

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Rekombináns fehérje szubsztrátok alkalmazása
HIV-1 és SARS-CoV-2 proteázok vizsgálatára és egy
bioréteg interferometria-alapú mérési módszer
kidolgozására**

Miczi Máriaó

Témavezető: Dr. Mótyán János András



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Sejt- és Imunbiológiai Doktori Iskola

Debrecen, 2022.

REKOMBINÁNS FEHÉRJE SZUBSZTRÁTOK ALKALMAZÁSA HIV-1 ÉS SARS-COV-2 PROTEÁZOK VIZSGÁLATÁRA ÉS EGY BIORÉTEG INTERFEROMETRIA-ALAPÚ MÉRÉSI MÓDSZER KIDOLGOZÁSÁRA

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

Írta: Miczi Márió, okleveles biotechnológus

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

Témavezető: Dr. Mótyán János András

Az értekezés bírálói: Dr. Kardos József, PhD

Dr. Tar Krisztina, PhD

A bírálóbizottság:

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

tagok: Prof. Dr. Emri Tamás, az MTA doktora

Dr. Fehér Enikő, PhD

Dr. Kardos József, PhD

Dr. Tar Krisztina, PhD

Az értekezés védésének (online formában) időpontja: 2022. 06. 15. 13:00 óra

A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben a vitán részt kíván venni, úgy jelezze a miczimario@med.unideb.hu email címre küldött üzenetben 2022.06.14. 16:00 óráig. A határidő lejárátát követően technikai okok miatt már nincs lehetőség a védéshez kapcsolódni.

1. Bevezetés

1.1. A proteázok

A proteolitikus enzimek tanulmányozásának története egészen a XVIII. század végéig vezethető vissza. A proteolitikus enzimek sokféleképpen befolyásolják az emberiség mindennapi életét, hiszen az élő szervezetben eszenciális folyamatok lebonyolításában vesznek részt a homeosztázis fenntartása érdekében. Biokémiai tulajdonságukat tekintve, képesek megszüntetni az aminosavmaradékok közti kapcsolatot, a peptidkötések hidrolízise révén. A proteolitikus aktivitás következménye lehet a fehérjemolekulákat alkotó polipeptidláncok degradációja (pl. emésztő enzimek), melynek során a proteáz a célfehérjét több pozícióban is hasítja, a degradációnak fontos szerepe van a fehérjék emésztésében és eliminációjában. A proteázok emellett képesek lehetnek a célfehérjék meghatározott helye(ke)n történő hasítására, úgynevezett limitált proteolízis révén, melynek során a fehérjék egy vagy csupán néhány specifikus helyen hasadnak, melynek a fehérjefunkció szabályozásában lehet fontos szerepe, sokszor a célfehérje aktivációjával jár (pl. véralvadási kaszkád). Az evolúció során a proteázok az eltérő felépítésű élőlényekben tapasztalható körülmények széles skálájához alkalmazkodtak (pl. pH-változások, redukzív környezet, ionerősség), és különböző katalitikus mechanizmusokat (szerin-, cisztein-, treonin vagy aszpartil-, metallo- és glutaminsav-proteázok) alkalmaznak a célmolekula (szubsztrát) hidrolíziséhez. A proteázoknak jelentős szerepe van különböző fertőző megbetegedések kialakulásában. Példaként említhető a különböző vírusok replikációs ciklusainak végbemenetelét elősegítő proteázok ún. maturációt (vírus érés) elősegítő funkciója, ezért fontos ezen enzimek szerkezeti felépítésének és funkcionalitásának részletes megismerése.

1.2. A HIV-1 proteáz

A retrovirális proteázok, az aszpartil-proteázok A2 családjába tartozó proteolitikus enzimek. Az 1-es típusú humán immundeficiencia vírus (HIV-1) proteáza homodimerként funkcionál, az aktív enzimet két, szekvenciájában és szerkezetében is azonos, legtöbb esetben 99 aminosavból álló monomer interakciója hozza létre. A vírus proteáza jelentős szerepet játszik a replikációs ciklusban a virális gag és gag-pol poliproteinek irreverzibilis poszttranszlációs módosítása révén. A gag és gag-pol fehérjék hasítása révén alakulnak ki a vírust felépítő funkcionális egységek, mint például a vírus strukturális felépítését biztosító mátrix (MA), kapszid (CA), nukleokapszid (NC) fehérjék, valamint a virális replikációs ciklust

elősegítő enzimek, a reverz transzkriptáz (RT), integráz (IN) és proteáz (PR) enzimek. Éppen ezért a HIV-1 PR maturációban betöltött szerepe rendkívül fontos a vírus replikációs ciklusában. A peptidkötés hidrolíziséért közvetlenül az aktív hely konszenzus D-T/S-G-A motívumában, a HIV-1 proteáz esetében az egyes monomerekben 25. és 25'. pozícióban található aszpartát aminosavmaradékokból álló katalitikus diád felelős. A katalitikus motívumon kívül más, szerkezetileg fontos régiók is vannak, amelyek részt vesznek a funkcionális homodimer kialakításában, illetve a szubsztrát megkötésében, mint például a lebeny régió, az aktív helyen a „tűzoltó-fogás” kölcsönhatások kialakításáért felelős hurok, az antiparalell β -redőkből felépülő dimerizációs régió, és a konszenzusos α -hélix az enzim C-terminálisának közelében. A HIV-1 PR szubsztrátspecifitásának és aminosav preferenciáinak a meghatározása a mai napig kihívást jelent annak ellenére, hogy jelentős erőfeszítések történtek a hasítási pozíciók *in vitro* laboratóriumi karakterizálása érdekében. A retrovirális proteázok esetében az S1 zsebekre elsősorban hidrofób aminosavak iránti preferencia jellemző, azonban a többi (S2-S4) szubsztrátkötő zseb aminosav preferenciája jelentősebb eltéréseket mutat. A HIV-1 PR szubsztrátjait tekintve a P2 pozíció kritikus jelentőségű, mely pozíciót leginkább az aszparagin jelenléte vagy β -elágazó láncú aminosavmaradékok jellemzik. A szubsztrát megkötésében az aktív hely motívumain kívül más, távolabb eső régiók is részt vesznek (szubsztrátkötő árok), mely meglétét eddig a HIV-1 és az 1-es típusú humán T-limfotróp vírus (HTLV-1) proteázok esetében igazolták. A szubsztrátkötő árok a homodimer enzim felszínén elhelyezkedő kölcsönható felület, mely lehetővé teszi a szubsztrát P12-P5 és P5'-P12' aminosavainak felismerését és megkötését. A szubsztrátkötő árok az enzim szubsztráthoz való affinitásának növelésén keresztül képes hatni az enzim proteolitikus hatékonyságára.

1.3. A nukleokapszid fehérje, mint HIV-1 szubsztrát

A HIV-1 PR poszt-maturációban betöltött egyik fontos szerepe a korábbi feltételezések alapján a kapszid és nukleokapszid fehérjék hasítása. A HIV-1 nukleokapszid (NC) fehérje egy kisméretű bázikus fehérje, amely két cink-ujj motívumot tartalmaz. A NC-nak számos funkciója van a vírusreplikációban, mivel részt vesz a genomiális RNS cDNS-sé való átírásában, dimerizációjában, és csomagolásában, a vírus-összeszerelésben, és nukleinsav-feltekeredést elősegítő, ún. chaperon-aktivitással is rendelkezik. Bizonyított, hogy a proteolízis a proximális cink-ujj motívum 16. pozíciójában lévő fenilalanin (F16) és 17. pozíciójában lévő aszparagin (N17) közt történik meg. A NC cink-ujj motívum hidrolízisének a korábbi

feltételezések alapján szerepe lehet a replikációs ciklus korai szakaszában, ám ezen szerepe a mai napig nincs egyértelműen tisztázva, annak ellenére, hogy a HIV vírusok életciklusában betöltött fontosságára utal a hasítóhely rendkívüli konzerváltsága is, valamint azon kutatások, melyek a proteáz korai fázisban betöltött szerepét vizsgálták. A NC processzálas vizsgálata emellett fontos információkkal szolgálhat a HIV-1 PR specificitására vonatkozóan is.

1.4. A SARS-CoV-2 fő proteáza

A súlyos akut légzőszervi szindróma koronavírus-2 fő proteáza (SARS-CoV-2 Mpro) a cisztein proteázok családjába tartozó proteolitikus enzim, amely két protomert tartalmaz, ami egyenként három doménből áll (I., II. és III. domén). A szubsztrátkötő hely az I. és II. domén közötti árokban található. Ezen árokban pozicionálódik az aktív hely, melynek részét képezi a cisztein proteázokra jellemző hisztidin (H41) molekula által aktivált cisztein (C145), mely jelen esetben a katalitikus diádot képezi, mely erősen konzervált. A SARS-CoV-2 Mpro legjelentősebb funkciója a virális poliproteinek funkcionális egységekké történő processzálása. A proteolitikus enzimek szubsztrát-specificitásának ismerete kulcsfontosságú a természetes szubsztrátok *in vitro* és *in silico* azonosítása és a molekuláris szintű gyógyszertervezés szempontjából egyaránt. A SARS-CoV-2 Mpro a „kis aminosav”-X-(L/F/M)-Q*(G/A/S)-X hasítási motívumot preferálja, ahol az X bármely aminosavat, a * pedig a hasítás helyét jelöli. A hasítóhely szekvenciáját tekintve erős preferenciát mutat a P1 pozícióban a glutaminra (Q), azonban újabb kísérletes adatok alapján a P1 pozícióban a glutaminon kívül hisztidin is előfordulhat. A P2 pozícióra leginkább a leucint találták jellemzőnek, azonban metionint is több esetben írtak le, míg a P1' pozícióra a glicin/alanin/szerin aminosavak jellemzőek. Figyelembe véve, hogy a humán szervezetben jelenlévő fehérjék közt nem ismert a fő proteázzal homológ fehérje struktúra, valamint a replikációs ciklusban betöltött kritikus szerepét, az Mpro a vírusellenes terápiák kiemelt célpontjának tekinthető.

