

## **A fehérje-fehérje kölcsönhatás szerkezeti alapjai és biológiai szerepük: multidiszciplináris megközelítés**

### **(zárójelentés)**

Az ELTE Biokémiai Tanszék tudományos kutatásainak tengelyében évtizedek óta a fehérjék szerkezetének, funkciójának és a fehérjék közötti kölcsönhatások szerkezeti hátterének és biológiai jelentőségének felderítése áll. Valamennyi, az elmúlt négyéves pályázati ciklusban vállalt feladatunk teljesítése a fenti célokat szolgálta. A vezető kutató megítélése szerint a pályázat támogatásával elért legkiemelkedőbb eredményeink, a vállalt témák sorrendjében a következők voltak: 1) Megállapítottuk, hogy a primata-specifikus tripszin 4 egyik, feltehetően biológiai szubsztrátja a mielin bázikus fehérje és modellt dolgoztunk ki a humán tripszinogén 4 asztrogliá sejtken belüli transzportjának és aktivációjának követésére 2) Hazánkban elsőként állítottuk be a fágbemutató módszerét, melynek segítségével az eredetitől eltérő specifitású proteáz inhibitorokat állítottunk elő. 3) Megállapítottuk, hogy a miozin II motorfehérje regulációs képességének az az előfeltétele, hogy a proximális kétláncú coiled-coil szerkezet instabil legyen. 4) Felderítettük a miozin II specifikus inhibitorának, a blebbistatinnak a működésmechanizmusát. 5) Kifejlesztettünk egy új tranziens kinetikai módszert, a „temperature-jump/stopped flow”-t a módszer alkalmazásához szükséges berendezéssel együtt.

### **3.1.1 A *Photobacterium* rovarpatogén baktérium Proteáz-A (PrtA) természetes szubsztrátjainak és inhibitorának vizsgálata**

A serralysin-típusú, Zn-metallo-proteázok közé sorolható PrtA proteolitikus rendszerét vizsgáltuk rovarok testfolyadékában, a PrtA szubsztrát (PAS) fehérjéit és a PrtA természetes inhibitorait (PAI). A PrtA-t nagy virulenciájú

rovar patogén baktériumok szekretálják. Tizenhat olyan fehérjét találtunk, melyeket a PrtA szelektíven hasít. Ezek közül kilenc az N-terminálisát határoztuk meg. Hatot adatbázisokból azonosítottunk. Ezek a következők: scolexin A és B, serpin-1, serin proteináz homológ-3 (SPH-3),  $\beta$ 1,3-glükán felismerő fehérje 2, hemocita aggregáció inhibitor protein. Mindegyik működése immunfolyamatokkal kapcsolatos, alátámasztva azt a hipotézisünket, hogy a PrtA résztvehet az immunszuppresszióban. A nem azonosított fehérjék közül kettő N-terminális szekvenciái nagyon hasonlóak egymáshoz. Tekintve, hogy ezek a PAS fehérjék (PAS-90 és -110) bizonyultak a legérzékenyebb PrtA szubsztrátoknak, ezek klónozását kíséreltük meg. Nagyszámú, különböző próbálkozás után beláttuk azonban, hogy a rendelkezésre álló szekvencia információ ehhez nem elegendő. A sikeres klónozáshoz egy belső aminosavszekvenciát is meg kell határoznunk. Ez a munka folyamatban van. A serpin-1 tizenkét variánsa fordul elő a rovarok testfolyadékában. Mindegyiket tisztítottuk a heterológ expressziós rendszerből. Hét olyan variánst találtunk, melyeket a PrtA elhasít. A PrtA proteolitikus rendszert az inhibitorok oldaláról vizsgálva, heterológ expresszióval előállítottuk és tisztítottuk a C-terminálison His-taggal megtöltött, 12 különböző Manduca serpin-1 variánst és megállapítottuk, hogy melyiket hasítja a PrtA. Az egyik PrtA inhibitor (PAI) klónozása arra az egyértelmű eredményre vezetett, hogy PAI egy immunindukálható fehérjével, a lebecinnal áll közeli szerkezeti rokonságban. A PAI heterológ expresszióját ennek az ismeretnek az alapján újra terveztük.

