

OTKA zárójelentés

Előzmények

A most zárult projektet eddigi első OTKA pályázatom finanszírozta. A pályázatot három évvel azután nyertem el, hogy hazatértem amerikai posztdoktori tanulmányutamról. Ez az OTKA támogatás tette lehetővé, hogy önálló kutatócsoportot, saját labort alapítsak. A pályázatíráskor a projekt egyik célja az volt, hogy meghonosítsam az irányított fehérjeevolúció szemléletét és technológiáját Magyarországon. Ezzel a rendkívül izgalmas megközelítéssel, és annak legsikeresebb eljárásával, a fág bemutatással az Amerikai Egyesült Államokban ismerkedtem meg, amikor az egyik legkiemelkedőbb biotechnológiai cég, a Genentech Fehérjemérnöki Intézetében dolgoztam posztdoktorként. Ez a cég konkrét gyógyszerfejlesztési projektjei mellett, azokat megalapozó, komoly alap kutatásokat is folytat.

Az a részleg, ahol magam is dolgoztam, azt tűzte ki célul, hogy az amúgy inkább praktikus célokra használt irányított fehérjeevolúciós arzenált alkalmassá tegye alap kutatási kérdések megválaszolására. Ehhez a kutatási irányhoz csatlakoztam. Modellként az emberi növekedési hormon (hGH) és a hGH receptor kölcsönhatása szolgált. A rendkívül sikeres kutatási időszak végére öt rangos közleményben igazoltuk, hogy irányított fehérjeevolúcióval sikeresen feltárható az egyes oldalláncok fehérje-fehérje kölcsönhatásban játszott energetikai szerepe, sőt azt is, hogy az egyes oldalláncok energetikailag kapcsoltak-e. A kutatási eredmények csúcspontjaként kidolgoztunk egy olyan eljárást, amivel a hGH receptor-kötő felszínén elhelyezkedő mind a 35 aminosav pozícióról meg tudtuk állapítani, hogy a 20 természetes aminosav közül az adott pozíció melyiket milyen mértékben preferálja. Kísérletesen igazoltuk, hogy ez alapján megbízható kvantitatív jóslást tehetünk bármelyik egyedi aminosav csere receptor-kötésre gyakorolt hatására.

Kiutazásom előtt doktori kutatásaimat Gráf László professzor témavezetésével folytattam. A témakör a szerin proteázok és a szubsztrátszerű, reverzibilis szerin proteáz inhibitorok kölcsönhatása volt. A vizsgálatok a klasszikus fehérjemérnöki megközelítés alapján zajlottak. Irányított mutagenézissel létrehozott egyedi aminosav cserék hatásaiból igyekeztünk megérteni a vad típusú fehérjék közötti kölcsönhatás molekuláris részleteit. Ennek során kutatócsoportunk számos sikert ért el. Ugyanakkor azt is megtapasztaltam, hogy bizonyos tudományos problémák makacsul ellenállnak a megoldási kísérleteknek, rendre megválaszolatlanul maradnak.

Ilyen volt például annak megértése, hogy két, azonos családba tartozó, látszólag azonos térszerkezetű kis fehérje inhibitor, az SGPI (*Schistocerca gregaria* protease inhibitor) családba tartozó SGCI és SGTI miért viselkedik rendkívül eltérően. Az egyik emlősök és gerinctelenek tripszinét egyaránt jól gátolja, a másik azonban csak gerinctelenek tripszinét gátolja, emlősökét nem. Ezt a jelenséget taxon-specifitásnak neveztük el. Az inhibitor ismert kölcsönhatási hurok szegmensének egyedi mutációival nem sikerült a taxon-specifitás okait feltárni.

Ezzel kapcsolatban, általánosságban is kijelenthető, hogy a klasszikus fehérjemérnöki megközelítés igen kis hatékonyságú akkor, amikor egy új fehérje-fehérje kölcsönhatást kellene létrehozni. A

lehetséges mutációk és mutáció kombinációk száma ugyanis csillagászati, de annak a valószínűsége, hogy az adott változtatás a kívánt irányba vezet, igen kicsi.

