

Milliárdok versengése: irányított evolúció a fehérjetudományban

Competition of billions: directed evolution in protein science

Pál Gábor

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Biokémiai Tanszék, 1117 Budapest, Pázmány Péter sétány 1/C, E-mail: palgabor@elte.hu

Összefoglalás

Az élet molekuláris szintű folyamatainak megértéséhez, részletesen ismerni kell a részt vevő fehérjéket, és atomi szinten kell feltárni, hogy a fehérjék mely részletei, milyen kölcsönhatásokban, miként teszik lehetővé az adott szerep ellátását. A megértésnek ilyen atomi szintű igénye hatja át a fehérjetudomány művelőit, akik DNS-technológiákkal felvértezve célzottan változtatják meg a fehérjéket, majd nagy felbontású szerkezetvizsgáló és egyéb módszerek birtokában elemzik a módosítások szerkezeti és működésbeli következményeit. Habár a fehérjemérnökség idestova húsz éve alatt hatalmas eredmények születtek, az egyedi mutációkra alapozó haladás módfelett lassú. Saját munkákon keresztül azt mutatjuk be, miként lehet alapvető fehérjemérnöki kérdéseket hatékonyabban megválaszolni fehérjevariánsok milliárdjainak irányított evolúciójával.

Pál, G.

Department of Biochemistry, Eötvös Loránd University, H-1117 Budapest, Pázmány Péter sétány 1/C, Hungary, E-mail: palgabor@elte.hu

Summary

To understand the mechanisms of key role protein life-processes, we need to identify the participating proteins, dissect the molecular interactions and reveal in atomic details how individual protein residues contribute to the function. Comprehension at such atomic details drives the protein scientists. Armed with DNA technologies these researches make targeted alterations in proteins and study the structural and functional consequences by high resolution techniques. Although protein science has delivered great achievements in the last 20 years, the progress based on individual mutations is rather slow. In this article I review some of our recent works to illustrate how fundamental questions in protein science can be answered through the directed evolution of billions of protein variants.

A klasszikus fehérjemérnöki megközelítés lehetőségei és korlátai

A pusztá megfigyelést leszámítva minden vizsgálatban szándékosan megzavarjuk a vizsgált rendszert, megfigyeljük, hogyan reagál. A fehérjék esetében kezdetben csak az oldatkörnyezetet (hőmérséklet, ionerő, kémhatás) lehetett változtatni, így például oldallánc-töltések szerepére következtetni. Később a szelektív kémiai módosítások számos aminosavtípus szerepét tették vizsgálhatóvá. Kivételes esetekben a kémiai módosítás célzott aminosavcserét is lehetővé tett [1]. Az áttörést a molekuláris biológia hozta: lehetővé vált a fehérjéjének klónozása és irányított mutagenézise [2,3], a fehérjék aminosav-sorrendje ma már tetszés szerint változtatható.

Ez határtalannak tűnő szabadságot, de egyben meglepő korlátokat hozott. Kiderült, hogy esély sincs a

teljes szekvenciateret bejárni, mivel az praktikusán végtelen. Egy 60 aminosavas kis fehérje esetén a lehetséges egyedi aminosavcserék száma 1140. Ennyi mutáns génre, tisztított fehérjevariánsra és egyedi mérésre lenne szükség ahhoz, hogy feltárjuk egy ilyen fehérje összes pozíciójának egyedi szerepét és evolúciós lehetőségeit. Természetesen soha senki nem végzett ilyen teljes vizsgálatot. Ráadásul, ha nem egyedi, hanem kombinált mutációkban gondolkodunk, akkor a variánsok száma exponenciálisan növekszik. Egy 60 aminosavas polipeptid összes variánsának száma 20^{60} , ami több, mint a ma ismert univerzumban létező összes elemi részecske. A szekvenciater a maga teljességében tehát nem feltárható. Emiatt a kísérletekben mindig komoly kérdés, mely pozíciók hányféle variánsa készüljön el. A vizsgálatok rendszerint korábbi ismeretek alapján fontosnak ítélt pozíciókra összpontosulnak, ismeretlen

területeket ritkán vizsgálnak. Ez a megközelítés talán érthető, de súlyos előítéletektől terhelt.

