

DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**A Ty1 retrotranszpozon proteáz enzimatisz
sajátságainak és humán tripszinek gátolhatóságának
vizsgálata**

Gazda Lívia Diána

Témavezető: Dr. Tózsér József



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIAI DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2023

A Ty1 retrotranszpozon proteáz enzimátikus sajátságainak és humán tripszinek gátolhatóságának vizsgálata

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

Írta: Gazda Lívía Diána, okleveles molekuláris biológus

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

Témavezető: Prof. Dr. Tózsér József

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Balogh István, MTA doktora
tagok: Dr. Ambrus Attila, MTA doktora
Dr. Csoma Eszter, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Elméleti Tömb 5. számú
szemináriumi tanterem,
2023. június 15, 10:30

Az értekezés bírálói:

Dr. Boros Eszter, PhD
Dr. Dócsa Tibor, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Balogh István, MTA doktora
tagok: Dr. Boros Eszter, PhD
Dr. Dócsa Tibor, PhD
Dr. Ambrus Attila, MTA doktora
Dr. Csoma Eszter, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet "A" épület
tanterem, 2023. június 15, 13:00

1. BEVEZETÉS

1.1 A proteázokról általában

Az enzimek az összes élőlényben előforduló biokatalizátorok, amelyek a peptidkötés hidrolízisének sebességét gyorsítják fel. A proteázok minden szervezet számára nélkülözhetetlen enzimek. Az emberi szervezetben részt vesznek többek között az emésztésben, vérárvadásban, jelátviteli útvonalakban, és az immunrendszer megfelelő működésében. Mivel a biokémiai útvonalak fontos résztvevői, rendellenes működésük patológiás állapotot idézhet elő, mint például daganatos, gyulladásos megbetegedések vagy neuro-degeneratív rendellenességek. A vírusokban és egyéb mikroorganizmusok életciklusában is kulcsfontosságú szerepet töltenek be.

A legismertebb proteázok emésztőenzimek, mint például a gyomorban termelődő pepszin, ami egy aszpartil proteáz, vagy a hasnyálmirigyben termelődő tripszin, ami a szerin proteázok csoportjába tartozik. A virális proteázok közül a legjobban karakterizált a HIV-1 proteáz, ami terápiás célpontként is szolgál, ezért a retrovirális és retrovírus-szerű aszpartil proteázok karakterizálása az utóbbi évtizedekben előtérbe került.

1.2 Az aszpartil és szerin proteázok

Az aszpartil proteázok közül számos enzim ismert és jól karakterizált, ebbe a csoportba tartozik például a pepszin, renin, katepszin D, katepszin E. A Nemzetközi Biokémiai és Molekuláris Biológiai Unió (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, IUBMB) besorolása szerint az aszpartil proteázok az általuk katalizált reakció alapján a hidrolázok és ezen belül olyan endopeptidázok, amelyek katalitikus helyén aszpartát aminosav található (EC 3.4.23). Ezekre az enzimekre összességében jellemző, hogy a katalitikus aszpartát körüli motívum a következő: Xaa-Xaa-Asp-Xbb-Gly-Xbb, ahol az Xaa hidrofób aminosav, az Xbb pedig szerin vagy treonin. A csoport más klinikai szempontból fontos aszpartil proteázokat is magába foglal, mint például az 1-es típusú humán immundeficiencia vírus (HIV-1) proteáz (PR) vagy a *Saccharomyces cerevisiae*-eredetű Tyl retrotranszpozon proteázt. A transláció során egy fehérjeláncot kódoló gén íródik át és két monomer fehérjelánc dimerizálva hozza létre az aktív enzimet.

A szerin proteázok családjában sok virális illetve emésztő enzimet találhatunk. Ide tartoznak például az emésztő enzimek, mint a kimotripszin és tripszin. A szekvencia, a negyedleges szerkezet, valamint a katalitikus aminosavak sorrendjére alapozva körülbelül 14 klánt és 50 családot különböztethetünk meg a szerin proteázokon belül. A legtöbb peptidáz az S1 családon belül prekuzorként szintetizálódik, egy N-terminális szignált tartalmaz, aminek az eltávolítása limitált proteolitikus hasítást igényel, így aktiválva az enzimet. A szerin, treonin és cisztein peptidázok abban különböznek az aszpartil, glutamát és metalloproteázoktól, hogy a víz helyett az aktív centrum nukleofilje egy aminosav rész. Ennek következményeképp az acil intermedierek csak a szerin, treonin és cisztein peptidázok által katalizált reakciókban jöhetnek létre. Szerin peptidáznak nevezzük azokat a proteázokat, ahol a katalitikus aktivitás a

szerin hidroxil csoportján alapszik, ami nukleofilként fogja támadni a peptidkötést a szubsztrátban.

1.3 Az aszpartil és szerin proteázok gátlószerei

Az aszpartil proteázok általános erős inhibitora a hat aminosavból (Iva-Val-Val-Sta-Ala-Sta; Iva: izovaleril, Sta: sztatin) álló peptid, a pepsztatin A. Az acetil-pepsztatin a pepsztatin A N-acetil származéka (Ac-Val-Val-Sta-Ala-Sta-OH; Ac: acetil), az aszpartil proteázok aktív centrumához kötődik, a kötődés következtében tetraédes állapot alakul ki, mert az aktív centrum aszpartátjai a peptid közepén elhelyezkedő sztatin OH csoportjával lépnek kölcsönhatásba, így a hidrolíziskor az aktív helyre kötődő katalitikus vízmolekula kiszorul a reakcióból. Az acetil-pepsztatin majdnem azonos kémiai szerkezettel rendelkezik, mint a pepsztatin A, azonban az acetil-pepsztatin hatékonyabb gátlószere a retrovirális eredetű proteázoknak, mint a pepsztatin A *in vitro* kísérletekben.

A szerin proteázok és inhibitoraik a legjobban kutatott fehérje komplexek közé tartoznak. A különböző típusú inhibitorokat a hatásmechanizmusuk alapján különböztetjük meg és három csoportba sorolhatjuk, i) kanonikus vagy más néven standard mechanizmusú, ii) nem-kanonikus és iii) szerpin-típusú inhibitorokról beszélhetünk. A kanonikus inhibitorok egy konvex-kötő hurkon keresztül kötődnek az enzimekhez, amely az aktív centrumba illeszkedik. A gátlási mechanizmus nagyon hasonlít egy ideális szubsztrát kötéséhez. A kanonikus inhibitorok csoportjába tartozik a Kazal 1-es típusú szerin proteáz inhibitor (SPINK1), amely a humán hasnyálmirigy acinus sejtjeiben termelődve a tripszin idő előtti aktiválódását és így a szerv önemésztődését gátolja.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Habár az *S. cerevisiae* Ty1 retrotranszpozon proteáz tisztítási protokollja régóta elérhető volt, a proteáz biokémiai szempontból nem karakterizálták, ezért kutatócsoportunk célul tűzte ki a proteáz enzimatiságainak feltérképezését. Célunk volt az enzim tisztítását követően a proteáz számára optimális körülmények meghatározása, az enzim aktivitásának és specificitásának tanulmányozása, különböző proteáz inhibitorok hatásának, valamint a szerkezeti sajátosságok *in silico* módszerekkel történő vizsgálata. A biokémiai sajátosságokat minden esetben más retrovirális és retrovírus-szerű proteázok tulajdonságaival kívántuk összehasonlítani, az általános hasonlóságok és különbségek meghatározása érdekében.

A krónikus hasnyálmirigy-gyulladás kiváltó oka genetikai szempontból komplex, kialakíthatja a PRSS, CTRC, SPINK1, CPA1 gének mutációja. A mutációk két patológiásan különböző útvonalon vezetnek a betegség kialakulásához. Az egyik útvonal a megnövekedett tripszin aktivitást jelenti a hasnyálmirigyen belül, a másik pedig a hibás fehérje folding által okozott funkcióvesztést foglalja magába. A SPINK1 tripszin inhibitor fiziológiásan az idő előtti tripszin aktivációt gátolja a hasnyálmirigyben, ezért a mutációk, amelyek a SPINK1 gént érintik, rendellenességet okozhatnak a tripszin aktivációban. Betegektől vett mintákból a SPINK1 N34S, illetve számos más mutációt is kimutató több kutatócsoport és feltételezték, hogy szerepet játszhat a hasnyálmirigy-gyulladás kialakulásában. A számos tanulmány ellenére a mechanizmust, ami emögött áll nem vizsgálták, ezért célul tűztük ki a humán tripszin kationos és anionos izoforma szulfatálás hatásának vizsgálatát a SPINK1 inhibitor kötésére, valamint a SPINK1 különböző mutánsainak hatását a proteáz-inhibitor kötés erősségére.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 A Ty1 proteáz vizsgálata

3.1.1 A Ty1 proteáz klónozása, expressziója és tisztítása

A Ty1 Gag-PR-His₆-t kódoló pET11a vektort Dr. J.F. Lawler kutatócsoportja (The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland, USA) bocsájtotta rendelkezésünkre. A Ty1 proteáz kódoló szekvenciát pET11a vektorba klónoztuk PCR módszerrel. A proteáz Gag-PR és PR formában BL21(DE3) *Escherichia coli* sejtekben termeltük. Míg a Ty1 Gag-PR-His₆ fehérjét a szolubilis frakcióból nyertük ki és Ni-kelát affinitás kromatográfiával tisztítottuk, a Ty1 PR-t az inszolubilis frakcióból gélszűréssel tisztítottuk. A fehérjék tisztaságát a 14%-os SDS-PAGE módszerrel vizsgáltuk. A fehérjét tartalmazó frakciókat „élesztő *in vivo*-szerű” puffer ellen dializáltuk majd 10K, valamint 3K Amicon Ultra 0,5 ml centrifugacsövek segítségével ultraszűréssel koncentráltuk. A fehérjekoncentráció meghatározását Bradford módszerrel végeztük.

3.1.2 A Ty1 proteáz azonosítása Western-blot módszerrel

A fehérjéket 14%-os poliakrilamid gélen választottuk el, majd nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A fehérjéket egér anti-His elsődleges antitesttel és torma peroxidázzal konjugált kecske anti-egér másodlagos antitesttel mutattuk ki. A detektáláshoz kemilumineszcens szubsztrátot használtunk.

