhető szerkezeti modellező algoritmus, valamint a több, mint kétszázmillió szerkezeti modellt tartalmazó AlphaFold DataBase könyvtár¹³ a szerkezeti alapú hipotézisek széleskörű bázisát biztosítja, ami jelentős segítséget jelent orvosbiológiai kutatások felgyorsításához.

A fenti bevezetőben bemutatott módszerek a szerkezeti biológiai kutatások fontos részét képezik, amelyek egymást kiegészítve alkalmazhatók a felmerülő létező tudományi kérdések szerkezeti alapon való megválaszolására. A továbbiakban a kutatócsoportunkban folyó szerteágazó tudományos munkák eredményeit bemutatva szemléltetjük ezen módszerek széleskörű felhasználhatóságát.

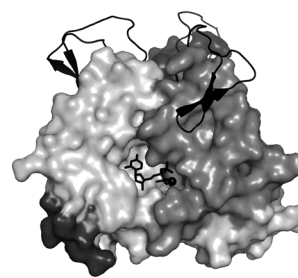
2. A Genom metabolizmus és Biostruct csoport

A Biostruct laboratórium 2011 óta működik a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszer-tudományi Tanszékén. A fehérjekristályosítás kísérleteket nagy áteresztőképességű kristályosító screenek alkalmazásával egy Mosquito nanoliteres folyadékkezelő robot (TTP Labtech) segíti, míg az összeállított kristályosító tálcák tárolását és automatikus fotózását egy Rock Imager kristály tálca 'hotel' rendszer végzi (Formulatrix). A labor SuperNova egykristály röntgendiffraktométer (Agilent Oxford Diffraction) házi röntgen sugárforrással is rendelkezik, mely egykristályok röntgendiffrakció tesztjét, valamint teljes adatkészlet felvételét teszi lehetővé. A labor korábban már bemutatásra került a Magyar Kémiai Folyóirat 124. évfolyam kiadásában¹⁴, a jelen tanulmány az azóta történt szerkezeti biológiai kutatásokat mutatja be. Megjegyzendő, hogy a Biostruct labor e kutatások mellett a szerkezeti biológiai oktatás fontos pillére is, különféle egyetemi kurzusok (pl.: Analitika labor, Modern szerkezetfelderítési módszerek, Projekt feladatok) valamint rendszeresen szolgált tudománynpszerűsítő programok (Kutatók Éjszakája, Lányok Napja, BME Nyílt Nap) helyszíneként.

3. A dUTPáz fehérje típusú inhibíciója

A dUTPáz fehérje a dUTP nukleotid hidrolízisét katalizálja, ezáltal a dUTP/dTTP szintet alacsonyan tartja. Mivel osztódó sejtekben a polimerázok által DNS-be beépített uracil mennyiségét ezen nukleotidok sejtbeli aránya határozza meg, így a dUTPáz a dUTP lebontásával megelőzi az uracil esetleges beépülését a genomba, ezáltal fontos szerepet játszik az örökítőanyag preventív védelmében.^{15, 16} A dUTPáz fehérje hiánya örvény- és fonálférgekben, ecetmuslicában és egérben egyaránt letálisnak bizonyult.¹⁷⁻²⁰ A humán dUTPáz fehérje Y54C mutációja pedig összefüggésbe hozható diabétesz és csontvelő elégtelenség kialakulásával.²¹ Kimutattuk, hogy a mutáció következtében a szubsztrát kötődése és az enzimaktivitás változatlan azonban a fehérje hőstabilitása jelentősen csökken, ami magyarázhatja, hogy miért tapasztalták a mutáns fehérje mennyiségének csökkenését nyúl modellben.^{22, 23}

A dUTPáz inhibitorok fejlesztése a patogén mikroorganizmusok elleni küzdelemben és a humán daganat terápiaiban is kutatások fókuszában áll.²⁴ 2010-ben azonosítottak egy olyan *Staphylococcus aureus* patogenitási sziget (SaPI) életciklusát vezérlő fehérjét (Stl), amelynek működését a f11 bakteriofág dUTPázal való kölcsönhatás szabályozza.²⁵ Ez a bakteriofág dUTPáz szekvenciája alapján hasonló más bakteriális és eukarióta dUTPázokhoz, viszont tartalmaz egy fágokra jellemző szekvenciába beágyazódó szegmenst, így az első megközelítésben a kölcsönhatást ehhez a szegmenshez köthették. A fág dUTPáz szerkezetének meghatározásával megmutattuk, hogy ez az inszert egy a dUTPázokra jellemző mag szerkezetből kinyúló, elkülönült mini domént alkot²⁶ (1. Ábra) és további vizsgálataink kimutatták, hogy nincs esszenciális szerepe az Stl fehérjével való kölcsönhatásban.²⁷



1. Ábra. A f11 bakteriofág dUTPáz szerkezete (PDB ID:4GV8)²⁶.

A trimer fehérje három alegysége a szürke szín különböző árnyalataival lett színezve, a kristályosításhoz használt szubsztrátanalóg (dUPNPP) fekete pálcikaként, míg a kofaktor magnézium ion szürke gömbként van megjelenítve. A fagra jellemző, Stl kölcsönhatás specifikusságáért felelős inszert fekete szalagmodellként látható, ezen régió evolúciósan konzervált dUTPáz szerkezetből (térkitöltő modell) nyúlik ki, mintegy önálló minidomént alkotva. Jól látható, hogy a kép közepén található szubsztrátkötő zseb két alegység közös felszínén helyezkedik el. A zsebet a harmadik alegység karboxi terminális régiója zárja. Ezen szakasz elhelyezkedését konformációs flexibilitása miatt a kristályszerkezetben nem lehetett meghatározni.

Emellett fluoreszcens stopped-flow gyorskinetikai módszerrel kimutattuk, hogy az Stl fehérje a f11 fág dUTPáz lassan, de erősen kötődő kompetitív inhibitora,²⁸ így az első ismert fehérje típusú dUTPáz inhibitor. Eredményeink alapján a fág dUTPáz csak azután képes kölcsönhatásba lépni az Stl fehérjével, miután elhidrolizálta a sejtbeli dUTP nagy részét. Ez a modell rámutat a kölcsönhatás esetleges evolúciós előnyére, hiszen a patogenitási sziget csak uracil-mentes környezetben replikálódik, ami biztosítja genetikai információjának megőrzését és elősegíti annak horizontális transzferét.

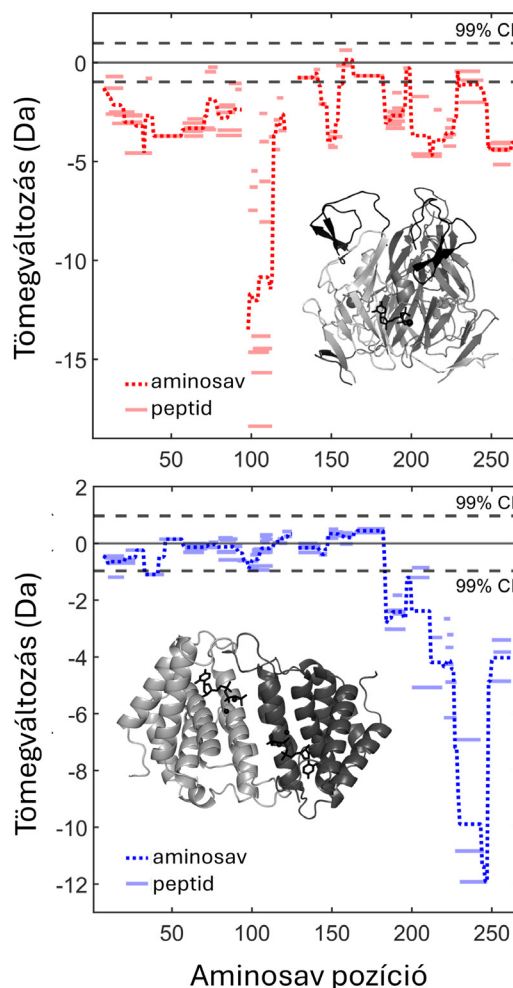
Érdekes módon az Stl fehérje ugyan nem minden fajta fág dUTPázal lép kölcsönhatásba, azonban a mikobakteriális dUTPáz aktivitását ötödére csökkenti.²⁹ Emellett az Stl-t *Mycobacterium smegmatis* sejtben expresszáva a sejtbeli dUTP szint megemelkedését figyeltük meg, amely zavart okozott a mikobaktérium kolóniaképzésében is. Továbbá az Stl fehérje különböző mértékben gátolja az *Escherichia coli*, ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) és a humán dUTPázokat, a legerősebb kölcsönhatást és teljes mértékű inhibíciót azonban a f11 bakteriofág dUTPáz esetében tapasztaltuk.^{28, 30-32}