### **3.1.2. A humán 4 tripszin természetes szubsztrátjainak és funkciójának felderítése**

A primata specifikus szerin proteázt, a humán tripszin 4-et munkacsoportunk kónoztta és fejezte ki először heterológ rendszerben. Az aktív enzim kristályszerkezetét is mi határoztuk meg először. A jelen pályázat egyik célkitűzése a humán tripszinogén 4 aktivációjának, az aktivált proteáz természetes szubsztrátjainak a kutatása, és ezzel összefüggésben a biológiai funkció felderítése volt. Az MTA-SE munkacsoportjával kollaborációban *post mortem* humán agymintákban elvégzett *in situ* hibridizációs és immunhisztokémiai festések eredménye azt mutatta, hogy a humán tripszinogén 4 a központi idegrendszerben elsősorban asztroglia sejtekben fejeződik ki. A humán tripszinogén 4 asztroglia sejtekben betöltött szerepének és lehetséges természetes szubsztrátjainak felderítésére ezért egér primer asztroglia sejtek tenyészetét használtuk. A C-terminálison GFP fehérjével kapcsolt, az N-terminálison pedig 28 (B izoforma), illetve 72 aminosavból álló (A izoforma) vezető (leader) peptidszakaszt tartalmazó humán tripszinogén 4 izoformákat újszülött egerek előagyából nyert primer asztroglia sejtekben Lipofectamine 2000 transzfekcióval fejeztettük ki. A GFP jel alapján a glia sejtekben mind az A-, mind B izoforma kifejeződött, de a B izoforma expressziója viszonylagosan alacsony szintű volt. A B izoforma megjelenése mindenesetre jelezte, hogy az izoforma leucint kódoló első kodonja egér asztroglia sejtekben is képes start kodonként funkcionálni. Amikor a B izoforma eredeti, Leu start kodonját ATG kodonra cseréltük, az expresszió mértéke jelentősen növekedett. Ezek az eredmények a korábban az U87 humán glióma sejtvonalban tapasztaltakkal megegyeztek, ezért a további vizsgálatokban a rövidebb, 28 aminosavnyi vezető peptiddel rendelkező B izoforma lokalizációjának vizsgálatokor is az ATG start

kodont tartalmazó konstrukciót használtuk. Az izoformák kifejeződését a GFP jel mikroszkópos detektálása mellett a rövid (p28), illetve a hosszú vezető peptidre (p40) specifikus, a Pécsi Tudományegyetem Immunológiai és Biotechnológiai Intézetében kifejlesztett ellenanyagokkal is ellenőriztük. Immuncitokémiai vizsgálataink alapján a transzfektált sejtekben megfigyelhető GFP jel a p28, illetve a p40 vezető peptid ellen termeltetett ellenanyaggal teljes mértékben átfedett. A hibridóma felülűszók közül kettő a Western blot detektálásra is kiválóan alkalmas volt. Asztroglia sejtekben a két izoforma expressziós mintázata hasonló volt: a citoplazmás GFP jel mellett gyakran tapasztaltunk kisebb-nagyobb, fehérjeaggregátumra emlékeztető struktúrákat is, amelyek gyakran irányítottan, sugár-irányban vagy a membrán közelében helyezkedtek el. Fluoreszcensen jelzett phalloidinnel elvégzett immunfestéseink alapján a GFP-vel jelölt humán tripszinogén 4 izoformák a filamentáris aktin citoskeleton mentén rendeződtek el, a mikrotubuláris hálózattal azonban nem estek egybe. A humán tripszin 4 a központi idegrendszer egyes patológias folyamataiban, így pl. a demielinizáció kialakulásában is valószínűsíthető szerepet játszik. Extracelluláris proteázok aktiválódását más központi idegrendszeri patológias folyamatok (pl. ischemia vagy hipoxia) során is leírták. A humán tripszinogén 4 izoformák patológias folyamatok hatására történő aktivációját egér asztroglia tenyészetekben vizsgáltuk.

