

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**A mezotripszinogén proteolízisének és a
hasnyálmirigy lipáz néhány természetes
mutációjának vizsgálata**

Toldi Vanda

Témavezető: Dr. Szabó András



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2021

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	1
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
1. BEVEZETÉS.....	5
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
2.1. Humán hasnyálmirigy	6
2.2. A hasnyálmirigy emésztőenzimei	7
2.2.1. Általános jellemzés	7
2.2.2. Hasnyálmirigy proteázok	11
2.2.3. A hasnyálmirigy emésztőenzimek aktivációja	12
2.2.4. Tripszinogén izoformák és jellemzőik	14
2.2.5. Mezotripszin.....	16
2.2.6. Proteáz inhibitorok	18
2.3. Krónikus hasnyálmirigy-gyulladás	19
2.3.1. Tripszin-függő út.....	20
2.3.2. Tripszin-független útvonal	23
2.3.3. Alternatív patológias útvonalak	27
3. CÉLKITŰZÉS.....	28
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	29
4.1. Általános módszerek.....	29
4.1.1. Nomenklatura	29
4.1.2. Anyagok	29
4.1.3. In vitro mutagenézis, plazmid DNS sokszorozás és tisztítás	29
4.1.4. Fehérje expresszió	32
4.1.5. Rekombináns fehérjék tisztítása, titrálása	34
4.1.6. Redukáló SDS gélelektroforézis és denzitometria	35
4.1.7. Statisztikai analízis	36
4.2. Kísérletek mezotripszinogénnel.....	36
4.2.1. Mezotripszinogén hasítás és aktiválás.....	36
4.2.2. Mezotripszin aktivitásmérés.....	37
4.2.3. Kazein degradáció vizsgálata	37
4.2.4. SBTI emésztés vizsgálata.....	37
4.2.5. SPINK1 degradáció vizsgálata	37

4.2.6.	Enzim kinetikai mérések	38
4.3.	Kísérletek hasnyálmirigy lipázzal.....	38
4.3.1.	Lipáz aktivitásmérés.....	38
4.3.2.	Sejtlizátumok készítése	39
4.3.3.	Ultracentrifugálás	39
4.3.4.	Fehérje immunoblot	39
4.3.5.	RNS izolálás, reverz transzkripció	40
4.3.6.	XBP splicing vizsgálata	40
4.3.7.	BiP expresszió vizsgálata	40
5.	EREDMÉNYEK	41
5.1.	Mezotripszinogén inaktiválása CTRC általi proteolitikus hasításokkal	41
5.1.1.	Mezotripszinogén CTRC általi hasítása	41
5.1.2.	A mezotripszin proteolitikus hasításának vizsgálata.....	44
5.1.3.	L81A-mezotripszin katalitikus tulajdonságai.....	47
5.1.4.	L81A-mezotripszin inhibitor kötésének vizsgálata.....	50
5.1.5.	L81A-mezotripszin inhibitor emésztésének vizsgálata.....	52
5.2.	Hasnyálmirigy lipáz mutációk szerepének vizsgálata krónikus hasnyálmirigy- gyulladásban.....	55
5.2.1.	Humán hasnyálmirigy lipáz (PNLIP) mutációk.....	55
5.2.2.	Endoplazmás retikulum (ER) stressz válasz HEK 293T sejtekben.....	60
5.2.3.	PNLIP variánsok szekréciója és feltekeredése AR42J sejtekben.....	62
5.2.4.	ER stressz markerek vizsgálata AR42J sejtekben.....	64
6.	DISZKUSSZIÓ	67
7.	ÖSSZEGZÉS	72
7.	SUMMARY.....	73
8.	IRODALOMJEGYZÉK.....	74
9.	PUBLIKÁCIÓS LISTA.....	84
10.	TÁRGYSZAVAK/KEYWORDS.....	86
11.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	87

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AR42J	patkány hasnyálmirigy sejtvonala
ATF6	aktiváló transzkripció faktor-6
BiP	immunglobulin-kötő fehérje/ <i>binding immunoglobulin protein</i>
BPTI	marha hasnyálmirigy tripszin inhibitor/ <i>bovine pancreatic trypsin inhibitor</i>
CASR	kalcium-érzékelő receptor/ <i>calcium-sensing receptor</i>
CEL	karboxil-észter lipáz
CELA	kimotripszin-szerű elasztáz
CFTR	cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor
CHOP	C/EBP homológ fehérje
CPA	karboxipeptidáz A
CPB	karboxipeptidáz B
CTRC	kimotripszin C
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DTT	ditiotritol
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
ER	endoplazmás retikulum
ERAD	endoplazmás retikulum- asszociált degradáció
FPLC	gyors protein folyadék kromatográfia
GAPDH	gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz
HEK 293	humán embrionális vese sejtvonala
HRP	tornaperoxidáz/ <i>horseradish peroxidase</i>
Hu3	humán mezotripszinogén
IRE1	inozitolt igénylő enzim-1/ <i>inositol-requiring enzyme 1</i>
IPTG	izopropil-béta-D-tiogalaktopiranozid
k_{cat}	katalitikus sebességi állandó
k_{cat}/K_m	specifitási állandó
K_i	gátlási állandó
K_m	Michaelis-Menten állandó
LB	Luria-Bertani tápfolyadék
PBS	foszfát-pufferelt sóoldat
PEI	polietilén-imin

PERK	PKR-szerű endoplazmás retikulum kináz
PLA	foszfolipáz A
PLRP	hasnyálmirigy lipáz-szerű fehérje
PNLIP	humán hasnyálmirigy lipáz
PRSS	tripszinogén gén
SDS-PAGE	nátrium-dodecyl szulfát poliakrilamid gélelektroforézis
SPINK1	hasnyálmirigy szekretórikus tripszin inhibitor
SBTI	szójabab tripszin inhibitor/ <i>soybean trypsin inhibitor</i>
TPST	membránkötött tirozilprotein szulfotranszferáz
TCA	triklórecetsav
UPR	selejtfehérje válasz/ <i>unfolded protein response</i>
VNTR	változó számú tandemismétlődés
XBP1	X-box-kötő fehérje-1

1. BEVEZETÉS

A krónikus hasnyálmirigy-gyulladás a hasnyálmirigy irreverzibilis gyulladásos megbetegedése, amelyben a funkcionális sejtek fokozatosan elhalnak. A folyamatos és visszafordíthatatlan sejtpusztulás hatással lehet a hasnyálmirigy exokrin és endokrin funkciójára, mivel a szerv számos emésztőenzimet és anyagcserét szabályozó hormont termel és szekretál. A betegség fő rizikófaktorai az alkohol-függőség és a dohányzás, de bizonyos emésztőenzimekben előforduló mutációk is jelentősen hozzájárulhatnak a betegség kialakulásához. A környezeti hatások és a genetikai rizikófaktorok a hasnyálmirigy-gyulladás tekintetében rendkívül összetettek. A betegség sok esetben több rizikófaktor együttes megléte esetén alakul ki.

Megfigyelték, hogy a hasnyálmirigy-gyulladás korai szakaszában szervben belüli tripszin aktiváció történik. A humán hasnyálmirigy három tripszin prekuzort termel inaktív formában: jelentősebb mennyiségben kationos és anionos tripszinogént és kisebb mennyiségben mezotripszinogént. Az első genetikai rizikófaktor, amelyet krónikus hasnyálmirigy-gyulladásban azonosítottak, egy kationos tripszinogénben előforduló mutáció volt. A tripszin kiemelt jelentőségű a hasnyálmirigy által termelt emésztőenzimek között, hiszen nemcsak a táplálékfehérjék emésztését végzi, hanem számos más hasnyálmirigy emésztőenzimet is aktivál a tripszin kaszkádon keresztül.

A tripszin inaktív formában történő bélbe juttatását több szabályozó mechanizmus biztosítja. A hasnyálmirigy acinus sejtjei egy kisméretű tripszin inhibitor (SPINK1) fehérjét és egy minor kimotripszin izoformát (CTRC) szekretálnak, amelyek késleltetni tudják a tripszinogén autoaktivációját. A tripszinogénben vagy az aktivitását szabályozó fehérjék valamelyikében megjelenő mutációk, amelyek korai tripszinogén aktivációhoz vezetnek, növelik a hasnyálmirigy-gyulladás kialakulásának esélyét.

Később számos olyan kutatás látott napvilágot, amely nem csak a tripszinben, hanem a hasnyálmirigy által termelt egyéb emésztőenzimekben előforduló mutációkra fókuszált. Figyelembe véve, hogy a hasnyálmirigy milyen nagy mennyiségben termeli és szekretálja ezen enzimeket, valószínű, hogy több patológiás útvonalon keresztül is hozzájárulhatnak a krónikus hasnyálmirigy-gyulladás kialakulásához, így karakterizálásuk és a mutációk azonosítása kiemelt jelentőségű.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Humán hasnyálmirigy

A hasnyálmirigy egy hosszúkas, falevél alakú mirigyes szervünk, amely a gyomor mögött helyezkedik el és a nyombéltől a lépig terjed (1). Központi szerepet játszik az energiafogyasztás és az anyagcsere szabályozásában. Morfológiai és funkcionális szempontból két különálló részből tevődik össze, a külső (exokrin) és a belső elválasztású (endokrin) hasnyálmirigyből (2). Szerkezetét tekintve az exokrin hasnyálmirigy főként mirigy- és csatornasejtekből áll, míg az endokrin hasnyálmirigyet szigetsejtek alkotják (3). A mirigysejtek emésztőenzimeket termelnek, amelyek a duktális sejtek által képzett csatornákon keresztül jutnak el a duodénumba (4). Az endokrin szövetek Langerhans-szigetei különböző sejtípusokat tartalmaznak, amelyek hormonokat választanak ki. Az α -sejtek a glukagon, a β -sejtek az inzulin, a δ -sejtek a szomatosztatin, az ϵ -sejtek a ghrelin míg a γ (vagy PP) sejtek a hasnyálmirigy polipeptid termelésért felelősek (5).

Mivel a kutatásaim a hasnyálmirigy exokrin funkcióira összpontosítanak, a továbbiakban ezt részletezem.

Az exokrin hasnyálmirigy funkcionális egysége az acinus, amely piramis alakú mirigysejtekből tevődik össze. Az acinus sejtek a hasnyálmirigy térfogatának közel 82 %-át teszik ki. Feladatuk az emésztőenzimek termelése és tárolása (6). Úgynevezett fehérjetermelő gyáraknak tekinthetők, mivel több fehérjét termelnek, mint bármely más sejtípus (7). Ezért a mirigysejtek rendkívül kiterjedt endoplazmás retikulum (ER) rendszerrel rendelkeznek (8,9).

Az emésztőenzimek a durvafelszínű ER-ben szintetizálódnak, majd itt veszik fel a harmadlagos és negyedleges szerkezetüket (folding). Ezen felül speciális módosításokon mennek keresztül (diszulfid hidak kialakítása, foszforiláció, szulfatálás, glikoziláció). Ezt követően a fehérjék a plazmamembránba vagy a kívánt organellumba (Golgi-apparátus, zimogén granulumok, lizoszóma) transzportálódnak. A szekretoros emésztőenzimek a Golgi-apparátusba kerülve további poszttranszlációs módosításokon mehetnek keresztül és zimogén granulumokba csomagolódnak (10). A zimogén granulumokból exocitózissal szabadulnak ki az étkezést követő neurohormonális stimuláció hatására (9,11). Az exocitózis a szekréciós granulum mozgásából áll, amely az apikális felszínhez érve fuzionál a plazmamembrán felismerő helyével. Ezt követően a granulum membrán/plazmamembrán felhasad (12).

Mivel az emésztőenzimek károsíthatják a hasnyálmirigy szöveteit, szükség van olyan védőmechanizmusokra, amelyek biztosítják a szövetek integritását. Egyrészt az enzimek proenzim formában szintetizálódnak és csak azt követően aktiválódnak, hogy a duodénumba

kerülnek; másrészt a zimogén granulomok savas kémhatásúak így nem optimális a pH a működésükhöz (13-15). Ezen felül az acinus sejtek inhibitor fehérjét is szintetizálnak és szekretálnak, amelyek feladata az emésztőenzimek gátlása, ezáltal védve a hasnyálmirigyet az önmérsztéstől (16-18).

Mind a neurális mind a hormonális rendszer központi szerepet játszik a mirigysejtek szekréciójának szabályozásában neurokrin, endokrin és parakrin jelátviteli rendszereken keresztül (19). Az exocitózis a megnövekedett kalcium koncentrációnak köszönhető, amely az intracelluláris raktárakból származik (20,21). Az ER a legfontosabb intracelluláris kalciumraktár a fehérjeszintézisben és feldolgozásban betöltött funkciója mellett (11).

A mirigysejtek szekréciós termékei a sejtek közötti csatornákba, majd a csatornarendszerbe végül a bél lumenébe kerülnek. A mirigysejtek plazmamembránján kalcium aktivált kloridion csatornák találhatók. Ha ezek a csatornák kinyílnak, kloridionok áramlanak az acináris lumenbe. A megnövekedett negatív töltés az extracelluláris nátrium beáramlásához vezet. A nátrium-klorid ozmotikusan maga után vonja a víz beáramlását, létrehozva ezzel az acináris áramlást (22).

Az acinus és a duktális sejtek együttesen termelik a hasnyálat, amely egy elektrolitokban gazdag folyadék. Ezen kívül számos emésztőenzimet és nem emésztő fehérjét is tartalmaz. A víz és az elektrolitok főként a duktális sejtekből származnak, az acinus sejtek szolgáltatják az emésztőenzimeket, míg a nem emésztő jellegű fehérjék (például az albumin) a szérumból kerülnek a hasnyálba (23). A megfelelő mennyiségű bikarbonát elengedhetetlenül szükséges az erősen savas gyomor pH semlegesítéséhez, ezzel megteremtve az optimális körülményeket az emésztőenzimek működéséhez (24).

2.2. A hasnyálmirigy emésztőenzimeit

2.2.1. Általános jellemzés

Az emésztőenzimek központi szerepet játszanak a táplálékban előforduló esszenciális tápanyagok emésztésében. A hasnyálmirigy minden fő emésztőenzim típust termel és kiválaszt, így a hasnyálban szénhidrátok, lipidek és fehérjék bontására specializálódott enzimek is megtalálhatók (25).

Szénhidrátok: A szénhidrátok egyszerű (monoszacharidok, diszacharidok) vagy összetett cukrok (keményítő) formájában fordulnak elő a táplálékban. A keményítő a glükóz polimerje, bontása során amilóz és amilopektin keletkezik. Mivel a szénhidrátok kizárólag monoszacharidok formájában képesek felszívódni a bélben, az étrendi keményítőt α -amiláz

izoformák hidrolizálják glükózzá. A keményítő emésztése a szájüregben kezdődik a nyálamiláz (AMY1A) által, majd a duodénumban folytatódik a hasnyál amiláz (AMY2A) által. Ez utóbbi egy 57 kDa nagyságú glikoprotein és a hasnyál teljes fehérje 5-6 %-át teszi ki. A hasnyál proteázokkal ellentétben az amilázoknak nincs inaktív prekursor formája. Az amiláz katalizálta reakció termékei 6-8 glükóz egységből álló α -1,4 és α -1,6 kötést tartalmazó oligoszacharidok (dextrinek, maltóz, maltotrióz és elágazó láncú oligoszacharidok). Ezek az oligoszacharidok a bélben alakulnak tovább monoszacharidokká (14).

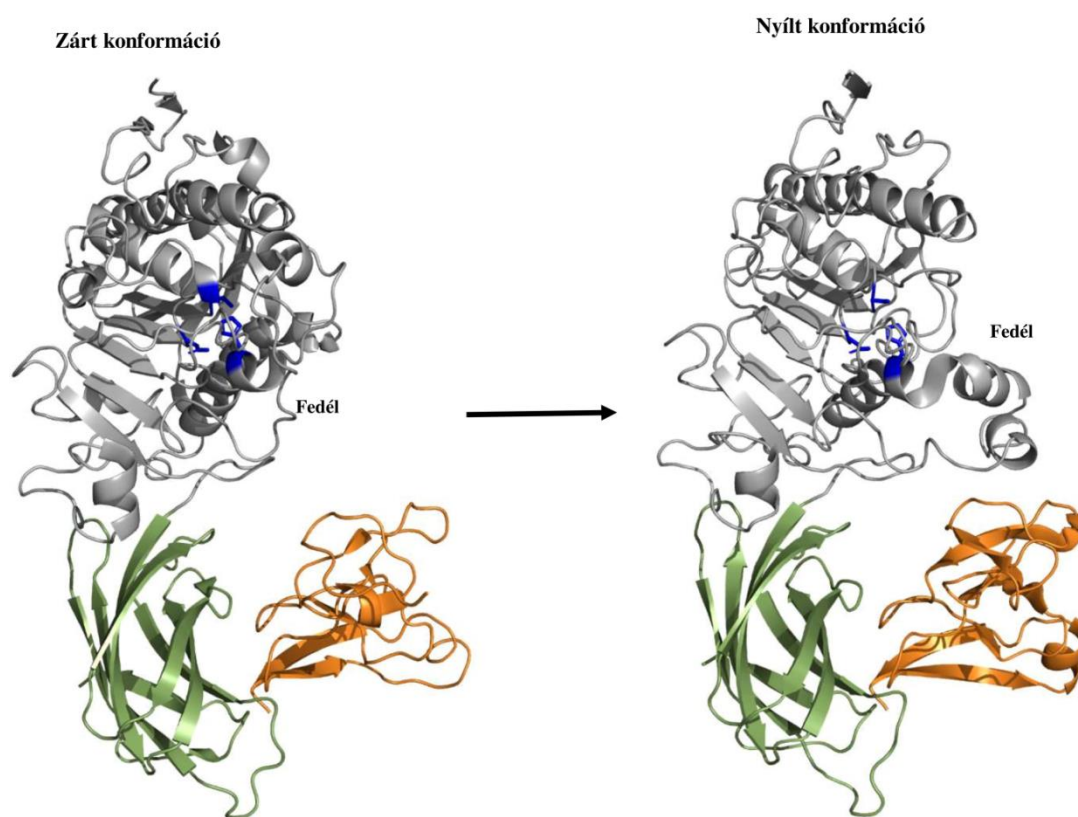
Lipidek: A lipidek változatos formában fordulnak elő és esszenciálisak a szervezet megfelelő működéséhez, mint energiaforrások, sejtmembrán alkotók (foszfolipidek, szfingolipidek, galaktolipidek, koleszterin, koleszterin-észterek), illetve a zsírban oldódó vitaminok felszívódása szempontjából is elengedhetetlenül szükségesek (14). Az étkezési zsírok hasítása kritikus hasznosulásuk szempontjából, hiszen a trigliceridek nem képesek felszívódni a bélhámsejtekben. Az étkezési triglicerideket felszívódásuk előtt szabad zsírsavakká és monoacil-gliceridekké kell alakítani. A lipázok végzik az étkezési zsírok lebontását, a zsírok felvételét különböző szövetekbe és azok mobilizálását a sejteken belül. Emberben a triglicerid lipázok a gasztrointesztinális traktusban találhatóak, epiteliális felszínhez kötve, illetve a zsírtároló sejtekben. Habár egyes lipázok az észterek széles spektrumát bontják, mindegyik enzimre jellemző, hogy hidrolizálják az acilglicerolok, köztük a trigliceridek észter-kötését (26). A trigliceridek emésztése már a szájüregben elkezdődik és a gyomorban folytatódik (27).

A triglicerid lipázok egy közös hidroláz ősből evolválódtak. A gyomor lipáz a zsírsavak 10-30 %-át szabadítja fel. Azonban a trigliceridek többségét a hasnyálmirigy lipáz (PNLIP) hidrolizálja zsírsavakra és monoacilglicerolokra (14). A hasnyálmirigyben két másik homológ hasnyálmirigy triglicerid lipázt is azonosítottak, amelyeket hasnyálmirigy lipáz szerű fehérjéknek (PLRP-1 és PLRP-2) nevezünk (26). A PLRP1 és PLRP2 közös vonása, hogy a PNLIP-hez hasonlóan képesek kolipázt kötni, de a PLRP1 in vitro kísérletek során inaktívnak bizonyult. Patkány hasnyálmirigyen végzett génexpressziós kísérletek azt mutatták, hogy a PLRP1 és PLRP2 a patkányok megszületésekor érték el maximális expressziójukat, amely később csökkenni kezdett. A PLRP expresszió csökkenésével a PNLIP expressziója fokozódott (28).

Az étkezési trigliceridek hatékony emésztéséhez a hasnyálmirigy lipáz, kolipáz és az epesavak együttes jelenléte szükséges a duodénumban. A humán PNLIP-et a hasnyálmirigy mirigysejtjei termelik és szekretálják. Elengedhetetlenül szükséges az étkezési trigliceridek hatékony bontásában és felszívódásában. A kolipáz fontos szerepet játszik abban, hogy

kihorgonyozza a lipázt a lipid micellák felszínére, ellensúlyozva az epesavak destabilizáló hatását (29).

A humán hasnyálmirigy lipáz (PNLIP) 465 aminosavból álló fehérje. Az éretlen fehérje egy 16 aminosav hosszúságú N-terminális hidrofób szignálpeptidet tartalmaz, így az érett fehérje 449 aminosavból áll. A hasnyálmirigy lipáz két doménre osztható, a globuláris N-terminális doménre, amely α -hélix és β -redő szerkezeti motívumokban gazdag és egy C-terminális doménre, amely kizárólag β -redő motívumokból áll (1. ábra). A domének egy rövid rendezetlen szerkezeti elemen keresztül kapcsolódnak egymáshoz és diszulfidhidakkal stabilizáltak. A humán hasnyálmirigy lipáz N-terminális doménjében található lipolitikus katalitikus triád a szerin proteázok aktív centrumához hasonló (Ser152, His152, Asp176). A lipáz azonban proteolízis helyett konformációváltozással aktiválódik (30) (1. ábra).



1. ábra. A humán hasnyálmirigy lipáz kolipázzal alkotott komplexének térszerkezeti modellje kétféle konformációs állapotban

A modellek az 1N8S (zárt konformáció) és az 1LPB (nyitott konformáció) Protein Data Bank (PDB) fájlok használatával készültek a PyMOL 2.4.1 (Schrödinger LLC) programmal. A lipáz N-terminális domén hordozza az enzim **aktív centrumát**, a C-terminális domén **kolipáz** kofaktort köt. Triglicerid csepphez történő kötődéskor a fedél elnevezésű felszíni hurok elmozdul a lipázban, és szabaddá válik az enzim aktív centruma. A **kolipáz** stabilizálja az enzim aktív állapotát, és hidrofób felszínének köszönhetően segíti az enzim lipid csepphez történő kapcsolódását.

A kolipáz egy 10 kDa molekulásúlyú fehérje és a hasnyálmirigy lipáz kofaktoraként működik. A hasnyálmirigy prekursor (prokolipáz) formában termeli és szekretálja a duodénumba, ahol az N-terminálisáról triptikus hasítással leemésztdődik egy öt aminosav hosszúságú propeptid. A kolipáz két sóhídon keresztül kötődik a PNLIP C-terminális doménjéhez. A kolipáz lipázhoz való kötődése egy nagyméretű hidrofób kötőfelszínt hoz létre, amely segítségével a lipáz hatékonyabban kapcsolódik a triglicerid cseppekhez.

A PNLIP enzim felszíni hurok elmozdulásokkal kétféle konformációs állapotot vehet fel (1. ábra). Az úgynevezett zárt konformációban a PNLIP inaktív. Ilyenkor egy fedőnek nevezett felszíni hurok eltakarja az aktív helyet. A fedél elmozdulása létrehozza a nyílt konformációs állapotot, amikor a triglicerid molekulák bejuthatnak az enzim aktív centrumába. Ugyan a PNLIP a monomer vízoldhatatlan szubsztrátokkal szemben is rendelkezik aktivitással, de a szubsztrát partikulákba rendeződésekor (micellákba vagy emulziókba) nő az aktivitása. A fedő motívum felnyílása a kolipáz kötődését követő konformációváltozások eredménye. A fedő motívum felnyílása után az enzim aktív centruma hozzáférhetővé válik a szubsztrátok számára. A kolipáz nem csak a fedő domén felnyitásáért felelős, de stabilizálja is azt egy nyitott pozícióban. Az epesavak gátolják a PNLIP enzimet. A kolipáz feladata, hogy aktív állapotban tartsa a PNLIP-et, epesavak jelenlétében is (26).

A karboxil-észter lipáz (CEL) a hasnyál teljes fehérjemennyiség közel 4 %-át teszi ki (31). A CEL két domént tartalmaz, egy N-terminális hidroláz és egy C-terminális domént, amely számos prolin gazdag ismétlődő régiót tartalmaz (VNTR), amelyek száma emberben 3-28 közé tehető. A prolin gazdag ismétlődések nagyfokú O-glikoziláltságot mutatnak és fontosak a fehérje stabilitás szempontjából (32). A CEL egy Ser-His-Asp katalitikus triáddal rendelkezik és a monoacil-glicerolok és más glicerol lipidek hidrolízisét végzi (33).

A foszfolipáz A2 (PLA2) egy 14 kDa molekulatömegű fehérje (34) és 135 aminosavat tartalmaz, egy szignálpeptidet és egy 7 aminosav hosszúságú aktivációs peptidet (35). Az enzim epesavakkal aktiválódik a duodénumban. Részt vesz a koleszterin és a lipidoldékony vitaminok bontásában és felszívásában (36).

Fehérjék: A fehérjék aminosavakból tevődnek össze és elengedhetetlenül szükségesek a megfelelő növekedéshez, fejlődéshez és az energiaszükségletek kielégítéséhez. A táplálék fehérjék sokfélesége és összetettsége, valamint kritikus szerepe tükröződik abban, hogy a hasnyálmirigy enzimek közel 80 %-a proteáz. Habár az acinus sejtek fő exokrin termékei proteázok, számos további proteáz fejeződik ki az emésztőrendszer egészében, különösen a gyomorban és a vékonybélben. A fehérjéket a gyomor által termelt pepszin kisebb polipeptidekké hasítja. Emésztésük a duodénumban, majd a vékonybélben folytatódik. A

rendszer fontosságát alátámasztja, hogy több párhuzamos és redundáns rendszer működik annak érdekében, hogy az összes kulcsfontosságú aminosav megfelelő mennyiségben rendelkezésre álljon az élő szervezetek növekedéséhez és fenntartásához (14).

2.2.2. *Hasnyálmirigy proteázok*

A hasnyálmirigy proteázok kiemelt jelentőségűek a táplálékkal bevitt fehérjék emésztésében. Aminosavakat és dipeptideket távolítanak el a polipeptidláncok C-terminálisáról (karboxipeptidázok) vagy a polipeptideket rövidebb darabokra bontják specifikus láncközi hasításokkal (tripszin, kimotripszin, elasztáz). Ezen enzimek több izoformája is szekretálódik a humán hasnyálmirigyből, amelyek számos tulajdonságban (pl. expresszió, specificitás, stabilitás) eltérőek lehetnek egymástól. A katalízis mechanizmusát tekintve a hasnyálmirigy proteázok a metalloproteázok és a szerinproteázok osztályába sorolhatók.

A metalloproteázok legjelentősebb képviselői a karboxipeptidázok, amelyek cinkatomot tartalmaznak az aktív helyen. Működésük során az étkezési polipeptidláncok terminális peptidkötését hidrolizálják. A hasnyálban három izoformát azonosítottak. Az A-típusú karboxipeptidázok (CPA1, CPA2) aromás és alifás aminosavakat hasítanak le a fehérjék C-terminálisáról, míg a B-típusú (CPB1) a triptikus hasítást követően keletkezett C-terminális lizin és arginin aminosavakat hidrolizálja. A karboxipeptidázok proenzimként szintetizálódnak és a tripszin aktiválja őket. Az inaktív preproprotein 419 aminosavból áll, amely egy 16 aminosav hosszúságú szekréción szignált és egy 94 aminosav hosszúságú propeptidet tartalmaz (37).

A tripszinek, kimotripszinek és elasztázok szerin endopeptidázok. A szerin proteázok erősen homológok, de különböző specifikus szubsztrátkötő zsebbel rendelkeznek, amelyek csak egy bizonyos peptidkötés hidrolízisét teszik lehetővé (14). Ahogyan nevük is mutatja, a szerin proteázok egy szerint tartalmaznak a katalitikus helyen (38). Minden szerin proteáz egyetlen polipeptidláncból áll, amely két doménből tevődik össze. A katalitikus triádot három aminosav alkotja (szerin, hisztidin, aszpartát) és a proteázok a szubsztrátkötő hely segítségével ismerik fel a szubsztrát fehérjékben található hasítóhelyeket.

A tripszinogén a legnagyobb mennyiségben termelődő hasnyálmirigy emésztőenzim. A hasnyálban található fehérjék közel 19 %-át teszi ki. A tripszin olyan endopeptidáz, amely a peptideket arginin és lizin aminosavak után hidrolizálja. A tripszin kitüntetett jelentőséggel bír, mivel központi szerepet tölt be a többi emésztőenzim aktiválásában.

A kimotripszinogén a második legelterjedtebb szerin proteáz a hasnyálban, a teljes hasnyál fehérjemennyiség közel 9 %-át teszi ki (39). A kimotripszin egy endopeptidáz, amely

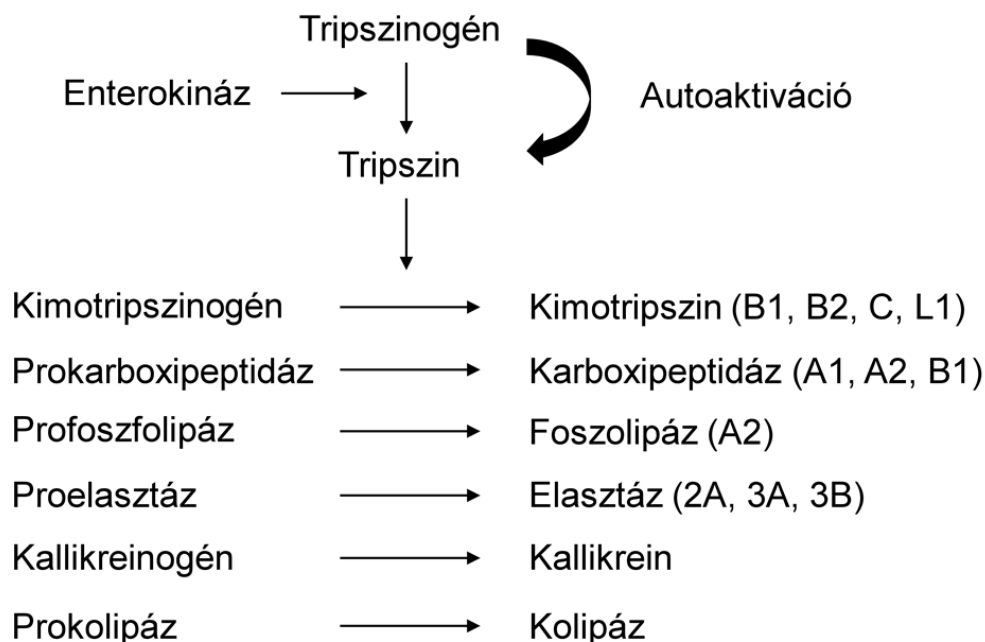
elsősorban aromás oldalláncú aminosavak (fenilalanin, tirozin, triptofán) utáni peptidkötéseket hidrolizál. Az inaktív kimotripszinogén egy 230 aminosavból álló aktív molekulából, egy 18 aminosav hosszúságú szignálpeptidből és egy 15 aminosav hosszúságú aktivációs peptidből tevődik össze (40). Emberben négy kimotripszin izoforma expresszálódik, a kimotripszinogén B1 (CTRB1), a kimotripszinogén B2 (CTRB2), a kimotripszinogén C (CTRC) és a kimotripszinszerű enzim 1 (CTRL1). Nagyobb mennyiségben az előbbi két izoforma termelődik, míg az utóbbi két izoforma csak kisebb mennyiségben expresszálódik. A CTRB1 és CTRB2 szerepe főként a táplálékfehérjék emésztésében van. A CTRL1 szerepe még nem teljesen tisztázott, míg a CTRC valószínűleg nagyobb szerepet játszik egyes emésztőenzimek aktivitásának szabályozásában. A CTRC több speciális hasítóhelyen processzálja a tripszinogént, amely kritikus fontosságú az aktivitása szempontjából (41). Emellett a CTRC a karboxipeptidázok (CPA1, CPA2) aktivitását is szabályozza. A CTRC a proCPA1 és proCPA2 hatékony társaktivátora, mert megkönnyíti az aktivációs peptid disszociációját, így a karboxipeptidázok aktivációját. A CTRC a propeptid proteolízisén keresztül fejt ki hatását, amely csak triptikus aktiválás után válik hozzáférhetővé (42).

Az elasztázok a szerin endopeptidázok harmadik fő osztályába tartoznak. Zimogén formában termelődnek és tripszin által aktiválódnak. A humán hasnyálmirigy négy kimotripszin-szerű elasztáz izoformát (CELA2A, CELA2B, CELA3A, CELA3B) szekretál a hasnyálba. A fehérje és oligopeptid szubsztrátokat főként az alifás aminosav oldalláncok után emésztik (43,44).