A fent bemutatott trimer dUTPázok aktív zsebét két alegység alkotja, amelyet a harmadik alegység karboxi-terminális régiója zár le katalízis során. Ez a záródás-nyílás a karboxi terminális régió flexibilitásától függően különböző mértékű konformáció változást jelent az enzim szerkezetében.³³ Az *E. coli* dUTPáz fehérje esetében ezen átlapoló ún. kar régió flexibilitásának csökkenését eredményező pontmutáció növelte mind az Stl inhibitorhoz való kötődés erősségét, mind az aktivitás gátlás mértékét.³¹ Így feltehetőleg a dUTPáz-Stl kölcsönhatás erőssége mellett, az aktív hely záródása során bekövetkező konformációváltozás kinetikája is modulálja az Stl által kifejtett inhibíció mértékét.

A Kardos József kutatócsoportjával együttműködésben (ELTE, Budapest) végzett szinkrotron radiációs cirkuláris dikroizmus vizsgálataink kimutatták, hogy az Stl fehérje főként alfa helikális térszerkezetű. A fehérje amino és karboxi terminális szegmenseit vizsgálva kimutattuk, hogy a DNS kötésért az amino terminálison található hélix-csavar-hélix motívum felelős, azonban ez a motívum nem szükséges a dUTPázal való kölcsönhatáshoz.³⁴ Továbbá igazoltuk, hogy a fehérje dimereket képez, és a dimerizációs felszín a karboxi terminális részen található.³⁵

2017-ben Hill és munkatársai felfedezték, hogy az általunk vizsgált Stl fehérje a főként b-redős szerkezetű trimer dUTPázoktól szerkezetükben teljesen különböző, a-helikális, dimer dUTPázokkal is kölcsönhatásba lép.³⁶ Ez alapján feltételezhető volt, hogy az Stl egy a szubsztrátot mimikáló szegmennel rendelkezik, amivel kapcsolódik a dUTPázokhoz. Azonban Antoni J. Borysik (King's College, London) csoportjával együttműködésben HDX-MS (hidrogén-deutérium cserés tömegspektrometria) módszerrel kimutattuk, hogy az Stl fehérje két különböző szegmense

lép kölcsönhatásba a trimer illetve a dimer dUTPázokkal.³⁵ (2. Ábra) Az, hogy ez az Stl fehérje különböző szegmensei révén bármely típusú dUTPázal képes felismerni, arra utal, hogy az uracil-mentes környezet előnyt jelenthet a patogenitási szigetek terjedésében.

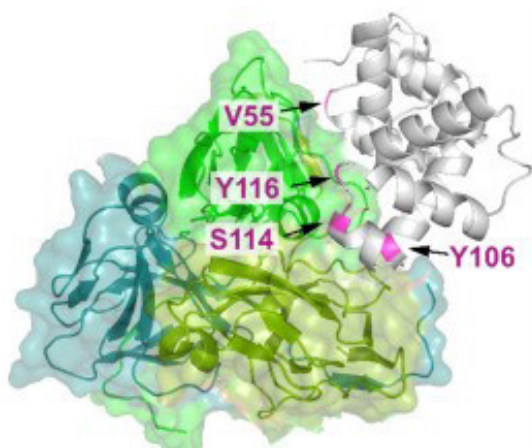


2. Ábra. Az Stl fehérjén HDX-MS módszerrel detektált tömegváltozás trimer (felső panel, PDB ID: 4GV8) illetve dimer (alsó panel, AlphaFold szerver) fág-eredetű dUTPázal való kölcsönhatás következtében. A fehérjék alegységei a szürke különböző árnyalataival színezve. A szubsztrátanalóg (dUPNPP) fekete pálcikaként a kofaktor magnézium ion gömbként van ábrázolva.³⁵

2018-ban Dimitri I. Svergun kutatócsoportjával kollaborációban (DESY, Hamburg) méretkizárásos kromatográfiával kombinált kisszögű szinkrotron radiációs röntgenszórás (SEC-SAXS) vizsgálattal meghatároztuk a humán dUTPáz és az Stl fehérje komplexének kis felbontású szerkezetét.³² A kapott szerkezeti modell egyértelműen arra utal, hogy a komplexképződés megzavarja az Stl fehérje dimerizációját. Ez alapján feltételezhető, hogy a trimer fág dUTPázok a patogenitási szigetek átíródását az azt szabályozó génszakaszhoz kötődő Stl represszor dimer megbontásával képesek iniciálni. Kötődési kinetikai méréseink alapján meghatároztuk, hogy az Stl dimerizáció disszociációs egyensúlyi

állandója $K_{\text{DIM}} = 0.12 \text{ nM}$.³⁷ Ennek fényében a fág dUTPázok tehát csak egy összetett és finomhangolt interakciós hálózat révén lehetnek képesek a patogenicitási sziget reprezentálására.

A humán dUTPáz esetében az Stl fehérjével való kölcsönhatás erőssége és az enzimgátlás mértéke (70%) is kisebb, mint a fág dUTPáz esetében (közel 100%). Annak érdekében, hogy az Stl-t mint a humán dUTPáz térben és időben szabályozható szelektív inhibitoraként használhassuk humán sejt kísérletekben a humán dUTPázra kifejtett Stl-általi gátlást többféle stratégia alapján kíséreltük meg növelni.³⁸ A dimerizációs domén eltávolítása, illetve a dimerizációt gyengítő specifikus pontmutációk nem eredményeztek jelentős növekedést az inhibíció mértékében. Ezzel kimutattuk, hogy az Stl karboxi terminális doménje teljes egészében fontos szerepet játszik a humán dUTPáz inhibíciójában. Az általunk meghatározott dUTPáz-Stl kristályszerkezet alapján specifikus pontmutációkat terveztünk a kölcsönhatás erősítésére (3. Ábra, 1. Táblázat). Itt megjegyzendő, hogy a kristályosításhoz az Stl C-terminális régióját nem tartalmazó fehérjekonstruktot használtunk, mivel a teljes hosszúságú Stl fehérje az amino és karboxi terminális domének közötti szakasz flexibilitása³² következtében nem kristályosítható.



3. Ábra. A humán dUTPáz az Stl fehérje amino terminális szegmensével (Stl^{NT}) alkotott komplexének röntgendiffrakciós módszerrel meghatározott szerkezeti modellje (PDB-kód: 8C8I). A könnyebb átláthatóság kedvéért a trimer dUTPáz (szalag model és áttetsző felszín) mellett a három kölcsönható Stl láncból csak egyet ábrázoltunk szalag modellként. A tervezett mutációk helyét nyilakkal és sötétítéssel jelöltük. A kialakuló új kölcsönhatásokat az 1. Táblázatban mutatjuk be.