3.1.3 Aktivitás mérések szintetikus oligopeptid szubsztrátokkal

A mérésekhez vízben oldott oligopeptid szubsztrátot használtunk, amit 0,2-1,2 mM koncentrációban inkubáltunk 2-5 órán át 30°C-on Ty1PR-His₆ vagy Ty1 PR-ral (400-1600 nM). A hasítási termékeket HPLC módszerrel választottuk el. Az enzimkinetikai méréseket a Ty1 PR/IN hasítóhelyet reprezentáló oligopeptid szubsztráttal (VPTIN*NVHTS) végeztük el. A kinetikai paramétereket a 20% hidrolízis alatti mérési adatokból számoltuk.

3.1.4 A pH, ionerősség, hőmérséklet és urea hatása a Ty1 proteáz aktivitására

A különböző reakciókörülmények hatását a Ty1 proteáz aktivitására a VPTIN*NVHTS szekvenciájú szintetikus oligopeptid szubsztráton vizsgáltuk. A Ty1 PR-His₆ aktivitás pH optimum értékének vizsgálata során az enzim reakciót 4 órán át 30°C-on inkubáltuk, 6,5-től 9,0-ig terjedő pH érték skálán. Az ionerősség hatását az aktivitásra 0,5-től 2 M-ig terjedő NaCl koncentráció mellett határoztuk meg. A proteáz hőmérsékleti optimumát 18-tól 37°C-ig terjedő skálán vizsgáltuk. Az urea disszociációs állandó (UC₅₀, a homodimer enzim aktivitásának 50%-os csökkenését eredményező urea koncentráció) meghatározását olyan pufferben (pH 8,0) végeztük el, ami 0,05-0,25 M ureát tartalmazott.

3.1.5 A Ty1 proteáz gátlás vizsgálata

A gátlási vizsgálatok során különböző HIV-1 proteáz gátlók hatását vizsgáltuk Ty1 PR-His₆ aktivitására. A vizsgált gátlók a következők voltak: atazanavir, nelfinavir, saquinavir, darunavir, amprenavir, lopinavir és tipranavir HIV-1 proteáz gátlók, az acetil-pepszatin és pepszatin A általános aszpartil proteáz inhibitorok. Az 50%-os gátláshoz tartozó inhibitor koncentráció (IC₅₀) meghatározásához az acetil-pepszatint 100 nM-től 1000 nM-ig terjedő koncentráció tartományban alkalmaztuk.

3.1.6 Fluoreszcens fehérje szubsztrátok klónozása, expressziója és tisztítása

A fluoreszcens fehérje szubsztráttal végzett kinetikai mérésekhez a munkacsoportunk által kidolgozott kísérletes rendszert alkalmaztuk, a rekombináns fehérjék előállításához az eredeti pDest-His₆-MBP-mTurquoise2 expressziós plazmidot módosítottuk. A restriktációs enzimekkel hasított vektorba két oligonukleotiddal klónoztuk a (GGGGS)₄ flexibilis linkert kódoló szekvenciát, amit végül T4 DNS ligázal kapcsolunk össze. A konstruktot TOP10 *E. coli*-eredetű kompetens sejtbe transzformáltuk, majd a plazmidokat High-Speed Plasmid Mini Kit-tel izoláltuk, és kapilláris DNS szekvenálási eljárással ellenőriztük. A Ty1 retrotranszpozon proteáz hasítóhelyeit kódoló szekvenciákat a BamHI és PacI restriktációs endonukleázokkal linearizált pDest-His₆-MBP-(GGGGS)₄-mTurquoise2 plazmidba klónoztuk. Az endonukleázokkal hasított linearizált plazmidot először 1% agaróz gélen futtatuk meg, NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit-tel tisztítottuk, végül 150 ng tisztított lineáris plazmidot 200 ng oligonukleotid primer-rel inkubáltunk és ligáltunk.

3.1.7 A fluoreszcens fehérje szubsztrátok vizsgálata SDS gélelektroforézissel

A rekombináns fluoreszcens szubsztrátokat BL21(DE3) *E. coli* sejtvonalon expresszáltuk. A His₆ címkével ellátott rekombináns fluoreszcens szubsztrátokat a szolubilis frakcióból tisztítottuk, a felülúszót 30 percig szobahőn inkubáltuk folyamatos forgatás mellett Ni-NTA mágneses gyöngyökkel. A gyöngy és felülúszó elválasztásához Dynamag™-2 magnetic particle concentrator mágneses állványt használtunk, majd a felülúszót eltávolítottuk és a gyöngyöket pufferrel való mosás után az aktivitás mérésekhez használt pufferben vettük fel.

3.1.8 A fluoreszcens szubsztrátok analízise gélelektroforézissel

A rekombináns szubsztrátokat az oldatban való emésztéshez elúciós pufferrel eluáltuk a mágneses gyöngyökről, majd 10K Amicon Ultra 0,5 mL ultraszűrő csöveket használva az elúciós puffert vízre cseréltük. A reakciók peptid puffert, rekombináns fehérje szubsztrátot (1–3 mg/mL) és Ty1 proteázt (300–1200 nM) tartalmaztak, míg a kontroll reakciók „élesztő *in vivo*-szerű” azaz tároló puffert az enzim helyett. Az enzim reakciókat 16 órán át 30°C-on inkubáltuk és Laemmli mintapufferrel állítottuk le. Gélelektroforézis előtt a fehérjéket 95°C-on denaturáltuk. A hasítatlan szubsztrátokat a hasítási termékektől SDS-PAGE segítségével választottuk el. A denaturálódott fluoreszcens fehérjéket a poliakrilamid gélben renaturáltuk, úgy, hogy az SDS-t a gél vízben történő rázatva inkubálásával (szobahőmérsékleten) távolítottuk el. A renaturáció után a gélben a fehérjéket kék átvilágító tálcán történő átvilágítással, illetve Coomassie festéssel detektáltuk.

3.1.9 Kinetikai mérések fluoreszcens fehérje szubsztrátokon

A kinetikai mérések során a fluoreszcens fehérje szubsztrátokat a Ni-NTA mágneses gyöngyökhöz immobilizáltuk majd különböző mennyiségű gyöngyöt mértünk ki. A gyöngyök és felülúszó elválasztásához mágneses állványt használtunk, majd a szubsztrátokat tartalmazó gyöngyöket egyenlő térfogatú reakció pufferben vettük fel. A szubsztrát koncentrációt Bradford assay-el állapítottuk meg. A szubsztrátok koncentrációja maximum 0,08 mM-t ért el és a mérésekhez a fúziós címke nélküli Ty1 proteázt használtuk mikromoláris koncentrációkban. A mintákat 2 órán át 30°C-on inkubáltuk, majd az enzimreakciót a mágneses gyöngyök és a folyadék fázis fizikai elválasztásával állítottuk le. Az így kapott felülúszó fluoreszcenciáját multimode mikrotiter plate-olvasó készülékkel mértük meg, 400/10 nm gerjesztési és 460/40 nm elnyelési tartományú filterekkel. A relatív fluoreszcens intenzitás (RFU) értékeket a vak mintákkal korrigáltuk, elosztottuk a referencia egyenes meredekségével, végül ábrázoltuk az így kapott szubsztrát koncentráció (μM) függvényében. A kinetikai paramétereket kevesebb, mint 20% hidrolízisnél mértük és Michaelis-Menten nem-lineáris regresszió alapján határoztuk meg, GraphPad Prism 5.00 verziójú szoftver segítségével.

3.1.10 In silico analízis, a Ty1 proteáz modellezése

A másodlagos szerkezet jóslása PredictProtein szerver felhasználásával a Ty1 proteáz szekvenciája alapján (UniProtKB: Q07793) készült. A rendezetlenség jóslásához az IUPred web szervert használtuk. A homológ modellezést Modeller 9v13 szoftverrel végeztük. A szerkezetek megjelenítése a PyMOL Molecular Graphics System szoftverrel történt. Az *in silico* analíziseket Dr. Mótyán János András végezte.

3.1.11 Mintaelőkészítés és MALDI-TOF MS analízis

A Ni-NTA mágneses gyöngyökhöz kötöttük a rekombináns fehérje szubsztrátokat, majd a Ty1 proteázzal inkubáltuk 16 órán át 30°C-on. Inkubáció után a hasítási termékeket imidazol-tartalmú eluáló pufferrel eluáltuk. Az eluált frakciókat koncentráltuk, valamint 10K Amicon Ultra 0,5 ml ultraszűrő csövekkel az eluáló puffert 50 mM Tris pufferre (pH 8,0) cseréltük. A koncentrált mintákhoz a dohány karcolatos vírus (*Tobacco Etch Virus*, TEV) proteázt adtunk és 16 órán át 30°C-on inkubáltuk. Inkubálás után a mintákban található hasítási termékek molekulatömegét mátrix-asszisztált lézer deszorpció, ionizáció, repülési idő mérésén alapuló tömegspektrometriával (MALDI-TOF MS) vizsgáltuk.

A MALDI-TOF MS méréseket Dr. Nagy Tibor az Alkalmazott Kémia Tanszék munkatársa végezte el, Bruker Autoflex Speed tömeg spektrofotométer használatával. A mintákat 2,5-dihidroxibenzoát (DHB) mátrixban készítettük elő 0,1% TFA-t tartalmazó víz-acetonitril (1:1) oldatban oldva, a koncentráció 100 mg/ml volt. 1 μl mátrixot helyeztünk a plate-re és 1 μl mintát adtunk hozzá, amit száradni hagyunk.