2.2.3. A hasnyálmirigy emésztőenzimek aktivációja

Számos proteázra jellemző, hogy inaktív prekursor zimogénként szintetizálódik és szelektív peptidkötések hasításai által alakul át fiziológiásan aktív formába. Ezt a folyamatot zimogén aktivációnak nevezzük és ezen mechanizmus alapján működik a prekursor proteolitikus enzimek processzálása. A szekretált proteáz prekursorok egy aktivációs peptidet tartalmaznak a fehérjék N-terminális végén (45). Az aktivációs peptid hasítása limitált proteolízissel egy új N-terminálist generál, amely sóhidat képez egy Asp-oldallánccal, amely következtében kialakul a funkcionálisan aktív centrum (46). A hasnyálmirigy zimogének a bélbe kerülésüket követően aktiválódnak. A humán tripszinogén aktivációját a bél kefeszegélyében található enteropeptidáz indítja a nyolc aminosav hosszúságú aktivációs peptid lehasításával. A megjelenő aktív tripszin ezután képes autokatalitikusan aktiválni a többi tripszinogént. A tripszinnek fontos szerepe van a többi hasnyálmirigy zimogén proteolitikus aktiválásában (kimotripszinogének, proelasztázok, prokarboxipeptidázok és

profoszfolidázok) (45). Ezt a kétlépcsős folyamatot a hasnyálmirigyenzimek aktivációs kaszkádjának nevezzük (2. ábra).



2. ábra. A tripszin kaszkád

A humán hasnyálmirigy emésztőenzimek aktivációja a duodénumban történik, melynek során első lépésben a tripszinogén alakul át aktív tripszinné az enteropeptidáz, illetve a tripszin általi aktivációban. Ezt követően a tripszin aktiválja a további zimogéneket az aktivációs peptid hasításával.

Habár a tripszin képes az inaktív tripszinogént aktiválni, az enteropeptidáz kétezerszer hatékonyabban végzi ezt a folyamatot. Az enteropeptidáz két alegységből áll, az első egy tripszin-szerű katalitikus alegység, amely az aktivációs peptid lehasításáért felelős, míg a második alegység egy lizin klasztert tartalmaz, amely interakcióba lép az emlős tripszinogének aktivációs peptidjében található evolúciósan konzervált tetra-aszpartát motívummal és a membránhoz horgonyozza az enteropeptidázt. Ez utóbbi kötődés növeli az első alegység katalitikus hatékonyságát. Az enteropeptidáz kimagaslóan specifikus, mivel az egyetlen fiziológiai szubsztrátja a tripszinogén. Az enzim 6-9 közötti pH értéken működik a leghatékonyabban és az epesavak alacsony koncentrációban növelik az aktivitását. Nem gátolható fehérjetípusú tripszin inhibitorokkal (pl.: hasnyálmirigy tripszin inhibitor, szójabab inhibitor) (15).

A tripszinogénen kívül a többi hasnyálmirigy zimogén nem képes autoaktivációra, kis koncentrációjú tripszin esszenciális az aktivációjukhoz. Az aktivációs peptid hosszúsága eltérő a különböző zimogénekben, így a humán kimotripszinogénekben 13-15, a

proelasztázokban 11-12, a profoszfolidáz A2-ben 7, míg a prokarboxipeptidáz A és B esetében 94 aminosav hosszúságú. A limitált proteolízis során az aktivációs peptidek nem minden esetben emésztődnek le teljesen a zimogénekről, esetenként továbbra is az aktív enzimhez kötődnek diszulfid hídon keresztül (kimotripszin és elasztáz egyes izoformái) (15).

2.2.4. *Tripszinogén izoformák és jellemzőik*

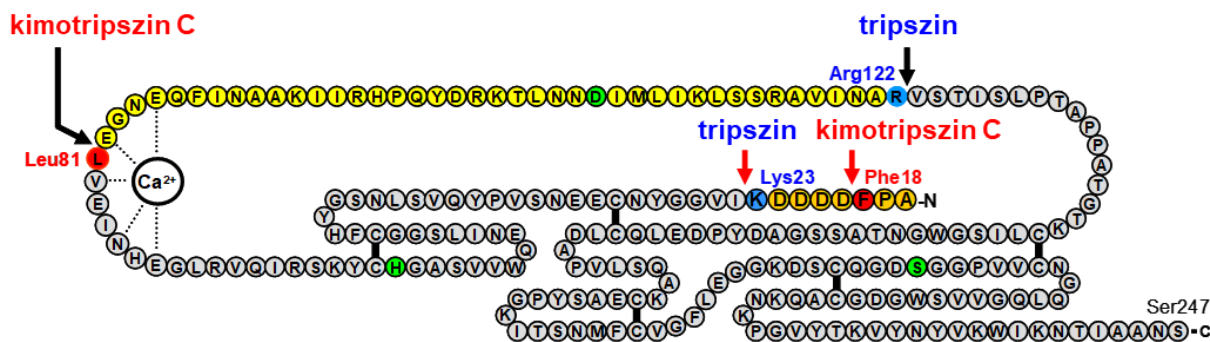
A tripszinek arginin és lizin aminosavak után hasítják a táplálékfehérjéket (47). A tripszinogének a szerin endopeptidázok kimotripszin szupercsaládjába tartoznak, így jellemző a hisztidin, aszpartát, szerin katalitikus triád jelenléte az aktív centrumban. A tripszinek kalcium iont képesek kötni és enyhén lúgos kémhatáson (pH 8,0) aktívak (48).

A humán hasnyálmirigy három tripszinogén izoformát szekretál, amelyek három különböző szerin proteáz (PRSS) gén által kódoltak: kationos tripszinogén (PRSS1), anionos tripszinogén (PRSS2) és mezotripszinogén (PRSS3). A PRSS3 gén alternatív promóterekkel rendelkezik, így megfigyelhető az alternatív splicing jelensége, ezáltal a hasnyálmirigyen kívüli szövetekben is expresszálódik (48).

A három izoforma közismertebb elnevezése az eltérő izoelektromos pontjukhoz köthető. A humán hasnyálat kétdimenziós izoelektromos fókuszálással vizsgálták, majd az eltérő izoelektromos pontjuk alapján nevezték el őket: a PRSS1 által kódolt tripszinogén-1 a kationos, a PRSS2 által kódolt tripszinogén-2 az anionos tripszinogén, míg a PRSS3 által kódolt tripszinogén-3 a mezotripszinogén, mivel izoelektromos pontja a kationos és az anionos izoforma izoelektromos pontja közé esik (49).

A kationos tripszinogén a legjelentősebb izoforma, ez alkotja a humán hasnyálmirigyben található összes tripszinogén kétharmadát, míg az anionos tripszinogén az egyharmadát. A mezotripszinogén minor izoformának tekinthető, mivel az összes tripszinogén mindössze 5 %-át teszi ki (48).

Az emlős tripszinogének többségével ellentétben a humán tripszinogének poszttranszlációs módosításon mennek keresztül a hasnyálmirigyben. Ez a poszttranszlációs módosítás egy O-szulfatálás a Tyr154 oldalláncon. A foszforilációval ellentétben a szulfatálás egy irreverzibilis poszttranszlációs módosítás, mivel az emlős szövetek nem rendelkeznek szulfatáz enzimmel (50). A tirozin szulfatálását membránkött tirozilprotein szulfotranszferáz izoformák (TPST1, TPST2) végzik a transz Golgi-apparátusban. A humán hasnyálmirigyben a TPST2 termelődik nagy mennyiségben (51). Mivel a Tyr154 része a tripszin szubsztrátkötő zsebének, a módosítás hatással van a szubsztrát, illetve az inhibitorok kötődésére és befolyásolja a proteáz szubsztrát preferenciáját is (52).



3. ábra. Proteolitikus hasítóhelyek a kationos tripszinogénben

Az ábra a kationos tripszinogén elsődleges szerkezetét mutatja. A kationos tripszinogén két CTRC hasítóhelyet tartalmaz, amelyek ellentétesen szabályozzák az aktivitását. Egyrészt a CTRC lehasít egy tripeptidet a tripszinogén N-terminálisáról. Az N-terminális processzálas következtében a tripszin hatékonyabban hasítja az aktivációs peptidet (Lys23), amely a kationos tripszinogén valamelyest gyorsabb autoaktivációját eredményezi. Emellett a CTRC a kalciumkötő hurokban (Leu81) is hasítja a tripszinogént, amely egy triptikus hasítás (Arg122) együttes eredményeként a tripszin jelentős degradációját és a maximális aktivitás csökkenését vonja maga után. Zhou és Sahin-Tóth ábrája alapján (53).

A CTRC két egymástól független mechanizmus által proteolitikusan szabályozza a kationos tripszinogén aktivációját. Egyrészt kismértékben stimulálja az autoaktivációját, másrészt jelentősen elősegíti a degradációját. Az autoaktiváció sebességének fokozása annak köszönhető, hogy a Phe18-Asp19 peptidkötés hasítása révén lehasít egy tripeptidet a nyolc aminosav hosszúságú aktivációs peptidről (3. ábra). A processzált aktivációs peptid ideálisabb szubsztrát a tripszin számára, ezáltal fokozott hasítást figyelhetünk meg, amely körülbelül négyszeres sebességnövekedést jelent az autoaktiváció tekintetében. Ez a hatás valószínűleg az aktivációs peptidben kialakuló tetra-Asp motívum és a kationos tripszinben előforduló Asp128 közötti elektrosztatikus kölcsönhatás mérséklésének köszönhető, amely korlátozza az autoaktivációt. Az aktivációs peptid processzálasának köszönhetően a CTRC növeli a vad típusú tripszinogén autoaktivációjának sebességét.

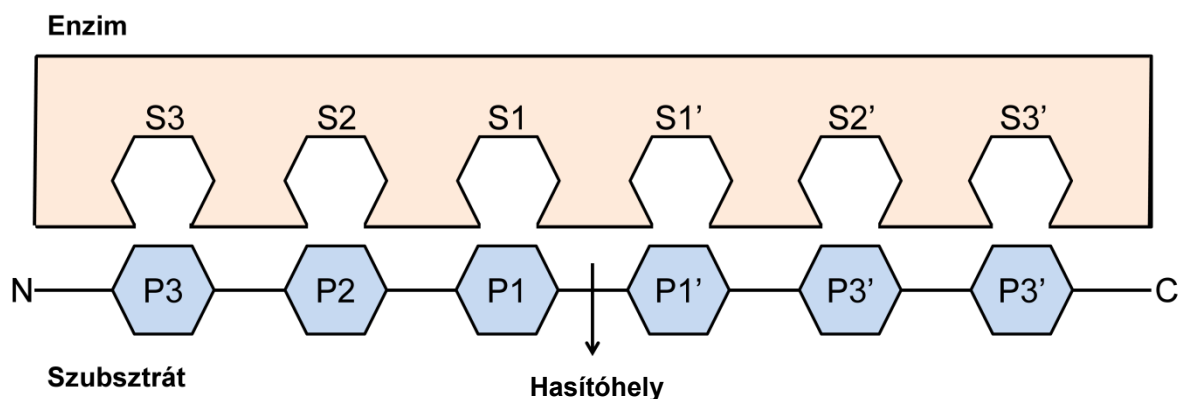
Másrészt a CTRC a tripszinogén kalciumkötő hurok régiójában található Leu81 aminosav után is hasít, amelyet egy autolitikus hasítás követ az Arg122 után, ez pedig a tripszin inaktivációját és degradációját eredményezi (3. ábra). A CTRC általi kalciumkötő hurokban történő hasítás nagyon specifikus, mivel a többi hasnyálmirigy proteáz egyike sem katalizálja ezt a reakciót (41).

A CTRC a kationos tripszinogéntől eltérően szabályozza az anionos tripszinogén aktivációját proteolitikus hasításokkal. Egyrészt az anionos tripszinogén aktivációs peptid processzálása CTRC-vel nem stimulálja a tripszinogén autoaktivációját. Másrészt az anionos tripszinogén CTRC általi lebontása hatékonyabb a kationos tripszinogén bontásánál. Ez utóbbi azzal magyarázható, hogy az anionos tripszinogén a kalciumkötő hurokban található Leu81 hasítóhelyen kívül egy további CTRC hasítóhelyet is tartalmaz az autolízis hurokban (Leu148). Ezen felül az anionos izoformában hiányzik a stabilizáló Cys139-Cys206 diszulfidkötés, amely fokozza a CTRC általi hasítás sebességét a könnyebben mozgó polipeptidláncnak köszönhetően (54).

2.2.5. Meotripszin

A többi hasnyálmirigy tripszinogénhez hasonlóan a meotripszin is keresztülmegy egy proteolitikus aktiváción, amelyet az enteropeptidáz katalizál a duodénumban (55). A meotripszin magasfokú szekvencia azonosságot mutat a két fő tripszin izoformával, amelyek 96 %-ban megegyeznek egymással, míg a meotripszin 88-89%-ban egyezik meg a kationos és anionos tripszinnel.

A fő tripszin izoformáktól eltérően a meotripszin szerkezete módosult az evolúció során. Ezek a módosítások az enzim funkcionális sajátosságainak változását eredményezték. A legszembeötlőbb eltérés, hogy a szerin proteázok esetében evolúciósan konzervált Gly198 arginin aminosav oldalláncra cserélődött a meotripszinben. Szerkezeti tanulmányok rávilágítottak, hogy az Arg198 pozitív töltésű elektrosztatikus felületet hoz létre a proteáz szubsztrátkötő helyének S2' pozíciójában a Schechter-Berger nevezéktan alapján (4. ábra). Fehérje szerkezeti modellezés azt mutatta, hogy sztérikus ütközés, esetenként elektrosztatikus taszítás figyelhető meg a meotripszin Arg198 aminosav és a tripszin inhibitorok, illetve szubsztrátok P2' aminosavai között. Az Arg198 jelentős szerkezeti deformációjára lenne szükség, hogy lehetővé tegye a szubsztrátok és az inhibitorok megkötését. Valószínűleg ennek a jelenségnek köszönhető, hogy az aminosavcsere több nagyságrenddel csökkenti a meotripszin peptid szubsztrátok és inhibitorok iránti affinitását a két fő izoformához viszonyítva. Ezért a meotripszin egyedülállóan ellenálló számos kisméretű fehérje típusú szerin proteáz inhibitor gátlásával szemben, viszont nem hatékony a szubsztrátokban megtalálható triptikus hasítóhelyek processzálásában, illetve autoaktivációra és más hasnyálmirigy zimogének aktiválására sem képes (48,56,57).



4. ábra. Proteázok szubsztrátkötő helyének nevezéktana

A Schechter és Berger nevezéktan (58) alapján definiálhatók a proteáz aktív centrumában olyan aminosav oldalláncok, amelyek részt vesznek a polipeptid szubsztrátlánc megkötésében. A számozás a hasítandó peptidkötéstől indul. A szubsztrát aminosav pozíciók számozása N-terminális irányba P1-Pn, míg C-terminális irányba P1'-Pn' számozás szerint történik. Az enzim szubsztrátkötő alhelyeit N-terminális irányba S1-Sn, valamint ellenkező irányba S1'-Sn'-ként jelöljük. A mezotripszinogénben az S2' helyen történt egy Gly-Arg evolúciós mutáció, amely befolyásolja az enzim működését.

A mezotripszin egyik legérdekesebb funkcionális jellemzője, hogy a többi tripszin izoformával ellentétben nem gátolható polipeptid tripszin inhibitorokkal. Ez a rezisztencia kulcsfontosságú lehet biológiai szerepe szempontjából. Noha a mezotripszin csak kis mennyiségben expresszálódik, egyedülálló szerepet tölthet be az emésztésben az étkezési tripszin inhibitorok bontása révén (57). A mezotripszin gyorsan inaktíválja a Kunitz-típusú inhibitorokat a reaktív helyen megtalálható peptidkötés hasítása révén és bontja a Kazal-típusú inhibitorokat. Ez a funkció magyarázatot adhat a mezotripszin más, nem specifikus emésztőenzimokkal szembeni alacsony szelekciós szintjére. Elképzelhető, hogy más emésztő proteázokkal együttesen fejti ki hatását, amelyek a részlegesen emésztett inhibitorokat degradálják. Ismert példa a karboxipeptidáz B, amely a reaktív hely hidrolízise után generált C-terminális lizint és arginint hasítja, ezzel inaktíválva a tripszin inhibitorokat (56).

A mezotripszinogén koncentrációja emelkedett krónikus alkoholizmus esetén és csökkent a hasnyálmirigy-gyulladásban szenvedő betegekben. Ezen megállapítások felvetik a kérdést, hogy a mezotripszin inhibitor-rezisztens aktiválása szerepet játszhat-e a hasnyálmirigyet érintő betegségek patogenezisében (49).

2.2.6. *Proteáz inhibitorok*

A proteázok szövetkárosító hatása jól ismert, ezért élő rendszerekben számos olyan mechanizmus fejlődött ki, amelyek arra hivatottak, hogy szabályozzák a proteázok aktivitását és koncentrációját. Ezen mechanizmusok között kiemelkedő jelentőségű az endogén fehérjetermészetű inhibitorok jelenléte, amelyek komplexeket alakítanak ki a proteázokkal. A proteáz/inhibitor egyensúly fenntartása kritikus fontosságú. Az egyensúly felborulása számos patológiás következményt vonhat maga után. Az egyensúly megtartásában lényeges a fehérje természetű proteáz inhibitorok proteázokkal szembeni rezisztenciája. Számos inhibitor kivételesen stabil a proteolízis tekintetében, ugyanakkor sok esetben inaktiválhatóak azokkal a proteázokkal, amelyeket gátolnak vagy más proteázok által, amelyek működését nem befolyásolják. A fertőző mikroorganizmusok szintén termelhetnek olyan proteázokat, amelyek megzavarhatják a humán szövetek proteáz/inhibitor egyensúlyát a humán proteáz inhibitorok szelektív bontása vagy inaktivációja által (59).

Az emberi szervezetben a proteázok legnagyobb családját a szerin proteázok alkotják. Több mint száz enzim tartozik ehhez a családhoz, köztük az emésztőenzimek (tripszinek, kimotripszinek, elasztázok), véralkadási enzimek, fibrinolízis, kallikrein és a komplement rendszer proteázai és számos membránasszociált jelátviteli fehérje is. Ezeket az enzimeket aspecifikus inhibitorok szabályozzák, többek között a szerpinek. A szerpinek nagy molekulású fehérjék, amelyek kovalens kötéseket alakítanak ki a proteázokkal, ezáltal csapdába ejtik őket. Ezzel szemben a kanonikus proteáz inhibitorok (pl.: Kazal-típusú inhibitorok) kis molekulású fehérjék és szorosan, de reverzibilisen kötődnek a proteázokhoz. A kanonikus inhibitorok szubsztrátszerű módon kötődnek az enzimek aktív centrumához. Azonban az inhibitoros hurok több nagyságrenddel szorosabban kötődik és lassabban hasad, mint a közönséges polipeptid szubsztrátok (60). Az egyik legismertebb kanonikus inhibitor család a Kunitz-BPTI család, amelynek egy archetípusa a marha hasnyálmirigy tripszin inhibitor (BPTI), egy kisméretű kompakt fehérje, amely hatvan aminosavból áll és hidrofób maggal rendelkezik (59).

A Kazal-típusú szerin proteáz inhibitor 1 (SPINK1) egy 6,2 kDa molekulású tripszin inhibitor, amelyet a humán hasnyálmirigy acinus sejtjei termelnek és szekretálnak. A SPINK1 gén egy 79 aminosav hosszúságú fehérjét kódol, amely egy 23 aminosav hosszúságú szignál peptidet tartalmaz az aktív fehérjerész mellett (61). A tripszinogén autoaktivációja során az újonnan generált tripszin komplexet képez a SPINK1-el, ezáltal nem képes katalizálni további tripszinogének aktivációját. A tripszin lassan emésztí a SPINK1 kanonikus hurok régióját, amely további triptikus hasítással társulva lebontja az inhibitorot. A SPINK1 kis mennyiségben

termelődik, ezáltal szerepe a tripszinogén autoaktiváció késleltetése lehet. Ez a folyamat nagyon fontos, hiszen ez idő alatt az inaktív emésztőenzimek a hasnyálmirigyből a duodénumba jutnak (62,63).

2.3. Krónikus hasnyálmirigy-gyulladás

A krónikus hasnyálmirigy-gyulladás a hasnyálmirigy progresszív és irreverzibilis destrukciója, amely endokrin és exokrin funkcióvesztéssel járhat (64). Az akut és krónikus hasnyálmirigy-gyulladás alapvetően különbözik egymástól, mivel az előbbit a kórházi ellátás utáni tökéletes felépülés jellemzi. A visszatérő akut hasnyálmirigy-gyulladás krónikus gyulladássá alakulhat (65). A betegség során epizodikus gyulladások jelentkeznek, amelyek végül szövetelhaláshoz vezetnek, majd a szekretórikus parenchima sejtek helyét fibrózus kötőszövet veszi át (66). Ennek köszönhetően tünetei közé tartozik a hasi fájdalom, a hasnyálmirigy kalcifikáció, felszívódási zavarok, alultápláltság, diabetes mellitus (67). Az emésztési zavarok az exokrin hasnyálmirigy-elégtelenséghez köthetők, amelyet a hasnyálmirigy által termelt emésztőenzimek hiánya okoz. A diabetes mellitus kialakulása pedig legfőképpen a Langerhans-szigetek elvesztésének tulajdonítható (68). A betegség előrehaladása további szövődményekkel járhat: pseudociszták, hasnyálmirigy-szűkület, nyombélszűkület, érrendszeri szövődmények, az epevezetékek összenyomódása (69). A krónikus gyulladás és a fibrózis visszafordíthatatlan, mert a diagnózis többnyire a betegség előrehaladott állapotában történik. A krónikus hasnyálmirigy-gyulladás hosszútávú fennállása esetén megnövekszik a hasnyálmirigyrák kialakulásának kockázata (70). A krónikus hasnyálmirigy-gyulladás kezelése nehéz, mert nem minden beteg esetében jelentkezik exokrin és endokrin elégtelenség vagy egyéb tünetek a betegség korai fázisában. A korai fázist epizodikus fájdalom jellemzi, amelyet akut hasnyálmirigy-gyulladásaként diagnosztizálhatnak. Idővel a fájdalom perzisztenssé és súlyossá válik. A krónikus hasnyálmirigy-gyulladás, illetve az exokrin és endokrin elégtelenség kialakulását képalkotó eljárásokkal lehet igazolni. Ez a folyamat akár évekig is eltarthat. Jelenleg nem létezik hatékony terápia a szindróma visszafordítására és a betegség előrehaladásának megállítására. A kezelések a tünetek enyhítését szolgálják. Mivel a betegség sokszor eltérő tényezők miatt alakul ki, személyre szabott tüneti kezelésre van szükség (71).

A betegség kialakulásában szerepet játszanak környezeti hatások és genetikai rizikófaktorok. A környezeti hatások közül a legrelevánsabbak az alkoholfüggőség és a dohányzás. Az alkoholizmus exponenciálisan növeli a betegség kialakulásának esélyét. Az alkoholfüggőség és a dohányzás gyakran együtt jelenlévő környezeti tényezők, azonban a

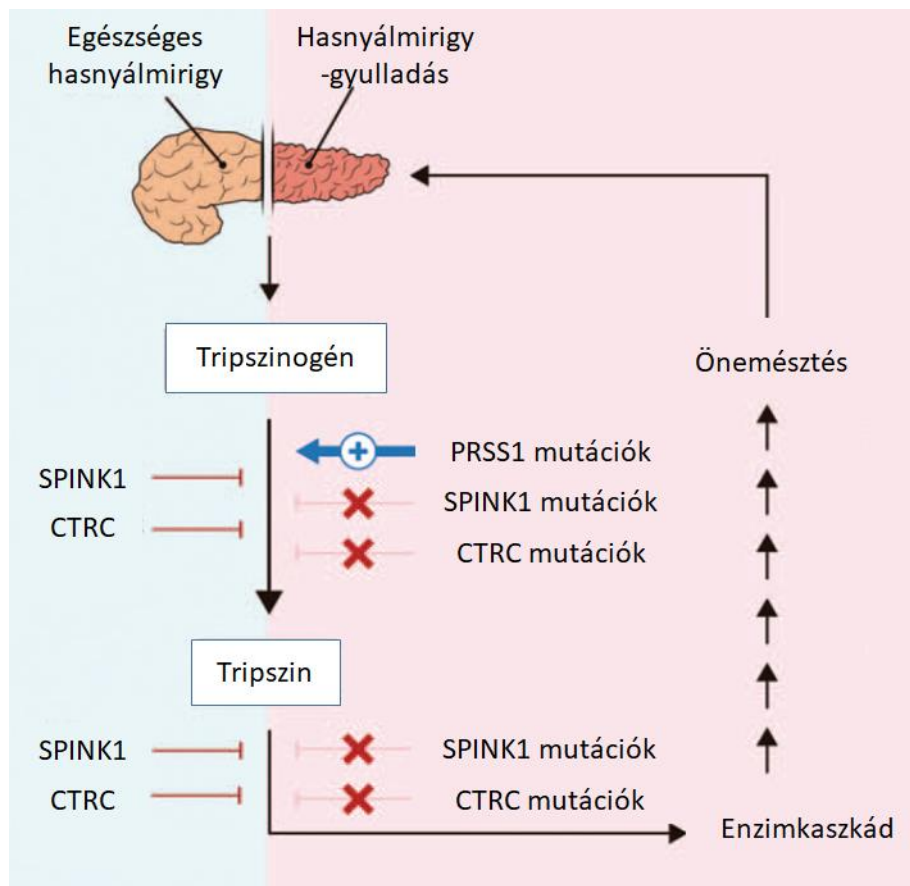
dohányzás független rizikófaktornak is tekinthető. Ezen felül nem csak a krónikus hasnyálmirigy-gyulladás, hanem a hasnyálmirigyrák kockázatát is növeli (72). Habár az alkoholfüggőség és a dohányzás a leglényegesebb rizikófaktorok, a betegség kialakulásának kiváltó oka nem csak egy rizikófaktor, hanem ezek együttes megléte szerepel (73). A környezeti hatások mellett genetikai rizikófaktorokat is azonosítottak. Ezek hasnyálmirigy-gyulladás esetében komplexek, egy vagy több gén polimorfizmusával függhetnek össze (74).

2.3.1. *Tripszin-függő út*

A kationos tripszinogén az első genetikai faktor, amelyet krónikus hasnyálmirigy-gyulladásban azonosítottak. 1996-ban fedezték fel a PRSS1 gén R122H mutációját, amely autoszomális domináns öröklésmenetet mutat és szorosan asszociált a krónikus hasnyálmirigy-gyulladással. Azóta számos mutációt azonosítottak a hasnyálmirigy emésztőenzimek és a SPINK1 inhibitor génjében. Ezek a mutációk növelik a krónikus hasnyálmirigy-gyulladás kialakulásának kockázatát. A legjelentősebb gének, amelyek a hasnyálmirigyen belüli tripszin aktivitás szabályozásához vagy a duktális folyadékáramlás csökkenéséhez kapcsolódnak. Így a tripszinogén, a SPINK1, cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor és a CTRC gének mutációi tekinthetők a legfontosabb rizikófaktoroknak (75,76). Az örökletes krónikus hasnyálmirigy-gyulladást a kationos tripszinogén (PRSS1) génjében azonosították, de vannak olyan hasnyálmirigy által termelt emésztőenzimek, amelyek génjében nem alakul ki családi halmozódás, hanem sporadikusan fordulnak elő (CTRC, SPINK1) (5. ábra).

Állatmodelleken végzett kísérletek arra engednek következtetni, hogy a hasnyálmirigy acinus sejtjein belüli korai tripszin aktiváció a hasnyálmirigy-gyulladás kezdeti eseményei közé tartozik. Ez a folyamat elősegíti a zimogén granulumok és a lizoszómák kolokalizációját, ezáltal a tripszinogén hozzáférhetővé válik a lizoszomális katepszin B számára, amely savas pH-n is képes a tripszinogén aktiválására (77).

Az örökletes hasnyálmirigy-gyulladás nagyon ritka genetikai eltérés, amely visszatérő akut hasnyálmirigy-gyulladással és krónikus hasnyálmirigy-gyulladással társul. A betegséget a kationos tripszinogén génben található mutációk (pl. N29I és R122H) okozzák (78). Ez a felfedezés megerősítette a tripszin kritikus szerepét a krónikus hasnyálmirigy-gyulladás patogenezisében. Számos genetikai és funkcionális tanulmány megerősítette a tripszin központi szerepét a betegség kialakulásában. Ezt az utat az örökletes krónikus hasnyálmirigy-gyulladás tripszin-függő patológiai útvonalának nevezzük. A modell azon alapul, hogy a hasnyálmirigyen belüli megnövekedett aktív tripszin koncentráció hozzájárul a betegség kialakulásához és progressziójához.



5. ábra. A tripszin-függő út

A hasnyálmirigy-gyulladásban szerepet játszó genetikai rizikófaktorok között kiemelkedő jelentőségűek a tripszin aktivációjában és gátlásában szerepet játszó enzimek, ezért ezt az útvonalat tripszin-függő útnak nevezzük. Fiziológias körülmények között a tripszinogén aktivációja gátolt a hasnyálmirigyen belül. Egyrészt a *SPINK1* reverzibilis, kompetitív tripszin inhibitornak köszönhetően, amely késlelteti a tripszin aktivációját, másrészt a *CTRC* a tripszinnel együttműködve képes lebontani a már felaktiválódott tripszint. A *PRSS1* funkciónyerő mutációi, illetve a *SPINK1* és a *CTRC* funkcióvesztő mutációi ahhoz vezetnek, hogy a tripszinogén aktivitás megnő a hasnyálmirigyen belül. Ez az enzimkaskád elindításához és a hasnyálmirigy szövetek emésztéséhez vezethet. Ezen folyamatok összessége megnöveli a hasnyálmirigy-gyulladás kialakulásának kockázatát. Módosítva Dytz és mtsai. ábrája alapján (79).

Ahogy előzőleg ismertettük, a tripszin egy inaktív prekursor molekulaként szintetizálódik, amely egy 8 aminosav hosszúságú N-terminális aktivációs peptidet tartalmaz. Az aktivációs peptid limitált proteolízissel lehasad, amely a tripszinogén tripszinné alakulását eredményezi. Fiziológias esetben ezért a folyamatért a szerin proteáz enteropeptidáz felelős a duodénumban. A kationos tripszinogén egyes mutációi gyorsítják az autoaktivációt, amely

korai tripszin aktivációhoz vezethet a hasnyálmirigyen belül. A korai tripszin aktiváció a szerv önmérsztését és krónikus hasnyálmirigy-gyulladás kialakulását eredményezheti (80).

A SPINK1 védi a hasnyálmirigyet a korai tripszinogén aktivációtól. A SPINK1 gén funkcióvesztéses mutációi az inhibitor csökkent gátló hatását eredményezik, ezáltal növelik a hasnyálmirigy-gyulladás kialakulásának kockázatát. Ezek a mutációk összességében csökkentik a funkcionális SPINK1 mennyiségét, azáltal, hogy lassítják vagy megakadályozzák a SPINK1 expresszióját, mRNS érését, transzlációját, a natív fehérjeszerkezet elérését, szekrécióját, illetve a hatékony tripszingátlást (81).

A CTRC a tripszinogén aktivitását a fent említett módon szabályozza. Növeli a kationos tripszinogén autoaktivációját, illetve a degradáció sebességét, a CTRC és a tripszin összehangolt hasításait követően. A CTRC általi degradáció aktív tripszint igényel, amely a kimotripszinogént aktív kimotripszin C-vé alakítja (62). A kationos tripszinogénnel ellentétben az anionos tripszinogén több CTRC hasítóhelyet tartalmaz, amely sokkal hatékonyabb degradációt eredményez. Ez magyarázatul szolgálhat arra, hogy nem azonosítottak krónikus hasnyálmirigy-gyuladást okozó PRSS2 mutációkat (54).

A kezdeti aktivitás fokozott, ha az aktivációs peptid vagy az N-terminális régió olyan mutációt tartalmaz, ami stimulálja az N-terminális processzálást. Ez a jelenség figyelhető meg az A16V mutáció esetében, ami növeli a kationos tripszinogén N-terminális processzálását, ezáltal megnövekszik az aktív tripszin koncentráció. Ehhez hasonló jelenséget figyelhetünk meg a N29I mutáció esetén is (62,82).

A CTRC funkcióvesztéses mutációi számos hatásmechanizmuson keresztül kifejtetik negatív hatásukat, ha nem kielégítő a CTRC általi tripszin degradáció. Ezek között szerepet játszhat a CTRC csökkent expressziója, a tripszin általi aktiválás rezisztenciája, defektív katalitikus aktivitás vagy tripszin degradáció (62).

Összegzésként elmondható, hogy az örökletes krónikus hasnyálmirigy-gyuladást a kationos tripszinogén autoaktivációjának szabályozási hibája okozza. Azok a PRSS1 mutációk, amelyek stimulálják a kationos tripszinogén autoaktivációját a CTRC érzékeny és tripszin érzékeny szabályozó hasítások megváltoztatásával (többek között: R122H, N29I, R122C, N29T, V39A) megakadályozzák a tripszin CTRC általi degradációját a Leu81-nél vagy gyorsítják a tripszinogén N-terminális processzálását. A tripszin-függő út azokat a mutációkat foglalja magába, amelyek végső soron megnövekedett tripszinogén aktivációt eredményeznek a hasnyálmirigyen belül. PRSS1 funkciónyerő mutációi direkt és indirekt stimulálhatják a tripszinogén autoaktivációját (83).

