

Doktori (PhD) értekezés tézisei

A humán T-limfotróp leukémia vírus 1, -2 és -3 proteázok biokémiai karakterizálása, valamint dohányfüst toxin és hasnyálmirigy lipáz mutáció, mint krónikus pankreatitisz kockázati tényezők vizsgálata

Kassay Norbert

Témavezető: Prof. Dr. Tózsér József



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2024.

**A HUMÁN T-LIMFOTRÓP LEUKÉMIA VÍRUS 1, -2 ÉS -3
PROTEÁZOK BIOKÉMIAI KARAKTERIZÁLÁSA, VALAMINT
DOHÁNYFÜST TOXIN ÉS HASNYÁLMIRIGY LIPÁZ MUTÁCIÓ,
MINT KRÓNIKUS PANKREATITISZ KOCKÁZATI TÉNYEZŐK
VIZSGÁLATA**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Kassay Norbert, okleveles biotechnológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Sejt- és Immunbiológia doktori
iskolája keretében.

Témavezető: Dr. Tózsér József, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Dr. Balogh István, az MTA doktora
tagok: Dr. Ambrus Attila, az MTA doktora
Dr. Dombrádi Viktor, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja: 2025.02.12. 10 óra
Debreceni Egyetem, ÁOK Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet
könyvtára

Az értekezés bírálói: Dr. Kiss Andrea, PhD
Dr. Pongrácz Judit, az MTA doktora

A bírálóbizottság: elnök: Dr. Balogh István, az MTA doktora
tagok: Dr. Ambrus Attila, az MTA doktora
Dr. Dombrádi Viktor, az MTA doktora
Dr. Kiss Andrea, PhD
Dr. Pongrácz Judit, az MTA doktora

Az értekezés védésének időpontja: 2025.02.12. 12 óra
Debreceni Egyetem ÁOK Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme

1. BEVEZETÉS

1.2. Retrovírusok

1.2.1. A deltaretrovírusok

A humán T-limfotróp vírusok (HTLV) a retrovírusok delta nemzetségébe tartoznak a marha leukémia vírussal (BLV) és a „*simian*” T-limfotróp vírusokkal (STLV) egyetemben, utóbbival együtt alkotva a „*primate*” T-limfotróp vírusok (PTLV) csoportját. A humán patogén retrovírusok közül a HTLV-1-et fedezték fel elsőként. Ezt nem sokkal később követte a HTLV-2, valamint a lentivírus nemzetségbe tartozó humán immundeficiencia vírus 1 (HIV-1) izolálása. Később a T-limfotróp vírusok további tagjait, a HTLV-3 és a HTLV-4 vírusokat is azonosították.

1.2.2. A retrovírusok szerkezete

A retrovírusok között megkülönböztetünk egyszerű és összetett retrovírusokat. A HTLV az utóbbiak közé tartozik, így az esszenciális *gag*, *pol* és *env* fehérjéken kívül más, kiegészítő és szabályozó fehérjéket is kódol. A 100 nm-es átmérőjű vírus lipid burokkal rendelkezik, amely felszínén az *env* gén által kódolt glikoproteinek heterodimerjei is kifejeződnek. A *gag* gén a szerkezeti mátrix (MA), kapszid (CA) és nukleokapszid (NC) fehérjéket, míg a *pol* gén a nem-szerkezeti fehérjéket, így a reverz transzkriptáz, az integráz (IN) és a proteáz (PR) enzimeket kódolja. A fertőzőképes virion tartalmazza még a pozitív szálú virális RNS genomot is.

A HTLV-1 genomját két hosszú terminális ismétlődés (*long terminal repeat*, LTR) fogja közre, az 5' LTR számít a fő promóternek, ebből az irányból íródik át a Gag, Gag-Pro és a Gag-Pro-Pol poliprotein a -1 irányú kereteltolódás (*frameshift*) függvényében. A *gag* gén által kódolt Gag fehérjéből a retrovirális PR általi hasítással jönnek létre a funkcióképes MA, CA és NC fehérjék. A Gag-Pol prekurzorból a nukleokapszid helyett az úgynevezett „*transframe protein 1*” (TF), a PR és két kisebb fehérje a p1 és p2 processzálódik. A Gag-Pro-Pol poliproteinből hasítódik ki a MA, CA, TF, PR és a p1 mellett a RT, az RNáz H és az IN is. Az *env* gén az envelope glikoprotein elemeit kódolja, amelyek proteolitikus hasítás által transzmembrán (TM) és a felületi alegység (SU) fehérjékre tagolódik. A 3'

LTR közelében fejeződnek ki a pX régió által kódolt fehérjék, a p12, p13, p30, a p8, ami a p12 proteolitikus hasításából származik, valamint a transzaktivátor fehérje (tax), rex vagy az antisense HTLV-1 bZIP faktor (HBZ) fehérjék. A HTLV-2 és HTLV-3 genomi organizációja a HTLV-1-gyel főbb elemeiben megegyezik, különbségek a pX régió esetében találhatóak.

1.2.3. A HTLV vírusok életciklusa

A HTLV vírusok életciklusa nagymértékben hasonló, viszont a HTLV-3 esetében ez még kevésbé feltárt. Elsősorban T-sejteket fertőznek, de képesek más immunsejtekbe is bejutni. A HTLV-1 a CD4, a HTLV-2 a CD8 T-sejteket preferálja, míg a HTLV-3 hasonló mértékben képes megfertőzni mindkettő sejtípust. A fertőzést sejtfelszíni receptorhoz való kötődés előzi meg. A membránnal való fúziót követően megtörténik a virális RNS reverz transzkripciója duplaszálú DNS-sé, amelyet a kapszid mag megmaradt részeiből kialakult úgynevezett preintegrációs komplex kialakulása követ, amely képes bejutni a sejtmagba, majd a gazdasejt genomjába integrálódni. Ezt követően a gazdasejt apparátusát felhasználva megkezdődik a virális poliproteinek translációja és expressziója. A gag poliproteinek a plazmamembrán irányába transzlokálódnak, ahol megkezdődik oligomerizációjuk és a virion összeszerelődése. A virális proteáz funkcionális egységekre hasítja a poliproteineket, így megtörténhet a vírus érése, majd a vírus jellemzően sejt-sejt kapcsolaton keresztül bejut egy másik sejtbe vagy lefűződik.

A fertőzés későbbi szakaszában inkább a klonális expanzió a jellemző. A HTLV-1 viszonylag alacsony variabilitása (egy egyénben) is azt támasztja alá, hogy a genomi DNS-be beépülve, azzal együtt, mitotikus osztódással szaporodik, vagyis a virális örökítőanyag replikációját a magasabb hibaráttával működő reverz transzkriptáz helyett, a celluláris DNS polimerázok végzik.

1.2.4. A HTLV proteáz

A HTLV-1 proteázt először 1989-ben izolálták, ezt több *in vitro* tanulmány is követte, ahol megfigyelték a gag poliprotein hasadását és

azonosították a MA, CA és NC fehérjéket. Később a MA/CA, CA/NC, TF1/PR, PR/p1, p1/RT, RT/RH és RT/IN hasítóhelyeket is meghatározták.

A HTLV-1 PR a 99 aminosavból álló HIV-1 PR-nál hosszabb, 125 aminosavat tartalmaz. Az „extra” aminosavak legnagyobb része a C-terminálison található, főleg hidrofób aminosavakból áll és csak a deltaretrovírusokra jellemző. A C-terminálison található aminosavakról megállapították, hogy az autoproteolízishoz legalább öt aminosav jelenléte szükséges (G111-L115). Az *in vitro* expresszálandó HTLV-1 PR hajlamos az autoproteolízisre, ezért a legtöbb kutatásban az L40I stabilizált mutánszt vagy egy további mutációt is tartalmazó fehérjét (C90A, C109A) vizsgálják. Egyes vizsgálatok az L40I stabilizáló mutációt és az N-terminálison His fúziós címkét tartalmazó 115 aminosav hosszúságú HTLV-1 PR esetében a teljes hosszúságú fehérjéhez hasonló enzimaktivitást tapasztaltak. Később munkacsoportunk is vizsgálta a vad típusú PR-t és egy stabilizáló mutációkat (L40I, C90A és C109A) tartalmazó fehérjét is, amelyek 125, 120 és 116 aminosav hosszúságúak voltak, de csak a teljes hosszúságú és az öt aminosavval rövidített proteáznál figyeltek meg aktivitást és megállapították, hogy P116-L125 aminosavaknak a dimer stabilizálásában lehet fontos szerepe. A retrovirális proteázok dimerizációjában a β -redős dimerizációs felszín kialakító N- és a C-terminálisok mellett a D-S/T-G-A konszenzus aktív hely motívum aminosavai által kialakított H-kötések rendszer, az úgynevezett tűzoltófogás („*fireman's grip*”) is fontos szerepet játszik. A HTLV-1 PR a lebeny („*flap*”) régióban a HIV-1 PR-hoz képest két extra aminosavat tartalmaz, így egy kiterjedtebb szubsztrátkötő helyet alakít ki és megtöri a lebeny hajtú struktúráját a hidrogén kötések megszakításán keresztül, ezzel egy hélix-szerű struktúrát eredményez.

A HIV-1 és a HTLV-1 PR között a teljes szekvencia tekintetében csak ~28% az azonosság, ennek ellenére röntgen krisztallográfiai elemzések szerint nagy a szerkezeti hasonlóságuk. Ez egyrészt az aktív hely konzerváltságából fakad, ott nagyobb fokú, 45%-os az azonosság. Másrészt, a dimerizációban részt vevő aminosavak esetében a variabilitás alacsony. A konzervált aminosavaknak a negyedleges szerkezet fenntartásában, a fehérje megfelelő feltekeredésében és dinamikai jellemzőinek kialakításában is fontos szerepük lehet.

A HIV-1 proteázhoz hasonló módon a HTLV-1 PR esetében sem ismert konszenzus hasítóhely szekvencia, a természetes hasítóhelyeket változatos szekvencia jellemzi, de túlsúlyban vannak bennük a hidrofób oldalláncok, illetve az autoproteolitikus hasítóhelyek többségében a P1 helyen leucin található, akárcsak a többi HTLV PR-nál. A proteázban hét szubsztrátkötő zsebet különböztetünk meg (S4-S3'). A szubsztrát aminosavak és a szubsztrátkötő helyek elnevezésénél a Schechter és Berger (1967) által meghatározott nomenklatúrát alkalmazzuk.

