

**Doktori (PhD) értekezés tézisei**

**A PEG10 és ASPRV1 retrovírus-szerű humán aszpartil  
proteázok biokémiai vizsgálata**

Golda Mária

Témavezető: Prof. Dr. Tózsér József



**DEBRECENI EGYETEM**  
Molekuláris Sejt- és Immunbiológiai Doktori Iskola

Debrecen, 2021

# **A PEG10 és ASPRV1 retrovírus-szerű humán aszpartil proteázok biokémiai vizsgálata**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
az elméleti orvostudomány tudományágában

Írta: Golda Mária, okleveles molekuláris biológus

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

Témavezető: Prof. Dr. Tózsér József, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Szabó Gábpr, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Minárovits János, az MTA doktora

Dr. Emri Tamás, az MTA doktora

A doktori szigorlat (online formában) időpontja: 2021.06.15. 9:00 óra

Az értekezés bírálói: Dr. Gyémánt Gyöngyi, PhD

Dr. Kvell Krisztián, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szabó Gábor, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Minárovits János, az MTA doktora

Dr. Emri Tamás, az MTA doktora

Dr. Gyémánt Gyöngyi, PhD

Dr. Kvell Krisztián, PhD

Az értekezés védésének (online formában) időpontja: 2021.06.15. 11:00 óra

A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben a vitán részt kíván venni, úgy jelezze a [golda.maria@med.unideb.hu](mailto:golda.maria@med.unideb.hu) email címre küldött üzenetben 2021.06.14. 16:00 óráig. A határidő lejáratát követően technikai okok miatt már nincs lehetőség a védéshez kapcsolódni.

# BEVEZETÉS

## 1.1 Aszpartil proteázok

Az aszpartil proteázok az egyik legjelentősebb proteolitikus enzimescsoportot alkotják. Az IUBMB (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) nemzetközileg alkalmazott besorolási rendszere alapján, mely az enzimeket a katalizált reakció szerint osztályozza, EC 3.4.23. katalógusszámmal regisztrálta az aszpartil proteázokat.

A legtöbb aszpartil proteáz proformában szintetizálódik, mely prekursorok, vagy zimogén formák több lépéses érési folyamaton mennek keresztül, mely az aktív forma felszabadulását eredményezi. Katalitikus aktivitásukhoz két aszpartát együttműködésére van szükség az enzim aktív centrumában. Az aszpartil proteázok általi hidrolízis mechanizmusának általánosan elfogadott sémáját először 1987-ben írták le. Az elmélet szerint a két katalitikus Asp közül csak az egyik található protonált formában (proton donor), míg a másik deprotonált (proton akceptor), a köztük elhelyezkedő nukleofil vízmolekulát aktiválva megtámadja a szubsztrát peptidkötésben található karbonil csoportjának szénatomját. Mindeközben a karbonilcsoport oxigénje protonálódik az aktív hely másik aszpartátja révén, létrehozva egy tetraédes átmeneti állapotot. A szubsztrát amid csoportjának protonálása és átrendeződése a tetraédes állapot felbomlását eredményezi, majd a szubsztrát a folyamat végén két termékre hasad.

A retrovirális proteázok esetében az aktív hely katalitikus aminosavai (D-S/T-G) hidrogénkötések hálózatán keresztül kapcsolódnak egymáshoz, melyet más néven tűzoltófogásnak (*fireman's grip*) nevezhetünk. A 1-es típusú humán immundeficiencia vírus (HIV-1) aktív centrumában található konszenzus motívum (D-T-G) katalízisben betöltött szerepét kísérletes vizsgálatokkal is igazolták. A motívum D25 és D25' aminosavai közvetlen kapcsolatba kerülnek a szubsztráttal/inhibitorral, így módosításuk az enzimfehérje inaktivációjához vezet. A T26 és T26' között kialakuló erős hidrogénkötés a dimer stabilitásában, így a tűzoltófogás kialakításában játszik fontos szerepet. A triád harmadik tagját képviselő G27 és G27' a szubsztrát befogadásában és stabilizálásában játszik szerepet, biztosítva ezzel a katalitikus Asp-ok szubsztrát támadását.

A szubsztrátkötő zsebek és a zsebekbe illeszkedő szubsztrát aminosavrészek egységes elnevezését 1967-ben vezették be. A hasítási helytől N-terminális irányba haladva P1, P2, stb., míg C-terminális irányban P1', P2', stb. elnevezéseket alkalmazunk. Az enzim szubsztrátkötő alhelyeinek megnevezése az előzőek analógjaként S1, S2, stb., illetve S1', S2', stb.

Az aszpartil proteázok általános inhibitoraként az irodalom a pepsztatint említi. A pepsztatin molekula só-származékaival együtt hatékony pepszin inhibitornak bizonyult. Reverzibilis, peptid-mimetikus inhibitoraként a pepsztatin A *in vitro* kísérletek során is igen hatékony celluláris aszpartil proteáz inhibitornak számít, míg kevésbé hatékony a virális proteázokkal szemben. A pepsztatin A felfedezésével szinte egyidőben a *Streptomyces naniwaensis* fajtából aszpartil proteázok gátlására alkalmas új inhibitor izoláltak (S-PI, mint *Streptomyces*-pepszin inhibitor), melyről a vizsgálatok során kiderült, hogy gyakorlatilag a pepsztatin A N-acetil származéka. Az acetil-pepszatin HIV-1 és HIV-2 proteázok hatékony inhibitorának tekinthető. Habár a pepsztatinokat a klinikumban nem alkalmazzák, gátlási mechanizmusuk megismerése nagyban hozzásegítette a tudományt új hatóanyagok kifejlesztéséhez humán patogén vírusokkal szemben. A HIV-1 esetében kifejlesztett első és második generációs inhibitorok többsége peptid-mimetikus, melyek az enzim aktív centrumához kötődve gátolják a Gag és Gag-Pol fúziófehérjék hidrolízisét, így a vírusérést. Kivételt képez ezalól a tipranavir és a darunavir, melyek nem peptid-mimetikus inhibitorok. Érdeemes azonban megjegyezni, hogy a HIV PR gátlására használt inhibitorokkal szembeni gyorsan kialakuló rezisztencia visszavetette a peptid-mimetikus inhibitorok klinikai használatát.

## **1.2. Retrovírus-szerű aszpartil proteázok az eukarióta genomban**

Míg az endogén aszpartil proteázok két-lebenyű (bilobális) szerkezeti felépítéssel rendelkeznek, mely az evolúció során génduplikáció eredményeképpen jöhetett létre (pepszin), addig egyes retrovírus, vagy retrotranszpozon eredetű aszpartil proteázok génjei csak egy katalitikus domént kódolnak és nagy valószínűséggel a retrovírusokra jellemző homodimer kialakítására képesek. Ilyen, az eukarióta genomban is

megtalálható retroelem a Ddi1 fehérje (DNS károsodás által indukálódó protein 1). Az élesztő Ddi1 (*yeast Ddi1*, yDdi1) fehérje szerepét, mint extra-proteaszómális ubikvitin receptor már leírták, azonban az erősen konzervált aszpartil proteáz domén funkciója ma még nem ismert.

A humán genom két Ddi1-szerű fehérjét kódol, a Ddi homológ 1 (*human Ddi1*, hDdi1) és a Ddi homológ 2 (*human Ddi2*, hDdi2) fehérjéket. Genomszerveződésük alapján azt feltételezik, hogy a hDdi2 az eredeti élesztő yDdi1 ortológ, melyről retrotranszpozícióval jöhetett létre a hDdi1. Bár szekvenciájukban egyaránt megtalálható az ubikvitin-szerű domén (UBL) és az aszpartil proteáz domén, a humán Ddi1-szerű fehérjék szerepe a degradációra ítélt fehérjék proteaszómához történő szállításában és irányításában még nem tisztázott.

A magreceptor-interakciós fehérje 2 (NRIP2), melyet az irodalomban gyakran említik neuron interakciós faktor X 1-ként is (NIX-1) kizárólag a központi idegrendszer neuronjaiban expresszálódik. Nukleáris receptor-kötő motívumai (LQTLL, LLQAL) között található egy D-T-G aszpartil-proteáz motívum, melynek szerepe a sejt funkcióját illetően nem ismert.

### **1.2.1. *peg10* (apai kromoszómáról expresszálódó gén 10)**

A *peg10* (*paternally expressed gene 10*) a humán genomba integrálódott (7q21.3), retrotranszpozon eredetű gén, mely kizárólag apai kromoszómáról expresszálódik, míg anyai allélről történő transzkripciója DNS metilációval gátolt.