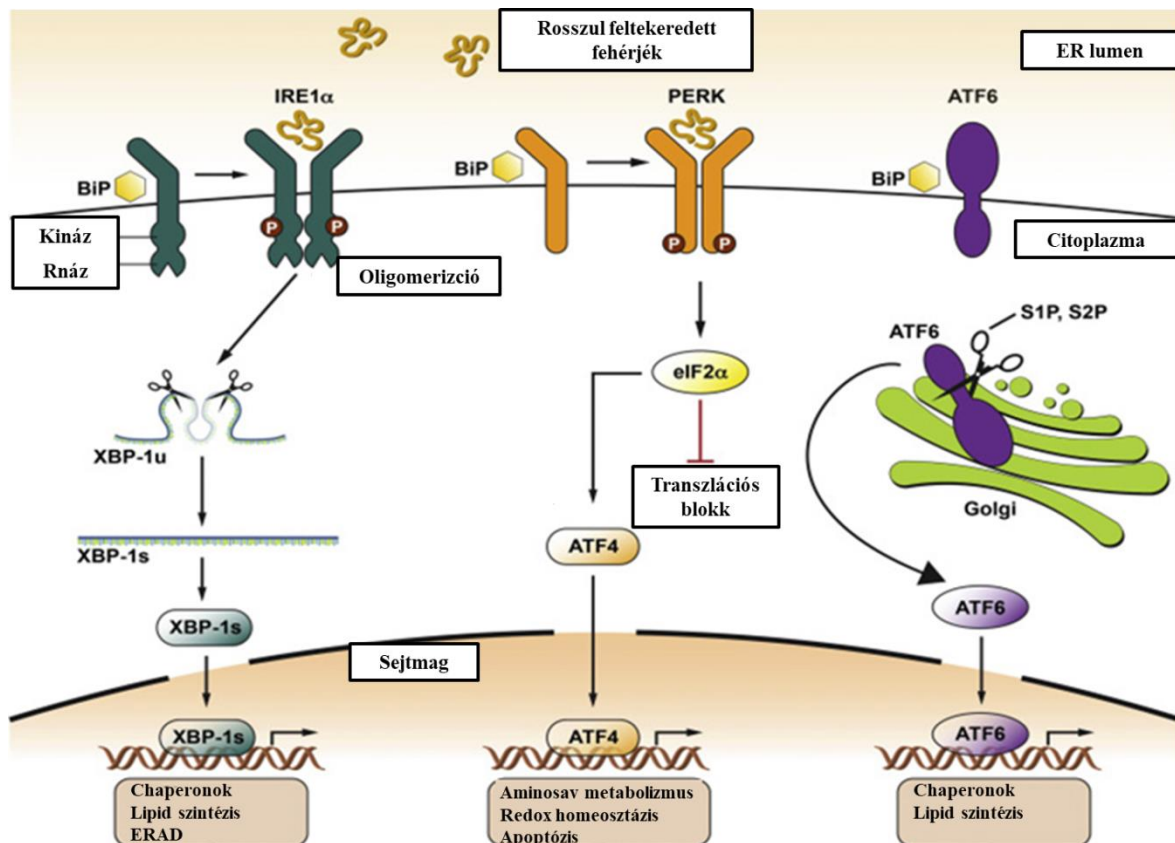
2.3.2. *Tripszin-független útvonal*

Annak érdekében, hogy a hasnyálmirigy acinus sejtek eleget tegyenek a nagy mennyiségű emésztőenzim termelésnek és szekréciónak, kiterjedt ER hálózattal rendelkeznek, amely szabályozza a fehérjék helyes feltekeredését és szállítását egy szekréción útvonalon keresztül. Számos dajkafehérje és foldáz asszisztálja a fehérjék feltekeredését az ER-en belül. Ezt követően egy minőségellenőrző rendszer bizonyosodik meg a fehérjék helyes feltekeredéséről. Ellenkező esetben elősegítik a rosszul feltekeredett fehérjék degradációját. Ezt a folyamatot ER-asszociált fehérje degradációnak (ERAD) nevezzük. Bármilyen kóros elváltozás az ER környezetében (oxidatív stressz, az ER fehérje folding kapacitásának túlterhelése, mutáns fehérjék jelenléte) a fehérjék hibás feltekeredéséhez vezethet, amely előidézheti a fehérjék visszatartását, végül az ER stresszt. Az ER stressz fontos szerepet játszik számos betegség progressziójában, többek közt a diabetesben, kardiovaszkuláris betegségekben, neurodegeneratív elváltozásokban, bélrendszeri gyulladásban és alkoholos májbetegségben. Az ER stressz válaszokat együttesen „selejt fehérje válasznak” (unfolded protein response, UPR) nevezzük (6. ábra) (84).

Az UPR az ER-ben jelenlévő körülményeket monitorozza. Érzékeli az ER fehérje feltekerő kapacitását, ezáltal képes kezelni a helytelen feltekeredést és kommunikációval továbbítja ezt az információt az ER lumenből a sejtmagba, génexpressziós szintre is. Az UPR az ER kiterjesztése érdekében megnöveli az ER membránt felépítő lipidek és fehérjék szintézisét, illetve a dajkafehérjék és foldázok expresszióját. Az ER-ben jelen van egy magas szintű minőség-ellenőrző rendszer annak érdekében, hogy kizárólag a helyesen feltekeredett fehérjék kerüljenek az ER vezikulákba és a szekréción útvonalba (85).

Egyes humán kationos tripszinogénben előforduló ritka aminosavcserével járó mutációk ER stresszhez vezetnek az acinus sejtekben, amely krónikus hasnyálmirigy-gyulladást eredményezhet (86-88). Három egymással párhuzamosan működő jelátviteli útvonalat különböztethetünk meg, amelyek központi transzmembrán fehérjéken keresztül fejtik ki hatásukat: IRE1, PERK, ATF6 (89).

Ezek a membránfehérjék a luminális környezetet érzékelik, ezzel információt nyernek a rosszul feltekeredett fehérjék hiányáról vagy meglétéről. A BiP egy általános dajkafehérje, amely a rosszul feltekeredett fehérjékhez, illetve a transzmembrán fehérjékhez (IRE1, PERK, ATF6) kapcsolódik. Amikor megnövekszik a rosszul feltekeredett fehérjék mennyisége az UPR receptorok (IRE1, PERK, ATF6) és a rosszul feltekeredett fehérjék versengenek a BiP kötésért, ezáltal megszüntetik a BiP csendesítő hatását és a szenzorok aktiválódnak (90-92).



6. ábra. Az endoplazmatikus retikulum (ER) stresszválasz

Különböző környezeti, illetve genetikai faktorok jelenlétekor a sejtekben megnövekedhet a rosszul feltekeredett fehérjék mennyisége, amely három jelátviteli útvonalat aktivál, az IRE1 α , PERK és ATF6, ER membránköti fehérjéken keresztül. Mind a három útvonal transzkripciós faktorok aktiválásán és génexpressziós változásokon keresztül fejt ki hatását. A folyamat végeredményeként megnő a dajkafhérjék és az ERAD fehérjék expressziójának mértéke, a lipid és aminosav szintézisben részt vevő fehérjék mennyisége. Ezek a fehérjék arra hivatottak, hogy kiküszöböljék a stresszválaszt és helyreállítsák az ER fiziológiai körülményeit. Abban az esetben, ha továbbra is fennáll az ER stressz, sejtpusztulás és gyulladás is kialakulhat. Oakes ábrája alapján módosítva (93).

Az IRE1 (Inositol-requiring enzyme 1) aktivációja során homodimerizálódik, majd autofoszforylációt követően egy specifikus RNáz aktiválódik. Az IRE1 RNáz hasítja az XBP1 mRNS-t. A splicing során kihasítódik egy 26 nukleotid hosszúságú intron az eredeti hosszúságú mRNS-ből. Az érett mRNS transzlációját követően egy transzkripciós faktor íródik át, amely a sejtmagba transzlokálódik (90-92). Az XBP1 transzkripciós faktor a sejtmagban az ER stressz elemekhez (ERSE) és az UPR elemekhez (UPRE) transzkripciós faktor kötőhelyekhez kapcsolódik és felerősíti számos UPR célgén expresszióját, többek között a nem érett XBP1 gént. Az XBP1 expresszió növekedése ahhoz vezet, hogy még több érett XBP1 transzkripciós faktor íródik át, ezzel fokozva a védelmi reakciót. Az IRE1/XBP1

útvonal ezen felül dajkafehérjék és foldázok (többek között a protein diszulfid izomeráz) expresszióját is fokozzák, illetve olyan enzimeket, amelyek a lipid szintézishez szükségesek, ezáltal az ER membrán kiterjeszthető, így nő az ER kapacitása. Az XBP1 transzkripciós faktorai között megtalálhatók az ERAD komponensei is (94). Az IRE1/XBP1 útvonal egy adaptív válasz annak érdekében, hogy megmaradjon az ER folding kapacitása és elindítsa a rosszul feltekeredett fehérjék lebontását (84).

Az ATF6 egy másik ER transzmembrán fehérje, amelynek C-terminális doménje érzékeli az ER stresszt, míg a citoplazmatikus N-terminális doménje egy DNS transzkripciós aktivátor domént tartalmaz. Az ATF6 a Golgi apparátusba transzportálódik, ha megszűnik az ATF6 és a BiP közötti kötődés, ahol transzkripciós faktorrá processzálódik. Működése során fokozza az XBP1 transzkripciós faktor és más UPR célgének expresszióját (95).

A PERK kulcsszerepet játszik az ER stresszhez való alkalmazkodásban, mivel csökkenti a fehérjeszintézist. Az aktivált PERK autofoszforylációon megy keresztül, majd foszforylálja az eIF2 α α -alegységét (95,96). Az eIF2 α nem foszforylált formában GTP-t köt és esszenciális a transláció iniciációja szempontjából. Az α -alegység foszforylációja blokkolja a transláció iniciációját, ami a fehérjeszintézis gátlásához vezet (97).

Az UPR képes sejthalált indukálni folyamatosan fennálló súlyos ER stresszt követően, amikor az adaptív válasz kiterjedt és/vagy az UPR nem képes kijavítani az ER stresszt. Az aktivált PERK az eIF2 α foszforylációján kívül fokozza az ATF transzkripciós faktor translációját, amely célgénjei között olyan gének szerepelnek, amelyek szerepet játszanak a sejten belüli redox állapot és glutation szintézisében. Míg az átmeneti PERK aktiválás enyhíti az ER stresszt, a hosszantartó PERK aktiváció a fehérjetermelés tartós blokádjához vezethet, amely kiváltja a C/EBP homológ fehérje (CHOP) expresszióját, ez pedig végül az apoptotikus választ.

A környezeti stresszorok mellett léteznek olyan genetikai stresszorok, amelyek jelenléte kiválthatja az UPR útvonal aktivációját. Ilyen stresszornak tekinthetők a fő proteáz emésztőenzimek mutációi, amelyek krónikus hasnyálmirigy-gyulladással asszociáltak (85). Mutációk a humán kationos tripszinogénben ER stresszt indukálhatnak a hasnyálmirigy acinus sejtekben, amely a sejtek pusztulásához és krónikus pancreatitis kialakulásához vezethet (86).

Egyes mutációk következménye lehet a fehérjék helytelen feltekeredése, amely szekréciós defektussal és lebomlással járhat. Ez az útvonal egy alternatív mechanizmusnak tekinthető, amely nem kapcsolódik a tripszinogén aktiválásához és a tripszin aktivitáshoz. A fehérjék helytelen feltekeredése ER stresszt indukálhat, amely asszociálódhat a hasnyálmirigy gyulladásos megbetegedésével. Számos kationos tripszinogén mutációt azonosítottak

szórványosan előforduló krónikus hasnyálmirigy-gyulladásos betegekben: R116C, D100H, C139F, K29N, S124F, G208A (98).

Több olyan mutációt is kimutattak, amelyek *in vitro* a fehérjék rossz feltekeredésén keresztül ER stresszt indukálnak. A leggyakoribb CPA1 variáns az N256K, amely a fehérje helytelen feltekeredése miatt felhalmozódott a sejten belül, majd ER stressz választ (megnövekedett BiP és XBP1 splicing), illetve apoptózist (CHOP) váltott ki (99).

Számos bizonyíték utal arra, hogy a hasnyálmirigy acinus sejtek sérülésre adott válasza több útvonalon keresztül történik és nem kizárólag a tripszin aktivációt érintő változásoknak tulajdonítható. Klinikai esetek alátámasztották, hogy egyes krónikus hasnyálmirigy-gyulladásban szenvedő betegek olyan emésztőenzim mutációkat hordoznak, amelyeknek nincs szerepe a tripszinogén aktivációban, sem pedig a degradációban, többek közt a karboxil-észter lipáz (CEL). A CEL VNTR szekvenciájában bekövetkező változások hasnyálmirigy betegséget okozhatnak. Egyes mutációk a CEL-ben UPR-t, ER stresszt indukálnak, illetve aktiválják az NF κ B útvonalat és a mirigysejtek sejthalálát. A mutáns CEL fehérje ER stresszt okozott, amely valószínűleg egy adaptív és védő mechanizmus. Az apoptózis védő válaszként szolgálhat, amennyiben csökkenti a sejt-sérülés súlyosságát a sérült sejtek eltávolításával jelentős gyulladás kiváltása nélkül (100).

Az idiopátiás krónikus hasnyálmirigy-gyulladás gyakran több mutációval, számos rizikógén jelenlétével asszociálódik. Számos olyan gén ismert, amelyek szabályozzák a tripszin autoaktivációját. Ezek a gének további rizikófaktorokat jelentenek a betegség kialakulása szempontjából. A CTRC-ben előforduló mutációk, amelyek csökkentik a szekréciót, illetve az enzim aktivitását szintén rizikófaktorok tekinthetők. Számos CTRC mutációt leírtak, amely a kódoló régióban található és a hatása nem elhanyagolható (misszensz, nonszensz, kereteltolódással járó). Az A73T mutáns ER stresszt indukál a mirigy sejtekben. Az eredmények azt demonstrálják, hogy a CTRC variánsok csökkent CTRC funkciót okozhatnak egy vagy több mechanizmuson keresztül: csökkent szekréció, katalitikus defektus, megnövekedett tripszin degradáció (101). Fontos megjegyezni, hogy mind a CTRC, mind a SPINK1 kis mennyiségben termelődnek, így a rosszul feltekeredett fehérjék mennyisége csak kismértékű ER stressz kiváltását okozza, amelyet valószínűleg a sejtek képesek kezelni. Valószínűleg a mutációk megléte nem elegendő a betegség kiváltásához, de jelenlétük növelheti a betegség kialakulásának kockázatát.

Lipáz hiányában azonosítottak egy homozigóta mutációt (T221M) egy testvérpárban. A betegeknek exokrin hasnyálmirigy elégtelenségük is volt, ami felvetette, hogy egyúttal hasnyálmirigy-gyulladásuk van. A Thr221 egy evolúciósan konzervált β 9 hurokban található aminosav a lipáz szekvenciában és együttműködik a PNLIP aktív centrumával. A szerkezeti

modellezés azt mutatta, hogy a lipáz valószínűleg katalitikusan defektív. Funkcionális vizsgálatok azonban kimutatták, hogy a mutáció hibás feltekeredést okoz, ami szekréciós defektust és ER stressz kialakulását eredményezi. A csökkent PNLIP szekréció magyarázza a lipáz hiányt, az ER stressz pedig az exokrin pancreas elégtelenséget és növelheti a krónikus hasnyálmirigy-gyulladás kialakulásának kockázatát (102).

2.3.3. Alternatív patológiás útvonalak

Egy közelmúltban megjelent tanulmány egy lehetséges eddig ismeretlen útvonalról tesz említést egyes ritka heterozigóta PNLIP mutációkkal kapcsolatban. A kutatók krónikus hasnyálmirigy-gyulladásos kohorszokban olyan hasnyálmirigy lipáz mutációkat azonosítottak, amelyek csökkentik a hasnyálmirigy lipáz proteolitikus stabilitását tripszin és kimotripszin emésztésével szemben. A fokozott PNLIP degradáció asszociálódott a betegséggel. A háttérben álló patológiás útvonal valószínűleg független a fokozott tripszin aktiválástól és ER stressz kialakulásától. Feltételezhető, hogy a PNLIP degradációja során toxikus fehérje fragmensek keletkeznek, amelyek a hasnyálmirigy-gyulladás kialakulásához vezetnek (103).

A kalcium-érzékelő receptor (CASR) egy G-fehérje kapcsolt receptor szupercsalád tagja. A humán hasnyálmirigy acinus és duktális sejtjeiben fejeződik ki és kulcsszerepet játszik a kalcium homeosztázisában. Mivel a hiperkalcémia a krónikus hasnyálmirigy-gyulladás egyik kockázati tényezője, a CASR gén mutációk kockázati tényezőnek tekinthetők a krónikus hasnyálmirigy-gyulladásban (104).

3. CÉLKITŰZÉS

A humán mezotripszinogén a tripszinogének minor izoformája, amely mindössze 5 %-a a teljes tripszinogén mennyiségnek. A fő tripszin izoformáktól eltérően a mezotripszin nem gátolható SPINK1 inhibitorral, sőt degradálni képes azt. Korábbi megfigyelések azt mutatták, hogy a kimotripszin C (CTRC) proteolitikusan szabályozza a tripszinogéneket. A CTRC hasításokkal megakadályozza a kationos és anionos tripszinogének aktivációját. Ezért azt feltételeztük, hogy a mezotripszinogén működését is befolyásolja.

Így az alábbi célokat tűztük ki a mezotripszinogén vizsgálata során:

- A mezotripszinben megtalálható CTRC hasítóhelyek azonosítása.
- Egy módosított mezotripszin (L81A-mezotripszin) létrehozása annak érdekében, hogy kizárólag az autolízis hurok régió proteolitikus hasításait vizsgáljuk.
- A kalcium védi a tripszineket a proteolitikus hasításokkal szemben így célunk volt, hogy megvizsgáljuk a kalcium hatását a CTRC általi mezotripszin hasítás tekintetében.
- A CTRC által hasított L81A-mezotripszin katalitikus tulajdonságainak meghatározása rövid peptid szubsztrátokon és nagyobb fehérje szubsztráton egyaránt.
- A CTRC által hasított mezotripszin inhibitor emésztő sajátosságainak vizsgálata.

A hasnyálmirigy-gyulladás kialakulásában szerepet játszó genetikai rizikófaktorok többféle útvonalon keresztül fejthetik ki kóros hatásukat. A két legjelentősebb útvonal a tripszin-függő és a tripszin-független útvonal. Ez utóbbi esetén a fehérjék helytelen feltekeredése figyelhető meg, amely végül endoplazmás retikulum (ER) stresszt indukálhat. Laboratóriumunk egy nemzetközi kollaboráció keretében számos ritka heterozigóta hasnyálmirigy lipáz (PNLIP) mutációt azonosított krónikus pancreatitis kohorszokban. Előzetes megfigyelések azt mutatták, hogy a talált 23 mutációból négy (A174P, G233E, C254R, V454F) szekréciós defektust okoz. Feltételeztük, hogy a nem-szekretálódó lipáz variánsok ER stresszt eredményeznek, amely hozzájárulhat a betegség kialakulásához.

Ezért kutatásunk során az alábbi célokat tűztük ki:

- Vad típusú és mutáns PNLIP expressziós plazmidok és adenovírus vektorok létrehozása.
- A PNLIP variánsok szekréciójának és intracelluláris retenciójának vizsgálata HEK 293T illetve AR42J patkány hasnyálmirigy sejtekben.
- A sejtben felhalmozódó hasnyálmirigy lipáz variánsok ER-stressz markerek (XBP1 mRNS érés, BiP expresszió) szintjére gyakorolt hatásának vizsgálata HEK 293T és AR42J sejtvonalon.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Általános módszerek

4.1.1. *Nomenklatúra*

A nukleotidok és az aminosavak számozása mind a mezotripszinogén mind a hasnyálmirigy lipáz esetében az elsődleges transzlációs termék első metioninjával (ATG) kezdődik.

4.1.2. *Anyagok*

A szójabab tripszin inhibitort (SBTI) a Sigma Aldrich-tól rendeltük, majd MonoQ anioncserélő kromatográfiával tisztítottuk. A humán enteropeptidázt a Bio-Techne R&D Systems-től rendeltük és humán kationos tripszinnel aktiváltuk. A humán CTRC, SPINK1 és kolipáz C-terminális His-tag-et tartalmaz, így a fehérjéket HEK 293T sejtekben expresszáltuk és nikkel-affinitás kromatográfiával tisztítottuk.

Az ekotin fehérje egy általános szerin-proteáz inhibitor, amely viszonylag erős komplexet képez az inaktív zimogénekkal, ezért az immobilizált ekotin felhasználható a szerin proteázok tisztítására és az aktív tripszin koncentráció meghatározására is. Első lépésben *Escherichia coli* BL21 (DE3) sejtekben expresszáltuk. A fehérjét ozmotikus sokkal (30 % szacharóz oldattal) izoláltuk a baktériumok periplazmájából, majd tripszin affinitás kromatográfiával tisztítottuk. Körülbelül 30 mg ekotin szükséges egy affinitás kromatográfiás oszlop elkészítéséhez. A tisztított ekotin redukáló aminálásához AminoLink Coupling Resint használtunk, amelyhez cianoborohidrid hozzáadásával rögzítettük a fehérjét.

4.1.3. *In vitro mutagenézis, plazmid DNS sokszorozás és tisztítás*

In vitro mutagenézis

A mezotripszinogén L81A és a PNLIP mutációkat (A174P, G233E, C254R, V454F) szekvencia specifikus mutagenézissel hoztuk létre, majd pTrapT7 vagy pcDNA3.1(-) vektorba klónoztuk. A módszer két PCR reakcióból áll, két primerpárból (mutagén/belső primerek; külső primerek: T7 forward, pcDNA rev). A vad típusú mezotripszin és lipáz szolgáltak teplotámként. A kapott PCR termékeket agaróz gélelektroforézissel és etídium-bromid festéssel detektáltuk, majd Nucleospin Gel és PCR Clean-up kit (Machery-Nagel) segítségével tisztítottuk. A második PCR során sokszorozott terméket a tisztítás után restrikciós enzimekkel emésztettük.

A humán mezotripszinogént kódoló cDNS-t XhoI és BamHI restrikciós emésztőenzimek felhasználásával klónoztuk pcDNA3.1(-), illetve pTrap-T7 expressziós vektorokba.

A PNLIP variánsokat NheI és KpnI restrikciós enzimek alkalmazásával klónoztuk pcDNA3.1(-) expressziós vektorba.

Plazmid DNS sokszorozás és tisztítás

Kémiaailag kompetens *E. coli* Top10 sejteket transzformáltunk mutáns mezotripszinogént/lipázt tartalmazó ligátummal, hogy bejuttassuk, majd felsokszorozzuk a mutációt hordozó plazmid DNS-t a baktériumban. A transzformálást az alábbi protokoll alapján végeztük: 30 perc inkubáció 4 °C-on; 42 °C-on hő sokk 1 percig; majd jégre tettük 2-3 percre. Ezt követően 1 órán keresztül inkubáltuk a baktériumokat 37 °C-on 300 µl Luria-Bertani (LB) folyékony táptalajban, majd szélesztettük 100 µg/ml ampicillin tartalmazú Luria-Bertani/agar petri csészére.

Egy izolált baktérium kolóniát leoltottunk 10 ml 100 µg/ml ampicillint tartalmazó LB tápoldatba és egy éjszakán át folyamatos rázatás mellett növesztettük 37 °C-on. Plazmid DNS-t izoláltunk a baktérium sejtekből High-speed plazmid mini kit (GeneAid) segítségével, majd DNS szekvenálással ellenőriztük a mutációk meglétét (Eurofins Genomics). Amennyiben a mutagenézis sikeres volt, 50 ml LB/Amp-ben növesztettük az újra transzformált *E. coli* Top10 sejteket, amelyből plazmid DNS izolátumot készítettünk NucleoBond Xtra Midi Plus Kit (Macherey-Nagel) használatával. A plazmid DNS preparátumok koncentrációját NanoDrop 2000 készülékekkel (Thermo Fisher) ellenőriztük.

Adenovírus konstruktok létrehozása

Az 5-ös szerotípusú adenovírus vektorokat, amelyek hordozzák a C-terminális hisztidin címkével ellátott vad típusú és mutáns lipázokat kódoló DNS-t az AdenoONE Cloning és Expression kit (Sirion Biotech) segítségével hoztuk létre.

Első lépésben a humán lipázt kódoló gént átklónoztuk a pcDNA3.1(-) plazmidból egy ingázó (shuttle) vektorba (pO6A5-CMV) NheI és KpnI restrikciós enzimeket alkalmazva. Ezt követően a pO6A5-CMV-PNLIP hordozó vektort kémiaailag kompetens *E. coli* PIR1 sejtekbe (Invitrogen) transzformáltuk. A kanamicint tartalmazó LB/agar lemezeket 16 óráig inkubáltuk 37 °C-on. Egy kolóniát átoltottunk 50 ml kanamicint tartalmazó folyékony LB tápoldatba és egy éjszakán át növesztettük, majd megtisztítottuk a lipázt tartalmazó hordozó vektorokat NucleoBond Xtra Midi Plus kit (Macherey-Nagel) segítségével.

Ezután elektroporálással bejuttattuk a PNLIP ingázó vektort a BA5-FRT elektrokompetens *E. coli* sejtekbe, amelyek hordozták a SIR-BAC-AD5 vektort (Sirion Biotech), majd kiszélesztettük a sejteket kanamicint és klóramfenikolt tartalmazó LB-agar lemezekre és 16 óráig inkubáltuk 42 °C-on, hogy létrejöjjön a homológ rekombináció a PNLIP shuttle vektor és a BAC vektor között. Egy egyedi baktérium telepet 300 ml kanamicint és klóramfenikolt tartalmazó LB folyékony táptalajban növesztettünk 37 °C-on. A PNLIP-BAC vektorokat NucleoBond PC100 kit (Macherey-Nagel) segítségével tisztítottuk, majd linerizáltuk *PacI* restrikciós enzimmal és újból tisztítottuk fenol-klóroformos extrakcióval. Annak érdekében, hogy megbizonyosodjunk róla, hogy csak egy kópia pO6A5-PNLIP DNS épült be a BAC vektorba, agaróz gélelektroforézissel detektáltuk a PNLIP-BAC DNS fragmenteket és ellenőriztük a mintázatot.

A humán embrionális vesesejteket (HEK 293AD) hatlyukú sejtenyészítő lemezen növesztettük 10 % magzati marhaszérummal, 4 mM glutaminnal és penicillin-streptomocinnal kiegészített magas glükóz-tartalmú DMEM tápfolyadékban. Amikor a sejtek elérték a 80-90 %-os konfluenciát, transzfekcióval bejuttattunk 3 µg linearizált PNLIP-BAC vektort 6 µl jetPEI transzfekciós reagenssel (Polyplus-transfection) a gyártó protokollját alkalmazva.

Három nap inkubáció után feltártuk a lecentrifugált sejteket ismételt fagyasztás-olvasztás ciklusokkal, hogy kinyerjük az adenovírusokat a sejtekből. A magasabb vírustiter elérésnek érdekében ezt a lépést kétszer megismételtük egy, majd három T75 flaskában növesztett HEK 293AD sejt megfertőzésével, begyűjtésével és feltárással. Végül megtisztítottuk a rekombináns adenovírusokat AdenoOne Purification kittel (Sirion Biotech) és alikvotokban tároltuk -70 °C-on. Az adenovírus vektorba bejuttatott vad típusú és mutáns lipázok nukleotid szekvenciáját nukleotid szekvenálással ellenőriztük (Eurofins Genomics). A fertőzőképes adenovírus koncentrációt az AdEasy Viral Titer kit (Agilent) használatával titrálással határoztuk meg és IFU/ml egységben fejeztük ki (infectious unit per ml). Az adenovírus minták vírustitere 10^9 - 10^{10} IFU/ml volt. A vad típusú és mutáns lipázt tartalmazó adenovírusok relatív PNLIP mRNS mennyiségét qPCR-rel erősítettük meg a fertőzött AR42J sejtekből TaqMan próbát (Thermo Scientific) alkalmazva, a humán PNLIP cDNS-t (Hs00609591_m1) a patkány GAPDH (Rn01775763_g1) cDNS mennyiségéhez viszonyítottuk, mint belső kontrollhoz. Az alkalmazott protokollt alább részletezzük. Kontroll kísérletekhez létrehoztunk lipázt nem kódoló, úgynevezett üres adenovírus vektort is.

4.1.4. Fehérje expresszió

Bakteriális expresszió

Az *E. coli* sejtek alkalmasak a humán hasnyálmirigy tripszinogének nagy mennyiségű termelésére. A fehérjék inklúziós testekbe kerülnek, így szükséges a baktériumok feltárása, majd a tripszinek *in vitro* refoldingja és ekotin affinitás kromatográfiás tisztítása.

Első lépésben *E. coli* BL21 (DE3) kompetens sejteket transzformáltunk a tripszinogén cDNS-t tartalmazó pTrap-T7 expressziós vektorral. Ezt követően starter kultúrát indítottunk 10 ml 100 µg/ml ampicillin tartalmú LB tápoldatban, amit egy éjszakán át rázattunk 37 °C-on. A következő nap meghígítottuk a 10 ml éjszakai kultúrát 200 ml 100 µg/ml ampicillint tartalmazó LB médiummal. Amikor az OD₆₀₀ elérte a ~0,5 értéket 1 mM végkoncentrációjú izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranoziddal (IPTG) indukáltuk a fehérjetermelést. Négy óra fehérje expressziót követően szétporcióztuk a 200 ml tápoldatot 50-50 ml-ként és 20 percig centrifugáltuk 15 000 g-n. A pelletet refoldoltuk vagy eltároltuk későbbi felhasználásra -20 °C-on.

A nem szulfatált humán tripszinogéneket BL21 (DE3) sejtekben expresszáltuk, *in vitro* foldoltuk és ekotin affinitás kromatográfiával tisztítottuk.

Emlős sejt fehérjetermelés

HEK 293T sejtek transzfekciója

A humán embrionális vesesejtek (HEK 293T) alkalmasak jelentős mennyiségű natív szerkezetű rekombináns fehérje termelésére. A sejteket 75 cm² felületű sejttenyésztő flaskában növesztettük 20 ml 4,5 g/l glükózt, 4 mM L-glutamint, 10 % FBS-t és 100 U/ml penicillin-streptomicint tartalmazó DMEM (Dulbecco's modified Eagle's) sejtkultúra médiumban 5 %-os CO₂ tartalom mellett 37 °C-on sejttenyésztő inkubátorban.

Amikor a sejtek elérték a 80-90 %-os konfluenciát, transzfektáltuk azokat elágazó polietilén-imin transzfekciós reagenssel (PEI stock: 45 mg elágazó polietilén-imin (katalógusszám 408727, Sigma-Aldrich), 80 ml desztillált H₂O, pH 7,0). Első lépésben előhígítottuk 1 ml Opti-MEM-mel (Thermo Fisher Scientific; csökkentett szérumalbuminnal használható médium) a célfehérje cDNS-t tartalmazó pcDNA3.1(-) plazmidot és a PEI-t. Ezt követően a transzfekciós elegyet húsz percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd hozzáadtuk a sejtek médiumához (DMEM). A transzfektált sejteket tartalmazó flaskákat 15 óráig inkubáltuk a sejttenyésztő inkubátorban 37 °C-on, majd mostuk foszfáttal pufferelt sóoldattal (PBS). Ezután 100 U/ml penicillin-streptomicint tartalmazó Opti-MEM médiumot adtunk a flaskákhoz, amelyben 48 óráig inkubáltuk a sejteket 37 °C-on.

Számos fehérjét expresszáltunk és tisztítottunk, többek között a szulfatált mezotripsint, kimotripszin C-t, SPINK1-et. Ehhez a transzfekciót és a fehérje expressziót is 75 cm² felületű flaskában végeztük: egy flaskát 10 µg pcDNA3.1(-) plazmid DNS-sel és 60 µl PEI reagenssel transzfektáltunk. A fehérjetermelést 20 ml antibiotikumot tartalmazó Opti-MEM-ben végeztünk. A médiumcserét követő 48 óra inkubáció után begyűjtöttük az expresszált fehérjék médiumát és 20 ml friss Opti-MEM-re cseréltük, amit újabb 48 óra inkubációs idő után gyűjtöttünk be.

A humán hasnyálmirigy lipáz (PNLIP) transzfekcióját hasonló módon végeztük el, de hatlyukú sejtenyésző lemezeken. Ehhez 2 ml DMEM sejtkultúra médiumban növesztettük, majd transzfektáltuk a sejteket 4 µg pcDNA3.1(-)-PNLIP plazmid DNS-sel és 20 µl PEI-vel, amelyeket 500 µl Opti-MEM médiummal előre meghígítottunk. A médiumcserét követő 48 óra inkubációs idő lejártakor mind a médiumot mind a sejteket összegyűjtöttük a további kísérletek elvégzése érdekében.

A szulfatált mezotripszinogén fehérje expressziójához a HEK 293T sejteket kotranszfektáltuk 8 µg pcDNA3.1(-) Hu3 és 2 µg pcDNA3.1(-) - TPST2 plazmid DNS preparátumokkal. A TPST2 gén a trioil protein szulfotranszferáz 2-t kódolja, amely a Golgi-apparátusban lokalizált és egyes fehérjék szulfatálását végzi. A szulfatálás sikerét a mezotripszin tisztítása után SDS-PAGE segítségével ellenőriztük, mivel a szulfatálás kismértékben megváltoztatja a fehérje elektroforetikus mobilitását.