A kutatók elsőként egyszerűnek ígérkező vizsgálatokat hajtottak végre: egy-egy enzim aktív helyén cseréltek le olyan oldalláncokat, amelyeket más vizsgálatok már kulcsfontosságúnak jósoltak. A nyolcvanas években ilyen vizsgálatok indultak el a tRNS szintetázok, szubtilizin, foszfofruktokináz, lizozim, RN-áz és a tripszin esetében, mely utóbbi-ba az ELTE Biokémiai Tanszék is bekapcsolódott Gráf László vezetésével [4-9]. A már eleve fontosnak vélt pozíciók mutációi azt sugallták, hogy a fehérjékben „minden mindennel összefügg”, alig akad funkcionálisan semleges mutáció.

Szisztematikus fehérjemérnöki vizsgálatok – a pásztázó alanin-mutagenézis

James Wells, a Genentech cég kutatója, bevezette az első szisztematikus mutagenézis-eljárást, a pásztázó alaninmutagenézist (*alanine scanning mutagenesis*) [10]: egyenként alaninra cserélve a vizsgált oldalláncokat megmérték a mutáció hatását. Az alanin a glicin után a legkisebb aminosav, de szemben a glicinnel, nem növeli lényegesen a főlánc konformációs szabadságát. Egy alanincsere 18 aminosav esetében a β -szélen kívüli részlet eltávolítását jelenti, így az eltávolított rész szerepét vizsgáljuk.

Elsőként az emberi növekedési hormon (hGH) nagy affinitású (*Site 1*) receptorkötő felszínének összes, 35 csoportját vizsgálták. Ezt, az ezzel kölcsönható hGH-receptor (hGHR) hasonló méretű hormonkötő felszíne követte [11,12]. E hatalmas munkákban együttesen több mint hatvan egyedi alaninvariánszt termeltek, izoláltak és jellemeztek kötési tesztekben. Munkájuk gyümölcse az a nagy visszhangot kiváltó felismerés volt, miszerint a térben szorosan illeszkedő két felismerőhely oldalláncainak csak negyede járul hozzá produktívan a kötéshez. A többi alanin cseréjének nincs érdemi hatása. A pozíciónkénti

kötésienergia-hozzájárulásokat a kötőfelszínre vetítve két kisméretű, egymással komplementer „forró folt” (*hotspot*) képe jelent meg. Azóta számos fehérje-fehérje kölcsönhatásban találtak ilyen koncentrált kötési energiát. Egyik munkám során, amikor a Chicagói Egyetem Tony Kossiakoff által vezetett intézetében a jeltovábbítás során kialakuló 1:2 összetételű hGH:(hGHR)₂ hormon-receptor komplexet vizsgáltuk, ilyen komplementer forró foltokat fedeztünk fel a két receptor közötti interakciós felszínen is [13]. A korábbi kép szertefoszlott, kiderült, hogy még olyan aminosavak is megváltoztathatók funkcióromlás nélkül, amelyek szerkezeti értelemben egy interakciós hely részét képezik.

A páros oldallánc-kölcsönhatások vizsgálatának páratlan nehézsége

Egyedi mutációkkal csak egyedi oldallánc-hozzájárulások vizsgálhatók, oldallánc-kölcsönhatások nem. Enzimek esetében jól ismert az együttműködő oldalláncok kiemelkedő szerepe. Páros oldallánc-kölcsönhatások vizsgálatára vezették be a dupla mutációs ciklus (*double mutation cycle*) eljárást [14]. Ha két oldallánc egymástól függetlenül működik, úgy egyedi mutációjuk hatásának összege megegyezik a dupla mutánsra kapott hatás értékével. Ha a dupla mutáció hatása kisebb vagy nagyobb az egyediek összegénél, úgy a két oldallánc funkcionális kapcsolatban áll. A hGH kapcsán belátható, hogy a páros variánsokat igénylő projekt kivitelezhetetlen lenne, hiszen a 35 egyedi alaninmutáns mellett még 595 (35x34/2) páros alaninmutáns előállítását és mérését igényelné.