Az S4 szubsztrátkötő zseb viszonylag nagy és főleg hidrofób aminosavakból áll, ellentétben a HIV-1 PR-ra jellemző hidrofil alhellyel. A retrovirális proteázok közös jellemzője, hogy az S4 zseb a fehérje felszínéhez közel helyezkedik el, nyitott és a többi zsebbel képest kevésbé jól definiálható. A HTLV-1 PR S3 zsebe szintén jelentősen eltér a HIV-1 PR-tól, az S4 zsebbel hasonlóan viszonylag nyitott, így könnyebben tud interakcióba lépni hidrofil és hidrofób oldalláncokkal is. A HIV-1 PR S3 szubsztrátkötő zsebe zártabb, mélyebb, a szubsztrátkötésben több aminosav vesz részt. Ezzel ellentétben az S2 zseb hidrofób karakterisztikájú, viszonylag kis méretű, hasonlóan a legtöbb retrovirális proteázhoz. A legnagyobb különbség a HIV-1 PR-hoz képest, hogy a D30 (aszparaginsav) aminosavnak megfelelő pozícióban a HTLV-1 PR metionint tartalmaz (M37), előbbi csak az immundeficiencia vírusokra jellemző (HIV, SIV), míg a legtöbb retrovirális proteáz hidrofób oldallánccal rendelkezik ezen a helyen. Az S1 zseb nagy méretű mindkét proteáz esetében. A HTLV-1 S1 zsebet kettővel több aminosav alkotja, a zsebet kialakító aminosavakban pedig két helyen van eltérés. A retrovirális proteázokra általánosságban jellemző, hogy a hasítóhelytől távolabb eső szubsztrátkötő helyek viszonylag variábilisak, mind a résztvevő aminosavak számában és minőségében, mind a kötődő szubsztrát aminosav oldallánc tekintetében. A hasítóhelyhez közeledve a zsebek egyre konzerváltabbak beleértve a HTLV-1 és HIV-1 proteázokat is.

A legtöbb retrovirális proteázokkal foglalkozó tanulmányban a természetes hasítóhelyeket reprezentáló oligopeptideket alkalmazzák szubsztrátként. Legrészletesebben a HIV-1 PR-t vizsgálták, a deltaretrovírusok közül eddig csak a HTLV-1 és BLV proteázok aktivitását kutatták. A jelenlegi irodalmi adatok azt mutatják, hogy a HTLV-1 PR a

HIV-1 PR-nál jelentősen szűkebb specificitással rendelkezik. Retrovirális proteáz hasítóhelyeket tartalmazó szubsztrátokkal végzett mérés-sorozatoknál, amely során a HIV-1 és HTLV-1 mellett a HIV-2, a ló vészes vérszegénységét okozó vírus (EIAV), a rous szarkóma vírus (RSV), a Mason-Pfizer majom vírus (MMTV), a BLV és a rágcsáló leukémia vírus (MuLV) hasítóhelyeit is vizsgálták, azt figyelték meg, hogy a HIV-1 PR a szubsztrátok jelentős részét hasította, ez alól kivételt csak egyes MuLV és RSV hasítóhelyek jelentettek, míg a HTLV-1 PR a vizsgált szubsztrátok csak mintegy 40%-át hasította. Ezzel szemben hasonló szubsztrát-sorozaton mért adatok szerint a BLV PR a HIV-1 PR-hoz hasonló specificitással rendelkezik. Ezt a megállapítást erősítik a HTLV-1 CA/NC hasítóhellyel végzett kísérletek is, ahol a hasítóhelyet egy-egy ponton módosították a P4-P1' helyeken. Habár a HTLV-1 PR a szubsztrátok jelentős részénél mutatott katalitikus aktivitást, a P2-P1' helyeken kevésbé tolerálta az aminosav cserét, ellentétben a BLV PR-zal. Specificitást tekintve a BLV PR nagyobb hasonlóságot mutat a HTLV-1 PR-hoz, a HIV-1-hez képest nagyobb hatékonysággal és szélesebb specificitással hasította a HTLV-1 CA/NC oligopeptideket, valamint az P2 és P1 helyeken a HTLV-1 PR-hoz hasonlóan jobban preferálta a nagy, hidrofób aminosav oldalláncokat.

A HTLV-1 okozta megbetegedéseket a vírus altípusától és a betegség progressziójának minőségétől függően jellemzően konvencionális kemoterápiával, a zidovudine (AZT) és az interferon-alfa (IFN) kombinációjával, vagy hematopoetikus őssejtek beültetésével kezelik. A HIV-1 terápiában elért sikereket nagyrészt specifikus gyógyszerek alkalmazásával érték el. A HTLV-1-gyel kapcsolatos kutatásokban is rendre előkerülnek ilyen lehetőségek, eddig alacsony terápiás hatékonysággal. A stratégiák egyrészt a HIV-1 ellenes terápiában sikeresen alkalmazott célpontokat igyekeznek a HTLV-1 esetén is előtérbe helyezni, tehát a vírus sejtbe való bejutását megakadályozni az *envelope* glikoproteinek vagy receptoraik támadásával, illetve a vírus életciklusában szerepet játszó enzimek, a reverz transzkriptáz, az integráz és a proteáz működését tervezik gátolni inhibitorok fejlesztésével. A HIV-1 elleni terápia esszenciális részét képezi a proteáz inhibitorok alkalmazása, amelyeket eddig nem tudtak sikeresen alkalmazni a HTLV-1 elleni terápiában, ami az *in vitro* kísérletekben tapasztalt magas inhibíciós állandó (K_i) értékekkel is

magyarázható. Az eddig szerzett tapasztalatok alapján szükséges a HTLV-1-re specifikus gátlók fejlesztése.

1.3. A krónikus pankreatitisz és rizikófaktorai

1.3.1. A krónikus pankreatitisz

A krónikus pankreatitisz (KP) a pankreász krónikus gyulladása, ami a folyamatosan fennálló gyulladás eredményeként alakulhat ki. Jellemző jelei a parenchimális vagy intraduktális kalcifikáció, pankreatikus fibrózis, az exokrin és endokrin állomány elégtelen működése, így együtt jár egyes emésztőenzimek hiányával vagy megváltozott viselkedésével, valamint az endokrin mirigyek elvesztését is okozhatja. Ezek eredményeképpen emésztési nehézségek, diabétesz és fájdalom alakulhatnak ki, az életminőség jelentős romlását okozva, valamint a várható élettartam is csökken. A betegség nem fordítható vissza, de a progressziója és a tünetek súlyossága enyhíthető.

1.3.2. Örökletes pankreatitisz

A KP-t genetikai tényezők is kiválthatják. Örökletes pankreatitist egyes, az acinus sejtek által szekrécióna termelt emésztőenzimek vagy azokkal szoros kapcsolatban lévő fehérjék mutációi okoznak. Leggyakrabban a kationos tripszin kódoló *PRSSI* az érintett gén.

A tripszin központi szerepet tölt be a pankreász által kódolt emésztőenzimek működésében. Az enzimek aktivációja a patkóbélben történik. A folyamat a vékonybélben termelt enterokináz általi hasítással kezdődik, ami a tripszinogént tripszinné alakítja.

A tripszinhez hasonlóan más emésztőenzimek is inaktív, zimogén formában szekretálódnak, aktivációs peptidet tartalmaznak az N-terminálisukon. Ezt követően a keletkező tripszin is képes a tripszinogén aktiválására. Az enterokináz szűk specificitással rendelkezik, az emésztőenzimek közül kizárólag a tripszinogén aktivációját végzi, a többi zimogén fehérjét (kimotripszinogén, karboxipeptidáz, proelasztáz, profoszfolipáz, kallikreinogén, prokolipáz) a tripszin aktiválja, azok autoaktivációra nem képesek. A tripszin működése az aktiváción kívül a szintén acinus sejtek által termelt SPINK1 inhibitorral és a kimotripszinogén C-vel (CTRC) is szabályozott.

1.3.3. Endoplazmatikus retikulum stressz

A pankréász acinus sejtei által termelt emésztőenzimek mutációi a fehérje nem megfelelő feltekerődését is okozhatják, ezzel szekréciós defektust is képesek okozni, amely a fehérjék sejten belüli felhalmozódásával is együtt járhat és az így termelődött fehérjék a proteosómális vagy az autofágiás útvonalakba is bekapcsolódhatnak. A legtöbb esetben ezen fehérjék termelődése együtt jár az ER stressz mértékének növekedésével is. Az erre adott sejtes stresszválaszt az úgynevezett „*unfolded protein response*” (UPR) néven írhatjuk le, amely egy, olyan szignalizációs útvonal, amelynek célja a sejtes homeosztázis visszaállítása, viszont a hosszú idejű, feloldatlan stressz sejthalálhoz vezethet.

Az UPR-nek három fő útvonala ismert, az „*inositol requiring enzyme-1*” (IRE1), a „protein kináz RNS-szerű ER kináz” (PERK) és az „aktiváló transzkripciós faktor 6” (ATF6). Közös jellemzőjük, hogy az ER membránban komplexként vannak jelen és „*binding immunoglobulin protein*” (BiP) fehérjét kötnek, amely az útvonalak aktiválódásának hatására szabadabbá válik és chaperonként viselkedve képes a nem megfelelően feltekeredett fehérjékhez kapcsolódni.

Az ER stressz a reaktív oxigén gyökök (ROS) által is képes aktiválódni. A sejtekben a normál működés során is termelődik ROS, amely elsősorban a mitokondriumban és az ER-ban halmozódik. A fehérjék feltekerődése az ER-ban történik, ahogy a diszulfid-hidak kialakítása is, amely együtt jár ROS képződéssel. A folyamat a protein diszulfid izomeráz (PDI) ERO1 általi oxidációjával indul, majd a feltekerendő fehérje tiol csoportja reagál az oxidált PDI-vel. Az ERO1 molekuláris oxigént használ akceptorként, így hidrogén-peroxid képződik. A redukált PDI-t nem csak az ERO1, hanem a GSSG is oxidálhatja a GSH:GSSG aránytól függően. A PDI nem csak a névadó PDI vagy PDI1 diszulfid izomerázt takarja, ez egy enzimsalád, amelyek az itt leírt funkciótól eltérő mechanizmusokkal is rendelkeznek, jelentős részük chaperonként is működik, ez magyarázhatja az ER stressz során megemelkedett szintjüket, valamint egyes tagjai (ERP57, ERP72, P5) a PDI-vel közel megegyező mennyiségben vannak jelen.

Az UPR és az oxidatív stressz szoros kapcsolatban áll egymással. A tartósan magas ROS szint a fehérjék oxidálását, így rossz feltekerődését is

okozhatja, ezzel erősebb választ indukálva. Egyes mutáns fehérjék nem megfelelő feltekerődési mechanizmusa beindíthatja az UPR választ, az oxidatív feltekerődési folyamatokba újra-újra bekapcsolódik, ezzel kimerítve a GSH készletet ROS felhalmozódáshoz vezetve. Szoros kapcsolatukat az is bizonyítja, hogy a PDI esszenciális aktivátora a PERK útvonalnak, az ERP72 pedig az ATF6 UPR válaszhoz szükséges.