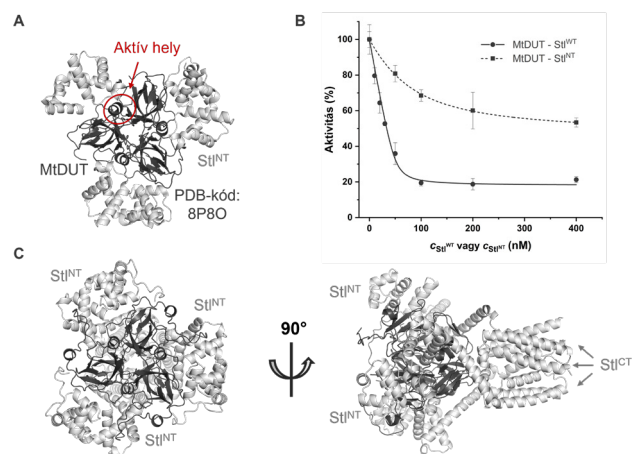
1. Táblázat. A humán dUTPázal való kölcsönhatás erősségének növelésére tervezett Stl mutációk

Stl mutáció	Lehetséges új kölcsönhatása humán dUTPázal
Y106K	poláris vagy ionos kölcsönhatás Asp104
Y106R	
V55S	poláris kölcsönhatás Glu144
S114E	poláris vagy ionos kölcsönhatás Lys91
S114D	
Y116R	poláris vagy ionos kölcsönhatás Asp127

Az előállított Stl pontmutánsok elvárásainktól eltérően nem javították a humán dUTPáz inhibíció hatékonyságát. Feltételezésünk szerint ez a megközelítés a fehérje átlapoló karjának flexibilitása, azaz a fehérje inherens tulajdonsága miatt volt sikertelen.

A dUTPáz és Stl fehérje közötti kölcsönhatás mélyebb megértése érdekében a teljes hosszúságú fehérjék által alkotott komplex térszerkezetének megfigyeltére krio-EM kísérleteket végeztünk (Jiri Novacek, CEITEC, Brno), ezek eredményének kiértékelése jelenleg folyamatban van.

Továbbá vizsgáltuk azt is, hogy az Stl fehérje amino terminális szegmense (Stl^{NT}) képes-e jobban vagy legalább a vad típushoz hasonló hatékonysággal gátolni a *M. tuberculosis* dUTPáz (MtDUT). A szerkezeti vizsgálatokhoz ebben az esetben is az Stl^{NT} amino terminális szegmenst használtuk. A MtDUT-Stl^{NT} komplex kristályszerkezet (PDB-kód: 8P8O) alapján elmondható, hogy az Stl^{NT} fehérje a MtDUT aktív centrumába kötődik (4. ábra/A), itt alakul ki az elsődleges kölcsönhatási felszín a két fehérje között a korábban ismert dUTPáz-N-terminális Stl komplex szerkezetekhez hasonlóan.³⁹⁻⁴¹



4. Ábra. A *M. tuberculosis* dUTPáz Stl általi gátlása. A) A MtDUT-Stl^{NT} komplex kristályszerkezete (PDB-kód: 8P8O). A trimer MtDUT-hoz (sötétszürke) három Stl^{NT} (világosszürke) kötődik. B) A MtDUT enzim aktivitás gátlása a két Stl variáns által. C) A MtDUT enzim teljes hosszú Stl fehérjével alkotott komplexének AlphaFold modellje. A fehérjék megjelenítése az A) panelhez hasonló, az Stl fehérje N- és C-terminális doménjeit jelölve, a fehérje komplex két orientációban látható.

Ezáltal az inhibitor szterikusan gátolja a szubsztrát bekötődését. Különböző biokémiai és biofizikai módszerek segítségével kimutattuk, hogy a Stl^{NT} fehérje kevésbé képes gátolni a MtDUT-ot, mint a teljes hosszú Stl fehérje (Stl^{WT}), az enzim aktivitását nagyjából csak a felére csökkenti (4. Ábra/B), és szubsztrát mentes környezetben is gyengébb kötődést mutat, amely különbség a disszociációs rátákban mutatkozik meg (2. táblázat).

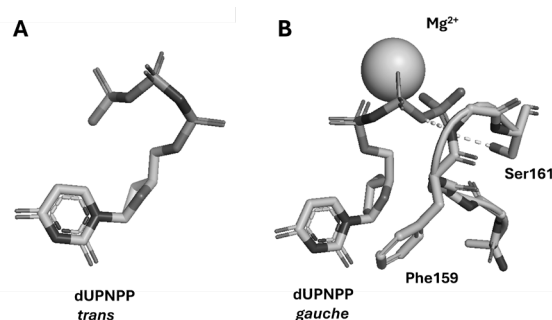
2. Táblázat. Az Stl variánsok és MtDUT közötti kölcsönhatás kinetikai paramétereit, bioréteg interferometria (BLI) mérések alapján

Ligandum	Analit	K_D (pM)	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)(10^5)	k_{off} (s^{-1})(10^5)
Stl ^{WT}	MtDUT	<1	2,70±0,01	<0,01±0,01
Stl ^{NT}	MtDUT	190±1	5,42±0,01	10,28±0,04

A szerkezeti modellezés fejlődését kihasználva próbáltunk magyarázatot találni arra, hogy az Stl fehérje C-terminális doménje hogyan járul hozzá az erősebb MtDUT-tal való kölcsönhatáshoz és gátláshoz. Ehhez AlphaFold modelleket alkalmaztunk, amik azt sugallják, hogy a két fehérje közötti kölcsönhatás kialakulása során az Stl karboxi terminális domének (Stl^{CT}) egymás között létrehozhatnak egy oligomerizációs felszínt (4. ábra/C), ami által növekszik az aviditás, és ez magyarázhatja a teljes hosszú Stl fehérje erősebb kötődését.⁴² Ezt a hipotézist a továbbiakban krio-elektromikroszkópiás módszerrel tervezzük vizsgálni.

4. Zebrahal dUTPáz szerkezeti és élettani vizsgálata

A zebrahal, mint modellorganizmus ma nagyon népszerű a kutatók körében, mivel könnyen, alacsony költségen fenntartható, fejlődése meglehetősen gyors, és jó túlélőképességet mutat a különböző megtermékenyítés utáni eljárásokkal szemben. Mindezek mellett további előnye, hogy olyan gerinces faj, amely 70%-os homológiát mutat az emberi genommal. Továbbá az embriók az anyaállaton kívül fejlődnek és átlátszóak. Ezen előnyök következtében ez a modell jól alkalmazható az embrionális fejlődés vizsgálatára.⁴³⁻⁴⁵ Eredményeink azt mutatták, hogy a korai embrionális fejlődés során a genomi uracilszint és a sejten belüli dUTP szint igen magas zebrahalakban. Emellett azt tapasztaltuk, ha ezeket a szinteket a dUTPáz megtermékenyített petesejtjeibe történő mikroinjektálásával csökkentjük, az az embriókra nézve letális. Annak érdekében, hogy minél jobban megértsük ezt a folyamatot többek között a zebrahal dUTPáz enzim izoformáit karakterizáltuk. Termofluorimetriás hőstabilitás vizsgálataink és spektrofotometriai alapú enzimaktivitás méréseink során azt tapasztaltuk, hogy az izoformák különböző stabilitással és aktivitással rendelkeztek. Emellett a zebrahal dUTPáz röntgen krisztallográfiás szerkezetét is meghatároztuk egy szubsztrát analóggal (dUPNPP) komplexben. A zebrahal dUTPáz szerkezete igen nagy hasonlóságot mutat a humán dUTPázhoz. A szerkezetben jól azonosítható a fehérjeláncok és a szubsztrát konformációjának összefüggése, mivel a trimer dUTPáz három aktív helyén a szubsztrát és a karboxi terminális kar többféle térállást vesz fel. Egyes szubsztrátkötő zsebek esetében a fehérjelánc karboxi terminálisa nem zárja az aktív centrumot, ekkor a szubsztrát egy nem hidrolizálható, *transz* konformációt vesz fel és a reakció lejtátszódásához szükséges magnézium ion kofaktor sincs jelen (5. Ábra/A). Amennyiben az aktív helyet a karboxi terminális régió zárja a szubsztrát a hidrolízishez megfelelő *gauche* konformációt vesz fel és a magnézium ion kofaktor is bekötődik (5. Ábra/B).