Fehérjemérnöki taposómalom – mire elég a tudásunk?

A klasszikus kutatások további korlátja a vizsgálatok iteratív, ciklikus jellegéből fakad. Korábbi ismeretek alapján hipotézist állítunk fel egy-egy fehérjerészlet



Pál Gábor 1990-ben, az ELTE TTK biológus szakán végzett okleveles biológusként. Azóta az ELTE TTK Biokémiai Tanszékén dolgozik, 2003-tól egyetemi docens. PhD-fokozatát az ELTE Szerkezeti Biokémia Doktori Iskolában szerezte 1996-ban. 1998-tól négy és fél évig posztdoktori ösztöndíjasként egyesült államokbeli tanulmányúton volt, mely során a kaliforniai Genentech cégnél és a Chicagói Egyetemen dolgozott. Amerikai munkája során az emberi növekedési hormon és receptora között kialakuló molekuláris felismerések energetikáját kutatta klasszikus fehérjemérnöki és irányított evolúciós megközelítésekkel. Hazatérte után az általa alapított Irányított Fehérjeevolúció Kutatócsoportban is bevezette a fágbemutatásnak nevezett evolúciós eljárást. A csoportban olyan fehérje-kölcsönhatások mechanizmusát kutatják, amelyek egyrészt alap kutatási szempontból érdekesek, másrészt terápiás alkalmazási szempontból ígéretesek.

szerepéről, egyedi mutációval megváltoztatjuk azt, majd új szerkezeti-funkcionális vizsgálatokat követően elemezzük a hipotézis helyességét, és ha kell, újabb hipotézist alkotunk. Általában nagyszámú ilyen ciklus szükséges még jól célzott kérdések megválaszolásához is. Nem meglepő, hogy az utóbbi évtizedek intenzív kutatásai ellenére is korlátozottak a fehérjeműködéssel kapcsolatos ismereteink. Ennek illusztrálására és egy alternatív megoldás bemutatása céljából végezzünk el egy rövid gondolat kísérletet.

A szakavatott biokémikus olvasó egy pillanatra képzelje el, hogy szervezetét veszélyes kórokozó támadja meg, amelynek egy kulcsfontosságú felszíni molekuláját kellene szelektíven blokkolni ahhoz, hogy a kórokozó el ne szaporodjon. Vajon elegendő tudás áll-e az olvasó rendelkezésére ahhoz, hogy a klasszikus fehérjemérnöki fegyvertár összes elemét bevetve egy-két hét leforgása alatt kifejlesszen egy szelektív kötésre képes fehérjét? A válasz minden bizonnyal nem. Ugyanakkor tudjuk, hogy immunrendszerünk rutinszerűen, nap mint nap megbirkózik ugyanezzel a feladattal, pár hét alatt csodálatos blokkoló fehérjéket kifejlesztve gyakorlatilag bármilyen idegen molekula ellen. Csakhogy az immunrendszer nem az emlegetett séma szerint működik. Egyenkénti mutációkon alapuló, iteratív fejlesztés helyett az immunrendszer a blokkoló fehérje, vagyis az ellenanyag-molekula mintegy 100 milliónyi variáns seregével „fogadja” a betolakodót. Minden variáns más-más B-sejt-klón felszínén jelenik meg receptorként, és azok a klónok szaporodnak el, amelyek hatékonyan kötődnek az idegen fehérjéhez. A szelektív kötésre képes fehérje tehát egy hatalmas variánsseregből, evolúciós folyamatban szelektálódik. Ennek a sémának az analógiájaként vezette be George P. Smith a fágbemutató (*phage display*) néven ismertté vált eljárást, amely lehetővé teszi fehérjék irányított *in vitro* evolúcióját [15].

A legeredményesebb *in vitro* evolúciós megközelítés – a fágbemutató

A fágbemutató (1. ábra) során az evolúcióba bevont fehérje génjét egy bakteriofág burokhéjához kapcsoljuk. Így olyan fúziós fehérje keletkezik, amely beépül a fág burkába. A fág részecskéje a belsejében hordozza az idegen fehérje génjét, miközben a külsején megjeleníti az idegen fehérjét. A fehérje és annak génje a fágon keresztül fizikailag kapcsolódik.