A primér asztroglia tenyészeteket GFP-vel fuzionáltatott A- és B izoforma, valamint a vezető peptid nélküli tripszinogén 4 konstrukciókkal transzfektáltuk, majd a transzfekciót követő 23. órában a sejteket 1 órán át hipoxiás körülmények között tartottuk. A tenyészetekben a hipoxiát az ún. oxigén-glükóz depriváció (OGD) kezeléssel értük el: a tenyészetek tápfolyadékát 1 órán át 2mM KCN és 10mM Deoxiglükóz oldatra cseréltük

(pH 7,2 és 300 mOsm; 10 mM Hepes, 145mM NaCl, 3mM KCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM CaCl<sub>2</sub>), majd a kezelést követően a sejteket fixáltuk. A GFP-vel jelzett konstrukciók eloszlását a szokásos immuncitokémiai módszerekkel és Olympus FV500 konfokális mikroszkóppal elemeztük. A OGD kezelésre adott válaszreakciókat „live cell imaging” technikával is megvizsgáltuk, így a folyamatok időbeliségéről is információt kaptunk. „Live cell imaging” vizsgálataink alapján az OGD-kezelést követő 15-20. percben a GFP-vel jelzett A- és B izoforma fluoreszcens jele a plazmamembrán közelében erősen megnövekedett, de a vezető peptid nélküli, GFP-vel kapcsolt tripszinogén formánál ilyen mintázatot nem láttunk. Immuncitokémiai vizsgálataink alapján a plazmamembrán közeli GFP fluoreszcencia a kortikális aktinhálózat mellett volt megfigyelhető. Érdekes módon a humán tripszinogén 4 vezető peptidjeire specifikus ellenanyagokkal (p24, p40) végzett immunfestések OGD kezelés esetén csak rendkívül gyenge plazmamembrán közeli kolokalizációt mutattak. Az eredmények alapján feltételezhető, hogy a plazmamembránhoz transzlokálódó, leader peptidet tartalmazó tripszinogén 4 izoformák vagy aktív tripszinné alakulnak, mely a vezető szekvencia levágódásával jár együtt, vagy az ellenanyagok által detektált epitopok OGD kezelésre elfedődnek. Az utóbbi lehetőség kapcsán elképzelhető, hogy a vezető szekvencia esetleg magába a plazmamembránba ágyazódhat. A kérdés eldöntésére az asztroglia sejteket olyan tripszinogén 4 konstrukcióval transzfektáltuk, amelyben a GFP fehérjét a vezető peptid elé, az N-terminális szakaszhoz fuzionáltuk. Így a tripszinogén aktiválódása, azaz a vezető szekvencia lehasítása a GFP jel lehasításával is együtt jár. Mivel a plazmamembrán-közeli GFP jel az OGD kezelést követően is detektálható volt, valószínűsíthető, hogy a tripszinogén 4 aktivációja a sejten belül nem

következik be, de a fehérje valószínűleg a membránhoz kapcsolódik. A tripszinogén 4 izoformák sejten kívüli aktivációját BZiPAR (rhodamine 110 bis-(CBZ-L-isoleucyl-L-prolyl-L-arginine-amide) dihydrochloride fluoreszcens szubsztrátmolekula segítségével elemeztük. A BZiPAR a tripszin mesterséges szubsztrátja, mely elhasítását követően 496 nm-en gerjeszhető és fluoreszcenssé válik, így a tripszin aktivációja és aktivitása élő sejtekben is követhető. Mivel az elhasított BZiPAR fluoreszcencia emissziója 520 nm körül van, a humán tripszinogén izoformák konstrukcióit mCherry-jelöléssel is előállítottuk. Az A izoforma tripszinogén 4-mCherry konstrukcióval transzfektált asztroglia tenyészetekben kontroll körülmények mellett és BZiPAR szubsztrát jelenlétében nem tapasztaltunk fluoreszcens jelet, azaz a BZiPAR nem hasadt el. Az OGD-kezelt tenyészetekben ezzel szemben a hipoxiás kezelés alatt és azt követően is fokozott BZiPAR fluoreszcenciát tapasztaltunk. A BZiPAR hasítását jelző fluoreszcens jelet elsősorban a transzfektált asztroglia sejtek aljathoz letapadt területén, extracellulárisan detektáltuk, elsősorban ott, ahol a plazmamembránban az mCherry-vel jelzett humán tripszinogén 4 izoforma is felhalmozódott. Eredményeiből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy hipoxiás állapotban a humán tripszinogén A és B izoformák a plazmamembrán közelében lokalizálódnak és aktivációjuk elsősorban a sejtek környezetében, extracellulárisan történik meg.