A *peg10*-ról több transzkript variáns is átíródhat (*peg10*-A 6573 bp, *peg10*-B 6584 bp), melyek közül a *peg10*-B alternatív splicing eredménye. Azonban a különböző szövetekben expresszálódó PEG10 fehérje variánsok megjelenéséért nem csak az alternatív splicing és a különböző translációs start helyek tehetők felelőssé, hanem a humán génállományban igen ritka -1 irányú riboszómális kereteltolás translációs mechanizmusa, valamint a poszt-transzlációs autoproteolízis is.

A *peg10* esetében a retrotranszpozonokra és retrovírusokra is jellemző -1 irányú kereteltolódást (*frameshift*) figyeltek meg, aminek eredményeként az első (RF1) és a teljes olvasási keretről (RF1/RF2) egyaránt történik átírás (RF1<sub>PEG10</sub> és RF1/RF2<sub>PEG10</sub> fehérjék). A *peg10* LTR-retrotranszpozon

eredetére nem csak a ritka transzlációs mechanizmusa, hanem a konzervált domén szerkezete is utal. Az LTR-retrotranszpozonok végein megtalálható a jellegzetes hosszúságú ismétlődő szekvencia (LTR), az egymást átfedő nyitott olvasási keretek (ORF1 és ORF2) és az általuk kódolt kapszid (CA) és nukleokapszid (NC) szerkezeti fehérjéket kódoló *gag*, valamint a proteáz (PR), reverz transzkriptáz (RT) és integráz (IN) enzimeket kódoló *pol*. Habár a *peg10* LTR régiót nem tartalmaz, a bilobális CA-szerű domén, a cink-ujj (CX2CX4HX4C) és erősen konzervált aszpartil proteáz motívumok (D-S-G), valamint a nem teljes-hosszúságú reverz transzkriptáz régió jelenléte miatt az LTR-retrotranszpozonok Ty3/Gypsy családjába sorolható. A retrovírusoktól eltérően a retrotranszpozonokból hiányzik a burokfehérjéket kódoló gén (*envelope*, *env*) és az életciklusukban sincs extracelluláris állapot.

A PEG10 fehérje jelenlétét a citoplazmában és a sejtmagban egyaránt kimutatták, sejten belüli lokalizációja feltételezhetően a kötőpartner(ek) jelenlététől is függ. A PEG10 legjelentősebb ismert kölcsönható partnerei az E3 ubikvitin-protein ligáz (SIAH1) és az aktivin-szerű kináz 1 (ALK1), amely a TGF- $\beta$ -1 családba tartozó sejtmembrán receptor.

A PEG10 aszpartil proteáz doménjének (PR<sub>PEG10</sub>) szerkezetéről és funkciójáról csupán kevés információt találunk az irodalomban. Ugyan a PR<sub>PEG10</sub> katalitikus aktivitását igazolták, az enzim szerepe a PEG10 fehérje „életében” továbbra sem tisztázott.

### 1.2.2. ASPRV1 (retrovírus-szerű aszpartil proteáz 1)

A bőr jelenti a legelső védelmi vonalat a szervezetünk és a külvilág között. Integritásának és homeosztázisának fenntartásához proteolitikus kaszkádok aktivációja és a célfehérjék processzálása szükséges. Ilyen, az epidermisz differenciálódásában és homeosztázisának fenntartásában kulcsszereppel bíró fehérje a retrovírus-szerű aszpartil proteáz 1 (*retroviral-like aspartic protease 1*, ASPRV1) is. A *stratum granulosum*-ban expresszálódó fehérje általános megnevezése mellett gyakran használja az irodalom a bőr-specifikus aszpartil proteáz (*skin-specific aspartic protease*, SASPáz) megjelölést is. A transzlációt követően a fehérje autoproteolízisen esik át, az így keletkező fehérjeformák elnevezése molekulatömegük alapján történik. A teljes méretű, transzmembrán doménnel is rendelkező fehérjére a

SASP37, a már transzmembrán doménnel nem rendelkező 28 kDa molekulatömegű előfehérjére a SASP28, míg a SASP28 autoprocesszállódásával keletkező 14 kDa-os enzimfehérjére a SASP14 megjelölést alkalmazzuk.

Az érett SASP14 enzim egyetlen ismert természetes szubsztrátjának a profilaggrin (pro-FLG) tekinthető. A pro-FLG óriásmolekula (>400 kDa) ismétlődő filaggrin (FLG) egységeket tartalmaz, érése során a pro-FLG a legtöbb esetben a GSFLY↓QVST intermonomer szekvenciáknál hasítódik (a nyíl a szekvencián belüli hasítási helyet jelöli), amely az FLG monomerek felszabadulásához vezet, majd a monomerek tovább fragmentálódnak rövidebb peptidekre, végül aminosavakra. A degradáció során felszabaduló termékek természetes nedvességet és védelmet biztosítanak a bőr számára külső környezeti behatások ellen (*natural moisturizing factors*, NMF).

Korábbi tanulmányok kizárólag az ASPRV1 epitéliumban történő expressziójára és funkciójára fókuszáltak, nemrég azonban kiderült, hogy az ASPRV1 az egér és humán immunrendszer ICAM<sup>+</sup> neutrofil granulocitáiban is kifejeződik. Nagy mennyiségben azonosították mRNS-ét neutrofil granulocitákban más fehérvérsejtekkel ellentétben, mennyiségi emelkedése pedig kimutatható súlyos szklerózis multiplex betegségben szenvedő betegek agyi lézióiban.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

A disszertáció alapjául szolgáló munkák során két, a humán szervezet számára fontos fehérje vizsgálatát tűztük ki célul.

A *peg10* szabályozott expressziója kulcsszereppel bír mind az embrionális fejlődés során, mind pedig posztnatálisan. A kifejeződésében bekövetkező változások súlyos betegségekkel állnak összefüggésben, azonban az irodalomban említett utalások többsége csupán PEG10 megjelöléssel azonosítja a fehérjét, míg az RF1/RF2<sub>PEG10</sub> poliprotein erősen konzervált aszpartil proteáz doménjének szerepe a fehérje életében ma még tisztázatlan. Kutatásaink célja az enzimfehérje aktivitásának ellenőrzése, működésének biokémiai jellemzése és sejtes rendszerben történő vizsgálata volt.

A humán ASPRV1 fehérje szerepe a bőrben esszenciális. Az autókatalízis során felszabaduló enzimfehérje felel a pro-FLG-nak a fillagrin monomerekké történő hidrolíziséért, így funkcionális zavara bőrbetegségekkel hozható összefüggésbe. Az ASPRV1 fehérje bőrben betöltött funkciója relatíve jól jellemzett, azonban jelentősége más sejttípusokban (pl. neutrofil granulocitákban) kevésbé ismert. Vizsgálatát indokolja továbbá, hogy az enzim szerkezetére és biokémiai sajátágára vonatkozó ismeretek is korlátozottak.

Míndezenek alapján a következő célok megvalósítását tűztük ki:

- A retrotranszpozon eredetű PR<sub>PEG10</sub> fehérje vizsgálatára alkalmas expressziós konstruktok létrehozása. A PR<sub>PEG10</sub> enzim működéséhez szükséges megfelelő körülmények (pl.: pH optimum) és a proteolízis stratégiájának (cisz/transz-aktivitás) meghatározása, gátolhatóságának vizsgálata, valamint a módosított PEG10 fehérjéknek sejtek életképességére és proliferációjára gyakorolt hatásának tanulmányozása.

- A GST címkével fuzionált SASP14 enzim optimális működési körülményeinek és HIV proteáz inhibitorokkal szembeni érzékenységének tesztelése, kinetikai paraméterek meghatározása, az autoaktiváció jelenségének igazolása, továbbá annak vizsgálata, hogy a hasítási helyeket érintő mutációk milyen hatást gyakorolnak a GST-SASP28 enzimfehérje autoproteolízisére.

### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### 3.1. A PEG10 fehérje vizsgálata

##### 3.1.1. *In silico* analízis

A PR<sub>PEG10</sub> szekvencia másodlagos szerkezetének jóslását *Jpred4* szerver segítségével végeztük. A rendezetlenségre vonatkozó adatokat az *IUPred* web szerverrel jósltuk meg. Az RF1/RF2<sub>PEG10</sub> 346-477 régió homológ modelljének felépítéséhez *Modeller9v13* programot alkalmaztuk. A molekulaszervezetek a *PyMOL Molecular Graphics System* programmal készültek. A humán PEG10 fehérje ubikvitinálódó helyeinek jóslása az *UbiSite*, *BDM-PUB* és *UbPred* online web szerverek segítségével történt. (Dr. Mótyán János András munkája.)