5. Ábra. A zebrahal dUTPáz szubsztrát analóg konformációs flexibilitása A zebrahal dUTPáz kristályszerkezet egyik aktív helyén a dUPNPP szubsztrát analóg az enzim működésben fontos szerepet játszó C-terminális karjának távollétében a katalízisre alkalmatlan *trans* konformációt vett fel. Ugyanazon kristályszerkezetben az enzim C-terminális karja (Phe159, S161) és Mg^{2+} kofaktor a dUPNPP szubsztrát analógot katalízisre alkalmas *gauche* konformációját stabilizálja.

5. Onkogén mutációt hordozó KRAS fehérjék kölcsönhatásainak vizsgálata

Csoportunk a Semmelweis Egyetemen, az Eötvös Loránd Tudományegyetemen, a KINETO Lab és a Fototronic Kft-vel való együttműködés (Rasopátia konzorcium) keretében a KRAS fehérje onkogén mutánsaira specifikus inhibitorokat fejleszt.⁴⁶ A KRAS fehérje a sejt növekedését, és osztódását szabályozó jelátviteli folyamatok kulcsfontosságú eleme, mutációi a daganatos megbetegedések közel egyharmadában vannak jelen. A KRAS fehérje molekuláris kapcsolóként működik, aktív formában GTP-t, inaktív állapotban GDP-t köt. A jelátvitel lecsengése a GTPáz aktiváló fehérjékkel (GAP) való kölcsönhatás következtében valósul meg, az onkogén mutánsok esetében azonban ez a folyamat jelentősen gátolt.

Ezen probléma egyik kezelési stratégiája a GDP kötött állapot rögzítése a mutáns aminosavhoz szelektíven kapcsolódó ágensek által. A G12C mutáns KRAS fehérje esetében nagy áteresztő képességű szűrővizsgálatot végeztünk egy 585 elemű diverz fragmens vegyülettáron, hogy felmérjük, mely vegyületek képesek a mutáns ciszteinnel reakcióba lépni.⁴⁷ Az ígéretes találatok méretnövelését követően nukleotidcsere vizsgálatokkal szűrtük a vegyületek hatékonyságát. Öt vegyületet ezután állat modellben is teszteltünk, amelyből kettő hatékonynak bizonyult, ezek további vizsgálata jelenleg is zajlik.

Egy másik lehetséges megközelítés a KRAS-GAP komplex kölcsönhatásának erősítése a mutáns KRAS fehérjék esetében. Ilyen vegyületek után kutatva Grolmusz Vince (ELTE, Budapest) kutatócsoportjával együttműködésben, *in silico* szűrési módszert alkalmazva, ígéretes jelölteket találtunk a kovalens molekulákkal nehezebben célozható G12D mutáns KRAS fehérje GAP-pal való kölcsönhatásának javítására.⁴⁸ Emellett Rosta Edinával és munkatársaival kollaborációban (University College London) vizsgáltuk a G12 mutáns KRAS fehérjék GAP fehérjék által elősegített GTP bontásának mechanizmusát.⁴⁹

6. További kutatási témák az elmúlt évtized során

A fentebb részletezett kutatások mellett számos további szerkezeti biológiai vizsgálat folyt az ABÉT Biostruct laboratóriumban különböző akadémiai és ipari partnerekkel közösen, melyeket e bekezdésben egészen rövid összefoglaló ismertet. Leveles Ibolya a BME SZKTT Szupramolekuláris Kémia Kutatócsoportjával való együttműködés során új királis koronaéterek röntgenkristallográfiás szerkezet-meghatározását végezte el.⁵⁰⁻⁵² Hegedűs Tamás kutatócsoportjával együttműködve Ibolya hozzájárult a cisztikus fibrózis betegség CFTR kulcsfehérjéjének szerkezeti alapú vizsgálatához, mely során a fehérje funkcióját meghatározó konformációs változásait krio-EM szerkezetek molekuladinamikai (MD) vizsgálatával derítették fel.⁵³ Emelett fehérjekristályosítás és házi röntgen sugár kísérletekkel járultunk hozzá az SH3 domén fehérjék tirozin foszforiláció inhibíciós mechanizmusának feltárásához.⁵⁴

Az elmúlt évben egy iparilag releváns enzim szerkezete is meghatározásra került a Biostruct Laboratóriumban. A Dr. Bata Zrt.-vel együttműködésben határoztunk meg az első ismert fumonizin észteráz szerkezetet röntgen-kristallográfia útján.⁵⁵ Ez az enzim képes a fumonizin B1 mikotoxin lebontására, így alkalmazható ilyen módon szennyezett élelmiszerek és takarmányok enzimatisz detoxifikálására. A szerkezet meghatározása lehetővé tette a további dokkolási modellezéseket, amivel közelebb kerültünk az fumonizin észteráz működésének megértéséhez, ami elengedhetetlen a későbbi nagyléptékű ipari felhasználáshoz.

A Biostruct laborból kiindulva Nagy Gergely 2017-től 2022-es visszatéréséig Oxfordban a Division of Structural Biology (STRUBI) intézet Yvonne Jones által vezetett kutatócsoportjában végzett posztdoktori kutatásokat. A szemaforin-plexin extracelluláris jelátvitel szerkezeti biológiáját vizsgálva kutatásai fényt derítettek a ligandum receptor fehérjék egy különleges kölcsönhatási elrendezésére, mely során a két fehérje egyazon sejtmembránon elhelyezkedve lép kölcsönhatásba.⁵⁶ Emellett fehérjekristallográfia révén azonosította a Semaphorin-5A fehérje glükózaminoglikán kötőhelyét, majd együttműködő partnerivel együtt meghatározta a fehérje-proteoglikán kölcsönhatás specifikitását, valamint *in vivo* szerepét a neuronális progenitor sejtek vándorlása során.⁵⁷

Szintén a Biostruct laborból kiindulva Kőhegyi Bianka 2017 januárjában fél évig a fehérjekristallográfia rejtelméről tanult tovább az ESRF (Grenoble, Franciaország) laborjában, majd szeptember végén Cambridge-ben, az MRC LMB, Ingo Greger által vezetett csoportjában kezdte meg doktori tanulmányait. A memória, illetve tanulás folyamatában kulcsfontosságú fehérjék, az AMPA receptorok különböző komplexeit vizsgálta krio-elektronmikroszkóppal. Többek között sikeresen megfejtette a hippokampusz egyik jellemző komplexének nyitott és deszenzitizált állapotban úgynevezett single particle elemzés technika alkalmazásával.⁵⁸

7. Krio-EM centrum Pécsen

Az utóbbi évtizedekben a Krio-elektronmikroszkópia forradalmasította a szerkezeti biológiát: lehetőséget nyújt olyan kérdések megválaszolására, melyek korábban elképzelhetetlennek tűntek. Ennek megfelelően 2022 decemberében megszületett az a döntés, hogy Magyarországon is szükséges egy 300 keV-os krio-elektronmikroszkóp, illetve az ahhoz kapcsolódó infrastruktúra kialakítása Pécsen, mely majd nyitva áll az ország kutatói számára. A projekt vezetője Czéh Boldizsár lett, akinek munkáját a Szakmai Tanácsadó Testületének tagjaként Vértessy Beáta is segítette. A kialakulóban lévő mérőállomáshoz 2025 januárban volt kollégánk, Kőhegyi Bianka csatlakozott első munkatársként. Márciustól pedig Horváth Péter 10 évnyi külföldi krio-elektronmikroszkópos tevékenysége után a létesítmény vezetői tisztségét tölti be. Előreláthatóan 2026-ban érkezik meg a műszer, azonban a központ addig is rendelkezésre áll a technikával és mintaelőkészítéssel kapcsolatos kérdések megválaszolásában.