### **3.1.3 Sáska-eredetű proteáz-inhibitorok specifikálásának megváltoztatása**

Az SGTI és SGCI nevű inhibitorokat sikeresen kifejeztük működőképes formában M13 fágokon. Létrehoztunk egy olyan SGTI/SGCI kiméra fágkönyvtárat, amely tartalmazta az összes lehetséges (több mint negyedmillió) SGTI/SGCI kimérát. Ebből a populációból szelektáltunk emlős kimotripszen és tripszinen, valamint ízeltlábú eredetű tripszinen. Sikerült

olyan SGTI/SGCI kimerát azonosítanunk, amely a szarvasmarha tripszint a hasonló mértékben gátolja, mint a kecskerák tripszint. Az egyes szelekciókból származó klónok szekvencia analízisével kimutattuk, hogy az SGTI molekula nagymérvű taxon-szelektivitásának hátterében a molekula belső magjának és egyik felszíni kanyarjának - a proteáz inhibitorok körében eddig nem tapasztalt -, funkcionális kapcsoltsága áll. A kapcsolat mibenlétét feltáró röntgenkristallográfiás és NMR vizsgálatok befejezésükhöz közelednek.

#### **3.1.4 Szerin proteináz inhibitorok szerkezeti plaszticitásának specifitás meghatározó szerepe**

Elvégeztük az  $^{15}\text{N}$ -jelölt SGCI NMR-titrálását jelöletlen szarvasmarha kimotripsinnel. Az eredmények, a biokémiai mérésekkel összhangban, lassú cserére, azaz szoros kötődésre utalnak. A komplex jelhozzárendelése és a dinamikai mérések elvégzése után megállapítottuk, hogy az előzetes várakozásokkal ellentétben a teljes SGCI-ben, a proteázzal közvetlenül érintkező kötőhuroktól távoli részeken is észlelünk változásokat, melyeket a szabad és kötött térszerkezetek összevetése és elemzése után a gerinc torziós szögek átlagértékeinek eltéréseire vezettünk vissza. A dinamikai vizsgálatok elemzése azt mutatta, hogy a szabad állapotban jellemző dinamika bizonyos vonásai a komplexált formában is megmaradnak. Kifejlesztettünk egy gyors módszert NMR-spektroszkópiai mérésekből származó távolság jellegű kényszerfeltételek ismert fehérjeszerkezetekkel való megfelelésének vizsgálatára (PRIDE-NMR). A módszer webszerverként elérhető.

### **3.2.1. Miozin homodimer coiled-coil domének szerkezet és dinamika vizsgálata**

Röntgenkristallográfiai, valamint CD spektroszkópiai és kalorimetriás vizsgálatok alapján megállapítottuk, hogy a miozin-II motorfehérje regulációs képességének (a “kikapcsolt” szerkezetet létrejöttének) előfeltétele, hogy a proximális kétláncú coiled-coil szerkezet instabil legyen. A dinamikus coiled-coil szerkezeti hátterének feltárását három különböző kristályszerkezeti modell összehasonlítása segítette. A miozin-VI korábban coiled-coil szerkezetűnek prediktált, sok töltött aminosavat tartalmazó farok doménjéről megállapítottuk, hogy stabil egyszálú  $\alpha$ -hélix szerkezetű. Kiderítettük, hogy ez az egyszálú  $\alpha$ -hélix számos fehérjében megtalálható szerkezeti elem, melynek elsősorban mechanikai szerepe lehet, például különböző miozinokban

### **3.2.2. A miozin motorok kargókötésének szerkezeti alapjai, eddig ismeretlen kargók azonosítása**

A miozin-V farok könnyű lánc (DLC) kötőhelyét egy szerkezet nélküli régióban azonosítottuk, s megállapítottuk, hogy a komplex kialakulása során a kötőrégiót határoló coiled-coil domének stabilizálódnak. A DLC egy konzervatív eukarióta „hub protein”, amely több mint 60 kötőpartnerrel rendelkezik (élesztő kettős hibrid módszerrel újonnan felfedezett partner, az ATMIN jellemzése folyamatban van), s a lineáris DLC kötőmotívum ( $\beta$ -MoRE) mindig egy szerkezet nélküli doménben lokalizálható. A DLC multifunkcionális fehérje, amely elősegíti a kötőpartnerei dimerizációját és allosztérikus módon befolyásolja a szerkezetük stabilitását és/vagy szabályozza nagyobb fehérje komplexek létrejöttét. Jellemeztük a DLC komplexek kialakulását kinetikai és termodinamikai szempontból, többek között NMR spektroszkópiával.



