SEMMELWEIS EGYETEM
Általános Orvostudományi Kar
Biokémiai Tanszék

Tanszékvezető
Dr. Csanády László egyetemi tanár

Dr. Gál Péter
tudományos tanácsadó
MTA TTK Enzimológiai Intézet

Tárgy: Válaszok MTA doktori értekezés bírálatára

Tisztelt Tudományos Tanácsadó Úr!

Hálás vagyok, hogy elfogadta doktori munkám bírálatát. Örömmel vettem tudomásul, hogy alapvetően meg volt elégedve a disszertációmban leírt tudományos munkával, és hogy támogató javaslattal élt a nyilvános vitára bocsájtás tekintetében. Az alábbiakban engedje meg, hogy válaszoljak a megjegyzéseire és kérdéseire.

Kérdések:

1. Az „Alkalmazott módszerek" fejezetben meglehetősen szerencsétlen megfogalmazásnak tartom a következő mondatot: „A periplazmatikus rendszer elméletileg funkcionálisan jobb minőségű fehérjét szolgáltat, míg a citoszólikus rendszer lényegesen nagyobb mennyiségben termeli a fehérjéket, amely pedig szerkezetvizsgálati céljaink miatt vált mindenképpen szükségessé (NMR, kristályosítási próbák)". A szerkezetvizsgálat során nyilván nem lehet a nagyobb mennyiség miatt funkcionálisan rosszabb minőségű fehérjével dolgozni. A szerkezetvizsgálathoz nagy mennyiségű, funkcionálisan teljesen aktív fehérjére van szükség. Összehasonlították-e a periplazmatikus rendszerből nyert rekombináns enzimpreparátumok specifikus aktivitását a citoszólikus rendszerből nyert preparátumok specifikus aktivitásával? Jelölt azt is megemlíti, hogy még egy refolding eljárást is kidolgoztak az inklúziós testekbe jutott rekombináns fehérjék renaturálására. Ez a módszer milyen minőségű fehérjepreparátumot szolgáltatott, és használták-e valamelyik fehérje szerkezetvizsgálata során?

Válasz: A hE3 fehérje előállítását megelőzően irodalmazott a jelölt és azt találta, hogy a periplazmatikus fehérjeexpresszió több szempontból előnyösebb lehet mint a citoszólikus (de nem feltétlenül az). Ezek a szempontok a következőek: *i.* a fehérjetisztítás egy első lépése lehet, mivel a periplazmába irányított fehérje mentes lesz az összes citoszólikus fehérjétől (a megfelelő proteázokat is beleértve, ami miatt azok inhibítorait el lehet hagyni potenciálisan a tisztítás következő lépései során, és ez költséghatékonyabbá is teszi a módszert), *ii.* a periplazma nem-redukáló környezetet biztosít a fehérjék számára, a citoszóllal szemben, ahol az inkább redukáló