1.5. A proteázok vizsgálatára alkalmas módszerek

A proteolitikus enzimek számos biológiai folyamatban töltenek be kulcsszerepet, fontos gyógyszer célpontok, és széles körű a biotechnológiai és ipari alkalmazásuk is. Ennek okán igen nagy az igény a proteázok vizsgálatára alkalmas hatékony eljárásokra, melyek alkalmazhatóak például az enzimek aktivitásának, specificitásának és gátolhatóságának

vizsgálatára. A proteázok vizsgálatára számos különböző mérési módszer áll rendelkezésre, melyeket csoportosíthatjuk az alkalmazott anyagok környezeti (proteáz-szubsztrát) elhelyezkedése alapján. Ilyen módon az esszéket homogén és heterogén vizsgáló módszerekre bonthatjuk. A homogén rendszerekben mind a szubsztrát mind pedig az enzim az reakcióközeg oldatában, azonos közegben található meg (pl. FRET-alapú technikák), mellyel szemben a heterogén módszereknél a szubsztrát szilárd felszínhez van kötve (pl. felületi plazmon rezonancia), míg az enzim az oldatban van. A rekombináns technológia új lehetőségeket nyitott a proteáz vizsgálatok területén a rekombináns fehérjék szubsztrátként történő felhasználásával, az elmúlt években kutatócsoportunk is részt vett hasonló szubsztrát rendszer kidolgozásában és alkalmazásában.

1.6. A rekombináns szubsztrát-alapú rendszer alkalmazási lehetőségei a proteázok vizsgálatában

A proteolitikus enzimek vizsgálatára több különböző típusú szubsztrát rendszer is elérhető, melyek közül a rekombináns fehérje szubsztrátok felhasználási lehetőségei rendkívül sokrétűek, és sok előnyös tulajdonsággal rendelkeznek. A kutatócsoportunk által kifejlesztett rekombináns szubsztrátok N-terminális hexahisztidin címkével (His₆) fuzionált maltóz-kötő fehérjét (*maltose-binding protein*, MBP) tartalmaznak, ezt követően a dohány karcolatos vírus (*tobacco etch virus*, TEV) proteáz természetes hasítóhelyét, amit a vizsgálni kívánt proteáz természetes vagy módosított hasítóhelyének szekvenciája követ. A szubsztrát C-terminálisán egy fluoreszcens címke fehérje található. A fúziós fehérje minden alkotóeleme fontos funkciót lát el a módszer szempontjából. A His₆ címke lehetővé teszi a fehérje fémion kelát-alapú immobilizálását (*immobilized metal affinity chromatography*, IMAC) és kromatográfiás tisztítását. Az MBP címke fehérje jelenléte növeli a fehérje oldékonyságát, valamint elősegíti a fehérje feltekerődését. A TEV PR hasítóhelye kettős szerepet betölt, i) kontroll hasítóhelyként ellenőrizhető a szubsztrátban lévő hasítóhely hozzáférhetősége és a szubsztrát hasíthatósága, valamint ii) a fehérje (pl. a TEV és a vizsgálni kívánt proteáz általi együttes) hasítását követően a - felszabaduló peptidfragmens molekula-tömegének tömegspektrometriás analízisével - a hasítási pozíció meghatározható.

Ezen szubsztrátok felhasználásának módjai a felépítésüknek köszönhetően rendkívül sokfélék lehetnek; használhatjuk őket szeparáláson alapuló heterogén rendszerben, ahol a proteolízis detektálása történhet fluorimetriával vagy elektroforézissel, de alkalmazhatjuk a

fluoreszcens szubsztrátokat homogén esszében is, oldatban történő hasításhoz, a szubsztrátokat és a termékeket SDS-PAGE segítségével vizsgálhatjuk. Bár ezek a szubsztrátok alkalmazhatók több különböző kísérletes rendszerben is, az eddig tesztelt alkalmazások egyike sem teszi lehetővé a terméképzés valós idejű detektálását.

1.7. A bioréteg interferometria alapjai és felhasználási módjai

A bioréteg interferometria (*bio-layer interferometry*, BLI) egy optikai elven működő analitikai módszer, mely lehetővé teszi a molekuláris interakciók valós idejű nyomon követését az interferencia mérése révén. A módszert főként különböző molekuláris interakciók mennyiségi és minőségi analizisére használják, de léteznek alternatív felhasználási módok is. A mai napig csak kevés tanulmányról számoltak be az enzimaktivitás BLI módszerrel történő vizsgálatáról. A proteázoknak BLI vizsgálatokban való felhasználására csak egyetlen példa ismert, ezen kísérletek célja azonban nem a proteáz vizsgálata volt, a proteolitikus enzimet csak a szenzorfelszínen maradó molekulák enzimatisztikus eltávolítására használták. Tudomásunk szerint a BLI alkalmazását proteáz vizsgálatokban a mai napig nem tették közzé.

2. Célkitűzések

Az általunk korábban kidolgozott rekombináns fluoreszcens fehérje szubsztrát rendszer alkalmazását alapul véve a következő vizsgálatokat tűztük ki célul.

I.) A HIV-1 és SARS-CoV-2 fő proteáz vizsgálata

I/A Célul tűztük ki a HIV-1 PR szubsztrátspecificitásának vizsgálatát a HIV-1 nukleokapszid proximális cink-ujj motívumában lévő hasítóhelyet reprezentáló szubsztrátokkal, a vad típusú és módosított szubsztrátok hasítási reakcióival, valamint a cink-ujj konformációs állapotainak vizsgálatával.

I/B Célunk volt a SARS-CoV-2 fő proteáz ismert és *in silico* módszerekkel jósolt hasítási szekvenciáit tartalmazó szubsztrátok létrehozása és a proteolitikus hasítás vizsgálata a hasítási pozíció azonosításával, valamint az enzimkinetikai paramétereinek meghatározásával.

II.) A rekombináns fehérje szubsztrátok használatán alapuló új, a proteolitikus hasítás valós idejű detektálására alkalmas mérési módszer kidolgozása.

Célul tűztük ki a rekombináns fluoreszcens fehérjék felhasználását egy bioréteg interferometria (BLI)-alapú mérési módszer kidolgozásához, valamint a mérési körülmények optimalizálását követően a módszer alkalmazását a HIV-1 PR szubsztrátspecificitásának és a szubsztrátkötő árok nevű enzimfelszíni kötőhelyének vizsgálatában.

3. Anyagok és módszerek

3.2. A HIV-1 proteáz expressziója és tisztítása

A katalitikusan inaktív, módosított dimerizációs régiót tartalmazó HIV-1 PR (HIV-1 PR_{ΔNΔC}) termeltetése *Escherichia coli* BL21(DE3) sejtekben történt ampicillin tartalmú Luria-Bertani (LB) tápoldatban. A fehérje expresszió indukálása izopropil-β-D-tiogalakto-piranozid (IPTG) hozzáadásával történt, amit 3 óra 37°C-on történő inkubálás követett, majd a sejtek begyűjtését centrifugálással végeztük. A sejtepellet feltárását ultrahangos szonikálással végeztük, lizozim jelenlétében. A reverz fázisú kromatográfiás tisztítás C18-as oszlopon történt (ÄKTA Purifier), 1 ml/perc áramlási sebesség mellett 0-40% növekvő gradiens elúciót alkalmaztunk, víz és 0,05% trifluorecetsavat (TFA), valamint acetonitrilt és 0,05% TFA-t tartalmazó eluensek alkalmazása mellett. A frakciók tisztaságának ellenőrzése 14%-os SDS-PAGE segítségével történt. A megfelelő tisztaságú (>90%) frakciókat két lépésben renaturáltuk, a fehérje koncentrációkat NanoDrop műszerrel és BCA kit segítségével határoztuk meg.

