

Fehérjetudomány és alkalmazásai Nemzeti Program - HunProtExc

2018-1.2.1-NKP-2018-00005

ELTE beszámoló

2021.03.30.

1. eredmény megnevezése

A munkaszakasz során sikeresen előállítunk rekombináns fehérjéket és fehérjekomplexeket különböző rendszerekben. Vizsgálatuk változatos módszerekkel folyik. Néhány esetben expressziós problémák miatt módosítani kellett az előállítási rendszereket (például a szerkezeti vizsgálatokra komplement proteáz esetében – sikeresen). A humán PIWIL4-gyel funkcionális eredmények születtek. WNT és miosztatin projekt során az NMR vizsgálatokhoz elkészültek a megfelelő rekombináns fehérjék. Az S100 fehérjecsalád komplexeinek vizsgálata két új röntgenszerkezet eredményezett, s eljutottak a szinkrotron-adatgyűjtésig az első SNARE-komplexek is. Sikerült egy új fehérjekristályosító „chaperon” rendszert létrehozni és az eredményeket publikálni. Az S100 család kölcsönhatási hálózatának tanulmányozása két új publikáció született. A károsodott DNS transléziós szintézise kapcsán elért eredmények szintén publikálásra kerültek. Ütemesen haladt a tumorminták foszfo proteom vizsgálata, ahol egy újabb dúsítási eljárást sikerült beállítani.

Az oktatásfejlesztés területén a Biotechnológia mesterképzésben az oktatás részévé vált a Rekombináns fehérjék 2 gyakorlati kurzus. A projekt részét képező kurzusok többségéhez video anyagok készültek.

2. eredmény leírása

A munkaszakasz során a legtöbb részprojekt során eljutottunk a tervezett vizsgálatokhoz szükséges fehérjék, fehérjekomplexek, mérőrendszerek, kísérleti körülmények optimalizálásához. Elkészült, bár az eredeti tervhez képes módosított rekombináns komplementer fehérjék szerkezeti vizsgálatokhoz. Ugyanez igaz a megfelelő WIF-doménekre, SNARE komplexekre is. Miosztatingátló peptidok elkészültek NMR vizsgálatok céljára. Két S100 fehérjekomplex kristályszerkezetét sikerült megoldanunk. Az alapkutatói projektek természeténél fogva néhány esetben módosítani kellett az eredeti terveinket, de gyakorlatilag minden projekt esetében értünk el eredményeket, sőt több publikáció is született már ezek alapján. A szerkezetvizsgálati témák kapcsán az NMR spektroszkópiai mérésekhez szükséges rekombináns fehérjék, izotópjelölt formában elkészültek. A röntgenkristallográfiai munkák két S100-komplex esetében atomi felbontású szerkezeteket eredményeztek. Publikált eredmények születtek többek-között a DNS transléziós szintézisével kapcsolatban, valamint a kiterjedt S100 fehérjecsalád interakciós hálózatának vizsgálatáról. Az előbbi projektben új módszerek beállítása történt a transléziós DNS-szintézis sejtes vizsgálatára, míg az utóbbinál finomításra került a család specifikus térképe. Fontos eredményünk, hogy egy, a reményeink szerint szélesebb körben is felhasználható „segédfehérjét” állítottunk csatasorba a fehérjekristályosítások megkönnyítésére. A PIWI témánál új funkcionális vizsgálati eredmények születtek.

Az ELTE-BME Biotechnológus mesterképzés során fontos eredmény, hogy a projekt keretében kialakított új tárgytematika az oktatás részévé vált, az „emelt szintű” Rekombináns fehérjék gyakorlati kurzus néven. A projektben felsorolt tárgyak előadásaihoz videoanyagok készültek, amelyeket a hallgatók számára hozzáférhetővé tettük. A Biotechnológia oktatási anyagok karcsúsításához” szükséges információt gyűjtöttünk.

3. eredmény nem számszerűsíthető, egyéb tulajdonságai

A munkaszakaszban elért részeredmények felsorolása: A komplementer-fehérje projekt célja az első teljes hosszúságú komplement proteáz röntgenszerkezet meghatározása. Mivel a MASP-2 előállítás alacsony hatékonysággal ment, C1s proteázra váltottunk. Ezt nagy mennyiségben, tiszta és aktív formában izoláltuk. Az ecotin M84R mutánsa egyaránt 100 nanomólos körüli egyensúlyi állandóval gátolta a teljes hosszúságú dimer C1s-t és annak katalitikusan aktív monomer fragmentumát. A teljes hosszúságú C1s és az ecotin komplexek tulajdonságainak vizsgálata folyamatban van.

A PIWI-fehérje projekt során a humán PIWIL4 fehérje szerepét elsősorban placenta sejtekben vizsgáltuk. A transzkripciós szabályozáshoz kapcsolódóan feltártuk az RNS interferencia egy másik kulcsfehérjéjének, a Drosha-nak a szerepét miRNS klaszterek transzkripciós regulációjában. Megvizsgáltuk a PIWI deficiencia hatását egy *Drosophila* tumormodellben; a fehérje hiánya szuppresszálta az *UAS-yki^{CA}* overexpresszáló állatok pusztulását. *C. elegans*-ban igazoltuk a Piwi szomatikus expressziójának élettartam növelő hatását.

A DNS transléziós projekt során ultraibolya fototermékeket tartalmazó DNS plazmidok replikációját vizsgáltuk különféle sejtizátumokban. Az esszé a nukleotidkivágó hibajavítás vizsgálatára is alkalmas. Megmutattuk, hogy humán citoszol képes a ciklobutil pirimidin dimer fototerméken transléziós szintézist végezni, melyhez az élő sejtekhez hasonlóan a PCNA fehérje ubikvitilációja szükséges. Különféle interferencia kísérletekkel módosítani tudtuk a replikáció hatékonyságát. Eredményeinket a FEBS Open Bio folyóiratban publikáltuk.