3.2 A SPINK1 vizsgálata

3.2.1 Expressziós plazmidok

Az expresszió vizsgálatához a vad típusú és mutáns SPINK1 fehérjéket kódoló DNS szekvenciát XhoI és BamHI restrikciós enzimekkel pcDNA3.1(-) plazmidba klónozták Dr. Szabó András, C-terminális His₁₀ címkével, illetve anélkül. A fehérje tisztításokhoz a SPINK1 vad típusú és mutáns fehérjéket kódoló DNS szekvenciát korábban a SPINK-1-minigene-1 vektorba klónozták, amely a SPINK1 első intronját és egy C-terminális His₁₀ címkét is tartalmazott (SPINK1-His₁₀). A humán kationos tripszinogén (pTrapT7-Hu1, pcDNA3.1(-)-Hu1), humán anionos tripszinogén (pTrapT7-Hu2, pcDNA3.1(-)-Hu2) és tirozil protein szulfotranszferáz 2 (pcDNA3.1(-)-TPST2) expressziós plazmidok klónozását korábban már leírták, laborunkban ezekkel a plazmidokkal dolgoztunk.

3.2.2 Sejtkultúrák és transzfekció

Humán embrionális vese sejteket (HEK293T) pcDNA3.1(-) plazmiddal transzfektáltuk Lipofectamin segítségével Opti-MEM médiumban. A sejteket 15 órán át 5% CO₂ inkubátorban, 37°C-on inkubáltuk, majd a felülúszót eltávolítottuk a sejtekről és PBS-sel (pH 7,4) mostuk őket, végül Opti-MEM-et mértünk rájuk. A felülúszót végül 48 óra után távolítottuk el és 15% SDS-PAGE-el, illetve Western-blot-tal azonosítottuk a SPINK1 fehérjét.

3.2.3 Western-Blot

Elektroforézis előtt a mintákat 2x Laemmler mintapufferrel és 1 M DTT-vel elfőztük 95°C-on 15 percig. A SPINK1-His₁₀ fehérjét Western-blottal mutattuk ki, a PVDF membránt blokkoló pufferben blokkoltuk, majd torma peroxidázzal konjugált anti-His antitesttel 1:2000 arányban, 1 óráig inkubáltuk szobahőmérsékleten. A HRP aktivitást kemilumineszcens szubsztráttal detektáltuk. A His₁₀ címke nélküli, natív SPINK1 fehérjét szintén Western-blottal mutattuk ki, PVDF membránt egér monoklonális anti-SPINK1 antitesttel inkubáltuk 1 éjszakán át. Másodlagos antitestként HRP-konjugált anti-egér IgG használtunk. A HRP aktivitást itt is kemilumineszcens szubsztráttal detektáltuk.

3.2.4 A SPINK1 expressziója és tisztítása

A HEK293T sejteket polietilénimin (PEI) illetve expressziós vektor keverékével transzfektáltuk. A sejteket 15 órán át inkubáltuk CO₂ inkubátorban, majd Opti-MEM-mel mostuk, végül 20 mL friss Opti-MEM-et mértünk rájuk. 48 óra inkubálás után a felülúszókat begyűjtöttük és újból 20 ml friss Opti-MEM-et mértünk a sejtekre. A SPINK1-His₁₀ fehérjét Ni-NTA oszlopon tisztítottuk. A fehérjét tartalmazó frakciókat 20 mM Tris-HCl (pH 8,0) ellen dializáltuk, vagy 5 ml HiTrap sómentesítő oszloppal cseréltük le az eluáló puffert 20 mM Tris-HCl (pH 8,0) pufferre.

3.2.5 A tripszinogén expressziója és tisztítása

A nem-szulfatált, rekombináns kationos tripszinogént (Hu1) és az anionos tripszinogént (Hu2) *Escherichia coli* BL21(DE3) baktérium sejtekben expresszáltuk. A sejteket szonikálással tártuk fel, majd centrifugálással választottuk el a szolubilis és inszolubilis frakciókat. Végül a

felülűszót 1 mM L-cisztin és 1 mM L-cisztein tartalmú pufferhez adtuk és egy éjszakán át inkubáltuk a fehérje folding elősegítésére. Az így kapott oldatból a tripszinogéneket ekotin-affinitás kromatográfiával tisztítottuk. A szulfatált, natív tripszinogéneket humán hasnyálmirigy váladékból tisztítottuk MonoQ anion cserélő oszloppal, amit ekotin-affinitás kromatográfia követett. A nem-szulfatált és szulfatált tripszinogéneket HEK293T sejtekben is expresszáltuk. A sejteket 10 µg pcDNA3.1(-)-Hu1 vagy pcDNA3.1(-)-Hu2 plazmiddal transzfektáltuk és 50 mM nátrium klorát jelenlétében növesztettük, ezzel gátolva az endogén ATP szulfuriláz. A sejteket ko-transzfektáltuk 8 µg pcDNA3.1(-)-Hu1 vagy pcDNA3.1(-)-Hu2 plazmiddal és 2 µg pcDNA3.1(-)-TPST2 plazmid DNS-el. Utóbbi a tirozil protein szulfotranszferázt kódolja, amely a termelt tripszinogének szulfatálásáért felelős. A tripszinogéneket 200-400 ml sejtfeülűszóból tisztítottuk, ekotin-affinitás kromatográfiával. A zimogéneket humán enteropeptidázzal aktiváltuk és a tripszin koncentrációt titrálással határoztuk meg.

3.2.6 Koncentráció meghatározások

A HEK293T sejtek által termelt SPINK1-His10 fehérje koncentrációját a sejtfeülűszóban humán tripszin elleni titrálással határoztuk meg. Felező hígítási sort készítettünk 96-lyukú plate-n mintapufferrel és tripszin oldattal. Minden lyukban 40 nM volt a tripszin végkoncentrációja. A reakciókat 30 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten majd Z-Gly-Pro-Arg-p-nitroanilidin szubsztrátot (szintén mintapufferben oldva) adtuk a lyukakhoz, így indítva a reakciókat. A tripszin aktivitását az inhibitor koncentráció függvényében ábrázoltuk, a SPINK1 koncentrációt a mérési pontokra illesztett egyenes X tengely keresztmetszetéből állapítottuk meg.

A marha tripszint p-nitrofenil p-guanidinobenzoáttal titráltuk. Az *E. coli* BL21(DE3) sejtekben termeltetett ekotint a periplazmából nyertük ki majd tisztítottuk. Az ekotin koncentrációt úgy határoztuk meg, hogy marha tripszin ellen titráltuk. Ezt az ekotin törzsoldatot használtuk a humán tripszinek aktív centrum titrálására. A reakciók 25-50 nM tripszint tartalmaztak, legalább 2 nagyságrenddel meghaladták az ekotin egyensúlyi disszociációs állandó értékét. A SPINK1 koncentrációját szintén aktív centrum titrálással határoztuk meg 25-50 nM tripszinnel a reakciókban. A K41N SPINK1 mutáns esetében az inhibitor csak nagyon gyengén kötődött a tripszinhez, így a koncentrációját SDS-PAGE analízissel, Coomassie Blue festéssel, denzitometriával határoztuk meg, ismert koncentrációjú vad típusú SPINK1 standard-ot használva.

3.2.7 Az egyensúlyi állandók meghatározása

A vad típusú és mutáns SPINK1 fehérjék kötődését a tripszin izoformákhoz az egyensúlyi állapotban a disszociációs állandó (K_D) meghatározásával állapítottuk meg. A 0,2 ml térfogatú reakciókat állandó tripszin koncentráció mellett növekvő SPINK1 koncentrációval állítottuk össze, majd 15 órán át inkubáltuk, kivéve K41N SPINK1 mutánst, amit 1 órán át inkubáltunk. Az egyensúly beállta után a szabad tripszin koncentrációját Z-Gly-Pro-Arg-AMC fluoreszcens szubsztrát felhasználásával határoztuk meg, fekete 96-lyukú platen, 380 nm excitációs és 460 nm emissziós hullámhosszon. A K_D értékeket a szabad tripszin

és teljes inhibitor koncentráció függvényében határoztuk meg. A görbéket legalább három mérés eredményének adataiból, globális illesztéssel készítettük.

3.2.8 Enzim asszociáció vizsgálata

A reakciók 50 pM tripszin és 500 pM SPINK1-et tartalmaztak szobahőn inkubálva. A tripszin aktivitását Z-Gly-Pro-Arg-AMC fluorogén szubsztrát hozzáadását követően mértük 96-lyukú platen, 380 nm gerjesztési és 460 nm kibocsájtási hullámhosszon. A pseudo-elsőrendű állandót (k_{obs}) úgy kaptuk meg, hogy a $\ln(vt/v_0)$ szemilogaritmikus ábrázolásból kapott egyenes meredekségét a gátlási idő függvényében ábrázoltuk, ahol v_0 a maximum, nem gátolt enzim aktivitás, vt a szabad enzim aktivitása, a következő egyenlet alapján: $(-k_{obs})(idő)=\ln(vt/v_0)$. A másodrendű asszociációs sebességi állandót (k_{on}) a pseudo-elsőrendű állandó és gátlószer koncentráció hányadosából számoltuk.

3.2.9 Enzim disszociáció vizsgálata

A proteáz-inhibitor komplexet 11 nM SPINK1 és 10 nM végkoncentrációjú tripszin összekeverésével és 1 órán át 23°C-on történő inkubációjával készítettük el. A reakciókat ezután hígítottuk és Z-Gly-Pro-Arg-AMC szubsztrát hozzáadásával indítottuk. A tripszin aktivitást fekete 96-lyukú plate-n, 380 nm excitációs és 460 nm emissziós hullámhosszon követtük szobahőmérsékleten. A parabolikus görbéket a másodrendű polinominális egyenlettel illesztettük. Az illesztett c koefficiens a kezdeti komplexképződés koncentrációjának függvényében ábrázoltuk (pM), a K_{off} -ot (mp-1) az egyenes meredekségéből határoztuk meg. A tripszin átviteli számát a peptid szubsztrátra a kalibrációs egyenes segítségével, a disszociációs mérésekkel azonos kísérleti körülmények között állapítottuk meg. A szubsztrát hidrolízis kezdeti sebességét (RFU/mp) az enzim koncentráció függvényében ábrázoltuk, az így kapott egyenes meredksége az átviteli szám (RFU/mp/pM).