környezet szerkezetileg fontos diszulfid-hidak kialakulását befolyásolhatja; ez nem megfelelő feltekeredést, denaturációt, ill. aggregációt okozhat bizonyos fehérjéknél, *iii*. a külső membrán szelektív módon kíméletesebb kezeléssel bontható meg mint a citoszólikus tartalom felszabadítása során (pl. EDTA, lizozim, ozmotikus sokk, az általában alkalmazott erős mechanikai módszerekkel szemben, mint pl. szonikálás, French press, amelyek lokális túlmelegedést és denaturációt okozhatnak); a szferoplasztok pedig – a teljes citoszólikus tartalommal együtt – könnyen kicentrifugálhatóak, *iv*, a periplazma 600 Da alatti molekulák számára könnyen elérhető, így pl. különböző ligandok, prosztetikus csoportok alkalmazhatóak, amelyek potenciálisan fokozzák a rekombináns fehérjék feltekeredését, stabilitását. A periplazmába lehet irányítani a fehérjéket megfelelő szignálpeptid alkalmazásával (pl. ompA), amely levágódik egy *E. coli* szignál-peptidáz által. A periplazma akár 40% sejttérfogatot is elfoglalhat, így akár megfelelő kitermelést is el lehet vele érni elméletileg. Mindezeket figyelembe véve először egy periplazmatikus expressziós rendszert állítottunk be a hE3 előállítására. Az ezzel nyert tisztított (>95%) hE3 enzim specifikus aktivitása 1,5-szer magasabb volt, mint a természetes forrásból nyert sertésszív E3 enzimé (95% szekvencia-azonosság, Sigma-Aldrich termék, MALDI-MS alapján gyakorlatilag szintén teljesen tiszta fehérje), és ez nem változott akkor sem amikor eltávolítottuk a tisztításhoz alkalmazott Strep affinitás cimkét. A két fehérje CD spektruma között nem volt gyakorlatilag eltérés. A fehérjekitermelés javítása érdekében optimalizáltunk egy refolding módszert is. Az így kapott fehérje specifikus aktivitása 2-szer magasabb volt mint a sertésszív ekvivalensé. A két fehérje CD spektruma között itt sem volt gyakorlatilag eltérés. A refolding eljárással előállított hE3 fehérjét közvetlenül nem használtuk eddig szerkezetvizsgálatra, azonban a dimerizációs domén nélküli ^{15}N-jelölt hE3 konstruktunkat – amelyet szintén ezzel a refolding eljárással állítottunk elő – NMR vizsgálatokban már használtuk (nem közölt eredmény, a munka folyamatban van jelenleg). A citoszólikusan előállított fehérjénk minőségét is ellenőriztük és mivel gyakorlatilag megegyező specifikus aktivitást (lásd Ambrus *et al*., Hum. Mol. Genet., 2011, Fig. 1A (periplazmatikus hE3), ill. Szabó E., Ph.D. disszertáció, 2020, 23A. ábra (citoszólból tisztított hE3; utóbbi még ~10%-kal magasabb aktivitást is mutatott)) és CD ujjlenyomatot (nem közölt adat) mutatott a periplazmatikus fehérjével összehasonlításban, így a jobb kitermelés miatt ezt a fehérjeforrást használtuk a későbbiekben a nagy mennyiségű fehérjét igénylő kristályosítási próbáinkhoz. A citoszólikus fehérjéink megfelelő minőségéhez valószínűleg nagyban hozzájárul: *i*. a vonatkozó irodalom által is gyakran használt „proteáz-gyengített" BL21(*DE3*) expressziós gazdasejt alkalmazása, *ii*. a kereskedelemben újonnan bevezetett kíméletes B-PER sejtlízis-puffer alkalmazása (szonikálás helyett), és *iii*. az a tény, hogy mindössze egy diszulfid-híd van jelen a hE3 fehérjében (Cys45-Cys50) és az is szekvenciálisan közeli Cys-ek között jön létre (a kötés esetleges átmeneti redukciója pedig láthatólag nem befolyásolja számottevően/tartós módon a feltekeredést).

A Jelölt egyetért azzal, hogy félrevezető volt a bírálatban megjelölt mondat és semmiképpen sem akarta azt a benyomást kelteni, hogy szerkezetvizsgálatokra kevesebbel is beérjük mint a teljesen funkcionális enzim.

2. A dolgozatban olvashatjuk, hogy a különböző patogén mutánsok esetében a hLADH enzimaktivitás csökkenésének mértékéből nem jelezhető jól előre a betegség lefolyásának súlyossága. Nyilvánvaló, hogy egyéb tényezőket is figyelembe kell venni. Ilyen tényező lehet, hogy a mutáns hLADH csökkent affinitással kötődik a komplexekhez. Elképzelhető-e olyan eset, hogy a mutáns nagy affinitással kötődik a komplexhez, viszont improduktív módon (pl. nem megfelelő térbeli orientációban), vagy pedig sérül a komplex sztöchiometriája?