Köszönetnyilvánítás

Nyíri Kinga köszönettel tartozik a ÚNKP-20-4-II-BME-311, OTKA PD 134324, MEC-R-21-141624 és BME 'Vissza a tudományba' pályázatok által biztosított kutatási támogatásért. A KRAS fehérje inhibitorainak kutatása az NVKP_16-1-2016-0020 projekt keretében történt. A dUT-Páz-Stl krio-elektronmikroszkópiás és SEC-SAXS kísérleteket az iNEXT-Discovery (PID: 19027 ill 1551) támogatta. A közlemény a Bolyai János Kutatási ösztöndíj (NGN) és a Varga József Alapítvány Somogyi Mihály pályázatának támogatásával (NGN) készült. Kőhegyi Bianka köszönettel tartozik a Pécsi Tudományegyetem Szentágotthai János Kutatóközpont Szentágotthai János Tehetségtámogató program, illetve a KrioEM Kompetencia Központ kialakítása a Pécsi Tudományegyetemen című projekt (2022-1.1.1-KK-2022-00001) által nyújtott támogatásért. A C1341189 számú projekt a Kulturális és Innovációs Minisztérium Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Alapból nyújtott támogatásával, a KDP-2021 pályázati program finanszírozásában valósult meg.

Hivatkozások

- Chushkin, Y.; Zontone, F., Prospects for coherent X-ray diffraction imaging at fourth-generation synchrotron sources. *IUCrJ* **2025**, *12* (Pt 3), 280-287. <https://doi.org/10.1107/S2052252525001526>
- Nanao, M.; Basu, S.; Zander, U.; Giraud, T.; Surr, J.; Guijarro, M.; Lentini, M.; Felisaz, F.; Sinoir, J.; Morawe, C.; Vivo, A.; Beteva, A.; Oscarsson, M.; Caserotto, H.; Dobias, F.; Flot, D.; Nurizzo, D.; Giggles, J.; Foos, N.; Siebrecht, R.; Roth, T.; Theveneau, P.; Svensson, O.; Papp, G.; Lavault, B.; Cipriani, F.; Barrett, R.; Clavel, C.; Leonard, G., ID23-2: an automated and high-performance microfoc beamline for macromolecular crystallography at the ESRF. *J Synchrotron Radiat* **2022**, *29* (Pt 2), 581-590. <https://doi.org/10.1107/S1600577522000984>
- Wojdyla, J. A.; Panepucci, E.; Martiel, I.; Ebner, S.; Huang, C. Y.; Caffrey, M.; Bunk, O.; Wang, M., Fast two-dimensional grid and transmission X-ray microscopy scanning methods for visualizing and characterizing protein crystals. *J Appl Crystallogr* **2016**, *49* (Pt 3), 944-952. <https://doi.org/10.1107/S1600576716006233>
- Afonine, P. V.; Poon, B. K.; Read, R. J.; Sobolev, O. V.; Terwilliger, T. C.; Urzhumtsev, A.; Adams, P. D., Real-space refinement in PHENIX for cryo-EM and crystallography. *Acta Crystallogr D Struct Biol* **2018**, *74* (Pt 6), 531-544. <https://doi.org/10.1107/S2059798318006551>
- Terwilliger, T. C.; Afonine, P. V.; Liebschner, D.; Croll, T. I.; McCoy, A. J.; Oeffner, R. D.; Williams, C. J.; Poon, B. K.; Richardson, J. S.; Read, R. J.; Adams, P. D., Accelerating crystal structure determination with iterative AlphaFold prediction. *Acta Crystallogr D Struct Biol* **2023**, *79* (Pt 3), 234-244. <https://doi.org/10.1107/S205979832300102X>
- Agirre, J.; Atanasova, M.; Bagdonas, H.; Ballard, C. B.; Basle, A.; Beilsten-Edmands, J.; Borges, R. J.; Brown, D. G.; Burgos-Marmol, J. J.; Berrisford, J. M.; Bond, P. S.; Caballero, I.; Catapano, L.; Chojnowski, G.; Cook, A. G.; Cowtan, K. D.; Croll, T. I.; Debreczeni, J. E.; Devenish, N. E.; Dodson, E. J.; Drevo, T. R.; Emsley, P.; Evans, G.; Evans, P. R.; Fando, M.; Foadi, J.; Fuentes-Montero, L.; Garman, E. F.; Gerstel, M.; Gildea, R. J.; Hatti, K.; Hekkelman, M. L.; Heuser, P.; Hoh, S. W.; Hough, M. A.; Jenkins, H. T.; Jimenez, E.; Joosten, R. P.; Keegan, R. M.; Keep, N.; Krissinel, E. B.; Kolenko, P.; Kovalevskiy, O.; Lamzin, V. S.; Lawson, D. M.; Lebedev, A. A.; Leslie, A. G. W.; Lohkamp, B.; Long, F.; Maly, M.; McCoy, A. J.; McNicholas, S. J.; Medina, A.; Millan, C.; Murray, J. W.; Murshudov, G. N.; Nicholls, R. A.; Noble, M. E. M.; Oeffner, R.; Pannu, N. S.; Parkhurst, J. M.; Pearce, N.; Pereira, J.; Perrakis, A.; Powell, H. R.; Read, R. J.; Rigden, D. J.; Rochira, W.; Sammito, M.; Sanchez Rodriguez, F.; Sheldrick, G. M.; Shelley, K. L.; Simkovic, F.; Simpkin, A. J.; Skubak, P.; Sobolev, E.; Steiner, R. A.; Stevenson, K.; Tews, I.; Thomas, J. M. H.; Thorn, A.; Valls, J. T.; Uski, V.; Uson, I.; Vagin, A.; Velankar, S.; Vollmar, M.; Walden, H.; Waterman, D.; Wilson, K. S.; Winn, M. D.; Winter, G.; Wojdyr, M.; Yamashita, K., The CCP4 suite: integrative software for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D Struct Biol* **2023**, *79* (Pt 6), 449-461. <https://doi.org/10.1107/S2059798323003595>
- McMullan, G.; Faruqi, A. R.; Henderson, R., Direct Electron Detectors. *Methods Enzymol* **2016**, *579*, 1-17. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2016.05.056>
- Kuhlbrandt, W., Biochemistry. The resolution revolution. *Science* **2014**, *343* (6178), 1443-4. <https://doi.org/10.1126/science.1251652>
- Stuart, D. I.; Subramaniam, S.; Abrescia, N. G., The democratization of cryo-EM. *Nat Methods* **2016**, *13* (8), 607-8. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3946>
- Kucukoglu, B.; Mohammed, I.; Guerrero-Ferreira, R. C.; Ribet, S. M.; Varnavides, G.; Leidl, M. L.; Lau, K.; Nazarov, S.; Myasnikov, A.; Kube, M.; Radecke, J.; Sachse, C.; Muller-Caspary, K.; Ophus, C.; Stahlberg, H., Low-dose cryo-electron ptychography of proteins at sub-nanometer resolution. *Nat Commun* **2024**, *15* (1), 8062. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-52403-5>
- Caspy, I.; Wang, Z.; Bharat, T. A. M., Structural biology inside multicellular specimens using electron cryotomography. *Q Rev Biophys* **2025**, *58*, e6. <https://doi.org/10.1017/S0033583525000010>
- Jumper, J.; Evans, R.; Pritzel, A.; Green, T.; Figurnov, M.; Ronneberger, O.; Tunyasuvunakool, K.; Bates, R.; Zidek, A.; Potapenko, A.; Bridgland, A.; Meyer, C.; Kohl, S. A. A.; Ballard, A. J.; Cowie, A.; Romera-Paredes, B.; Nikolov, S.; Jain, R.; Adler, J.; Back, T.; Petersen, S.; Reiman, D.; Clancy, E.; Zielinski, M.; Steinegger, M.; Pacholska, M.; Berghammer, T.; Bodenstein, S.; Silver, D.; Vinyals, O.; Senior, A. W.; Kavukcuoglu, K.; Kohli, P.; Hassabis, D., Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* **2021**, *596* (7873), 583-589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Varadi, M.; Bertoni, D.; Magana, P.; Paramval, U.; Pidruchna, I.; Radhakrishnan, M.; Tsenkov, M.; Nair, S.; Mirdita, M.; Yeo, J.; Kovalevskiy, O.; Tunyasuvunakool, K.; Laydon, A.; Zidek, A.; Tomlinson, H.; Hariharan, D.; Abrahamson, J.; Green, T.; Jumper, J.; Birney, E.; Steinegger, M.; Hassabis, D.; Velankar, S., AlphaFold Protein Structure Database in 2024: providing structure coverage for over 214 million protein sequences. *Nucleic Acids Res* **2024**, *52* (D1), D368-D375. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad1011>
- Nyíri, K.; Leveles, I.; Nagy, G. N.; Vértessy, G. B., Szerkezeti biológiai kutatások röntgenkristallográfiái alapokon a BME VBK ABÉT Biostruct laboratóriumban. *Magyar Kémiai Folyóirat* **2018**, *124* (3), 121-126. <https://doi.org/10.24100/MKF.2018.03.121>
- Vertessy, B. G.; Toth, J., Keeping uracil out of DNA: physiological role, structure and catalytic mechanism of dUTPases. *Acc Chem Res* **2009**, *42* (1), 97-106. <https://doi.org/10.1021/ar800114w>
- Szabo, J. E.; Takacs, E.; Merenyi, G.; Vertessy, B. G.; Toth, J., Trading in cooperativity for specificity to maintain uracil-free DNA. *Sci Rep* **2016**, *6*, 24219. <https://doi.org/10.1038/srep24219>
- Muha, V.; Horvath, A.; Bekesi, A.; Pukancsik, M.; Hodoscsek, B.; Merenyi, G.; Rona, G.; Batki, J.; Kiss, I.; Jankovics, F.; Vilmos, P.; Erdelyi, M.; Vertessy, B. G., Uracil-containing DNA in Drosophila: stability, stage-specific accumulation, and developmental involvement. *PLoS Genet* **2012**, *8* (6), e1002738. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002738>
- Palinkas, H. L.; Racz, G. A.; Gal, Z.; Hoffmann, O. I.; Tihanyi, G.; Rona, G.; Gocsa, E.; Hiripi, L.; Vertessy, B. G., CRISPR/Cas9-Mediated Knock-Out of dUTPase in Mice Leads to Early Embryonic Lethality. *Biomolecules* **2019**, *9* (4). <https://doi.org/10.3390/biom9040136>
- Dengg, M.; Garcia-Muse, T.; Gill, S. G.; Ashcroft, N.; Boulton, S. J.; Nilsen, H., Abrogation of the CLK-2 checkpoint leads to tolerance to base-excision repair intermediates. *EMBO Rep* **2006**, *7* (10), 1046-51. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400782>