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

4.1 A Ty1 proteáz vizsgálata

4.1.1 A Ty1 proteáz klónozása, expressziója és tisztítása

A Ty1 proteáz natív, His₆ fúziós címkét nem tartalmazó változatát pET11a plazmidba klónoztuk és szekvenálással ellenőriztük. A címke nélküli és a His₆ címkét tartalmazó (Ty1 Gag-PR-His₆) Ty1 proteázt kódoló plazmidokat egyaránt *E. coli* sejtekbe transzformáltuk. Ezt követően a Ty1 proteázt expresszáltuk, majd gélszűréssel tisztítottuk. A Ty1 Gag-PR-His₆ fehérje feltételezhetően autoproteolízis révén processzáldott a Ni-kelát kromatográfiával történő tisztítás során, így a Ty1 Gag-PR-His₆ prekursor (molekulatömeg: ~72 kDa) fehérjéről a Ty1 PR-His₆ formája hasadt le (molekulatömeg: ~21 kDa). A processzált Ty1 PR-His₆-t használtuk a biokémiai tulajdonságok vizsgálata során.

4.1.2 Ty1 proteáz aktivitás esszé szintetikus oligopeptid szubsztrátokkal

Az optimális feltekeredés elérése érdekében a Ty1 proteázt számos különböző puffer ellen dializáltuk és az aktivitást számos pufferben vizsgáltuk, amiben a retrovirális proteázok aktivitását kimutatták. A reakciókban a proteázt és a szintetikus oligopeptid szubsztrátokat a pufferhez adtuk, 30°C-on inkubáltuk, végül TFA hozzáadásával állítottuk le, majd az aktivitás megállapítása érdekében a keletkezett termékeket a hasítatlan szubsztrátoktól reverz fázisú oszlopon választottuk el, és meghatároztuk a szubsztrátok konverziójának mértékét.

A Ty1 proteáz több retrovirális proteáz számára optimális pufferben sem mutatott aktivitást. Kizárólag az „élesztő *in vivo*-szerű” puffer ellen dializált fehérje esetében tapasztaltunk enzimaktivitást, a reakciókat PIPES- („A” peptid puffer) vagy MES-alapú („B” peptid puffer) pufferekben végezve. A pufferek aránya a reakciókban is fontos tényezőnek bizonyult az aktivitás szempontjából. Az optimális arány ¼ víz, ¼ „élesztő *in vivo*-szerű” puffer, 2/4 PIPES vagy MES alapú puffer. A puffer összetétel meghatározása mellett vizsgáltuk a különböző reakció körülmények hatását az aktivitásra, így karakterizáltuk a proteáz biokémiai tulajdonságait.

Az ionerősség hatását vizsgáltuk az enzim aktivitásra, a legoptimálisabbnak a 1,5-2 M tartomány bizonyult. Az I-es típusú humán immundeficiencia vírus (HIV-1), 1, 2, 3-as típusú humán T-sejtes leukémia vírus (HTLV-1, -2, -3) és (humán foamy vírus) HFV proteázokhoz hasonlóan az ionerősség növelte a Ty1 proteáz aktivitását >1 M NaCl koncentrációban. A *D. melanogaster* Copia transzpozon proteáz szintén magas, 2 M NaCl koncentráció mellett érte el az aktivitás maximumát, ezalatt és felett csökkent az aktivitása.

A Ty1 proteáz pH optimuma enyhén lúgosnak adódott (pH 7,7), ami magasabb, mint általában a retrovirális vagy retrovírus-szerű proteázoké. Például a HFV proteáz pH optimuma 6,6–6,8, míg a HIV-1 proteázé 4-6 közötti tartományba esik. A humán ASPRV1 proteáz optimuma pedig az enyhén savas tartományba esik (6,0-6,5). A pH optimum a humán *peg10* gén által kódolt apai allélról expresszáldó gén 10 (*paternally expressed gene 10*, PEG10) proteáz enzim esetében is lúgos tartományba esik pH 6,9-7,4 közé a Ty1 proteázhoz hasonlóan.

Érdekes, hogy a *D. melanogaster* Copia transzpozon proteáz pH optimuma a HIV-1 proteázhoz hasonló, a legmagasabb aktivitást 4-es pH értéken mérték szintetikus szubsztráton.

A Ty1 proteáz hőmérsékleti optimuma 30°C körülnek adódott, magasabb hőmérsékleten alacsonyabb aktivitás értékeket mértünk. Ezt a tulajdonságot megfigyelték sok nem retrovírus-eredetű proteáz tanulmányozása során is, például a dohány érfoltosság vírus (*tobacco vein mottling vírus*, TVMV) és a TEV PR esetén is alacsonyabb aktivitást mértek 34°C felett.

Ezzel ellentétben a HFV proteáz és a HIV-1 proteáz legmagasabb aktivitás értékeit 37°C-on mérték. Az általunk megállapított hőmérséklet optimuma a Ty1 proteáz esetén egyezést mutat a Lawler és munkatársai által megfigyelt alacsonyabb retrotranszpozíciós képességgel magasabb hőmérséklet tartományban (32–36°C), ami a Ty1 proteáz hőmérséklet szenzitásának az eredménye.

A Ty1 proteáz érzékenynek bizonyult egy kaotropikus ágenssel, az ureával szemben, ami jelentősen csökkentette az aktivitást. Az általunk megállapított urea koncentráció, ami 50%-os aktivitás-vesztést okoz, az úgynevezett urea disszociációs állandó (UC_{50}) 0,05 M értéknek adódott a Ty1 proteáz esetében. Ez egy nagyságrenddel alacsonyabb az ASPRV1 ($UC_{50}=0,54$ M), míg két nagyságrenddel kisebb a HIV-1 proteáz esetében meghatározott értékhez képest ($UC_{50}=1,47$ M), viszont hasonló a munkacsoportunk által az XMRV proteáz esetében meghatározott $UC_{50}=0,2$ M értéknel.

Az alacsonyabb UC_{50} érték alacsonyabb dimer stabilitást sejtet a Ty1 proteáz esetén, amelynek a lehetséges szerkezeti okára a későbbiekben *in silico* analízis részben térünk ki. A retrovirális proteázok, úgy, mint a HIV-1, HTLV-1, BLV és a MMLV proteázok általában magas aktivitást mutatnak a természetes hasítóhelyeikkel megegyező szekvenciájú mesterséges oligopeptid szubsztrátokon, ellenben a Ty1 proteáz és a Ty1 PR-His₆ is alacsony aktivitást mutatott a Ty1 természetes hasítóhellyel azonos mesterséges oligopeptid szubsztrátokon. Hasonlóképp alacsony aktivitást figyeltek meg laborunk munkatársai a HFV proteáz és a Gag-encoded *Avian myeloblastosis* vírus (AMV) proteáz esetén. A Ty1 proteáz és a Ty1 PR-His₆ is hasította a VPTIN*NVHTS szekvenciájú szintetikus oligopeptid szubsztrátot, ami a PR/IN hasítóhelyet reprezentálja a Ty1 retrotranszpozon prekursor fehérjében. A kinetikai paramétereket ezen szubsztrát segítségével mértük. A katalitikus állandó (k_{cat}) a His címkével ellátott és a His címke nélküli natív fehérje esetén nem mutatott szignifikáns eltérést, ami arra utalt, hogy a C-terminális hexahisztidin címke nem befolyásolja a fehérje foldingját és aktivitását.

A mért alacsony specificitási állandót ($0,028$ mM⁻¹s⁻¹) a PR/IN szubsztrátra munkacsoportunk már a HFV proteáz esetén is meghatározta, a proteázra optimalizált körülmények mellett $0,007$ mM⁻¹s⁻¹ értéket állapított meg. Teszteltük a Ty1 retrotranszpozon többi hasítóhelyét, így az IN/RT (IHLIA*AVKAV) és a Gag/PR (TARAH*NVSTS) hasítóhelyet reprezentáló szintetikus szubsztrátot is, ezeken a szubsztrátokon azonban nem figyeltünk meg aktivitást.

4.1.3 Kinetikai mérések fluoreszcens fehérje szubsztrátokon

A kinetikai mérésekhez az előzőekben publikált rekombináns fúziós fehérje szubsztrátokat használtuk. A szubsztrátok tartalmaztak egy N-terminális His₆ címkét, ami

elősegítette az immobilizációt, valamint egy maltóz-kötő fehérje címkét (MBP) ami segítette a foldingot, illetve egy C-terminális fluoreszcens fehérjét (mTurquoise2), ami a fluoreszcens detektálást tette lehetővé. Továbbá a szubsztrátok tartalmaznak egy TEV proteáz kontroll hasítóhelyet is, amelyet a Ty1 proteáz hasítási pozíciójának azonosítása során alkalmaztunk, valamint tartalmazták a Ty1 retrotranszpozon hasítóhelyet. Az előzőekben leírt szubsztrátokat úgy módosítottuk, hogy a fluoreszcens fehérje rész elé egy (GGGS)₄ flexibilis linkert klónoztunk, ezzel megnövelve a távolságot az MBP és mTurquoise2 fúziós címkék között, ami a hasítóhely jobb hozzáférhetőségét biztosította a proteáz számára. Hét különböző, a természetes hasítóhelyeket reprezentáló fluoreszcens szubsztráton vizsgáltuk a Ty1 proteáz aktivitását, különböző pufferekben.

A hasítatlan szubsztrátokat, valamint a hasított fragmenseket SDS-PAGE-sel is vizsgáltuk. Nem figyeltünk meg nem-specifikus hasítási termékeket az inkubáció ideje alatt. A Ty1 proteázzal inkubált mintákban egyetlen fluoreszcens fragmenst mutattunk ki minden szubsztrát, azaz hasítóhely esetében. Ez azt jelenti, hogy nincsenek alternatív hasítási helyek a rekombináns fehérje szubsztrátokban és a Ty1 proteáz csak egyetlen, általunk beépített specifikus helyen hasítja őket. A hasított mintákat MALDI-TOF tömeg-spektrométerrel analizáltuk.