Válasz: A klinikai laboratóriumi adatok azt mutatják, hogy a LADH-aktivitás csökkenésének mértéke gyakorlatilag soha nem egyezik meg pontosan egyik érintett enzimkomplex aktivitás-csökkenése mértékével sem (eltérő mértékben modulálódnak általában a különböző E3-at koordináló enzimkomplexek aktivitásai is egy adott patogén mutáció esetében). Mivel van számos mutáns amelynél krisztallográfiával relatíve kismértékű szerkezeti perturbációt lehet felfedezni, illetve ezek között van olyan mutáns, amely esetében a maradék LADH-aktivitás jóval magasabb mint a komplex-aktivitások (és nincs számottevő disszociáció, mint pl. a G194C-hE3 esetén), teljesen mértékben elképzelhető, hogy egy önmagában relatíve aktívabb hE3 mutáns azáltal rontja le nagyobb mértékben a komplex aktivitást, hogy nem megfelelő orientációban vagy lokális szerkezettel kapcsolódik a komplex többi alegységéhez (pl. a hKGDHk-nál az E1-nek is van szerepe az E3 kötésében). A G194C mutánsnál mindazonáltal meg kell jegyezni, hogy a komplex emelkedett ROS-képző kapacitása is hozzájárulhat a patológiás viselkedéshez.

Egy együttműködésben nemrégiben írt cikkünk bemutatja, hogy egy a vizsgálataink tárgyába tartozó rokon komplex – az alfa-ketoadipát-dehidrogenáz komplex (KADHk) – E1 alegységében jelentkező patogén mutáció (G729R) éppen azáltal rontja le a komplex aktivitást, hogy nem engedi az E1 alegységet megfelelő orientációban/pozícióban koordinálódni az E2 alegységhez és ez a szubsztrát-csatornázást hátrányosan befolyásolja. Ez a patogén mutáció ~50-szeres komplex-aktivitás-csökkenést okoz, amellett, hogy az alegység-specifikus aktivitást gyakorlatilag nem befolyásolja (Zhang *et al*., J. Biol. Chem, 2020).

A komplexek optimális sztöchiometriája az esetlegesen megváltozott kötésmódok, ill. a vonatkozó affinitások függvényében szintén elképzelhető, hogy sérülhet. Ennek a vizsgálatát a közeli jövőben el is fogjuk kezdeni, mert fel is vállaltuk ezt a feladatot egy nemrég elnyert pályázatunkban. A mutáns komplexek efajta analíziséhez ITC, SPR, CL-MS, HDX-MS és krio-EM technikákat is fel fogunk használni. A krio-EM vizsgálatokat is kombinálni fogjuk a kémiai keresztkötés technikájával a gyakran gyenge alegység-alegység affinitások és a nagymértékű belső flexibilitások miatt.

3. Jelölt azt is kimutatta, hogy az izolált LADH képes ROS-t termelni a komplexektől függetlenül is, és felveti, hogy ennek a ROS képzésnek a gátlása terápiás szempontból hasznos lehet. Van-e arra valami adat vagy becslés, hogy patológiás állapotokban milyen mennyiségben van jelen szabad LADH és ez az összes ROS képződés mekkora hányadáért felelős?

Válasz: i. Flavinok és flavoenzimek kapcsán irodalmi adat, hogy képesek lehetnek szuperoxid, ill. H_2O_2 képzésére. *ii*. Agyi és izom mitokondriumokban a LADH enzim a legnagyobb mennyiségben jelenlévő flavoenzim. *iii.* Eritrocitákban és szérumban jelentékeny mennyiségű szabad LADH-val számolnak az irodalomban. *iv*. Izolált patkány izom mitokondriumokban a KGDHk kétszer annyi ROS-t termelt mint a PDHk, és ez az arány négyszeres volt az elágazó-szénláncú α-ketosav-dehidrogenáz komplexszel (ELKDHk) szemben, míg nyolcszoros a Komplex I tekintetében (az egyes komplexekre vonatkozó optimális körülmények között, a dehidrogenáz komplexek *forward* reakciójában). *v*. A fenti α-ketosav-dehidrogenáz komplexekben egyértelműen az E3/LADH-alegység termeli a ROS-t mind a *forward*, mind pedig a *reverz* reakciókban, intakt komplexeket figyelembe véve. *vi*. A KGDHk ~30-szor

