

# Fehérjetudomány és alkalmazásai Nemzeti Program - HunProtExc

**2018-1.2.1-NKP-2018-00005**

**ELTE beszámoló**

**2020.03.30.**

## **1. eredmény megnevezése**

Megkezdődött az összes tervezett kutatómunka, amely nagyobb része fehérjék és fehérjekomplex előállítását jelenti rekombináns DNS módszerekkel, megfelelő expressziós rendszereket felhasználásával (néhány példa: komplement rendszer fehérjék, SNAR-SANP autofágiás komplexek, kristályosítási chaperon kimé-re-fehérjék, S100 fehérjék és komplexeik). Az első év a rekombináns fehérjetermelés beállításával, az expressziók optimalizálásával, a fehérjetisztítások kidolgozásával telt. Néhány esetben már elkezdődött ezekkel a mintákkal a tervezett szerkezet-funkció és szerkezetvizsgálat is, egyes esetekben kristályosítási és NMR spektroszkópiai kísérletek is. Szintén ütemezetten halad a fehérjék hordozására alkalmas hiperelágazásos polimerek előállítása, szerkezeti jellemzés is. Az eddigi eredményekből már megjelentek tudományos publikációk is.

A Biotechnológus MSc képzés gyógyszer-biotechnológia specializációval, együttműködésben a BME-VBK-val elindult, az ehhez tervezett néhány oktatási anyag már kipróbálásra is került. A képzéshez tervezett további oktatási anyagok pontos felmérése elindult és folyamatban van. Időközben az ELTE TTK jelentős oktatási reformba kezdett, aminek a megvalósításában jelen projekt keretében konkrét – kidolgozás alatt álló – segítséget tudunk nyújtani elektronikus oktatási anyagok kidolgozásával.

## **2. eredmény leírása**

A projekt szakmai vállalásai kapcsán a kutatási projektek esetében az első évben elsősorban a tanulmányozandó fehérjék, fehérjekomplexek, ligandumok, további makromolekulák előállítása, azok optimalizálása és a tervezett mérésekhez történő előkészítése történt meg. A különböző mérés technikákat alkalmazó projektek esetében ezek beállítása, optimalizálása ütemesen folyik. Már néhány mérés is elkezdődött, miként fehérjék és fehérjekomplexek kristályosítása, egyes minták NMR spektrumainak felvétele, egyes fehérjeminták ellenőrző tömegmérésén túl fehérjekomplexeket tartalmazó minták tömegspektrometriai analízise, valamint egyes molekuladinamikai számítások. Az oktatási segédanyag vállalások terén még csak az előkészítő fázisnál tartunk. Mivel időközben az ELTE Természettudományi kara irányelveket fogalmazott meg az egyes szakok oktatási anyagainak a kor igényeihez történő átalakítása érdekében, ezért a projekt keretében megvalósítandó elektronikus tankönyvek fejlesztését ehhez fogjuk igazítani. Ezzel együtt több oktatási tananyag már olyan fázisban van, hogy részben-egészben kipróbálásra is került, elsősorban a Biotechnológus mesterképzésben. Az infrastruktúrális beszerzések az ELTE nehézkes közbeszerzési eljárása miatt még nem realizálódtak. A közbeszerzésbe bekerült műszer- és eszközlistát úgy állítottuk össze, hogy az

alkalmas lesz az oktatási, kutatási és szolgáltatási céljaink megvalósítására, ami elsősorban egy csúcstechnológiára épülő bioreaktoros bakteriális expressziós laboratórium kiépítését jelenti, valamint egy fehérje-preparációs laboratórium továbbfejlesztését jelenti. A műszerek elhelyezéséhez szükséges helyiségek kialakítása részben már megtörtént, részben még folyamatban van.