3.3. A rekombináns fehérje szubsztrátok előállítása, expressziója és tisztítása

3.3.1. Klónozási lépések

A cirkuláris pDest-His₆-MBP-mApple (mApple, monomer vörös fluoreszcens fehérje) és pDest-His₆-MBP-mEYFP (mEYFP, monomer sárga fluoreszcens fehérje) expressziós vektorokat PacI és NheI restrikciós endonukleázokkal hasítottuk, míg a pDest-His₆-MBP-(GGGGS)₄-mApple vektor esetében PacI és BamHI enzimeket használtunk. A hasítási termékeket 1%-os agaróz gélen választottuk el, majd a linearizált plazmidokat DNS extrakciós kit segítségével preparáltuk ki a gélből. A proteázok hasítóhelyeit kódoló *forward* és *reverz* komplementer primereket és a tisztított linearizált expressziós plazmidot T4 DNS-ligáz használatával ligáltuk össze, majd az elegyet BL21(DE3) bakteriális expressziós sejtekbe transzformáltuk hősokk alkalmazásával. A transzformáns sejteket LB-agar lemezekre szélesztettük, és legalább 16 órán át 37°C-on inkubáltuk, majd a különálló telepekből plazmidot izoláltunk. A klónozás sikerességét szekvenálással ellenőriztük.

3.3.2. Fehérje expresszió bakteriális rendszerben

A HIV-1 PR vizsgálatához olyan rekombináns fehérje szubsztrátokat hoztunk létre, melyek a HIV-1 NC fehérje proximális cink-ujj motívumában lévő vad típusú vagy módosított hasítóhelyet, vagy a HIV-1 MA/CA hasítóhely 9- vagy 24-tagú, vad típusú vagy módosított hasítóhelyét tartalmazták. A SARS-CoV-2 Mpro vizsgálatához létrehozott szubsztrátok az Mpro természetes autoproteolitikus, vagy az *in silico* módszerekkel becsült, eddig ismeretlen természetes hasítóhelyét tartalmazták.

A HIV-1 PR és SARS-CoV-2 Mpro szubsztrátok termeléséhez a szubsztrátot kódoló plazmiddal transzformált *E. coli* BL21(DE3) sejteket alkalmaztunk. A tenyészetet LB táptalajban növesztettük és IPTG segítségével történt a fehérje expresszió indukálása. A termelés 3 órán át zajlott, amit a sejtek centrifugálással történő begyűjtése követett.

3.3.3. Sejt lízise

A sejtek lízise lizozim, DNáz és proteáz inhibitor (PMSF) jelenlétében történt lízis pufferben (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5), szonikálással. Centrifugálási lépést követően a rekombináns szubsztrátot tartalmazó, sejtörmelékektől mentes felülúszót (sejtlizátum) használtuk a továbbiakban.

3.3.4. Fehérje tisztítás Ni-NTA-alapú mágneses gyöngyök segítségével

A rekombináns szubsztrátok tisztítását Ni-NTA mágneses agaróz gyöngyök segítségével végeztük. A szubsztrátokat a sejtlizátumokból tisztítottuk, az aspecifikusan vagy gyengén kötődő fehérjék jelentős részét ismétlődő mosási lépésekben távolítottuk el a mágneses gyöngyökről. A gyöngyökhöz kötődő fehérjék eluálását EDTA-t tartalmazó oldattal végeztük, amit puffercsere követett. A fehérje koncentráció meghatározását NanoDrop készülék segítségével végeztük, az adott fehérjékre jellemző molekulatömeg és extinkciós koefficiens adatok alapján. A minták tisztaságát SDS-PAGE segítségével ellenőriztük.

3.4. A rekombináns HIV-1 nukleokapszid szubsztrátok oldatban történő hasítása

A reakciókban használt, katalitikusan aktív (stabilizáló mutációkkal ellátott) HIV-1 PR (HIV-1 PR_{vad}) rendelkezásünkre állt a kutatócsoport korábbi munkáiból, az aktív enzim

koncentrációját a HIV-1 MA/CA hasítóhelyét (VSQNY*PIVQ) reprezentáló 9-tagú oligopeptid segítségével határoztuk meg. Az oldatban történő hasításokhoz a HIV-1 NC hasítóhely szekvenciákat tartalmazó His₆-MBP-(GGGGS)₄-mApple szubsztátokat használtuk. A hasítási reakciókat 20 µl végtérfogatban végeztük HIV-1 reakciópufferben (az enzimet 250 nM, a szubsztrátot 1,4 mM végkoncentrációban alkalmaztuk, a puffer ZnCl₂-ot vagy ditiotreitolt (DTT) és EDTA-t tartalmazott. A hasítási közegeket 16 órán át inkubáltuk 37°C-on, majd natív körülmények közt történt a mintaelőkészítés. A mintákat poliakrilamid gélen analizáltuk, 14%-os gélen. A fehérjék gélben történő renaturálása során a denaturáló elektroforézist követően a gél desztillált vízbe helyeztük 30 percre és ezt követően újból megismételtük a mosást. A részlegesen renaturálódott fehérjéket UV fény alatt, illetve kék átvilágító tálcán való átvilágítással detektáltuk.

3.5. A rekombináns SARS-CoV-2 Mpro szubsztrátok hasítása

A hasítási reakciókban a SARS-CoV-2 Mpro szubsztrátjaként a SARS-CoV-2 nsp4 autoproteolitikus hasítóhelyét reprezentáló His₆-MBP-TSAVLQ*SGFRKM-mEYFP, valamint a humán C-terminális kötő fehérje 1 (CTBP1) fehérjében lévő hasítási szekvenciát tartalmazó His₆-MBP-REGTRVQ*SVEQIRE-mEYFP szubsztrátot használtuk. A hasítási reakcióban az a szubsztrát és az enzim végkoncentrációja 1,5 és 2 µM volt. Szelektív, szoros kötődésű inhibitorok hiányában az aktív hely koncentrációjának meghatározása nem volt lehetséges, ezért a SARS-CoV-2 Mpro aktivitását 100%-osnak tekintettük. Reakciópufferként 20 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7,8 oldatot használtunk, a hasítási reakciókat 40 µl végtérfogatban végeztük. A reakcióközegeket 37°C-on 1 órán át inkubáltuk, majd a reakcióközegeket 20-20 µl-ként kettéosztottuk. A minták egy részét denaturáló körülmények közt kezeltük, ahol a reakciókat SDS-t és 2-merkaptóetanolt tartalmazó pufferrel állítottuk le, majd a mintákat 95°C-on elfőztük. A minták analízise 14%-os SDS-PAGE segítségével történt. A minták másik molekulatömeg meghatározás céljából használtuk fel mátrix-asszisztált lézer deszorpciós ionizációs repülési idő mérésén alapuló tömegspektrometria (MALDI-TOF-MS) mérések során.

3.6. Kinetikai mérések rekombináns SARS-CoV-2 Mpro szubsztrátokkal

A kinetikai paraméterek meghatározása érdekében végzett, mágneses gyöngy-alapú vizsgálatokat His₆-MBP-TSAVLQ*SGFRKM-mEYFP és His₆-MBP-REGTRVQ*SVEQIRE-

mEYFP szubsztrátokkal végeztük 0,074 μM , illetve 0,74 μM végkoncentrációban alkalmazott SARS-CoV-2 Mpro jelenlétében. A termékképződés detektálására a fluorimetriás méréseket Biotek Synergy H1 készülékkel végeztük, 510 nm-es gerjesztési és 540 nm-es emissziós hullámhosszokon.

3.7. Bio-réteg interferometria-alapú vizsgálatok

3.7.1. Ni^{2+} -, Cu^{2+} -, Zn^{2+} - és Co^{2+} -NTA bioszenzorok előkészítése és vizsgálata

Az ekvilibrált Ni-NTA bioszenzorokat magas koncentrációjú EDTA oldattal kezeltünk, majd a nikkell ionok eltávolítása után egy kétértékű kationt tartalmazó oldatba helyeztük (10 mM NiSO_4 / 10 mM ZnCl_2 / 10 mM CoCl_2 / 10 mM CuCl_2) a szenzorokat.

Az asszociációs fázis esszé pufferben történt (A puffer (50 mM nátrium, pH 5) és B puffer (0,275 M Na_2HPO_4 , 0,2 M NaH_2PO_4 , 4 M NaCl , pH 5,6) 1:1 arányú elegye), ez a fázis 120 másodpercig tartott, a felkötés a His₆-MBP-VSQNY*PIVQ-mEYFP szubsztrát 4 μl -es térfogatú oldatából történt (0,7 μM). A disszociációs szakaszt esszé pufferben vizsgáltuk 120 másodpercen keresztül 250 μl -es térfogatban. A bioszenzorok regenerálásához a gyártó utasításainak megfelelően, foszforsav oldatot (pH 2,5) használtunk. Az adatokat a BLItz Pro 1.2 szoftverrel értékeltük ki, és az adatok matematikai illesztésénél, 1:1 kötési modellt (Langmuir) használtunk, helyi illesztést alkalmazva.

3.7.2. Mérések tisztított szubsztrátokkal

A méréseket 30 másodpercig tartó, esszé pufferben történő alapvonal-felvétellel kezdtük 250 μl térfogatban, ezt követően 60 másodpercen keresztül 14 μM -os tisztított szubsztrát oldatból történt a szubsztrátok immobilizálása a bioszenzorhoz, 4 μl térfogatban (*drop* mód). Az immobilizálás után a bioszenzorok mosási lépései következtek, az esszé pufferrel történő mosás során eltávolítottuk a többlet szubsztrátot, valamint a nem specifikusan és gyengén kötődő molekulákat. Az első mosási lépés 60 másodpercig tartott (250 μl térfogatban, *tube* mód), míg a második mosási lépés 30 másodpercen keresztül, 4 μl térfogatban (*drop* mód). A második mosási lépés alkalmazását az alapvonal eltolódásból származó aspecifikus jel minimalizálására iktattuk be. A mérésekhez használt HIV-1 PR-t a proteolízis megkezdése előtt 1:1 arányba hígítottuk az esszé puffer B komponensével, majd a további hígításokat esszé pufferrel végeztük. Minden egyes enzimatikus mérést 4 μl térfogatból végeztünk, *drop* módban.