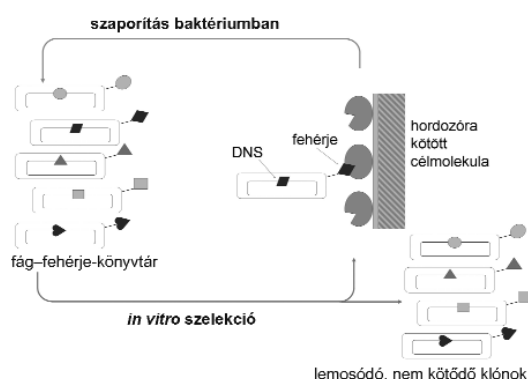
A fehérje irányított evolúciójához a gén általunk pontosan megszabott kodonjait változtatjuk meg. Egyszerre számos kodont is megváltoztathatunk szintetikus oligonukleotidok keverékén alapuló kombinatorikus mutagenezissel [16]. Egyszerre szabjuk meg a mutációk helyét és a pozíciókenti variabilitást. Több milliárd variánst tartalmazó DNS-könyvtárat hozunk létre, amelyet baktériumokba juttatva létrejön a fág-fehérje könyvtár. Minden fág csak egyfajta fehérjevariánst jelenít meg, és csak annak a génjét hordozza. Így egy, a B-sejtekkel szoros analógiát mutató rendszer jön létre. A fágbemutató azonban számos komoly előnnyel bír: a könyvtár variabilitását kizárólag a kutató határozza meg, nem valamilyen bonyolult sejtfüggő mechanizmus; a variánsok száma lényegesen meghaladhatja a B-sejteken megjelenő ellenanyagokét; bármilyen baktériumban termelhető fehérjével dolgozhatunk; és végül a szelekció is a kutató által kontrollált, *in vitro* módszerekkel zajlik.

Az evolúció során mutánsok egyenkénti vizsgálata helyett több milliárd kísérletet végzünk párhuzamosan. A megfelelőnek bizonyult fág-fehérje variánsokat a fizikailag kapcsolt gén szekvenálásával azonosítjuk. Egyedi mérések helyett a funkciószelektált klónok szekvenációanalízisével derítjük ki, hogy a funkció ellátását milyen aminosavsorrendek teszik lehetővé.

Mutánsok milliárdjaival dolgozunk, ami az egyedi mutációkhoz képest hatalmas szám. Mégis okosan kell gazdálkodnunk a könyvtár tervezésekor. Mint láttuk, egész fehérjék teljes variálása nem lehetséges. Az oszd meg és uralkodj elvét kell alkalmaznunk. Ha egyszerre sok pozíciót akarunk vizsgálni, akkor a szekvenciateret osztjuk csoportokra, tehát a 20 féle aminosav helyett csak egy kis hányadot engedünk meg, szélsőséges esetben például csak kettőt. Ha viszont mind a 20 féle aminosavat meg akarjuk engedni, akkor valamilyen átgondolt elv alapján a fehérjepozíciókat osztjuk fel csoportokra. A milliárdnyi variáns 6-7 pozíció teljes feltárására elegendő.

Sörétes pásztázó alaninmutagenezis

Sachdev Sidhu, korábbi munkatársam a Genentech cégnél, kifejlesztett egy módszert a klasszikus pásztázó alaninmutagenezis kiváltására. A sörétes pásztázó alaninmutagenezisnek (*shotgun alanine scanning*) keresztelt eljárásban egyedi mutációk helyett kombinatorikus sémát alkalmazott. Az első ilyen



1. ábra A fágbemutató sémája

munkában a növekedési hormon *Site-1* területén egyszerre 19 pozíciót variált bináris módon a vad típusú és alaninoldalláncot 1:1 arányban megengedve (2. ábra) [17]. Funkciószelektált klónok szekvenálásával minden variált pozíciónál meghatározta a vad típusú (wt) és az alaninmutáns (Ala) arányát. Egyhez közeli wt/Ala arány arra utal, hogy az alaninmutáció nem okoz funkcióváltozást, tehát a vad típusú oldallánc szerepe elhanyagolható. Minél nagyobb a wt/Ala arány, annál fontosabb a vad típusú csoport. Sidhu és munkatársai bebizonyították, hogy ez a várakozás kvantitatív értelemben is teljesül. Az egyes pozíciók wt/Ala aránya ragyogóan korrelál a vad típusú fehérjére és az adott pozíció egyedi alaninmutására vonatkozó affinitások (asszociációs állandók) arányával.