A "*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*" (Nrf2) központi szerepet tölt be az ER stressz és oxidatív stressz szabályozásában. Az UPR útvonalban aktiválódhat a PERK foszforilálódásával az ATF4, JNK fehérjéken keresztül, valamint az oxidatív stresszre adott válaszként is. Transzkripció faktoroként indukálja a redox homeosztázisban részt vevő gének átíródását. Ezek egyike az NAD(P)H kinon dehidrogenáz 1 (NQO1), amely a stresszre adott válaszként redukázként funkcionál, amelyhez az aktív centrumában található FAD-on keresztül a NAD(P)H-t használja donorként. Emellett ismert a szerepe bizonyos fehérjék stabilizációjában és egyes fehérjék mRNS-ének kötésével azok szabályozásában is részt vesz.

1.3.4. Aberráns fehérje útvonal

A hasnyálmirigy által termelt, normál esetben szekretálódó fehérjék feltekerődési defektusa legtöbbször együtt jár az UPR válasz aktiválódásával, ami a CHOP (C/EBP homológ fehérje) transzkripció növekedéséhez és apoptózishoz vezethet.

Habár a legtöbb kationos tripszin variáns megfelelően szekretálódik, ezen az útvonalon is képesek pankreatitist okozni. Egyes nem-szekretálódó mutánsok az ER stressz kiváltása mellett a sejten belül auto-aktiválódnak, ezzel programozott sejthalált indukálva.

A tripszin mellett más emésztőenzimeket is érintenek a nem megfelelően feltekerődött fehérjét eredményező mutációk. Az így termelődött fehérjék hatása viszont a tripszintől független, elsősorban az UPR-re vezethetőek vissza. Ezek között megemlíthető a CTRC, CPA1, CEL, viszont a feltekerődési defektus más szekréciós fehérjét is érinthet, a stresszválasz súlyossága a termelődő fehérje mennyiségével lehet kapcsolatban. A SPINK-1 mutánsok kivételt képeznek a csoportban, ugyanis nem funkcionális inhibitoroként nem képes gátolni a tripszin aktiválódását,

ennek ellenére a G48E, D50E, Y54H és R67C mutánsokat még nem hozták összefüggésbe hasnyálmirigy gyulladással.

1.3.5. Humán pankreász lipáz

A humán pankreász lipáz (PNLIP) a kationos tripszinhez hasonlóan nagy mennyiségben szekretálódik a hasnyálmirigyben, majd a vékonybélben katalizálja a trigliceridek hidrolízisét zsírsavakká, rövidebb és hosszabb láncú trigliceridek hasítását is hatékonyan végzi. Működését a kolipáz segíti, ezzel ellentétes hatást fejtenek ki az epesavak, melyek a lipáz aktivitást képesek gátolni. Habár a kolipáz és az epesavak nem esszenciálisak, a trigliceridek hatékony emésztéséhez és felszívódásához elengedhetetlenek.

A PNLIP számos mutációja ismert. Egyes variánsok lipáz deficienciát okoznak, ami együtt jár az étkezéssel bevitt lipidek felszívódási zavarával. A KP-szel még nem hozták egyértelműen kapcsolatba, viszont több mutáció is nagy kockázatot hordoz magában. Egyes variánsok nagyobb aktivitással rendelkeznek, mások nem megfelelően szekretálódnak. Utóbbi mutációkat a T221M kivételével csak heterozigóta formában detektálták és nem hozták kapcsolatba KP-szel. Egyes mutációk érzékenyebbé tehetik a PNLIP fehérjét a kationos tripszin és a CTRC általi degradációra, egyes nem alkohol-indukált KP-ben szenvedő betegekben megtalálhatóak ilyen protein variánsok, viszont a KP és a mutációk közötti kapcsolatot még nem tárták fel. A nem-szekretálódó PNLIP variánsok esetében (A174P, T221M, G233E, C254R és V454F) bebizonyosodott azok ER stresszt fokozó hatása is. Ezek közül több mutáció is az aktív hely közelében található, a G233 a β 9 huroknak is a része. Az eddigi kísérletek HEK és AR42J sejtvonalakon *in vitro* vizsgálták ER-ra kifejtett hatást. Mind az öt fehérje variáns esetében megfigyelhető volt az XBP-1 mRNS érés fokozódása, valamint a BiP mRNS szintjének növekedése. Az AR42J patkány acinus sejtvonal esetében ezek a hatások intenzívebbek voltak, amit magyarázhat a sejt viszonylag kiterjedt ER-a.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Eddig számos tanulmány vizsgálta a HTLV-1 és a HTLV-2 vírusok közötti eltéréseket. Ezek főleg a szabályozó fehérjék, a szignál útvonalak és a patogenikus kimenetek közötti különbségekre tértek ki. A HTLV-3-ra vonatkozóan csak korlátozott mennyiségű információ áll rendelkezésre és a HTLV proteázok közötti különbségeket korábbi közlemények sem tárgyalják. Habár a HTLV-1 PR esetében már jelentős mennyiségű kísérletes adat áll rendelkezésre, a HTLV-2 elterjedtsége és a HTLV-3 által jelentett egészségügyi kockázat miatt is szükségessé vált a HTLV-2 és HTLV-3 PR-ok vizsgálata. Munkánk során meghatározott főbb céljaink az alábbiak voltak:

- a HTLV-2 és HTLV-3 PR expressziójának és tisztításának optimalizálása
- a HTLV-1, HTLV-2 és HTLV-3 proteázok szubsztrát-specifitásának és gátolhatóságának vizsgálata
- a HTLV-2 és HTLV-3 proteázok autoprocesszálo képességének vizsgálata

Az örökletes krónikus pankreatitisz kialakulását többek között a nem megfelelően feltekeredett, normál esetben szekretálódó fehérjék mutációi okozhatják, de a dohányzás, mint ettől független rizikó faktor is jelen lehet. Feltételeztük, hogy a dohányzás és a genetikai rizikófaktorok együttes jelenléte egymás hatását erősítheti. Vizsgálati modellünkben a genetikai tényezőt egy eddig kevésbé tanulmányozott humán hasnyálmirigy lipáz (PNLIP) variáns (G233E) reprezentálta. Hipotézisünket egy humán (HEK293AD) és egy patkány hasnyálmirigy sejtvonal (AR42J) alkalmazásával kívántuk igazolni. Célunk volt:

- a főbb cigarettafüst komponensek és a PNLIP mutáció hatásának vizsgálata a sejtek életképességére
- endoplazmatikus retikulum stressz markerek vizsgálata
- a HQ és a G233E PNLIP mutáció közötti asszociáció vizsgálata

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. HTLV proteázok karakterizálása

3.1.1. HTLV-1, HTLV-2 és HTLV-3 proteázok expressziója

A HTLV-1 PR expressziójához az enzim kódoló szekvenciájának pET11a expressziós plazmidba klónozott stabilizált (L40I, C90A és C109A) változatát használtuk fel. A HTLV-2 PR termeléséhez egy bakteriális expresszióra kodon-optimalizált szekvenciát rendeltünk. A HTLV-3 PR esetében a Pyl43 törzs kodon-optimalizált szekvenciáját alkalmaztuk. A proteáz szekvenciáját pCR2.1-TOP0 plazmidból klónoztuk pET11a expressziós vektorba az NdeI és BamHI restriktions endonukleázok segítségével.

Az expressziós plazmidokat BL21(DE3) *E. coli* sejtekbe transzformáltuk hősokkal. A transzformált sejteket ampicillinnel kiegészített Luria-Bertani (LB) médiumban növesztettük, a fehérje expressziót 1 mM izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid (IPTG) hozzáadásával indukáltuk.

3.1.2. HTLV-1, HTLV-2 és HTLV-3 proteázok tisztítása

Az expressziót követően a sejteket centrifugálással gyűjtöttük be. A sejteket „A” pufferbe (50 mM Tris-HCl, 1 mM ditiotreitolt (DTT), 1 mM etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA), pH 8,2) oldottuk, majd szonikálással tártuk fel. Ezt egy ultracentrifugálási lépés követte. A zárványtesteket tartalmazó pelletet ezt követően „B” pufferbe oldottuk (50 mM Tris-HCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 1 v/v % Triton X-100, pH 8,2). Ez a tisztítási lépés a korábban HTLV-1 PR-ra leírt módszerben nem volt jelen. Két centrifugálási lépést követően a pelletet „C” pufferben oldottuk fel (50 mM Tris-HCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 1 v/v % Triton X-100, 1 M urea, pH 8,2), végül a pelletet szolubilizáltuk „D” pufferben (50 mM Tris-HCl, 7,5 M guanidin-HCl, 5 mM DTT, 5 mM EDTA, pH 8,2). A fehérjéket SDS-PAGE segítségével választottuk el.

A szolubilizálást követően a fehérjéket reverz-fázisú HPLC módszerrel Äkta Purifier készüléken POROS R2 oszlopon tisztítottuk. A szeparáláshoz növekvő víz/acetonitril (0-100%) grádienszt alkalmaztunk 0,05% trifluoroacetát (TFA) jelenlétében. Az eluált frakciók tisztaságát

SDS-PAGE segítségével ellenőriztük. A legnagyobb tisztaságú (>90%) frakciókkal dolgoztunk tovább.

Az enzimek megfelelő feltekeredését „E” puffer ellenében történő dialízissel biztosítottuk (20 mM piperazin-N, N'-bisz(2-etánszulfonsav) (PIPES), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 10 v/v % glicerol, 0,5 v/v % NP-40, 5 mM DTT, pH 7,0).

3.1.3. Oligopeptidek és inhibitorok

HTLV-1, HTLV-2 és HTLV-3 PR hasítóhelyeket reprezentáló szintetikus oligopeptideket alkalmaztunk szubsztrátként. Kísérleteink során a MA/CA, a CA/NC, a TF1/PR és a PR/p1 hasítóhelyeket, illetve a vad típusú és P4, P3, P2, P1 vagy P1' helyen módosított HTLV-1 MA/CA (KTKVL*VVQPK) hasítóhelyet tartalmazó oligopeptideket vizsgáltunk.

Az IB-268 (KTKVL-r-VVQPK) és IB-269 (APQVL-r-PVMHP), redukált peptidkötést tartalmazó inhibitorokat Dr. Ivo Blaha (Ferring Leciva, Prága, Csehország) szintetizálta és bocsájtotta rendelkezésünkre. A DMP-323 (a HIV-1 PR egy szorosan kötődő inhibitora) valamint a HIV-1 ellenes terápiában jelenleg is vagy korábban alkalmazott inhibitorok (atazanavir, darunavir, indinavir, ritonavir és saquinavir) kutatócsoportunkban már rendelkezésre álltak.

3.1.4. HTLV-1, HTLV-2 és HTLV-3 proteázok aktivitásának vizsgálata

A kinetikai vizsgálatokhoz 10 µl 2x töménységű inkubációs puffert (0,5 M K₃PO₄, 4 M NaCl, 10 v/v % glicerol, 10 mM DTT, pH 5,6), 5 µl HTLV-1, HTLV-2 vagy HTLV-3 proteázt és 0,5-5 µl természetes HTLV PR hasítási helyet reprezentáló oligopeptid szubsztrátot alkalmaztunk. A reakció végtérfogata 20 µl volt. A reakciókat az enzim hozzáadásával indítottuk el és 37°C-on 0,5-4 órán át inkubáltuk, majd TFA hozzáadásával állítottuk le.