Az S100 fehérjék specifikitási térképét egy HTP „holdup” módszerrel és egy foldamer könyvtár segítségével további finomítottuk. Bizonyítottuk, hogy a foldamer könyvtár használata általánosan, más, nehezen „megcélozható” fehérje-fehérje kölcsönhatási felszínnek tanulmányozására is igen alkalmas. A S100 komplexek atomi felbontású szerkezetvizsgálat eredményt hozott az S100A4-p53 és az S100A6-p53 komplex esetén. Az új kötőpartnerek keresése „pulldown” módszerekkel és MS analízissel tovább folyik.

A WNT paralóg témában a sikeresen előállított és refoldált WIF-domén HEK 293 sejtekben végzett TCF/LEF reporter assay vizsgálatokban aktívnak bizonyult. Kidolgoztuk és optimalizáltuk az egér L-sejtekben előállított rekombináns Wnt3a fehérje tisztítására szolgáló módszert, hogy NMR spektroszkópiával vizsgálhassuk a WIF domén-Wnt kölcsönhatást. A Wnt5a feltételezett WIF-kötőhelyeit hordozó fragmentumok előállítására is tettünk kísérleteket: egy nagyobb, N-terminális oldali fragmentumot, illetve egy kisebb, C-terminális oldali peptidet expresszáltattunk bakteriális rendszerben.

A tumorminták foszfoproteom vizsgálata során a korábban legígéretesebbnek tűnő citromsavas foszfopeptid dúsító módszer további optimalizálásával 9-szeresére növeltük a dúsítás hatékonyságát 250 ng HeLa sejtizátum vizsgálata során. Igazoltuk, hogy ez a módszer nagyobb kiindulási mintamennyiségek esetén (40 µg-ig) is kiválóan alkalmazható. A dúsítást megelőző sómentesítési lépés során fellépő veszteségek csökkentésére módosítottuk a csoportban alkalmazott protokollt. A fejlesztett módszereket tüdő-, emlő- és prosztatadaganatos szöveteken alkalmaztuk, melynek mérése és kiértékelése jelenleg is zajlik.

A miosztatin-antagonista-fejlesztő projektben a korábban miosztatin-gátló hatást mutató peptidből kiindulva racionális tervezéssel kíséreltük meg a miosztatint jobban gátló peptidok előállítását. CD mérések szerint az aminosav cserék a peptidok helikális hajlamát növelik, de génexpressziós reporter rendszerben nem gátolták jobban a miosztatint, ezért molekuláris dinamikai szimulációk segítségével terveztünk újabb peptidokat. A miosztatin és a peptidok közötti kölcsönhatás NMR spektroszkópiai jellemzéséhez izotóppal jelölt fehérjéket állítunk elő.

Az elmúlt évben sikerült előállítanunk az autofág és krinofág vezikulafúziós fehérjék SNARE doménjeit (*Drosophila* Syx17/Syx13, SNAP29, Vamp7/Ykt6) fehérjekristályosításhoz megfelelő mennyiségben és

tisztaságban. Ezt követően az egyes SNARE-komplexek 3-3 tagját összekevertük és szűrtük különböző kristályosító körülmények alkalmazásával. Jelenleg a szűrés pozitív találatait optimalizáljuk Röntgenkristallográfiás méréshez megfelelő egykristályok előállítására.

A nehezen kristályosítható fehérjék kristályosodási hajlamának növelésére olyan kristályosító chaperon rendszert terveztünk, amelyek jól kristályosodó, a kristályokban más fehérjék számára alkalmas üreget képező fehérje használatán (annexin 2, ANXA2); vagy specifikus fehérje/fehérje kölcsönhatásokon alapulnak (dinein könnyűlánc 1 (DYNLL)/EML3). Összehasonlító vizsgálatokban bizonyítottuk, hogy az ANXA2 kristályosító chaperonként változatos fehérjékkel alkalmazható, a leggyakrabban alkalmazott MBP-nél jobb hatékonysággal; eredményeinket a Structure folyóiratban publikáltuk. A DYNLL/EML3 rendszer teszteléshez előállított, az EML3-t a kristályosítandó fehérjéhez egy linkerrel kötött címkeként tartalmazó 8-féle fehérjekonstrukcióval vizsgáljuk, az EML a peptid helyzetének, a linker hosszának és a célfehérje méretének (célfehérjék: MBP és PDZ domén) hatását a kristályosodási hajlamra. A kristályosítás első eredményei szerint a nagyobb méretű fehérje/EML peptid konstrukció rövid linkerrel használva kizáródott a képződő kristályokból, azok csak a DYNLL-t tartalmazták.

4. rövid összefoglaló

Sikeresen és ütemesen halad a legtöbb tematikus és dedikált műszer résztéma kutatása. Néhány problémás esetet leszámítva a szerkezeti/funkcionális vizsgálatokhoz szükséges fehérjék, fehérjekomplexek elkészültek. Több sikeres szerkezetvizsgálati módszer már eredményeket is szolgáltatott. Fontos eredmény, hogy kidolgoztunk egy reményeink szerint széles körben használható Fehérjekristályosító „chaperon” rendszert. Több témában már tudományos publikáció is született rangos folyóiratokban (Structure, FEBS J, FEBS Open Bio). Az oktatásfejlesztés terén gyakorlati átültetésre került egy új tárgytematika és számos videoanyag készült el a munkaszakasz során.