gyengébben köti az E3 alegységet, mint a PDHk és ez tovább gyengülhet acidózisban ill. megfelelő patogén E3 mutánsok esetén. Ekkor viszont megfelelő szubsztrát (α-KG) ellátottság esetén a hKGDHk E1-E2 alkomplexe hasonló mennyiségű ROS-t tud képezni mint az intakt hKGDHk, a *forward* reakcióban. *vii*. A *reverz*-irányú ROS-képző E3 reakcióban több ROS termelődik, mivel a magas $NADH/NAD^+$-arány elősegíti az E3 négyelektronos redukált állapotának létrejöttét, amely nagyobb arányban tartalmaz teljesen redukált FAD-ot – amely által a ROS-képző reakció hatékonyan játszódik le – mint a *forward* reakcióban létrejövő kételektronosan redukált enzim (amely döntően egy töltésátviteli-komplex állapotában van jelen, ahol a FAD csak részlegesen van redukálva; a DHLA nem képes négyelektronosan redukált állapotba hozni az E3 enzimet). *viii*. A $NADH/NAD^+$-arány befolyásolja a *reverz*-irányú ROS-képzés mértékét, amely elvileg ugyanúgy hat az izolált E3-ra is mint a KGDHk-ra. *ix*. Acidózis mind az E3, mind pedig a KGDHk *reverz*-irányú ROS-képzését stimulálja, de a KGDHk *forward*-irányú ROS-képzését nem.

Az irodalomban tudtommal nincs olyan adat vagy becslés, hogy patológiás állapotokban milyen mennyiségben van jelen szabad LADH. Mindazonáltal a LADH relatíve magas mitokondriális összkoncentrációja, szabad formájának természetes megjelenése, a KGDHk-hoz való gyenge kötődése, acidózisban vélhetően megjelenő még alacsonyabb affinitása a KGDHk-hoz, a számos hE3 patogén mutáns esetében kimutatott nem mérhető mértékű affinitása a PDHk-hoz, mind azt sejteti, hogy bizonyos patológiás körülmények között ténylegesen meghatározó lehet a szabad (vad típusú vagy mutáns) LADH jelenléte és ROS-képző aktivitása (a fentebb pontokba szedett információkat is figyelembe véve). Ezen ROS-képzés hozzájárulásának pontos és aktuális mértékét nehéz megbecsülni az össz mitokondriális ROS-képzéshez viszonyítva adott körülmények között és nincsennek is ilyen adatok tudtommal az irodalomban egyelőre. Olyan ROS-képzés gátlószerek alkalmazása mellett, amelyek csak a szabad (vad típusú vagy mutáns) E3-ra hatnak, valószínűleg meg lehetne mérni ezt a paramétert. Munkahipotézisünk egy ilyen gátlószer kifejlesztése tekintetében az, hogy a molekula például a liponsav-csatornán keresztül támadjon, amely a komplexekben be van csatornázva és így ott nem elérhető (ehhez előzetes eredményeket szolgáltatott a J. Neurochem., 2009-es cikkünk anyaga).

4. A G194C hLADH mutánssal kapcsolatban azt olvashatjuk a dolgozatban (26. oldal), hogy részleges (kb. 30%) FAD vesztés mellett fokozott ROS képzés jellemzi. Ez némileg ellentmondás, mivel az LADH ROS képzése közvetlenül a FAD-on keresztül valósul meg. Jelölt szerint elképzelhető, hogy a mutáció a FAD reakcióképességének növelése által akár túl is kompenzálhatja a FAD veszteség mennyiségi hatását. Ehhez képest meglepő, hogy az irodalom leír egy G194C homozigóta beteget, aki a terápiás célú FAD pótlásra jól reagált. Hogyan oldhatók fel ezek az ellentmondások?