Éppen az ilyen problémák kibogozásában hoz nagy előrelépést az irányított fehérjeevolúció, amelynek során párhuzamosan milliárdnyi, de általunk megszabott fehérjevariánst tesztelünk egy előre meghatározott, szelektálható tulajdonság meglétére. A „győztesek” szekvenciáinak összehasonlító analízisével rajzolódik ki az, hogy pontosan mi is kell az adott funkció ellátásához. Eközben természetesen új, a természetből nem ismert kölcsönhatásokat is kifejleszthetünk.

Túl azon, hogy meghonosítsam a fehérjeevolúciót idehaza, első OTKA projektem egyik alapkutatási célja az volt, hogy megfejtsem a taxon-specifitás okát, és megválaszoljak számos, a proteáz inhibitorokkal kapcsolatos kérdést. Annak érdekében, hogy a szubsztrátszerű reverzibilis szerin proteáz inhibitorok körében általános törvényszerűségeket tárhassunk fel, 3 eltérő evolúciós eredetű és vázszerkezetű inhibitort vontam be a vizsgálatokba. A 14 aminosavas SFTI (Sunflower Trypsin Inhibitor), a 35 aminosavas SGPI és a 142 aminosavas homodimer Ecotin (E. coli trypsin inhibitor) szolgáltak modellként.

Azt is célként tűztam ki, hogy inhibitorokat fejlesszek olyan érdekes humán proteázok ellen, amelyeknek nincs ismert szelektív gátlószerük. Egy ilyen cél elérése számos új lehetőséggel kecsegtet. Az új inhibitor proteázzal alkotott komplexének kristályszerkezete megmutathatja, hogyan ismeri fel szelektíven az adott proteáz a szubsztrátjait. Az újfajta inhibitor ezen felül nagyban elősegítheti annak tisztázását, hogy a proteáz pontosan milyen szerepet tölt be egy-egy élettani vagy patológiás folyamatban. A szokásos modellként szolgáló hasnyálmirigy proteázokon (tripszin, kimotripszin, elasztáz) felül ezért bevontam a vizsgálatokba az agyban is kifejeződő humán tripszint (IV-es izoforma) és a komplement rendszer lektin útjának kulcs enzimét a MASP-2 (mannán-asszociált szerin proteáz-2) enzimet.

Eredmények

1. Taxon-specifitás.

A taxon-specifitás témakörében elkészítettük az SGTI/SGCI inhibitorok összes kiméráját. A kiméra könyvtárát fágon fejeztünk ki, és szelektáltuk emlős és ízeltlábú eredetű tripszineken. Ennek eredményeként sikerült fényt deríteni a taxon-specifitás okára, amely a molekula hidrofób magjának egy felszíni, prolin-tartalmú kanyarral kialakított funkcionális kapcsolatában rejlik. A természetben előforduló mag / kanyar kombináció nem engedi meg az emlős tripszin gátlását. Ezt egyedi mutánsokon végzett inhibíciós mérésekkel igazoltuk. A proteáz inhibitoroknál ilyen funkcionális kapcsolatot még soha nem írtak le. Kutatásunk átértékelte a reverzibilis inhibitorok működésére vonatkozó ez idáig elfogadott, túlegyszerűsített képet. Eredményeink 2007-ben a J. Mol. Biol. folyóiratban közzéttek. Ezek az eredmények adták Szenthe Borbála sikeresen megvédett PhD disszertációjának gerincét.

