

**Doktori (PhD) értekezés**

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

**Kassay Norbert**

**Témavezető: Prof. Dr. Tózsér József**



**DEBRECENI EGYETEM**

**MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2024.**

## TARTALOMJEGYZÉK

1. Bevezetés.....	4
2. Rövidítések .....	5
3. Irodalmi áttekintés .....	7
3.1 Hidrolázok.....	7
3.1.1. Peptidázok és észterázok .....	7
3.1.2. Aszpartil proteázok és lipázok szerepe emberi megbetegedésekben .....	8
3.2. Retrovírusok .....	9
3.2.1. A deltaretrovírusok.....	9
3.2.2. A retrovírusok szerkezete.....	9
3.2.3. A HTLV vírusok életciklusa .....	11
3.2.4. HTLV-1 kezelési stratégiák.....	13
3.2.5. A HTLV proteáz .....	16
3.3. A krónikus pankreatitisz és rizikófaktorai.....	19
3.3.1. A krónikus pankreatitisz .....	19
3.3.2. Örökletes pankreatitisz .....	21
3.3.3. Örökletes pankreatitisz: tripszin útvonal .....	22
3.3.4. Endoplazmatikus retrikulum stressz.....	22
3.3.5. Örökletes pankreatitisz: aberráns fehérje útvonal .....	25
3.3.6. Humán pankreász lipáz.....	26
4. Célkitűzések.....	28
5. Anyagok és módszerek.....	29
5.1. HTLV proteázok karakterizálása .....	29
5.1.1. HTLV-1, HTLV-2 és HTLV-3 proteázok expressziója .....	29
5.1.2. HTLV-1, HTLV-2 és HTLV-3 proteázok tisztítása .....	29
5.1.3. Oligopeptidek és inhibitorok .....	30
5.1.4. HTLV-1, HTLV-2 és HTLV-3 proteázok aktivitásának vizsgálata .....	30
5.1.5. HTLV-1, HTLV-2 és HTLV-3 proteázok számára optimális pH, hőmérséklet és NaCl koncentráció meghatározása .....	31
5.1.6. A HTLV-2 és HTLV-3 proteázok aminosav preferenciáinak meghatározása.....	31
5.1.7. HTLV-1, HTLV-2 és HTLV-3 proteázok gátolhatóságának vizsgálata.....	32
5.1.8. HTLV-2 és HTLV-3 proteázok irányított mutagenézise.....	32
5.1.9. HTLV-2 és HTLV-3 proteázok autoprocesszáló képességének vizsgálata.....	33
5.2. A főbb cigarettafüst komponensek és a G233E PNLIP mutáció vizsgálata .....	35
5.2.1. Expressziós plazmidok és adenovírus vektorok .....	35
5.2.2. Sejtkultúrák és géntranszfer.....	35

5.2.3. Kémiai kezelések .....	36
5.2.4. Életképesség vizsgálatok .....	36
5.2.5. Áramlási citometria .....	37
5.2.6. SDS-poliakrilamid gélelektroforézis.....	37
5.2.7. RT-PCR és qPCR analízisek .....	37
5.2.8. Fehérje immunoblot.....	38
5.2.9. Statisztikai analízis .....	38
6. Eredmények.....	39
6.1. A HTLV proteázok jellemzése .....	39
6.1.1. A HTLV proteázok expressziója és tisztítása.....	39
6.1.2. Az optimális reakciókörülmények meghatározása és az enzimek stabilitásának .....	40
6.1.3. A katalitikus tulajdonságok összehasonlítása.....	42
6.1.4. Aminosav preferenciák vizsgálata .....	46
6.1.5. Gátlásvizsgálatok .....	48
6.1.6. Szekvencia analízis és szubsztrátkötő helyek vizsgálata .....	49
6.1.7. Autoprocessáló képesség vizsgálata.....	51
6.2. A hidrokinon és G233E PNLIP mutáció kapcsolatának vizsgálata .....	54
6.2.1. A cigarettafüst fő komponenseinek hatása a HEK293AD sejtek életképességére.....	54
6.2.2. A szekréciónak vizsgálata, valamint a hidrokinon és a nem megfelelően feltekeredett PNLIP mutánsnak a HEK293AD sejtek életképességére gyakorolt hatása .....	55
6.2.3. A HQ és a nem megfelelően feltekeredett PNLIP variáns hatása az ER stresszre HEK293AD sejteken .....	56
6.2.4. A HQ hatása az AR42J sejtek életképességére .....	58
6.2.5. A szekréciónak vizsgálata, valamint, az AR42J sejtek életképessége HQ és a nem megfelelően feltekeredett PNLIP mutáns jelenlétében .....	59
6.2.6. A HQ és a nem megfelelően feltekeredett PNLIP variáns hatása az ER stresszre AR42J sejteken .....	60
7. Diskusszió.....	63
8. Összefoglalás .....	69
8. Summary.....	70
9. Irodalomjegyzék .....	71
10. A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények.....	82
11. Tárgyszavak/Keywords .....	84
12. Köszönetnyilvánítás.....	85
13. Függelék.....	86