A gátlásvizsgálatokhoz az atazanavirt dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldottuk be, ezért az esszé puffert 5% DMSO-val egészítettük ki. A mérésünk során alkalmazott HIV-1 PR_{vad} végkoncentrációja 9 nM volt, míg az atazanavirt 2 nM és 2 µM végkoncentrációban használtuk. Kontrol kísérleteinkhez 5% DMSO-t tartalmazó esszé pufferben hígított HIV-1 PR_{vad} enzimet használtunk. Az enzimet nem tartalmazó kontroll minták csak 5%-os DMSO-val kiegészített esszé puffert tartalmaztak. A tripszinnel végzett mérésekhez szükséges humán kationos tripszint használtunk, melyet Dr. Szabó András bocsájtott rendelkezésünkre. Minden mérést BLItz készüléken végeztünk (Pall Forté Bio, Fremont, CA, USA) szobahőmérsékleten (25°C-on). Az elsődleges kísérleti adatokat a BLItzPro 1.2. szoftverből exportálva tovább analizáltuk Microsoft Excel felhasználásával.

3.7.3. Mérések sejtlyizátumból

A His₆-MBP-VSQNY*PIVQ-mEYFP rekombináns fehérjét expresszáló és az „üres” (nem-transzformált) BL21(DE3) sejteket a korábbiakban említettek alapján tártuk fel, majd a centrifugálási lépésből visszamaradó felülúszót használtuk a mérések kivitelezéséhez és az SDS-PAGE analízisekhez.

A BLI mérések során az alapvonalat lízis pufferben (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5) vettük fel, 20 másodpercen keresztül. Ezt követően történt meg a sejtlyizátumból a szubsztrát kikötés 30 másodpercen keresztül. A bioszenzort 3 egymást követő mosási lépéssel tisztítottuk, rendre lízis pufferrel 30 másodpercen keresztül, esszé pufferrel 30 másodpercen keresztül (250 µl térfogattal, *tube* módban), valamint újból esszé pufferrel 30 másodpercen keresztül (4 µl térfogattal, *drop* módban). A proteolízis szakaszban alkalmazott körülmények megegyeztek a tisztított szubsztráttal végzett mérések körülményeivel.

4. Eredmények

4.1. A HIV-1 proteáz specificitásának vizsgálata nukleokapszid hasítóhelyet reprezentáló szubsztrátokkal

4.1.1. Relatív hasítási hatékonyság megállapítása

Munkánk során a HIV-1 NC proximális cink-ujj motívumot reprezentáló szekvencia processzálását vizsgáltuk rekombináns fehérje szubsztrátok alkalmazásával, melynek során arra kerestük a választ, hogy az általunk kidolgozott fehérje szubsztrát-alapú rendszer alkalmazható-e a fehérje szerkezeti motívumok (jelen esetben cink-ujj) konformációs tulajdonságainak vizsgálatára, továbbá, hogy a rekombináns fehérjék alkalmazásával meghatározhatóak-e a hasítási preferenciák. A vizsgálatokhoz olyan, His₆-MBP-(GGGS)₄-mApple szubsztrátokat hoztunk létre, amelyek HIV-1 NC-nak csak a proximális cink-ujj szekvenciáját tartalmazták. Az általunk vizsgált felismerési szekvenciák a teljes hosszúságú proximális cink-ujj motívumot reprezentálták (¹¹KIVKCCFNCGKEGHTARNCRAPR³²), ami lehetőséget adott a proteolitikus hasítás vizsgálata mellett a szerkezeti motívum konformációs állapotainak tanulmányozására is. A vad típusú szekvencia mellett az N17T, N17L, N17F, I14_inz-N17G és K14I-N17G mutánsokat is vizsgáltuk.

Annak vizsgálatára, hogy a cink jelenléte milyen hatással van a rekombináns fluoreszcens fehérjék hasíthatóságára, a hasítási reakciókat DTT és EDTA jelenlétében, valamint ZnCl₂-tartalmú pufferben is elvégeztük. Az EDTA-t kelátorként használtuk, hogy a cink-ujjak fémiontól mentes állapotában biztosítsuk a „nyitott” konformációjú állapot kialakulását, míg a DTT-t a cisztein oldalláncok redukciója és az intra- és intermonomer diszulfidkötések kialakulásának megakadályozása érdekében adtuk a rendszerhez. Ezzel szemben a cinket tartalmazó pufferrel biztosítottuk a cink-ujj motívumok kialakulásának lehetőségét, mely „zárt” konformáció várhatóan gátolja az enzimnek a hasítóhelyhez való hozzáférését és így a szubsztrát hasítását.

A szubsztrátok HIV-1 PR_{vad} általi proteolízise csak a DTT-t és EDTA-t tartalmazó pufferben volt megfigyelhető. Ez arra utalt, hogy a hasítóhelyek hozzáférhetőek a „nyitott” konformációkú cink-ujjakban, és a cink-ionok EDTA-val történő kelációja és a cisztein oldalláncok DTT-vel történő redukciója biztosítja a cink-ujjak „nyitott” konformációját. Ezzel ellentétben a szubsztrátok cink jelenlétében ellenálltak a proteolízisnek, ami arra utalt, hogy a cink jelenléte biztosította a „zárt” konformációjú szerkezeti motívum kialakulását, ez a proximális NC hasítóhelyet a proteáz számára elérhetlenné tette, megakadályozva a

proteolízist. $ZnCl_2$ jelenlétében a HIV-1 PR_{vad} egyik szubsztrátot sem processzálta, de mind a hasítási reakciókban, mind a szubsztrát kontroll mintákban olyan sávok jelentek meg a géleképeken, amelyek a DTT-t és EDTA-t tartalmazó mintákban nem voltak megfigyelhetők. Feltételeztük, hogy ezek a sávok a natív (nem denaturáló) körülmények között, intermolekuláris kölcsönhatások révén kialakuló oligomereknek felelnek meg, míg a DTT és EDTA tartalmú pufferben az ilyen, intermolekuláris diszulfid hidak kialakulása gátolt lehet.

Az elektroforézist követően a sávok intenzitását denzitometriával határoztuk meg a DTT és EDTA jelenlétében végzett reakciók esetében. Eredményeink alapján a vizsgált mutációk egyike sem akadályozta meg a cink-ujj szerkezeti motívum kialakulását és a proteolitikus hasítást.

A legmagasabb szubsztrátkonverziót az N17F mutáns esetében kaptuk, a vad típusú szekvenciához képest ez a mutáns a HIV-1 PR_{vad} számára jelentős mértékben jobb szubsztrájának bizonyult, ami összhangban volt az oligopeptid szubsztrátokon korábban végzett mérések eredményével. Az N17F mutáns kivételével a többi mutáns esetében kapott szubsztrátkonverziók hasonlóak voltak, ami valószínűleg a gél-alapú analízis viszonylag alacsonyabb érzékenységének köszönhető. A kinetikai paraméterek meghatározása a fluoreszcens fehérje-alapú vizsgálattal nem volt lehetséges, mivel a hasítási reakció számára optimális körülmények nem kompatibilisek a Ni-NTA-alapú mérési módszerrel, mivel a DTT és az EDTA a szubsztrát immobilizációjára negatív hatással van, a szubsztrát disszociációját okozzák. Ezen szerek alkalmazása viszont a „zárt” konformációjú motívum kialakulásának kedvez, ami a proteolízist megakadályozza.

Eredményeink alapján az alkalmazott fehérje szubsztrát-alapú rendszer alkalmasnak bizonyult a konformációs állapotok, valamint a hasítási preferenciák vizsgálatára, utóbbi esetben azonban csak korlátozott mértékben tudtuk vizsgálni a módosított szubsztrátok közötti különbségeket.

4.2. A SARS-CoV-2 fő proteáz vizsgálata

4.2.1. Rekombináns szubsztrátok előállítása és hasítása

Kísérletünkben a SARS-CoV-2 természetes hasítóhelyét (nsp4), valamint a humán C-terminális kötő fehérje 1 (CTBP1)-ben található hasítóhely feltételezett proteolitikus hasítását tanulmányoztuk. Olyan His₆-MBP-mEYFP rekombináns fúziós fehérjéket állítottunk elő, amelyeket a SARS-CoV-2 M_{pro} szubsztrátjaként használtunk. A His₆-MBP-TSAVLQ*SGFRKM-mEYFP szubsztrát a SARS-CoV-2 poliprotein természetes nsp4

hasítóhelyét tartalmazta, míg a His₆-MBP-REGTRVQ*SVEQIRE-mEYFP fehérje *in silico* jóslás alapján azonosított CTBP1 fehérje hasítási szekvenciáját tartalmazta (¹⁵³GTRVQ*SVEQI¹⁶²), mely szekvencia teljes mértékben azonos a humán CTBP1 és CTBP2 izoformákban.