### **3. eredmény nem számszerűsíthető, egyéb tulajdonságai**

Az eddig elért részeredmények felsorolása: Az alfa-SNAP fehérjével kapcsolatos munka során, *Drosophila* modellrendszeren funkcióvesztéses kísérleteinkben az Ykt6 R-SNARE fehérje szükségesnek bizonyult a membránfúziós lépéshez a korábban leírt Vamp7 R-SNARE-hez hasonlóan. Pull-down vizsgálataink alapján vélhetően a Syx13 és SNAP29 ismert krinofág Q-SNARE fehérjékkel való kölcsönhatása révén. Az R-SNARE tartalmú SNARE komplexek szerkezetvizsgálata kapcsán sikerült előállítani a tervezett fehérje-krisztallográfiai munkához az R-SNARE komplex összes komponensét, s megkezdtük az első kristályosítási próbálkozásokat. Az S100 fehérjecsalád specifikitása és interakció vizsgálatát során a részleges partnerek ismeretében elkészült és publikálásra került (Simon et al, FEBS J 2020) az első specifikitástérkép, az interakció vizsgálat pull-down kísérleteknél tart, s elvégeztük az első MS méréseket. A kristályosítási chaperon projekt első sikeres fejezete lezárult, az ANXA2 fehérjéről bizonyítottuk, hogy kiméra konstrukciókban alkalmas kristályosítási segédfehérje (Ecsédi et al, Structure, publikálás alatt). Az EML3 kiméra konstrukciók rekombináns fehérjeként történő előállítása halad, kristályosításuk a közeljövőben indul. A Piwi fehérjét vizsgáló projekt során az expresszázó *C. elegans* modell funkcionálisan tesztelése és a humán őssejtek Piwi expressziós mintázatának vizsgálata folyik. A tumorminták foszfoproteom vizsgálata kapcsán a mennyiségű komplex minták (pl. sejtlizátumok, szövetmetszetek) vizsgálatára alkalmas foszfopeptid dúsítási módszerek fejlesztésében és optimalálásában vannak eredmények. Tapasztalataink alapján a foszfopeptidek megkötésének hatékonysága és a normál peptidekkel való nem specifikus kölcsönhatások jelentős mértékben függenek a felviteli oldószer pH-jától és leszorító-agens tartalmától. A legígéretesebb módszer (TiO<sub>2</sub> SPE, 50 mM citromsav, 1,5% TFA) alkalmazásával 250 ng HeLa sejtlizátum foszfopeptidjeinek jelentős dúsulását sikerült elérnünk és a módszer szöveti biopsziákon való tesztelését tervezzük. A miosztatin antagonisták fejlesztő projektben a promiosztatin térszerkezete alapján szintetizált peptidek csak 20% trifluoretanol jelenlétében vették fel a promiosztatinban mutatott alfa helikális szerkezetet és a három peptidből csak egy gátolta a miosztatin aktivitását. Hatékonyabb miosztatin inhibitorok előállítása érdekében NMR spektroszkópiai mérésekkel jellemezzük a növekedési faktor és miosztatin prodomén fragmentek közötti kölcsönhatást. Ennek érdekében izotóppal jelölt rekombináns fehérjét állítunk elő. A teljes hosszúságú komplement proteáz vizsgálatát célzó projektben a hat doménből álló mozaik fehérje, a MASP-2 szintetikus génjét megterveztük, szintetizáltattuk és eukarióta expressziós rendszerben kifejeztük a teljes hosszúságú molekulát, egyelőre kisebb mennyiségben. Letermeltük az ekotin vad típusú és P1 Arg variánsát a kísérletekhez elegendő mennyiségben és tisztaságban. A kristályosítási kísérletek előkészítés alatt állnak. A hem-enzimek tumorogenezisben betöltött szerepe kapcsán a sejtszintű gázérzékelés megértésének céljából CO, NO és O<sub>2</sub> gázok diffúzióját vizsgáltuk három bakteriális H-NOX fehérje esetében molekuladinamikai számítások segítségével, és elkezdtük a QM/MM számításokat a spin-tiltott kémiai reakció mechanizmusára vonatkozóan. Megállapítottuk a három gáz diffúziós reakciósebességi együtthatóját a három fehérjében, amely O<sub>2</sub>>NO>CO sorrendben csökken, meghatároztuk a diffúziós útvonalakat és a gáztároló zsebeket. Két fő diffúziós útvonalat azonosítottunk, amely