AR42J sejtek transzdukciója

A patkány hasnyálmirigy sejtvonal (AR42J) alkalmas egy humán hasnyálmirigyhez hasonló modellrendszer létrehozására. A sejteket T75 sejtenyésző flaskában növesztettük 20 ml 4,5 g/l glükózt, 4 mM L-glutamint, 20 % FBS-t és 100 U/ml penicillin-streptomicint tartalmazó DMEM (Dulbecco's modified Eagle's) médiumban 5 %-os CO₂ tartalom mellett 37 °C-on sejtenyésző inkubátorban.

A sejteket 12-lyukú sejtenyésző lemezen (~ 4x10⁵ sejt) növesztettük 48 óráig 100 nM dexametazon jelenlétében, hogy előidézzük a sejtek differenciálódását. A transzdukciót 5x10⁷ IFU/ml lipázt tartalmazó adenovírus vektorral végeztük 1 ml antibiotikumot és 100 nM dexametazont tartalmazó Opti-MEM tápfolyadékban. 48 óra inkubációs idő után összegyűjtöttük a médiumot és lizáltuk a sejteket.

4.1.5. Rekombináns fehérjék tisztítása, titrálása

Humán tripszinogének in vitro refoldolása

A tripszinogén hibás térszerkezetet vesz fel a baktériumok citoplazmájában és inklúziós testek formájában felhalmozódik, ezért szükség van a baktériumok feltárására, szonikálással, illetve a tripszinek helyes feltekeredését segítő folyamatra.

Ehhez első lépésben az 50 ml expresszátyumból származó baktérium pelletet felvettünk 6 ml szonikáló pufferben (0,1 M Tris/HCl (pH 8,0), 5 mM K-EDTA) és 1-1 ml-ként alikvotoltuk. Ezt követően háromszor 20 másodpercig szonikáltuk a sejtszuspenziót, majd centrifugálással összegyűjtöttük az inklúziós testeket (16 000g, 10 perc, 4 °C), majd mostuk szonikáló oldattal. Még kétszer megismételtük a mosási-centrifugálási lépést a szonikáló puffer mennyiségének csökkentésével, így a hat csőből egyetlen inklúziós test pelletet kaptunk a folyamat végén.

Az inklúziós test frakciót felvettük 0,5 ml magas guanidin tartalmú, úgynevezett unfolding oldatban (4 M guanidin/HCl, 0,1 M Tris/HCl (pH 8,0), 2 mM K-EDTA, 30 mM DTT), majd inkubáltuk 30 percig 37 °C-on, annak érdekében, hogy a tripszinogént oldatba juttassuk.

Végül centrifugálással (16 000 g, 10 perc, 4 °C) távolítottuk el a be nem oldódott anyagokat, a felülúszót pedig hozzáadtuk 50 ml refolding oldathoz (0,9 M guanidin-HCl, 0,1 M Tris/HCl (pH 8,0), 2 mM K-EDTA, 1 mM L-cisztein, 1 mM L-cisztein). Az oldatot kevertettük 5 percig mágneses keverőn, majd egy éjszakán keresztül inkubáltuk 4 °C-on.

Ekotin affinitás kromatográfia

A humán tripszinogén izoformákat ekotin affinitás kromatográfiával tisztítottuk meg (korábbiakban ismertetett refoldolást, illetve 400 ml HEK 293T kondicionált médiumot). Első lépésként 40 mikronos szűrővel átszűrtük a mintákat, hogy eltávolítsuk a törmeléket, majd kiegészítettük 50 mM Tris/HCl (pH 8,0) és 200 mM NaCl végkoncentrációjú oldatokkal. Az ekotin oszlopot Äkta Prime készülékhez csatlakoztattuk és 50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 200 mM NaCl ekvilibráló pufferrel mostuk, majd felkötöttük a tripszinogént. Ezt követően az ekvilibráló pufferrel eltávolítottuk a nem kötődő fehérjéket az oszlopról és 50 mM HCl oldattal eluáltuk a tripszinogént.

Az eluátum fehérje koncentrációját 280 nm-en mért abszorbancia elnyelésük alapján határoztuk meg a következő moláris extinciókoefficiens értékek használatával (kationos tripszinogén $\epsilon = 37525 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; mezotripszinogén $\epsilon = 41535 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Nikkel-affinitás kromatográfia

A pcDNA3.1(-) plazmidban expresszált fehérjék tartalmaznak egy C-terminális 10 hisztidinből álló úgynevezett His-cimkét, amely segítségével a proteinek nikkel-affinitás kromatográfiával tisztíthatók. Az expresszált fehérjét tartalmazó begyűjtött médiumot átszűrtük 40 mikronos szűrőn, hogy eltávolítsuk a sejttörmelékét. Ezt követően a mintákat megtisztítottuk 5 ml térfogatú Ni-NTA superflow affinity cartridge (Qiagen) oszloppal Äkta Prime FPLC rendszeren. Miután felkötöttük a fehérjét az oszlopra, mostuk egy alacsony imidazol tartalmú pufferrel (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol (pH 8,0)), hogy eltávolítsuk a gyengén kötődő fehérjéket, majd eluáltuk a célfehérjét egy magas imidazol koncentrációjú pufferrel (30 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM imidazol (pH 8,0)). A begyűjtött frakciókat első lépésben dializáltuk, hogy eltávolítsuk az imidazolt, majd koncentráltuk 10 kDa pórusméretű Amicon Ultra centrifuga szűrővel.

Emésztőenzimek aktiválása, titrálása

A tripszinogénekhez és a CTRC-hez 0,1 M végkoncentrációjú Tris/HCl (pH 8,0) puffert és 1 mM CaCl₂-ot adtunk, majd az előbbi humán enteropeptidázzal (R&D Systems), az utóbbit pedig kationos tripszin hozzáadásával aktiváltuk.

A tripszinek, illetve a CTRC koncentrációját aktív centrum titrálással határoztuk meg ismert koncentrációjú szorosan kötődő ekotin inhibitort alkalmazva, amelyből nyolclepcsős felező hígítási sort készítettünk 0-200 nM koncentrációtartományban 96-lyukú lemezen minta pufferrel (0,1 M Tris/HCl (pH 8,0), 1 mM CaCl₂, 0,05 % Tween20). A szabad tripszin, illetve CTRC aktivitását 405 nm-en spektrofotométerrel detektáltuk 6 mM Suc-Ala-Ala-Pro-Lys-p-nitroanilid (Suc-AAPK-pNA) és Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilid (Suc-AAPF-pNA) (Bachem) szubsztrát hozzáadásával. Az enzimek koncentrációját a proteáz-inhibitor 1:1 arányú egyensúlyi állapotának meghatározása alapján számítottuk ki.

4.1.6. Redukáló SDS gélelektroforézis és denzitometria

A tisztított fehérje frakciókat, a médiumokat, illetve a hasítási reakciók mintáit 10 % triklórecetsavval (TCA) kicsaptuk, 5 percig inkubáltuk jégen, majd 16 000 g-n 10 percig centrifugáltuk. A felülúszót eltávolítottuk, a fehérje csapadékot pedig visszaoldottuk 15 µl 0,1 M DTT-t tartalmazó redukáló Laemmli pufferben és hődenaturáltuk 5 percig 95 °C-on.

A fehérjéket megfuttattuk 15 %-os SDS-poliakrilamid gélen. A gélt Coomassie Brilliant Blue R-250 (1,25 g/liter 40 % metanolban és 10 % ecetsavban oldva; Thermo Fisher Scientific) segítségével festettük meg, majd a fehérjesávokat 10 % metanol és 10 % ecetsav oldattal tettük láthatóvá. A géleket DryEase mini-gel dryer (Thermo Fisher Scientific)

rendszerrel szárítottuk ki, majd scanneltük. A fehérjesávok mennyiségi értékelését szemikvantitatív denzitometriás analízissel végeztük a Quantity one 4.6.6 szoftverrel (Bio-Rad).

PNLIP fehérje szekréció vizsgálata: A HEK 293T sejtek esetében 200 μ l, az AR42J sejtek esetében 40 μ l kondicionált médiumot precipitáltunk 10 % triklórecetsavval, majd a fent ismertetett módon jártunk el, azzal a különbséggel, hogy 12 %-os töménységű SDS gél alkalmaztunk.

4.1.7. Statisztikai analízis

A hasnyálmirigy lipáz variánsok aggregációjáról, illetve ER stresszmarkerekre gyakorolt hatásáról statisztikai értékeléseket készítettünk. A számításokat a MedCalc online szoftver segítségével készítettük. A program a minták átlagát és szórását felhasználva t-teszt próbát alkalmaz a szignifikancia értékek (p-érték) meghatározásához. Az enzimológiai kísérleteink során nem végeztünk statisztikai számolást.

4.2. Kísérletek mezotripszinogénnel

4.2.1. Mezotripszinogén hasítás és aktiválás

Az autolízis hurok hasításának vizsgálatához 2 μ M mezotripszinogént 5-100 nM CTRC-vel inkubáltunk 0,1 M Tris/HCl (pH 8,0) és 20 nM SPINK1 jelenlétében 37 °C-on. A tripszin inhibitort azért adtuk a reakcióhoz, hogy blokkoljuk az esetleges tripszin szennyeződést, amely a CTRC-vel került a rendszerbe. Különböző időpontokban (0, 2, 5, 10, 20, 30 perckor) kivettünk 75 μ l-t a reakcióelegyből majd 10 % TCA-val precipitáltuk és a fehérjesávokat 15 %-os redukáló SDS-PAGE-t követő Coomassie festéssel detektáltuk.

A mezotripszinogén proteolitikus hasításának azonosítását Edmann degradációval végeztük el. Első lépésben 15 %-os redukáló poliakrilamid gélelektroforézis segítségével elválasztottuk a hasítási fehérjetermékeket, majd PVDF membránra transzferáltuk és Coomassie Brilliant Blue festéssel tettük láthatóvá. Az N-terminális fehérje szekvenálást a Midwest Analytical (St. Louis, MO, USA) végezte.

A nem szulfatált és szulfatált L81A-mezotripszinogént a fent tárgyalt módon hasítottuk CTRC-vel, 1 és 10 mM CaCl_2 jelenlétében.

Hasított mezotripszin előállításához 2 μ M L81A-mezotripszinogént inkubáltunk 50 nM CTRC-vel egy órát 37 °C-on 0,1 M Tris/HCl (pH 8,0) pufferben, majd kiegészítettük 1 mM kalcium-kloriddal és 300 ng/ml humán enteropeptidázzal aktiváltuk 30 percig 37 °C-on.

4.2.2. Meotripszin aktivitásmérés

A meotripszin aktivitást 0,3 mM Suc-Ala-Ala-Pro-Lys-p-nitroanilid (Bachem) tripszin szubsztráttal mértük 100 µl reakció pufferben (0,1 M Tris/HCl (pH 8,0), 1 mM kalcium-klorid, 0,05 % Tween20). A feltüntetett időpontokban 2,5 µl alikvotokat kevertünk 92,5 µl reakció pufferrel és a reakciót 5 µl 6 mM szubsztrát oldat hozzáadásával indítottuk el. A szubsztrát hasítását 1 percig 405 nm-en a Synergy H1 96-lyukú lemez olvasóval követtük. Az enzimreakció kezdeti sebességét a görbe lineáris szakaszából határoztuk meg.

4.2.3. Kazein degradáció vizsgálata

2 mg/ml koncentrációjú marha β kazeint inkubáltunk 10 nM nem szulfatált és szulfatált CTRC-vel hasított és intakt L81A meotripszinnel 0,1 M Tris/HCl (pH 8,0) pufferben, 1 mM kalcium-klorid és 20 nM eglin C jelenlétében 37 °C-on. A CTRC inhibitort azért adtuk a rendszerhez, hogy blokkoljuk a CTRC aktivitását, ami megmaradhatott a CTRC hasított L81A meotripszin elegyekben. A feltüntetett időpontokban 100 µl alikvotot kicsaptuk 10 %-os végkoncentrációjú TCA-val és a kazein bomlását 15 %-os redukáló SDS gélelektroforézissel vizsgáltuk.

4.2.4. SBTI emésztés vizsgálata

10 µM SBTI-t inkubáltunk 200 nM L81A meotripszinnel (CTRC-vel hasított és nem hasított nem szulfatált és szulfatált forma) 0,1 M Tris/HCl (pH 8,0) és 20 nM eglin C jelenlétében 37 °C-on. A jelzett időpontokban (0, 15, 30, 60 perckor) kivettünk 75 µl reakcióelegyet, majd kicsaptuk 10 %-os TCA-val és az SBTI hasítását 15 %-os redukáló SDS gélelektroforézissel vizsgáltuk.

4.2.5. SPINK1 degradáció vizsgálata

0,5 µM SPINK1 tripszin inhibitort inkubáltunk 200 nM L81A meotripszinnel (nem szulfatált, szulfatált, CTRC hasított szulfatált és nem szulfatált forma) 0,1 M Tris/HCl (pH 8,0), 1 mM kalcium-klorid, 0,05 % Tween20 pufferben 37 °C-on 200 µl végtérfogatban. Adott időpontokban (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 percnél) kivettünk 5 µl-t a reakcióelegyből és hozzáadtuk 40 µl 55 nM kationos tripszinhez (0,1 M Tris/HCl (pH 8,0) pufferben, 1 mM kalcium-klorid és 0,05 % Tween 20). Ezt követően 3 percig inkubáltuk az elegyet 23 °C-on, majd megmértük a kationos tripszin aktivitását 5 µl 6 mM Suc-Ala-Ala-Pro-Lys-p-nitroanilid szubsztrát hozzáadásával 405 nm-en 96-lyukú lemezolvasóval.

4.2.6. Enzim kinetikai mérések

A mezotripszin variánsok Michaelis-Menten kinetikai paramétereit kromogén szubsztrátok segítségével határoztuk meg (Suc-Ala-Ala-Pro-Lys-p-nitroanilid, Suc-Ala-Ala-Pro-Arg-p-nitroanilid és N-benziloxikarbonil-Gly-Pro-Arg-p-nitroanilid (Bachem)). A szubsztrát koncentrációk 5 és 16200 μM között változtak 200 μl végtérfogatban (Mintapuffer: 0,1 M Tris/HCl (pH 8,0), 1 mM kalcium-klorid, 0,05 % Tween20). A reakciókat 2 nM mezotripszin hozzáadásával indítottuk. A sebesség értékeket a koncentráció függvényében ábrázoltuk és a K_m , k_{cat} értékeket hiperbolikus illesztéssel számítottuk a Microcal Origin programmal.

Mértük az intakt és CTCRC-vel hasított szulfatált L81A mezotripszin (2 nM) Michaelis-Menten paramétereit Suc-Ala-Ala-Pro-Arg-p-nitroanilid szubsztrát hozzáadásával, növekvő SBTI koncentrációk mellett (0; 0,5; 1; 1,5; 2,5 μM). Ezt követően meghatároztuk az SBTI-re vonatkoztatott inhibitoros állandó (K_i) értéket.

4.3. Kísérletek hasnyálmirigy lipázzal

4.3.1. Lipáz aktivitásmérés

A PNLIP aktivitásmérését a transzfektált sejtek médiumából végeztük p-nitrofenil palmitát (Sigma-Aldrich) szubsztrát segítségével. 3 mg/ml szubsztrátot feloldottunk izopropanolban, majd 0,3 mg/ml végkoncentrációra hígítottuk 0,1 M Tris/HCl pufferrel, amit kiegészítettünk 1 mg/ml gumiarábikummal és 0,4 mg/ml nátrium-deoxikoláttal.

Az enzimreakció indításához a 180 μl emulzifikált szubsztráthoz 10 μl 6 μM rekombináns humán kolipázt és 10 μl kondicionált Opti-MEM médiumot adtunk. Ezután 15 percig inkubáltuk a reakcióelegyet szobahőmérsékleten. A reakciót 10 μl Triton-X100 hozzáadásával állítottuk le. A mintákat ezután 10 percig centrifugáltuk 17 000 g-n, majd 100 μl tiszta felülúszót 96-lyukú lemezre pipettáztunk és 405 nm-en mértük a képződött szabad p-nitrofenol mennyiségét. Kontrollként a lipáz mentes Opti-MEM aktivitása szolgált, amelyet kivontunk a lipázt tartalmazó médiumok aktivitásából. Csak azokat az értékeket fogadtuk el, amelyek kisebbek voltak OD_{405} 0,5 értéknél, mert ezek mutatták az enzimatis reakció kezdeti sebességét.

4.3.2. Sejtlizátumok készítése

Fehérje sejtlizátumok készítéséhez a transzfektált/transzduktált HEK 293T és AR42J sejteket PBS-sel mostuk, óvatosan szuszpendáltuk 1 ml PBS-ben és lecentrifugáltuk 10 percig 850 g-n. A sejteket felvettük 200 µl Promega Reporter Lysis pufferben, amit kiegészítettünk cOmplete Mini Protease Inhibitor Cocktail (Roche) oldattal, majd a sejteket ismételt fagyasztás-olvasztás ciklusokkal tártuk fel. 5 perc centrifugálást követően (2400 g) a felülúszót eltávolítottuk és BCA Protein Assay kit (Pierce) segítségével határoztuk meg az egyes minták összfehérje koncentrációját.

4.3.3. Ultracentrifugálás

Az ultracentrifugálást a transzfektált HEK 293T sejtek lizátumából végeztük el 48 órával a transzfekció után. 100 µl sejtlizátumot centrifugáltunk le 90 000 g-n 12 percig. A felülúszót elmentettük és kiegészítettük 100 µl Laemmli pufferrel, amely 100 mM DTT-t tartalmazott. Ezt követően 5-5 µl felülúszót és pelletet választottunk el SDS-PAGE segítségével, majd western blot analízissel vizsgáltuk.

4.3.4. Fehérje immunoblot

A transzfektált HEK 293T sejtek médiumából 5 µl-t, a transzduktált sejtek médiumából pedig 3 µl, illetve a sejtlizátumok esetében 10 µg össz-proteint összekevertünk 10 µl, 0,1 M DTT-t tartalmazó 2x Laemmli pufferrel. A hődenaturáció után (95 °C, 5 perc) a minták fehérjeit 12 %-os poliakrilamid gélen választottuk el redukáló SDS gélelektroforézissel, majd a fehérjéket átranzferáltuk nitrocellulóz membránra. A membránt 0,1 % Tween20-at tartalmazó PBS-ben oldott 5 %-os sovány tejporral blokkoltuk.

A detektált PNLIP His-cimkét tartalmaz, így egy HRP konjugált polihisztidin elleni antitesttel (Qiagen, katalógusszám: 34460) inkubáltuk 1:2000 arányban. A BiP (GRP78) fehérje kimutatásának érdekében 1:3000 hígításban nyúl anti-GRP78 antitesttel (Invitrogen, katalógusszám: PA1-014A) inkubáltuk a blokkolt membránt. Másodlagos antitestként HRP-konjugált anti-nyúl IgG (Bio-Rad, katalógusszám: 1706515) ellenanyagot használtunk 1:15 000 x-es hígításban. A GAPDH fehérjét 1: 15 000 x-es anti-GAPDH (Sigma-Aldrich, katalógusszám: G9545) elsődleges és 1:10000 x-es HRP-konjugált anti-nyúl IgG másodlagos antitesttel detektáltuk. Az antitesteket minden esetben 1 óráig inkubáltuk a blokkolt membránnal. A fehérjesávokat WesternBright ECL HRP szubsztrát (Advansta) segítségével tettük láthatóvá.

4.3.5. RNS izolálás, reverz transzkripció

Össz-RNS izolálást a transzfektált HEK 293T, illetve transzduktált AR42J sejtekből végeztük el NucleoSpin RNA Plus kit (Macherey-Nagel) segítségével. A minták RNS koncentrációját Nanodrop 2000 műszer alkalmazásával határoztuk meg a 260 nm-en mért elnyelésük alapján. Ezt követően reverz transzkripciót végeztünk, az RNS koncentrációt úgy állítottuk be, hogy az RNS mennyisége a reverz transzkripcióban 2 µg legyen.

4.3.6. XBP splicing vizsgálata

Az X-box-kötő fehérje-1 (XBP1) mRNS splicing arányát PCR analízissel határoztuk meg. Az XBP1 mRNS processzálas kimutatására szemikvantitatív PCR-t alkalmaztunk a szerkesztett és nem szerkesztett forma elválasztására. HEK 293T sejtek esetében a primerek a következők voltak hXBP1 forward primer: 5'-CCT TGT AGT TGA GAA CCA GG-3' és hXBP1 reverz primer, 5'-GGG CTT GGT ATA TAT GTG G-3'. A felamplifikált PCR-termékek 441 (teljes hosszúságú) és 415 bp (kivágott) hosszúságúak voltak. AR42J sejtek esetében alkalmazott primerek: rXBP1 fwd: 5'-GCT TGT GAT TGA GAA CCA GG-3', rXBP1 rev: 5'-AGG CTT GGT GTA TAC ATG G-3'; a teljes hosszúságú XBP1 447 bp hosszúságú, a splicelódott 421 bp. A PCR termékeket 2,5 %-os agaróz gélen futtattuk meg és etidium-bromid festéssel tettük láthatóvá.

4.3.7. BiP expresszió vizsgálata

Az Immunglobulin kötő fehérje (BiP) mRNS expresszióját qPCR-al határoztuk meg (Roche LightCycler 480 II), TaqMan primereket (Thermo Scientific, human Hs00607129_gH, rat Rn00565250_m1), illetve TaqMan Universal PCR Mastermixet (Applied Biosystems) alkalmazva. A méréseket az alábbi protokoll alapján végeztük: 10 perc, 95 °C (a polimeráz aktiválása), 15 mp 95 °C, 60 mp 60 °C (ez utóbbi két lépés egy ciklusnak felel meg, amely 40x ismétlődött). A génexpresszió kvantitálására a komparatív CT ($\Delta\Delta CT$) módszert alkalmaztuk. A küszöbértékeket (C_t) a LightCycler software 1.5.0.SP3 segítségével határoztuk meg. A BiP expressziós szintjét először a belső kontrollhoz, a GAPDH-hoz normalizáltuk (Thermo Scientific, human Hs02758991_g1, rat Rn01775763_g1) (ΔCT), majd a sejteket transzfektált 5×10^7 IFU/ml adenovírus vektorkontrollhoz ($\Delta\Delta CT$). A kapott adatokat a $2^{-\Delta\Delta CT}$ formula alapján számítottuk és fold change (expressziós változás mértéke) értékben fejeztük ki.

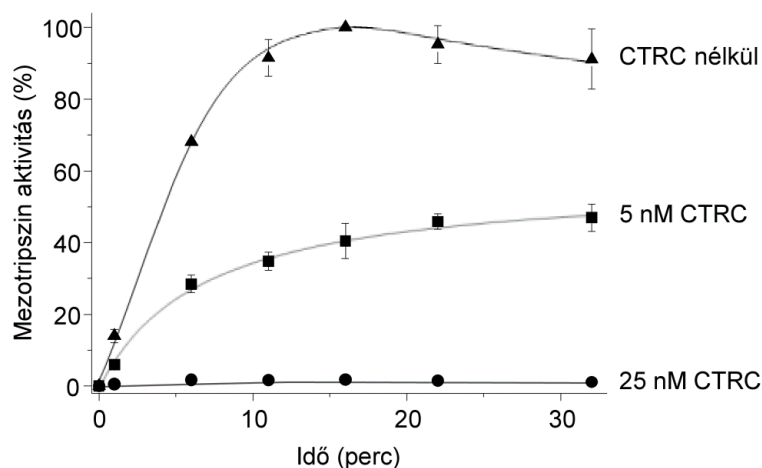
5. EREDMÉNYEK

5.1. Mezotripszinogén inaktiválása CTRC általi proteolitikus hasításokkal

5.1.1. Mezotripszinogén CTRC általi hasítása

A kationos tripszinogén proteolitikus szabályozása CTRC-vel jól ismert. A tripszinogén autoaktivációja során a CTRC jelentősen degradálja és inaktiválja a proteázt. A CTRC a kalciumkötő hurok Leu81 utáni specifikus hasításával, és ezzel összehangolt triptikus hasításokon keresztül fejti ki hatását. Az exokrin hasnyálmirigy által szekretált többi kimotripszin és elasztáz izoforma a kalciumkötő hurok emésztésében alulmaradt, amely arra utal, hogy a CTRC a tripszinogén szabályozására fejlődött ki.

A mezotripszinogén és a kationos tripszinogén aminosav szekvenciája nagyfokú egyezést mutat. Első lépésként egy enzimológiai kísérletben megvizsgáltuk, hogy a korábbi megfigyelésekkel összhangban a CTRC csökkenti-e a mezotripszinogén aktivációját (7. ábra). Ehhez a mezotripszinogént katalitikus mennyiségű CTRC-vel inkubáltuk, és aktiváltuk.

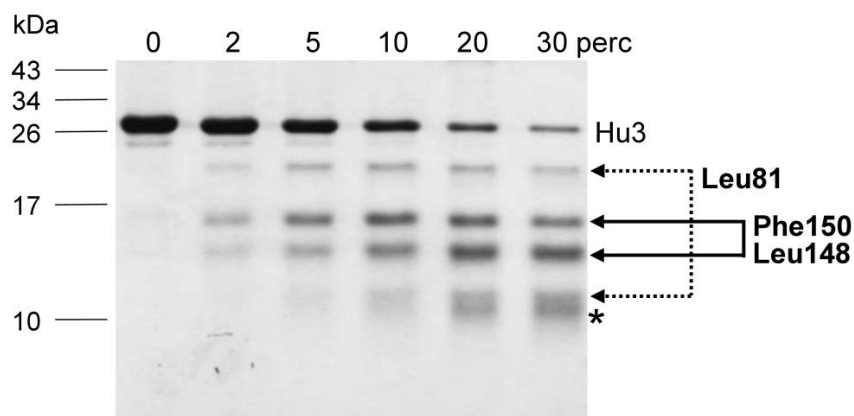


7. ábra. CTRC-vel kezelt mezotripszinogén aktiválása humán enteropeptidázzal

2 μ M mezotripszinogént inkubáltunk 5, illetve 25 nM CTRC-vel 5 percig 0,1 M Tris-HCl (pH 8,0) pufferben 37 °C-on, majd a mintát kiegészítettük 1 mM kalcium-kloriddal és 25 ng/ml humán enteropeptidázzal (Bio-Techne). A jelzett időpontokban a mezotripszin aktivitását az Anyagok és Módszerek részben leírtak alapján követtük. Az ábra három párhuzamos mérés eredményét mutatja.

A mezotripszinogén és a CTRC fiziológias aránya megfeleltethető a kísérleteinkben alkalmazott koncentrációknak. Mind a mezotripszinogén mind a CTRC minor izoformáknak tekinthetők, de a hasnyálmirigy által termelt emésztőenzimek közül a tripszinek mennyisége a legjelentősebb.

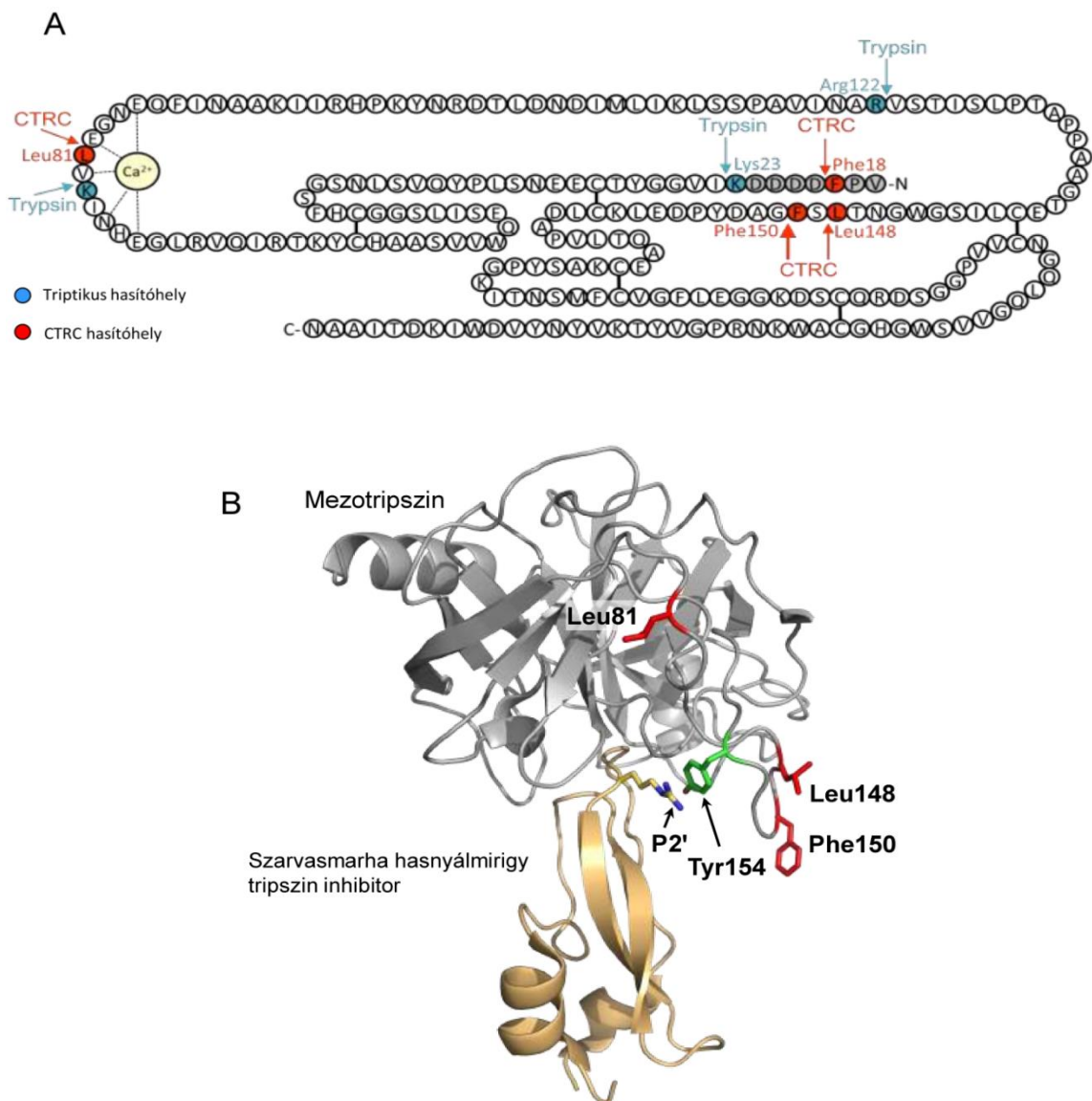
Eredményeink azt mutatták, hogy 5 nM CTRC hozzáadása jelentősen csökkentette a mezotripszin végső aktivitását, míg 25 nM CTRC kezelést követően a proteáz nem aktiválódott. További kísérleteinkben arra a kérdésre kerestük a választ, hogy mi a molekuláris háttere a markáns aktivitásvesztésnek.



8. ábra. A mezotripszinogén CTRC általi hasítása

2 μ M mezotripszinogént (Hu3) 5 nM CTRC-vel inkubáltunk 37 °C-on az *Anyagok és Módszerek* részben leírtak szerint. A jelzett időpontokban mintát vettünk és TCA-s kicsapás után redukáló SDS-PAGE és Coomassie Blue festéssel detektáltuk a hasítási termékeket. A proteolitikus hasításokat Edman degradációval azonosítottuk az *Anyagok és módszerek* fejezetben ismertetett módon. A folyamatos nyíl a fő hasítási termékeket jelöli, míg a pontozott nyíl a másodlagos hasítási termékeket mutatja. A csillaggal jelölt fehérjesávokat azokat a hasítási termékeket jelölik, amelyek a kalciumkötő hurok (Leu81) és az autolízis hurok (Leu148/Phe150) egyidejű hasításának következtében keletkeztek. Az ábra három párhuzamos kísérlet egyikét mutatja be.

További kísérleteinkben arra a kérdésre kerestük a választ, hogy mi a molekuláris háttere a markáns aktivitásvesztésnek. A kationos tripszinogénhez hasonlóan a mezotripszinogén is tartalmaz kiemelt CTRC hasítóhelyeket. A hasítóhelyek vizsgálata érdekében a mezotripszint katalitikus mennyiségű CTRC-vel inkubáltuk hozzáadott kalcium nélkül. A megjelenő sávokat redukáló SDS-PAGE-t követő Coomassie blue festéssel detektáltuk. Azt tapasztaltuk, hogy az idő előrehaladtával a CTRC elhasította a mezotripszinogént, harminc perc elteltével szinte teljesen eltűnt a gélről az intakt fehérjesáv (~ 30 kDa). Ezzel egyidejűleg 10-20 kDa molekulásúlyú tartományban többszörös hasítási termékek megjelenését tapasztaltuk (8. ábra).



9. ábra. A mezotripszin elsődleges és harmadlagos szerkezete

(A) A mezotripszinogén aminosav szekvenciája, amely mutatja a **CTRC** és a **tripszin** általi hasítóhelyeket. (B) A mezotripszin szarvasmarha hasnyálmirigy tripszin inhibitorral (BPTI) alkotott komplexének szalagmodellje, kiemelve a **CTRC hasítóhelyeket**. Az ábrán a szulfatálás helyét (**Tyr154**) és az inhibitorban a P2' aminosav oldalláncot is jelöltük. A modell a PyMOL 1.3 használatával készült a Protein Data Bank 2R9P fájl felhasználásával.