Az elektroforézis-alapú vizsgálatok eredménye alapján a His₆-MBP-TSAVLQ*SGFRKM-mEYFP szubsztrátot a SARS-CoV-2 Mpro jelentős mértékben elhasította, míg a His₆-MBP-REGTRVQ*SVEQIRE-mEYFP fehérje csupán kismértékű hasítási hatékonyságot tapasztaltunk, ami a CTBP1 hasítóhely iránti alacsonyabb preferenciára utalt.

4.2.2. A SARS-CoV-2 fő proteáz természetes hasítóhelyeinek azonosítása

Elvégeztük a tisztított teljes hosszúságú rekombináns CTBP1 fehérje, valamint a His₆-MBP-TSAVLQ*SGFRKM-mEYFP és His₆-MBP-REGTRVQ*SVEQIRE-mEYFP fehérje szubsztrátok oldatban hasítását SARS-CoV-2 Mpro enzimmel. A hasítási közegekből meghatároztuk a hasítatlan fehérjék és a hasítási termékek molekulatömegeit, a hasítási pozíciókra a kísérletesen meghatározott és a szekvenciák alapján számított molekulatömegek alapján következtettünk. A molekulatömeg meghatározást célzó műszeres analitikai méréseket Dr. Nagy Tibor (Debreceni Egyetem, TTK, Alkalmazott Kémiai Tanszék) végezte.

A várakozásoknak megfelelően az nsp4 hasítási hely szekvenciáját (TSAVLQ*SGFRKM) reprezentáló rekombináns His₆-MBP-mEYFP szubsztrát a beépített szekvencián belül a kívánt pozícióban hasadt. A rekombináns CTBP1 fehérje hasítását követően a hasítási fragmentumok elemzése arra utalt, hogy a teljes hosszúságú fehérje az *in silico* jóslt pozícióban (¹⁵³GTRVQ*SVEQI¹⁶²) hasad, és az enzim az ugyanezt a hasítóhelyet tartalmazó rekombináns His₆-MBP-mEYFP szubsztrátot is ebben a pozícióban hasította. Eredményeink megerősítették a számítógépes eljárásokkal jóslt hasítóhelyek jelenlétét, így vizsgálatainkban elsőként azonosítottuk a SARS-CoV-2 Mpro egy eddig ismeretlen természetes gazdasejt szubsztrátjában lévő hasítóhelyet. A fluoreszcens szubsztrátokat a továbbiakban felhasználtuk az enzimkinetikai paraméterek meghatározására, a szubsztrát-preferencia vizsgálata érdekében.

4.2.3. Enzimkinetikai mérések

Miután bizonyítottuk, hogy a SARS-CoV-2 Mpro a rekombináns szubsztrátokat a kívánt pozícióban hasítja, Ni-NTA mágneses gyöngy-alapú enzimkinetikai méréseket végeztünk a His₆-MBP-TSAVLQ*SGFRK-mEYFP és His₆-MBP-REGTRVQ*SVEQIRE-mEYFP szubsztrátokkal a hasítóhely iránti preferencia összehasonlítása érdekében. A kinetikai analízissel kimutattuk, hogy a poliprotein természetes hasítóhelyét tartalmazó His₆-MBP-TSAVLQ*SGFRKM-mEYFP szubsztrát jobb szubsztrátja a SARS-CoV-2 Mpro-nak, mint a CTBP1 hasítóhelyet tartalmazó szubsztrát. Ez összhangban van a gél-alapú vizsgálat eredményeivel, amely a His₆-MBP-TSAVLQ*SGFRKM-mEYFP szubsztrát nagyobb hasítási hatékonyságát mutatta a szubsztráthoz képest. Eredményeink igazolták, hogy a tervezett szubsztrátokat fel lehet használni proteolitikus vizsgálatokhoz, és azt mutatják, hogy a szubsztrátot a beépített CTBP1 csak alacsonyabb hatékonysággal hasítja a poliproteinben lévő szekvenciához képest.

4.3. Bioréteg interferometria-alapú mérési eljárás kidolgozása és alkalmazása

4.3.1. Mutáns HIV-1 PR tisztítása

A bioréteg interferometria-alapú mérési eljárás kidolgozásához a HIV-1 proteázt használtunk modell enzimként. A katalitikusan aktív enzim mellett (HIV-1 PR_{vad}) kísérleteinkben kontrollként használtunk a HIV-1 PR 1-4-es és a 96-99-es pozíciókban deléciót tartalmazó formáját, nem képes funkcionális dimer kialakítására, katalitikus aktivitással nem rendelkezik (HIV-1 PR_{ΔNΔC}). A kísérletek elvégzéséhez a HIV-1 PR_{vad} rendelkezésünkre állt, a HIV-1 PR_{ΔNΔC} tisztítását reverz fázisú kromatográfiával végeztük el.

4.3.2. Rekombináns fehérje szubsztrátok előállítása és hasítása

A HIV-1 PR vizsgálatához olyan His₆-MBP-mEYFP és His₆-MBP-mApple rekombináns fehérje szubsztrátokat terveztünk, melyekben a beépített szekvenciák a HIV-1 MA/CA hasítóhely 9- (P5-P4') vagy 24-tagú (P12-P12') szekvenciáját reprezentálták. Mind a 9-tagú, mind pedig a 24-tagú szubsztrátból vad típusú (vad-9 és vad-24) és mutáns (mut-9 és mut-24) szubsztrátokat egyaránt létrehoztunk. A rövidebb HIV-1 MA/CA hasítóhelyet tartalmazó szekvenciák közül a mutáns szekvencia P2 pozícióban leucint tartalmazott (VSQLY*PIVQ). A 24-tagú mutáns MA/CA hasítóhelyet tartalmazó szekvencia P12-P6, illetve P5'-P12' pozíciókban a HIV-1 proteáz CA/p2 hasítóhely szekvenciáját tartalmazta.

Utóbbi szubsztrátok alkalmazásával lehetőségünk nyílt megvizsgálni az irodalmi adatokból ismeretes enzimfelszíni ún. szubsztrátkötő árkot.

Annak tesztelésére, hogy a tisztított fehérjéket lehet-e a HIV-1 proteáz szubsztrátjaként használni, oldatban történő emésztési reakciókat végeztünk. A minták elektroforézisét követően proteolitikus fragment megjelenése arra utalt, hogy a rekombináns fehérjéket a HIV-1 PR_{vad} enzim elhasítja a beépített hasítóhelyen, így alkalmazhatóak a további kísérletes munkák elvégzésére. A HIV-1 PR_{ΔNΔC} enzimmel végzett reakciókban nem tapasztaltunk hasítást. A további kísérletes munkáink során ezen fehérjéket használtuk szubsztrátként a hasítási reakciókban egy új, a proteolitikus aktivitás folyamatos mérésén alapuló mérési módszer kidolgozása során.

4.3.3. A bioréteg interferometria-alapú mérés beállítása

4.3.3.1. Hasítás katalitikusan aktív és inaktív HIV-1 proteázzal

A bioréteg interferometria-alapú proteáz aktivitásmérési módszer kidolgozásának alapját az a feltételezés képezte, miszerint a bioszenzor felszínéhez immobilizált és a HIV-1 PR hasítóhelyét tartalmazó szubsztrátok érzékenyek a proteolízisre, és a hasítás következtében a fragmentek felszabadulása csökkenti a felületen lévő szubsztrátok méretét, ezáltal a biomolekuláris réteg vastagságát, és a bekövetkező változás egy mérhető jelként detektálható. A módszer tesztelésére és fejlesztésére a His₆-MBP-VSQNY*PIVQ-mEYFP szubsztrátot, modell enzimeként pedig HIV-1 proteázt használtuk. A vizsgálatokhoz a katalitikusan aktív és inaktív enzimeket használtuk, melyekkel jól elkülöníthetőek a proteolízis következtében végbemenő változások. Vizsgálataink során Ni-NTA-alapú bioszenzorokat alkalmaztunk.

Az általunk fejlesztett BLI-alapú proteáz esszé 3 fő lépésből áll. Az első lépés a szubsztrát kikötése a Ni-NTA-alapú szenzorhoz, mely a szubsztráton lévő His₆ affinitás címke révén valósulhat meg. Második lépésben a bioszenzoron lévő gyengén, illetve aspecifikusan kötődött fehérjék lemosása történik. Harmadik lépésben történik meg a szubsztrát enzimátikus hidrolízise, mely a szenzor HIV-1 PR oldatba történő merítésével kezdődött. A bioszenzorra felkötött szubsztrátok HIV-1 PR_{vad} általi érzékenységének köszönhetően a beépített hasítóhelyen processzálódtak, ebből adódoan a bioréteg vastagsága a szenzoron lecsökkent, ami az idő függvényében detektálható. Amint megtörtént az immobilizált His₆-MBP-VSQNY*PIVQ-mEYFP szubsztrát (72,24 kDa) HIV-1 PR_{vad} általi hasítása, az N-terminális fragmens rajta maradt a szenzoron (His₆-MBP-VSQNY, 44,45 kDa), míg a fluoreszcens

fehérjét tartalmazó C-terminális termék (PIVQ-mEYFP, 27,64 kDa) a HIV-1 PR_{vad} enzimet is tartalmazó oldatba került, aminek következtében jelentős jel-változás volt tapasztalható, a bioréteg vastagságának csökkenése következtében.