A Ty1 proteáz kinetikai paramétereit fluoreszcens esszével vizsgáltuk. A 10 aminosav hosszú hasítóhelyet tartalmazó szubsztrátokon mért katalitikus állandó minden esetben azonos nagyságrendű volt, a legmagasabb értéket a PR/IN hasítóhelyet tartalmazó szubsztráton mértük „B” reakció pufferben (50 mM MES, 100 mM Tris, 50 mM Na-acetát, 150 mM NaCl, 75 mM KCl, 12,5 mM NaH₂PO₄, 61,25 mM Na-glutamát, 12,5 mM MgSO₄, 0,125 mM CaCl₂, 0,05% Tween20, pH 8,0). A mért katalikus állandók magasabbnak adódtak a 20 aminosav hosszú hasítóhelyet tartalmazó szubsztrátokon mint a rövidebb, 10 aminosavat tartalmazó szubsztrátokon. Ezzel ellentétben, a k_{cat}/K_m állandók alacsonyabbak voltak a hosszabb 20 aminosavat tartalmazó szubsztrátok esetén (IN/RT és Gag/PR) amikor a méréseket „A” reakció pufferben (10 mM PIPES, 75 mM NaCl, 0,25% Nonidet P-40, 5% glicerol, 75 mM KCl, 12,5 mM NaH₂PO₄, 61,25 mM Na-glutamát, 12,5 mM MgSO₄, 0,125 mM CaCl₂, 0,05% Tween20, pH 7,0) végeztük. Ennek az eltérésnek az oka a különböző mérési körülmény, különböző puffer lehet, valamint az, hogy egy kiterjedtebb szubsztrát (vagy linker) szekvencia esetén sok alternatív, de nem-produktív bekötődés is történhet, ami befolyásolhatja a mért paramétereket. A felszíni aminosavak szerepét a szubsztrát-kötésben nemrég bizonyították a HIV-1 és HTLV-1 proteázok esetében, ezt a kötőfelszínt szubsztrátkötő ároknak (*substrate groove* vagy *S-groove*) nevezték el. A HIV-1 mátrix (MA) és kapszid (CA) fehérje közötti régió a HIV-1 poliproteinben nem vesz fel másodlagos szerkezetet és hozzáférhető a HIV-1 proteáz számára. Amíg a HIV-1 és HTLV-1 proteáz aktív centruma a P5-P5' aminosavakat köti, a felszíni S-groove lehetővé teszi, hogy a proteáz kölcsönhatásba lépjen a P12-P6 és P6'-P12' aminosavakkal a domén közötti régiókban, ami kiterjesztett szubsztrát kötő felszínt fog létrehozni. A kötési energia a P12-P12' aminosavak kötése esetén magasabbnak adódott, mint amikor csak a P4-P4' aminosavak kötődtek az aktív centrumhoz. (15. ábra).

A katalitikus állandókat összehasonlítva nem figyeltünk meg különbséget a 10 és 20 aminosav hosszúságú kötőhelyek között a Ty1 proteáz esetén, ezért nem feltételezhetjük egyértelműen a szubsztrátkötő árok enzimefelszíni kötőhelyek jelenlétét a Ty1 proteázban. Ezt úgy vizsgáltuk, hogy a rekombináns szubsztrátok nem csak a PR/IN hasítóhely 10

(VPTIN*NVHTS) és 20 aminosav (PSNISVPTIN*NVHTSESTRK) hosszúságú részét tartalmazták, hanem annak egy mutáns verzióját is (GGGGVPTIN*NVHTSGGGG) ahol a P10-P6 és P6'-P10' pozíciókban az aminosavakat glicinre cseréltük. Ezzel azt vizsgáltuk, hogy az oldallánc közvetített enzim szubsztrát interakciót rontja-e a mutáció. A k_{cat}/K_m katalitikus állandó hasonló értéket mutatott a PR/IN 20 aminosav vad típus és PR/IN 20 aminosav mutáns szubsztrátokon. A glicin szubsztitúció csak minimális eltérést okozott a k_{cat}/K_m értékekben, amelyek nem adódtak szignifikánsak. Amíg a HIV-1 proteáz esetében igazolták az enzimefészini szubsztrátkötő árok kötőhelyek jelentőségét a szubsztrát kötésben, addig az általunk mért *in vitro* eredmények nem szolgáltattak egyértelmű bizonyítékkal, de arra utalnak, hogy a Ty1 proteáz felszíni aminosavai is hozzájárulhatnak a szubsztrát felismeréséhez. A szubsztrátban a P10-P6 és P6'-P10' pozíciókban található aminosavak megváltoztatása, azaz az oldallánc közvetített interakciók törlése ezekben a pozíciókban, nem okozott szignifikáns eltérést a katalitikus állandóban különféle pufferekben mérve. Ezért azt feltételezzük, hogy a Ty1 proteáz felszíni aminosavai gyenge kölcsönhatásba lépnek a szubsztráttal ezekben a pozíciókban.

4.1.4 Hasítóhelyek azonosítása a rekombináns fluoreszcens szubsztrátokban

Munkacsoportunk az SDS-PAGE alapján nem azonosította a vártnál több hasítási terméket a rekombináns fluoreszcens szubsztrátokban, tehát nem detektáltunk nem-specifikus hasítóhelyeket ezzel a módszerrel.

A kontrollként használt TEV proteáz hasítóhelyet a His₆-MBP-mTurquoise2 szubsztrátokban ezen tanulmányban használtuk először a proteáz pontos hasítóhelyének meghatározásában. Célunk az volt, hogy igazoljuk, hogy a Ty1 proteáz nem hasít alternatív, nem-specifikus helyeken a szubsztrátban. Ahhoz, hogy ezt igazoljuk, a szubsztrátokat Ty1 és TEV proteázokkal egyaránt hasítottuk. A keletkező rövid termék fragmenseket MALDI-TOF tömegspektrométerrel azonosítottuk, minden szubsztrát variáns esetében. A kísérleteket „B” reakció pufferben végeztük, majd a Tween20 detergenst - ami a tömegspektrometria eredményét befolyásolhatja - eltávolítottuk úgy, hogy a puffert 50 mM Tris (pH 8,0) oldatra cseréltük. A puffer cseréhez centrikon csöveket használtunk 10 kDa-os pórus mérettel, ami a polietilén glikol származékokat bizonyítottan eltávolította, a fragmensek azonosítását tömegspektrométerrel nem befolyásolta. Miután Ty1 és TEV proteázzal hasítottuk a szubsztrátokat, a hasítási termékeket MALDI-TOF tömegspektrométerrel azonosítottuk és a számolt m/z értékeket ([M+H]⁺) összehasonlítottuk.

A mért értékek megegyeztek az általunk számoltakkal. A tömegspektrométerrel mért eredmények tehát összhangban voltak az SDS-PAGE analízis eredményeivel és azt igazolták, hogy a Ty1 proteáz egyetlen specifikus helyen hasít a szubsztrátban, tehát nem hasít alternatív pozíciókban, sem a (GGGS)₄ flexibilis régióban, sem a felismerő helyet körül vevő egyéb pozíciókban.

4.1.5 Ty1 proteáz gátlhatóságának vizsgálata

Teszteltük a Ty1 proteáz aktivitására potenciálisan ható azon gátlószereket, amelyek a *Food and Drug Administration* (FDA), az Amerikai Egyesült Államokban működő élelmiszerbiztonsági szervezet által elfogadott és retrovirális terápiában használt HIV-1

proteáz gátlószerek. A gátlószerek a következők voltak: atazanavir, nelfinavir, saquinavir, darunavir, amprenavir, lopinavir és tipranavir. Teszteltük továbbá a DMP-323-t, ami egy a HIV-1 proteázhoz erősen kötődő gátlószert, valamint teszteltük az általános aszpartil proteáz gátlószereket is, az acetil-pepszatint és pepszatin A-t.

Az említett gátlószerek közül egyedül az acetil-pepszatin gátolta a Ty1 proteáz aktivitását, a többi gátlószert nem okozott változást az aktivitásban 100 nM-os végkoncentrációban sem. Míg korábbi eredményeink alapján az amprenavir, atazanavir, darunavir, tipranavir, lopinavir és DMP-323 az XMRV proteáz aktivitását gátolták, a Ty1 proteáz esetében ezen gátlószerek mellett a nelfinavir és a saquinavir sem mutattak gátló hatást. A HIV proteáz inhibitorok nem mutattak gátlást több retrotranszpozon-eredetű proteázra irányuló tanulmányban sem, valamint a humán ASPRV1 proteáz és a humán PEG10 proteáz sem gátolták. Az XMRV proteáz az acetil-pepszatin és pepszatin A csak kis mértékben gátolja, ám a pepszatin A semmilyen mértékben nem gátolta a Ty1 proteázot. Az acetil-pepszatinra a következő értékeket állapítottuk meg, $IC_{50}=367,5$ nM és a $K_i=296$ nM. Ezek az értékek a HIV-1 ($K_i=13,15$ nM, $IC_{50}=1,18$ nM) proteáz esetén alacsonyabbak, tehát az acetil-pepszatin gátlási képessége a Ty1 proteázra vonatkoztatva alacsonyabb, az XMRV proteázhoz hasonlítható ($K_i=712$ nM, $IC_{50}=1290,2$ nM). A copia retrotranszpozon proteáz esetén mért érték $K_i=15$ nM pedig, a HIV-1 proteázon mért értékhez hasonló. Annak ellenére, hogy egyedül az acetil-pepszatin gátolta a Ty1 proteáz aktivitását, a fenti értékek azt igazolják, hogy az acetil-pepszatin A is csak gyenge gátlószere a Ty1 proteáznak. Érdekes, hogy az acetil-pepszatin kivételes módon kötődik az XMRV proteázhoz, egyszerre két molekula kötődik az aktív centrumban fej-fej orientációban. A jövőben krisztallográfiai mérések igazolhatják, hogy ez az elmélet a Ty1 proteáz acetil-pepszatin komplexre is megvalósul-e.