A hasítás következtében megjelenő termékeket Edman degradációval azonosítottuk. Az eredmények azt mutatták, hogy a CTRC a kalciumkötő hurok hasításán kívül további hasítóhelyeket is tartalmaz az autolízis hurokban. A 81. leucin egy konzervált CTRC hasítóhely és a kalciumkötő hurok régióban található, míg a 148. leucin és a 150. fenilalanin az autolízis hurokban megtalálható aminosavak. A jobb átláthatóság érdekében kiemeltük a mezotripszinben megtalálható CTRC hasítóhelyeket mind az elsődleges aminosav szekvenciában mind a háromdimenziós szalagmodellen (9. ábra).

A keletkezett termékek fehérje szekvenálásával nemcsak az aminosav sorrendet határoztuk meg, hanem az egyes termékek egymáshoz viszonyított arányát is, amiből a hasítás sebességére következtettünk. A mezotripszinogénben található hasítóhelyek közül 150. fenilalanin bizonyult a CTRC számára a legkedvezőbbnek, tekintve, hogy a Phe150 hasítás kétszer olyan hatékony volt, mint a Leu148. Ezen felül azt is megállapítottuk, hogy a CTRC sokkalta gyorsabban processzálta az autolízis hurok régiót, mint a kalciumkötő hurokban található Leu81 helyet. Ez a jelenség egy viszonylag stabil duplaszálú mezotripszin köztiterméket eredményezett, amely egy lassabb, további emésztésen ment keresztül a Leu81 helyen.

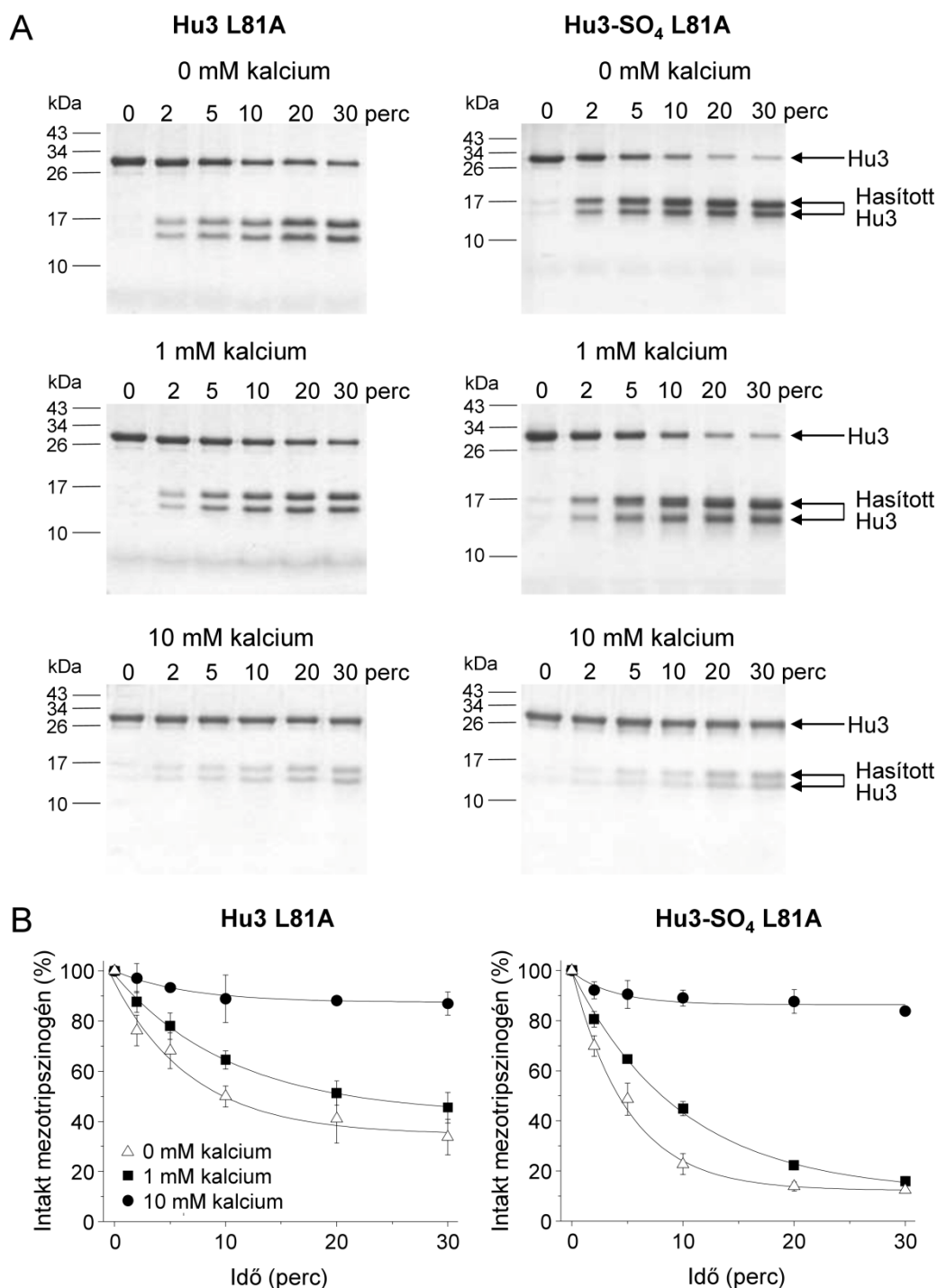
A Leu148 utáni CTRC hasítás szintén megfigyelhető az anionos tripszinogénben. A CTRC gyorsabban emésztí az anionos tripszinogént, mint a mezotripszinogént. A Phe150 CTRC hasítóhelyhiányzik a kationos és az anionos tripszinogénből, amely azt sugallja, hogy a mezotripszinogén egy pozitív szelekción ment keresztül a CTRC általi hurok régió hasításának tekintetében.

Eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy az aktivációs peptidben található Phe18 CTRC általi hasítása segíti a gyorsabb tripszin aktivációt, mivel a processzált, rövidebb aktivációs peptid fokozza a Lys23 utáni hasítás sebességét. Ismert, hogy a CTRC proteolitikus hasításokkal degradálni képes a kationos és anionos tripszinogént. A CTRC a mezotripszinogént főként az autolízis hurokban hasítja a Leu148 és Phe150 oldalláncok után. Ezzel ellentétben a kationos tripszinogénnél a kalcium-kötő hurokban a Leu81 után láttunk hasítást.

A CTRC proteolitikus szabályozó szerepe a kationos és anionos tripszinogén esetén már jól ismert, az N-terminális processzálas és a kalciumkötő hurok hasítása jól karakterizált. Viszont a mezotripszinogén autolízis hurokjában található hasítóhelyek hatása korábban nem volt ismert. Így további kísérleteinkben az autolízis hurok CTRC általi proteolízisének hatására összpontosítottunk.

5.1.2. A mezotripszin proteolitikus hasításának vizsgálata

Annak érdekében, hogy kizárólag az autolízis hurokban megtalálható CTRC hasítóhelyeket vizsgáljuk, anélkül, hogy az eredményeinket befolyásolná a Leu81 utáni másodlagos hasítás, létrehoztunk egy olyan mezotripszinogén mutánst, amelyben a kalciumkötő hurokban található 81. leucint alaninra cseréltük (L81A mezotripszin). Az L81A mutáció nem módosítja a tripszin aktivitását.



10. ábra. Az L81A-mezotripszinogén autolízis hurok hasítása CTRC-vel

(A) $2\mu\text{M}$ nem szulfatált és szulfatált (SO_4) L81A-mezotripszinogént (Hu3) inkubáltunk 5 nM CTRC-vel 0 , 1 és 10 mM kalcium-klorid koncentráció mellett $0,1\text{ M}$ Tris-HCl ($\text{pH } 8,0$) pufferben 37°C -on. A megadott időpontokban frakciókat vettünk ki a reakcióelegyből és a hasítást redukáló SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel detektáltuk az *Anyagok és módszerek* fejezetben ismertetett módon. A gélek három párhuzamos kísérlet egyikét mutatják. (B) Az intakt L81A mezotripszinogén sávok intenzitásának változását denzitometriásan értékeltük ki. Az ábrázolt pontok három mérés átlagát és szórását mutatják.

A humán tripszinogének az acinus sejtekben poszttranszlációs szulfatáláson mennek keresztül a TPST2 szulfotranszferáz által. Ez a poszttranszlációs szulfatálás a 154. tirozin oldalláncon következik be, amely az S2' szubsztrátkötő zseb része (9.B ábra). A mezotripszin háromdimenziós szalagmodelljén jól látható, hogy a Tyr154 az autolízis hurokban található CTRC hasítóhelyek (Leu148, Phe150) közelében helyezkedik el. Ezért arra következtettünk, hogy a szulfatálás befolyásolhatja a CTRC hasítás sebességét, amely kiterjedhet a CTRC által hasított mezotripszin katalitikus tulajdonságaira is. Ebből a feltevésből adódóan a további kísérleteinkben mind a nem szulfatált (Hu3 L81A) mind a szulfatált (Hu3-SO₄ L81A) L81A-mezotripszinogén és L81A-mezotripszin enzimeket vizsgáltuk.

A humán hasnyál fiziológias kalcium koncentrációja körülbelül 1 mM. Első lépésként a nem szulfatált, illetve a szulfatált mezotripszinogén CTRC általi hasítás különbségeit és a kalcium hatását tanulmányoztuk. Így a nem szulfatált és szulfatált mezotripszinogént CTRC-vel inkubáltuk ugyanolyan reakciókörülményeket biztosítva hozzáadott kalcium nélkül, illetve 1 és 10 mM kalcium jelenléte mellett.

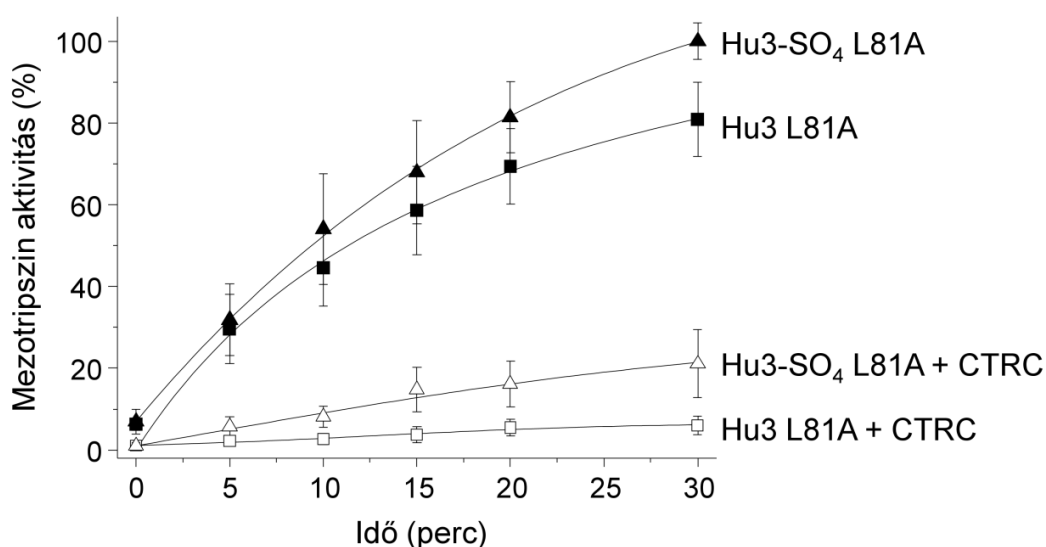
Miután létrehoztuk az L81A mezotripszinogén mutánst, a CTRC kizárólag az autolízis hurokban található hasítóhelyeket processzálta (Leu148, Phe150). Ennek eredményeképp a redukáló SDS gélelektroforézissel két egymáshoz közel futó sávot detektáltunk a 10-20 kDa molekulasúlyú tartományban (10.A ábra). Az N-terminális fehérje szekvenálás megerősítette, hogy a felső sáv a mezotripszinogén N-terminális fragmense, míg az alsó sáv a Phe150/Leu148 utáni hasítás termékei és a mezotripszinogén C-terminális régióját tartalmazta. Ahogyan a vad típusú mezotripszinogén esetében is megfigyeltük, a CTRC előnyben részesítette a Phe150-t a Leu148 hasítóhellyel szemben, a keletkezett termékek aránya 2:1.

A redukáló SDS gélelektroforézis után kapott gélképeket denzitometriásan is kiértékeltek. A sávok intenzitását számszerűsítettük, majd százalékos formában ábrázoltuk. A reakció kezdeti intakt mezotripszinogén mennyiségét 100 %-nak feleltettük meg, majd ehhez viszonyítottuk a reakció előrehaladtával csökkenő mezotripszinogén mennyiségét. Látható, hogy a CTRC hatékonyan hasította az autolízis hurok régiót. Közel 30 perc alatt az intakt fehérje jelentős részét emésztette. A CTRC a szulfatált L81A-mezotripszinogént gyorsabban hasította, mint a nem szulfatált megfelelőjét. Vizsgáltuk a növekvő kalcium koncentráció hatását a CTRC általi mezotripszinogén hasításra. A kísérletben azt tapasztaltuk, hogy már 1 mM kalciumkoncentráció is csökkentette a hasítási sebességet, míg 10 mM kalcium már teljes védelmet nyújtott a mezotripszinogén számára a CTRC elleni hasításokkal szemben (10.B ábra).

5.1.3. L81A-mezotripszin katalitikus tulajdonságai

Ezt követően arra voltunk kíváncsiak, hogy a mezotripszin autolízis hurok hasítása CTRC-vel milyen következményekkel jár az enzimfunkció tekintetében. A tripszinben az autolízis hurok része a szubsztrátkötő helynek, ezáltal fontos szerepet tölt be a tripszinek aktivitása és szubsztrátspecifitása szempontjából. (9.B ábra). Figyelembe véve, hogy az autolízis hurok milyen kitüntetett szerepet tölt be a mezotripszin szerkezetében, feltételeztük, hogy a CTRC általi autolízis hurok hasítása megváltoztathatja a mezotripszin szerkezetét, ezáltal a funkciójára is hatással lehet.

Annak érdekében, hogy teszteljük ezt az állítást olyan L81A mezotripszinogént hoztunk létre, amelyet CTRC-vel hasítottunk, majd enteropeptidázzal aktiváltunk. Ezt követően vizsgáltuk az enteropeptidáz általi aktiválás időfüggését a nem szulfatált és szulfatált mezotripszinogén (Hu3 L81A, Hu3-SO₄ L81A), illetve az előzetesen CTRC-vel hasított megfelelőjük (Hu3 L81A + CTRC, Hu3-SO₄ L81A + CTRC) esetében.



11. ábra. CTRC által hasított L81A-mezotripszinogén aktiválása enteropeptidázzal.

2 μ M nem szulfatált és szulfatált (SO₄) L81A-mezotripszinogént hasítottunk 50 nM CTRC-vel 0,1 M Tris (pH 8,0) és 0,05 %-os Tween 20 pufferben 37 °C-on 1 óráig 150 μ l végtérfogóban. A CTRC-hasított L81A-mezotripszinogént rekombináns humán enteropeptidázzal aktiváltuk 1 mM kalcium-klorid jelenlétében. A jelölt időpontokban mértük a mezotripszin aktivitását az Anyagok és módszerek részben leírtak alapján. A mérési pontok három kísérlet átlagát és szórását ábrázolják.

A reakció során azt tapasztaltuk, hogy a nem szulfatált és a szulfatált L81A-mezotripszinogén aktivitása magas volt (a szulfatált forma aktivitása magasabb, mint a nem szulfatált formáé), ezzel szemben a CTRC által kezelt formák aktivitása jelentősen csökkent (11. ábra).

Ezt követően meghatároztuk a különböző L81A mezotripszin formák (nem szulfatált és szulfatált; CTRC által hasított nem szulfatált, illetve szulfatált forma) kinetikai paramétereit. A reakciók során három kromogén peptid szubsztátot használtunk: Suc-Ala-Ala-Pro-Lys-p-nitroanilid (AAPK-pNA), Suc-Ala-Ala-Pro-Arg-p-nitroanilid (AAPR-pNA) és N-benziloxikarbonil-Gly-Pro-Arg-p-nitroanilid (GPR-pNA) (1. táblázat).

1. Táblázat. Intakt és CTRC által hasított L81A-mezotripszin kinetikai paramétereit

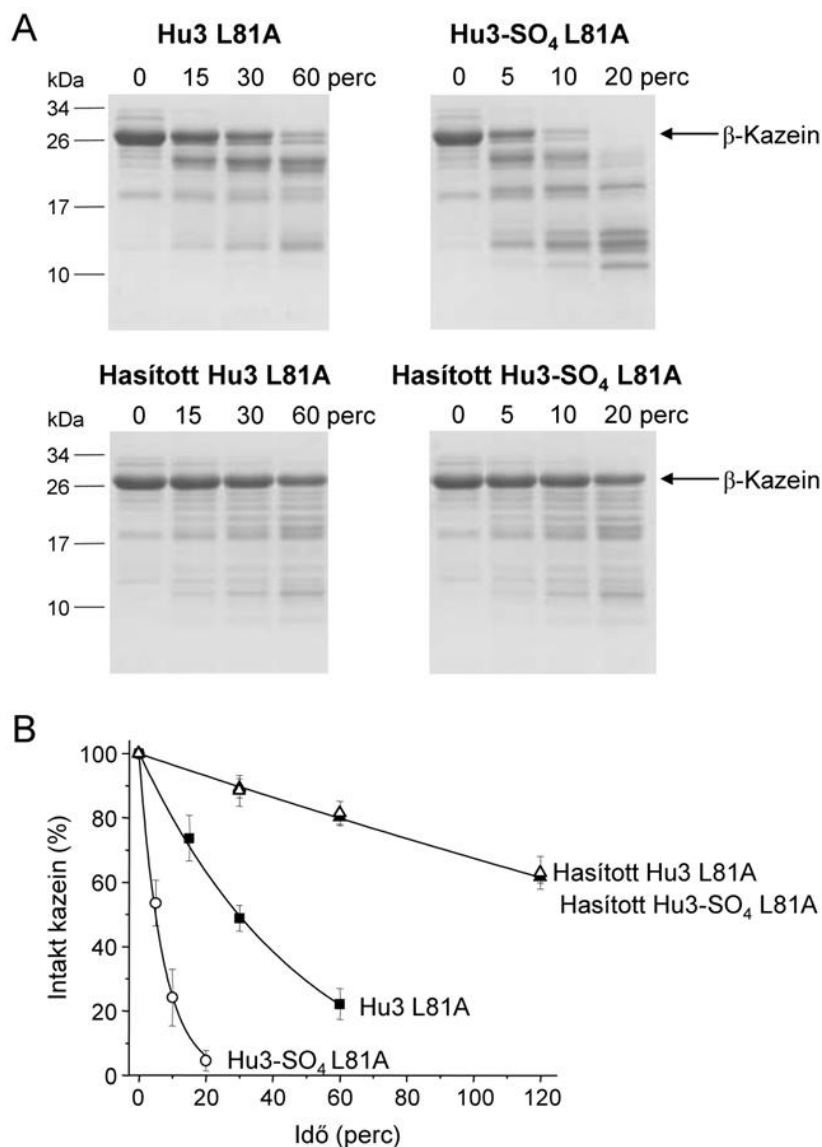
AAPKA-pNA: Suc-Ala-Ala-Pro-Lys-p-nitroanilid; AAPR-pNA: Suc-Ala-Ala-Pro-Arg-p-nitroanilid; GPR-pNA: N-benziloxikarbonil-Gly-Pro-Arg-p-nitroanilid. A táblázatban szereplő adatok három párhuzamos mérés átlagát és szórását mutatják.

	AAPK-pNA		AAPR-pNA		GPR-pNA	
	Hasítatlan	Hasított	Hasítatlan	Hasított	Hasítatlan	Hasított
Nem szulfatált						
k_{cat} (s^{-1})	240 ± 3	240 ± 4	223 ± 2	191 ± 13	154 ± 2	131 ± 2
K_m (μM)	191 ± 9	3223 ± 183	$49,3 \pm 2,3$	1346 ± 213	$36,1 \pm 1,9$	377 ± 16
k_{cat}/K_m ($s^{-1} \mu M^{-1}$)	1,26	0,07	4,52	0,14	4,27	0,35
Szulfatált						
k_{cat} (s^{-1})	156 ± 2	176 ± 2	112 ± 1	119 ± 1	$88,5 \pm 1,3$	136 ± 2
K_m (μM)	$84,2 \pm 4,1$	888 ± 42	$19,0 \pm 1,0$	185 ± 4	$11,1 \pm 0,7$	$93,3 \pm 5,4$
k_{cat}/K_m ($s^{-1} \mu M^{-1}$)	1,85	0,20	5,89	0,64	7,97	1,46

Az eredményeink azt mutatták, hogy a szulfatálás csökkentette a mezotripszinogén K_m és k_{cat} értékét. A K_m érték 2,3-3,3-szoros mértékben, míg a k_{cat} érték 1,5-2-szeres mértékben csökkent a szulfatálás következtében. Mivel a specificitási konstans (k_{cat}/K_m) e két kinetikai paraméter hányadosa, így ebben az értékben egy 1,3-1,9-szeres növekedést tapasztaltunk. Ez az eredmény igazolta azt a felvetésünk, miszerint a szulfatálás hatására fokozódik a mezotripszin katalitikus hatékonysága.

Az autolízis hurok hasítása CTRC által megközelítőleg egy nagyságrenddel növelte az L81A-mezotripszinek K_m értékeit, míg a k_{cat} értékek gyakorlatilag változatlanok maradtak. Ez a változás azt eredményezte, hogy a k_{cat}/K_m értékek a hasított L81A-mezotripszin (mind a nem szulfatált mind a szulfatált forma esetében) egy nagyságrenddel csökkentek az intakt proteázhoz viszonyítva. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a CTRC általi mezotripszin autolízis hurok hasítása jelentősen csökkenti annak funkcióját.

Az eddigi kísérleteink során kizárólag néhány aminosav hosszúságú peptidszubsztrátokat használtunk, így a továbbiakban megvizsgáltuk a mezotripszin formák (nem szulfatált és szulfatált L81A-mezotripszin; CTRC által hasított nem szulfatált és szulfatált L81A-mezotripszin formák) katalitikus aktivitását egy nagyobb fehérje szubsztráton. Kísérleteinkhez a kazeint választottuk, amely kiválóan használható proteázok aktivitásának követésére (12. ábra).



12. ábra. β-kazein emésztése CTRC-vel hasított L81A mezotripszinnel

(A) 2 mg/ml kazeint emésztettünk 10 nM L81A-mezotripszinnel (Hu3) (nem szulfatált, szulfatált, nem szulfatált CTRC-vel hasított és szulfatált CTRC-vel hasított) 1 mM kalcium-klorid jelenlétében 37 °C-on. A jelzett időpontokban kivettünk 100 µl alikvotokat, a fehérjét precipitáltuk és 15 %-os redukáló SDS-poliakrilamid gélen megfuttattuk. (B) Az intakt kazein sávok intenzitás változását denzitometriával értékeltük ki, a pontok három kísérlet átlagát és szórását reprezentálják.

Az intakt L81A-mezotripszin gyorsan emésztette a fehérje szubsztrátot. 60 perc alatt gyakorlatilag teljesen lebontotta a kazeint. Az előző eredményeinknek megfelelően a mezotripszin szulfatálás 5-6-szorosára növelte a kazein emésztés sebességét. A hasítatlan mezotripszinnel ellentétben a CTRC által hasított L81A-mezotripszin formák jóval lassabban degradáltak a β -kazeint. Statisztikai analízist nem végeztünk.

Az előzőekben ismertetett módon számszerűsítettük a hasítás mértékét. A redukáló SDS gélelektroforézis eredményét denzitometriával értékeltük ki, majd a kezdeti β -kazein sávintenzitását 100 %-nak tekintettük és ehhez viszonyítottuk az időben fogyó intakt β -kazein sávok intenzitását (12.B ábra). Az így kapott adatok alapján megállapítottuk, hogy a CTRC általi hasítás a nem szulfatált L81A-mezotripszin esetében közel nyolcszorosára, míg a szulfatált L81A-mezotripszin esetében megközelítőleg harmincszorosára csökkentette az enzim katalitikus aktivitását.

Ezek az eredmények azt bizonyítják, hogy a mezotripszin autolízis hurok CTRC általi processzálása nagyobb szubsztrátok esetében is negatívan befolyásolja az enzim működését.

5.1.4. L81A-mezotripszin inhibitor kötésének vizsgálata

A tripszin inhibitorok, a SPINK1, illetve a szójabab tripszin inhibitor (SBTI) csak kismértékben gátolják a mezotripszint. Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk, milyen hatása van a CTRC általi mezotripszin autolízis hurok hasításának a kisméretű fehérje inhibitor kötődésére tanulmányoztuk a szulfatált L81A-mezotripszin és az SBTI kötődését.

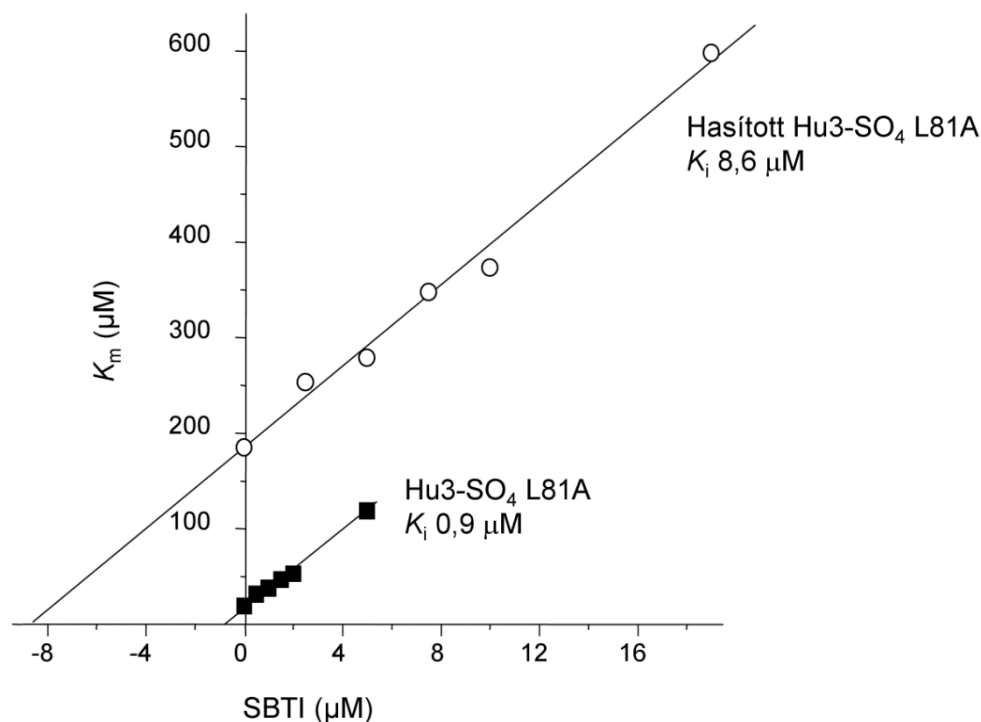
2. Táblázat. Az intakt és CTRC által hasított szulfatált L81A-mezotripszin enzimkinetikai paraméterei SBTI jelenlétében

A mérésekhez a Suc-Ala-Ala-Pro-Arg-p-nitroanilid peptid szubsztrátot használtunk. A táblázatban szereplő értékek három párhuzamos mérés átlagát és szórását mutatják.

Hasítatlan	SBTI nélkül	0,5 μ M	1 μ M	1,5 μ M	2 μ M	5 μ M
k_{cat} (s^{-1})	112 $\pm$ 1	122 $\pm$ 1	114 $\pm$ 1	111 $\pm$ 1	108 $\pm$ 1	117 $\pm$ 2
K_m (μ M)	19,0 $\pm$ 1,0	31,3 $\pm$ 1,8	37,5 $\pm$ 0,9	46,7 $\pm$ 0,9	52,8 $\pm$ 1,9	119 $\pm$ 6
CTRC-hasított	SBTI nélkül	2,5 μ M	5 μ M	7,5 μ M	10 μ M	19 μ M
k_{cat} (s^{-1})	119 $\pm$ 1	124 $\pm$ 1	119 $\pm$ 1	125 $\pm$ 1	119 $\pm$ 1	112 $\pm$ 2
K_m (μ M)	185 $\pm$ 4	254 $\pm$ 8	279 $\pm$ 7	348 $\pm$ 11	373 $\pm$ 12	598 $\pm$ 22

A Michaelis-Menten paramétereket egy rövid kromogén peptid szubsztrát, a Suc-Ala-Ala-Pro-Arg-p-nitroanilid (AAPR-pNA) segítségével határoztuk meg növekvő inhibitor koncentráció mellett. Eredményül azt kaptuk, hogy a K_m érték jelentősen megnőtt, míg a k_{cat} érték szinte teljesen változatlan maradt az SBTI jelenlétében (2. táblázat).

Ezután ábrázoltuk a K_m értékeket a funkcionális SBTI koncentráció függvényében (13. ábra), majd az x tengely metszéspontjából meghatároztuk a gátlási állandó (K_i) értéket (a részletek a 6. ábra aláírásában ismertettük). Az SBTI K_i értéke $0,9 \mu\text{M}$ volt az intakt szulfatált L81A-mezotripszinre vonatkoztatva, ezzel szemben a CTRC által hasított L81A-mezotripszin esetében a K_i érték jelentősen megnőtt ($K_i = 8,6 \mu\text{M}$).



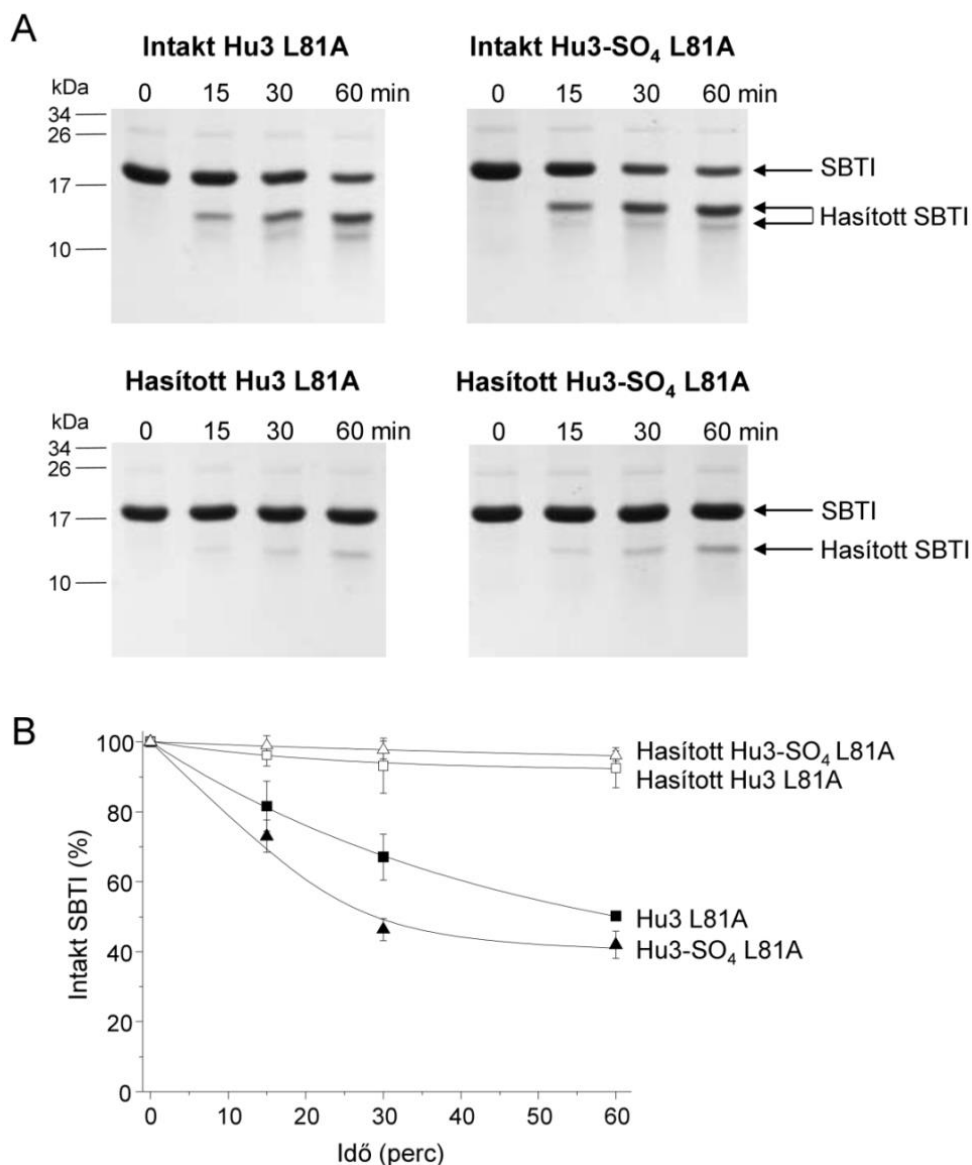
13. ábra. CTRC által hasított L81A-mezotripszin gátlása SBTI inhibitorral

Az intakt (hasítatlan) és a CTRC által hasított szulfatált L81A mezotripszin Michaelis-Menten kinetikai paramétereit Suc-Ala-Ala-Pro-Arg-p-nitroanilid szubsztrát segítségével határoztuk meg SBTI jelenléte nélkül, illetve növekvő SBTI koncentrációknál. A K_m értékeket az SBTI koncentráció függvényében ábrázoltuk. Az inhibitoros állandó (K_i) értéket az illesztett egyenes x tengely metszéspontjából állapítottuk meg. Az adatpontok három mérés átlagát jelenítik meg, a szórást az egyértelműség kedvéért kihagytuk.