Annak érdekében, hogy kizárjuk az esetleges fals pozitív eredményt, miszerint a jel erősség csökkenésének az oka nem a proteolízis, hanem a His₆ címkét tartalmazó szubsztrátok disszociációja, a kontrol kísérletben katalitikusan inaktív HIV-1 PR-t használtunk. A HIV-1 PR_{ΔNΔC} enzimmel végzett mérésekben elhanyagolható mértékű jelerősség csökkenést tapasztaltunk, annak ellenére, hogy az enzimet azonos koncentrációban alkalmaztuk, mint a korábbi mérésben a katalitikusan aktív enzimet. Mindezekből arra következtettünk, hogy a vad típusú HIV-1 PR használatakor a rekombináns szubsztrátba épített MA/CA hasítóhelyen történő processzálas miatt történt jelerősség csökkenés, nem pedig a spontán disszociáció miatt. Méréseink igazolták, hogy a módszer alkalmazható lehet proteolitikus aktivitás vizsgálatára, ezért további vizsgálataink a mérési körülmények optimalizálására és a mérési lehetőségek vizsgálatára irányultak.

4.3.3.2. Hasítási reakció tripszinnel

Kísérletünkben megvizsgáltuk, hogy a mérés alkalmazható lehet-e más proteolitikus enzim(ek) vizsgálatára is, és hogy növelhető-e a rendszer érzékenysége abban az esetben, ha olyan enzimet alkalmazunk, ami nagyobb jelintenzitás csökkenést generál. A vizsgálatunkban tisztított humán kationos tripszint alkalmaztunk. A HIV-1 PR_{vad} az általunk használt rekombináns szubsztrátokat csak a beépített hasítóhelyen belül egyetlen pozícióban hasítja, melynek következtében az immobilizált szubsztrát molekulatömege ~26 kDa-nal csökken. Ezzel szemben a tripszin a His₆-MBP-VSQNY*PIVQ-mEYFP szubsztrátot több helyen is képes hasítani, ami nagyobb méretbeli változást okoz. Ennek megfelelően a tripszin esetében a jel nagyobb mértékű változását tapasztaltuk a HIV-1 PR-hoz képest, amihez hozzájárulhatott az is, hogy a mérések során alkalmazott körülmények (pl. hőmérséklet) optimálisabbak voltak a tripszin számára.

Eredményeink arra utalnak, hogy a HIV-1 proteázon kívül más proteolitikus enzimek aktivitása is vizsgálható az általunk kidolgozott módszerrel, és hogy a jelintenzitás csökkenése fokozható olyan enzim vagy szubsztrát használatával, mely a hasítás következtében a molekulatömeg nagyobb mértékű csökkenését okozza. Fontos megjegyezni, hogy a mérés körülményeit minden egyes enzim esetében külön szükséges optimalizálni, pl. szenzor típusa,

szubsztrát típusa (pl. specifikus vagy általános proteáz szubsztrát), reakciókörülmények (pl. pufferkomponensek, pH, hőmérséklet).

4.3.4. Különböző fémionok hatása a szubsztrát immobilizációra

A His-címkével ellátott fehérjék immobilizálásához különböző kétértékű kation-alapú affinitás kromatográfiai eljárások alkalmazhatók, azonban a szakirodalomban kevésbé taglaltak az egyes kationok és a His-címke közötti kölcsönhatások. A bioszenzorokról történő spontán szubsztrát disszociáció csökkenthető lehet a megfelelő kation használatával, a kisebb disszociációs állandó miatt növelhető az immobilizáció hatékonysága. Mindezek mellett a kísérlet szempontjából esszenciális, hogy olyan rendszeren tudjunk dolgozni, amely az egymást követő regenerálási lépéseket jól bírja, tehát több egymást követő enzimreakció és regenerálási lépés után is nagy mértékben hasonló szenzogramokat kapjunk (reprodukálhatóság). Az esszé szempontjából ez a költséghatékonyság, illetve az egyszerűség miatt is rendkívül fontos.

Az optimalizálási kísérletek során individuális bioszenzorok felszínét Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} vagy Cu^{2+} kétértékű kationokkal töltöttük fel, amihez ezt követően His₆-MBP-VSQNY*PIVQ-mEYFP szubsztrátot kötöttünk ki az asszociációs lépés folyamán, és ezután megvizsgáltuk a disszociációt. Savas regenerálási lépést követően a szenzorokat újból felhasználtuk egy párhuzamos méréshez.

Az elvégzett kísérletek eredményeként elmondható, hogy a His-címkével ellátott szubsztráttal legstabilabb kölcsönhatást a nikkell ionokkal töltött szenzor alakította ki, ahol sem a kötő kapacitásban, sem a disszociációs és asszociációs állandókban nem tapasztaltunk jelentős változást a többi ionhoz képest.

4.3.5. Az enzimkoncentráció hatása az immobilizált szubsztrát processzálására

A módszer validálása szempontjából rendkívül fontos az általános enzimológiai törvényszerűségek szem előtt tartása. Kísérletünk során megvizsgáltuk, hogy hogyan változik a reakciósebesség az enzimkoncentráció növelésének hatására, detektálhatóak-e különbségek, illetve arányosan változik-e a jel intenzitása az enzim mennyiségével. A mérések során a Ni-NTA bioszenzorokat azonos mennyiségű His₆-MBP-VSQNY*PIVQ-mEYFP szubsztráttal töltöttük fel és megvizsgáltuk a szubsztrátok processzálását, a HIV-1 PR_{vad} különböző koncentrációban történő alkalmazása mellett. Az elsődleges kísérleti eredményekből

(szenzogram) az adatok feldolgozása során meghatároztuk az egyes proteolízis szakaszokat jellemző bioréteg vastagság csökkenését az idő függvényében ($\Delta n m / \Delta t$) és ezen eredmények meredekség értékeiből korrelációs analízist végeztünk az enzim koncentráció függvényében. Eredményünk alapján a rendszer alkalmasnak bizonyult az enzim eltérő koncentrációban való alkalmazásakor várt különbségek kimutatására. A jelnek az enzimkoncentrációval arányos változása is alátámasztotta, hogy a detektált változások az enzim proteolitikus aktivitásának következtében jönnek létre, nem pedig a szubsztrát spontán disszociációja vagy más aspecifikus hatás következtében. További méréseink során az enzimaktivitás gátlásán alapuló kísérletet, illetve szubsztrát specificitás vizsgálatokat hajtottunk végre.

4.3.6. Gátlószer hatása az enzimaktivitásra

Annak további megerősítésére, hogy az optikai jel megváltozását a proteolízis okozza, és nem pedig a szubsztrátnak a bioszenzor felületétől való spontán disszociációja, vagy az immobilizált szubsztrátok és az enzim közötti nem specifikus kölcsönhatások, hasítási reakciókat végeztünk el a HIV-1 PR-t gátolni képes atazanavir inhibitor jelenlétében.

A hasítási reakciókhoz a His₆-MBP-VSQNY*PIVQ-mEYFP szubsztrátot és a HIV-1 PR_{vad} enzimet alkalmaztuk. A legintenzívebb jelváltozást a kontroll - gátlószer nem tartalmazó - reakciónál figyeltük meg. A kontrollhoz képest a jel meredeksége alacsonyabb volt ha az atazanavirt 2 nM végkoncentrációban alkalmaztuk, ami csak részleges gátlást jelent. Ezzel szemben a mért jel változása 2 μ M inhibitor jelenlétében elhanyagolható volt, ami az enzim csaknem teljes gátlására utalt az alkalmazott inhibitor koncentrációnál.

Eredményeink megerősítették, hogy az észlelt jel változását a szubsztrát HIV-1 PR általi proteolízise okozta, mely gátolható specifikus inhibitorral.

4.3.7. Mérések teljes sejtlizátumból

A BLI technológiának köszönhetően a célmolekulák szenzorhoz történő kikötéséhez nem feltétlen szükséges tisztított fehérjét alkalmazni. Komplex biológiai mintából (pl. bakteriális sejtlizátumból) direkt módon immobilizálhatóak a hisztidin címkét (pl. His₆ vagy His₈) tartalmazó rekombináns fehérjék. Az ily módon, tisztítatlan fehérjékkel történő mérés tovább csökkentheti a BLI proteáz esszé anyag- és időigényét, mely kritikus jelentőségű lehet egy nagy áteresztőképességű módszer alkalmazása során.

Vizsgálatainkat a His₆-MBP-VSQNY*PIVQ-mEYFP rekombináns fluoreszcens fehérje szubsztrátok sejtízátumból történő kikötésével kezdtük. Kontrol kísérletünkben a szubsztrátot nem expresszáló, transzformálatlan BL21(DE3) sejtízátumot alkalmaztunk, a háttérkötődés mértékének meghatározásához. A sejtízátumokat SDS-PAGE segítségével vizsgáltuk meg, a Coomassie festéssel festett gélben is kimutatható volt a fluoreszcens szubsztrát, azonban a teljes sejtízátum mintában számos bakteriális fehérje is detektálható volt, ezért a fehérjéket UV fényben is vizsgáltuk. A fehérjék gélben történő renatulása után kizárólag a fluoreszcens fehérje volt detektálható a szubsztrátot expresszáló sejtek lizátumában, míg a kontroll mintában nem tapasztaltuk sáv megjelenését azonos molekulaméretnél sem. Ezzel igazoltuk a szubsztrát jelenlétét vagy hiányát a vizsgálatokhoz használt mintákban.