<u>*Válasz:*</u> A riboflavin és ezért a FAD is antioxidáns hatású molekulák (lásd például: Olfat *et al.*, Riboflavin is an antioxidant: a review update, Br. J. Nutr, 2022). Elképzelhető, hogy a FAD-pótló terápia során a mutáns hE3 FAD-tartalma nő, ezáltal ROS-képzése tovább növekszik, azonban a feleslegben lévő (nem enzimkötött) FAD - mint antioxidáns - eliminálja a keletkező ROS-t és ez összességében terápiásan jótékony hatású. Ez a hipotézis természetesen

bizonyításra vár. A bírálatban említett ellentmondást sajnos tényleg nem próbálta meg feloldani a disszertáció.

5. Jelölt CD spektroszkópiával is vizsgálta a hLADH és patogén mutánsainak szerkezetét. A távoli UV fényben felvett CD spektrum a fehérje másodlagos szerkezeti elemeiről (pl. α-hélix, β-lemez), ezek arányairól szolgáltat információt. A CD spektrumok felvétele semleges pH-n (pH=7,3) történt. Érdekes lett volna megnézni a CD spektrumok pH függését, különös tekintettel arra, hogy patológiás szituációkban a pH savas irányba tolódik el.

Válasz: Teljesen egyetértek a Bírálóval. Ezt és más CD analíziseket is beterveztünk már jó ideje, ill. már el is végeztünk többet ezek közül (lásd alább; a pH-függés még hátra van; nem publikált adatok). Ezzel a technikával tervezzük még a közeli jövőben a patogén hE3 mutánsok hőstabilitását is vizsgálni például (a pH-függés mellett). A FAD prosztetikus-csoport mikrokörnyezetét, konformációját és redox státuszát/oxidációs állapotát a 290-600 nm-es régióban már vizsgáltuk is a vad típusú hE3-ban (itt különböző szubsztrátok jelenlétében is), ill. 20 mesterségesen létrehozott aktív centrum hE3 mutánsban, 12 His-Ala hE3 mutánsban és 6 FAD-derivatívumokkal komplexált vad típusú hE3-ban. Ezen analízisek a vad típusú hE3 ROS-képző mechanizmusának felderítése céljából lettek elvégezve, elemzésük és kiegészítésük még tart. Ebben a FAD-ra érzékeny hullámhossz-tartományban a patogén hE3 mutánsokat is vizsgálni kívánjuk a közeli jövőben, pH-függő módon.

6. A dolgozat egyik fontos eredménye, hogy sikerült az LADH tartalmú enzim komplexeket rekombináns alegységekből összeépíteni. Mivel rendelkezésre állnak a mutáns hLADH fehérjék is tisztított formában, nem lehetne valamilyen módszerrel legalább közelítő pontossággal megmérni a különböző hLADH mutánsok kötődésének erősségét a komplexekhez?

Válasz: Korábban a hE3 ill. számos patogén és mesterségesen előállított mutánsa affinitását megmérték a hPDHk E3-kötő fehérjéjéhez ITC és SPR technikákkal (Park *et al*., BBRC, 2010; Patel *et al*., J. Mol. Cat. B, 2009; Brautigam *et al.*, Structure, 2006). Egy nemrégiben elnyert pályázatunkban felvállaltuk, hogy létrehozzuk az összes - számunkra még hiányzó - humán rekombináns PDHk, KADHk és ELKDHk alegységet és többek között pont a Bíráló által is javasolt affinitás-vizsgálatokat is elvégezzük a patogén hE3 mutánsok esetében. Ehhez ITC és SPR készülékünk is van, de egy speciális MS-alapú vizsgálattal is ki kívánjuk ezeket az analíziseket egészíteni. Ezek az eredmények fontosak lesznek abból a szempontból is, hogy esetleg érdemes lesz-e valamelyik disszociációra hajlamosabb patogén hE3 mutáns esetében olyan molekulákat fejleszteni, amelyek legalább részben vissza tudják esetleg kapcsolni az adott mutánst a komplexekhez.