##### 3.1.2. PEG10 szekvenciák módosítása és klónozása

A humán *peg10* cDNS szekvenciáról a vizsgálatunk tárgyát képező PEG10 fehérjéket kódoló DNS szakaszokat pQE-TriSystem expressziós plazmidba klónoztuk, melyet Prof. Dr. Papp Zoltán (DE, ÁOK, Kardiológiai Intézet, Klinikai Fiziológiai Tanszék) bocsájtott a rendelkezésünkre.

A klónozáshoz a HindIII és XhoI restriktív enzimeket választottuk. Mivel a *peg10* szekvencia önmagában is tartalmaz XhoI hasító helyet (661-666 bp), így a klónozást megelőző lépésként szükséges szinoním pontmutációt végeztünk. Trombin hasítóhelyet kódoló szekvenciát illesztettünk a PEG10 fehérjét kódoló DNS szekvencia és a hisztidin címke közé. A ligációhoz T4 DNA ligázt használtunk. Annak érdekében, hogy a RF1/RF2<sub>PEG10</sub> fehérje transzlációjakor minden esetben megkapjuk a teljes hosszúságú klónozott szekvenciát (<sub>fs</sub>RF1/RF2<sub>PEG10</sub>), inzerációs mutagenézisre volt szükség. A PR<sub>PEG10</sub> aktivitásának vizsgálata érdekében további pontmutációkat hoztunk létre (D369A, D370A és S371A), mely mutációk a katalitikus triádot érintik. A pontmutációk létrehozása *QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit* segítségével történt. A mutációk és a klónozás sikerességét minden esetben szekvenálással ellenőriztük.

### 3.1.3. Rekombináns PEG10 fehérje expressziója eukarióta sejtekben

Tranziens fehérje termelésre HEK293T humán embrionális vese sejteket használtunk. A plazmid DNS-sel történő tranziens transzfekciót a 60 %-os konfluenciát elért sejteken végeztük polietilénimin (PEI) segítségével (T75 tenyésztőedényben).

### 3.1.4. HEK293T sejtek lízise

A sejteket a transzfekciót követő nap tripszinnel kezeltük, majd centrifugálással begyűjtöttük. A sejt pelletet kétszer átmostuk hideg foszfát-pufferelt sóoldattal (PBS), végül proteáz inhibitor koktélt tartalmazó PBS-ben vettük fel. A sejteket szonikálással tártuk fel, majd a lízált sejteket magas fordulatszámon centrifugáltuk, majd a PEG10 fehérjét is tartalmazó felülúszóval dolgoztunk tovább.

### 3.1.5. Rekombináns fluoreszcens szubsztrát termeltetése prokarióta sejtekben

Rekombináns, fluoreszcens fehérjével fuzionált szubsztrát létrehozásához (His<sub>6</sub>-MBP<sub>-TS</sub>RF1/RF2<sub>PEG10</sub> (1-345)-mTurquoise2) templát szekvenciaként bakteriális expresszióra alkalmas, kodon-optimalizált *peg10* cDNS-t alkalmaztunk. A PCR technikával felsokszorozott inzertet a plazmid DNS-hez hasonlóan restrikciónal emésztettük (PacI, NheI), majd klónoztuk. A klónozás sikerességét szekvenálással validáltuk. A rekombináns fehérje termeltetésre BL21(DE3) sejteket használtunk, a sejteket centrifugálással gyűjtöttük össze, majd a pelletet lizozimot és fenil-metil-szulfonil-fluoridot is tartalmazó lízis pufferben vettük fel. A sejteket szonikálással lízáltuk, tisztításuk pedig Ni-nitrilotriacetáttal, bevont mágneses agaróz gyöngyökkel történt. Amicon Ultra-10K ultrafiltrációs centrifugacsövekkel történő puffercserét követően a tisztított fehérjét felhasználásukig 4 °C-on tároltuk.

### 3.1.6. *In vitro* proteolitikus aktivitásvizsgálat

A transzfektált HEK293T sejtek lízisének követően a mintákat tárolásra is alkalmas semleges pH-jú puffer közeggel szemben dializáltuk. A dialízist követően a mintához proteáz inhibitor koktélt (szerin és cisztein proteázok

gátlása) is tartalmazó oldatban 37 °C-on inkubáltuk egy éjszakán át, míg a kontroll minták azonnal fagyasztásra kerültek. A PR<sub>PEG10</sub> intermolekuláris hasítási vizsgálata His<sub>6</sub>-MBP-<sub>fs</sub>RF1/RF2<sub>PEG10</sub> (1-345)-mTurquoise2 rekombináns fehérje szubsztráton történt (20 óra inkubációs idő; 37 °C).

### 3.1.7. A pH optimum meghatározása

A lizált és tároló puffer ellen dializált mintákat 1:1 térfogat arányban mértük össze 5,0-8,0 pH tartományú META pufferrel, majd inkubáltuk a mintákat 37 °C-on 20 órát.

### 3.1.8. Western-blot analízis

A mintákat 14 %-os SDS-poliakrilamid gélen megfuttattuk, majd nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A membránt sovány tejport tartalmazó Tris-pufferelt sóoldatban (TBS) blokkoltuk, majd elsődleges antitesttel inkubáltuk éjszakán át (4 °C). Másnap a nem kötődött antitesteket TTBS pufferes mosási lépésekkel távolítottuk el a membrán felszínéről, majd a HRP konjugált másodlagos antitesttel inkubáltuk szobahőn. Az inkubációt ismételt TTBS pufferes mosások követték. A fehérjéket *SuperSignal WestPico* kemilumineszcens szubsztrát segítségével tettük láthatóvá.

### 3.1.9. A proteolitikus aktivitás gátolhatóságának *in vitro* ellenőrzése

A PR<sub>PEG10</sub> autoprocessálás *in vitro* gátolhatóságát pepsztatin A, lopinavir, nelfinavir, saquinavir, darunavir és tipranavir inhibitorokkal vizsgáltuk. Az <sub>fs</sub>RF1/RF2<sub>PEG10</sub> fehérjét expresszáló HEK293T sejtek lizátumához DMSO-ban oldott inhibitorokat mértük (10 μM), majd a mintákat 37 °C-on inkubáltuk 20 órát. A kontroll minta a bemért inhibitorokkal megegyező koncentrációban DMSO-t tartalmazott, inhibitor nélkül. A fehérjék kimutatása Western-blot technika segítségével, anti-GAPDH és anti-PEG10 antitestek felhasználásával történt.

### 3.1.10. Életképesség vizsgálat (MTT assay)

A vizsgálatokat 16 órával megelőzően a 96-lyukú tenyésztőedényekbe HEK293T vagy HaCaT sejteket mértünk ki. A sejteket *Lipofectamine*

*LTX&PLUS<sup>TM</sup>* reagens segítségével transzfektáltuk a gyártó által megadott leírás alapján. Az életképesség vizsgálatot a transzfekciót követő nap végeztük. A sejtekhez MTT reagenst mértünk, majd 4 órát inkubáltuk 37 °C-on. A formázán kristályok beoldására DMSO-t alkalmaztunk, a minták abszorbanciáját 544 nm-en határoztuk meg. Kontrollként „üres” pQE-TriSystem plazmidot használtunk (mock kontroll), a transzfekció hatékonyságát pedig a fluoreszcens fehérjét kódoló pQE-TriSystem-GFP plazmiddal transzfektált minták fluoreszcencia mérésével ellenőriztük.

### **3.1.11. Sejtprolifерáció vizsgálat (áramlási citometria)**

A HEK293T és HaCaT sejteket 6-lyukú sejtenyészőedénybe mértük. Másnap a letapadt sejteken a tápfolyadékot antibiotikum-mentes OptiMEM médiumra cseréltük, majd RF1<sub>PEG10</sub>, RF1/RF2<sub>PEG10</sub>, f<sub>s</sub>RF1/RF2<sub>PEG10</sub> vagy D370A-f<sub>s</sub>RF1/RF2<sub>PEG10</sub> szekvenciát kódoló plazmiddal transzfektáltuk *Lipofectamine LTX&PLUS<sup>TM</sup>* reagenst használva, a gyártó utasításai alapján. A kontroll minták estében „üres” pQE-TriSystem plazmidot használtunk (mock kontroll), a transzfekció sikerességét pQE-TriSystem-GFP plazmiddal transzfektált sejtek fluoreszcenciájának mérésével ellenőriztük. A sejtprolifерáció vizsgálatát 36 órával a transzfekciót követően áramlási citométer segítségével, FITC-konjugált egér anti-humán Ki67 antitest alkalmazásával végeztük.