2. Egy finomított szerin proteáz katalízis modell megalkotása

A fent említett szelekciós kísérletek eredménye alapján tervezett SGTI variáns tripszinnel alkotott térszerkezetét a Götebörgi Egyetem Kémiai Intézetében Katona Gergely oldotta meg rendkívül nagy, atomi (0,8 Angström) felbontásban. Ilyen felbontásban már „láthatóvá” váltak a hidrogénatomok is. Ennek segítségével sikerült kimutatni, hogy a tripszin katalitikus triádjában szereplő Asp102 oldallánc karboxil csoportja a szubsztrátszerű komplexben protonált, míg a His57 oldallánc semleges, tehát nincs rajta extra proton. Ez egy eddig nem detektált átmeneti állapotot jelent a katalízis folyamatában. A jelenlegi modell szerint a katalízis során az Asp102 folyamatosan deprotonált, tehát negatív töltésű. Ez a negatív töltés az, amely növeli a His57 bázikusságát, ami miatt a His57 könnyebben protonálódik. A modell szerint a His57 pozitívan töltött állapotát a negatív Asp102 stabilizálja. Míg ez utóbbi kijelentést magunk is elfogadjuk, azt állítjuk, hogy valójában nincs olyan állapot, amelyben a His57 semleges, miközben az Asp102 negatívan töltött. Finomított modellünk szerint, amikor egy nagy szubsztrát, mint amilyen egy szubsztrátszerű fehérje inhibitor, elzárja az oldószerből a katalitikus triádot, az Asp102 protonálódik egy konzervált pozícióban lévő szerkezeti víz által, így mind az Asp102, mind a His57 semleges állapotban van. Amikor a His57 protont von el a Ser195 oldallánctól, ezzel összehangolt módon az Asp102 leadja a protonját a szerkezeti víznek, és a semleges-semleges állapotból kialakul a jól ismert negatív-pozitív töltésmintázat. Ezt az eredményt 2011-ben közzétettük a J. Biol. Chem. lapban.

3. Új fehérjejelölési séma kidolgozása

A projektbe NMR alapú vizsgálatokkal Gáspári Zoltán és Perczel András is bekapcsolódott az ELTE Kémiai Intézete részéről. Mivel terveink között szerepelt pozíció-szelektíven izotópjelölt variánsok NMR-es vizsgálata is, ezért kidolgoztuk egy merőben új jelölési eljárás sémáját. Ezt a BioEssays folyóiratban 2008-ban közzétettük.

4. Bioinformatikai fejlesztések

Az evolúciós kísérletekből származó nagyszámú szekvencia gyors osztályozásának igénye miatt kidolgoztunk egy nukleinsav szekvenciák osztályozására használható eljárást, amelyet a Nucleic Acid Research folyóiratban 2007-ben publikáltunk. Ennek továbbfejlesztett változatát 2012-ben közzétettük a DNA Research lapban. Ezekre az eredményekre támaszkodik Szenes Áron idén megvédendő, már beadott PhD disszertációja.

6. Optimális szubsztrát versus optimális inhibitor

A szubsztrátszerű proteáz inhibitorokkal kapcsolatos, széles körben elfogadott nézet az, hogy a proteáz ugyanazt a szekvenciát preferálja az inhibitor proteázköti hurok régióján, mint egy optimális szubsztrát esetében. A modell szerint az inhibitor azért nem tökéletes szubsztrát, mert az inhibitor

hurok viszonylag merev szerkezete miatt a hasadt forma is ugyanolyan jól kötődik az enzimhez, mint az intakt forma.

Az SGCI molekulából kiindulva feltérképeztük a proteázkötő hurok eltérő enzimekkel szemben mutatott preferenciáját. A hasadó kötés mindkét oldalán három-három pozícióban megengedtük mind a húszt lehetséges aminosav előfordulását. A könyvtárat hasnyálmirigy modell enzimeken, tripszinen, kimotripszinen és elasztázon szelektáltuk, és minden enzimre meghatároztuk a szelekció eredményeként kialakuló szekvencia mintázatot illetve a konszenzus szekvenciát.

Az eredmények alapján biztos állítható, hogy az optimális szubsztrátszerű inhibitor szekvenciája lényegesen eltér az irodalomban korábban közölt optimális szubsztrát szekvenciáktól. A fő kémiai jellegek minden pozícióban visszaköszönnek ugyan, de a konkrét aminosavak preferencia sorrendje eltérő. Ez fontos eredmény abban a tekintetben, hogy eszerint egy optimális inhibitor szekvenciájából kiindulva nem feltétlenül jósolható meg az optimális (illetve természetes) szubsztrát szekvenciája, és fordítva, az optimális szubsztrát szekvencia inhibitor hurokba építése nem feltétlenül eredményez optimális inhibítort.