### 3.2.3 A II-es Blebbistatin általi gátlásának hatásmechanizmusa

Sikerült megfejtenünk az első miozin II specifikus inhibitor (blebbistatin) hatásmechanizmusát. Ez egyúttal az inhibitor kötési helyének meghatározását jelentette. A 2003-ban felfedezett blebbistatin a sejtosztódási barázda kialakulását gátolja anélkül, hogy megszakítaná a mitózis egyéb folyamatait. Kimutatták, hogy hatását nem az izomban előforduló miozin II gátlásával éri el. További kísérletek igazolták, hogy a blebbistatin specifikusan a miozin II enzim család tagjait gátolja, míg más miozinokhoz nem, vagy csak gyengén kötődik. Kovács Mihállyal kollaborációban kiterjedt kinetikai méréseket végeztünk annak megállapítására, hogy mi a blebbistatin hatás miozin II iránti specifitásának szerkezeti alapja. Megállapítottuk, hogy a blebbistatin nagy affinitással a miozinhoz csak ahhoz az állapotához kötődik, amely a „switch 2” zárt helyzetével jellemezhető. Ezt az állapotot stabilizálja. Ennek következménye, hogy a ciklus ebben az állapotban gyakorlatilag megáll. Ekkor az aktinhoz csak gyengén kötődik a miozin, tehát a blebbistatin a rendszert relaxált állapotban tartja. *In silico* kísérletekkel modelleztük a kötőhelyet, azt a számítási feltételt alkalmazva, hogy a blebbistatin a miozin II fehérjéhez csak zárt állapotban kötődik, míg más miozinokhoz egyáltalán nem kötődik. Számításaink szerint a blebbistatin az aktinkötő árok mélyén kötődik. Egy évvel később Ivan Rayment laboratóriuma meghatározta a miozin-blebbistatin komplex atomi szerkezetét és ezzel megerősítette feltételezéseinket. Modellünk azonban az atomi szerkezetből nyerhető információon túlmutatva azt is kimutatta, hogy a blebbistatin kötődése során a kötéstől eltérő helyen történik szerkezeti változás a miozinban. Ez a statikus atomi szerkezetből nem olvasható ki. Egyelőre a blebbistatin a miozin család egyedüli specifikus inhibitora. A működésmechanizmus, továbbá az

inhibitor kötésekor bekövetkező „*induced fit*” azonban mintául szolgálhatnak új típusú és specifikus inhibitorok tervezéséhez.

### **3.3. Amiloid-képződés vizsgálata biofizikai módszerekkel**

Kimutattuk, hogy a  $\beta_2$ -mikroglobulin ( $\beta_2m$ ) amiloid szálak hő hatására lebonthatóak. Ez egy reverzibilis, gyors egyensúlyra vezető folyamat. Magas hőmérsékleten az amiloid szálakkal a monomer molekulák tartanak egyensúlyt. A hő által indukált depolimerizáció mechanizmusát két folyamat határozza meg, a szálvégekről történő disszociáció és a szálak törése. Felvetődött a kérdés, hogy a szálak törése vajjon végbemehet-e fiziológias hőmérsékleten is? Jól ismert, hogy az amiloidképződés erősen nukleációfüggő, a tisztán monomereket tartalmazó oldat polimerizációja csak hosszú lag fázis után indul el. Magok hozzáadására azonban a  $\beta_2m$  késedelem nélkül amiloid szálakat képez. Az irodalomban a spontán nukleáció jelenségével magyarázzák a lag által indukált fázis végét jelentő felgyorsult reakciót. Egy másik lehetséges magyarázat a szálak törése és így polimerizációra képes új szálvégek keletkezése. Hipotézisünket a reakció kinetikájának fluoreszcencia spektroszkópiai vizsgálatával és elektronmikroszkópos felvételekkel bizonyítottuk. Kimutattuk, hogy a szálak érzékenyek a mechanikai behatásokra is. Eredményeink arra utalnak, hogy a szálak törése *in vivo* szerepet játszhat a betegség időbeli lefutásában és akár egyetlen  $\beta_2m$  amiloid szál kialakulása is elindíthatja a betegség kifejlődését.