A megfigyeléseink azt mutatták, hogy a CTRC általi hasítást követően az inhibitor egy nagyságrenddel gyengébben kötődik a mezotripszinhez. Ez az eredmény összhangban áll a CTRC általi hasítások során mért K_m értékekkel, amelyeket a rövid peptid szubsztrátokon határoztunk meg (1. táblázat).

5.1.5. L81A-mezotripszin inhibitor emésztésének vizsgálata

A mezotripszin több szempontból is különbözik a kationos és anionos tripszin izoformáktól. Azon túl, hogy a mezotripszin nem gátolható jól fehérje tripszin inhibitorokkal, megfigyelték, hogy a mezotripszin proteolitikus hasításokkal képes inaktiválni azokat.



14. ábra. SBTI emésztése CTRC által hasított mezotripszin-L81A-val

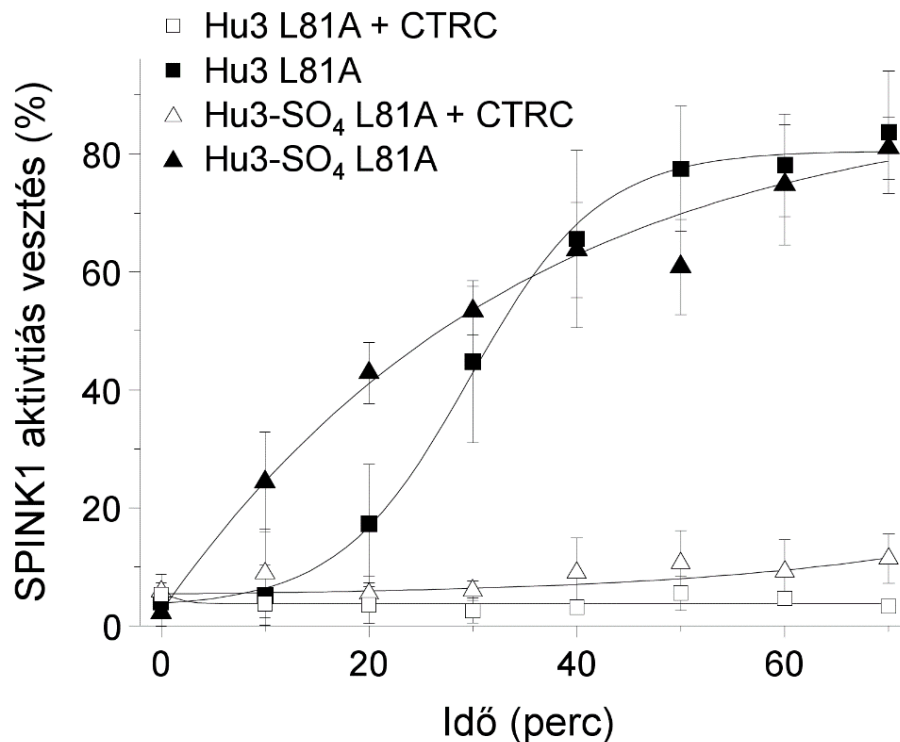
10 μ M SBTI-t inkubáltunk 200 nM L81A-mezotripszinnel (nem szulfatált, szulfatált, nem szulfatált CTRC-vel hasított, illetve szulfatált CTRC-vel hasított) 0,1 M Tris-HCl (pH 8,0) pufferben 37 °C-on. A jelölt időpontokban 75 μ l alikvotokat vettünk ki a reakcióelegyből és megfuttattuk redukáló 15 %-os SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel. Az ábra három párhuzamos kísérlet egyikét mutatja. (B) Az intakt SBTI fehérjesávok intenzitásának változását denzitometriásan számszerűsítettük. Az adatpontok három párhuzamos kísérlet átlagát és szórását mutatják.

Az előző eredményeink igazolták, hogy a mezotripszin gyengébben kötődött az inhibitorokhoz abban az esetben, ha a CTRC hasította az enzim autolízis hurok régióját. Így a következő kísérleteink arra irányultak, hogy a gyengébb kötődés csökkent tripszin inhibitor emésztéssel társul-e. A mezotripszin hasítja az SBTI reaktív hely peptidkötését az inhibitor hurokban, amely egy 50-50 %-os egyensúlyhoz vezet a hasított és nem hasított SBTI forma között. Megvizsgáltuk redukáló SDS-PAGE segítségével, hogy az intakt és a CTRC által hasított L81A-mezotripszin formák (nem szulfatált és szulfatált) hogyan emésztik az SBTI-t (14. ábra).

Az előző kísérletekhez hasonlóan denzitometria segítségével számszerűsítettük a hasítás mértékét. Ezúttal a hasítatlan SBTI sávintenzitását tekintettük 100 %-nak és ehhez az értékhez viszonyítottuk a további időpontokban kapott intakt SBTI sávintenzitását.

A korábbi eredményeinkkel összhangban a szulfatált L81A-mezotripszin több mint kétszer olyan gyorsan hasította az SBTI-t, mint a nem szulfatált L81A-mezotripszin, amely egy sokkal gyorsabb egyensúlyi állapot eléréséhez vezetett, azonban szignifikanciát nem számoltunk. Miután CTRC-vel hasítottuk a mezotripszin autolízis hurok régióját, az SBTI emésztés sebessége jelentősen lecsökkent. Mind a nem szulfatált mind a szulfatált L81A-mezotripszin szinte teljesen inaktívvá vált.

Végezetül az intakt és CTRC által hasított L81A-mezotripszin formákat (nem szulfatált és szulfatált) humán SPINK1 inhibitorral inkubáltuk (15. ábra). A mezotripszin több helyen is hasítja a SPINK1 fehérjét, ami teljes degradációt eredményez. A tripszint gátló hatás gyengülésével követtük nyomon a SPINK1 bomlását. A kísérletünk során a kationos tripszin aktivitását mértük kromogén szubsztrát segítségével a különböző L81A-mezotripszin formákkal (nem szulfatált és szulfatált intakt enzim, illetve CTRC által hasított szulfatált és nem szulfatált mezotripszin) előinkubált SPINK1 hozzáadását követően.



15. ábra. Humán SPINK1 bontása CTRC által hasított L81A-mezotripszinnel

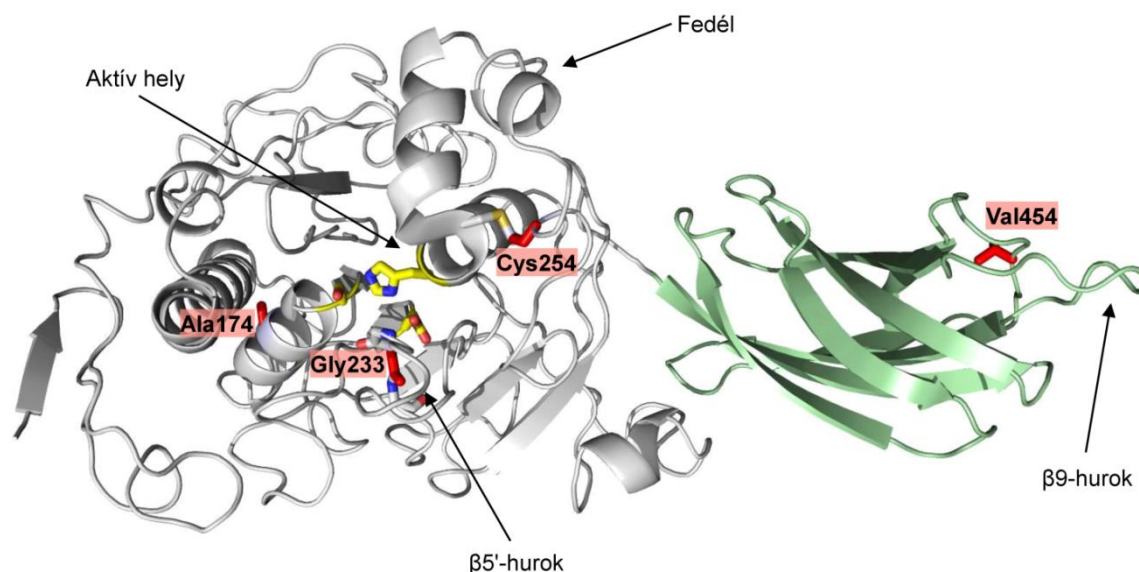
0,5 μ M SPINK1 tripszin inhibitorot inkubáltunk 200 nM L81A-mezotripszinnel (nem szulfatált, szulfatált, CTRC-vel hasított nem szulfatált, illetve CTRC-vel hasított szulfatált mezotripszin) 0,1 M Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM CaCl₂ és 0,05% Tween 20 pufferben 37 °C-on 200 μ l végtérfogatban. A jelölt időpontokban kivettünk 5 μ l alikvotokat és összekevertünk 40 μ l 55 nM kationos tripszinnel. Három perc inkubáció után megmértük a kationos tripszin aktivitását 5 μ l 6 mM Suc-Ala-Ala-Pro-Lys-p-nitroanilid szubsztrát hozzáadása után. A SPINK1 inhibitor inaktiválását százalékosan fejeztük ki a kationos tripszin aktivitásának relatív értékéből. A mérési pontok három kísérlet átlagát és szórását reprezentálják.

Eredményül azt kaptuk, hogy az intakt szulfatált és nem szulfatált L81A-mezotripszin degradálta a SPINK1 inhibitorot a 60 perc hosszúságú mérési idő alatt. A szulfatált forma aktívabbnak bizonyult, mint a nem szulfatált mezotripszin. Ezzel szemben a CTRC által hasított L81A mezotripszin nem volt képes emészteni a SPINK1-et, így ebben az esetben a SPINK1 gátló funkciója csak elhanyagolható mértékben (szulfatált forma) vagy egyáltalán nem (nem szulfatált forma) csökkent. Eredményeinkből arra következtethetünk, hogy a CTRC specifikus proteolitikus hasításokkal inaktiválni képes a mezotripszint ezzel védve a SPINK1 inhibitorot a mezotripszin bontó aktivitásával szemben.

5.2. Hasnyálmirigy lipáz mutációk szerepének vizsgálata krónikus hasnyálmirigy-gyulladásban

5.2.1. Humán hasnyálmirigy lipáz (PNLIP) mutációk

Munkánk során négy missense hasnyálmirigy lipáz (PNLIP) mutációt karakterizáltunk (A174P, C233E, C254R, V454F). Egy a Protein Data Bank adatbázisban található kristályszerkezet alapján létrehoztuk a lipáz háromdimenziós szalagmodelljét kiemelve az érintett aminosavakat (16. ábra).



16. ábra. A humán hasnyálmirigy lipáz (PNLIP) szalagmodellje.

Az ábrát a PyMOL 2.4.1 (Schrödinger LLC) programmal készítettük a Protein Data Bankban (PDB) található 1LPB fájl atomi koordinátái alapján. A modellben jelöltük az *N-terminális* és *C-terminális* doméneket, az *aktív centrumot*, az általunk vizsgált *mutációkat* és azokat a szerkezeti elemeket, amelyeket befolyásolhat az aminosavcsere.

Az Ala174, Gly233 és a Cys254 mutációs helyek a lipáz N-terminális doménjében találhatóak, közel a katalitikus helyhez. Az Ala174 a szerkezetileg fontos α -hélix része, amely felelős a katalitikus triád szerin aminosav pozicionálásért az aktív centrumban. A Gly233 részt vesz a β 9-hurok kialakításában, míg a Cys254 diszulfidkötést képez a 278. pozícióban található ciszteinnel, ezzel stabilizálva a fedélnek nevezett felszíni hurok régiót. Ezek a hurok motívumok befolyásolják a triglicerid szubsztrátok hozzáférését a katalitikus triádhoz. A Val454 a C-terminális domén úgynevezett β 5' felszíni hurok régiójában helyezkedik. Ez a domén a fedéllel együttműködve részt vesz a lipáz lipidcseppekhez való kötődésében.

A genetikai vizsgálatok azt mutatták, hogy a PNLIP-ben azonosított ritka A174P, G233E, C254R és V454F mutációk heterozigóták és mind krónikus hasnyálmirigy-gyulladásban szenvedő betegekben mind egészséges egyéneknél előfordulhatnak. A mutációkat Polyphen2 és SIFT fehérje funkciót prediktáló szoftverek segítségével vizsgáltuk, amelyek azt mutatták, hogy a mutációk jelenléte valószínűleg káros a PNLIP szerkezetére, illetve funkciójára nézve (3. Táblázat).

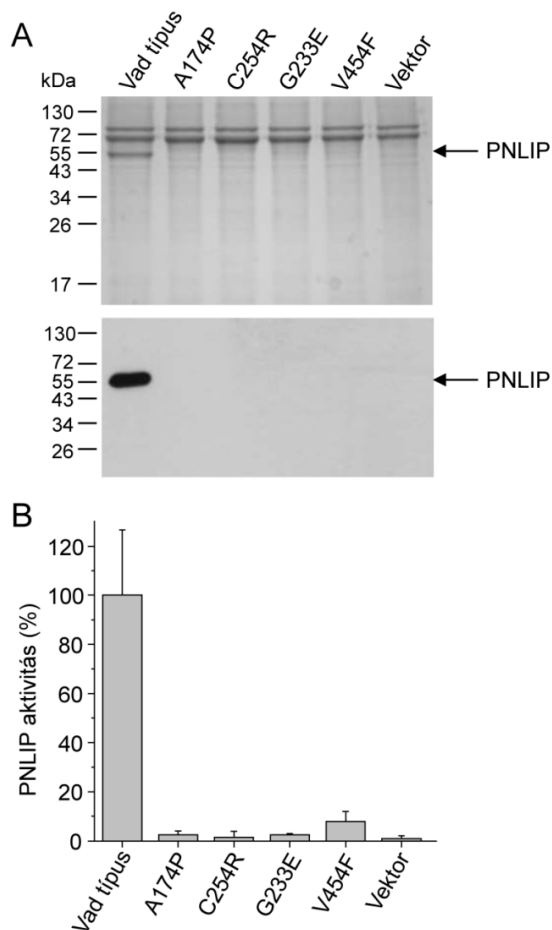
3. Táblázat. Csökkent szekréción mutató missense PNLIP mutációk

A mutációk jellemzői, valamint a Polyphen2 és SIFT programok által jósolt patogenitásuk. CP – krónikus pancreatitis

Exon	Nukleotidcsere	Aminosav csere	CP hordozó	Nem CP hordozó	Hordozók előfordulása a gnomAD-ben	Polyphen2	SIFT
6	c.520G>C	p.A174P	0	1	Nincs közölve	Valószínűleg káros	Tolerált
8	c.698G>A	p.G233E	1	0	0,0008%	Valószínűleg káros	Káros
8	c.760T>C	p.C254R	1	0	0,0035%	Valószínűleg káros	Káros
13	c.1360G>T	p.V454F	0	1	0,0040%	Valószínűleg káros	Káros

Egy közelmúltban megjelent publikáció rávilágított, hogy az A174P, G233E, C254R és V454F PNLIP variánsok emlős sejtekben gyengén szekretálódnak (103). Annak érdekében, hogy megerősítsük és kiterjesszük a korábbi megfigyeléseket HEK 293T sejteket transzfektáltunk vad típusú és mutáns PNLIP plazmidokkal. Ezt követően vizsgáltuk a lipáz mennyiségét a transzfektált sejtek médiumában 48 órával a transzfekciót követően redukáló SDS poliakrilamid gélelektroforézissel, amit Coomassie blue festés vagy western blot analízis követett (17.A ábra).

A vad típusú lipázzal ellentétben, amely megfelelő mértékben szekretálódott, egyik PNLIP mutáns sem volt detektálható a transzfektált sejtek médiumában, amelyet az SDS-PAGE-t követő Coomassie blue festés (17.A ábra, felső panel) és az immunoblot analízis (14.A ábra, alsó panel) is megerősített.



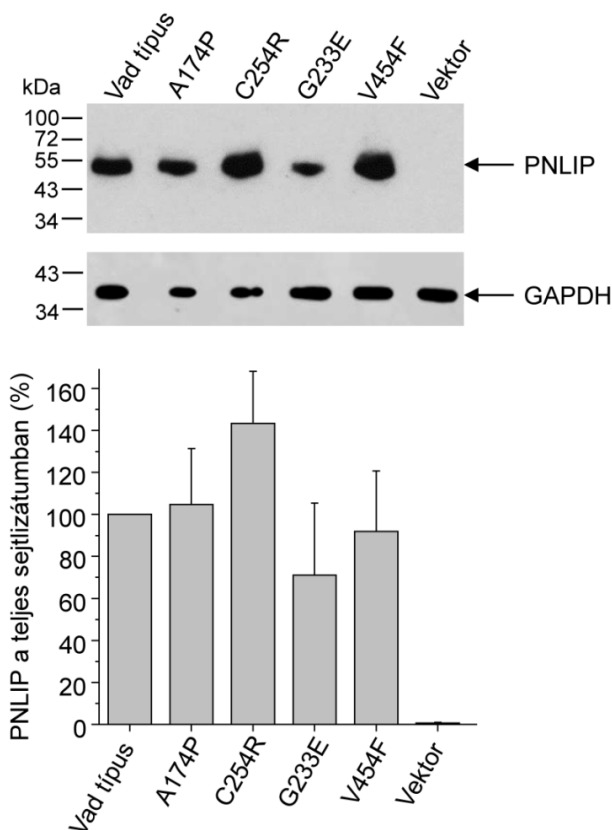
17. ábra. A vad típusú és mutáns PNLIP fehérjék szekréciója HEK 293T sejtekben.

(A) PNLIP szekréciót a transzfektált sejtek médiumában vizsgáltuk 48 órával a transzekciót követően SDS-PAGE és Coomassie blue festéssel (felső panel), illetve western blot analízissel (alsó panel) az *Anyagok és Módszerek* fejezetben ismertetett módon. Az ábra négy párhuzamos kísérlet egyikét mutatja. (B) A PNLIP szekrécióját a transzfektált sejtek médiumának aktivitásmérésével is meghatároztuk az *Anyagok és módszerek* részben leírtak alapján. Az ábrán három párhuzamos mérés átlagértékét és szórását tüntettük fel.

A gátolt PNLIP szekréció igazolására megmértük a kondicionált médiumok lipáz aktivitását is végpontméréssel, amelyhez p-nitrofenil palmitát szubsztrátot használtunk (17.B ábra). A lipáz aktivitására a 405 nm-en mért abszorbanciából következtettünk. A vad típusú PNLIP-et tartalmazó médium aktivitását 100 %-nak tekintettük, majd ehhez viszonyítottuk a lipáz variánsokat tartalmazó médiumok aktivitását. Az eredmények megerősítették, hogy a vad típusú PNLIP-től eltérően, amely jól szekretálódott a sejtekből, a mutánsok nem voltak kimutathatóak a médiumban.

A korábbi kísérletek alapján feltételezhető, hogy a PNLIP variánsok gyenge szekréciója HEK 293T sejtekben vagy a gyenge fehérje termelésnek vagy a fehérjék hibás feltekeredésnek, illetve sejten belüli retenciójának köszönhető.

A sejten belüli PNLIP variánsok mennyiségének vizsgálata érdekében lizáltuk a sejteket 48 órával a transzfekciót követően és a lipáz variánsokat redukáló SDS poliakrilamid gélelektroforézist követő western blottal analizáltuk (18. ábra). A kapott sávokat denzitometriával számszerűsítettük, majd a GAPDH belső kontroll segítségével határoztuk meg az expresszió mértékét. Ezt követően a vad típusú PNLIP fehérjemennyiségét tekintettük 100 %-nak és ehhez viszonyítottuk a mutáns lipázok fehérjemennyiségét.

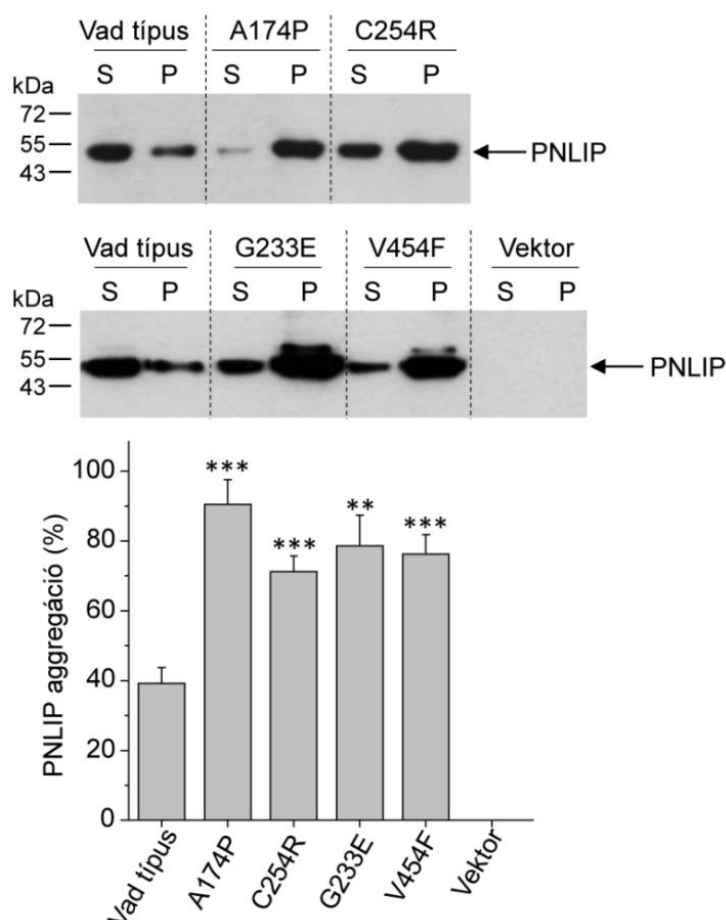


18. ábra. A vad típusú és mutáns PNLIP fehérjék expressziójának vizsgálata HEK 293T sejtlizátumokban.

48 órával a transzfekciót követően feltártuk a sejteket, majd meghatároztuk a sejtlizátumok PNLIP mennyiségét SDS-PAGE-t követő immunoblottal. Kontrollként GAPDH fehérjét detektáltunk (felső panel). A teljes sejtlizátumok relatív PNLIP mennyiséget denzitometriával számszerűsítettük. A PNLIP sávok intenzitását a GAPDH sávok intenzitásához normalizáltuk, majd a mutáns lipázok expresszióját a vad típusú lipázhoz képest ábrázoltuk százalékban kifejezve. Az oszlopdiagram három párhuzamos kísérlet átlagát és szórását mutatja (alsó panel).

Az eredményeink azt mutatták, hogy minden PNLIP variáns termelődik, mivel a PNLIP variánsok sejten belüli mennyisége közel azonos a vad típusú lipáz mennyiségével. Ebből az eredményből a transzfekció sikerességére is következtethetünk.

Miután igazoltuk, hogy a csökkent szekréció nem a fehérjetermelés hibájának tulajdonítható, be akartuk bizonyítani, hogy a rosszul feltekeredett fehérjék oldhatatlan aggregátumokat hoznak létre a sejten belül. Az összezsapzódott fehérjék ultracentrifugálással elkülöníthetők az oldatban lévő fehérjéktől, így a sejtizátumokat ultracentrifugáltuk, hogy elválasszuk egymástól az oldható és oldhatatlan frakciókat, majd SDS-PAGE-t követő western blottal vizsgáltuk a frakciók PNLIP mennyiségét (19. ábra).



19. ábra. A PNLIP variánsok sejten belüli felhalmozódásának vizsgálata HEK 293T sejtekben.

A sejtizátumokat ultracentrifugáltuk, majd a felülúszót (S) és a csapadékot (P) SDS-PAGE-t követő western blot analízissel vizsgáltuk az Anyagok és Módszerek fejezetben leírtak szerint (felső panel). A PNLIP sávok intenzitását denzitometriával kvantifikáltuk. A PNLIP aggregációt az alábbi formula alapján számítottuk: $P/(S+P) \cdot 100$ (alsó panel). A diagram három különböző mérés átlagát és szórását mutatja. A statisztikai analízist az Anyagok és Módszerek fejezetben leírtak alapján végeztük. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Az aggregálódott és oldatban található PNLIP mennyiségére a fehérjesávok denzitometriás kiértékeléséből következtettünk és meghatároztuk, hogy az oldhatatlan csapadékban megtalálható lipáz mennyisége hány százaléka a sejtizátum teljes lipáz mennyiségének. A várttal megegyezően a vad típusú lipáz főként az oldható frakcióban, míg a PNLIP mutánsok elsősorban az oldhatatlan csapadékban voltak megtalálhatóak.

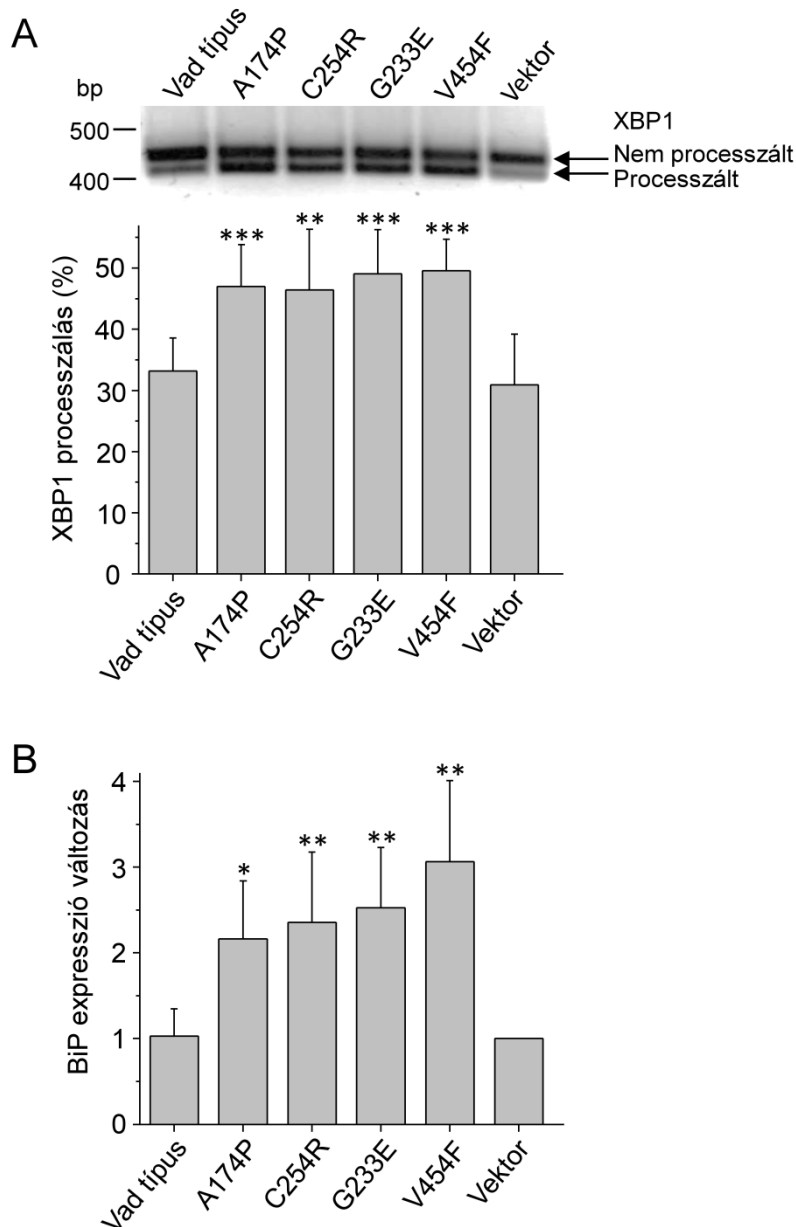
5.2.2. Endoplazmás retikulum (ER) stressz válasz HEK 293T sejtekben

A korábban ismertetett eredmények azt mutatják, hogy a PNLIP variánsok felhalmozódnak és sejten belüli oldhatatlan aggregátumokat hoznak létre HEK 293T sejtekben. Ezek a megfigyelések előrevetítik, hogy a mutációt tartalmazó PNLIP fehérjék súlyosabb szekréciós defektust okoznak, amely ER stresszt indukálhat.

Hipotézisünk tesztelésére a sejteket feltártuk 48 órával a transzfekciót követően és össz-RNS-t izoláltunk azokból, amelyet átírtuk cDNS-sé reverz transzkripciót alkalmazva. Az ER stressz mértékét két ER stressz marker, az XBP1 transzkripciós faktor és az ER egyik fő dajkafehérjéjének (BiP) vizsgálatával határoztuk meg (20. ábra).

A rosszul feltekeredett fehérjék felhalmozódnak az ER-ben, amelyek hatására különböző szignál transzdukciós útvonalak indulnak el, többek között az inozitolt igénylő enzim-1 α (IRE1 α) aktiváció. Az IRE1 α processzálja az XBP1 mRNS-t, létrehozva egy rövidebb formát, amely templátként szolgál az XBP1 fehérje szintéziséhez. Az XBP1 mRNS érés mértékét RT-PCR segítségével követtük, majd agaróz gélelektroforézissel detektáltuk (20.A ábra). A sávok intenzitását denzitometriás analízissel számszerűsítettük, majd kiszámoltuk, hogy a teljes XBP1 mRNS (a teljes hosszúságú és a szerkesztett mRNS összege) hány százaléka ment keresztül az mRNS érése (szerkesztett mRNS mennyisége).

Az eredményeink azt mutatják, hogy az XBP1 mRNS érés szignifikánsan emelkedett azokban a sejtekben, amelyeket a PNLIP variánsokkal transzfektáltunk a vad típusú lipázzal transzfektált sejtekhez képest. Az XBP1 mRNS érés mértéke közel 10 %-kal magasabb volt a mutáns lipázzal transzfektált sejtek esetében (A174P: 47 $\pm$ 6,84 %, C254R: 46,43 $\pm$ 9,93 %, G233E: 49,05 $\pm$ 7,22 %, V454F: 49,6 $\pm$ 5,12%) a vad típusú transzfektált sejtekhez képest (33,17 $\pm$ 5,4 %).



20. ábra. A PNLIP variánsok hatása az endoplazmatikus retikulum (ER) stressz markerekre HEK 293T sejtekben.

A sejteket lizáltuk 48 órával a transzekciót követően és össz-RNS-t izoláltunk azokból, amelyet reverz transzkripcióval átírtuk cDNS-sé. (A) Az XBP1 mRNS splicingot PCR amplifikáció és agaróz gél elektroforézis segítségével vizsgáltuk (felső panel). A hasított és nem hasított DNS sávok intenzitását denzitometriával számszerűsítettük. Az XBP1 mRNS érés mértékét az alábbi formula alapján számoltuk: $\text{processzált}/(\text{nem-processzált} + \text{processzált}) \cdot 100$. Az adatok 9 párhuzamos mérés átlagát és szórását mutatják. (B) A BiP mRNS expressziót kvantitatív RT-PCR-rel TaqMan próbákkal vizsgáltuk. A BiP expressziós szintet GAPDH mRNS szintjére normalizáltuk, majd kiszámoltuk az expresszió változást az üres pcDNA3.1(-) plazmid DNS-sel transzekált sejtekben mért értékekhez képest. A diagram hat párhuzamos mérés átlagát és szórását mutatják. A statisztikai analízist az Anyagok és Módszerek fejezetben leírtak alapján végeztük. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$

Az endoplazmás retikulum chaperon BiP expressziója megnövekszik, amikor az ER-ben túlságosan nagy mennyiségben vannak jelen a rosszul feltekeredett fehérjék. A BiP mRNS szintjét RT-qPCR-al és TaqMan próbával vizsgáltuk a vad típusú és mutáns lipázokkal transzfektált sejtek cDNS mintáiban (20.B ábra). A vad típusú PNLIP által transzfektált sejtekkel összehasonlítva 2,2-3,0-szoros BiP mRNS expressziós szintnövekedés figyelhető meg a PNLIP variánsok esetében. (Vad típus: $1,03 \pm 0,32$, A174P: $2,16 \pm 0,68$, C254R: $2,36 \pm 0,82$, G233E: $2,52 \pm 0,71$).

Az eredmények azt mutatták, hogy a felhalmozódott rosszul feltekeredett PNLIP variánsok ER stresszt indukálnak HEK 293T sejtekben.