20. Alam, M. S.; Moriyama, H.; Matsumoto, M., Inhibition of Dr-dut gene causes DNA damage in planarian. *Mol Reprod Dev* **2018**, *85* (3), 188-196.
<https://doi.org/10.1002/mrd.22952>
21. Dos Santos, R. S.; Daures, M.; Philippi, A.; Romero, S.; Marselli, L.; Marchetti, P.; Senee, V.; Bacq, D.; Besse, C.; Baz, B.; Marroqui, L.; Ivanoff, S.; Masliah-Planchon, J.; Nicolino, M.; Soulier, J.; Socie, G.; Eizirik, D. L.; Gautier, J. F.; Julier, C., dUTPase (DUT) Is Mutated in a Novel Monogenic Syndrome With Diabetes and Bone Marrow Failure. *Diabetes* **2017**, *66* (4), 1086-1096.
<https://doi.org/10.2337/db16-0839>
22. Szabo, J. E.; Nyiri, K.; Andrasi, D.; Matejka, J.; Ozohanics, O.; Vertessy, B., Redox status of cysteines does not alter functional properties of human dUTPase but the Y54C mutation involved in monogenic diabetes decreases protein stability. *Sci Rep* **2021**, *11* (1), 19197.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-98790-3>
23. Fang, M.; Yang, S.; Liu, R.; Wu, X.; Jiang, L.; Yang, J.; Liu, X.; Wang, G.; Mu, C.; Wang, X., DUT (p. Y116C)-Mutation-Induced Thrombocytopenia in Rabbits. *International Journal of Molecular Sciences* **2025**, *26* (9), 4169.
<https://doi.org/10.3390/ijms26094169>
24. Nyiri, K.; Vertessy, B. G., Perturbation of genome integrity to fight pathogenic microorganisms. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* **2017**, *1861* (1 Pt B), 3593-3612.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.05.024>
25. Tormo-Mas, M. A.; Mir, I.; Shrestha, A.; Tallent, S. M.; Campoy, S.; Lasa, I.; Barbe, J.; Novick, R. P.; Christie, G. E.; Penades, J. R., Moonlighting bacteriophage proteins derepress staphylococcal pathogenicity islands. *Nature* **2010**, *465* (7299), 779-82.
<https://doi.org/10.1038/nature09065>
26. Leveles, I.; Nemeth, V.; Szabo, J. E.; Harmat, V.; Nyiri, K.; Bendes, A. A.; Papp-Kadar, V.; Zagyva, I.; Rona, G.; Ozohanics, O.; Vekey, K.; Toth, J.; Vertessy, B. G., Structure and enzymatic mechanism of a moonlighting dUTPase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2013**, *69* (Pt 12), 2298-308.
<https://doi.org/10.1107/S0907444913021136>
27. Nyiri, K.; Papp-Kádár, V.; Szabó, J. E.; Németh, V.; Vertessy, B. G., Exploring the role of the phage-specific insert of bacteriophage Φ11 dUTPase. *Structural Chemistry* **2015**, *26*, 1425-1432.
<https://doi.org/10.1007/s11224-015-0652-2>
28. Szabo, J. E.; Nemeth, V.; Papp-Kadar, V.; Nyiri, K.; Leveles, I.; Bendes, A. A.; Zagyva, I.; Rona, G.; Palinkas, H. L.; Besztercei, B.; Ozohanics, O.; Vekey, K.; Liliom, K.; Toth, J.; Vertessy, B. G., Highly potent dUTPase inhibition by a bacterial repressor protein reveals a novel mechanism for gene expression control. *Nucleic Acids Res* **2014**, *42* (19), 11912-20.
<https://doi.org/10.1093/nar/gku882>
29. Hirmondo, R.; Szabo, J. E.; Nyiri, K.; Tarjanyi, S.; Dobrotka, P.; Toth, J.; Vertessy, B. G., Cross-species inhibition of dUTPase via the Staphylococcal Stl protein perturbs dNTP pool and colony formation in Mycobacterium. *DNA Repair (Amst)* **2015**, *30*, 21-7.
<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.03.005>
30. Benedek, A.; Poloskei, I.; Ozohanics, O.; Vekey, K.; Vertessy, B. G., The Stl repressor from Staphylococcus aureus is an efficient inhibitor of the eukaryotic fruitfly dUTPase. *FEBS Open Bio* **2018**, *8* (2), 158-167.
<https://doi.org/10.1002/2211-5463.12302>
31. Benedek, A.; Temesvary-Kis, F.; Khatanbaatar, T.; Leveles, I.; Suranyi, E. V.; Szabo, J. E.; Wunderlich, L.; Vertessy, B. G., The Role of a Key Amino Acid Position in Species-Specific Proteinaceous dUTPase Inhibition. *Biomolecules* **2019**, *9* (6).
<https://doi.org/10.3390/biom9060221>
32. Nyiri, K.; Mertens, H. D. T.; Tihanyi, B.; Nagy, G. N.; Kohegyi, B.; Matejka, J.; Harris, M. J.; Szabo, J. E.; Papp-Kadar, V.; Nemeth-Pongracz, V.; Ozohanics, O.; Vekey, K.; Svergun, D. I.; Borysik, A. J.; Vertessy, B. G., Structural model of human dUTPase in complex with a novel proteinaceous inhibitor. *Sci Rep* **2018**, *8* (1), 4326.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-22145-8>
33. Lopata, A.; Leveles, I.; Bendes, A. A.; Viskolcz, B.; Vertessy, B. G.; Jojart, B.; Toth, J., A Hidden Active Site in the Potential Drug Target Mycobacterium tuberculosis dUTPase Is Accessible through Small Amplitude Protein Conformational Changes. *J Biol Chem* **2016**, *291* (51), 26320-26331.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M116.734012>
34. Nyiri, K.; Kohegyi, B.; Micsonai, A.; Kardos, J.; Vertessy, B. G., Evidence-Based Structural Model of the Staphylococcal Repressor Protein: Separation of Functions into Different Domains. *PLoS One* **2015**, *10* (9), e0139086.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139086>
35. Nyiri, K.; Harris, M. J.; Matejka, J.; Ozohanics, O.; Vekey, K.; Borysik, A. J.; Vertessy, B. G., HDX and Native Mass Spectrometry Reveals the Different Structural Basis for Interaction of the Staphylococcal Pathogenicity Island Repressor Stl with Dimeric and Trimeric Phage dUTPases. *Biomolecules* **2019**, *9* (9).
<https://doi.org/10.3390/biom9090488>
36. Hill, R. L. L.; Vlach, J.; Parker, L. K.; Christie, G. E.; Saad, J. S.; Dokland, T., Derepression of SaPIbov1 Is Independent of phiNM1 Type 2 dUTPase Activity and Is Inhibited by dUTP and dUMP. *J Mol Biol* **2017**, *429* (10), 1570-1580.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.04.001>
37. Nyiri, K.; Gal, E.; Laczkovich, M.; Vertessy, B. G., Antirepressor specificity is shaped by highly efficient dimerization of the staphylococcal pathogenicity island regulating repressors: Stl repressor dimerization perturbed by dUTPases. *Sci Rep* **2024**, *14* (1), 1953.
<https://doi.org/10.1038/s41598-024-51260-y>
38. Kohegyi, B.; Toth, Z. S.; Gal, E.; Laczkovich, M.; Benedek, A.; Vertessy, B. G.; Nyiri, K., Full-length inhibitor protein is the most effective to perturb human dUTPase activity. *Sci Rep* **2025**, *15* (1), 4836.
<https://doi.org/10.1038/s41598-025-86131-7>
39. Wang, F.; Liu, C.; Wang, C.; Wang, Y.; Zang, K.; Wang, X.; Liu, X.; Li, S.; Li, F.; Ma, Q., Structural basis of staphylococcal Stl inhibition on a eukaryotic dUTPase. *Int J Biol Macromol* **2021**, *184*, 821-830.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.06.107>
40. Sanz-Frasquet, C.; Ciges-Tomas, J. R.; Alite, C.; Penades, J. R.; Marina, A., The Bacteriophage-Phage-Inducible Chromosomal Island Arms Race Designs an Interkingdom Inhibitor of dUTPases. *Microbiol Spectr* **2023**, *11* (1), e0323222.
<https://doi.org/10.1128/spectrum.03232-22>
41. Ciges-Tomas, J. R.; Alite, C.; Humphrey, S.; Donderis, J.; Bowring, J.; Salvatella, X.; Penades, J. R.; Marina, A., The structure of a polygamous repressor reveals how phage-inducible chromosomal islands spread in nature. *Nat Commun* **2019**, *10* (1), 3676.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-11504-2>