4.1.6 In silico vizsgálatok

A Ty1 proteáz szerkezetét homológ modellezés segítségével jósoltuk, ugyanis a Ty1 proteáz szerkezetéről 2022 májusáig sem áll rendelkezésre kísérletes adat. Az előzőekben leírtak alapján, a Ty1 proteáz domén a megszokottnál hosszabb, 181 aminosavból áll. Az N és C-terminális régiók jelentősen hosszabbak, mint az a retrovirális és retrovírus-szerű proteázokra általában jellemző. Ezen régiók szerkezeti vagy funkcionális jelentőségét ez idáig még nem vizsgálták. Hosszabb N- és C-terminális régiókat megfigyeltek néhány retrovirális proteáz esetében, például a MMLV proteáz N és C-terminális régiója néhány aminosavval hosszabb, mint a HIV-1 proteázé, de még így is jóval rövidebb, mint a Ty1 proteáz N-terminális része. Habár ennek a résznek az MMLV proteáz aktivitásában nincs szerepe, a HIV-1 proteáz N-terminális részének precíz processzálódása - hasítás a dimerizációs régió előtt - növeli az enzim aktivitását. Az MMLV és XMRV proteázok 98% szekvencia azonosságot mutatnak és csak két aminosavban tér el a szekvenciájuk, így mindkettő összehasonlítható a Ty1 proteázzal, jelen esetben az XMRV proteázot hasonlítottuk a Ty1 proteázhoz.

A másodlagos szerkezeti elemek *in silico* jósolt elrendeződése nagyfokú hasonlóságot mutatott a retrovirális és retrovírus-szerű proteázokéval. Továbbá a D-S-G-A szekvencia a Ty1 proteázban megegyezik a retrovirális proteázok konszenzus D-S/T-G-A aktív centrum motívumával, illetve a folding is megegyezett a retrovirális proteázokéval. Az N-terminális (N1-H56) rész jósolt szerkezete nem mutatott rendezett másodlagos szerkezeteket (α -hélixeket

vagy β -redőket). A rendezetlenségi jóslás szintén szerkezet nélküli természetű jóslat az N-terminális részre, hasonlóképp az MMLV proteázhoz, ahol ez a rész flexibilis, konformációja nem ismert. Egy α -helixet jósltunk a katalitikus motívumhoz közel (A71-H75), ami megegyezik a DNS károsodás által indukálódó protein (Ddi1) proteázban és a lovak fertőző kevésvérűségét okozó vírus (*equine infectious anemia virus*, EIAV) proteázban leírt helikális inzerttel. A jóslási eredmények azt sejtetik, hogy a dimerizációs régió a Ty1 proteáz homodimerben csak C-terminális β -redőket tartalmaz, amelyeket rövid hurkok kötnek össze. A HIV-1 és EIAV proteázokkal szemben a Ty1 proteáz dimerizációs régiójában ezek a β -redők nem mutatnak alterációt. Mindkét monomer C-terminális részén négy-négy β -redőt jósltunk.

Egyetlen ismert szerkezetű retrovirális vagy retrovírus-szerű proteáz sem rendelkezik nyolc β -redőből álló dimerizációs régióval. Azt feltételezzük, hogy a Ty1 proteáz dimerizációs régiója is csak hat β -redőből áll, hasonlóan a Ddi1 proteázéhoz. Ebből kiindulva, a Ddi1 proteázot vettük alapul a Ty1 proteáz dimerizációs régiójának modellezéséhez. Továbbá, mivel nem állt rendelkezésünkre templát nyolc β -redőből álló dimerizációs régióval, nem volt lehetséges egy ilyen modellt építenünk, a negyedik β -redő szerepe csak hozzávetőlegesen lett volna becsülhető. A Ty1 proteáz érzékenysége az urea koncentrációra - a HIV-1 proteázhoz hasonlítva - magyarázatot szolgáltat a dimerizációs régió elrendeződésére. Amíg a HIV-1 proteáz N és C-terminális régiója alternáló β -redőkből áll, addig az XMRV és Ty1 proteázok csak C-terminális β -redőket tartalmaznak, amelyek nem váltakozva helyezkednek el. Mindkét proteáz alacsonyabb dimer stabilitást, tehát nagyobb érzékenységet mutatott a HIV-1 proteázhoz képest. Ez azt jelentheti, hogy a nem váltakozó C-terminális β -redőket tartalmazó dimerizációs régió stabilitása kisebb (Ty1 és XMRV proteázok), mint ahol a homodimeriek között váltakozó β -redők közötti kölcsönhatás alakul ki, mely erősíti a dimerizációt (HIV-1 proteáz). A katalitikus motívum szintén szerepet játszhat a dimer stabilitásban. A retrovirális aszpartil proteázok homodimerjei a monomerek konszenzus aktív centrum (D-S/T-G-A) motívum szerin vagy treonin oldalláncai közötti interakciók, úgynevezett tűzoltófogas révén stabilizálják a dimerizációt. Korábban kimutatták, hogy azok az enzimek dimerjei, amelyek szerint tartalmaznak treonin helyett az aktív centrumban, kevésbé stabilak. Ezt igazolta a T26S HIV-1 proteáz mutáns, amely alacsonyabb specifikus aktivitást mutatott a vad típushoz képest, a HFV S25T mutánsa pedig kevésbé volt érzékeny a növekvő urea koncentrációra. A Ty1 proteázban szintén szerint találunk az aktív centrumban, ami szerepet játszhat az alacsonyabb dimer stabilitásban.

A N- and C-terminális régiók megvizsgálásának érdekében modelleztük a teljes hosszúságú Ty1 proteáz szerkezetét. Ezekről a kiterjesztett régiókról nem áll rendelkezésre semmilyen szerkezeti adat az aszpartil proteázok körében, ezért templát nélkül a jóslt konformációk csak nagy bizonytalansággal becsülhetőek. A teljes proteáz jóslt szerkezetét an *in vitro* eredmények értelmezéséhez használtuk fel. Abból a célból, hogy megértsük a szubsztrátkötő árok szerepét a szubsztrát kötésben, a kinetikai méréseket fluoreszcens rekombináns fehérje szubsztrátokon végeztük el, de a Ty1 proteáz interakcióját a P10-P6 és P6'-P10' pozíciójú aminosavakkal nem tudtuk bizonyítani egyértelműen. A lehetséges konformációs variánsok szerkezete azt sejteti, hogy a Ty1 proteáz felszíni aminosavai nem annyira hozzáférhetőek, mint a HIV-1 proteáz esetében, bár megfelelő templát szerkezet hiányában a hosszabb N- és C-terminális szakaszok pontos konformációja nem volt megbízhatóan modellezhető.

Ennek az lehet az oka, hogy az N- és C-terminális kiterjesztések térben közel vannak az aktív centrumhoz, valamint az enzim felszínéhez. Figyelembe véve ezt a potenciális, sztérikus elrejtését a szubsztrátkötő aminosavaknak feltételeztük, hogy a Ty1 proteáz P10-P6 és P6'-P10' pozíciókkal kölcsönhatásba lépő felszíni aminosavai hiányoznak, vagy teljesen más szerkezetet vesznek fel, mint a HIV-1 proteáz esetében. Pontosabb szerkezeti modellek, illetve kiterjedt molekuladinamikai számítások nélkül nem tudtuk megállapítani, hogy a Ty1 proteáz felszíni aminosav-maradékai hozzáférhetetlenek vagy esetleg az N- és C-terminális régiók térben gátolják a szubsztrát kötést. A Ty1 és Ty-3 proteázok természetes hasítóhelyeit már vizsgálták korábban, a hidrofóbitási indexét a P10-P10' aminosav pozícióknak meghatározták. Összehasonlítva ezeket az értékeket jelentős specificitásbeli eltéréseket állapítottak meg, mint ami általában a retrovirális hasítóhelyekre jellemző, de a proteázok szerkezetét idáig senki sem hasonlította össze. A szubsztrátkötő zseb tanulmányozásának céljából a jósolt teljes Ty1 proteáz szerkezetet használtuk fel. A P4-P1 pozíciók aminosav összetételét a HIV-1 és Ty1 szerkezet-alapú illesztésével határoztuk meg. A HIV-1 proteáz szubsztrátkötő zsebének kompozícióját már korábban meghatározták, a Ty1 proteáz szubsztrátkötő zsebeit a megfelelő helyen lévő aminosavak azonosításával térképeztük fel.

Azt találtuk, hogy a Ty1 proteáz S1 kötő zsebe főként hidrofób aminosavakat tartalmaz, ami hasonlóságot mutat a HIV-1 proteáz S1 kötő zsebéhez. Habár a retrovirális proteázok általában főként hidrofób aminosavakat preferálnak a P1 pozícióban, a három ismert Ty1 felismerési és hasítóhelyeken hidrofil aminosavmaradékokat találunk a P1 és P1' pozíciókban. A modell alapján az S2 szintén hidrofób aminosavakból áll, ami megfelel a P2 és P2' magasabb hidrofóbitásának, itt általában valin vagy izoleucin aminosavak találhatóak. Az enzim S3 pozícióban főként hidrofil aminosavakat azonosítottunk, ami összhangban van a hasítóhelyek P3 és P3' pozícióival, ugyanis ezekben itt is főként hidrofil aminosavak jellemzőek a szekvenciára. A P4 és P4' pozíciók nem bizonyultak se hidrofóbnak, sem pedig hidrofilnak, illetve az enzim S4 helyet hidrofóbként azonosítottuk, habár fontos megjegyezni, hogy ez nehézségekbe ütközött, mert a proteáz ezen része a felszínhez közel helyezkedik el. A hidrofób, hidrofil és töltéssel rendelkező aminosavak eloszlása a Ty1 proteázban nem tért el jelentősen a HIV-1 proteáztól, kivéve a Ty1 proteáz S3 zsebet, amely nem tartalmaz töltéssel rendelkező aminosavakat. Habár a kötőhelyek összetételének profilja megegyezik a hasítóhelyek hidrofóbitási profiljával, a specificitást nem lehet pontosan megbecsülni kizárólag a szubsztrátkötő zseb összetétele alapján. Az enzim specificitás pontos megállapításához kiterjesztett *in silico* vizsgálatokra és *in vitro* kísérletekre lenne szükség változatos szubsztrát sorozattal.