## **3.2. ASPRV1 fehérjék vizsgálata**

### **3.2.1. *In silico* vizsgálat**

A SASP14 szekvencia alapján történő másodlagos szerkezet jóslását (UniProtKB: Q53RT3) *PredictProtein*, *JPred4*, *DSC*, *SOPMA*, *GOR4 web* szerverek segítségével végeztük. A hidropátiás index értékeket irodalmi adatokból nyertük. A templát kereséséhez *SWISS-MODEL Workspace*, a homológ modell készítéséhez *Modeller 9v13* programokat. A szubsztrátkötő zsebek térfogatának számításához a *Sybyl SiteID* modulját alkalmaztuk. A számításokat a *Silicon Graphics Fuel* munkaállomásokon futtatott *Sybyl* programcsomaggal hajtottuk végre. A molekulászerkezetet megjelenítéséhez a *PyMOL Molecular Graphics System* programot használtuk. A stabilitás-

elemzést az *I-Mutant 2.0* webszerver segítségével hajtottuk végre, míg a többszörös szerkezet-alapú molekula-illesztést *mTM-Align* szerver segítségével történt. (Az *in silico* elemzéseket minden esetben Dr. Mótyán János András végezte.)

### **3.2.2. SASPáz minták klónozása és mutagenézise**

A SASP28 és SASP14 fehérjéket kódoló cDNS szekvenciát PCR technika alkalmazásával sokszoroztuk fel. Az inzerteket és a pGEX-4T-3 expressziós plazmidot BamHI és EcoRI restriktációs enzimek segítségével tettük kompetensé, míg a ligáláshoz T4 DNS ligázt alkalmaztunk. A SASP28 autoprocesszáló helyeinek mutációit (A167G, L168G, A189K és N190I) *QuikCange Lightning Multi Site-Directed* mutagenézis kit segítségével hoztuk létre a gyártó által ajánlott protokollt követve. A klónozás, illetve a mutagenézis sikerességét minden esetben szekvenálással validáltuk. (A SASPáz minták klónozását és mutagenézisét Nagy Katalin végezte.)

### **3.2.3. GST-SASPáz fehérjék expressziója és tisztítása**

A SASPáz fehérjéket BL21(DE3) kompetens sejtekben IPTG indukcióval expresszáltattuk, az inkubációt követően a sejteket centrifugálással begyűjtöttük, a sejt pelletet lízis pufferben, szonikálással feltártuk, centrifugálást követően a felülúszóval dolgoztunk tovább. A szolubilizált és szűrt GST-fúzionált fehérjéket affinitás-kromatográfiával tisztítottuk (*Äkta prime*). Az eluálás során gyűjtött frakciókat tárolópufferrel szemben dializáltuk. A tisztított fehérje koncentrációját BCA módszerrel határoztuk meg. A fehérjék tisztaságának ellenőrzését és méret szerinti elválasztását SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel végeztük. A fehérjék festését *Coomassie Brilliant Blue* és *PageBlue* festékekkel végeztük. A minták denzitometriás elemzéséhez a *GelAnalyzer* szoftvert alkalmaztuk.

### **3.2.4. Szintetikus oligopeptid szubsztrátok**

A HIV-1 MA és CA fehérjék közötti természetes hasítóhelyet reprezentáló, illetve a P2 és P3 helyen módosított szintetikus oligopeptid szubsztrátok a kutatócsoport rendelkezésre álltak, míg a természetes és a módosított pro-FLG szekvenciákat reprezentáló oligopeptideket a *BioBasic*

cégtől szereztük be. A P4-foszforillált peptidet (GpSFLY↓QVSTH) 50 %-os DMSO-ban, míg a többi szubsztrátot desztillált vízben oldottuk.

### 3.2.5. GST-SASP14 enzimaktivitás mérése

Az enzimet, puffert és szubsztrátot tartalmazó aktivitás mérési reakcióelegyet 37°C-on inkubáltuk 1 órát, ezt követően a reakciót trifluorecetsav (TFA) segítségével állítottuk le. A kapott elegyet fordított fázisú kromatográfiás oszlopra injektáltuk automata injektor segítségével (Merck Hitachi HPLC). Lineáris víz-acetonitril gradiens alkalmazásával, 0,05 % TFA jelenlétében, 206 nm-en követve különítettük el egymástól a szubsztrátot, a termékeket és a pufferkomponenseket.

### 3.2.6. Kinetikai paraméterek meghatározása

A GST-SASP14 enzimkinetikai paramétereinek meghatározását a P2 helyen módosított HIV-1 MA/CA fehérje hasítóhelyét reprezentáló VSQLY↓PIVQ szekvenciájú szintetikus oligopeptid szubsztrát felhasználásával végeztük el. A reakció körülményeket úgy állítottuk be, hogy a szubsztrát hidrolízisre 20 % alatt maradjon. A kinetikai paraméterek meghatározását Michaelis-Menten illesztéssel határoztuk meg, nem-lineáris regressziós módszerrel. Az aktív enzim mennyiségét aktív centrum-titrálással határoztuk meg. A katalitikus állandót ( $k_{cat}$ ) a maximális reakciósebesség és az aktív enzim hányadosaként definiáltuk. Az adatokat *GraphPad Prism 5.01* programmal értékeltük.

A pH optimum meghatározását és az ionerősség aktivitásra gyakorolt hatásának vizsgálatát szintén a VSQLY↓PIVQ szekvenciájú oligopeptiddel végeztük. A pH optimum meghatározásánál a reakcióközeg 2 M végkoncentrációjú NaCl-ot tartalmazott és a puffer sorozat pH tartománya 5,0-9,0 közötti volt, addig az ionerősség hatásának vizsgálatánál a NaCl-ot 0-2 M közötti koncentráció-tartományban alkalmaztuk (pH 6,0). A reakcióelegyet 37 °C-on inkubáltuk 1 órán át, a reakciót TFA oldattal állítottuk le. (Az ionerősség hatásának vizsgálatát Nagy Katalin végezte.)

Az urea-disszociációs állandót ( $UC_{50}$ ) VSQLY↓PIVQ oligopeptid szubsztráton határoztuk meg. A reakciópuffer növekvő koncentrációban ureát (0-2 M végkoncentráció) tartalmazott. Növekvő urea koncentráció

függvényében ábrázoltuk a párhuzamos mérésekből származó relatív aktivitás értékeket, nem-lineáris illesztést alkalmaztunk.

### **3.2.7. GST-SASP14 gátolhatóságának vizsgálata**

A gátolhatóság vizsgálatához a pepsztatin A, indinavir, tipranavir, saquinavir, nelfinavir, darunavir, lopinavir vagy amprenavir inhibitorokat DMSO-ban oldottuk, míg az acetil-pepszatin esetében 50 %-os ecetsavat használtunk. Az enzimreakciók során VSQLY↓PIVQ oligopeptid szubsztrátot alkalmaztunk, a kontroll mintákhoz esetében a gátlószer helyett DMSO-t adtunk (az acetil-pepszatin esetében 50 %-os ecetsavat). A gátlási állandó ( $K_i$ ), illetve az aktív enzim koncentráció meghatározásához indinavir inhibitorot használtunk.

### **3.2.8. Autoaktiváció vizsgálata**

A kísérlet során a tisztított GST-SASP28 fehérjét ASPRV1-reakciópufferben előinkubáltuk. Ezt követően a minták egyik felét SDS-PAGE analízisnek vetettük alá és meghatároztuk a GST-SASP28 proforma és a SASP14 enzim relatív mennyiségét, míg a minták másik feléhez oligopeptid szubsztrátot mértünk (VSQLY↓PIVQ) és 37 °C-on inkubáltuk. A reakciót 1 %-os TFA oldattal állítottuk le, majd a reakcióelegyet HPLC analízisnek vetettük alá.