42. Toth, Z. S.; Leveles, I.; Nyiri, K.; Nagy, G. N.; Harmat, V.; Jaroentomeechai, T.; Ozohianics, O.; Miller, R. L.; Alvarez, M. B.; Vertessy, B. G.; Benedek, A., The homodimerization domain of the Stl repressor is crucial for efficient inhibition of mycobacterial dUTPase. *Sci Rep* **2024**, *14* (1), 27171. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-76349-2>
43. Kari, G.; Rodeck, U.; Dicker, A. P., Zebrafish: an emerging model system for human disease and drug discovery. *Clin Pharmacol Ther* **2007**, *82* (1), 70-80. <https://doi.org/10.1038/sj.clpt.6100223>
44. Howe, K.; Clark, M. D.; Torroja, C. F.; Torrance, J.; Berthelot, C.; Muffato, M.; Collins, J. E.; Humphray, S.; McLaren, K.; Matthews, L.; McLaren, S.; Sealy, I.; Caccamo, M.; Churcher, C.; Scott, C.; Barrett, J. C.; Koch, R.; Rauch, G. J.; White, S.; Chow, W.; Kilian, B.; Quintais, L. T.; Guerra-Assuncao, J. A.; Zhou, Y.; Gu, Y.; Yen, J.; Vogel, J. H.; Eyre, T.; Redmond, S.; Banerjee, R.; Chi, J.; Fu, B.; Langley, E.; Maguire, S. F.; Laird, G. K.; Lloyd, D.; Kenyon, E.; Donaldson, S.; Sehra, H.; Almeida-King, J.; Loveland, J.; Trevanion, S.; Jones, M.; Quail, M.; Willey, D.; Hunt, A.; Burton, J.; Sims, S.; McLay, K.; Plumb, B.; Davis, J.; Clee, C.; Oliver, K.; Clark, R.; Riddle, C.; Elliot, D.; Threadgold, G.; Harden, G.; Ware, D.; Begum, S.; Mortimore, B.; Kerry, G.; Heath, P.; Phillimore, B.; Tracey, A.; Corby, N.; Dunn, M.; Johnson, C.; Wood, J.; Clark, S.; Pelan, S.; Griffiths, G.; Smith, M.; Glithero, R.; Howden, P.; Barker, N.; Lloyd, C.; Stevens, C.; Harley, J.; Holt, K.; Panagiotidis, G.; Lovell, J.; Beasley, H.; Henderson, C.; Gordon, D.; Auger, K.; Wright, D.; Collins, J.; Raisen, C.; Dyer, L.; Leung, K.; Robertson, L.; Ambridge, K.; Leongamornlert, D.; McGuire, S.; Gilderthorp, R.; Griffiths, C.; Manthavadi, D.; Nichol, S.; Barker, G.; Whitehead, S.; Kay, M.; Brown, J.; Murnane, C.; Gray, E.; Humphries, M.; Sycamore, N.; Barker, D.; Saunders, D.; Wallis, J.; Babbage, A.; Hammond, S.; Mashregi-Mohammadi, M.; Barr, L.; Martin, S.; Wray, P.; Ellington, A.; Matthews, N.; Ellwood, M.; Woodmansey, R.; Clark, G.; Cooper, J.; Tromans, A.; Grafham, D.; Skuce, C.; Pandian, R.; Andrews, R.; Harrison, E.; Kimberley, A.; Garnett, J.; Fosker, N.; Hall, R.; Garner, P.; Kelly, D.; Bird, C.; Palmer, S.; Gehring, I.; Berger, A.; Dooley, C. M.; Ersan-Urun, Z.; Eser, C.; Geiger, H.; Geisler, M.; Karotki, L.; Kirn, A.; Konantz, J.; Konantz, M.; Oberlander, M.; Rudolph-Geiger, S.; Teucke, M.; Lanz, C.; Raddatz, G.; Osoegawa, K.; Zhu, B.; Rapp, A.; Widaa, S.; Langford, C.; Yang, F.; Schuster, S. C.; Carter, N. P.; Harrow, J.; Ning, Z.; Herrero, J.; Searle, S. M.; Enright, A.; Geisler, R.; Plasterk, R. H.; Lee, C.; Westerfield, M.; de Jong, P. J.; Zon, L. I.; Postlethwait, J. H.; Nusslein-Volhard, R.; Hubbard, T. J.; Roest Crollius, H.; Rogers, J.; Stemple, D. L., The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* **2013**, *496* (7446), 498-503. <https://doi.org/10.1038/nature12111>
45. Gutierrez-Lovera, C.; Vazquez-Rios, A. J.; Guerra-Varela, J.; Sanchez, L.; de la Fuente, M., The Potential of Zebrafish as a Model Organism for Improving the Translation of Genetic Anticancer Nanomedicines. *Genes (Basel)* **2017**, *8* (12). <https://doi.org/10.3390/genes8120349>
46. Nyiri, K.; Koppány, G.; Palfy, G.; Vida, I.; Toth, S.; Orgovan, Z.; Radelovic, I.; Baranyi, M.; Molnar, E.; Keseru, M. G.; Tovari, J.; Perczel, A.; Vertessy, B. G.; Timar, J., [Allele-specific inhibitors of mutant KRAS are in the focus of RASopathy consortium]. *Magy Onkol* **2019**, *63* (4), 310-323.
47. Orgovan, Z.; Peczka, N.; Petri, L.; Abranyi-Balogh, P.; Radelovic, I.; Toth, S.; Szakacs, G.; Nyiri, K.; Vertessy, B.; Palfy, G.; Vida, I.; Perczel, A.; Tovari, J.; Keseru, M., Covalent fragment mapping of KRas(G12C) revealed novel chemotypes with in vivo potency. *Eur J Med Chem* **2023**, *250*, 115212. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115212>
48. Radelovic, I.; Nyiri, K.; Koppány, G.; Baranyi, M.; Tovari, J.; Kigyos, A.; Timar, J.; Vertessy, B. G.; Grolmusz, V., Gluing GAP to RAS Mutants: A New Approach to an Old Problem in Cancer Drug Development. *Int J Mol Sci* **2024**, *25* (5). <https://doi.org/10.3390/ijms25052572>
49. Berta, D.; Gehrke, S.; Nyiri, K.; Vertessy, B. G.; Rosta, E., Mechanism-Based Redesign of GAP to Activate Oncogenic Ras. *J Am Chem Soc* **2023**, *145* (37), 20302-20310. <https://doi.org/10.1021/jacs.3c04330>
50. Szabó-Szentjóni, H.; Majoros, I.; Márton, A.; Leveles, I.; Vertessy, B. G.; Dékány, M.; Tóth, T.; Huszthy, P., Synthesis of New Chiral Crown Ethers Containing Phosphine or Secondary Phosphine Oxide Units. *Synthesis* **2020**, *52* (19), 2870-2882. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1707854>
51. Pál, D.; Baranyai, P.; Leveles, I.; Vertessy, B. G.; Huszthy, P.; Móczár, I., An Acridone-Based Fluorescent Chemosensor for Cationic and Anionic Species, and Its Application for Molecular Logic Operations. *ChemistrySelect* **2019**, *4* (40), 11936-11943. <https://doi.org/10.1002/slct.201903483>
52. Németh, T.; Petró, J. L.; Leveles, I.; Tóth, T.; Balogh, G. T.; Vertessy, B. G.; Huszthy, P., Structural characterization of a sodium perchlorate-acridino-18-crown-6 ether complex. *Structural Chemistry* **2018**, *29*, 113-118. <https://doi.org/10.1007/s11224-017-1008-x>
53. Tordai, H.; Leveles, I.; Hegedus, T., Molecular dynamics of the cryo-EM CFTR structure. *Biochem Biophys Res Commun* **2017**, *491* (4), 986-993. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.07.165>
54. Mero, B.; Radnai, L.; Gogl, G.; Toke, O.; Leveles, I.; Koprivanacz, K.; Szeder, B.; Dulk, M.; Kudlik, G.; Vas, V.; Cserkaszky, A.; Sipeki, S.; Nyitray, L.; Vertessy, B. G.; Buday, L., Structural insights into the tyrosine phosphorylation-mediated inhibition of SH3 domain-ligand interactions. *J Biol Chem* **2019**, *294* (12), 4608-4620. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004732>
55. Incze, D. J.; Molnar, Z.; Nagy, G. N.; Leveles, I.; Vertessy, B. G.; Poppe, L.; Bata, Z., Understanding the molecular mechanism of fumonisin esterases by kinetic and structural studies. *Food Chem* **2025**, *473*, 143110. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.143110>
56. Rozbesky, D.; Verhagen, M. G.; Karia, D.; Nagy, G. N.; Alvarez, L.; Robinson, R. A.; Harlos, K.; Padilla-Parra, S.; Pasterkamp, R. J.; Jones, E. Y., Structural basis of semaphorin-plexin cis interaction. *EMBO J* **2020**, *39* (13), e102926. <https://doi.org/10.15252/embj.2019102926>
57. Nagy, G. N.; Zhao, X. F.; Karlsson, R.; Wang, K.; Duman, R.; Harlos, K.; El Omari, K.; Wagner, A.; Clausen, H.; Miller, R. L.; Giger, R. J.; Jones, E. Y., Structure and function of Semaphorin-5A glycosaminoglycan interactions. *Nat Commun* **2024**, *15* (1), 2723. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-46725-7>
58. Herguedas, B.; Kohegyi, B. K.; Dohrke, J. N.; Watson, J. F.; Zhang, D.; Ho, H.; Shaikh, S. A.; Lape, R.; Krieger, J. M.; Greger, I. H., Mechanisms underlying TARP modulation of the GluA1/2-gamma8 AMPA receptor. *Nat Commun* **2022**, *13* (1), 734. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28404-7>