A további, HIV-1, EIAV, RSV, MMTV, MPMV, MuLV és BLV proteáz hasítóhelyeket tartalmazó szubsztrátok esetében hosszabb (24 óra) inkubációs időt alkalmaztunk.

A hasítási termékeket és a szubsztrátot Nova-Pack C18 RP-HPLC oszlopon választottuk el egymástól LaChrom készüléken. A szeparáláshoz 0-100% víz-acetonitril grádiens alkalmaztunk 0,05% TFA jelenlétében.

A kinetikai paramétereket a szubsztrátra és a kapott termékekre számított csúcs alatti terület értékek alapján, az adatok Michaelis-Menten egyenletre illesztésével határoztuk meg. A pH optimum meghatározásához Gauss egyenletet, míg a NaCl koncentráció és a hőmérséklet optimumának meghatározásához lineáris regressziót alkalmaztunk. A k_{cat}/K_M katalitikus konstansok kiszámításához figyelembe vettük az aktív enzim koncentrációját, amelyet aktív centrum titrálással határoztunk meg egy korábban leírt módszer alapján.

3.1.5. HTLV-1, HTLV-2 és HTLV-3 proteázok számára optimális pH, hőmérséklet és ionerősség meghatározása

A pH, a hőmérséklet és az ionerősség hatásának vizsgálatához az enzimreakciókat 2x META pufferben (100 mM MES [2- (N-morfolino)-etánszulfonsav], 200 mM Tris, 100 mM nátrium-acetát) végeztük. A reakcióelegyek 10 μ l puffert, 5 μ l enzimet és 5 μ l szubsztrátot tartalmaztak. A reakciókat az enzim hozzáadásával indítottuk el, az inkubálás és a reakcióközegek vizsgálata a HTLV-1, HTLV-2 és HTLV-3 proteázok aktivitásának vizsgálata részben leírtak szerint történt.

A HTLV-1, HTLV-2 és HTLV-3 PR vizsgálatához HTLV-1 PR/P1, HTLV-2 PR/P1 és HTLV-3 TF1/PR hasítóhelyeket reprezentáló oligopeptid szubsztrátokat használtunk. A NaCl hatását 0-2 M koncentráció tartományban vizsgáltuk, a pH optimum meghatározásához 4,5-8,0 pH-jú puffereket használtunk, míg a hőmérsékleti optimum meghatározását 20-40°C közötti hőmérsékleteken vizsgáltuk.

3.1.6. HTLV-2 és HTLV-3 proteázok aminosav preferenciáinak meghatározása

A HTLV-1, HTLV-2 és HTLV-3 PR aminosav preferenciájának összehasonlításához a HTLV-1 PR vad típusú CA/NC hasítási helyet (KTKVL*VVQPK) reprezentáló szubsztrátot, illetve annak P4, P3, P2, P1 és P1' helyen módosított variánsait alkalmaztunk. Annak tanulmányozására, hogy az S5 és S4 zsebek részt vesznek-e a szubsztrát felismerésében, az előzőektől (P5-P5') rövidebb szubsztrát variánsokat (P4-P5' és P3-P5') is vizsgáltunk. Az enzimreakciókat a HTLV-1, HTLV-2 és HTLV-3 PR-ok aktivitásának vizsgálata részben leírt módon végeztük. A 20 μ l-es

reakcióelegy 10 µl 2x inkubációs puffert, 5 µl HTLV-1, HTLV-2 vagy HTLV-3 PR-t (az aktív enzimek végkoncentrációja 0,1-34,4 nM értékek között változott) és 5 µl szubsztrátot (0,4-0,5 mM végkoncentráció) tartalmazott. A reakciókat az enzim hozzáadásával indítottuk el, amit 0,5-4 óra inkubáció követett 37°C-on. A reakciókat TFA hozzáadásával állítottuk le. Minden szubsztrát esetében relatív aktivitás értékeket határoztunk meg. A kapott értékek összehasonlítása során minden esetben a KTKVL*VVQPK szubsztrátra kapott értéket tekintettük 100%-nak.

3.1.7. HTLV-1, HTLV-2 és HTLV-3 proteázok gátolhatóságának vizsgálata

A reakcióelegy 4,8 µl szubsztrátot, 0,2 µl inhibitor, 5 µl enzimet (HTLV-1, HTLV-2 és HTLV-3 PR) és 10 µl 2x inkubációs puffert tartalmazott. A szubsztrátok a HTLV-2 és HTLV-3 MA/CA hasítási helyet reprezentálták. A HIV-1 PR inhibitorok esetén 100 µM-os törzsoldat koncentrációt, míg az IB-268 és IB-269 inhibitorok esetében 0,5-100 µM-t alkalmaztunk. Az inhibitorokat DMSO-ba oldottuk, ezért 0,2 µl DMSO-t adtunk a kontroll mintákhoz. Az IB-269 inhibitor alkalmaztuk az aktív enzim mennyiségének meghatározásához.

3.1.8. HTLV-2 és HTLV-3 proteázok irányított mutagenézise

A HTLV-2 és HTLV-3 PR kódoló szekvenciákat az N-terminálison kiegészítettük egy 8 aminosavból álló linkerrel, amely megfeleltethető a TF1/PR természetes hasítási hely P8-P1 aminosavainak. Az így kapott szekvenciát pMALc2x vektorba klónoztuk, amely lehetővé tette, hogy a fehérje, az N-terminálison maltóz-kötő fehérjével (MBP) fuzionált formában termelődhessen. A klónozást „*overlap extension*” PCR módszerrel végeztük, a PCR terméket EcoRI és BamHI restriktív endonukleázokkal emésztettük, majd ligáltuk a pMALc2x vektorba. Ezt a HTLV-2 (L37D, L37N, L57G, A59I és F67Q) és a HTLV-3 PR (I37D, I37N, L57G, A59I és F67Q) helyspecifikus mutagenézise követte QuikChange II mutagenesis kittel. A mutagenézis sikerességét szekvenálással ellenőriztük.

3.1.9. HTLV-2 és -3 proteázok autoprocesszáló képességének vizsgálata

Az expressziós konstruktokat BL21(DE3) *E.coli* sejtekbe transzformáltuk hősokkal. A rekombináns HTLV-2 és HTLV-3 proteázokat egy N-terminális MBP fúziós címkével fuzionált formában expresszáltattuk (MBP-HTLV-2 PR és MBP-HTLV-3 PR). Az expressziót 1 mM IPTG hozzáadásával indukáltuk, majd a sejteket lizáltuk szonikálás segítségével „A” pufferben. A sejtízátumokat 16%-os poliakrilamid gélen futtattuk. Az SDS-PAGE elektroforézist követően a fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A Western-blotot a kutatócsoport által korábban optimalizált protokoll alapján végeztük. A membránt 1 órán át 5%-os tejport tartalmazó TTBS oldatban (Tris-pufferelt sóoldat, pH 7,5, 0,01% Tween20) blokkoltuk. Elsődleges antitestként anti-MBP monoklonális antitestet 1:4000 hígításban (4°C, 16 óra), míg másodlagosként egy anti-nyúl HRP-konjugált antitestet 1:10000 hígításban (szobahő, 1 óra) alkalmaztunk. A fehérjéket kemilumineszcens szubsztrát segítségével detektáltuk, röntgen film felhasználásával, KODAK Medical X-ray processor 102 előhívó készülék segítségével.

3.2. A főbb cigarettafüst komponensek és a G233E PNLIP mutáció vizsgálata

3.2.1. Expressziós plazmidok és adenovírus vektorok

A PNLIP expressziójához egy korábban leírt, a PNLIP C-terminálisán egy dekahisztidin (His₁₀) fúziós címkrét tartalmazó pcDNA3.1(-) vektorba klónozott konstrukciót használtunk.

A lipáz kódoló szekvenciáját tartalmazó adenovírusokat HEK293AD humán embrionális vese sejtekben amplifikáltuk. Az adenovírusokat fagyasztás-olvasztás ciklusokkal szabadítottuk ki a sejtekből, majd anioncserélő oszlopokon tisztítottuk. Az oszlopokat 0,4 ml 0,1 M nátrium-hidroxiddal mostuk, majd centrifugáltuk (1 perc, 2000 g), ezt egy másik mosási lépés követte 0,4 ml 0,1 M nátrium-acetát pufferrel (pH 5,0) (1 perc, 2000 g). Az oszlopokat mintapufferrel (50 mM HEPES, 2 mM MgCl₂, 0,1% Tween-20, pH 8,0) ekvilibráltuk, majd centrifugáltuk. Az ekvilibrálás ismételt elvégzését követően az adenovírusokat tartalmazó sejtlyúzátumokat mintapufferrel 10x-re hígítottuk, az oszlopra pipettázuk, majd centrifugáltuk (3 perc, 2000 g). Az oszlopokat 0,2 M NaCl-dal kiegészített mintapufferrel mostuk, majd 1 M NaCl-tartalmú mintapufferrel eluáltuk. A tisztított adenovírust tartalmazó oldatokat kiegészítettük 0,1 ml 50 v/v % glicerollal, majd felhasználásig -70°C-on tároltuk. A vírus titereket IFU/ml (*infectious unit/ml*) mértékegységben határoztuk meg (AdEasy Viral Titer Kit).

3.2.2. Sejttenyésztéskultúrák és géntranszfer

A HEK293AD sejteket DMEM (magas glükóztartalmú DMEM tápoldat, kiegészítve 10 v/v % FBS, 50 U/ml penicillin és 50 µg/ml sztreptomycin oldatokkal) sejt kultúra médiumban tartottuk fenn 37°C-on sejt kultúra inkubátorban. A kísérleteket megelőző napon 12 lyukú sejttenyésztő lemezre (180000/lyuk) helyeztük a sejteket 0,5 ml médiumban. Az elágazó láncú polietilénimin (PEI) oldatot egy korábban leírt módon készítettük. A transzfekcióhoz 12 µl PEI oldatot kevertünk össze 2 µg plazmid DNS-sel, Opti-MEM médiumban. 20 perc inkubációt követően (szobahő) az elegyet hozzáadtuk a sejtekhez, majd sejt kultúra inkubátorba helyeztük a sejttenyésztő lemezt. 6 óra elteltével a médiumot eltávolítottuk, foszfáttal pufferelt sóoldattal (PBS) mostuk a sejteket, majd 50 U/ml

penicillinnel 50 µg/ml sztreptomicinnel kiegészített Opti-MEM oldatra cseréltük a felülúszót.

Az AR42J patkány acinus sejteket magas glükóz-tartalmú 20 v/v % FBS-sel, 50 U/ml penicillinnel és 50 µg/ml sztreptomicinnel kiegészített DMEM tápoldatban tartottuk fenn, 37°C-on sejt kultúra inkubátorban.