5.2.3. PNLIP variánsok szekréciója és feltekeredése AR42J sejtekben

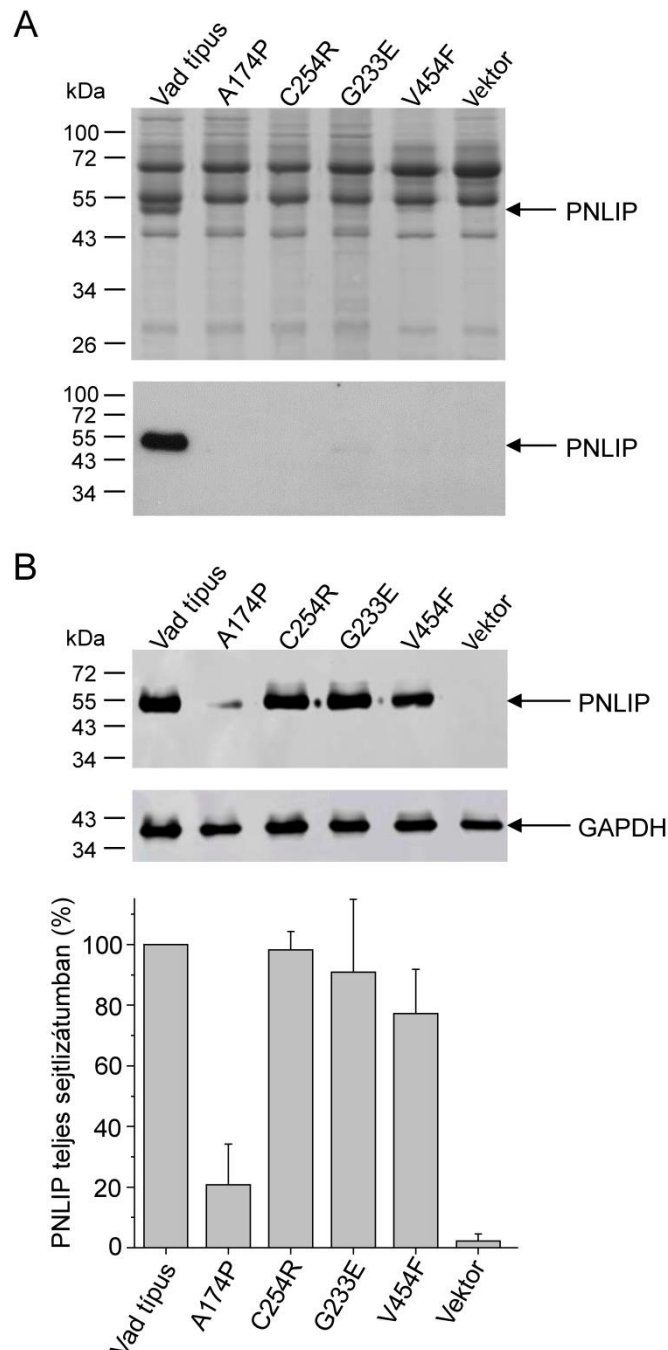
Az acinus irányba differenciált AR42J patkány hasnyálmirigy sejtek alkalmasabbak a humán acinus sejtek által termelt fehérjék szekréciójának és sejtes hatásainak vizsgálatára. A sejtvonal egyetlen hátránya, hogy kis hatékonysággal transzfektálható plazmid vektorokkal. Annak érdekében, hogy bejuttassuk a PNLIP gént az AR42J sejtekbe, rekombináns adenovírus vektorokat hoztunk létre, amik hordozzák a vad típusú és mutáns lipázt.

A vad típusú és mutáns PNLIP szekrécióját 48 órával a transzdukciót követően vizsgáltuk redukáló SDS-PAGE-t követő Coomassie blue festéssel és immunoblottal (21.A ábra). Az eredmények megfelelnek a HEK 293T sejtvonalban kapottakkal. A vad típusú lipáz készségesen szekretálódott AR42J sejtekben, míg a PNLIP variánsok szekréciós defektust mutattak, mivel egyik lipáz variánst sem tudtuk detektálni a transzduktált sejtek médiumában.

A PNLIP aktivitását nem tudtuk meghatározni a transzduktált hasnyálmirigy sejtek médiumában, ami valószínűleg annak köszönhető, hogy magas az endogén lipáz enzim szekréciója, amely gyorsan degradálja a p-nitrofenil palmitát szubsztrátot és elfedi a PNLIP aktivitását.

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a PNLIP variánsok AR42J sejten belüli mennyiségét, feltártuk a sejteket 48 órával a transzdukció után, majd SDS-PAGE-t követő western blot analízissel detektáltuk a lipázt (21.B ábra). A kapott sávokat denzitometria segítségével számszerűsítettük, majd GAPDH-ra normalizáltuk. Ezt követően a vad típusú PNLIP fehérjemennyiségét tekintettük 100 %-nak és ehhez viszonyítottuk a mutáns lipázok fehérjemennyiségét.

Az eredményeink azt mutatták, hogy a sejten belüli PNLIP G233E, C254R és V454F fehérjeszintje közel azonos a vad típusú lipáz mennyiségével. Ezzel ellentétben az A174P variáns mennyisége lényegesen csökkent, valószínűleg a sejten belüli degradációnak köszönhetően.

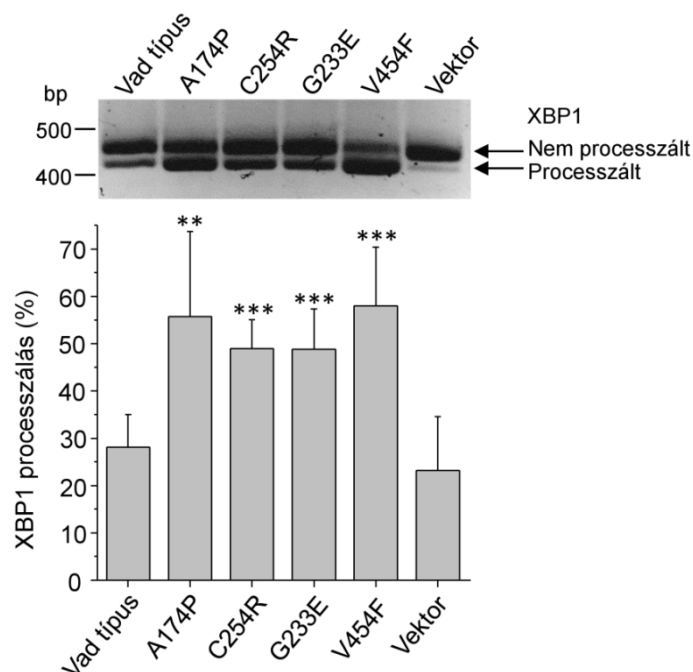


21. ábra. A vad típusú és mutáns PNLIP fehérjék expressziójának vizsgálata AR42J sejtekben.

A sejteket transzduktáltuk a PNLIP cDNS-t hordozó adenovírus vektorokkal, majd 48 óra után begyűjtöttük a médiumot és feltártuk a sejteket. (A) PNLIP variánsok szekrécióját a médiumba SDS-PAGE és Coomassie Blue festéssel (felső panel) és western blot analízissel (alsó panel) követtük. Az itt bemutatott ábrák három párhuzamos kísérlet reprezentatív ábrái. (B) A teljes sejtlizátum PNLIP mennyiségét immunoblot analízissel is vizsgáltuk. Kontrollként GAPDH-t használtunk. Három párhuzamos kísérlet reprezentatív ábrája került bemutatásra (felső panel). A PNLIP fehérjék relatív mennyiségét denzitometriával számszerűsítettük (alsó panel). A PNLIP relatív mennyiségét GAPDH-ra normalizáltuk, majd a mutáns lipázok expressziós szintjét a vad típusú lipázhoz viszonyítottuk.

5.2.4. ER stressz markerek vizsgálata AR42J sejtekben

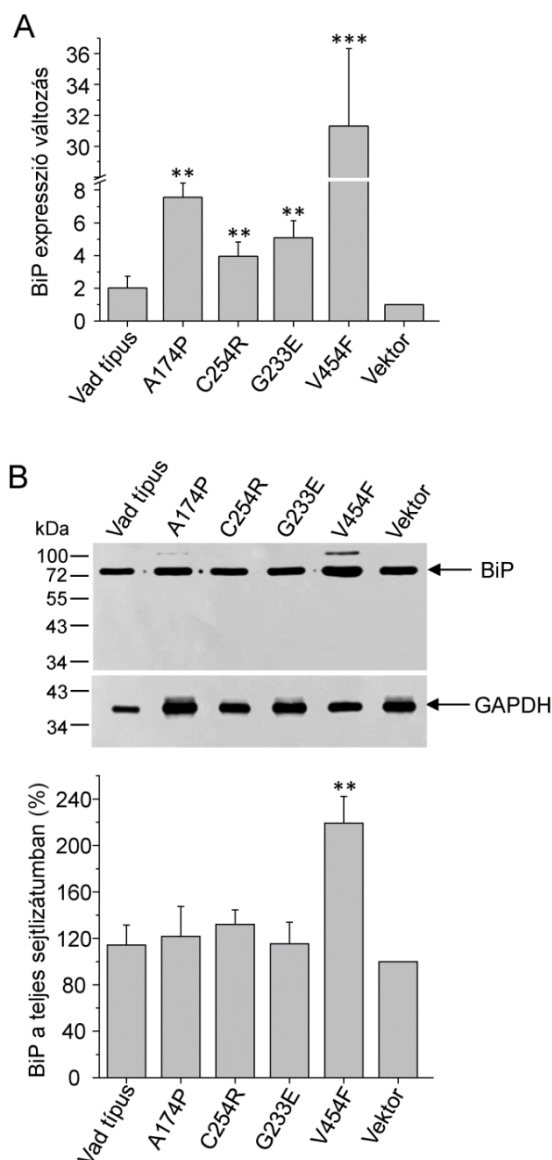
A PNLIP variánsok szekréciós defektusa azt sejteti, hogy kialakulhat ER stressz a patkány hasnyálmirigy sejtekben is. Ezért a HEK 293T sejtvonalon végzett kísérletekkel megegyezően két ER stressz indikátor szintjét vizsgáltunk: az XBP1 mRNS érést és a BiP mRNS expressziót 48 órával a transzdukciót követően. A sávok intenzitását denzitometriás analízissel vizsgáltuk, majd meghatároztuk, hogy a teljes XBP1 mRNS (a teljes hosszúságú és a processzált mRNS összege) hány százaléka az érett XBP1 mRNS (processzált mRNS mennyisége). A lipáz variánsokkal transzduktált sejtek esetében lényegesen megnövekedett az XBP1 mRNS érés (A174P: $65,89 \pm 10,91$ %, C254R: $49,34 \pm 6,7\%$, G233E: $51,51 \pm 6\%$, $55,45 \pm 12,06$ %) a vad típusú lipázzal transzduktált sejtekben mért XBP1 éréshez képest ($30,82 \pm 2,12\%$).



22. ábra. A PNLIP variánsok hatása az endoplazmás retikulum (ER) stressz marker, XBP1 mRNS érés mértékére AR42J sejtekben.

A sejteket feltártuk 48 órával a transzdukciót követően, majd össz-RNS-t izoláltunk, amelyből reverz transzkripcióval cDNS-t szintetizáltunk. Az XBP1 mRNS érését PCR amplifikációval és agaróz gélelektroforézissel vizsgáltuk (felső panel). A processzált és nem-processzált DNS sávokat denzitometráltuk, majd az alábbi formulát alkalmazva határoztuk meg az XBP1 mRNS érés mértékét: $\text{processzált}/(\text{nem-processzált} + \text{processzált}) * 100$ (alsó panel). A diagram hat párhuzamos kísérlet átlagát és szórását mutatja. A statisztikai analízist az Anyagok és Módszerek fejezetben leírtak alapján végeztük. $**P \leq 0,01$; $***P \leq 0,001$.

A rosszul feltekeredett PNLIP variánsok megközelítőleg kétszeresére növelték a patkány hasnyálmirigy sejtekben az XBP1 mRNS érést (22. ábra).



23. ábra. A PNLIP mutánsok hatása az endoplazmás retikulum stressz marker BiP expressziós szintjére AR42J sejtekben.

(A) A BiP mRNS expressziót kvantitativ valósídejű PCR segítségével határoztuk meg, TaqMan próbát alkalmazva. A BiP expressziót GAPDH mRNS szintre normalizáltuk, majd az üres vektort tartalmazó adenovírus vektorral transzduktált sejtek BiP mRNS szintjéhez viszonyítottuk. Az eredmények három független kísérlet átlagát és szórását mutatják. (B) A BiP fehérje szintjét SDS-PAGE-et követő western blot analízissel határoztuk meg AR42J sejtekben. Kontrollként GAPDH-t használtunk. A gél három párhuzamos kísérlet egyikét mutatja (felső panel). A BiP relatív mennyiségét denzitometriával kvantitáltuk (alsó panel). A BiP sávok mennyiségét GAPDH-hoz normalizáltuk, majd az üres vektort tartalmazó adenovírusokkal transzduktált sejtek BiP mennyiségéhez viszonyítottuk. Az eredmények három mérés átlagát és szórását demonstrálják. A statisztikai analízist az Anyagok és Módszerek fejezetben leírtak alapján végeztük. ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$

Ezen felül a BiP mRNS expressziós szintje is megemelkedett a PNLIP variánsokkal transzduktált sejtek esetében (23.A ábra).

A BiP mRNS mennyisége 4,0-7,8-szor magasabb volt azokban a patkány hasnyálmirigy sejtekben, amelyeket PNLIP A174P ($7,57 \pm 0,85$), G233E ($5,1 \pm 1,03$) és C254R ($3,97 \pm 0,86$) PNLIP gént hordozó adenovírusokkal transzduktáltunk, összehasonlítva a vad típusú lipázt expresszáló sejtekkel ($2,02 \pm 0,71$). Érdekes módon, a BiP mRNS szintje azokban a sejtekben, amelyek V454F ($31,3 \pm 5,04$) mutáns expresszáltak 15-szörös emelkedést mutatott a vad típusú lipázzal transzduktált sejtekhez viszonyítva.

Annak érdekében, hogy megerősítsük, a mutációt hordozó lipázok nemcsak mRNS szinten, hanem fehérje expressziós szinten is okoznak különbségeket megvizsgáltuk a BiP fehérje mennyiségét az AR42J sejtek esetében (23.B ábra) western blot analízissel.

A BiP fehérjesávok intenzitását denzitometriával számszerűsítettük, majd a GAPDH-ra (belső kontrol) normalizáltuk. Ezt követően az üres vektorral transzduktált sejtekben megtalálható BiP mennyiségét tekintettük 100 %-nak (annak érdekében, hogy az eredményeink összehasonlíthatóak legyenek a qPCR során kapott adatokkal) és ehhez viszonyítottuk a vad típusú és mutáns lipázokkal transzduktált sejtek BiP mennyiségét.

Meglepő módon a BiP fehérje mennyisége közel azonos volt a vad típusú lipázzal, illetve az A174P, G233E és C254R variánsokkal transzduktált sejtek esetében is. Kizárólag a V454F esetében volt megfigyelhető kétszeres fehérje mennyiség növekedés. A jelenség lehetséges magyarázata, hogy a fehérjemennyiséget olyan tényezők is befolyásolják, amelyek függetlenek az mRNS mennyiségétől (fehérje módosítások, degradáció, stb.). Ezen felül a fehérjeszintézis időigényes folyamat és időben késleltetve követi a transzkripció változásokat. Mivel az mRNS és a fehérje expressziót azonos időben vizsgáltuk (48 órával a transzdukciót követően), előfordulhat, hogy fehérjeszinten később tapasztaltunk volna jelentősebb változást, de kísérleteink főként az mRNS változásokra fókuszáltak.

Összegzésképpen elmondható, hogy az általunk vizsgált mutációk szekréción defektust okoztak, ennek következtében a lipáz variánsok felhalmozódtak a sejtekben és ER stresszt indukáltak. Megfigyeléseink arra engednek következtetni, hogy a lipáz variánsok növelhetik a hasnyálmirigy-gyulladás kialakulásának kockázatát.

6. DISZKUSSZIÓ

A mezotripszin egy különleges humán emésztő proteáz, amely nagy valószínűséggel arra evolválódott, hogy eméssze az étkezési tripszin inhibitorokat (48,49,56,59,105-107). A mezotripszin csak kismértékben gátolható a fehérje proteáz inhibitorokkal, ami az S2' alhelyen található töltött hosszú oldallánccal rendelkező Arg198 aminosavnak köszönhető. Ez az aminosav csere akadályozza az inhibitor kötődését. A sztérikus változásokból eredő csökkent kötődés nemcsak azt vonja maga után, hogy a tripszin inhibitorok gyengébb mértékben gátolják a mezotripszint, hanem azt is, hogy a proteáz hatékonyan emésztí azokat a reaktív hurok hasításával. Az Arg198 aminosavcserén kívül számos más oldallánc cseréje is megfigyelhető a mezotripszinben, amelyek megkönnyítik az inhibitorok emésztését (60).

Korábbi megfigyelések azt mutatták, hogy a mezotripszin inaktiválni képes a hasnyálmirigy acinus sejtjei által termelt tripszin inhibitort, a SPINK1-et, melynek feladata, hogy védje a hasnyálmirigyet potenciálisan a szerven belül megjelenő patológiás tripszin aktivitás ellen (15,105). A funkcionális SPINK1 csökkenése fokozhatja a pancreatitis kialakulásának esélyét. A csökkent SPINK1 mennyiség lehet genetikai eredetű a SPINK1 génben előforduló funkcióvesztő mutáció eredménye, illetve a krónikus hasnyálmirigy-gyulladás következménye is. A CTRC proteáz szintén szabályozza a kóros tripszin aktivációt a hasnyálmirigy védelmében (62). Azt feltételeztük, hogy a CTRC hasítások hatással lehetnek a mezotripszin funkciójára oly módon, hogy mérséklék a SPINK1 lebomlását.

A CTRC szabályozó szerepét már karakterizálták a két fő tripszinogén izoforma (kationos és anionos) esetében. A kationos tripszinogénben a CTRC hasítóhely a kalciumkötő hurokban a Leu81 után található (41,83,108). A CTRC általi hasítást egy triptikus hasítás követi az Arg122 aminosav után, amely a tripszin bomlását és ezáltal inaktivációját eredményezi. Ezen felül az aktivációs peptidben is található egy CTRC hasítóhely a Phe18 után, a hasítás során egy N-terminális tripeptidet távolít el (83,109). Ez a hasítás gyorsabb autoaktivációt eredményez, mivel a tripszinogén aktivációs peptidjében megtalálható tetra-aszpartát motívum és az Asp218 közötti gátló kölcsönhatás felszabadul (109). A két szabályozó hasítás eredményeképpen a kationos tripszinogén autoaktiváció kezdeti sebessége nő, míg a végső tripszin aktivitás csökken (83). Az aktív tripszin koncentráció csökkenése véd a hasnyálmirigy-gyulladás kialakulása ellen. A CTRC funkcióvesztéses mutációi növelik a krónikus hasnyálmirigy-gyulladás kockázatát (101). Azon PRSS1 mutációk, amelyek családi halmozódása figyelhető meg, krónikus hasnyálmirigy-gyulladással asszociáltak, csökkent CTRC-függő tripszinogén degradáción vagy megnövekedett CTRC általi N-terminális

processzáson keresztül. A végeredmény mindkét esetben az autoaktiváció fokozódása. Azok a változások, amelyek a mutáns kationos tripszinogén korai aktivációjához vezetnek megnövekedett aktív tripszin koncentrációt eredményeznek, amely növeli a hasnyálmirigyen belüli tripszin aktivációt és a hasnyálmirigy-gyulladás kockázatát (62).

Az anionos tripszinogén (PRSS2) CTRC általi autoaktivációja egy sokkal szorosabban szabályozott folyamat, mivel egy extra hasítást figyelhetünk meg a tripszinogén autolízis hurok régiójában a Leu148 aminosav után. Ezen kívül az anionos tripszinogénből hiányzik a Cys139-Cys206 diszulfid híd, ezáltal fogékonyabb a degradációra. Ennek eredményeképpen a CTRC sokkal hatékonyabb az anionos tripszin proteolízisében, amely azt is magyarázza, miért nem azonosítottak anionos tripszinogén mutációkat örökletes hasnyálmirigy-gyulladásban. A CTRC általi N-terminális processzálas nem fokozza az anionos tripszinogén autoaktivációját. Ellentétben egy enyhe gátlást figyelhetünk meg (54) az Asp218→Tyr evolúciós mutációnak köszönhetően, amely megtalálható a legtöbb emlős tripszinben.

Eredményeink azt mutatták, hogy a CTRC általi Phe18 és Leu81 hasítása a mezotripszinben is konzervált és hasonló hatást figyelhetünk meg, mint a többi tripszinogén esetében. Emellett a kationos tripszinogéntől eltérően a CTRC az autolízis hurokban is hasította a mezotripszin Phe150 és Leu148 aminosav oldalláncok után. A hasítási termék viszonylag stabilnak bizonyult. Ezért kíváncsiak voltunk a mezotripszin autolízis hurokban bekövetkező hasítások funkcióra gyakorolt lehetséges hatására.

Az autolízis hurok hasítása homológ szerin proteázokban, többek között a trombinban és az Xa faktorban megváltozott katalitikus aktivitásról és bizonyos fokú funkcióvesztésről tanúskodnak (110,111). Azt feltételeztük, hogy a mezotripszin hasonlóképpen szabályozott a CTRC által, végeredményben az autolízis hurok hasítása megvédheti a SPINK1-et a degradációtól. Annak érdekében, hogy kizárólag az autolízis hurok hasítás hatását vizsgáljuk, egy L81A-mezotripszin variánst használtunk.

Eredményeink azt mutatták, hogy az L81A-mezotripszin CTRC általi hasítása a K_m érték emelkedésének köszönhetően jelentősen csökkenti a proteáz katalitikus aktivitását. A CTRC általi hasítás következményeként az SBTI tripszin inhibitor kötődése tizedére csökkent és az SBTI proteolitikus emésztése is lassult. A jelenség minden bizonnyal annak köszönhető, hogy megváltozik a szubsztrát és a szubsztrátkötő alhelyek kölcsönhatása a mezotripszinben.

A tripszinogének egy poszttranszlációs szulfatáláson mennek keresztül, melynek során a Tyr154 szulfatálódik (112). Más emlősökben ez a tripszinogén szulfatálás nem figyelhető meg és a módosítás emberben betöltött fiziológiai szerepe egyelőre még nem tisztázott. A szulfatálás kismértékben növelte a kationos tripszinogén autoaktivációját és módosította az S2' szubsztrátkötő alhely szelektivitását (50,52). Egy az afrikai populációkban gyakori

anionos tripszinogén mutáció megszünteti a tripszinogén szulfatálását, de kimutatták, hogy az nem fokozza a hasnyálmirigy-gyulladás esélyét (47). Vizsgáltuk a CTRC hasítás hatását a szulfatált L81A-mezotripszin esetében is, mivel a Tyr154 az autolízis hurok közelében helyezkedik el. Kísérleteink azt mutatták, hogy a szulfatálás kismértékben növeli a CTRC általi hasítás mértékét a mezotripszin autolízis hurokban. Igazoltuk, hogy a szulfatált mezotripszin ötször gyorsabban hasította a marha β -kazeint, mint a nem szulfatált proteáz, míg a tripszin inhibitorok emésztése csak kismértékben növekedett. Habár az autolízis hurok CTRC általi hasítása erősen befolyásolta a gátló hatást a nem szulfatált és a szulfatált L81A-mezotripszin forma esetében is.

Összefoglalásként elmondható, hogy a kísérleteink során demonstráltuk, hogy a mezotripszin autolízis hurok hasítása CTRC-vel jelentősen csökkenti a proteáz aktivitását és a SPINK1 tripszin inhibitor degradációt. Ennek eredményeként a SPINK1 képes megakadályozni a hasnyálmirigyen belüli tripszin aktivációt és hasnyálmirigy-gyulladás kialakulását. Ez a mechanizmus egy újabb aspektusa a CTRC védő szerepének a hasnyálmirigyen belül.

A közelmúltban 23 ritka heterozigóta PNLIP variánst azonosítottak nem alkoholos krónikus hasnyálmirigy-gyulladásos betegekben és kontroll csoportokban egyaránt. A funkcionális vizsgálatok azt mutatták, hogy a PNLIP variánsok jelentős része megfelelően szekretálódik a transzfektált sejtekből, míg négy PNLIP variáns (A174P, G233E, C254R, V454F) csökkent szekréciót mutatott (103).

A szerkezeti modellezés azt mutatta, hogy a PNLIP mutációk közül az A174P, G233E és C254R a lipáz N-terminális domén magjában találhatóak, közel az aktív helyhez, míg a V454F a C-terminális doménben lokalizált a szubsztrátkötő hely közelében. Aminosav szekvenciák összehasonlítása alapján megállapítható, hogy az érintett mutáció helyek konzerváltak a humán emlős hasnyálmirigy lipázokban. Ez arra enged következtetni, hogy ezek az aminosavak kritikus szerepet játszhatnak a lipáz szerkezetének stabilizálásában. Ezért funkcionális vizsgálatokat végeztünk HEK 293T és differenciált AR42J sejt vonalakon, hogy tanulmányozzuk a négy PNLIP variáns sejtes környezetre gyakorolt hatását.

A PNLIP variánsok expresszázódtak, de bent ragadtak és felhalmozódtak a sejtben rosszul feltekeredett fehérje aggregátumokként. A rosszul feltekeredett fehérjék sejtben belüli felhalmozódása megemelte az ER stressz markerek szintjét (XBP1 splicing, BiP mRNS expresszió) a vizsgált sejt típusokban. A legnagyobb hatás a PNLIP V454F variánsnak tulajdonítható, amely több mint egy nagyságrenddel növelte a BiP mRNS szintjét az AR42J

sejtekben. A PNLIP misszensz mutációk szerepe kevésbé ismert a hasnyálmirigyet érintő betegségekben (29,113).

A hasnyálmirigy lipáz deficiencia egy ritka betegség, amelynek egy érdekes genetikai esetét Behar és munkatársai írták le. Közleményükben veleszületett lipáz hiánnyal diagnosztizált testvérpár kórtörténetét írták le. Érdekes, hogy a betegek exokrin hasnyálmirigy elégtelenségben is szenvedtek, amely csökkent elasztázszintet eredményezett a székletben, ez pedig felvetette a krónikus hasnyálmirigy-gyulladás lehetőségét. A PNLIP gén szekvenálása homozigóta mutációt azonosított mindkét betegnél (29). A Thr221→Met mutáció a lipáz N-terminális domén magjában található. Habár a T221M mutáció az aktív hely közelében van, funkcionális karakterizálás azt vetítette előre, hogy a lipáz hiány a fehérjék helytelen feltekeredésének és sejten belüli felhalmozódásuknak köszönhető, nem pedig a csökkent lipáz aktivitásnak (102). A rosszul feltekeredett T221M PNLIP fehérje ER stresszt indukált, mivel fokozódott az XBP1 mRNS érése és a BiP expresszió szintje. Ez az eredmény azt feltételezi, hogy a homozigóta PNLIP mutációk szerepet játszhatnak a krónikus hasnyálmirigy-gyulladás kialakulásában és az aktivált ER stressz útvonalak a betegség rizikófaktorainak tekinthetők (102,114). Mivel a testvérpár szülei, akik a T221M mutáció heterozigóta hordozói voltak nem mutattak semmilyen tünetet arra következtethetünk, hogy a mutáció heterozigóta formája nem okoz krónikus hasnyálmirigy-gyuladást (29). A közelmúltban az örökletes PNLIP deficiencia egy másik esetét is leírták egy ikerpárnál (113). A PNLIP gén szekvenálásával a betegekben mindkét allélt érintő compound heterozigóta mutációkat (W102X, R188C) azonosítottak. A W102X nonszensz mutáció csökkent aktivitáshoz vezet a korai transzláció terminálás következtében, míg az R188C misszensz mutáció abnormális diszulfidkötések kialakulásával valószínűleg hibás lipáz feltekeredést és csökkent szekréciót okoz. Habár a funkcionális karakterizálás még várat magára, feltételezhetően ezen mutációk kombinált hatása hasonló a homozigóta T221M mutáció hatásához. A rosszul feltekeredett fehérjék általi ER stressz indukció a krónikus hasnyálmirigy-gyulladás kialakulásában és előrehaladásában egy gyakori patológiai útvonal (114).

A CPA1 az egyik fő emésztő proteáz a humán hasnyálban (112,115). Számos olyan heterozigóta CPA1 mutációt karakterizáltak krónikus hasnyálmirigy-gyulladásos betegben, amelyek csökkent szekréciót mutatnak és ER stresszt váltanak ki (37). A krónikus hasnyálmirigy-gyulladással asszociált CPA1 N256K mutáció a fehérje helytelen feltekeredését eredményezi, ami szekréciós defektushoz vezet. A CPA1 N256K knock-in egérmodellben végzett kísérletek azt mutatták, hogy a mutáció misfoldingon és ER stressz növelésen keresztül spontán és progresszív krónikus hasnyálmirigy-gyuladást eredményez (99).

A kationos tripszinogén, amelyet a PRSS1 gén kódol nagy mennyiségben szekretálódik a humán exokrin hasnyálmirigy által. Azonosítottak olyan ritka heterozigóta PRSS1 mutációkat (R116C, C139S), amelyek krónikus hasnyálmirigy-gyulladással asszociáltak, csökkent tripszinogén szekréciót okoznak és a fehérje helytelen feltekeredése miatt a sejten belül felhalmozódnak (86,114). A krónikus hasnyálmirigy-gyulladásban azonosított mutációkat hordozó PRSS1 génnel transzfektált sejtek funkcionális karakterizálása fokozott ER stresszt mutatott. Habár a PNLIP az egyik legnagyobb mennyiségben szekretált enzim a humán exokrin hasnyálmirigy által, az expressziója valamelyest alacsonyabb a CPA1-nél és a PRSS1-nél, a humán hasnyál fehérje analízise alapján (112) és mRNS expressziós adatok alapján a GTEx portál szerint (Genotype-Tissue Expression) (116).

Az expressziós adatokból és a variábilis klinikai fenotípusokból arra következtethetünk, hogy az általunk vizsgált heterozigóta PNLIP mutációk enyhébb ER stresszt és sejtkárosodást indukálnak, mint a rosszul feltekeredő CPA1 és PRSS1 mutációk, amelyek krónikus hasnyálmirigy gyulladással járnak. A korábban karakterizált T221M PNLIP mutánsal összevetve eredményeinkből arra következtethetünk, hogy a lipáz mutációk homozigóta formában eredményeznek hasnyálmirigy-gyulladást.

Összefoglalva, karakterizáltuk négy potenciálisan patogén PNLIP mutáció sejtre gyakorolt hatását sejtvonalas modellrendszerben. Azt találtuk, hogy az A174P, G233E, C254R és V454F mutációk PNLIP feltekeredési hibát, sejten belüli felhalmozódást, fehérje aggregációt és ER stresszt indukálnak. Eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy a vizsgált PNLIP mutációk kockázati tényezők a krónikus hasnyálmirigy-gyulladásban, de heterozigóta formában további kockázati tényezők jelenléte szükséges a betegség kialakulásához.

7. ÖSSZEGZÉS

Munkám során két hasnyálmirigy által termelt emésztőenzim vizsgálatát végeztem.

A fő humán tripszin izoformákkal összevetve a mezotripszin egyedi sajátosságokkal rendelkezik, mivel nem gátolják a tripszin inhibitorok, illetve képes bontani a proteáz inhibitorokat. Ilyen többek között a SPINK1, amely azért felelős, hogy megakadályozza a tripszinogén korai aktivációját a hasnyálmirigyen belül. A CTRC szabályozó szerepe jól ismert a kationos és anionos tripszinogének aktivációjában. A CTRC növeli az autoaktivációt azáltal, hogy hasítja az enzimek aktivációs peptidjét, ezen kívül a tripszinek kalcium-kötő hurok régióját is hasítja a Leu81 után, amely növeli a tripszinek degradációját. Az anionos tripszinogén további CTRC hasítóhelyeket tartalmaz. Kutatásaink a mezotripszinogén CTRC általi proteolitikus szabályozására irányultak. A mezotripszinogénben a Leu81 hely mellett egy további hasítóhelyet is azonosítottunk az autolízis hurokban. Eredményeink azt mutatták, hogy a CTRC által hasított mezotripszin elvesztette katalitikus aktivitását, hiszen kisebb hatékonysággal emésztette a szubsztrátjait, amit a K_m 10x-es növekedése igazolt. Végeredményként elmondható, hogy a CTRC védi a hasnyálmirigyet a korai tripszin aktivációtól, mivel a mezotripszin a CTRC általi hasításokat követően inaktiválódik, így nem tudja hasítani a védő SPINK1-et.

A humán hasnyálmirigy-gyulladás kialakulhat tripszin-független mechanizmusok során is. Az egyik ilyen mechanizmus, amikor a hasnyálmirigy által termelt emésztőenzimek rosszul tekerednek fel, így bent ragadnak a sejten belül, aggregálódnak és beindítják az UPR és az ER stresszválaszt. A közelmúltban két európai hasnyálmirigy-gyulladásos kohorszban fiatal betegekben és kontrollokban azonosítottak négy heterozigóta hasnyálmirigy lipáz (PNLIP) mutációt (A174P, C254R, G233E, V454F), amelyek csökkent PNLIP szekréciónak mutattak. Célunk volt annak meghatározása, hogy ezek a mutációk patogének vagy ártalmatlanok. Ehhez megvizsgáltuk a fehérjék szekréciónak, sejten belüli aggregációját, illetve ER stressz markerek szintjét HEK 293T és AR42J sejtvonalon. Eredményeink azt mutatták, hogy a mutációk szekréciónak defektussal rendelkeznek. Igazoltuk, hogy a PNLIP mutánsok sejten belüli oldhatatlan aggregátumokat alkotnak és felhalmozódnak a sejtekben. A PNLIP mutánsok expressziója ER stressz indukciót eredményezett, amelyet a fokozott XBP1 mRNS érés és az emelkedett ER chaperon, BiP szint jelzett HEK 293T és AR42J sejtekben. Eredményeink azt mutatják, hogy habár a PNLIP variánsok önmagukban nem alkalmasak a krónikus hasnyálmirigy-gyulladás kialakulásához, de más rizikófaktorok együttes megjelenésével növelhetik a betegség kialakulásának kockázatát.