7. A hidrogén/deutérium kicserélődési kísérletek kiértékelésével kapcsolatban a dolgozatban azt olvashatjuk, hogy a deutérium beépülés tekintetében egyik mutáns esetében sem volt markáns változás a dimerizációs doménben a vad típushoz képest. A 9. ábrán viszont az látható, hogy az E340K, I445M, R447G és a P453L mutánsok esetében a dimerizációs domén C-terminálisában, míg a D444V és I358T mutánsok esetében a domén egész hosszában detektálhatók változások. Ezek a változások nem befolyásolják az LADH dimerizációját?

Válasz: A dimerizációs domén ~120 aminosav hosszúságú. Ebben 4 db olyan főlánci amid-csoport van, amely intermonomer interakcióban vesz részt (a hE3 kristályszerkezete alapján, CONTACT program [CCP4 program csomag], lásd Table S1 a disszertációhoz is csatolt Hum. Mol. Genet., 2019-es cikkünkben) és amit mért a mi HDX-MS kísérletünk (nem Pro; az oldalláncok cseresebességei pedig általában sokkal nagyobbak (oda-vissza irányban, a vissza irányban ez teljes mértékben elmondható), mint a kísérletben vizsgált cseresebességek (alkalmazott/vizsgált csereidő: 3 min)). Ezek egyike sincs az utolsó 2 C-terminális peptidben (amelyek igazából erősen átfednek: 465-474 és 469-474), amelyek relatíve nagyobb effektust adtak több mutánsnál. Igazából ez a 4 aminosav a 451., 452., 455. és 456. aminosavak, amelyek mind együtt a 445-458-as peptidben vannak jelen (jobbról a 4. peptid az említett ábrán). Monomerizáció esetén ez a 4 főlánci N-H vélhetően teljesen lecserélődött volna D-ra és egy igen erőteljes effektust adott volna ΔΔD tekintetében (min. 3,5 Da összesen, a 445-458-as peptiden belül, mivel ez a peptid a WT-hE3-ban mindössze ~0,5 Da D-beépülést produkált összesen a 14 aminosavra nézve). Ilyen mértékű effektust egyik mutáns esetében sem találtunk ebben a peptidben és ezért mondhatjuk azt, hogy az eredmények alapján nincs jelen monomerizáció egyik vizsgált mutánsban sem. Ezen eredmények több más - a disszertációban is említett - módszerrel (röntgenkrisztallográfia, MD szimuláció, analitikai ultracentrifugálás, nano-LC MS, kalibrált gélszűrés) is megerősítést nyertek, általunk ill. mások által is különböző mutánsok esetében. A jelölt belátja, hogy pontosabb magyarázat lett volna helyénvaló a megfelelő helyen a disszertációban.

8. A célkitűzések között szerepel (5. pont), hogy a jelölt gyógyszermolekulákat fog tervezni, a hLADH elégtelenség, illetve a hKGDHk/hLADH ROS képzésével kapcsolatos betegségek kezelésére. Az eredmények ezt egyáltalán nem tárgyalják, mindössze arra történik utalás a dolgozatban, hogy a liponsav jó kiindulási molekula lehet ilyen fejlesztéseknél. Kérem a jelöltet, hogy fejtse ki bővebben a gyógyszerfejlesztési koncepcióját, és azt, hogy eddig milyen eredményeket értek el.

Válasz: A rövid disszertációs forma és abban a kiemelt csatolt cikkekben bemutatott eredményekre történő fókuszálás miatt nem lettek ezek az elképzelések, ill. (nem közölt) eredmények leírva, csak mint eredeti és jövőbeli célok lettek megemlítve.

A genetikai betegségekre nagyon ritkán van jelenleg még hatásos gyógymód. A jelölt laboratóriumában (részben külföldi együttműködések keretében) modern megközelítéseket próbálnak alkalmazni komplex - mitokondriális dehidrogenáz-enzimekhez kapcsolódó - patomechanizmusok elemeinek szelektív befolyásolására. Ezek a kutatások potenciálisan klinikailag releváns terápiás megközelítéseket alapozhatnak meg a jövőben.