A kísérleteket megelőző napon 12 lyukú sejtenyészítő lemezre (400000/lyuk) helyeztük a sejteket 100 nM dexametazon jelenlétében. 48 órán át inkubáltuk a sejteket, PBS oldattal mostuk, majd 50 U/ml penicillinnel 50 µg/ml sztreptomicinnel kiegészített Opti-MEM oldatot helyeztünk a sejtekre és adenovírus vektorokkal (5×10^7 IFU/ml végkoncentráció) transzdukáltuk.

3.2.3. Kémiai kezelések

Az akrolein és krotonaldehid törzsoldatokat közvetlenül a kísérleteket megelőzően készítettük el. A hidrokinton vizbe oldottuk és felhasználásig -20°C-on tároltuk. A HEK293AD és AR42J sejteket 10-200 µM végkoncentrációjú oldatokkal kezeltük.

3.2.4. Életképesség vizsgálatok

Az életképesség vizsgálatokhoz MTT reagenst oldottunk PBS oldatba, 5 mg/ml koncentrációban. Eltávolítottuk a sejtekről a kondicionált médiumot, majd 1 ml, 0,1 ml 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil-tetrazólium bromiddal (MTT) kiegészített Opti-MEM tápoldatot adtunk a sejtekhez. A formazán kristályok képződéséhez a sejtenyészítő lemezt 37°C-on (10-60 perc) inkubáltuk. Ezt követően az oldatot DMSO-ra (0,2 ml) cseréltük és a kristályok beoldásához szuszpendáltuk. Az így kapott formazán-tartalmú oldatot 96-lyukú sejtenyészítő lemezre transzferáltuk és megmértük az abszorbanciát 544 nm hullámhosszon.

3.2.5. Áramlási citometria

A mérésekhez eltávolítottuk a médiumot a HEK293AD és az AR42J sejtekről, majd 0,5x töménységű tripszinnel felszedtük a sejteket a sejtenyészítő lemezről. Ezt követően a sejteket mikrocentrifuga csövekbe transzferáltuk és kétszer mostuk és centrifugáltuk (100 g, 5 perc) 1 ml PBS-ben. A sejthalált FITC Annexin V / Dead Cell Apoptosis Kit segítségével karakterizáltuk. A sejteket a FITC-konjugált Annexin V-tel és a propidium-

jodiddal történő inkubációt követően átszűrtük, FACS csövekbe helyeztük, majd BD FACSAria III áramlási citométerrel (BD Biosciences) (DE-ÁOK, BMBI Össejt Kutató Laboratórium) 488 nm lézert 530/30 BP szűrővel a FITC és 561 nm lézert 610/20 BP szűrővel a propídiium-jodid mérésekhez.

3.2.6. SDS-poliakrilamid gélelektroforézis

48 órával a transzfekciót követően begyűjtöttük a HEK293AD (200 μ l) és AR42J (40 μ l) sejtekről a médiumot és a benne található fehérjéket 10% triklór-ecetsavval kicsaptuk, majd centrifugáltuk (17000 g, 10 perc). A pelleteket 100 mM DTT-vel kiegészített Laemmli pufferben vettük fel és hődenaturáltuk (95°C, 5 perc). A mintákat SDS-PAGE gélen futtattuk meg, majd a fehérjéket Coomassie Brilliant Blue R-250 festékkel tettük láthatóvá.

3.2.7. RT-PCR és qPCR analízisek

Az RNS-t izoláltuk NucleoSpin RNA Plus kit (Macherey-Nagel) segítségével és 2 μ g mennyiséget reverz transzkripciónak vetettünk alá. Az így kapott cDNS-ből PCR segítségével határoztuk meg az érett XBP-1 mRNS mennyiségét humán és patkány XBP-1 primerpárokkal. A PCR termékeket 2%-os agaróz gélen futtattuk meg és denzitometriával értékeltük ki. Az átírt cDNS-ből meghatároztuk a BiP, CHOP, GAPDH és az NQO1 gének expressziós szintjét. A kísérletekhez a felsorolt TaqMan próbákat használtuk fel: BIP/HSPA5 (Hs00607129_gH, Rn00565250_m1), CHOP/DDIT3 (Hs00358796_g1, Rn00492098_g1), ERP72 (Rn00587766_m1), GAPDH (Hs02758991_g1, Rn01775763_g1), Nqo1 (Hs00168547_m1, Rn00566528_m1) és PDI (Rn00564459_m1).

3.2.8. Fehérje immunoblot

A sejteket kétszer megmostuk PBS-sel, felkapartuk a sejttenyésztő lemezről és 1 ml PBS-be oldottuk. Ezt egy centrifugálás (850 g, 10 perc) követte. A sejteket ismétlődő fagyasztás-olvasztás ciklusokkal tártuk fel 200 μ l, inhibitorokkal kiegészített lízis pufferben (*Reporter Lysis Buffer*, Promega), majd az elegyet centrifugáltuk (2400 g, 5 perc) és a felülúszót begyűjtöttük. A Western-blot kísérletek során az AR42J lizátumból 2,5 μ g, míg a HEK293AD sejtekből származó fehérjékből 5 μ g-ot használtunk fel, amit Laemmli pufferbe oldottunk és hődenaturáltunk. Ezt SDS-PAGE

követte, majd transzferálás nitrocellulóz membránra (100V, 1 óra). A membránt 1 órán át 5% tejjport tartalmazó TTBS oldatban blokkoltuk, majd 1:15000 hígításban GAPDH-ellenes antitestet adtunk (1 óra) az elegyhez és HRP-konjugált anti-nyúl antitestet használtunk (1 óra) másodlagos antitestként 1:10000 hígításban. A PNLIP jelenlétének kimutatásához HRP-konjugált anti-His antitestet alkalmaztunk 1:2000 hígításban, szintén 1 óra inkubáció mellett. A fehérjéket kemilumineszcens szubsztrát segítségével detektáltuk, Azure 600 géldokumentációs rendszer segítségével.

3.2.9. Statisztikai analízis

A bemutatott adatok a kapott értékek átlagát mutatják szórással (SD). Az értékeket a MedCalc programmal analizáltuk, T-próbának vetettük alá, ahol a <0,05-nél kisebb P-értékeket tekintettük szignifikánsnak. Az adatok ábrázolását GraphPad 5 szoftverrel végeztük.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A HTLV proteázok jellemzése

4.1.1. A HTLV proteázok expressziója és tisztítása

A HTLV-1, -2 és -3 proteázokat BL21(DE3) *E. coli* sejtekben expresszáltuk, minden enzim esetében inklúziós testből. A fehérjék inklúziós testből való extrakciója volt a tisztítás első lépése, melyhez minden enzimre azonos kondíciókat alkalmaztunk. A HTLV-2 és -3 proteázokat korábban mások nem vizsgálták, így szükséges volt szolubilizációjuk és tisztításuk optimalizálása is, melyhez egy korábban a HTLV-1 PR-ra leírt protokollt vettünk alapul. A szolubilizáció során egy további mosó lépést is alkalmaztunk (részletek az Anyagok és módszerek című fejezetben). A szolubilizálást követően a fehérjéket reverz-fázisú HPLC-vel tisztítottuk. Az eluált frakciókat begyűjtöttük és SDS-PAGE gélen ellenőriztük. A legnagyobb tisztaságú frakciókat (>95%) dializáltuk „E” puffer ellenében, a fehérjék megfelelő feltekeredésének elérése céljából.

4.1.2. Az optimális reakciókörülmények meghatározása és az enzimek stabilitásának vizsgálata

Vizsgáltuk a különböző reakciókörülmények (hőmérséklet, pH, ionerősség) hatását a HTLV-2 és HTLV-3 PR aktivitására, valamint az összehasonlítás érdekében meghatároztuk a HTLV-1 PR pH optimumát is. Az enzimreakciókat követően a szubsztrátot és a hasítási termékeket reverz-fázisú HPLC módszerrel választottuk el egymástól. Az aktivitásmérések során a HTLV-1, HTLV-2 és HTLV-3 PR természetes hasítóhelyeit reprezentáló oligopeptid szubsztrátokat alkalmaztunk.

Mind a HTLV-2, mind a HTLV-3 PR aktivitása növekedett a hőmérséklet emelésének hatására. Az enzimek a legnagyobb aktivitást ~40°C-on mutatták, míg alacsonyabb hőmérsékleten (35°C) a teljes aktivitásnak már a jelentős mértékű (~40%) csökkenése volt megfigyelhető. Korábbi HTLV-1 proteáz mérésekkel összhangban úgy találtuk, hogy a közel 37°C-os hőmérséklet megfelelő számukra. A HTLV-1 proteázon kívül a BLV, valamint a HIV-1, HIV-2 PR, EIAV, MMTV és a humán „foamy” vírus (HFV) PR-ra is ezt a hőmérsékletet alkalmazták.

A reakcióközeg NaCl végkoncentrációjának növelésére az aktivitás emelkedésével reagált a HTLV-2 és HTLV-3 PR is. A legmagasabb aktivitást 2 M NaCl koncentrációnál tapasztaltuk. Korábban a HTLV-1 PR esetén is hasonló tendenciát figyeltek meg. Ez a fajta aktivitás változás a retrovirális proteázok közös jellemzője, beleértve a HIV-1, HFV, BLV és más retrovírus-szerű proteázokat is, pl. Ty1 retrotranszpozon PR, vagy a humán retrovírus-szerű aszpartil proteáz 1 (ASPRV1).

Az enzimek pH-függését a 4,5-8,0 közötti tartományban vizsgáltuk. A HTLV-1 (pH $6,11 \pm 0,03$) és a HTLV-2 PR (pH $6,14 \pm 0,06$) pH optimuma közel azonos volt, míg a HTLV-3 PR pH-optimuma alacsonyabbnak adódott (pH $5,56 \pm 0,04$). A HTLV proteázok pH-optimuma hasonló a többi retrovirális proteázra jellemző enyhén savas értékhez, pl. a HIV-1 PR (pH 4,0–6,0) (151), a BLV PR (pH 4,0–6,5), a HFV PR (pH 6,6), vagy az ASPRV1 PR ($6,27 \pm 0,02$) esetében kapott értékhez.

4.1.3. A katalitikus tulajdonságok összehasonlítása

A HTLV proteázok katalitikus hatékonyságának meghatározásához az egyes HTLV proteázok autoproteolitikus hasítóhelyeit (MA/CA, CA/NC, TF1/PR, PR/P1) reprezentáló oligopeptideket használtunk. A mérésekhez az legoptimálisabb helyett a korábban a HTLV-1 proteáz számára optimális kondíciókat alkalmaztuk (0,25 M K_3PO_4 , 2 M NaCl, 5 v/v % glicerol, 5 mM DTT, pH 5,6, 0,5-4 óra, 37 °C), az enzimreakciókhoz a kinetikai paraméterek jobb összehasonlíthatósága érdekében.

Bizonyos mérések hosszabb inkubációs időt igényeltek, ami nem járt együtt az enzim aktivitásának csökkenésével vagy inaktivációjával. A HTLV-1, HTLV-2 és HTLV-3 PR stabilitását HTLV-3 PR/P1 szubsztráton ellenőriztük az idő függvényében (1-4 óra).