A teljes sejtízátumokkal történő mérés kísérletes körülményei megegyeztek a tisztított szubsztráttal való mérési protokollal azzal a kivétellel, hogy egy extra mosási lépést iktattunk be annak érdekében, az aspecifikusan kikötődő szennyező fehérjék többségét eltávolítsuk. A Ni-NTA bioszenzorokat a különböző sejtízátumokba merítve eltérő jelintenzitásokat kaptunk, a szubsztrátokat nem tartalmazó lizátumban összességében jóval kisebb kötési szignált kaptunk, mint a fehérje szubsztrátot expresszáló bakteriális sejtek lizátumában. A mérés proteolízis szakaszában a katalitikusan aktív HIV-1 PR_{vad} a kötési jelet a szubsztrátot tartalmazó mintánál csökkentette, míg a szubsztrátot nem tartalmazó mintánál változatlan maradt (**32. ábra**). Az SDS-PAGE eredményeinkből és a BLI-vel kapott szenzogramból egyértelműen kiderült, hogy a rendszer alkalmas lehet a His₆-címkét tartalmazó fehérje sejtízátumból történő kikötésére, illetve ily módon a HIV-1 PR proteolitikus aktivitásának vizsgálatára, de részletes vizsgálatokat nem végeztünk a szubsztrát előzetes tisztítása nélkül. Fontos megjegyezni, hogy a szubsztrátok elsődleges tisztítása előnyös lehet, mivel a szennyeződés kiküszöbölése növelheti a szenzorfeltöltés hatékonyságát és segíthet elkerülni a nem specifikusan kötött fehérjék interferenciáját.

4.4. A bioréteg interferometria-alapú mérés alkalmazása

4.4.1. A HIV-1 proteáz S2 szubsztrátkötő zsebének vizsgálata

A szubsztrát immobilizálás és a BLI-alapú mérés körülményeinek beállítását követően a kidolgozott módszert a HIV-1 PR szubsztrátspecifitásának vizsgálatára kívántuk felhasználni. A kísérleteket His₆-MBP-VSQNY*PIVQ-mEYFP szubsztrát alkalmazásával végeztük, valamint ennek a szubsztrátnak egy módosított változatát is elkészítettük, a

hasítóhely P2 pozíciójában az aszparagint leucinra módosítottuk (VSQLY*PIVQ). A HIV-1 PR_{vad} hasítási hatékonyságának összehasonlító analízisét vad és mutáns mEYFP-s szubsztrátok kezdeti $\Delta n/\Delta t$ értékének meghatározásával végeztük. A tapasztaltak alapján a jel intenzitásának csökkenése jóval intenzívebb volt a vad típusú szekvenciát tartalmazó szubsztrát esetében, mint a mutáns szubsztrát használatkor. A két eltérő hasítóhely közti szignifikáns különbség jól összhangban van a korábban HIV-1 PR-ra oligopeptid szubsztrátokon meghatározott aminosav preferenciákkal. Eredményeink egyértelműen bizonyították, hogy a valós idejű BLI-alapú proteáz mérési eljárás alkalmas lehet az enzim specificitásának tanulmányozására, ezért további szubsztrátokat is terveztünk a HIV-1 PR enzimefészíni kötőhelyének vizsgálatára.

4.4.2. A HIV-1 proteáz szubsztrátkötő árkának vizsgálata

A BLI-alapú proteáz esszét fel kívántuk használni a HIV-1 PR szubsztrátkötő árkának tanulmányozására is, ugyanis ennek az enzimefészíni kötőhelynek a szerepét a szubsztrát kötésében független vizsgálatokban még nem igazolták a HIV-1 PR esetében. A vizsgálatokhoz olyan His₆-MBP-mApple szubsztrátot terveztünk, mely a HIV-1 MA/CA természetes hasítóhelyének 24-tagú szekvenciáját tartalmazta (vad-24, DTGHSNQVSQNY*PIVQNIQGQMVH). Emellett elkészítettük a módosított felismerési szekvenciát tartalmazó szubsztrátot is, melynek esetében a MA/CA hasítóhelyet P12-P6 és P5'-P12' pozíciókban módosítottuk, hogy az megfeleljen a HIV-1 CA/p2 hasítási szekvenciának (mut-24 GVGGPGHVSQNY*PIVQSQVTNSAT). Feltételeztük, hogy a felsimerési szekvencia módosítása miatt megváltoznak a szubsztrát és az enzimefészíni kötőhelyek közötti kölcsönhatások, ugyanis a P12-P6 helyeken a mutáció hatására a poláris aminosavakat a legtöbb esetben apolárisra változtattuk. A hasítóhely szekvencia megváltoztatásától a hasítási hatékonyságok közötti különbségek megjelenését vártuk. A vad típusú és mutáns szubsztrátok proteolízise közötti különbséget BLI módszer segítségével határoztuk meg.

A vad-24 és mut-24 szubsztrátok proteolízise egyaránt detektálható volt a rendszer felhasználásával, a mutáns szekvenciát tartalmazó szubsztrát processzálása kevésbé volt hatékony a vad típusú szubsztráthoz képest. A különbség oka feltehetően az volt, hogy a szubsztrát módosítása miatt megváltoztak az enzim és a szubsztrát közötti kölcsönhatások a szubsztrátkötő árok kötőhelyeken, a megváltozott kölcsönhatások következtében pedig a szubsztrátok eltérő hatékonysággal processzálódtak. Az alkalmazott szubsztrátokat

felhasználtunk az enzimkinetikai paraméterek meghatározására is, a mágneses gyöngy-alapú mérések eredményei is igazolták, hogy a HIV-1 PR hatékonyabban hasítja a vad típusú felimserési szekvenciát tartalmazó szubsztrátot. Eredményeink a BLI-alapú mérési módszer alkalmazhatóságát támasztják alá, továbbá igazolják, hogy az enzimfelszíni szubsztrátkötő árok fontos szerepet tölt be a szubsztát megkötésében.

Összefoglalásként elmondható, hogy az általunk kidolgozott BLI-alapú proteáz esszé segítségével folyamatos optikai méréssel, valós időben követhető nyomon a proteolitikus reakció. Bár a valós idejű homogén (pl. FRET-alapú) és heterogén (pl. felületi plazmon rezonancia) proteáz próbák száma korlátozott, a BLI-alapú megközelítés jó alternatíva lehet a termékképződés folyamatos mérésére. Ez a technika egy új megközelítést jelent mind a laboratóriumunkban kifejlesztett His₆-MBP-FP rekombináns fehérje szubsztrát rendszer, mind pedig a BLI felhasználása szempontjából. A szubsztrátok sokoldalú felhasználhatóságának köszönhetően a BLI-alapú mérési módszer számos különböző szubsztráthoz és proteázhoz is adaptálható lehet.

5. Összefoglalás

A doktori értekezésem alapjául egy korábban kidolgozott rekombináns fluoreszcens fehérje szubsztrát rendszer szolgált, melynek kidolgozásában munkám során részt vettem. Ezt a meglévő technológiát alkalmaztuk a HIV-1 és SARS-CoV-2 proteázok szubsztrát-specifitásának vizsgálatára és egy új proteáz aktivitásmérési módszer kidolgozására.

A HIV-1 PR vizsgálata céljából **olyan szubsztrátokat hoztunk létre, melyek a HIV-1 nukleokapszid proximális cink-ujj motívumában lévő vad típusú (N17) és mutáns (N17T, N17L, N17F, I14-ins-N17G és K14I-N17G) proteolitikus hasítóhelyeket tartalmaztak. Vizsgáltuk a szubsztrátok konformációs állapotait.** A HIV-1 PR nem hasította a cink-ujj motívumot cink ion jelenlétében, míg a szupermásodlagos szerkezet kialakulását megakadályozó EDTA és DDT jelenlétében processzálást tapasztaltuk. **Elvégeztük a hasítási hatékonyságok összehasonlító vizsgálatát,** a legnagyobb mértékű szubsztrát-konverziót az N17F mutáns esetében tapasztaltuk, eredményeink összhangban vannak a korábban oligopeptid szubsztrátokon meghatározott aminosav preferenciákkal.

A SARS-CoV-2 Mpro vizsgálatát olyan szubsztrátok *in vitro* vizsgálatával végeztük el, melyek a proteáz ismert vagy *in silico* módszerek felhasználásával jóslott hasítási szekvenciát tartalmaztak. Igazoltuk, hogy a SARS-CoV-2 Mpro az ismert és a jóslott hasítóhely szekvenciákon belül egyaránt képes hasítani a szubsztrátokat. Sikeresen azonosítottuk a hasítási pozíciókat a szekvenciákon belül, majd enzimkinetikai méréseket végeztünk a szubsztrát-specifitás vizsgálata érdekében. Munkánk eredményeként **azonosítottuk a SARS-CoV-2 Mpro egy eddig ismeretlen szubsztrátját, a humán CTBP1 fehérjét, valamint a fehérjében lévő új hasítóhelyet,** melyet az enzim kisebb hatékonysággal hasított a SARS-CoV-2 poliprotein autoproteolitikus szekvenciához képest.