Ahhoz, hogy általánosítható következtetéseket vonjunk le ebben a tekintetben, még számos kísérletet szeretnénk elvégezni, ezért ezeket az eredményeket egyelőre még nem publikáltuk.

7. Humán enzimek elleni inhibitor fejlesztés

7.1 Agyi tripszin elleni inhibitorok keresése.

Az inhibitor-rezisztensként ismert humán agyi tripszinnel szemben elkezdtek az SFTI és SGPI alapú inhibitorok fejlesztését. Ebben a proteázban a tripszinekre jellemző Gly193-at egy Arg csoport helyettesíti. Modellezések szerint az Arg193 ütközik az inhibitorok P2' csoportjával. Elhatároztuk, hogy irányított evolúcióval derítjük ki, vajon létrehozható-e egy, az ütközést elkerülő agyi tripszin-inhibitor. Feltételeztük, hogy a megoldást részben egy P2' Gly variáns jelentheti. A kísérletek megmutatták, hogy az SFTI ill. SGPI vázak nem tolerálják a P2' pozícióban a glicin jelenlétét. Ennek oka vélhetően a glicin nagy konformációs szabadsága miatt megnövekedett dinamika, ami csökkentheti az inhibitor stabilitását. Mivel úgy véltem, hogy ez a projekt más, érdekesebb projektek előtt venne el erőforrásokat, ezt a vonalat nem folytattuk. Helyette egy olyan enzimmel kezdtünk el foglalkozni, ami korábban nem szerepelt a terveinkben (lásd alább).

7.2 Kimotripszin C inhibitorok fejlesztése

Sahin-Tóth Miklós (Boston University) kutatásainak nyomán fény derült arra, hogy létezik egy eddig szinte ismeretlen humán pankreatikus proteáz, amely – mint kiderült –, egyfajta karmesterként vezényli számos hasnyálmirigy proteáz felaktiválódásának ütemét, illetve a fő tripszin izoforma esetén azt is, hogy az milyen ütemben bomoljon le az alsóbb béltraktusokban. A patkóbélben, ahol magas a kalcium koncentráció, a kimotripszin C többszörösére gyorsítja a legnagyobb mennyiségben jelenlévő

humán kationos tripszin önaktiválódásának ütemét azáltal, hogy a tripszinogénről eltávolít egy tripszin általi hasíthatóságot akadályozó rövid peptid szakaszt. Mivel a kationos tripszin számos más hasnyálmirigy proenzim aktivátora, ezért a kimotripszin C közvetve számos más enzimre is hat. A kimotripszin C közvetlen hasítással is gyorsítja a karboxipeptidáz A izoformák tripszin általi aktiválását. Szintén *in vitro* vizsgálatok valószínűsítik, hogy a kimotripszin C az alsóbb béltraktusokban, ahol a kalcium szint alacsony, egy merőben eltérő aktivitást fejt ki: gyorsítja a kationos tripszin önemésztését. Alacsony kalcium szint esetén a kimotripszin C egy meghatározott helyen, a kalciumot elvesztett kalciumkötő hurokban képes hasítani a tripszint, ami egy további, immár tripszin általi hasítással kombinálódva a tripszin inaktiválódásához vezet.

Mivel a kimotripszin C enzimnek sem volt ismert szelektív inhibitora, elhatároztam, hogy megpróbálkozunk egy ilyen kifejlesztésével. Komoly eredményünk, hogy SGPI könyvtárból kiindulva sikerült rendkívül hatékony, roppant szelektív kimotripszin C inhibitorokat evolválunk.