4.2 A SPINK1 vizsgálata

4.2.1 Szekretálódó misszensz SPINK1 variánsok

A szekréción vizsgálatokat Demcsák Alexandra és Sahin-Tóth Miklós végezték el. Irodalmi adatok és az előzetes kísérleteik azt mutatták, hogy a mutációk többsége az inhibitor szekréción defektusát okozza. Hét SPINK1 mutáció (N34S, N37S, K41N, I42M, P55S, R65Q és Q68R) azonban nem befolyásolta az inhibitor expresszióját és szekréciónját. A kísérleteket elvégeztük C-terminális His₁₀ címkét tartalmazó és anélküli SPINK1 variánsokkal is, hogy meggyőződjünk arról, hogy a címke nem hat az inhibitor szekréciónra. Eredményül azt kaptuk,

hogy a His₁₀ címke összeségében fokozta a SPINK1 szekrécióját. A K41N és Q68R variánsok expresszója kismértékben csökkent a vad típushoz képest. A többi variáns szekréciója nem változott jelentősen. Egy korábbi publikációban a Q68R variáns fokozott szekrécióját közölték. A mi eredményeink azonban ezt a jelenséget nem erősítették meg. A R65Q mutáns csökkent szekrécióját már leírták korábban, viszont munkacsoportunk ennek az ellenkezőjét figyelte meg. A variánsok tripszin elleni gátlási aktivitását is megvizsgáltuk a transzfektált sejtek médiumában. A K41N SPINK1 gátló aktivitását nem tudtuk kimutatni. További kísérleteink során funkcionális vizsgálatokkal arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a szekretálódó SPINK1 variánsok fokozhatják-e a krónikus hasnyálmirigy-gyulladás rizikóját.

4.2.2 A tripszin-SPINK1 komplex modellezése

A következőkben leírt modellezés Szabó András munkája. A SPINK1 fehérje humán tripszinnel alkotott komplexéről napjainkig nincs elérhető röntgenkrisztallográfias adat, ezért munkacsoportunk épített egy modellt, ahol a natív, illetve szulfatált kationos humán tripszint a borjú kimotripszinogén A rekombináns SPINK1 K41Y, illetve I42E variánssal alkotott komplexére vetítettük, végül a reaktív hely peptidkötésben résztvevő Lys41-Ile42 aminosavakat helyreállítottuk. A hét szekréciós mutánsban vizsgált aminosav oldalláncok azt mutatják, hogy a K41N és I42M mutációk befolyásolják a Lys41-Ile42 reaktív peptidkötés erősségét (P1 és P1' pozíciók) és valószínűleg rontják az inhibitor-kötés erősségét. A többi variáns, N34S, N37S, R65Q és Q68R mutáció által érintett aminosav oldalláncok ezzel szemben közvetlen nem állnak kölcsönhatásban a tripszin oldalláncaival, ezért valószínűleg nem befolyásolják az inhibitor kötődését. Érdekeség, hogy a modellben a szulfát csoport a tripszin Tyr154 oldalláncon, a Pro55 aminosav oldallánc közelében helyezkedik el, így feltételezhető, hogy a P55S variáns kötődését befolyásolhatja a tripszin szulfatálása.

Továbbá a SPINK1 Tyr43 oldallánca, amely a reaktív hurok P2' pozíciójában található, szintén a tripszin Tyr154 oldallánc szulfát csoportjának közelében helyezkedik el szterikusán. Ezekből arra következtethetünk, hogy ez a mutáció is a SPINK1 szulfatált tripszin kölcsönhatását gyengítheti. Munkánk során ezeket a feltételezéseket teszteltük kísérletesen.

4.2.3 A vad típusú és N34S SPINK1 kötődése a humán tripszinekhez

A kérdés nyitott, hogy az N34S mutáció változtat-e a SPINK1 tripszinhez való kötődésén, ezért ezt a variánst részletesebben vizsgáltuk. A kísérletekhez rekombináns SPINK1-His₁₀ fehérjéket használtunk, mint ahogy az anyagok és módszerek részben leírjuk. Korábbi kutatások kimutatták, hogy a tripszin gátlása vad típusú és N34S SPINK1 variánssal összehasonlítható, bár a kísérletek technikai háttérükből adódóan csak félkvantitatív minőségűek. Elsőként megmértük a gátlás egyensúlyi állandóját *Eschericia coli*-ban termelt rekombináns tripszin ellen, amely poszttranszlációs módosításon nem megy keresztül, nem-szulfatált.

A vad típusú SPINK1 esetében erős kötődést figyeltünk meg a kationos (K_D 1,1 pM) és anionos tripszinhez (K_D 0,3 pM) egyaránt. Hasonló K_D értékeket mértünk az N34S mutáns

esetében is $K_D=1,5$ pM kationos tripszinre, illetve 0,4 pM anionos tripszinre. Ahogy a szerkezeti model jóslás is sejteti, az állandók magasabbnak adódtak a hasnyálból tisztított szulfatált tripszinek esetében. A vad típusú SPINK1 esetében a K_D érték kationos tripszinre 62,2 pM anionos tripszinre 36,7, az N34S mutáns esetében 32,3 és 16,7 pM volt.

Ez azt jelenti, hogy a tripszin szulfatálásának jelentős szerepe van a SPINK1 inhibitorral való kölcsönhatásban. A N34S mutáns gátlási értékei azt mutatják, hogy valamivel erősebben gátolja a tripszin izoformákat, de ez a különbség a kísérlet hiba tartományán belül esik. Ebből arra következtethetünk, hogy a N34S mutáns SPINK1 tripszin-gátlási képessége nem gyengébb a vad típusú SPINK1-hez képest. Biológiai rendszerekben az inhibitor asszociációs vagy disszociációs sebessége a funkció szempontjából relevánsabb lehet, mint az egyensúlyi kötés erőssége, ezért a K_{on} és K_{off} értékeket is meghatároztuk a vad típusú, illetve N34S SPINK1 mutánsra, kationos és anionos szulfatált, valamint nem-szulfatált rekombináns tripszinekre is. Hasonló értékeket kaptunk mindkét inhibitor esetében. Ha összehasonlítjuk a szulfatált és nem-szulfatált tripszineket, a SPINK1 inhibitor a nem-szulfatált formákhoz gyorsabban kötődik, míg a szulfatált formák esetében a disszociáció gyorsabb. Összességében a nagyobb disszociációs érték magyarázatot ad a magasabb K_D értékre, amelyet az egyensúlyi kötés vizsgálata során állapítottunk meg. A K_D értékeket a sebességi állandóból számoltuk és hasonlítottuk az egyensúlyi kötés erősségéhez. A kapott értékek itt is a pM-os vagy alacsonyabb tartományba tartoztak a nem-szulfatált tripszinek esetében. Megjegyzendő azonban, hogy a használt kísérletes módszer nem megbízható a subpikomoláris K_D tartományban. A szulfatált és hasnyálból tisztított natív tripszinek a számolt K_D értékek két-öttszörös eltérést (alacsonyabb) mutattak a kísérletes eredményekhez képest. Ez az eltérés még elfogadható két eltérő módszer esetében.

4.2.4 A tripszin átmeneti gátlása SPINK1 inhibitorral

A SPINK1 egy úgynevezett átmeneti inhibitor, idővel inaktiválódik és az aktív proteáz felszabadul a gátlás alól. A gátlás alóli felszabadulás első lépéseként a tripszin hasítja a SPINK1 reaktív hurokjában található peptidkötést Lys41-Ile42, amelyet a véglegesen inaktiváló, főként Arg67-Gln68 közötti peptidkötés, illetve az inhibitoron belül több helyen történő hasítás követ. A szulfatált és nem-szulfatált tripszinek vad típusú SPINK1 gátlás alól való felszabadulását összehasonlítva azt találtuk, hogy a szulfatált tripszin sokkal gyorsabban szabadult fel, mint a nem-szulfatált tripszin.

Erre magyarázatot ad, hogy a szulfatált formák esetében az inhibitor disszociáció a tripszinről gyorsabb, ami magasabb K_D értéket jelent. A SPINK1 lebomlását Western-blottal is igazoltuk, ami megegyezett a mintákban mért növekvő tripszin aktivitással. Az átmeneti gátlás kinetikája hasonló volt a vad és N34S mutáns esetében, a felszabadulás valamivel lassabban következett be a mutáns SPINK1 estében.

4.2.5 A tripszin szulfatálás gyengíti a SPINK1 kötést

Ahogy fentebb leírtuk, azt találtuk, hogy a human tripszin szulfatálás a 154-es tirozinon gyengíti a SPINK1 inhibitor kötődését a tripszinhez és elősegíti annak gátlás alóli

felszabadulását. A munkánk során humán hasnyálból izolált szulfatált tripszin izoformákat, illetve *E. coli*-ban termelt nem-szulfatált tripszineket használtunk. A vizsgálatok teljessége érdekében HEK293T sejtekben termelt szulfatált és nem-szulfatált kationos és anionos tripszineket is bevontuk a kísérletekbe, lásd Anyagok és módszerek fejezet. A tripszineket a sejtes felülúszóból tisztítottuk és az egyensúlyi kötés erősségét megmértük a vad típusú és az N34S mutánsra is. A K_D értékek mindig magasabbnak adódtak szulfatált tripszinre, mint a nem-szulfatált tripszinekre, alátámasztva, hogy a szulfatálás gyengíti az inhibitor kötést. Érdekesség, hogy az *E. coli* és hasnyálból tisztított tripszinekkal történő összehasonlítás esetén a K_D értékek a nem-szulfatált HEK293T sejtekben termelt tripszinekre magasabbak voltak, a szulfatált HEK293T sejtekben termelt tripszinekre pedig alacsonyabbak. Ezért a HEK293T sejtekben termelt szulfatált és nem-szulfatált tripszinek kisebb eltérést mutatnak, így a különbség a gátlás csökkenésében kisebb lesz, azonban az előzőekben megfigyelt megállapítás még mindig igaz marad, hogy a szulfatálás gyengíti a SPINK1 kötődését.