Structural biology studies in the BME ABÉT Biostruct Laboratory

Over the past decade, structural biology has undergone remarkable technological and methodological advances, greatly enhancing our understanding of macromolecular structures and their roles in cellular processes. This review summarizes major developments in experimental and computational structural biology techniques, including X-ray crystallography, cryogenic electron microscopy (cryo-EM), and AI-based structure prediction methods such as AlphaFold. X-ray crystallography, though long established, continues to play a key role in high-resolution structure determination due to improvements in synchrotron radiation sources, hybrid pixel detectors, and automation. Meanwhile, cryo-EM has achieved near-atomic resolution and has become widely accessible, revolutionizing the study of complex biological systems and *in situ* structures through cryo-electron tomography. Complementing experimental approaches, AlphaFold has dramatically advanced the accuracy and accessibility of structure prediction, offering over 200 million models that support biomedical research and hypothesis generation. Using these advanced tools, the Genome Metabolism and Biostruct group at Budapest University

of Technology and Economics has explored the structural basis of dUTPase inhibition, a key enzyme that prevents uracil incorporation into DNA by hydrolyzing dUTP nucleotides. We characterized the interaction of dUTPase enzyme with its unique protein inhibitor, Stl, from bacteriophage $\phi 11$, identifying distinct structural elements involved in competitive inhibition across different species, including human and *Mycobacterium tuberculosis*. We probed to enhance Stl inhibition of human dUTPase via rational mutagenesis; however, the structural flexibility of Stl limited the feasibility of this approach. Further investigations involved cryo-EM and HDX-MS analyses, revealing the modular binding modes of Stl to trimeric and dimeric dUTPases. Additionally, structural and physiological studies in zebrafish embryos demonstrated the critical role of dUTPase in early development, highlighting conserved enzymatic mechanisms across species. These multidisciplinary studies emphasize the power of integrated structural biology in understanding enzyme regulation, host-pathogen interactions, and potential therapeutic interventions.