7. SUMMARY

In my work I examined two digestive enzymes produced by the human pancreas.

Mesotrypsin is a unique human trypsin isoform, because it has several unusual properties. Mesotrypsin cannot be inhibited by trypsin inhibitors, but it is able to degrade protease inhibitors, including SPINK1, which is responsible for preventing early activation of trypsinogen within the pancreas. The regulatory role of CTRC is well known in the activation of cationic and anionic trypsinogens. CTRC enhances autoactivation by cleaving the activation peptide of trypsinogens. Besides that CTRC cleaves the calcium-binding loop of trypsins after Leu81, which cause trypsin autodegradation. The anionic trypsinogen contains an additional CTRC cleavage site in the autolysis loop. Our research focused on the effect of CTRC on the regulation of mesotrypsinogen activation. An additional CTRC cleavage site was identified in the autolysis loop of the mesotrypsinogen. Our results showed that CTRC-cleaved mesotrypsin lost its catalytic activity. The substrates were digested with less efficiency, as evidenced by a 10 fold increase in K_m values. Our data demonstrate that CTRC protects the pancreas from early trypsin activation because mesotrypsin is inactivated after cleavage by CTRC, as a consequence it cannot cleave the protective SPINK1.

Chronic pancreatitis can also develop through trypsin-independent mechanisms. One of these mechanisms is when the pancreatic digestive enzymes are misfolded, retained inside the cells and aggregated and triggered the UPR and ER stress response. Recently, four pancreatic lipase (PNLIP) mutations (A174P, G233E, C254R, V454F) were identified in two European pancreatitis cohorts in young patients and also in controls that showed decreased PNLIP secretion. Our aim was to determine whether these mutations are pathogenic or harmless variants. We examined protein secretion, intracellular aggregation and the level of ER stress markers in HEK 293T and AR42J cells. Our results showed that the mutants had secretory defect. Additional analyses confirmed that PNLIP mutants form insoluble aggregates after accumulation within the cells. The PNLIP mutants induced ER stress as the level of ER stress markers (XBP1 mRNA splicing and the expression of BiP chaperone) were elevated both in HEK 293T and AR42J cell lines. Our results show that although PNLIP variants alone are not suitable for development of chronic pancreatitis, but they can increase the risk of developing the disease by the co-occurrence of other risk factors.

8. IRODALOMJEGYZÉK

1. Atkinson, M. A., Campbell-Thompson, M., Kusmartseva, I., and Kaestner, K. H. (2020) Organisation of the human pancreas in health and in diabetes. *Diabetologia* **63**, 1966-1973
2. Zhou, Q., and Melton, D. A. (2018) Pancreas regeneration. *Nature* **557**, 351-358
3. Leung, P. S., and Ip, S. P. (2006) Pancreatic acinar cell: its role in acute pancreatitis. *Int J Biochem Cell Biol* **38**, 1024-1030
4. Muraro, M. J., Dharmadhikari, G., Grun, D., Groen, N., Dielen, T., Jansen, E., van Gurp, L., Engelse, M. A., Carlotti, F., de Koning, E. J., and van Oudenaarden, A. (2016) A Single-Cell Transcriptome Atlas of the Human Pancreas. *Cell Syst* **3**, 385-394 e383
5. Jennings, R. E., Berry, A. A., Strutt, J. P., Gerrard, D. T., and Hanley, N. A. (2015) Human pancreas development. *Development* **142**, 3126-3137
6. Bolender, R. P. (1974) Stereological analysis of the guinea pig pancreas. I. Analytical model and quantitative description of nonstimulated pancreatic exocrine cells. *J Cell Biol* **61**, 269-287
7. Wollny, D., Zhao, S., Everlien, I., Lun, X., Brunken, J., Brune, D., Ziebell, F., Tabansky, I., Weichert, W., Marciniak-Czochra, A., and Martin-Villalba, A. (2016) Single-Cell Analysis Uncovers Clonal Acinar Cell Heterogeneity in the Adult Pancreas. *Dev Cell* **39**, 289-301
8. Palade, G. (1975) Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* **189**, 867
9. Case, R. M. (1978) Synthesis, intracellular transport and discharge of exportable proteins in the pancreatic acinar cell and other cells. *Biol Rev Camb Philos Soc* **53**, 211-354
10. Farquhar, M. G., and Palade, G. E. (1998) The Golgi apparatus: 100 years of progress and controversy. *Trends Cell Biol* **8**, 2-10
11. Petersen, O. H., and Tepikin, A. V. (2008) Polarized calcium signaling in exocrine gland cells. *Annu Rev Physiol* **70**, 273-299
12. Palade, G. E. (1995) Protein kinesis: the dynamics of protein trafficking and stability. Summary. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **60**, 821-831
13. Beck, I. T. (1973) The role of pancreatic enzymes in digestion. *Am J Clin Nutr* **26**, 311-325
14. Whitcomb, D. C., and Lowe, M. E. (2007) Human pancreatic digestive enzymes. *Dig Dis Sci* **52**, 1-17
15. Rinderknecht, H. (1986) Activation of pancreatic zymogens. Normal activation, premature intrapancreatic activation, protective mechanisms against inappropriate activation. *Dig Dis Sci* **31**, 314-321

16. Pubols, M. H., Bartelt, D. C., and Greene, L. J. (1974) Trypsin inhibitor from human pancreas and pancreatic juice. *J Biol Chem* **249**, 2235-2242
17. Gorry, M. C., Gabbaizedeh, D., Furey, W., Gates, L. K., Jr., Preston, R. A., Aston, C. E., Zhang, Y., Ulrich, C., Ehrlich, G. D., and Whitcomb, D. C. (1997) Mutations in the cationic trypsinogen gene are associated with recurrent acute and chronic pancreatitis. *Gastroenterology* **113**, 1063-1068
18. Whitcomb, D. C., Gorry, M. C., Preston, R. A., Furey, W., Sossenheimer, M. J., Ulrich, C. D., Martin, S. P., Gates, L. K., Jr., Amann, S. T., Toskes, P. P., Liddle, R., McGrath, K., Uomo, G., Post, J. C., and Ehrlich, G. D. (1996) Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nat Genet* **14**, 141-145
19. Chey, W. Y., and Chang, T. (2001) Neural hormonal regulation of exocrine pancreatic secretion. *Pancreatology* **1**, 320-335
20. Petersen, O. H. (1992) Stimulus-secretion coupling: cytoplasmic calcium signals and the control of ion channels in exocrine acinar cells. *J Physiol* **448**, 1-51
21. Petersen, O. H., and Ueda, N. (1976) Pancreatic acinar cells: the role of calcium in stimulus-secretion coupling. *J Physiol* **254**, 583-606
22. Gray, M. A., Greenwell, J. R., Garton, A. J., and Argent, B. E. (1990) Regulation of maxi-K⁺ channels on pancreatic duct cells by cyclic AMP-dependent phosphorylation. *J Membr Biol* **115**, 203-215
23. Beaudoin, A. R., St-Jean, P., and Grondin, G. (1989) Pancreatic juice composition: new views about the cellular mechanisms that control the concentration of digestive and nondigestive proteins. *Dig Dis* **7**, 210-220
24. Githens, S. (1988) The pancreatic duct cell: proliferative capabilities, specific characteristics, metaplasia, isolation, and culture. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **7**, 486-506
25. Rothman, S. S. (1977) The digestive enzymes of the pancreas: a mixture of inconstant proportions. *Annu Rev Physiol* **39**, 373-389
26. Lowe, M. E. (1997) Structure and function of pancreatic lipase and colipase. *Annu Rev Nutr* **17**, 141-158
27. Moreau, H., Laugier, R., Gargouri, Y., Ferrato, F., and Verger, R. (1988) Human preduodenal lipase is entirely of gastric fundic origin. *Gastroenterology* **95**, 1221-1226
28. Payne, R. M., Sims, H. F., Jennens, M. L., and Lowe, M. E. (1994) Rat pancreatic lipase and two related proteins: enzymatic properties and mRNA expression during development. *Am J Physiol* **266**, G914-921
29. Behar, D. M., Basel-Vanagaite, L., Glaser, F., Kaplan, M., Tzur, S., Magal, N., Eidlitz-Markus, T., Haimi-Cohen, Y., Sarig, G., Bormans, C., Shohat, M., and Zeharia, A. (2014)

- Identification of a novel mutation in the PNLIP gene in two brothers with congenital pancreatic lipase deficiency. *J Lipid Res* **55**, 307-312
30. Winkler, F. K., D'Arcy, A., and Hunziker, W. (1990) Structure of human pancreatic lipase. *Nature* **343**, 771-774
31. D'Agostino, D., and Lowe, M. E. (2004) Pancreatic lipase-related protein 2 is the major colipase-dependent pancreatic lipase in suckling mice. *J Nutr* **134**, 132-134
32. Xiao, X., Jones, G., Sevilla, W. A., Stolz, D. B., Magee, K. E., Haughney, M., Mukherjee, A., Wang, Y., and Lowe, M. E. (2017) A carboxyl ester lipase (CEL) mutant causes chronic pancreatitis by forming intracellular aggregates that activate apoptosis. *J Biol Chem* **292**, 7744
33. Chen, Q., Blackberg, L., Nilsson, A., Sternby, B., and Hernell, O. (1994) Digestion of triacylglycerols containing long-chain polyenoic fatty acids in vitro by colipase-dependent pancreatic lipase and human milk bile salt-stimulated lipase. *Biochim Biophys Acta* **1210**, 239-243
34. Kozumplik, V., Staffa, F., and Hoffmann, G. E. (1989) Purification of pancreatic phospholipase A2 from human duodenal juice. *Biochim Biophys Acta* **1002**, 395-397
35. Seilhamer, J. J., Randall, T. L., Yamanaka, M., and Johnson, L. K. (1986) Pancreatic phospholipase A2: isolation of the human gene and cDNAs from porcine pancreas and human lung. *DNA* **5**, 519-527
36. Fjeld, K., Weiss, F. U., Lasher, D., Rosendahl, J., Chen, J. M., Johansson, B. B., Kirsten, H., Ruffert, C., Masson, E., Steine, S. J., Bugert, P., Cnop, M., Grutzmann, R., Mayerle, J., Mossner, J., Ringdal, M., Schulz, H. U., Sandler, M., Simon, P., Sztromwasser, P., Torsvik, J., Scholz, M., Tjora, E., Ferec, C., Witt, H., Lerch, M. M., Njolstad, P. R., Johansson, S., and Molven, A. (2015) A recombined allele of the lipase gene CEL and its pseudogene CELP confers susceptibility to chronic pancreatitis. *Nat Genet* **47**, 518-522
37. Witt, H., Beer, S., Rosendahl, J., Chen, J. M., Chandak, G. R., Masamune, A., Bence, M., Szmola, R., Oracz, G., Macek, M., Jr., Bhatia, E., Steigenberger, S., Lasher, D., Buhler, F., Delaporte, C., Tebbing, J., Ludwig, M., Pilsak, C., Saum, K., Bugert, P., Masson, E., Paliwal, S., Bhaskar, S., Sobczynska-Tomaszewska, A., Bak, D., Balascak, I., Choudhuri, G., Nageshwar Reddy, D., Rao, G. V., Thomas, V., Kume, K., Nakano, E., Kakuta, Y., Shimosegawa, T., Durko, L., Szabo, A., Schnur, A., Hegyi, P., Rakonczay, Z., Jr., Pfutzer, R., Schneider, A., Groneberg, D. A., Braun, M., Schmidt, H., Witt, U., Friess, H., Algul, H., Landt, O., Schuelke, M., Kruger, R., Wiedenmann, B., Schmidt, F., Zimmer, K. P., Kovacs, P., Stumvoll, M., Bluher, M., Muller, T., Janecke, A., Teich, N., Grutzmann, R., Schulz, H. U., Mossner, J., Keim, V., Lohr, M., Ferec, C., and Sahin-Toth, M. (2013) Variants in CPA1 are strongly associated with early onset chronic pancreatitis. *Nat Genet* **45**, 1216-1220

38. Whitcomb, D. C. (2000) Genetic predispositions to acute and chronic pancreatitis. *Med Clin North Am* **84**, 531-547, vii
39. Carrere, J., Figarella, C., Guy, O., and Thouvenot, J. P. (1986) Human pancreatic chymotrypsinogen A: a non-competitive enzyme immunoassay, and molecular forms in serum and amniotic fluid. *Biochim Biophys Acta* **883**, 46-53
40. Kardos, J., Bodi, A., Zavodszky, P., Venekei, I., and Graf, L. (1999) Disulfide-linked propeptides stabilize the structure of zymogen and mature pancreatic serine proteases. *Biochemistry* **38**, 12248-12257
41. Szabo, A., and Sahin-Toth, M. (2012) Determinants of chymotrypsin C cleavage specificity in the calcium-binding loop of human cationic trypsinogen. *FEBS J* **279**, 4283-4292
42. Szmola, R., Bence, M., Carpentieri, A., Szabo, A., Costello, C. E., Samuelson, J., and Sahin-Toth, M. (2011) Chymotrypsin C is a co-activator of human pancreatic procarboxypeptidases A1 and A2. *J Biol Chem* **286**, 1819-1827
43. Rosenbloom, J. (1984) Elastin: relation of protein and gene structure to disease. *Lab Invest* **51**, 605-623
44. Appelt, G., Schulze, B., Rogos, R., and Kopperschlager, G. (1988) Analysis of human exocrine pancreatic proteins by means of pore gradient polyacrylamide gel electrophoresis. *Biomed Biochim Acta* **47**, 133-140
45. Neurath, H., and Walsh, K. A. (1976) Role of proteolytic enzymes in biological regulation (a review). *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**, 3825-3832
46. Boechi, L., Pierce, L., Komives, E. A., and McCammon, J. A. (2014) Trypsinogen activation as observed in accelerated molecular dynamics simulations. *Protein Sci* **23**, 1550-1558
47. Ronai, Z., Witt, H., Rickards, O., Destro-Bisol, G., Bradbury, A. R., and Sahin-Toth, M. (2009) A common African polymorphism abolishes tyrosine sulfation of human anionic trypsinogen (PRSS2). *Biochem J* **418**, 155-161
48. Salameh, M. A., and Radisky, E. S. (2013) Biochemical and structural insights into mesotrypsin: an unusual human trypsin. *Int J Biochem Mol Biol* **4**, 129-139
49. Nyaruhucha, C. N., Kito, M., and Fukuoka, S. I. (1997) Identification and expression of the cDNA-encoding human mesotrypsin(ogen), an isoform of trypsin with inhibitor resistance. *J Biol Chem* **272**, 10573-10578
50. Sahin-Toth, M., Kukor, Z., and Nemoda, Z. (2006) Human cationic trypsinogen is sulfated on Tyr154. *FEBS J* **273**, 5044-5050

51. Rinderknecht, H., Stace, N. H., and Renner, I. G. (1985) Effects of chronic alcohol abuse on exocrine pancreatic secretion in man. *Dig Dis Sci* **30**, 65-71
52. Szabo, A., Salameh, M. A., Ludwig, M., Radisky, E. S., and Sahin-Toth, M. (2014) Tyrosine sulfation of human trypsin steers S2' subsite selectivity towards basic amino acids. *PLoS One* **9**, e102063
53. Zhou, J., and Sahin-Toth, M. (2011) Chymotrypsin C mutations in chronic pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol* **26**, 1238-1246
54. Jancso, Z., and Sahin-Toth, M. (2016) Tighter Control by Chymotrypsin C (CTRC) Explains Lack of Association between Human Anionic Trypsinogen and Hereditary Pancreatitis. *J Biol Chem* **291**, 12897-12905
55. Pendlebury, D., Wang, R., Henin, R. D., Hockla, A., Soares, A. S., Madden, B. J., Kazanov, M. D., and Radisky, E. S. (2014) Sequence and conformational specificity in substrate recognition: several human Kunitz protease inhibitor domains are specific substrates of mesotrypsin. *J Biol Chem* **289**, 32783-32797
56. Szmola, R., Kukor, Z., and Sahin-Toth, M. (2003) Human mesotrypsin is a unique digestive protease specialized for the degradation of trypsin inhibitors. *J Biol Chem* **278**, 48580-48589
57. Salameh, M. A., Soares, A. S., Hockla, A., and Radisky, E. S. (2008) Structural basis for accelerated cleavage of bovine pancreatic trypsin inhibitor (BPTI) by human mesotrypsin. *J Biol Chem* **283**, 4115-4123
58. Schechter, I., and Berger, A. (1967) On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun* **27**, 157-162
59. Salameh, M. A., Soares, A. S., Navaneetham, D., Sinha, D., Walsh, P. N., and Radisky, E. S. (2010) Determinants of affinity and proteolytic stability in interactions of Kunitz family protease inhibitors with mesotrypsin. *J Biol Chem* **285**, 36884-36896
60. Alloy, A. P., Kayode, O., Wang, R., Hockla, A., Soares, A. S., and Radisky, E. S. (2015) Mesotrypsin Has Evolved Four Unique Residues to Cleave Trypsin Inhibitors as Substrates. *J Biol Chem* **290**, 21523-21535
61. Lin, T. C. (2021) Functional Roles of SPINK1 in Cancers. *Int J Mol Sci* **22**
62. Hegyi, E., and Sahin-Toth, M. (2017) Genetic Risk in Chronic Pancreatitis: The Trypsin-Dependent Pathway. *Dig Dis Sci* **62**, 1692-1701
63. Kereszturi, E., Kiraly, O., and Sahin-Toth, M. (2009) Minigene analysis of intronic variants in common SPINK1 haplotypes associated with chronic pancreatitis. *Gut* **58**, 545-549
64. Majumder, S., and Chari, S. T. (2016) Chronic pancreatitis. *Lancet* **387**, 1957-1966

65. Braganza, J. M., Lee, S. H., McCloy, R. F., and McMahon, M. J. (2011) Chronic pancreatitis. *Lancet* **377**, 1184-1197
66. Beyer, G., Habtezion, A., Werner, J., Lerch, M. M., and Mayerle, J. (2020) Chronic pancreatitis. *Lancet* **396**, 499-512
67. DiMagno, M. J., and DiMagno, E. P. (2010) Chronic pancreatitis. *Curr Opin Gastroenterol* **26**, 490-498
68. Kleeff, J., Whitcomb, D. C., Shimosegawa, T., Esposito, I., Lerch, M. M., Gress, T., Mayerle, J., Drewes, A. M., Rebours, V., Akisik, F., Munoz, J. E. D., and Neoptolemos, J. P. (2017) Chronic pancreatitis. *Nat Rev Dis Primers* **3**, 17060
69. Mayerle, J., Hoffmeister, A., Werner, J., Witt, H., Lerch, M. M., and Mossner, J. (2013) Chronic pancreatitis--definition, etiology, investigation and treatment. *Dtsch Arztebl Int* **110**, 387-393
70. Etemad, B., and Whitcomb, D. C. (2001) Chronic pancreatitis: diagnosis, classification, and new genetic developments. *Gastroenterology* **120**, 682-707
71. Forsmark, C. E. (2013) Management of chronic pancreatitis. *Gastroenterology* **144**, 1282-1291 e1283
72. Lew, D., Afghani, E., and Pandol, S. (2017) Chronic Pancreatitis: Current Status and Challenges for Prevention and Treatment. *Dig Dis Sci* **62**, 1702-1712
73. Gupte, A. R., and Forsmark, C. E. (2014) Chronic pancreatitis. *Curr Opin Gastroenterol* **30**, 500-505
74. Brock, C., Nielsen, L. M., Lelic, D., and Drewes, A. M. (2013) Pathophysiology of chronic pancreatitis. *World J Gastroenterol* **19**, 7231-7240
75. Weiss, F. U., Laemmerhirt, F., and Lerch, M. M. (2019) Etiology and Risk Factors of Acute and Chronic Pancreatitis. *Visc Med* **35**, 73-81
76. Weiss, F. U., Skube, M. E., and Lerch, M. M. (2018) Chronic pancreatitis: an update on genetic risk factors. *Curr Opin Gastroenterol* **34**, 322-329
77. Sahin-Toth, M., and Toth, M. (2000) Gain-of-function mutations associated with hereditary pancreatitis enhance autoactivation of human cationic trypsinogen. *Biochem Biophys Res Commun* **278**, 286-289
78. Amann, S. T., Gates, L. K., Aston, C. E., Pandya, A., and Whitcomb, D. C. (2001) Expression and penetrance of the hereditary pancreatitis phenotype in monozygotic twins. *Gut* **48**, 542-547
79. Dytz, M. G., Mendes de Melo, J., de Castro Santos, O., da Silva Santos, I. D., Rodacki, M., Conceicao, F. L., and Ortiga-Carvalho, T. M. (2015) Hereditary Pancreatitis Associated

- With the N29T Mutation of the PRSS1 Gene in a Brazilian Family: A Case-Control Study. *Medicine (Baltimore)* **94**, e1508
80. Geisz, A., Hegyi, P., and Sahin-Toth, M. (2013) Robust autoactivation, chymotrypsin C independence and diminished secretion define a subset of hereditary pancreatitis-associated cationic trypsinogen mutants. *FEBS J* **280**, 2888-2899
81. Szabo, A., Toldi, V., Gazda, L. D., Demcsak, A., Tozser, J., and Sahin-Toth, M. (2021) Defective binding of SPINK1 variants is an uncommon mechanism for impaired trypsin inhibition in chronic pancreatitis. *J Biol Chem* **296**, 100343
82. Kereszturi, E., and Sahin-Toth, M. (2009) Intracellular autoactivation of human cationic trypsinogen mutants causes reduced trypsinogen secretion and acinar cell death. *J Biol Chem* **284**, 33392-33399
83. Szabo, A., and Sahin-Toth, M. (2012) Increased activation of hereditary pancreatitis-associated human cationic trypsinogen mutants in presence of chymotrypsin C. *J Biol Chem* **287**, 20701-20710
84. Lugea, A., Tischler, D., Nguyen, J., Gong, J., Gukovsky, I., French, S. W., Gorelick, F. S., and Pandol, S. J. (2011) Adaptive unfolded protein response attenuates alcohol-induced pancreatic damage. *Gastroenterology* **140**, 987-997
85. Whitcomb, D. C. (2010) Genetic aspects of pancreatitis. *Annu Rev Med* **61**, 413-424
86. Kereszturi, E., Szmola, R., Kukor, Z., Simon, P., Weiss, F. U., Lerch, M. M., and Sahin-Toth, M. (2009) Hereditary pancreatitis caused by mutation-induced misfolding of human cationic trypsinogen: a novel disease mechanism. *Hum Mutat* **30**, 575-582
87. Ron, D., and Walter, P. (2007) Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 519-529
88. Rutkowski, D. T., and Kaufman, R. J. (2007) That which does not kill me makes me stronger: adapting to chronic ER stress. *Trends Biochem Sci* **32**, 469-476
89. Walter, P., and Ron, D. (2011) The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* **334**, 1081-1086
90. Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., and Mori, K. (2001) XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* **107**, 881-891
91. Calton, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J. H., Hubbard, S. R., Harding, H. P., Clark, S. G., and Ron, D. (2002) IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* **415**, 92-96
92. Lee, K., Tirasophon, W., Shen, X., Michalak, M., Prywes, R., Okada, T., Yoshida, H., Mori, K., and Kaufman, R. J. (2002) IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and

- S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. *Genes Dev* **16**, 452-466
93. Oakes, S. A. (2020) Endoplasmic Reticulum Stress Signaling in Cancer Cells. *Am J Pathol* **190**, 934-946
94. Yoshida, H., Matsui, T., Hosokawa, N., Kaufman, R. J., Nagata, K., and Mori, K. (2003) A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response. *Dev Cell* **4**, 265-271
95. Shen, J., Chen, X., Hendershot, L., and Prywes, R. (2002) ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev Cell* **3**, 99-111
96. Blais, J. D., Chin, K. T., Zito, E., Zhang, Y., Heldman, N., Harding, H. P., Fass, D., Thorpe, C., and Ron, D. (2010) A small molecule inhibitor of endoplasmic reticulum oxidation 1 (ERO1) with selectively reversible thiol reactivity. *J Biol Chem* **285**, 20993-21003
97. Scheuner, D., Song, B., McEwen, E., Liu, C., Laybutt, R., Gillespie, P., Saunders, T., Bonner-Weir, S., and Kaufman, R. J. (2001) Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. *Mol Cell* **7**, 1165-1176
98. Schnur, A., Beer, S., Witt, H., Hegyi, P., and Sahin-Toth, M. (2014) Functional effects of 13 rare PRSS1 variants presumed to cause chronic pancreatitis. *Gut* **63**, 337-343
99. Hegyi, E., and Sahin-Toth, M. (2019) Human CPA1 mutation causes digestive enzyme misfolding and chronic pancreatitis in mice. *Gut* **68**, 301-312
100. Xiao, X., Jones, G., Sevilla, W. A., Stolz, D. B., Magee, K. E., Haughney, M., Mukherjee, A., Wang, Y., and Lowe, M. E. (2016) A Carboxyl Ester Lipase (CEL) Mutant Causes Chronic Pancreatitis by Forming Intracellular Aggregates That Activate Apoptosis. *J Biol Chem* **291**, 23224-23236
101. Beer, S., Zhou, J., Szabo, A., Keiles, S., Chandak, G. R., Witt, H., and Sahin-Toth, M. (2013) Comprehensive functional analysis of chymotrypsin C (CTRC) variants reveals distinct loss-of-function mechanisms associated with pancreatitis risk. *Gut* **62**, 1616-1624
102. Szabo, A., Xiao, X., Haughney, M., Spector, A., Sahin-Toth, M., and Lowe, M. E. (2015) A novel mutation in PNLIP causes pancreatic triglyceride lipase deficiency through protein misfolding. *Biochim Biophys Acta* **1852**, 1372-1379
103. Lasher, D., Szabo, A., Masamune, A., Chen, J. M., Xiao, X., Whitcomb, D. C., Barmada, M. M., Ewers, M., Ruffert, C., Paliwal, S., Issarapu, P., Bhaskar, S., Mani, K. R., Chandak, G. R., Laumen, H., Masson, E., Kume, K., Hamada, S., Nakano, E., Seltsam, K., Bugert, P., Muller, T., Groneberg, D. A., Shimosegawa, T., Rosendahl, J., Ferec, C., Lowe, M. E., Witt,

- H., and Sahin-Toth, M. (2019) Protease-Sensitive Pancreatic Lipase Variants Are Associated With Early Onset Chronic Pancreatitis. *Am J Gastroenterol* **114**, 974-983
104. Masson, E., Chen, J. M., and Ferec, C. (2015) Overrepresentation of Rare CASR Coding Variants in a Sample of Young French Patients With Idiopathic Chronic Pancreatitis. *Pancreas* **44**, 996-998
105. Rinderknecht, H., Renner, I. G., Abramson, S. B., and Carmack, C. (1984) Mesotrypsin: a new inhibitor-resistant protease from a zymogen in human pancreatic tissue and fluid. *Gastroenterology* **86**, 681-692
106. Katona, G., Berglund, G. I., Hajdu, J., Graf, L., and Szilagyi, L. (2002) Crystal structure reveals basis for the inhibitor resistance of human brain trypsin. *J Mol Biol* **315**, 1209-1218
107. Szilagyi, L., Kenesi, E., Katona, G., Kaslik, G., Juhasz, G., and Graf, L. (2001) Comparative in vitro studies on native and recombinant human cationic trypsins. Cathepsin B is a possible pathological activator of trypsinogen in pancreatitis. *J Biol Chem* **276**, 24574-24580
108. Szmola, R., and Sahin-Toth, M. (2007) Chymotrypsin C (caldecrin) promotes degradation of human cationic trypsin: identity with Rinderknecht's enzyme Y. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 11227-11232
109. Nemoda, Z., and Sahin-Toth, M. (2006) Chymotrypsin C (caldecrin) stimulates autoactivation of human cationic trypsinogen. *J Biol Chem* **281**, 11879-11886
110. Sabharwal, A. K., Padmanabhan, K., Tulinsky, A., Mathur, A., Gorka, J., and Bajaj, S. P. (1997) Interaction of calcium with native and decarboxylated human factor X. Effect of proteolysis in the autolysis loop on catalytic efficiency and factor Va binding. *J Biol Chem* **272**, 22037-22045
111. Guillin, M. C., and Bezeaud, A. (1992) Thrombin derivatives obtained by autolytic or limited tryptic cleavage. *Semin Thromb Hemost* **18**, 224-229
112. Scheele, G., Bartelt, D., and Bieger, W. (1981) Characterization of human exocrine pancreatic proteins by two-dimensional isoelectric focusing/sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis. *Gastroenterology* **80**, 461-473
113. Gottesman-Katz, L., Chung, W., Hernan, R., and DeFelice, A. R. (2020) Two Novel PNLIP Mutations Causing Congenital Lipase Deficiency in Identical Twin Boys. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **70**, e85-e86
114. Sahin-Toth, M. (2017) Genetic risk in chronic pancreatitis: the misfolding-dependent pathway. *Curr Opin Gastroenterol* **33**, 390-395

115. Satoh, J., Darley-USmar, V. M., Kashimura, H., Fukutomi, H., Anan, K., and Ohsuga, T. (1986) Analysis of pure pancreatic juice proteins by two-dimensional gel electrophoresis in cases of pancreatic cancer. *Gastroenterol Jpn* **21**, 623-629
116. Consortium, G. T., Laboratory, D. A., Coordinating Center -Analysis Working, G., Statistical Methods groups-Analysis Working, G., Enhancing, G. g., Fund, N. I. H. C., Nih/Nci, Nih/Nhgri, Nih/Nimh, Nih/Nida, Biospecimen Collection Source Site, N., Biospecimen Collection Source Site, R., Biospecimen Core Resource, V., Brain Bank Repository-University of Miami Brain Endowment, B., Leidos Biomedical-Project, M., Study, E., Genome Browser Data, I., Visualization, E. B. I., Genome Browser Data, I., Visualization-Ucsc Genomics Institute, U. o. C. S. C., Lead, a., Laboratory, D. A., Coordinating, C., management, N. I. H. p., Biospecimen, c., Pathology, e, Q. T. L. m. w. g., Battle, A., Brown, C. D., Engelhardt, B. E., and Montgomery, S. B. (2017) Genetic effects on gene expression across human tissues. *Nature* **550**, 204-213

9. PUBLIKÁCIÓS LISTA



**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/449/2021.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Toldi Vanda

Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Toldi, V.**, Kassay, N., Szabó, A.: Missense PNLIP mutations impeding pancreatic lipase secretion cause protein misfolding and endoplasmic reticulum stress.
Pancreatology. [Epub ahead of print], 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pan.2021.07.008>
IF: 3.996 (2020)
2. **Toldi, V.**, Szabó, A., Sahin-Tóth, M.: Inactivation of mesotrypsin by chymotrypsin C prevents trypsin inhibitor degradation.
J. Biol. Chem. 295 (11), 3447-3455, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.RA120.012526>
IF: 5.157





További közlemények

3. Szabó, A., **Toldi, V.**, Gazda, L., Demcsák, A., Tózsér, J., Sahin-Tóth, M.: Defective binding of SPINK1 variants is an uncommon mechanism for impaired trypsin inhibition in chronic pancreatitis.

J. Biol. Chem. 296, 1-13, 2021.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100343>

IF: 5.157 (2020)

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 14,31

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
9,153**

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.



10.TÁRGYSZAVAK/KEYWORDS

mezotripszin	<i>mesotrypsin</i>
kimotripszin C	<i>chymotrypsin C</i>
proteáz	<i>protease</i>
proteáz inhibitor	<i>protease inhibitor</i>
tripszin	<i>trypsin</i>
hasnyálmirigy-gyulladás	<i>pancreatitis</i>
lipáz	<i>lipase</i>
genetikai rizikófaktor	<i>genetic risk factors</i>
sejten belüli fehérje akkumuláció	<i>intracellular accumulation</i>
fehérje aggregáció	<i>protein aggregation</i>
ER stressz	<i>ER stress</i>

11.KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Szabó Andrásnak, hogy szakmai tapasztalatával és tanácsaival segítette munkámat.

Köszönöm Prof. Dr. Tőzsér József intézetvezető úrnak, hogy lehetőséget biztosított a Retrovirális Biokémiai Kutatólaboratóriumban PhD. tanulmányaim folytatására.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Sahin-Tóth Miklósnak, hogy szakmai tanácsaival támogatta munkámat.

Külön köszönöm Miczi Máriónak és Nataly Morales Granda-nak a barátságukat, támogatásukat, szakmai tanácsaikat és a jó hangulatot.

Köszönöm a Retrovirális Biokémiai Kutatólaboratórium korábbi és mostani munkatársainak, külön kiemelve Kassay Norbertet, Dr. Szojka Zsófiát, Dr. Golda Máriát, Joóné Dr. Matúz Krisztinát, Janics-Pető Szilviát és Dr. Mótyán Jánost, szakmai tanácsaikat és a baráti hangulatot.

Szeretném megköszönni a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet dolgozóinak.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni családomnak, páromnak és barátaimnak a támogatásukat, nélkülük nem sikerülhetett volna.