SGPI alapon a kölcsönható hurok evolválásával olyan variánsokat szelektáltunk, amelyek nagyságrendekkel hatékonyabban gátolták a kimotripszin C enzimet, mint bármely más kimotripszin-szerű proteázt. A szelekció eredményeként evolválódó kötőhurok szekvencia mintázat kirajzolta, hogy milyen kölcsönható peptideket preferál a kimotripszin C szubsztrátkötő apparátusa.

A (kimo)tripszinszerű proteázok körében szokatlan módon ez az enzim elsősorban nem a hasítandó peptidkötéstől N-terminális irányba eső P1 oldallánc jellege, hanem az attól 2 illetve 4 pozícióval a C-terminus irányába eső P2' illetve P4' csoport jellege alapján válogatja szubsztrátjait. Ezt a szokatlan preferenciát térszerkezeti modellel is alá tudtuk támasztani.

Tehát egyrészt feltártuk a kimotripszin C kötőfelszín specifikitást meghatározó fontos sajátosságait, másrészt lehetővé tettük, hogy a kimotripszin C szerepét *in vivo* körülmények között is vizsgálni lehessen. Mivel a hasnyáiban még legalább ötféle kimotripszin illetve elasztáz jellegű enzim is működik, csak egy szelektív inhibitorral lehet igazolni, hogy az említett aktivitásokért *in vivo* kizárólag a kimotripszin C a felelős.

Eredményeinket 2011-ben közzétettük a J. Biol. Chem. folyóiratban.

7.3 MASP inhibitorok fejlesztése

Ez a projektrész átvezet a komplement rendszer kutatásának a területére. A komplement rendszer 3 eltérő útvonalon keresztül aktiválódhat. Ezek közül az egyik a lektin út. Ez az útvonal ellenanyag független, ezért azonnali védelmet biztosít számos kórokozó mikroba ellen, és véd saját veszélyesen megváltozott sejteink ellen is. A megtámadandó sejteken ősi molekuláris mintázatokat ismer fel ez az útvonal bizonyos felismerő fehérjék, pl. mannán-kötő lektin (MBL) és fikolinok által. Ezekhez a fehérjékhez több doménes szerin proteázok, MASP-ok (MBL asszociált szerin proteázok) kapcsolódnak. A felismerés során bekövetkező konformáció változás eredményeként a zimogén állapotú MASP-ok részlegesen aktív állapotba kerülnek, és – egy korábban nem ismert sorrendben kaszkádszerűen aktiválják egymást.

Mivel a komplement rendszer három párhuzamos proteáz kaszkád által aktiválódik, amelyek közös végső termékekhez vezetnek, mindig felmerül, hogy egy-egy folyamatban az egyes útvonalak mekkora szereppel bírnak. Ennek feltárására ideális megközelítés a tökéletesen szelektív inhibitorok használata. Sajnos egyetlen komplement proteáznak, így a MASP enzimeknek sincs természetből ismert szelektív inhibitora. Ilyen nélkül nem csak az egyes útvonalak pontos szerepét nehéz feltárni, de az adott útvonalon belül működő egyes proteázok pontos szerepe is nehezen felderíthető.

A projekt célja ezért az volt, hogy szelektív lektin út gátlókat hozzunk létre. A lektin úton két MASP enzimnek volt beazonosítható aktiváló szerepe. A MASP-1 enzimet egyfajta segédenzimnek, tehát mellékszereplőnek írták le, míg a MASP-2 enzimet az aktiválódás autonóm, tehát kulcsszereplőjének. Mivel szeretnénk volna kideríteni az egyes enzimek pontos szerepét, igyekeztünk MASP-1 és MASP-2 ellen is specifikus inhibitorokat fejleszteni. A vérben számos rokon tripszinszerű enzim működik, és egyfajta dogma volt a területen, hogy ezek aktív helyét támadva nem lehet szelektív inhibitorokhoz jutni. Nagyobb esélyt jósoltak olyan inhibitoroknak, amelyek az aktív helytől eltérő külsőbb részeket (exosite) támadják.