*In vitro*, semleges pH értéken a  $\beta_2m$  csak adalékanyagok hatására képez amiloid szálakat. Központi kérdés, hogy *in vivo* milyen tényezők játszanak szerepet a fehérje polimerizációjában és lerakódásában. Korábban kimutattuk, hogy a nátrium-dodecil-szulfát (SDS) semleges pH mellett amiloidképződést indukál. Ebből kiindulva megvizsgáltuk az SDS-hez

hasonló felépítésű, fiziológiásan előforduló lizofosfolipidek szerepét a  $\beta$ 2m polimerizációjában. A monomerek szerkezetére és stabilitására gyakorolt hatást CD spektroszkópiával és kalorimetriával vizsgáltuk, az amiloid szálakat fluorimetriás mérésekkel, illetve elektronmikroszkópiával detektáltuk. Megmutattuk, hogy a lizofoszfatisav (LPA), egy a vérben jelenlévő lizofosfolipid, képes speciális kölcsönhatásba lépni a fehérjével. Az LPA a natív, monomer fehérje szerkezetét destabilizálja, illetve magok jelenlétében elősegíti az amiloidszálak képződését. Ez felveti az LPA és a hozzá hasonló lipidek szerepét a vesedialízishez kötött amiloidózis kialakulásában. Az eredményeket több nemzetközi és hazai konferencián mutattuk be, illetve a beküldött kézirat revízió alatt áll. *In silico* dokkolás segítségével feltérképeztük  $\beta$ 2m amiloidképződését elősegítő SDS valószínűsíthető kötőhelyét. Kimutattuk, hogy a lizofoszfatisav, amely eredményeink alapján hasonló specifikus hatással rendelkezik, ugyanazt a kötőhelyet preferálja a  $\beta$ 2m molekula felszínén. Limitált proteolízissel vizsgáltuk, hogy az SDS és LPA hatására fellazuló monomer  $\beta$ 2m molekulában milyen hasítóhelyek exponálódnak. Ezeket tömegspektrometriával azonosítottuk, és megállapítottuk, hogy a megjósolt SDS-kötőhely közelében helyezkednek el. Az eredmények alapján tervezett, célzott fehérjemutánsok segítségével kívánjuk bizonyítani a kölcsönhatásban részt vevő érintett aminosavak szerepét. A mutagenézis munka folyamatban van.

#### **4. Metodikai fejlesztés**

Fejlesztési programunk keretében vállalt feladataink tulnyomó részét teljesítettük. Tanszékünk hazánkban egyedülálló fehérje- és peptidanalitikai laboratóriummal (**Központi Bio-Analitikai Labor**) rendelkezik, melyet a pályázati ciklusban is tovább fejlesztettünk. Kísérletek történtek a **Tap**

**(Tandem Affinity Purification)** módszer bevezetésére. A projekt keretében megterveztünk és szintetizáltunk egy olyan **keresztkötő reagenst**, amely egyrészt a célfehérjék oldallánc jelölésére alkalmas, másrészt tartalmaz egy fotóaktiválható csoportot, amely a célfehérjével kölcsönható fehérjével képes reagálni. A **tranziens kinetikai módszereket** illetően az utóbbi években egy alapvetően új gyors kinetikai módszert, illetve eszközt fejlesztettünk ki: az ún. „*temperature-jump/stopped flow*”-t. A módszer lényege az, hogy a „*stopped flow*”-ban a reaktánsok szubmilliszekundum alatt történő keverésével egy időben a reakció elegy hőmérsékletét gyakorlatilag tetszőleges mértékben emeljük. A keverés és a hőmérsékletugrás ugyanolyan gyorsan, egyidejűleg történik. A rendszer további előnye, hogy a hőmérséklet szenzitív reaktáns (pl. az enzim) a hőmérsékletugrás előtt végig natív hőmérsékleten van, ugyanakkor a kevésbé hőmérséklet szenzitív reaktáns (pl. a szubsztrát) is csak néhány másodpercig van magas hőmérsékleten a keverés és a hőmérsékletugrás előtt. A módszer alkalmazása széleskörű. Az egyik legizgalmasabb alkalmazási lehetőség az, hogy az enzimreakciót az enzim denaturációs hőmérséklete fölött vizsgáljuk. Ebben a kísérletben minden olyan enzimreakció lépést tudunk követni, amelynek sebességi állandója nagyobb, mint a denaturációé. Újabban miozin motor domén W501+ konstrukción végeztünk ilyen irányú kísérleteket. Különböző reakciólépéseket tudunk tanulmányozni jóval a miozin denaturációs hőmérséklete felett. A módszer további fontos alkalmazási lehetősége, hogy humán fehérjék *in vitro* kinetikáját fiziológiai hőmérsékleten is tudjuk tanulmányozni. A legtöbb humán enzim 37°C-on instabil, ezért enzimkinetikai paramétereik csak 20°C körüli hőmérsékleten ismertek. Emiatt pedig ezek a paraméterek csak nehezen vethetők össze a fiziológiai kísérletek eredményeivel. A