### **3.2.9. Hasítási hely azonosítása HPLC-(+) ESI-TOF módszerrel**

Azon HIV-1 MA/CA oligopeptid szubsztrátok esetében, melyeket kísérleteinkben a GST-SASP14 enzim hatékonyan képes volt hasítani, a hasítási pozíciók meghatározása érdekében a szubsztrátok és termékek molekulatömegeit HPLC-(+) ESI-TOF módszerrel határoztuk meg. A reakcióközegek vizsgálatához *Waters 2695* HPLC készüléket és *VDSphere PUR 100 C18-M-SE* fordított fázisú kromatográfiai oszlopot használtunk, gradiens elúciót alkalmazva. A szeparálást követően a méretanalízishez az elektroporlasztásos ionforrással (ESI) felszerelt *MicroTOF-Q* típusú *Qq-TOF MS* készüléket pozitív ionmódban használtuk. (Az előkészített minták HPLC-MS vizsgálatát Dr. Nagy Tibor végezte.)

### **3.2.10. Hasítási hely azonosítása MALDI-TOF-MS módszerrel**

A vad típusú és autoproteolitikus hely mutáns GST-SASP28 enzimfehérjéken belüli hasítási pozíciók meghatározásához a mintákat reakciópufferben inkubáltuk (37 °C) egy éjszakát. Az inkubációt követően a mintákat víz ellen dializáltuk, majd *Eppendorf Concentrator plus* készülékkel töményítettük. A minták előkészítéséhez C18 töltetű ZipTip pipettahegyeket alkalmaztunk. Az előkészített minták MALDI-TOF MS méréseit *Bruker Autoflex Speed* tömegspektrométerrel kiviteleztük, lineáris módban. A hasítási pozíció meghatározása a felszabaduló SASP14 molekulatömegének meghatározása alapján történt (Dr. Nagy Tibor munkája.)

### **3.2.11. SASPáz minták statisztikai elemzése**

A statisztikai elemzéseket a PEG10 és ASPRV1 esetében is GraphPad QuickCalcs online számológép használatával végeztük (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1.cfm>).

## 4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

### 4.1. PEG10 vizsgálata

#### 4.1.1. *In silico* vizsgálati eredmények

A PR<sub>PEG10</sub>-ra vonatkozó szerkezeti adatok csupán korlátozott mértékben álltak rendelkezésre, kristályszerkezetét vagy oldatfázisú szerkezetét a mai napig nem határozták meg, homológ modelljét sem építették fel, így szerkezeti jellemzőinek vizsgálatára *in silico* módszereket alkalmaztunk. Az analízisek eredménye alapján a PR<sub>PEG10</sub> konzervált katalitikus motívum jelenléte és a másodlagos szerkezeti elemek elrendeződése is a retrovírus és retrovírus-szerű proteázokkal való nagyfokú hasonlóságra utalt. Míg a PR<sub>PEG10</sub> szerkezet rendezetlenségének jóslása azt mutatja, hogy a kereteltolódás közvetlen közelében található régió (247-348 aa) nem rendezett szerkezetű, addig a katalitikus D-S-G-A motívum közelében elhelyezkedő régió  $\alpha$ -helikális konformációt vesz fel, utóbbi a legtöbb retrovirális proteázra nem jellemző. A PR<sub>PEG10</sub> domén C-terminális régiójának elemzése monomerenként három  $\beta$ -redőt jelenlétét jóslta, melyek rövid hurokrégióval kapcsolódnak (*loop*), ez alapján a homodimer PR<sub>PEG10</sub> dimerizációs régiójában összesen hat  $\beta$ -redő feltételezhető. A homodimer PR<sub>PEG10</sub> feltételezett szerkezetét homológ modellezéssel jósltuk, mely nagyfokú hasonlóságot mutat a retrovírus-szerű Ddi1 és Ddi2 fehérjék legfőbb szerkezeti sajátjaival. A modell szerkezetet a PR<sub>PEG10</sub> specificitásának vizsgálatára és autoproteolitikus hasítási helyének becslésére is felhasználtuk.

#### 4.1.2. PEG10 fehérjék tranzien্স expressziójának ellenőrzése

A PEG10 fehérjék előállítására HEK293T sejtvonalon történt. A létrehozott variánsok azonosítására RF1<sub>PEG10</sub>-specifikus (1-325 aa) antitestet alkalmaztunk, mely nem alkalmas az RF2<sub>PEG10</sub> kimutatására. A Western-blot kísérletek során HEK293T sejtizátumot használtunk kontrollként. A különböző fehérje formák mennyiségi összehasonlítása az alkalmazott antitest poliklonális jellege miatt nem volt lehetséges. A mutációkra visszavezethető expressziós különbséget nem tapasztaltunk a D370A-<sub>fs</sub>RF1/RF2<sub>PEG10</sub> és a S371A-<sub>fs</sub>RF1/RF2<sub>PEG10</sub> fehérjék között.

### 4.1.3. PR<sub>PEG10</sub> proteolitikus aktivitás bizonyítása

A <sub>fs</sub>RF1/RF2<sub>PEG10</sub> fehérje esetében a teljes méretű fehérjéhez képest két új sáv (~45 kDa és ~37 kDa molekulaméretű) volt megfigyelhető inkubációt követően. A megjelenő fehérje-sávokat proteolitikus fragment 1 (PF1) és proteolitikus fragment 2 (PF2) néven említjük a továbbiakban. A megjelenő fragmentek a PR<sub>PEG10</sub> autoprocesszáló képességének meglétére utaltak, a katalitikus triád mutációját hordozó variánsok (D370A-<sub>fs</sub>RF1/RF2<sub>PEG10</sub> és S371A-<sub>fs</sub>RF1/RF2<sub>PEG10</sub>) egyikénél sem tapasztaltunk változást. Annak a lehetőségnek a kizárására, hogy a teljes sejtlizátumban található egyéb enzimek hasítják a PEG10 fehérjét, a katalitikusan inaktív D370A-<sub>fs</sub>RF1/RF2<sub>PEG10</sub> fehérjét nem-transzfektált HEK293T sejtek teljes lizátumával inkubáltuk. A kísérleti eredményeink alapján az <sub>fs</sub>RF1/RF2<sub>PEG10</sub> inkubációját követően megjelenő fragmensek a PR<sub>PEG10</sub> katalitikus aktivitásának termékei, nem pedig egyéb celluláris proteázok hasítása következtében keletkezett termékek.

### 4.1.4. Proteolitikus hasítható hely becslése

A homológ modellen alapuló számítások segíthetik a specificitás vizsgálatokat és *in vitro* kísérleti eredményekkel együtt jósolhatóvá teszik a hasítási hely szekvenciáját. Mivel az autoproteolitikus felismerő szekvenciá(k) a PR<sub>PEG10</sub> esetében nem volt(ak) ismert(ek), és specificitás-vizsgálatok eredményei sem álltak rendelkezésre az irodalomban, a homológ modell szerkezeten alapuló számításokat végeztünk a PEG10 fehérjén belüli autoproteolitikus hasítási hely azonosítására. *In vitro* vizsgálati eredményeinkből tudtuk, hogy az RF1<sub>PEG10</sub> és PF1 molekulatömege eltérő, mely különbség számításaink alapján közel 4-5 kDa-nak bizonyult. Az adatok alapján a hasítás helye az RF1<sub>PEG10</sub> fehérje CA-szerű doménje és a cink-ujj motívuma közé volt jósolható.

### 4.1.5. PEG10 ubikvitináltsága

*In vitro* vizsgálataink a fehérje poszttranszlációs módosulására utaltak, így a lehetséges módosítások vizsgálatára *in silico* algoritmusokat is alkalmaztunk, melyek alátámasztották az ubikvitináció lehetőségét. A módosulás *in vitro* igazolásához kísérleteinkben a HEK293T sejtekben

előállított D370A-<sub>f<sub>s</sub></sub>RF1/RF2<sub>PEG10</sub> fehérje tisztítását Ni-kelát affinitás kromatográfiával végeztük, majd Western-blotot végeztünk ubikvitin-ellenes antitesttel, kontrollként nem-transzfektált HEK293T sejtek lizátumát használtuk, azonos körülmények között. Vizsgálatunk egyértelműen bizonyította a D370A-<sub>f<sub>s</sub></sub>RF1/RF2<sub>PEG10</sub> fehérje ubikvitináltságát.