Saját példák irányított evolúció alkalmazására fehérjemérnöki kutatásokban

A fenti munka nyomán Sachdev Sidhu-val együttműködésben számos kutatást végeztem [18–22], amelyekből most hármat említek.

Affinitásnövekedés molekuláris hátterének feltárása. A sörétes alaninmutagenézist kiterjesztettem a hGH *Site-1* teljes, 35 aminosavas felszínére, és az energiatérképezést elvégeztem egy olyan, 400-szoros affinitású, 15 mutációt hordozó hGH-variánson is, amelyet a Genentech cég fágbemutatóval fejlesztett ki [22]. A két energiatérkép összehasonlítása megmutatta, hogy az affinitásnövekedés egymás ellen ható effektusok eredője. A vad típusra jellemző koncentrált „forró folt” helyett egy kiterjedtebb „langyos” energiatérképet kaptunk. Az eredeti forró foltot alkotó aminosavak az affinitásnövelés során a mutánsban megőrződtek, de szerepük lecsökkent, a terület „lehűlt”. Ez jelezte, hogy ere-

deti szerepük ellátását az egyéb pozíciók mutációi akadályozzák. A „langyos folt” kiterjedtségét zömmel éppen ezek az új, affinitásnövelő mutációk okozták, amelyek receptorkötést gátló vagy a kötésben funkcionálisan részt nem vevő oldalláncokat cseréltek funkcióképesebbekre. Meglepetésre olyan vad típusú csoportot is azonosítottunk, amelynek energetikai szerepe az egyéb pozíciók mutációi nyomán megnőtt. A vad típusú oldalláncok szerepmódosulását is magyarázó modellünk szerint az affinitásnövekedés komoly konformációs átrendeződéssel járt. Szerkezeti vizsgálatok ezt a következtetésünket igazolták [23].

Intramolekuláris oldalláncapcsolatok feltárása. A hGH sörétes alaninmutagenézisének adatait felhasználva demonstráltam, hogy a kombinatorikus mutagenézissel nem csak egyedi oldalláncszerepek, de oldallánc-kölcsönhatások is azonosíthatók [20]. Minden binárisan variált pozíciópárra kiszámoltam, hogy az ott kapott együttes wt:wt; Ala:wt; wt:Ala és Ala:Ala párok előfordulási gyakorisága mennyire tér el a véletlen kombinálódás esetén várt értékektől, és statisztikai próbával elemeztem az eltérés szignifikanciaszintjét. Azt találtam, hogy a vad típusú kötőhely oldalláncainak túlnyomó többsége autonóm módon működik. Néhány, zömmében töltéssel bíró oldalláncpár esetében az adatok gyenge, egymást segítő vagy éppen gátló hatást jósoltak. Egyedi és dupla mutánsok méréseivel igazoltam, hogy a kombinatorikus eljárás még gyenge kölcsönhatások azonosítására is képes.