A HTLV-1 PR a vizsgált szubsztrátok közül a HTLV-1 PR hasítóhelyeket reprezentáló szubsztrátokon mutatta a legmagasabb k_{cat}/K_M értékeket. A HTLV-2 és HTLV-3 PR hasítóhelyek alkalmazása során alacsonyabb értékeket figyeltünk meg. A HTLV-3 CA/NC kivételével minden szubsztrátot képes volt elhasítani a proteáz, ugyanezt a peptidet a HTLV-2 és a HTLV-3 PR is alacsony hatékonysággal hasította. A HTLV-1 PR-zal végzett enzimreakciók során a legalacsonyabb k_{cat}/K_M értéket a

HTLV-1 TF1/PR hasítóhelyen figyeltük meg, amelyet a HTLV-2 és HTLV-3 PR is hasonló hatékonysággal hasított.

A HTLV-2 PR minden vizsgált szubsztrátot hasított. A legnagyobb katalitikus hatékonyságot a HTLV-2 TF1/PR és a PR/P1 szubsztrátoknál tapasztaltuk. A HTLV-1 és a HTLV-2 CA/NC hasítási helyek csak a P5' oldalláncban különböznek, ahol lizin található a HTLV-1, és arginin a HTLV-2 esetében, így csak a HTLV-1 CA/NC szubsztrátot alkalmaztuk, a HTLV-2 CA/NC szubsztrátot nem vizsgáltuk a kísérletek során.

A HTLV-3 szintén hasította az összes vizsgált oligopeptidet, de érdekes módon a legmagasabb k_{cat}/K_M értéket a HTLV-1 PR/P1 hasítási helyen figyeltük meg, ami a HTLV-1 proteáznak is a leginkább preferált szubsztrátja volt.

Vizsgáltuk az enzimek aktivitását HIV-1, EIAV, RSV, MMTV, MPMV, BLV, és MuLV PR hasítóhelyeket reprezentáló szubsztrátokon is. Habár a HTLV-1 PR képes volt hasítani bizonyos szubsztrátokat, a HTLV-2 és a HTLV-3 PR a vizsgált oligopeptidek egyikénél sem mutatott katalitikus aktivitást, ami azt jelzi, hogy a HTLV-1 PR a HTLV-2 és a HTLV-3 PR-okhoz képest szélesebb specificitással rendelkezik. Egyes vizsgált peptidek gátolták a HTLV-1 vagy a HIV-1 PR-t 0,1 mM-nál nagyobb koncentrációk alkalmazásánál, ennél fogva elképzelhető, hogy egyes szubsztrátoknak hasonló hatása lehet a HTLV-2 és a HTLV-3 PR-ra is.

4.1.4. Aminosav preferenciák vizsgálata

A HTLV proteázok aminosav preferenciáinak meghatározásához vad típusú HTLV-1 CA/NC (KTKVL*VVQPK) hasítóhelyet reprezentáló oligopeptid szubsztrátot, továbbá ennek N-terminálisan rövidített (P4-P5' és P3-P5') és P4, P3, P2, P1 vagy P1' pozícióban módosított variánsait alkalmaztunk.

A vad típusú szubsztráthoz (KTKVL*VVQPK) képest a P4-P5' rövidített szubsztrátokon mindhárom HTLV proteáz alacsonyabb aktivitást mutatott. A legrövidebb P3-P5' szubsztrátot nem, vagy csak elhanyagolható mértékben hasították. A meghatározott relatív aktivitás adatok összhangban vannak a korábban a HTLV-1 proteáznál tapasztalt alacsonyabb katalitikus konstansokkal. A rövidített szubsztrátok alkalmazása során szintén alacsonyabb értékek voltak megfigyelhetőek, bizonyítva az S4 és S5 helyek

szubsztrát-felismerésben betöltött jelentőségét a HTLV-2 és HTLV-3 PR esetében is.

A szubsztrát P4 pozícióban történő módosítását mindhárom proteáz jól tolerálta. A kapott eredmények összhangban vannak azzal a megállapítással, hogy a HTLV-1 PR egy viszonylag nagy, hidrofób S4 szubsztrátkötő zsebbel rendelkezik. A P4 variánsok monitorozása során azt tapasztaltuk, hogy a HTLV proteázok hasonló aminosavakat preferálnak. A legalacsonyabb relatív aktivitást a P4-Gly és a P4-Asp szubsztrátoknál figyeltük meg, míg a P4-Arg variánst egyik enzim sem hasította.

A P3 variánsoknál végzett megfigyelések alapján az S3 zseb az S4 zsebbel hasonlóan különböző aminosav oldalláncokat is képes befogadni. A három proteáz esetében hasonló preferenciák figyelhetőek meg, de a P3-Phe és P3-Val variánsokat szubsztrátként csak a HTLV-1 PR fogadta el, valamint a P3-Ser oldalláncot a P3-Asp-nál és a vad típusú lizinnél is jobban preferálta.

A P2 variánsok közül mindhárom proteáz a P2-Ile mutánst preferálta leginkább, a HTLV-2 és HTLV-3 PR esetében a vad típusú szubsztrátnál is magasabb relatív aktivitás értéket mutatva. Egy korábbi, P2 mutánsok monitorozásával foglalkozó tanulmányhoz hasonlóan mi is azt tapasztaltuk, hogy az S2 zsebben az izoleucin a leginkább elfogadott oldallánc, míg a P2-Asn és a P2-Lys nem elfogadható a HTLV1 PR számára. A P2-Asn a HTLV-2 PR viszonylag jó szubsztrátja, bár a szubsztrátkötő zseb összetétele ezt nem indokolja.

A P1 pozícióban a P1-Tyr és P1-Phe mutánsokat csak a HTLV-1 PR tolerálta. Munkacsoportunk egy korábbi munkájában is megfigyelték, hogy ezeket a variánsokat a HTLV-1 PR hatékonyan képes elhasítani. A HTLV-3 nem hasította a P1-Ala mutánst, a P1-Leu és a P1-Gly variánsokat kis hatékonysággal processzálta, míg a HTLV-2 egyik szubsztrát variánst sem hasította legalább 1%-os hatékonysággal.

A korábbi eredményekkel összhangban a HTLV-1 PR-zal végzett kísérleteink során mi sem tapasztaltuk a P1'-Ala, -Gly vagy -Lys szubsztrát variáns hasítását, valamint a HTLV-2 és HTLV-3 PR-oknak is rossz szubsztrátjai voltak a P1'-Leu kivételével a HTLV-3 PR esetében.

4.1.5. Gátlásvizsgálatok

A HTLV-2 és HTLV-3 PR gátlhatóságát több, a HIV-1 elleni terápiában használt inhibitorral (atazanavir, darunavir, indinavir, ritonavir és saquinavir), valamint a DMP-323-mal vizsgáltuk, amely szintén egy hatékony HIV-1 PR inhibitor. Az inhibitorokat 1 μ M-os végkoncentrációban alkalmaztuk és enyhe gátlóhatást fejtettek ki, ami minden esetben kevesebb volt, mint 50%. A kapott adatok összhangban vannak a korábban a BLV, a HTLV és az MuLV proteázokra meghatározott K_i értékekkel, amelyekre szintén alacsony gátlhatóságot mutattak ki. A legnagyobb gátló hatást a darunavir fejtette ki (25-30%) a három HTLV PR gátlási vizsgálata során. Ezzel szemben az indinavir csak a HTLV-1 PR-ra fejtett ki jelentősebb gátló hatást.

A HIV-1 PR gátlószerek mellett végeztünk kísérleteket kettő kísérleti HTLV-1 PR inhibitorral is (IB-268, IB-269). A K_i értékeket a HTLV-1 PR-ra korábban már meghatározták, ami az IB-268 esetén 298 nM, az IB-269-nél 465 nM volt, viszont a HIV-1 PR ellenében nem bizonyult hatékonyaknak. Az IB-268 a HTLV-2 PR-ra kapott inhibíciós állandó a HTLV-1 PR-nál megállapítottak közel tizede (37 nM), míg a HTLV-3 PR a HTLV-1 PR-hoz hasonló értéket (214 nM) mutatott. Az IB-269-nél a HTLV-2 és HTLV-3 proteázok aktivitása hasonló mértékben gátlódott, jelentősen hatékonyabban, mint a HTLV-1 PR.

4.1.6. Szekvencia analízis és szubsztrátkötő helyek vizsgálata

A HTLV proteázok szekvenciája jelentős eltéréseket mutat, a szekvenciák közötti azonosság kis mértékű. A HTLV-1 proteázzal a HTLV-2 PR 50%-ban, a HTLV-3 49%-ban egyezik. Utóbbi kettő 57%-os azonosságot mutat, viszont a szubsztrátkötésért felelős régiókban magasabb fokú a konzerváltság (HTLV-1/HTLV-2 PR: 82%, HTLV-1/HTLV-3 PR: 56%, HTLV-2/HTLV-3 PR: 76%). A szubsztrátkötő zsebek tekintetében az S4 alhelyen a legnagyobb a variabilitás, ahol a HTLV1 és a HTLV-2 proteázok között 57% az azonosság, a HTLV-3 PR esetében szintén 57%, míg a HTLV-2 és HTLV-3 PR között csupán 43%. Az S1 alhelyhez közeledve magasabb fokú a konzerváltság. A HTLV-2 és HTLV-3 PR S3 zsebének összetétele megegyezik, a HTLV-1 tőlük egy aminosavban tér el. A HTLV-1 és HTLV-3 PR S2 zsebe csak a 37-es pozícióban tér el

egymástól, a HTLV-1/HTLV-2 és a HTLV-2/HTLV-3 proteázok között is csupán 2 aminosavban van eltérés. A HTLV-2 és HTLV-3 PR S1 zsebe azonos összetételű, a HTLV-1 PR a 10-es pozícióban tér el a többi HTLV proteázétól. Az S4-S1 szubsztrátkötő zsebek összetételét a HTLV-1 PR esetében kutatócsoportunk tagjai korábban már meghatározták, munkánk során a HTLV-2 és HTLV-3 proteázok szubsztrátkötő zsebeinek összetételét a szekvenciák összehasonlítása alapján határoztuk meg.