#### **4.1.6. PR<sub>PEG10</sub> transz-aktivitás vizsgálata**

A BL21(DE3) sejtekben termeltetett, majd tisztított His<sub>6</sub>-MBP-<sub>f<sub>s</sub></sub>RF1/RF2<sub>PEG10</sub>-mTurquoise2 szubsztrátot a <sub>f<sub>s</sub></sub>RF1/RF2<sub>PEG10</sub> fehérjét is tartalmazó HEK293T sejtek teljes lizátumával inkubáltuk, a változásokat pedig Western-blot technika segítségével követtük (anti-MBP és anti-PEG10 antitestek). A hasítási reakció mellett külön vizsgáltuk az enzim cisz-aktivitását is a fúziós forma proteolízisének nyomkövetésével. A szubsztrát hasíthatóságát TEV proteázzal végzett enzimreakcióban igazoltuk.

A kísérlet eredménye alapján - bár intramolekuláris hasítás történt - a PR<sub>PEG10</sub> nem volt képes hasítani a rekombináns szubsztrátot. A transz-aktivitás hiánya véleményünk szerint magyarázható az ön-inaktiváció mechanizmusával, mely jelenséget korábban az alfavírus kapszid proteáz esetében is megfigyelték.

#### **4.1.7. A pH hatása az autoproteolízisre**

Vizsgáltuk a pH hatását a <sub>f<sub>s</sub></sub>RF1/RF2<sub>PEG10</sub> autoproteolízisére. Eredményeink alapján elmondható, hogy bár tapasztalunk proteolízist pH 6,0 és 8,0 közötti tartományban, a PR<sub>PEG10</sub> számára optimális pH közel neutrális (pH 6,9-7,4), mely hasonlóságot mutat a HFV esetében meghatározott optimummal (pH 6,6).

#### **4.1.8. HIV proteáz inhibitorok hatása a PEG10 autoproteolízisre**

A kísérlet során olyan gátlószereket próbáltunk ki, mint a klasszikus aszpartil proteáz inhibitornak számító pepsztatin A, első és második generációs peptid-mimetikus (nelfinavir, saquinavir, lopinavir) és „flexibilis” szerkezettel bíró HIV PR inhibitorok (darunavir és tipranavir). Az autoproteolízisre gyakorolt gátló hatást azonban egyik esetben sem

tapasztaltunk, ami arra utal, hogy a PEG10 természetes rezisztenciával rendelkezik ezen gátlószerekkel szemben.

#### 4.1.9. Életképesség és sejtproliferáció vizsgálata

Az RF1<sub>PEG10</sub> fehérjét expresszáló HEK293T sejtek életképessége szignifikánsan növekedett a kontroll csoporthoz képest, míg RF1/RF2<sub>PEG10</sub> esetében nem tapasztaltunk számottevő változást egyik sejtvonalnál sem. Amennyiben a PEG10 fehérjéket expresszáló sejtek eredményeit hasonlítottuk össze, RF1<sub>PEG10</sub> transzfektált HEK293T minták esetében a tapasztalt növekedés továbbra is szignifikáns különbségnek mutatkozott az RF1/RF2<sub>PEG10</sub> mintáihoz képest. Annak bizonyítására, hogy az RF1/RF2<sub>PEG10</sub> poliprotein által kódolt funkcióképes PR<sub>PEG10</sub> fontos befolyásoló tényezője a sejtek életképességének, a katalitikusan aktív (<sub>fs</sub>RF1/RF2<sub>PEG10</sub>) és inaktív (D370A-<sub>fs</sub>RF1/RF2<sub>PEG10</sub>) szekvenciát kódoló plazmidokkal transzfektáltunk. Amennyiben a mock kontroll mintákhoz viszonyítottuk az eredményeket, a katalitikusan inaktív PR<sub>PEG10</sub>-t tartalmazó D370A-<sub>fs</sub>RF1/RF2<sub>PEG10</sub> fehérjét expresszáló sejtek életképességében nem tapasztalunk változást. Az aktív PR<sub>PEG10</sub>-t tartalmazó <sub>fs</sub>RF1/RF2<sub>PEG10</sub> viszont már mindkét sejtvonal esetében jelentősen csökkentette az életképes sejtek arányát. Az eredmények alapján megállapítható, hogy a PR<sub>PEG10</sub> a vizsgált sejtekben az RF1<sub>PEG10</sub> életképességet befolyásoló biokémiai folyamatait szabályozhatja, mely szabályozási folyamatok vizsgálata, molekuláris szinten történő feltárása a továbbiakban indokolt lehet.

A különböző plazmidokkal végzett transzfekció hatását a sejtek növekedésére Ki67 fehérje kimutathatóságának vizsgálatával végeztük. A növekedésre optimális körülmények között tartott sejtek nem mutattak változást a kontroll csoporthoz képest egyik PEG10 variáns esetében sem, azonban ha a <sub>fs</sub>RF1/RF2<sub>PEG10</sub> és D370A-<sub>fs</sub>RF1/RF2<sub>PEG10</sub> minták Ki67 pozitív sejteinek arányát hasonlítjuk össze, már szignifikáns eltérést tapasztalunk HEK293T sejtek esetében. A <sub>fs</sub>RF1/RF2<sub>PEG10</sub> fehérje - a katalitikusan inaktív PR<sub>PEG10</sub>-t expresszáló sejtekhez viszonyítva - indukáló hatással volt a sejtek növekedésére.

## 4.2. ASPRV1 vizsgálata

### 4.2.1. ASPRV1 *in silico* vizsgálati eredmények

A PR<sub>PEG10</sub>-hoz hasonlóan a SASP14 esetében sem ismert a mai napig kísérletes módszerrel meghatározott szerkezet, így a szerkezeti jellemzők analizését *in silico* módszerekkel végeztük el. Akárcsak a PR<sub>PEG10</sub> esetében, a SASP14 szerkezeti analízise is valószínűsített a katalitikus motívum közelében egy helikális inzertet. A szerkezeti jóslás monomerenként három C-terminális  $\beta$ -redő jelenlétére utalt, mely alapján a PR<sub>PEG10</sub>-hoz hasonló, összesen hat  $\beta$ -redőből álló dimerizációs régiót feltételeztünk, melyben a  $\beta$ -redők rövid hurokkal kapcsoltak. Az enzim a PEG10 fehérjéhez hasonlóan D-S-G-A szekvenciát tartalmaz, mely megfelel a retrovírus proteázok konzervált D-S/T-G-A aktívhely motívumának.

### 4.2.2. Mutációk tervezése a SASPáz fehérjékben

A vizsgált SASP14 enzimek esetében a Met2 aminosav Ile-ra történő mutációját elvégeztük, mellyel az enzim stabilitás növelése és oxidációjának elkerülése volt a cél. A mutáció szekvencia-alapú *in silico* vizsgálata (*I-Mutant 2.0*) alapján a mutáció növeli az enzim stabilitását, míg a működést valószínűleg nem befolyásolja, mert a Met2 nem vesz részt szubsztrát-kötésben és a dimerizációban sem. Vizsgálatainkban a Met2Ile mutáns rekombináns SASP14 enzimformát vizsgáltuk és tekintettük vad típusúnak.

A GST-SASP28 forma esetében az autoproteolízis helyét érintő mutációkat vezettünk be és vizsgáltuk azok hatását az enzim processzáló képességére. Az A189K/N190I dupla mutáns esetében az N-terminális SASP14 processzáló hely P1 és P2 aminosavakat módosítottuk, míg az alternatív hasítóhely P1 és P1' pozíciójában található aminosavak módosításait a A167G/L168G/A189K/N190I négyszeres mutáns tartalmazta.

### 4.2.3. GST-fúziós fehérjék expressziója és tisztítása

Az ASPRV1 enzimformák közül a SASP37 pre-proformát nem vizsgáltuk, a transzmembrán régió okozta expressziós nehézségek miatt. A GST-fúziós címkével kapcsolt SASP14, illetve SASP28 fehérjéket BL21(DE3) baktérium sejtekben expresszáltuk, majd detergens

jelenlétében szonikálással lizált mintákat affinitás kromatográfiával tisztítottuk. Affinitás kromatográfiát követően a GST-SASP14 és GST-SASP28 fehérje frakciók tisztaságát SDS-PAGE segítségével ellenőriztük, majd a kiválasztott mintákat tároló pufferrel szemben dializáltuk.

#### 4.2.4. GST-SASP14 enzim vizsgálatok

A GST-SASP14 esetében meghatároztuk az enzimkinetikai paramétereket ( $K_M=1,26$  mM;  $k_{cat}=0,034$  s<sup>-1</sup>;  $k_{cat}/K_M=0,027$  mM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>), mely értékek a HIV-1 proteázhoz képest a GST-SASP14 alacsonyabb katalitikus hatékonyságra utaltak.