7.3.1. Naiv peptid könyvtárak

A fenti gondolatmenetet elfogadva, mintegy másfél éven keresztül próbáltunk úgynevezett naiv peptid-fág könyvtárakkal eredményre jutni. Az ilyen könyvtárak sem teljesen random eleműek, de minimális prekonceptióval kerülnek megtervezésre, tehát elvileg bármilyen kötődésre alkalmas helyet feltárhatalnak a célmolekulán.

Ezek a kísérletek kudarcot vallottak, feltételezhetően azért, mert rendre nem-specifikus, hidrofób jellegű kötőmolekulákhoz jutottunk. Ezért az említett dogma ellenére elkezdtük a szubsztrátkötő árok támadását szubsztrátszerű inhibitor vázakon létrehozott könyvtárakkal.

7.3.2. SFTI-alapú könyvtár

Mivel a MASP-2 enzimről az üres proteáz térszerkezete lapján tudtuk, hogy a kötőárka részlegesen blokkolt felszíni hurkok által, ezért a természetből ismert legkisebb tripszin inhibitor, SFTI molekulával kezdtünk.

A szelekciókat MASP-1 és MASP-2 célenzimeken végeztük el. A „minimál-váz” SFTI molekulából kiindulva sikerült tökéletesen szelektív MASP-2 inhibitor (SFMI-2) fejlesztenünk. A MASP-1 enzim ellen fejlesztett inhibitor (SFMI-1) ugyanakkor – jóllehet kisebb affinitással –, de a MASP-2 enzimet is gátolta. Mindkét inhibitor tökéletesen útvonal-szelektív módon kizárólag a lektin út aktivációt gátolta, a komplement rendszer többi ágára nem hatott. Így létrehoztuk az első lektin út szelektív gátlószereket. Érdekes megfigyelésünk volt, hogy a MASP-2 enzimet szerényebben gátló SFMI-1 molekula hatékonyabb lektin út inhibitor, mint a nagyobb affinitású, MASP-2 szelektív SFMI-2. Ezek alapján jóslást tettünk arra nézve, hogy a MASP-1 enzimnek fontosabb szerepe van, mint azt korábban

gondolták. Ezeket az eredményeket 2010-ben a Journal of Immunology lapban közzöltük. Ez az eredmény fontos részévé vált Kocsis Andrea doktori disszertációjának, amit idén védett meg.

Időközben ismertté vált, hogy a lektin út fontos szerepet játszik a szívinfarktus és szélütést követő, gyulladásos jellegű szövetpusztulásban. Ennek tulajdonítható, hogy ezen eredmények alapján 2010-ben elnyertem a sanofi-aventis által alapított, az MTA szakértői által odaítélt Magyar Kutatási Díjat. Az eredményeket szabadalmaztattuk.

7.3.3. SGPI-alapú könyvtár

Mivel a MASP-1 pontos szerepe továbbra is rejtélyes maradt, elhatároztuk, hogy MASP-1 ellen is fejlesztünk szelektív inhibitorot. Az SFTI szelekciók eredményéből világossá vált, hogy azon a molekulán melyek azok a pozíciók, (pl. a P1') amik nem fejleszthetők szelektív módon. Ezért olyan vázhoz fordultunk, amelyről tudtuk, hogy ezen pozíciója szabadon variálható. Az SGPI vázon létrehozott könyvtárat ismét MASP-1 és MASP-2 célnzimeken szelektáltuk. Sikerült olyan variánsokat evolválunk mindkét enzim esetében, amelyek nagyobb affinitással, kötődtek, mint az SFMI peptidek. Ennél fontosabb, hogy a MASP-2 mellett immár sikerült a MASP-1 ellen is szelektív inhibitorot létrehozunk.

8. A lektin út aktiválódási modell korrigálása, új terápiás lehetőség szívinfarktus és szélütés kezelésére

Mind a MASP-2 ellen fejlesztett SGMI-2, mind a MASP-1 elleni SGMI-1 tökéletesen szelektív módon gátolta a lektin út aktivációt. Arra a meglepő eredményre jutottunk tehát, hogy nem csak a MASP-2 kulcsenzim, a MASP-1 is az. Számos kísérlet kombinációjával igazoltuk, hogy normál humán vérben a MASP-1 a MASP-2 zimogén kizárólagos aktivátora.