4.1.7. Az autoproteázáló képesség vizsgálata

A HTLV-1 PR esetében már tanulmányozott mutációkat alkalmaztuk a HTLV-2 és HTLV-3 PR autoproteolízisének vizsgálatához is. A HIV-1 és a HTLV proteázok között kisebb fokú a szekvenciák közötti azonosság, mint a HTLV-1, -2 és -3 proteázok között. A mutagenézis során a HTLV proteázok aminosavait olyan aminosavakra cseréltük, melyek az adott pozícióban a HIV-1 proteázban található aminosavnak felelnek meg. A mutációk célja annak vizsgálata volt, hogy a HTLV proteázok milyen mértékben érzékenyek a lebenyeket (57. és 59. pozíciók) és az aktív centrumot (37. és 67. pozíciók) érintő mutációkra. A módosított aminosavak mindegyike részt vesz valamely szubsztrátkötő zseb felépítésében. A 37. pozícióban lévő aminosav maradék az S2 és S4 zsebek, míg a 57. pozícióban lévő az S2-S4 zsebek részét képezi, az 59. és 67. pozíciókban található pedig az S1-S2, valamint a S4 zsebek felépítésében vesznek részt. A L57 konzervált a HTLV PR-ok között, a HIV-1 PR-ban ezzel megfeleltetett pozíció (E48) mutációja leucinra felelős az indinavir és a saquinavir elleni rezisztenciáért. A HIV-1 és HIV-2 PR I50 oldalánca feltételezhetően szerepet játszik a lebeny régió mobilitásában, a HTLV-1 PR esetében az ennek megfeleltethető pozícióban az A59I mutáció az enzim inaktiválódását okozta. Az F67 az S4 zseb része, az enzim nem tolerálja ebben a pozícióban a glutaminra történő cserét (F67Q mutáció).

A HTLV-2 és HTLV-3 PR autoproteolízis vizsgálatához az enzimeket fúziós fehérjeként expresszáltuk, ami az N-terminálisán egy MBP-t és egy 8 aminosav hosszúságú linker szekvenciát tartalmazott. Ez a szakasz a megfelel a Gag-Pro poliproteinben a proteáz N-terminális irányban megelőző, az autoproteolitikus hasítóhelyet tartalmazó szakasznak, mely lehetővé teszi a proteáznak a fúziós fehérjéből való kihaladását. A

proteolitikus aktivitást Western-blot technikával vizsgáltuk és a hasítási hatékonyságokat összehasonlítottuk a korábban HTLV-1 PR-nál megfigyelttel.

A proteázok hasonlóan reagáltak a mutációkra, különbségek a 37-es és 57-es pozícióban eltérő konstrukciók esetében mutatkoztak. A 37-es helyen található aminosav (MBP-HTLV-1: metionin, MBP-HTLV-2: leucin, MBP-HTLV-3: izoleucin) aszparginra cserélése megakadályozta a processzáldást az MBP-HTLV-1 és MBP-HTLV-2 PR esetében, viszont az MBP-HTLV-3 PR-nál nem okozott változást. Az L57G mutáció autoprocesszáldásra gyakorolt hatását korábban nem vizsgálták a HTLV-1 PR esetében, viszont az enzimaktivitás csökkenése volt megfigyelhető HTLV-1 CA/NC szubsztráton. Az MBP-HTLV-3 PR szintén érzékenyen reagált a mutációra ebben a pozícióban, az MBP-HTLV-2 PR-ra kihatódására viszont nem volt hatással.

4.2. A hidrokinon és G233E PNLIP mutáció kapcsolatának vizsgálata

4.2.1. A cigarettafüst fő komponenseinek hatása a HEK293AD sejtek életképességére

A cigarettafüst fő alkotóelemek hatása karakterizálása céljából HEK293AD sejteket vizsgáltunk emelkedő koncentrációjú akrolein, krotonaldehid vagy hidrokinon (HQ) jelenlétében. A sejtek hozzávetőleges életképességét a sejtek metabolikus aktivitásának vizsgálatával határoztuk meg.

Az akrolein 20 μM -os koncentráció értékig nem befolyásolta a sejtek metabolizmusát, viszont magasabb koncentráció értékeknél fokozatosan csökkentette a sejtek életképességét. Ezzel szemben a HQ és a krotonaldehid már alacsony koncentrációban is jelentős életképesség-csökkenést okozott, 100 μM -os koncentrációban az életképesség csökkenésének mértéke meghaladta a 80%-ot. A metabolikus aktivitásra gyakorolt jelentős hatása és a jó tárolhatósága miatt a HQ-t vizsgáltuk részletesebben. Áramlási citometria segítségével vizsgáltuk, hogy a csökkent sejtes metabolikus aktivitás összefüggésbe hozható-e programozott sejthalállal vagy nekrozissal. Ehhez FITC annexin V és propídiium-jodid festékekkel jelölt sejtek mennyiségének változását követtük nyomon, emelkedő HQ koncentráció hatására. 25 μM koncentrációjú HQ nem okozott jelentős hatást, viszont a magasabb, 50 és 75 μM -os HQ alkalmazása során programozott sejthalált figyeltünk meg, amit a FITC annexin V festékkel jelölt sejtek arányának növekedéséből állapítottunk meg, amelyet a propídiium-jodiddal festett sejtek mennyiségének növekedése követett.

4.2.2. A szekréció vizsgálata, valamint a hidrokinon és a nem megfelelően feltekeredett PNLIP mutáns HEK293AD sejtek életképességére gyakorolt hatása

Korábbi tanulmányok már vizsgálták a G233E mutáns PNLIP szekrécióját, melynek során azt tapasztalták, hogy a vad típusú lipázzal ellentétben a nem megfelelően feltekeredő G233E variáns nem szekretálódott HEK293T és AR42J sejtekben, azonban a G233E mutáns PNLIP expresszióját HEK293AD sejtekben eddig nem vizsgálták. A szekréció ellenőrzéséhez tranziens transzfekcióval juttattuk be a vad típusú

és mutáns lipázt kódoló plazmidokat, begyűjtöttük a kondicionált médiumot, majd SDS-PAGE módszerrel analizáltuk. Az említett sejtvonalakhoz hasonlóan a HEK293AD sejtek is csak a vad típusú PNLIP-t szekretálták, így alkalmasnak bizonyultak az általunk végezni kívánt kísérletekhez. A HQ szekrécióra gyakorolt hatását is követtük, 25 μM HQ hozzáadása a sejtekhez csökkentette a vad típusú lipáz szekrécióját, ugyanakkor nem volt hatással az intracelluláris PNLIP szintekre.

A HQ és a mutáns PNLIP együttes hatásának vizsgálatához HEK293AD sejteket transzfektáltunk vad típusú és mutáns lipázt kifejező plazmiddal, majd HQ-nal (0,25 μM) inkubáltuk a sejteket. Az alkalmazott HQ koncentráció még nem járt együtt sejthalállal, így alkalmasnak bizonyult a korai sejtes válaszok vizsgálatára. Az üres vektorral transzfektált, HQ-nal nem kezelt sejteket tekintettük kontrollnak. A HQ jelenléte 30%-os metabolikus aktivitás csökkenésért volt felelős. Önmagában a vad típusú PNLIP 18%-kal, míg a mutáns jelentősebb mértékben, 31%-kal csökkentette a sejtek életképességét. A HQ és a vad típusú lipáz jelenléte együttesen 48%, a HQ és a mutáns lipázé 57% csökkenésért volt felelős.

4.2.3. A HQ és a nem megfelelően feltekeredett PNLIP variáns hatása az ER stresszre HEK293AD sejteken

Egyes nem-szekretálódó PNLIP variánsok, például az általunk részletesebben tanulmányozott G233E mutáns ER stressz-okozó hatása HEK293T és AR42J sejteken már bizonyításra került korábban. A HQ ER stresszre gyakorolt hatását is már több tanulmány is vizsgálta más emlős sejteken. A HQ és a G233E PNLIP mutáció ER stresszre gyakorolt hatásának vizsgálatához HEK293AD sejteket transzfektáltunk (transziens) vad típusú és mutáns lipázt tartalmazó plazmidokkal. A sejteket HQ-nal (0 és 25 μM) inkubáltuk, majd az XBP-1 érést, illetve további ER stressz markerek, a BiP, a CHOP és az NQO1 mRNS szintjét határoztuk meg. Az üres plazmiddal transzfektált mintákat tekintettük kontrollnak. Az érett XBP-1 mRNS aránya a vad típusú lipázt kifejező sejteknél a kontrollhoz (10%) képest csak enyhén emelkedett, 16%-ra. A vad típusúhoz képest a mutánsok esetében közel kétszeres növekedést tapasztaltunk, amely tovább emelkedett HQ jelenlétében, 42%-ra, ami magasabb, mint a HQ önmagában kifejtett hatása.

A vad típusú PNLIP expressziója nem okozott változást a BiP mRNS szintjében, ezzel ellentétben a mutáns 2,5x növekedést váltott ki. A HQ 1,9-2,2x növekedést okozott a kontroll és a vad típust kifejező sejtekben. Amennyiben a mutánsokhoz adtunk HQ, a mutánsoknál tapasztaltnál magasabb, 3,6x változást regisztráltunk. A BiP mRNS-hez hasonló módon a CHOP mRNS szint tekintetében sem okozott jelentős változást a vad típusú PNLIP a kontrollhoz képest. A mutáns jelenléte 1,6x mértékben emelte a CHOP szintjét. A kontroll sejtekben a HQ hozzáadása ettől kissé alacsonyabb értékváltozással járt együtt és az előzőekhez hasonlóan a mutáns és a HQ együttes jelenléte okozta a legnagyobb 2,6x növekedést. Az NQO1 mRNS tekintetében sem emelte a vad típusú PNLIP a transzkripciót, a mutáns 1,6x változásért volt felelős. A HQ hozzáadása szintén az mRNS szintek emelkedését okozta, a legmagasabbat a mutánssal együtt történő alkalmazás esetén (2,5x).

4.2.4. A HQ hatása az AR42J sejtek életképességére

A HQ hatását AR42J patkány hasnyálmirigy sejteken is vizsgáltuk, amelyet a kísérleteket megelőzően dexametazonnal differenciáltattunk. A sejteket HQ-nal inkubáltuk (0 és 40 μM , 24 óra), majd monitoroztuk a sejtek életképességét a metabolikus aktivitásuk mérésén keresztül. A HQ koncentrációját 100 μM -ig emeltük, ami viszonylag csekély, 20%-os életképesség-csökkenéssel járt együtt, a HEK293AD sejtekhez képest kisebb érzékenységet mutatva a sejtek.

Az apoptózis vizsgálatát különböző HQ koncentrációk mellett (0, 40, 100 és 200 μM) is elvégeztük. Ehhez annexin V és propidium-jodid festést alkalmaztunk, majd áramlási citométerrel vizsgáltuk a sejteket. 40 μM -os HQ koncentráció értékig a sejtek stabilak maradtak, annexin V-pozitív sejtek csak 100 μM -nál jelentek meg. Magasabb (200 μM) koncentrációnál a sejtek propidium-jodiddal is elkezdtek festődni. Az eredményeink azt mutatják, hogy az AR42J sejtek esetében a programozott sejthalál a HEK293AD sejtekhez képest magasabb HQ koncentráció jelenlétében figyelhető meg.

4.2.5. A szekréció vizsgálata, valamint, az AR42J sejtek életképessége HQ és a nem megfelelően feltekeredett PNLIP mutáns jelenlétében

Vizsgáltuk a vad típusú és mutáns lipázt expresszáló AR42J sejteken a HQ (40 μM) szekrécióra gyakorolt hatását. A PNLIP mennyiségét a sejtekről begyűjtött médiumban és sejtlyázumokban is monitoroztuk. A korábban leírt megfigyeléseinkkel összhangban a G233E variáns nem szekretálódott, továbbá a HQ jelentősen csökkentette a vad típusú PNLIP szekrécióját, míg az intracelluláris lipáz szintek nem változtak.