#### 4.2.5. Optimális pH és ionkoncentráció meghatározása

Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a GST-SASP14 enzim pH optimuma ( $pH_{opt}=6,27\pm 0,02$ ) közelebb található a *stratum granulosum* fiziológiás pH értékéhez, míg savas környezetben, mint például a *stratum corneum* felsőbb rétegei, veszt az aktivitásából. Hasonlóan a HFV és a HIV-1 proteázokhoz, a GST-SASP14 esetében is emelkedett enzimaktivitást tapasztaltunk az ionerősség növelésével.

#### 4.2.6. Urea-disszociációs állandó (UC<sub>50</sub>) meghatározása

Urea-disszociációs állandó (UC<sub>50</sub>) alatt a dimerként aktív enzim aktivitásának 50 %-os csökkenését eredményező urea koncentrációt értjük.

Az UC<sub>50</sub> értékek alapján megállapítható stabilitásbeli különbségek részben az enzimek eltérő felépítésű dimerizációs felszínével magyarázhatóak. Maga a dimerizációs felszín a molekulák közötti fő kölcsönható felületként definiálható, így azoknál a proteázoknál, ahol alternáló N- és C-terminális  $\beta$ -redők erősítik a molekulák közötti kapcsolatot (pl. HIV-1 PR) szignifinansabban magasabb intermonomer kölcsönhatás-sűrűség állapítható meg, mint azoknál a fehérjéknél, amelyeknél csak C-terminális, nem ismétlődő  $\beta$ -redő található (pl. XMRV és Ddi proteázok). Utóbbi proteázokhoz hasonlóan a SASP14 dimerizációs felszínét is kizárólag C-terminális  $\beta$ -redők alkotják, ami relatíve alacsonyabb dimer stabilitást biztosít a homodimer számára.

#### 4.2.7. Szubsztrát specificitás vizsgálat

A GST-SASP14 enzim S2 és S3 szubsztrátkötő helyeinek aminosav preferenciáját a HIV-1 MA/CA (VSQNY↓PIVQ) hasítóhely P2 és P3 pozícióban módosított variánsait reprezentáló szintetikus oligopeptid szubsztrátok felhasználásával vizsgáltuk. A természetes hasítóhelyet tartalmazó, vad típusú (VSQNY↓PIVQ) szubsztrát esetében 1 óra alatt nem, míg 16 órás inkubációs időt követően is csupán kismértékű hidrolízist tapasztaltunk. A P3-módosított oligopeptid szubsztrátok hidrolízise 1 órás reakcióidő mellett nem volt detektálható, ezért az inkubációs időt 16 órára növeltük. A vizsgált oligopeptid szubsztrátok közül a P3-Val és -Asp mutánsok 16 óra alatt sem hasadtak, illetve a többi vizsgált peptid (P3-Gln, -Lys és -Gly) esetében tapasztalható hidrolízis mértéke is igen alacsony volt. A vizsgált mutációk közül a P3-Lys mutáns esetében tapasztaltuk a legnagyobb mértékű hasítást, azonban ez a mutáns még így is szignifikánsan rosszabb szubsztrátja volt a SASP14 enzimnek, mint a P2-Leu mutáns (1 órás reakcióidő).

A pontos hasítási hely meghatározásához a hasított és hasítatlan oligopeptid szubsztrátokat HPLC-ESI-TOF analízisnek vetettük alá. A retenciós idő és tömeg/töltés ( $m/z$ ) értékeket a hasítatlan szubsztrát, és a hasítás során keletkező fragmentek esetében egyaránt meghatároztuk. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a szubsztrátok mind a vad típusú, mind pedig a P2 és P3 módosított peptidek esetében is a P1-Tyr és P1'-Pro aminosavak között hasadtak, amely megegyezik a HIV-1 PR hasítási pozíciójával, alternatív hasítási helyet nem detektáltunk. A pro-FLG hasítóhely szekvenciákon kívül eddig nem volt ismert, hogy a SASP14 proteáz milyen más szekvenciákon belül és hol képes hasítani.

#### 4.2.8. Foszforiláció hatása a szubsztrát hidrolízisre

Irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy a FLG a translációt követően foszforilálódik, melynek feltételezések szerint szerepe lehet a FLG egységeket összekötő szakaszok proteolízisének, így a FLG érésének megakadályozásában, ugyanis a hasítási helyek foszforilációja miatt a szubsztrát hasítása gátlódik. Azt feltételezve, hogy a szubsztrát foszforiláltsága hasonlóan gátló hatással lehet az ASPRV1 PR-ra, vizsgáltuk

a természetes, azaz a FLG processzáló helyet (GSFLY↓QVSTH) reprezentáló szubsztrát, valamint annak P4-foszforilált formája hasíthatóságát. Kísérletünkben a vad típusú szekvencián belüli hasítást tapasztaltunk, míg a P4 pozícióban foszforilált oligopeptid már nem bizonyult megfelelő szubsztrátnak a GST-SASP14 enzim számára, ami megerősíti a hasítóhely foszforilációjának szabályozásban betöltött szerepét.

#### **4.2.9. Gátolhatósági vizsgálatok HIV-1 proteáz inhibitorokkal**

A tesztelt inhibitor panel alapján az indinavir gátló hatása volt a legjelentősebb. A gátló hatás értékének számszerűsítéséhez meghatároztuk a gátlási állandót ( $K_i=0,62 \mu\text{M}$ ). Az acetil-pepszatin inhibitort  $10 \mu\text{M}$  végkoncentrációban alkalmazva az enzimaktivitás fokozódását figyeltük meg, míg az inhibitor koncentrációjának növelése szignifikáns mértékű gátlást okozott. A jelenséget korábban a HIV-1 PR esetében már megfigyelték, mely alapján az acetil-pepszatin képes stabilizálni a kialakult dimer szerkezetet, így fokozva a hidrolízis hatékonyságát. A SASP14 enzim esetében ez a jelenség még nem ismert részleteiben, így további vizsgálatok szükségesek a pontos körülmények tisztázására.

A PR<sub>PEG10</sub> fehérjéhez hasonlóan a SASP14-et sem gátolták az amprenavir, darunavir, lopinavir, nelfinavir, saquinavir és tipranavir inhibitorok az *in vitro* vizsgálatok során, ezért megvizsgáltuk, hogy a HIV-1 PR rezisztencia mutációi előfordulnak-e az SASP14 szekvencia megfelelő pozícióiban. Megállapítottuk, hogy az SASP14-ben több olyan aminosav is található, amely megfelel a HIV-1 PR elsődleges vagy másodlagos rezisztencia mutációinak. Ezek közül csak három aminosav játszik szerepet a kötőhely kialakításában HIV-1 PR esetében: az I47 az S2 és S4 zsebekben, a Q58 az S4 zsebben, míg a V82 az S1 zseb esetén. A SASP14 V66 és A80 vad típusú aminosavai megfelelnek a HIV-1 PR Q58V és a G73A másodlagos rezisztencia mutációinak, ennek ellenére kísérleteinkben a SASP14 mégis gátolható volt indinavirral, így tehát a számos inhibitorral szembeni természetes rezisztencia nem magyarázható kizárólag a HIV-1 rezisztencia mutációkkal való azonossággal néhány pozícióban.

#### **4.2.10. GST-SASP28 enzimformák autoproteolízisének vizsgálata**

Eredményeink azt mutatták, hogy a létrehozott mutációkkal (A189K/N190I és A167G/L168G/A189K/N190I) nem sikerült elérni a GST-SASP28 autoprocesszálásának teljes gátlását, ugyanakkor annak hatékonysága jelentősen lecsökkent. A mutációk hatására nem tapasztaltuk az alternatív hasító helyen történő processzálást vagy a hasítási pozíció(k) eltolódását, sem SDS-PAGE, sem pedig MALDI-TOF-MS analízisek eredményei alapján. Eredményeink alapján a vad típusú GST-SASP28 fehérjéhez képest (~80 %) a mutánsok esetében az autoproteolízis hatékonysága jelentősen lecsökkent (~10 %) 20 óra inkubációs idő alatt, ami arra utalt, hogy az N-terminális hasítóhely P2 és P1 pozícióban található aminosavak egyidejű mutációi (A189K/N190I) nem gátolják a processzálás képességét, csakúgy, mint a négyszeres mutációt hordozó fehérje (GST-SASP28- A167G/L168G/A189K/N190I) esetében sem.