Ez azért volt megdöbbentő eredmény, mert a MASP-2 enzimről *in vitro* kísérletek és MASP-1 génkiütött egerekkel folytatott kísérletek alapján tudvalevő volt, hogy képes önaktiválódni. Mi azt kaptuk, hogy a MASP-1 *in situ* gátlása esetén a MASP-2 önaktiválódás nem zajlik le, tehát ez az önaktiválódás valójában nem fiziológias folyamat. Csak akkor jelentkezik, ha a MASP-1 enzimet teljes egészében eltávolítják a vérből.

Mindezek alapján korrigáltuk a lektin út aktiválódás eddig hibás modelljét. Magyarázatunk viszonylag egyszerű. Normál humán vérből kiindulva a megtámadott sejteken a lektin út aktiválódása során a molekulák elrendeződése olyan, hogy a MASP-2 zimogéneket MASP-1 zimogének veszik körül. Miután a MASP-1 zimogének aktiválták egymást, az aktív MASP-1 enzimek aktiválják a MASP-2 zimogéneket is. Amennyiben a MASP-1 enzimeket *in situ* gátoljuk, a MASP-2 zimogének aktiválása természetesen elmarad.

Amennyiben azonban a MASP-1 komponens nincs jelen (lásd génkiütött állatok), a MASP-2 zimogének betöltik a MASP-1 komponensek helyét, így a MASP-2 zimogéneket immár MASP-2 molekulák veszik majd körül. Így manifestálódhat az *in vitro* kimutatható MASP-2 önaktiválódás képessége. Ezeket az eredményeket idén közzöltük a PNAS folyóiratban.

Sikerült megfejtenünk a MASP-2/SGMI-2 és a MASP-1/SGMI-1 komplexek kristályszerkezetét is, ami feltárta a molekuláris felismerés részleteit. Ez utóbbi eredményeket szintén idén közzétettük a J. Biol. Chem. lapban. Ezek az eredmények alkotják Héja Dávid már beadott, idén védendő doktori disszertációjának alapját.

A potenciális terápiás lehetősége miatt az SGMI molekulákkal kapcsolatos eredményeket is szabadalmaztattuk, mielőtt publikáltuk volna. Ezzel kapcsolatban 2012-ben elnyertem az ELTE Innovatív Kutatója díjat.

Kutatásaimat 2008-tól Bolyai János Kutatási Ösztöndíj is támogatta. A zárójelentésem alapján a projektem kiemelkedő minősítést kapott, és 2012-ben Bolyai-plakett kitüntetésben részesültem.

9. Új eredmények az Ecotin inhibitorral

Szakács Dávid – korábban szakdolgozatos-, immár doktoranduszhallgatóm- munkája nyomán sikerült létrehozunk egy nagyhatékonyságú fág bemutató rendszert, ami az ismert legnagyobb hatékonyságú kanonikus szerin proteáz inhibitor, a homodimer ecotint egyláncú formában fejezi ki fág-felületén. A rendszer lényeges eleme, hogy a két (korábbi) protomert kódoló génszakasz szekvenciája csendes mutációkkal olyan mértékben lett megváltoztatva, hogy az inhibitor egymásnak megfelelő analóg pozíciói immár egymástól függetlenül módosíthatóak, evolválhatóak. A két analóg proteázköti kanonikus hurok közül az egyiket pontmutációval inaktiváltuk, és egyelőre kimotripszin esetében igazoltuk, hogy a másik kanonikus hurok sikeresen evolválható. A kísérletek azt is demonstrálták, hogy az így kapott hurok szekvencia mintázat lényegesen eltér attól, amit az SGPI vázszerkezeten korábban kaptunk.