A rekombináns fluoreszcens fehérje szubsztrátokat felhasználtuk egy új, a proteolitikus aktivitás mérésére alkalmas, bioréteg interferometria-alapú módszer kidolgozására, a HIV-1 proteázt alkalmazva modell enzimként. A mérés körülményeinek optimalizálását követően a módszert sikeresen alkalmaztuk a HIV-1 PR specificitásának tanulmányozása során, vizsgáltuk az enzim P2 aminosav preferenciáját, valamint igazoltuk az enzimfelszíni szubsztrátkötő árok szerepét a szubsztráttal való kölcsönhatások kialakításában. Módszerünk segítheti a BLI ezen új felhasználási lehetőségének elterjedését, mert lehetővé teszi a proteáz aktivitás valós idejű mérését kis térfogatban és nagy áteresztőképességű rendszerekkel is kompatibilis.

6. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, **Dr. Mótyán János Andrásnak** a PhD tanulmányaim alatt nyújtott szakmai segítségéért, mely lehetővé tette számomra a disszertációm elkészítéséhez szükséges elméleti és gyakorlati tudás elsajátítását.

Köszönettel tartozom **Dr. Tózsér Józsefnek** intézetvezető professzor úrnak, a Retrovirális Biokémiai Kutató Laboratórium vezetőjének, hogy PhD tanulmányaimat az intézetben és kutatócsoportjában végezhettem, és szakmai segítségével támogatta a munkánkat.

Köszönettel tartozom **Dr. Golda Máriának, Dr. Matúz Krisztinának, Dr. Mohamed Mahdinak, Dr. Szabó Andrásnak, Dr. Szojka Zsófiának, Janics-Pető Szilviának, Kassay Norbertnek** és **Veres Ágotának**, akikre mindig számíthattam elméleti, gyakorlati és emberi tekintetben is!

Szeretném megköszönni **Dr. Bozóki Beának** és **Gazda Líviának** a rekombináns fluoreszcens szubsztrátokkal való munkavégzéssel kapcsolatos szakmai tapasztalataiknak az átadását!

Köszönettel tartozom **Ambrus Viktor, Kunkli Balázs, Linkner Tamás** és **Miltner Noémi** munkatársaimnak a szakmai segítségükért!

Szeretnék köszönetet mondani a cöeliákia kutatócsoport vezetőjének **Dr. Korponay Szabó Ilmának**, hogy lehetővé tette kutatócsoportunk számára a BLItz készülék használatát, valamint kutatócsoportja tagjainak, különös tekintettel **Elek Ritának, Diós Ádámnak** és **Szabó Ildikónak** a munkám során nyújtott szakmai segítségükért!

Köszönöm **Dr. Nagy Tibornak** a hasítóhelyek meghatározásában végzett munkáját!

Külön köszönet illeti **Nataly Morales Granda** és **Toldi Vanda** barátaimat, hogy mindig számíthattam rájuk a munkámban és magánéleti dolgokban is! Köszönöm a rengeteg együtt töltött időt, a szakmai és baráti beszélgetéseket, a kávézásnak álcázott „brainstormingokat”!

Köszönet **Aranyos Anitának** és **Tóth Juditnak** az egyetemi éveim alatt nyújtott segítségükért, támogatásukért, barátságukért!

Köszönettel tartozom **Balogh Ágnesnek**, aki a középiskolás tanulmányim óta mentorálta utamat!

Köszönettel tartozom a **testvéreimnek**, a folyamatos támogatásért („minek tanulsz úgylis átmész”), a stresszoldó otthoni légkör megteremtéséért, köszönöm a **családom minden**

tagjának az egyetemi éveim során és azon kívül nyújtott támogatásukért, szeretetükért. Külön köszönöm **nagynénémnek** és **mamámnak** a szerető támogatást, biztatást, **édesanyámnak**, hogy az első perctől kezdve hitt bennem, és mindig támogott a döntéseimben!

Cám ơn anh đã luôn bên cạnh em trong những lúc khó khăn nhất. Em tin rằng có thể vượt qua tất cả khi bên anh!

A HIV-1 proteáz specificitásának vizsgálatát, valamint a bioréteg interferometria-alapú mérési módszer kidolgozását leíró közleményeket is az *International Journal of Molecular Sciences* folyóirat „In memory of Stephen Oroszlan” című különszámában publikáltuk, melyet a folyóirat a 2020. májusában elhunyt Dr. Stephen Oroszlanra emlékezve jelentetett meg. Dr. Stephen Oroszlan eredményei kiemelkedő jelentőségűek a retrovirologia területén, munkája jelentős mértékben járult hozzá a HIV proteáz és más retrovirális proteázok működésének megismeréséhez és megértéhez. Munkája kutatócsoportunk számára is kiemelt jelentőséggel bír, hiszen Dr. Tózsér József azután hozta létre 1992-ben a Debreceni Egyetemen a Retrovirális Biokémiai Kutató Laboratóriumot, miután Dr. Stephen Oroszlannal együtt dolgozott az Amerikai Egyesült Államokban (Molecular Virology and Carcinogenesis Laboratory, NCI-Frederick Center for Cancer Research). Dr. Oroszlan kutatócsoportunk számos munkájában részt vett, a HIV-1 és más retrovirális proteázok specificitásának és antivirális inhibitorok hatásának vizsgálatát is inspirálta és segítette. A disszertáció alapjául szolgáló, a HIV-1 proteáz vizsgálatát célzó munkánk jelentős mértékben Dr. Stephen Oroszlan és kollégái korábbi eredményein alapulnak, munkánk tisztelgés emléke előtt.

A disszertációban bemutatott munkák az alábbi pályázatok támogatásával valósulhattak meg: Felsőoktatási Intézményi Kiválósági Program (NKFIH-1150-6/2019), Tématerületi Kiválósági Program (TKP2020-IKA-04), A gyógyszerkutatás újabb irányai: peptid-fehérje kölcsönhatások a magasabb rendű fehérjeszerveződések szabályozásában - PHARMPROT teaming (GINOP-2.3.2-15-2016-00044), Az orvos-, egészségtudományi- és gyógyszerész-képzés tudományos műhelyeinek fejlesztése (EFOP-3.6.3- VEKOP-16-2017-00009), Az intercelluláris kommunikáció szerepe a határfelületek (bőr, béltraktus) gyulladáso és immunológiai betegségeiben (GINOP-2.3.2-15-2016-00015), és a Gyógyszertechnológiai K+F fejlesztése a Debreceni Egyetemen (GINOP-2.3.3-15-2016-00021).

7.Függelék



**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/447/2021.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Miczi Mária
Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10068511

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Miczi, M.**, Diós, Á., Bozóki, B., Tózsér, J., Mótyán, J. A.: Development of a Bio-Layer Interferometry-Based Protease Assay Using HIV-1 Protease as a Model. *Viruses-Basel*. 13 (6), 1-20, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/v13061183>
IF: 5.048 (2020)
2. Mótyán, J. A., **Miczi, M.**, Oroszlan, S., Tózsér, J.: Specificity of the HIV-1 Protease on Substrates Representing the Cleavage Site in the Proximal Zinc-Finger of HIV-1 Nucleocapsid Protein. *Viruses-Basel*. 13 (6), 1-14, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/v13061092>
IF: 5.048 (2020)
3. **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: 5.923

További közlemények

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: 4.099





5. Mótyán, J. A., **Miczi, M.**, Tózsér, J.: Dimer Interface Organization is a Main Determinant of Intermonomeric Interactions and Correlates with Evolutionary Relationships of Retroviral and Retroviral-Like Ddi1 and Ddi2 Proteases.
Int. J. Mol. Sci. 21 (4), 1-24, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21041352>
IF: 5.923
6. Szojka, Z., Mótyán, J. A., **Miczi, M.**, Mahdi, M., Tózsér, J.: Y44A Mutation in the Acidic Domain of HIV-2 Tat Impairs Viral Reverse Transcription and LTR-Transactivation.
Int. J. Mol. Sci. 21 (16), 1-17, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21165907>
IF: 5.923
7. Bozóki, B., Mótyán, J. A., **Miczi, M.**, Gazda, L., Tózsér, J.: Use of Recombinant Fusion Proteins in a Fluorescent Protease Assay Platform and Their In-gel Renaturation.
JoVE. 143, 1-15, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3791/58824>
IF: 1.163
8. Bozóki, B., Gazda, L., Tóth, F., **Miczi, M.**, Mótyán, J. A., Tózsér, J.: A recombinant fusion protein-based, fluorescent protease assay for high throughput-compatible substrate screening.
Anal. Biochem. 540-541, 52-63, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2017.11.001>
IF: 2.507
9. Mótyán, J. A., **Miczi, M.**, Bozóki, B., Tózsér, J.: Data supporting Ni-NTA magnetic bead-based fluorescent protease assay using recombinant fusion protein substrates.
Data in Brief. 18, 203-208, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dib.2018.03.031>

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 35,634

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):

16,019

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, 2021.10.05.