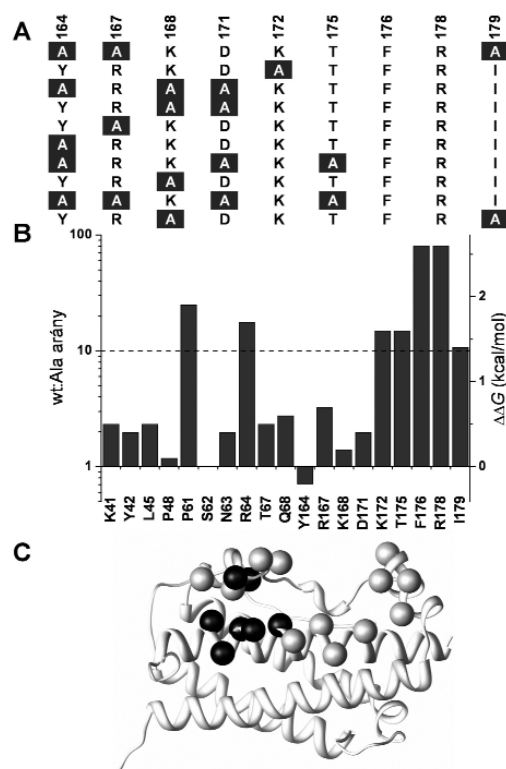
Az evolúciós fehérjemérnöki megközelítés segítségével az ELTE Biokémiai Tanszékén elsőként egy proteázinhibitor-családot érintő rejtélyes viselkedés okait tártuk fel [24]. A pacifastincsalád a hidrofób mag tekintetében két paralóg alcsaládra oszlik [25]. Az I-es alcsalád tagjairól kiderült, hogy korábban soha nem tapasztalt mértékű taxonszelektivitással bírnak: kiválóan gátolják gerinctelen fajok tripszinjeit, de alig hatnak a gerincesek tripszinjeire [26].

A II-es alcsalád tagjai mindkét tripszinforma hatékony inhibitorai. Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy az eltérés oka nem az inhibitorok proteázzal kölcsönható „aktív hurok” régiójában rejlik. Az eltérés okát egy sörétes paralógmutagenézisnek is nevezhető eljárással tártuk fel. A két alcsaládból kiválasztottunk egy-egy ismert inhibitor, amelyek 18 pozícióban tértek el egymástól. A két szekvencia tökéletes, pozícióőrző keverésével létrehoztuk az

összes lehetséges, tehát 2^{18} féle (több mint negyed-millió) kimeravariánst. A könyvtárat eltérő eredetű tripszineken szelektáltuk. Az oldallánckapcsoltságok vizsgálata megjósolta, hogy a taxonszelektivitást az I-es típusú mag és egy szintén I-es típusra jellemző, prolintartalmú felszíni kanyar kombinációja okozza. Ezt egyedi mutánsok mérésével igazoltuk. Ez az első példa arra, hogy egy kisméretű inhibitor esetén a belső mag és egy felszíni elem funkcionálisan meghatározó kapcsolatban áll egymással [24].

Nagy kötőfelszínek totális jellemzése – Affinitásigazítás rendelésre. Eddigi legátfogóbb munkám visszavezet az emberi növekedési hormonhoz [18]. Korábbi bináris vizsgálataink fontos ismereteket nyújtottak, de továbbra sem tudtuk, hogy a hatalmas receptor-kötő felszínen az egyes csoportok milyen mértékben és mire változnának meg, ha mind a 20-féle aminosavat megengednénk. A 35 pozíció szimultán variálása a lehetséges változatok elképzelhetetlenül kicsiny hányadát hozta volna létre a valóságban. A 35 aminosavas felszínt felosztottuk hat nem átfedő halmazra (későbbi könyvtárra) úgy, hogy minden halmazba legfeljebb 6 pozíció kerüljön. Minden halmazba csak egyetlen olyan pozíció került, amit a korábbi alaninmutagenézis kiemelkedően fontosnak talált, és az egy halmazba tartozó pozíciók nem lehettek szomszédosak. A két elv alkalmazásával segítettük elő, hogy minden könyvtár biztosan tartalmazzon funkcionális klónokat, és az egyes pozíciók egymástól függetlenül evolváljanak, tehát ne szelektálódjanak ki együttműködő csoportok. Két-féle szelekciót alkalmaztunk. A funkcionális szelekciónál a kötőpartner a hGH-receptor volt, míg a szerkezeti szelekciónál egy olyan monoklonális ellenanyag, amely a receptorkötő felszínnel átellenes oldalon egy szerkezeti epitópot ismer fel.