A jelenleg elfogadott Laskowski-féle modellel ellentétben az optimális inhibitor hurok szekvencia tehát függ az inhibitor vázszerkezetétől. Szakács Dávid ezzel az eredménnyel mind az egyetemi, mind pedig az országos TDK konferencián első helyezést ért el a Biokémia szekcióban, és Pro Scientia Aranyéremmel is kitüntették.

10. Lineáris epitópok fejlesztése

A projekt folyamán létrehozott fág bemutató rendszerek lehetővé tették azt is, hogy az eredetileg kitűzött, és már teljesített célokon felül egyéb problémák felé is nyissunk. Elhatároztam, hogy lineáris epitópot evolválunk egy fontos intracelluláris csomóponti fehérje, a DYNLL ellen.

A projekt sikereként feltártuk a DYNLL optimális kötőmotívumát, és a humán proteóm alapján nagyszámú potenciális DYNLL kötőpartnert azonosítottunk.

Bár ez az eredmény egy másik OTKA pályázatunkhoz szorosabban kapcsolódik, létrehozását a vektorok kifejlesztése miatt ez a projekt is támogatta, ezért az ezzel kapcsolatos két közleményben ezt az OTKA projektet is feltüntettük a támogatók között. Ezek a közlemények 2011-ben jelentek meg a PLoS One, illetve a FEBS J. lapokban.

Összefoglalás

Úgy vélem, hogy a fenti beszámoló alapján első OTKA pályázatom, illetve az általa finanszírozott projekt sikeresnek mondható.

Létrehoztam egy önálló kutatócsoportot, meghonosítottam egy új kutatási szemléletet, az irányított fehérjeevolúciót, és bevezettem ennek metodikai arzenálját.

Olyan fehérjemérnöki problémákat oldottunk meg, amelyeknél a klasszikus megközelítések korábban kudarcot vallottak.

Számos új ismeretet szereztünk a reverzibilis proteáz inhibitorok szerkezet-funkció összefüggéseiről.

Új ismereteket szereztünk a szerin proteáz katalízis finom részleteivel kapcsolatban.

Feltártuk egy rejtélyes enzim, a kimotripszin C szubsztrát-felismerésének fő szerkezeti alapjait.

A MASP enzimek elleni gátlószerek fejlesztésével létrehoztuk az első lektin út szelektív inhibitorokat, amivel új terápiás lehetőségeket nyitottunk.

Feltártuk, hogy a lektin út aktiválódás modellje eddig hibás volt, és korrigáltuk azt.

A proteázok és inhibitoraik körén túl egyéb fontos fehérje-fehérje kölcsönhatás molekuláris részleteit is sikerrel feltártuk.

A kísérletek bioinformatikai fejlesztéseket is inspiráltak.

A projekttel kapcsolatban 11 nemzetközi folyóirat cikket közzeltünk, amelyek kumulatív impakt faktora 59,2. Ezen felül született egy nemzetközi könyvfejezet, és három szabadalmi bejelentés is.

A kutatásban eddig hat doktoranduszhallgató vett részt. Közülük Szenthe Borbála és Kocsis Andrea már megvédte disszertációját. Héja Dávid és Szenes Áron már beadták dolgozatukat, idén védenek. Rapali Péter idén adja be dolgozatát.

A kutatásokkal kapcsolatos eredmények számos rangos díjhoz is vezettek. A saját három, már említett díjam mellett had foglaljam össze hallgatóim eredményeit is. A munkákból több mint tíz kari illetve országos TDK dolgozat született, és ezek egytől egyig díjazottak lettek. A díjak között három kari, és egy országos első helyezés is van.

A munkákból három esetben nyerték el diákjaim, Kocsis Andrea, Rapali Péter és Héja Dávid nemzetközi konferenciákon a legjobb poszter díját.

Szakács Dávid doktori hallgatómat Pro Scientia Aranyéremmel tüntették ki.

Mindezen eredmények nem jöhettek volna létre az OTKA támogatása nélkül, amelyért hálás vagyok.

Pál Gábor

Budapest, 2012. augusztus 31.