A jelöltet nemrégiben megkeresték a University of Iowa-ról (USA), hogy legyen szakmai konzultáns egy fehérje-alapú gyógyszer kifejlesztésében a hE3-deficiencia betegség terápiája céljából. A kollaborációban fejlesztett enzimpótló terápiás fehérjekonstrukt már állatmodellen történő kipróbálás alatt áll és potenciálisan hamarosan eljuthat (a tervek szerint) egy ún. ”investigator-initiated clinical trial” fázisba az USA-ban (FDA). A jelöltnek meghatározó szerepe volt a fehérjekonstrukt megfelelő megtisztításának optimalizálásában. Szintén együttműködő partner a projektben a Children’s Hospital of Philadelphia, akikkel rektori szintű

együttműködési megállapodást írtunk alá a projekt tekintetében. A projekt alapvetése, hogy a hE3 fehérjét bejuttatjuk a mitokondriumba, ahol az – kompetíció útján, a patogén hE3 mutáns fehérjék ellenében – visszaállítja az érintett alfa-ketosav-dehidrogenáz enzimkomplexek normál működését. Ehhez egy megfelelő, biológiai membránokon áthaladni képes hE3-fehérjekonstrukt kifejlesztése szükséges, amely korábban már az egyik együttműködő partner által közlésre is került (sejtkultúrában és állatmodellben tesztelve, affinitás-kromatográfiával tisztítva). A mostani feladat az volt, hogy tiszta (GMP-szintű), affinitás-címke nélküli konstruktot hozzunk létre, mert az FDA nem fogad be olyan fehérje-gyógyszer jelöltet, amely affinitás-kromatográfiával lett tisztítva, még akkor sem ha a címke le lett vágva utólag (mert a nem tökéletes vágás potenciálisan immunogenitást okozhat). A fehérjekonstrukt a hE3 fehérjén kívül tartalmazza az N-terminális végen a mitokondriális szignálszekvenciát (MTS, 35 aminosav), illetve egy 11 aminosavból álló peptidet (YGRKKRRQRRR) a HIV-1 vírus által kódolt TAT (Trans-Activator of Transcription) fehérjéből.

Egy kanadai gyógyszerfejlesztő céggel (Cyclica, Inc., Toronto) szintén folytat a jelölt laboratóriuma gyógyszerfejlesztési irányú kutatásokat (a cég és a Semmelweis Egyetem együttműködési megállapodást is aláírt a projekt kapcsán rektori szinten). Itt is vannak kezdeti eredmények kismolekulás gyógyszertervezés tekintetében az E3-deficiencia kórképpel kapcsolatban. A cég modern mesterséges intelligencia alapú algoritmusokat alkalmaz gyógyszerjelölt molekulák fejlesztésére (az alkalmazott algoritmusokhoz mi sem férünk hozzá, azok szabadalomi oltalom alatt állnak). A jelenlegi közös projekt azon alapul, hogy az általunk meghatározott nagyfelbontású patogén hE3 mutáns kristályszerkezeteket, illetve a hPDHk E3-kötő fehérje kötődoménjének kristályszerkezetét felhasználva megpróbálunk ún. adaptor molekulákat fejleszteni, amelyek mindkét fehérjével interakcióba lépve potenciálisan visszaragasztják a disszociáló mutánst a hPDHk-ra (és ezzel legalább részben visszaadják a komplex funkcionalitását). Ez a megközelítés potenciálisan enyhítheti az általában igen súlyos klinikai tüneteket. ~100 potenciális adaptor molekulát már tervezett is a Cyclica számunkra, ebből mi 9-et választottunk ki szintetizáltatásra saját további szerkezet-dokkolási analízisünk alapján. A szerves szintézisekre most szerezzük be éppen az árajánlatokat.

Tervben van még szintén a céggel közösen ROS-termelés gátlószerek jövőbeli fejlesztése is (liponsavból kiindulva, a KGDHk/E3 ROS-képzése tekintetében).

Tisztelettel:

Dr. Ambrus Attila
egyetemi docens

Budapest, 2022. április 7.