A vizsgálat primer eredménye egy példátlanul átfogó, részletes és megbízható, kísérleteken alapuló adatsereg volt. Mind a 35 pozíció esetén meghatároztuk, hogy a 20 aminosavtípus milyen előfordulási gyakorisággal reagál a szerkezeti és funkcionális szelekciók nyomására. A két szelekcióból összesen 1400 ($2 \times 35 \times 20$) kísérletes aminosav-gyakorisági adatot kaptunk. Kiderítettük, hogy melyek azok a pozíciók, amelyek funkcionálisan részt tudnak venni a receptorkötésben, és melyek azok, amelyek nem. Megmutattuk, hogy melyek azok a megoldások, amelyeknél az irányított evolúció utánózza a természetes evolúciót, és melyek azok, ame-



2. ábra Sörétes pásztázó alaninmutagenézis: a szekvenált pozíciók/klónok részlete (A), wt/Ala arányok (B) és ezek szerkezeti eloszlása (C).

lyeknél attól eltérő megoldásokra lel. Ez utóbbiak affinitásnövelést ígértek, amit egyedi pontmutánsok méréseivel igazoltunk. Bebizonyítottuk, hogy a hGH vonatkozásában bármilyen aminosavcsere esetén meg tudjuk jósolni, hogy annak milyen hatása lesz a hormon stabilitására és receptorkötő affinitására. A módszer természetesen általános, tehát minden fehérje esetén alkalmazható.

Köszönetnyilvánítás

A szerző köszönetét fejezi ki az OTKA (K68408, TS049812) és az MTA Bolyai János Kutatási Ösztöndíj pénzügyi támogatásáért.

Irodalomjegyzék

- [1] Polgar, L., Bender, M. L. (1967) *Biochemistry*, **6**(2): 610–620.
- [2] Zoller, M. J., Smith, M. (1983) *Methods Enzymol.*, **100**: 468–500.
- [3] Smith, M. (1982) *Trends Biochem. Sci.*, **7**(12): 440–442.
- [4] Nicholson, H., Anderson, D. E., Daopin, S., Matthews, B. W. (1991) *Biochemistry*, **30**(41): 9816–9828.
- [5] Lau, F. T. K., Fersht, A. R. (1987) *Nature*, **326**(6115): 811–812.
- [6] Graf, L., Craik, C. S., Patthy, A., Rocznik, S., Fletterick, R. J., Rutter, W. J. (1987) *Biochemistry*, **26**(9): 2616–2623.
- [7] Wells, J. A., Bott, R. R., Powers, D. B., Ultsch, M. H., Power, S. D., Adams, R. M., Cunningham, B., Graycar, T. P., Estell, D. A. (1986) *J. Cell. Biochem., Suppl.* **10**: 246.
- [8] Craik, C. S., Largman, C., Fletcher, T., Rocznik, S., Barr, P. J., Fletterick, R., Rutter, W. J. (1985) *Science*, **228**(4697): 291–297.