#### **4.2.11. Autoaktiváció jelenségének bizonyítása**

Az önprocesszálás végbemenetelét és így a SASP14 enzimforma megjelenését a GST-SASP28 előinkubálásával biztosítottuk, a különböző ideig inkubált minták eltérő mennyiségben tartalmazták a prekursor formát és a SASP14 fehérjét. A kiindulási mintában a GST-SASP28, míg az inkubációs idő növekedésével a processzálódott SASP14 enzim mennyisége dominált. Az előinkubációt követően a mintákhoz oligopeptid szubsztrátot adtunk, majd a reakcióidő lejárta után HPLC-alapú analízissel ellenőriztük a szubsztrát hidrolízist. A növekvő előinkubációs idővel arányosan fokozódott a szubsztrát hidrolízise a nulla időpontban mért értékhez képest, mindez pedig összefüggésben van a felszabadult SASP14 arányával a reakcióelegyben. Eredményeink alapján megállapítható, hogy az önprocesszálás során valóban autoaktiváció történik, mely a két forma katalitikus aktivitásának összehasonlításából egyértelműen kijelenthető.

## 5. ÖSSZEFOGLALÁS

A doktori értekezésem alapjául szolgáló munkák során lehetőségem nyílt két, retrovírus-szerű humán aszpartil proteáz tanulmányozására. A PR<sub>PEG10</sub> vizsgálata céljából a teljes hosszúságú poliprotein átírását biztosító *frameshift* mutánst (<sub>ts</sub>RF1/RF2<sub>PEG10</sub>), valamint aktív hely-mutánsokat (D370A, S371A) kódoló plazmidokat állítottunk elő. A HEK293T sejtvonalban termeltetett PEG10 fehérjék kimutatására, a PR<sub>PEG10</sub> aktivitásának nyomon követésére és a fehérje ubikvitinációjának igazolására is Western-blot technikát alkalmaztunk. Az autoproteolízis vizsgálata a PR<sub>PEG10</sub> neutrális pH optimumát mutatta (pH 6,9-7,4). Kísérleteinkben igazoltuk a PR<sub>PEG10</sub> intramolekuláris hasítását (PF1 és PF2 termékek megjelenése), ugyanakkor rekombináns fehérje szubsztráton végzett kísérleteinkben intermolekuláris kölcsönhatást nem tapasztaltunk. A pontos hasítási pozíciót *in vitro* kísérletekkel nem sikerült pontosan azonosítani, így azt *in silico* módszerrel becsültük. A PR<sub>PEG10</sub> autoproteolízisének gátlóhatóságát több HIV proteáz inhibitorral is teszteltük, gátló hatást azonban egyik esetben sem figyeltünk meg. HEK293T és HaCaT sejtvonalakon végzett kísérletekben igazoltuk, hogy a PR<sub>PEG10</sub> hatással van a sejtek életképességére és proliferációjára.

Az ASPRV1 enzimfehérje GST-fúzionált formáit (GST-SASP14, GST-SASP28) BL21(DE3) sejtekben expresszáztattuk és a fehérjéket affinitás kromatográfiával tisztítottuk. Az *in vitro* enzimvizsgálatok során SDS-PAGE- és HPLC-alapú módszereket alkalmaztunk. A GST-SASP14 enzimkinetikai paramétereit ( $K_M$ ,  $k_{cat}$ ,  $k_{cat}/K_M$ ), a pH, az ionerősség és az urea enzimaktivásra gyakorolt hatását a HIV-1 MA/CA hasítóhely P2-Leu módosított variánsát reprezentáló oligopeptid szubsztráttal vizsgáltuk, valamint tanulmányoztuk az S2 és S3 szubsztrátkötő zsebek aminosav-preferenciáit is. Igazoltuk az indinavir gátló hatását, kimutattuk, hogy a pepsztatin A és acetil-pepsztatin egyaránt képesek az enzim gátlására, valamint bizonyítottuk, hogy a GST-SASP28 prekursor autoproteolízise szükséges az ASPRV1 autoaktivációjához, az autoprocesszálas vizsgálatát hasítóhely-mutánsok vizsgálatával is elvégeztük.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom *Prof. Dr. Tózsér József* intézetvezető egyetemi tanár Úrnak, hogy lehetőséget biztosított nekem témavezetőként Ph.D. tanulmányaim folytatására és hogy szakmai tanácsaival segítette a munkámat!

Köszönöm †*Dr. Bagossi Péternek*, hogy kezdeti témavezetésével elkezdhettem a Ph.D. munkám a Retrovirális Biokémia Kutató Laboratóriumban!

Köszönöm *Prof. Dr. Fésüs László* korábbi intézetvezető egyetemi tanár Úrnak, hogy Ph.D. tanulmányaimat a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézetben támogatta!

Külön köszönöm *Dr. Mótyán János Andrásnak* és *Joóné Dr. Matúz Krisztinának*, hogy barátságukkal, szakmai és emberi támogatásukkal mindvégig segítettek a munkám során!

Köszönöm *Dr. Mohamed Mahdinak*, *Dr. Tóth Ferencnek*, *Dr. Szojka Zsófiának*, *Gazda Líviának*, *Janics-Pető Szilviának*, *Kassay Norbertnek*, *Miczi Máriónak* és *Toldi Vandának* baráti és szakmai segítségüket, a vidám és jó hangulatot, mely megteremtésével a kutatómunka is könnyebben haladt! Külön köszönöm *Dr. Nagy Tibor* és *Nagy Katalin* szakmai támogatását!

Köszönöm *Ambrus Viktor*, *Dr. Szabó András*, *Kunkli Balázs*, *Linkner Tamás*, *Miltner Noémi*, *Molnár Boglárka*, *Nataly Morales Granda* és kollégáimnak, hogy bármikor számíthattam rájuk szakmai és emberi tekintetben!

Szeretném megköszönni a *Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet dolgozóinak* az érdeklődésüket és a munkát támogató barátságos hangulatot!

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni a *családom* biztató támogatását, nélkülük ez a dolgozat nem születhetett volna meg!

Kutatásaink kivitelezését a GINOP-2.3.2-15-2016-00044 számú „A gyógyszerkutatás újabb irányai: peptid-fehérje kölcsönhatások a magasabb rendű fehérjeszerveződések szabályozásában- PHARMPROT teaming” című pályázat, a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0023 „VÉD-ELEM”, valamint a TÁMOP-4.2.2.D-15/1/KONV-2015-0016 pályázatok, az Innovációs és Technológiai Minisztérium Felsőoktatási Intézményi Kiválósági Program NKFIH-1150-6/2019 számú programja, valamint az Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok (K-101591, NKFI-125238) segítették.



Nyilvántartási szám: DEENK/72/2021.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Golda Mária  
Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Golda, M.**, Mótyán, J. A., Nagy, K., Matúz, K., Nagy, T., Tózsér, J.: Biochemical characterization of human retroviral-like aspartic protease 1 (ASPRV1).  
*Biomolecules*. 10 (7), 1-25, 2020.  
IF: 4.082 (2019)
2. **Golda, M.**, Mótyán, J. A., Mahdi, M., Tózsér, J.: Functional Study of the Retrotransposon-Derived Human PEG10 Protease.  
*Int. J. Mol. Sci.* 21 (7), 1-22, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21072424>  
IF: 4.556 (2019)

### További közlemények

3. Kassay, N., Mótyán, J. A., Matúz, K., **Golda, M.**, Tózsér, 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: 2.991 (2019)
4. Mahdi, M., Mótyán, J. A., Szojka, Z., **Golda, M.**, Miczi, M., Tózsér, J.: Analysis of the efficacy of HIV protease inhibitors against SARS-CoV-2's main protease.  
*Virology*. 17 (1), 1-8, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12985-020-01457-0>  
IF: 2.579 (2019)





5. Miczi, M., **Golda, M.**, Kunkli, B., Nagy, T., Tózsér, J., Mótyán, J. A.: Identification of Host Cellular Protein Substrates of SARS-COV-2 Main Protease.

*Int. J. Mol. Sci.* 21 (24), 1-19, 2020.

DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21249523>

IF: 4.556 (2019)

**A közlő folyóiratok összesített impact faktora: 18,764**

**A közlő folyóiratok összesített impact faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):  
8,638**

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, 2021.03.01.