*temperature-jump/stopped flow* alkalmazása ezt a problémát megoldja, hiszen a mérés közben a humán fehérjét a fecskendőben tárolhatjuk azon a hőmérsékleten, amelyen stabil, míg a mérést a hőmérsékletugrással fiziológias hőmérsékleten végezhetjük el. A *temperature-jump/stopped flow* egyik legfontosabb alkalmazási területe a fehérjék stabilitásának és unfoldingjának vizsgálata lehet. A *temperature-jump/stopped flow* különösen hasznos olyan fehérjék unfolding folyamatainak termodinamikájának vizsgálatában, amelyek irreverzibilisen denaturálódnak, mert differenciál pásztázó kalorimetriával (DSC) ezek a mérések nem végezhetők el. Szerkezet specifikus szignál (pl. egyedi triptofán) alkalmazásával a fehérjék egyes régióinak unfoldingját is vizsgálni lehet hőmérséklet indukált denaturáció során. Kimutattuk, hogy a különböző régiókban elhelyezett szignálok különböző kinetikai profilt mutatnak a hődenaturáció során. Ezen kísérletek révén meghatározható az a régió, amely a leggyengébb „láncszem”, ahol a hődenaturáció iniciálódik. Ennek a régiónak a megtalálása azért fontos, mert leghatékonyabban ebben a régióban elhelyezett változtatás révén stabilizálhatunk egy fehérjét. A *temperature-jump/stopped flow* mind elméleti, mind gyakorlati szempontból nagy lépést jelenthet fehérjék hőstabilitásának tervezésében. Valamennyi tanszéki kutatásunk fehérje-fehérje kölcsönhatásokkal kapcsolatos. Vizsgálatainkat rendszeresen kiegészítjük a kölcsönhatások **izotermikus kalorimetriás titrálással** történő termodinamikai mérésével. A **molekuláris dinamikai és dokkolásos molekula modellezések** is általános gyakorlattá váltak. Az **NMR spektroszkópiai** fejlesztésekre a **3.1.4.** feladat teljesítésénél már utaltunk. **Nanobiotechnológiai** vizsgálatokat Kellermayer Miklóssal (aki időközben a SE Biofizikai Tanszékének vezetője lett) együttműködve végeztünk. A **peptidek és fehérjék irányított**

**evolúciójához** hazánkban első ízben állítottuk be a fágbemutató módszerét. Az első konkrét eredményekről a **3.1.3.** pontban számoltunk be. A módszerrel kapcsolatban elmondható, hogy gyakorlatilag minden olyan alapkutatói kérdés megválaszolására és probléma megoldására alkalmas, amelyeket általában a fehérjemérnökség körébe sorolunk. Kiválóan alkalmas továbbá arra, hogy a természetben elő nem forduló, de ipari, vagy orvosgyógyászati szempontból előnyös tulajdonságokkal rendelkező fehérjék előállítására is felhasználjuk.

## **5. A posztgraduális program aktualizálása, új kurzusok**

A pályázati ciklusban, az elmúlt négy év során valamennyi, a pályázatban vállalt PhD kurzus, a **Géntechnológia és PCR-től a Kombinatorikus Molekuláris Biológiáig**, megtartására sor került. A felsorolástól itt eltekintek (az ELTE TTK Biológia Doktori Iskola teljes képzési programja megtalálható az Iskola honlapján), a tárgyyszerűség kedvéért megemlítem, hogy a zárójelentés írásakor az általam vezetett Szerkezeti Biokémia Doktori Program keretében Málnási-Csizmadia András és Kovács Mihály **Tranziens Enzimkinetika** és egy amerikai vendégelőadó, Michel Espinoza-Fonseca **Molecular simulations of the dynamics and stability of proteins c.** kurzusa van soron.