4.2.6 A SPINK1 Y43 szerepe a humán tripszinek kötésében

A molekuláris modellezés azt sejtette, hogy a Y43 térben közeli elhelyezkedése a szulfát csoporthoz csökkent gátlást eredményezhet. Ennek igazolására a SPINK1 tirozin 43 aminosavat alaninra, valamint argininra cseréltük és meghatároztuk az egyensúlyi kötési állandót szulfatált és nem-szulfatált kationos tripszinre. A vad típusú SPINK1-el összehasonlítva azt kaptuk, hogy a Y43A mutáns hússzoros, a Y43R mutáns pedig százszoros csökkenést mutat a kötés erősségében nem-szulfatált tripszinre. A kötés erőssége a Y43A mutáns esetében hasonló volt a vad típusúhoz a szulfatált tripszinre, a Y43R pedig háromszor erősebben kötődött a vad típusúhoz képest. Az Y43A mutáns csökkent kötődése a nem-szulfatált tripszinhez cáfolja, hogy a SPINK1 Y43-nak fontos szerepe lenne a tripszin 154 tirozinnal való kölcsönhatásban és így a kötés stabilizálásában. A szulfatált tripszinre ugyanakkor nem mutat elérést a vad típusú SPINK1-hez képest. A Y43R mutáció csökkent inhibitor tripszin kötést eredményez a nem-szulfatált tripszin esetén, azonban a szulfatált tripszinhez erősebben kötődik, valószínűleg elektrosztatikus kötés révén a guanidium és szulfát csoport között. Összességében kijelenthető, hogy a Y43 mutációi a kulcs meghatározói a gyengébb szulfatált tirozin-SPINK1 kölcsönhatásban.

4.2.7 A misszensz SPINK1 mutánsok kötődése a natív human tripszinekhez

Munkánk során az N34S mutáns mellett további 6 különböző SPINK1 mutánst tisztítottunk, amelyek normál szekréciót mutatnak. A gátlási képességük karakterizálása céljából meghatároztuk az egyensúlyi állandókat hasnyálból tisztított humán, natív szulfatált anionos és kationos tripszinekre. Klinikai szempontból ezek a mutációk pathobiokémiai jelentőséggel rendelkezhetnek, így fontos, hogy karakterizáljuk őket. A K41N mutáns a vártnak megfelelően gyengén kötődött mindkét tripszin izoformához, az általunk mért K_D értékek a mikromoláris tartományba estek, ami 20-30 ezerszeres csökkenést jelent. A reaktív hurok mutáns I42M kötődése 3-7-szeresére csökkent. A P55S mutáns csak nagyon kis eltérést mutatott a vad típusúhoz képest, 1,6-3,4-szeres csökkenést. A többi SPINK1 mutáns, N34S, N37S, R65Q és Q68R K_D értékei hasonlóak vagy kisebbek voltak, mint a vad típusé.

Összességében arra a következtetésre jutottunk, hogy a ritka K41N és I42M mutációk, amelyek a reaktív hurokban találhatóak, okoznak szignifikáns változást a tripszin inhibitor kötésében.

Megfigyeléseink és kísérleteink arra engednek következtetni, hogy a SPINK1 lecsökkent kötődése a humán tripszinekhez nem gyakori jelenség krónikus hasnyálmirigy-gyulladásban, és általában ritka mutációk okozzák, amelyek az inhibitor reaktív hurkát érintik. A SPINK1 mutációk fő patogén mechanizmusa, amely hozzájárul a hasnyálmirigy-gyulladás kialakulásához inkább az inhibitor szintjének csökkenésében rejlik, amit a csökkent expresszió és szekréció, valamint a nem megfelelő feltekeredés okoz.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Tanulmányaim során két proteáz és azok inhibitorainak tanulmányozására nyílt lehetőségem. Az *S. cerevisiae* Ty1 retrotranszpozon-eredetű Ty1 proteáz His₆ címkével jelölt és natív jelöletlen formáit BL21(DE3) *E. coli* baktérium törzsben termeltettük. A proteáz jellemzőit, biokémiai sajátosságait elsőként vizsgáltuk. A Ty1 proteáz legfontosabb sajátosságai nagymértékben hasonlóak a retrovírus és retrovírus-szerű proteázokéhoz. Megállapítottuk a proteáz kinetikai paramétereit (K_M , k_{cat} , k_{cat}/K_M) különböző természetes hasítóhelyeket reprezentáló szubsztrátokra. Módosított szubsztrátokkal arra kerestük a választ, hogy a Ty1 proteáz esetében létezhet-e a korábban HIV-1 proteáz esetén azonosított felszíni szubsztrát kötő rész, azonban eredményeik alapján ez a Ty1 proteáz esetében nincs jelen. Vizsgáltuk az ionerősség, hőmérséklet, pH és urea koncentráció hatását az enzim aktivitására, az eredmények mind összehasonlíthatóak voltak a retrovírus-szerű proteázokra jellemző értékekkel. Továbbá vizsgáltuk a HIV1 proteáz és egyéb általános aszpartil proteáz gátlószerek hatását a Ty1 proteázra. Méréseink alapján, a proteáz természetes rezisztenciával rendelkezik a legtöbb HIV-1 proteáz inhibitorral szemben.

Munkánk során a vad típusú, illetve hét betegben azonosított SPINK1 variáns (N34S, N37S, K41N, I42M, P55S R65Q és Q68R) gátlási képességét vizsgáltuk szulfatált és nem-szulfatált humán tripszin izoformákon. A vad típusú és a mutáns SPINK1 fehérje változatok hatását a kötési erősségre az asszociációs és disszociációs állandók megállapításával vizsgáltuk. Amikor a vad típusú SPINK1 kötődését vizsgáltuk *E. coli*-ban termelt (nem-szulfatált) és hasnyálból tisztított tripszin (szulfatált) esetében, a kationos tripszin esetében 50-szeres, az anionos tripszin esetében több mint 120-szeres csökkenést mértünk a K_D értékekben. Megvizsgáltuk a nem-szulfatált és szulfatált humán kationos tripszin átmeneti gátlását a vad típusú és a szakirodalomban hasnyálmirigy-gyulladással asszociált N34S SPINK1 variánssal. Nem figyeltünk meg jelentős eltérést a kötési erősségben vagy degradációban. Vizsgáltuk továbbá a SPINK1 fehérjében két mesterséges mutáció (Y43A és Y43R) hatását a szulfatált és nem-szulfatált kationos tripszin Y154-nel való kölcsönhatásra. A kötés erősségét a tripszinek szulfatációs állapota határozta meg, gyengítve vagy erősítve azt. Mindent összevetve, eredményeink arra engednek következtetni, hogy a SPINK1 inhibitor gyengébb kötődése a tripszin izoformákhoz elhanyagolható, nem kiváltó oka a hasnyálmirigy gyulladásnak, a betegség kialakulásához inkább az inhibitor csökkent expressziója és/vagy megváltozott foldingja járulhat hozzá.

6. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek Prof. Dr. Tózsér József intézetvezető egyetemi tanár Úrnak a szakmai és gyakorlati tanácsaiért.

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

Köszönöm Dr. Szabó Andrásnak és Dr. Mótyán János Andrásnak a szakmai segítséget és a publikációkban, valamint a dolgozat megírásában nyújtott segítséget. Köszönettel tartozom Joóné Dr. Matúz Krisztinának a gyakorlati bevezetésért a laboratóriumi és tudományos munkába. Külön köszönet illeti Janics-Pető Szilvia laboratóriumi asszisztenst a kísérletek előkészítése során nyújtott segítségével.

Köszönöm a segítséget Demcsák Alexandrának és Sahin-Tóth Miklósnak a közlemény elkészítésében végzett munkájukért.

Köszönettel tartozom Dr. Tóth Ferencnek, Dr. Golda Máriának és Dr. Mohamed Mahdi-nak szakmai tanácsaikért és támogatásukért az évek alatt.

Köszönöm Dr. Sojka Zsófiának, Kassay Norbertnek, Dr. Miczi Máriónak, Dr. Toldi Vandának és Nagy Katalinnak baráti támogatásukat és gyakorlati tanácsaikat. Külön köszönöm Dr. Nagy Tibornak a tömegspektrometriás mérések során nyújtott szakmai segítségét.

Végezetül szeretném megköszönni a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet dolgozóinak a lehetőséget és barátságos környezetet.

A kutatásaink kivitelezését a GINOP-2.3.2-15-2016-00044 számú „A gyógyszerkutatás újabb irányai: peptid-fehérje kölcsönhatások a magasabb rendű fehérjeszerveződések szabályozásában- PHARMPROT teaming” című pályázat, valamint a GINOP-2.3.3-15-2016-00021 pályázatok támogatták.

Munkánk létrejöttét továbbá a Nemzeti Egészségfejlesztési Intézet (OEFI) R01 DK117809 és R01 DK058088, Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok (OTKA), Új Nemzeti Kiválóság Program (ÚNKP-20-5), Bolyai Felsőoktatási Fiatal Oktatói, Kutatói Ösztöndíj (BO/00514/19/5) és Innovációs és Technológiai Minisztérium Felsőoktatási Intézményi Kiválósági Program (PD120960 és FK127942) pályázatok tették lehetővé.



Nyilvántartási szám: DEENK/121/2022.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Gazda Livia Diána

Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Szabó, A., Toldi, V., **Gazda, L. D.**, 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)
2. **Gazda, L. D.**, Matúz, K., Nagy, T., Mótyán, J. A., Tózsér, J.: Biochemical characterization of Ty1 retrotransposon protease.
PLoS One. 15 (1), 1-24, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0227062>
IF: 3.24





További közlemények

3. Bozóki, B., Mótyán, J. A., Miczi, M., **Gazda, L. D.**, Tózsér, J.: Use of Recombinant Fusion Proteins in a Fluorescent Protease Assay Platform and Their In-gel Renaturation.
JoVE. 143, 1-15, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3791/58824>
IF: 1.163
4. Bozóki, B., **Gazda, L. D.**, Tóth, F., Miczi, M., Mótyán, J. A., Tózsér, J.: A recombinant fusion protein-based, fluorescent protease assay for high throughput-compatible substrate screening.
Anal. Biochem. 540-541, 52-63, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2017.11.001>
IF: 2.507

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 12,067

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
8,397**

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

Debrecen, 2022.03.23.