- [9] Winter, G., Fersht, A. R., Wilkinson, A. J., Zoller, M., Smith, M. (1982) *Nature*, **299**(5885): 756–758.
- [10] Cunningham, B. C., Wells, J. A. (1989) *Science*, **244**(4908): 1081–1085.
- [11] Clackson, T., Wells, J. A. (1995) *Science*, **267**(5196): 383–386.
- [12] Cunningham, B. C., Wells, J. A. (1993) *J. Mol. Biol.*, **234**(3): 554–563.
- [13] Bernat, B., Pal, G., Sun, M., Kossiakoff, A. A. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**(3): 952–957.
- [14] Carter, P. J., Winter, G., Wilkinson, A. J., Fersht, A. R. (1984) *Cell*, **38**(3): 835–840.
- [15] Smith, G. P. (1985) *Science*, **228**(4705): 1315–1317.
- [16] Fellouse, F. A., Pal, G. (2005) Methods for the Construction of Phage-Displayed Libraries. In: Sidhu, S. S. (Ed.) *Phage Display in Biotechnology and Drug Discovery*, CRC Press, Boca Raton.
- [17] Weiss, G. A., Watanabe, C. K., Zhong, A., Goddard, A., Sidhu, S. S. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**(16): 8950–8954.
- [18] Pal, G., Kouadio, J. L. K., Artis, D. R., Kossiakoff, A. A., Sidhu, S. S. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**(31): 22378–22385.
- [19] Kouadio, J. L. K., Horn, J. R., Pal, G., Kossiakoff, A. A. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**(27): 25524–25532.
- [20] Pal, G., Ultsch, M. H., Clark, K. P., Currell, B., Kossiakoff, A. A., Sidhu, S. S. (2005) *J. Mol. Biol.*, **347**(3): 489–494.
- [21] Pal, G., Fong, S. Y., Kossiakoff, A. A., Sidhu, S. S. (2005) *Protein Sci.*, **14**(9): 2405–2413.
- [22] Pal, G., Kossiakoff, A. A., Sidhu, S. S. (2003) *J. Mol. Biol.*, **332**(1): 195–204.
- [23] Schiffer, C., Ultsch, M., Walsh, S., Somers, W., de Vos, A. M., Kossiakoff, A. (2002) *J. Mol. Biol.*, **316**(2): 277–289.
- [24] Szenthe, B., Patthy, A., Gaspari, Z., Kekesi, A. K., Graf, L., Pal, G. (2007) *J. Mol. Biol.*, **370**(1): 63–79.
- [25] Malik, Z., Amir, S., Pal, G., Buzas, Z., Varallyay, E., Antal, J., Szilagy, Z., Vekey, K., Asboth, B., Patthy, A., Graf, L. (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, **1434**(1): 143–150.
- [26] Patthy, A., Amir, S., Malik, Z., Bodi, A., Kardos, J., Asboth, B., Graf, L. (2002) *Arch. Biochem. Biophys.*, **398**(2): 179–187.

A kecskerák (*Astacus leptodactylus*) tripszinjének esete a szarvasmarha-pankreász tripszininhibitorával

The affair of crayfish trypsin with bovine pancreatic trypsin inhibitor

Gráf László

Eötvös Loránd Tudományegyetem, MTA KK-ELTE Biotechnológiai Kutatócsoport, Biokémiai Tanszék, 1117 Budapest, Pázmány Péter sétány 1/C

Gráf, L.

Department of Biochemistry, Eötvös Loránd University, H-1117 Budapest, Pázmány Péter sétány 1/C

Summary

The most precious reward of a scientist is the discovery that he makes. Discovery is the recognition of a phenomenon or relationship that cannot be seen before the research is started.

The recognition that the tightness or strength of a complex formed between crayfish trypsin and bovine pancreatic trypsin inhibitor is much stronger than that of bovine trypsin with its natural trypsin inhibitor is a discovery. It is not evident at this stage, however, how important it is.

A *Biokémia* első, 1977. márciusi számába, a lap alapító szerkesztőjének, Bagdy Dánielnek a biztatására írtam meg „Endorfinsztori” című tanulmányomat. Most alkalom adódott, hogy a lap nyomtatásban utoljára megjelenő számába is írjak egy történetet. Fogadják jó szívvel.

A történet a kilencvenes évek közepén kezdődött. Akkor még rendszeresen részt vettem a Karchiban (Pakisztán) kétfévente megrendezett „Protein Structure and Function” című nemzetközi konferencián. Egy ilyen szimpózium alkalmával találkoztam először két pakisztáni diákkal, Malik Zulfiqarral és Sumaira

Amirral. A diákok, akik néhány év múlva összeházasodtak Budapesten, a fejükbe vették, hogy nálam doktorálnak. Ugyancsak hosszú történet kerekedne, ha elmesélném, hogy ezt az elképzelésüket miképpen valósítottuk meg. Egy szó, mint száz, eljöttek Magyarországra, és a Gödöllői Biotechnológiai Központban az irányításom mellett végzett ötévesi küzdelmes munka árán doktoráltak. Témájuk a sivatagi sáska hemolimfájából általuk izolált két kisméretű szerinproteáz-inhibitornak, az SGCI (*Schistocerca gregaria chymotrypsin inhibitor*) és SGTI (*S. gregaria trypsin inhibitor*) peptidek biokémiai vizsgálata volt