a hemzsebbe vezet, s megmutattuk, hogy különböző zsebek léteznek az egyes gázok tárolására. A WIF1 fehérjét tanulmányozó projektben N15-izotópjelölt WIF-domént baktériális expressziós rendszerben állítottuk elő és meghatároztuk a fehérje HSQC spektrumát. A Wnt3a fehérjét egér L sejtekben állítjuk elő, hogy NMR spektroszkópiai módszerekkel vizsgálhassuk a WIF domén-Wnt kölcsönhatást. Egér L sejtekben koexpresszáljuk a teljes hosszúságú WIF1 és a Wnt3a fehérjéket annak érdekében, hogy krio-elektronmikroszkópiával meghatározhassuk a Wnt3a-WIF1 komplex térszerkezetét. A sérült DNS replikációját tanulmányozó projektben a replikációs termékek szekvenálásával sikerült a lizátumokban aktív transzléziós szintézist, valamint nukleotidkivágó hibajavítást kimutatni. Fúziós fehérjék illetve a kötőhelyeket tartalmazó peptidek hozzáadása segítségével megmutattuk a PCNA fehérje interakcióinak és poszttranszlációs módosításainak szerepét a transzléziós szintézis folyamatában. A fehérje/arany nanokomplexek vizsgálata kapcsán a BSA-Au biokonjugátumok vörös emittanciájával kapcsolatban lévő szerkezeti változásokat kutattuk. Az előállítás paramétereinek a közti és végső formák szerkezetére és morfológiájára gyakorolt hatását fluoreszcencia mérésekkel, infravörös spektroszkópiával, valamint a fehérje alakváltozását szolgáltató kisszögű röntgenszórással tanulmányoztuk. Az antimikrobiális önszerveződő oligopeptidek projektben humán és egyéb organizmusokhoz köthető peptideket állítottunk elő és meghatároztuk a biofizikai és in vitro tulajdonságaikat. A foldamerek beépítésének optimális pozícióját molekuladinamikai szimulációk segítségével határoztuk meg. Ezen számítások alapján tervezzük a további szintéziseket. A tananyag- és tankönyvfejlesztő program kapcsán részben feladatátcsoportosítás várható (az új ELTE TTK oktatási koncepció elemeinek figyelembevételével), de a mérőföldköik történt előrehaladás, így a Krisztallográfia előadás, a Tömegspektrometria kurzus, a Biomanalitika és biospektroszkópia, a Physical Biochemistry kurzusok kidolgozása terén. Az Immun-biotechnológia és Fehérjetisztítási módszerek tárgya segédanyaga már kipróbálásra is került a Biotechnológia mesterképzés keretében.

#### **4. rövid összefoglaló**

A projekt szakmai vállalásai közül az első évben elsősorban a tanulmányozandó fehérjék, fehérjekomplexek, ligandumok, további makromolekulák előállítása, azok optimalizálása és a tervezett mérésekhez történő előkészítése történt meg. A különböző mérés technikákat alkalmazó projektek esetében ezek beállítása, optimalizálása ütemesen folyik. Már néhány mérés is elkezdődött (pl. fehérjekristályosítás, NMR és MS mérések, MD szimulációk). Az oktatási segédanyag vállalások terén még csak az előkészítő fázisnál tartunk. Az infrastruktúrális beszerzések az ELTE nehézkes közbeszerzési eljárása miatt még nem fejeződött be, viszont az ezek befogadására szolgáló műszerlaboratórium kialakítása folyamatban van.