A sejt metabolikus aktivitásának nyomon követésével vizsgáltuk, hogy a G233E PNLIP mutációnak és a HQ-nak van-e összeadódó hatása. Ehhez az AR42J sejteket vad típusú és mutáns PNLIP-t kódoló adenovírussal fertőztük, majd inkubáltuk HQ (0, 40 μM) jelenlétében. A HQ hozzáadása 28%-kal csökkentette az életképességet, ami összevethető a HEK293AD sejtekre kapott adatokkal, ahol 25 μM HQ-t alkalmaztunk. A vad típusú lipáz 9%-os csökkenést okozott, amennyiben HQ-t is adtunk a sejtekhez kissé erősebb hatást tapasztaltunk, mint a HQ egyedüli alkalmazásakor. A G233E PNLIP mutáció 45%-os csökkenésért volt felelős, ami 60%-ra emelkedett HQ hozzáadásakor.

4.2.6. A HQ és a nem megfelelően feltekeredett PNLIP variáns hatása az ER stresszre AR42J sejteken

A HQ és a G233E PNLIP mutáció kapcsolatát az ER stressz tekintetében is vizsgáltuk, ehhez az éretlen/érett XBP-1 mRNS arányát, valamint a BiP, CHOP és NQO1 transzkripciós szintjét figyeltük meg. Az üres adenovírussal transzdukált sejteket tekintettük kontrollnak. Az érett XBP-1 mRNS aránya a kontroll és vad típusú lipázt kifejező sejtekben 12-16% között alakult, míg a G233E variáns esetén jelentősen, 37%-ra emelkedett. A HQ hozzáadása mind a kontroll, mind a vad típusú PNLIP-t expresszáló sejtekben 31%-os arányt okozott, a mutánst kifejező sejtekben viszont már 45%-ra, ami a legmagasabb érték a vizsgált kondíciók között. A vad típusú PNLIP-t kifejező sejtekben a BiP mRNS szintje nem változott a kontrollhoz képest, a mutáns viszont közel 2,1x növekedésért volt felelős. A HQ jelentősen fokozta a BiP transzkripcióját (2,7x-6,1x), a legmagasabb értéket a G233E PNLIP mutáció jelenlétében elérve. A CHOP szintje a vad típusú PNLIP-t expresszáló sejtekben nem változott jelentősen, míg a G233E

mutáció 2,1x növekedésért volt felelős. A HQ hatására a CHOP szintje 3x-ra emelkedett, a változás mértéke közel 6x-ra nőtt, ha a HQ mellett a vad típusú vagy a mutáns PNLIP is jelen volt. A HQ hozzáadása a sejtekhez 1,5x növekedést okozott az NQO1 transzkripciójában. Habár a vad típusú lipáz csak kis mértékben emelte a transzkripciót, az mRNS szintjének emelkedése 2,3x volt amennyiben HQ is jelen volt, a HQ által önmagában kiváltott 1,5x változással szemben. A mutáns kifejeződése ettől is jelentősebben növelte az NQO1 szintjét, ami a HQ hozzáadásával tovább fokozódott.

Az oxidatív stressz jelenlétének további igazolására kettő protein diszulfid izomeráz, a PDI és az ERP72 transzkripcióját is vizsgáltuk AR42J sejteken. Az ERP72 mRNS szint tekintetében HQ hatására 2,1x növekedés volt megfigyelhető, míg a G233E variáns expressziója ezzel közel megegyező változást okozott, míg a vad típusú lipáz 1,4x emelkedésért volt felelős. A lipázt termelő sejtekben a HQ hozzáadása egyaránt 4,5x növekedés volt megfigyelhető az ERP72 mRNS szintjében. A vad típusú lipáz kifejeződése nem járt együtt változással a PDI mRNS szintjében, a mutáns is csak csekély, 1,3x emelkedést okozott. A HQ hozzáadása 1,5-1,9x növekedést okozott és a genetikai faktorok nem befolyásolták jelentősen.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A doktori disszertációban bemutatott munkám kettő, humán megbetegedésekben érintett fehérje vizsgálatát dolgozza fel, betekintést nyújtva a HTLV retrovirális proteázok működésének biokémiai hátterébe, továbbá a dohányfüstben található komponensek és a nem megfelelően feltekeredő, normál esetben szekretálódó pankréász enzimek kapcsolatába.

Munkánk során elvégeztük a HTLV-2 és -3 PR expressziójának és tisztításának optimalizálását, valamint biokémiai sajátosságai vizsgálatát. Megállapítottuk, hogy a HTLV-2 és -3 PR-ok enzimatiszus sajátosságai nagymértékben hasonlóak és a HTLV-1 PR-nál szűkebb szubsztrát-specifitással rendelkeznek, valamint aminosav preferenciáik is hasonlóak. A HTLV-1-hez hasonlóan a HTLV-2 és -3 PR-ok P4 és P3 aminosavak iránti toleranciája nagyobb, míg az S2-S1' zsebek szigorúbb aminosav-preferenciával rendelkeznek. A vizsgált HIV-1 PR inhibitorok nem voltak képesek a HTLV-2 és -3 PR hatékony gátlására, viszont az IB-268 és IB-269 kísérleti HTLV-1 PR inhibitorok jelentősen hatékonyabbnak bizonyultak. A módosított HTLV-2 és -3 PR-okkal végzett autoprocesszálas-vizsgálatok alátámasztották, hogy a HTLV PR-ok - eltérő replikációs stratégiájuk miatt - a HIV-1 PR-hoz képest érzékenyebbek az aktív helyet érintő mutációkra.

A krónikus pankreatitisz kockázati tényezőivel kapcsolatos munkánk során a dohányzás lehetséges hatásának modellezésére a HQ-t használtuk, a nem megfelelően feltekeredő PNLIP fehérjét pedig a G233E mutánsal reprezentáltuk. Azt tapasztaltuk, hogy az egyes hatások önmagukban is csökkentették a sejtek életképességét, magasabb koncentrációjú HQ alkalmazása a programozott sejthalált is képes volt kiváltani, és a vad típusú PNLIP szekrécióját is gátolta. Együttes alkalmazásuk még jelentősebb változással járt együtt. ER stressz markerek expressziójának emelkedését is tapasztaltuk, továbbá egy pro-apoptotikus marker mRNS szintjének változása is követte ezt a trendet. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a HQ és a G233E PNLIP mutáció hatása kumulatív, ami arra enged következtetni, hogy bár a nem megfelelően feltekeredő PNLIP mutánsok nem minden esetben hozhatóak egyértelműen összefüggésbe a pankréász gyulladásos megbetegedésével, a dohányfüst komponens HQ ennek kockázatát jelentősen képes lehet növelni, vagy a PNLIP mutációkkal együtt

akár
súlyosabb tüneteket is okozni.

6. A PHD ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400

Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/425/2022.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Kassay Norbert
Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10081734

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Kassay, N.**, Toldi, V., Tőzsér, J., Szabó, A.: Cigarette smoke toxin hydroquinone and misfolding pancreatic lipase variant cooperatively promote endoplasmic reticulum stress and cell death. *PLoS One*. 17 (6), 1-19, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0269936>
IF: 3.752 (2021)
2. **Kassay, N.**, Mótyán, J. A., Matúz, K., Golda, M., Tőzsér, J.: Biochemical Characterization, Specificity and Inhibition Studies of HTLV-1, HTLV-2, and HTLV-3 Proteases. *Life (Basel)*. 11 (2), 1-21, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/life11020127>
IF: 3.251





További közlemények

3. Mótyán, J. A., **Kassay, N.**, Matúz, K., Tózsér, J.: Different Mutation Tolerance of Lentiviral (HIV-1) and Deltaretroviral (BLV and HTLV) Protease Precursors.
Viruses-Basel. 14 (9), 1-17, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/v14091888>
IF: 5.818 (2021)
4. Toldi, V., **Kassay, N.**, Szabó, A.: Missense PNLIP mutations impeding pancreatic lipase secretion cause protein misfolding and endoplasmic reticulum stress.
Pancreatology. 21 (7), 1317-1325, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pan.2021.07.008>
IF: 3.977

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 16,798

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
7,003**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2022.09.09.



7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm **Dr. Tózsér József** egyetemi tanár Úrnak, hogy témavezetőmként útmutatásokkal, szakmai tanácsokkal segítette a munkámat és lehetőséget biztosított, hogy PhD tanulmányaimat a Debreceni Egyetem Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézetében végezhessem!

Köszönöm **Dr. Szabó András**nak, hogy lehetőséget adott az általa vezetett kutatási témákba való bekapcsolódásba és szakmai tanácsaival segítette a munkámat!

Köszönöm **Dr. Mótyán János András**nak, hogy észrevételeivel és szakmai tanácsaival hozzájárult a munkám sikerességéhez!

Köszönöm **Dr. Joóné Matúz Krisztinának**, korábbi MSc témavezetőmnek, hogy PhD tanulmányaim alatt is segítette a munkámat. Köszönöm a Retrovirális Biokémiai Kutató Laboratórium minden korábbi és jelenlegi munkatársának: **Ambrus Viktor, Dr. Gazda Livia Diána, Dr. Golda Mária, Hoffka Gyula, Janics-Pető Szilvia, Kunkli Balázs, Linkner Tamás Richárd, Dr. Miczi Márió, Miltner Noémi, Dr. Mohamed Mahdi Faisal, Nagy Katalin, Dr. Szojka Zsófia Ilona, Dr. Toldi Vanda, Dr. Tóth Ferenc és Nagyné Veres Ágota** kollégáimnak, hogy bármikor számíthattam a segítségükre!

Köszönöm a Molekuláris Biológiai és Biokémiai Intézet minden további dolgozójának és mindazoknak, akik hozzájárultak a PhD dolgozat létrejöttéhez!

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm **családom**nak, akik nélkül ez disszertáció nem valósulhatott volna meg!

A vad típusú HTLV-2 PR-pET11a konstruktot Dr. Golda Mária, a vad típusú HTLV-3 PR-pET11a konstruktot Dr. Joóné Matúz Krisztina, a vad típusú és mutáns PNLIP plazmid konstruktot Dr. Toldi Vanda bocsájtotta rendelkezésemre. A szubsztrátkötő zsebek összetételének meghatározását Dr. Mótyán János András készítette.

A munka megvalósulását elősegítő pályázati források: GINOP-2.3.2-15-2016-00044 “PHARMPROT teaming”, TKP2020-IKA-04, TKP2021-EGA-20 (Biotechnológia), TÁMOP 4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0023 “VÉDELEM”, TÁMOP-4.2.2.D-15/1/KONV-2015-0016, ÚNKP-21-5 Új Nemzeti Kiválóság Program, FK127942 OTKA, K125238 OTKA.