# 1. BEVEZETÉS

Az első humán patogén retrovírusokat az előző század 80-as éveiben fedezték fel, köztük az 1-es és 2-es típusú humán T-limfotróp vírusokat (HTLV-1, HTLV-2) és az 1-es típusú humán immundeficiencia vírust (HIV-1) is. Ezek közül a legnagyobb figyelmet HIV-1 kapta, mely a szerzett immunhiányos tünetegyüttes (AIDS) betegség kialakulásáért felelős kórokozó. A súlyos megbetegedések a HIV-1 vírussal kapcsolatos kutatások felfutását idézték elő, ezzel elősegítve a HIV-1-ellenes inhibitorok fejlesztését, így mára a HIV-1 fertőzés tünetmentes maradhat. Ezzel párhuzamosan megindultak a HTLV-1 vírussal kapcsolatos kutatások is, amelyek viszont nem zárultak hasonló sikerrel, így a mai napig sincs specifikus terápia az általa kiváltott betegségekre. Az egyik potenciális terápiás támadópont a proteáz, amely a retrovírusok életciklusában esszenciális szerepet tölt be, a HIV-1 ellenes terápiában több proteázgátlót is sikeresen alkalmaznak. A HTLV-2 és HTLV-3 vírusfertőzések kisebb populációkat érintenek, ezért a HTLV-1-nél is kisebb figyelmet kaptak, viszont ezek elterjedése akár egy-egy mutációt követően is gyorsan változhat, ezért szükséges részletesebb vizsgálatuk, így a proteáz tanulmányozása is.

A krónikus pankreatitisz egy súlyos, visszafordíthatatlan megbetegedés, amelyet elsősorban az alkoholfogyasztás vagy a dohányzás, valamint kisebb gyakorisággal a pankréasz acinus sejtei által termelődött fehérjékben található mutációk válhatnak ki. A genetikai eredetű megbetegedések hátterében leggyakrabban a kationos tripszin áll, amely inaktív formában szekretálódik az acinus sejtekből, majd a patkóbélben aktiválódik. A korai, pankréáson belüli aktiválódása tünetekkel asszociálható. A tripszin központi szerepet tölt be más emésztőenzimek aktivációjában is. A tripszin, vagy az aktiválandó emésztőenzimek szekvenciájában található egyes mutációk funkcionyerő és funkcióvesztő hatást is okozhatnak, ezért komoly kockázati tényezők lehetnek. A genetikai eredetű megbetegedések másik típusa esetében a betegség kialakulását a pankréasz sejtek által termelt fehérjék nem megfelelő feltekeredése okozza. Itt a tripszin nem tölt be központi szerepet és a legtöbb, fiziológias körülmények között nagy mennyiségben szekretálódó fehérje érintett lehet, így egy általánosabb mechanizmust jelent. Több esetben egy ilyen fehérje jelenléte elegendő a betegség kiváltásához, számos esetben viszont ez nem egyértelműen bizonyított, illetve egészséges egyéneknél is kimutathatóak ezek a mutációk. Elképzelhető, hogy a betegség kiváltásához más tényezők is szükségesek, viszont ezzel kapcsolatban még kevés adat áll rendelkezésre.

## 2. RÖVIDÍTÉSEK

AIDS	szerzett immunhiányos tünetegyüttes
ATF6	transzkripciós faktor 6
ATLL	fejnött T-sejtes leukémia
AZT	zidovudine/azidothymidine
BiP	immunoglobulin-kötő fehérje
BLV	marha leukémia vírus
CEL	karboxil-észter lipáz
CHOP	C/EBP homológ fehérje
CTRC	kimotripszin C
DMSO	dimetil-szulfoxid
DTT	ditiotreitól
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EIAV	ló vészes vérszegénységét okozó vírus
ER	endoplazmatikus retikulum
HBZ	HTLV-1 bZIP faktor
HFV	humán foamy vírus
HIV-1	1-es típusú humán immundeficiencia vírus
HPLC	nagy teljesítményű folyadékkromatográfia
HTLV	humán T-limfotróp vírus/humán T-sejtes leukémia vírus
HQ	hidrokinon
IRE1	„ <i>inositol requiring enzyme-1</i> ”
$k_{cat}$	katalitikus konstans
$K_i$	inhibíciós állandó
$K_M$	Michaelis-Menten konstans
KP	krónikus pankreatitisz
LB	Luria-Bertani médium
MBP	maltóz-kötő fehérje
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil-tetrazólium bromid
NQO1	NAD(P)H kinon dehidrogenáz 1
PBS	foszfáttal pufferelt sóoldat
PDI	protein diszulfid izomeráz
PEI	polietilén-imin

PERK	“protein kináz RNS-szerű ER kináz”
PIPES	piperazin-1,4-bisz(2-etánszulfonsav)
PNLIP	humán hasnyálmirigy lipáz
PR	proteáz
ROS	reaktív oxigén gyökök
TFA	trifluorecetsav
XBP-1	érett X-boksz-kötő fehérje 1

## 3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 3.1 Hidrolázok

Az enzimeket az általuk katalizált reakció alapján a Nemzetközi Biokémiai és Molekuláris Biológiai Unió (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*; IUBMB) nevezéktani bizottsága csoportosította. Hét fő enzimosztályt különböztetnek meg: oxidoreduktázok (EC-1), transzferázok (EC-2), hidrolázok (EC-3), liázok (EC-4), izomerázok (EC-5), ligázok (EC-6) és transzlokázok (EC-7) (1). A hidrolázok a szubsztrát hasításához vizet használnak hidroxil-csoport donorként. Rendkívül diverz osztályt alkotnak, így az elhasítandó kémiai kötés alapján további 13 alcsoportba oszthatóak, ezek közé tartoznak az észter-kötést hasító észterázok és a peptidkötést hasító peptidázok is (1. ábra).

#### Hidrolázok



1. ábra. A hidrolázok által hasított kötések típusai. A C-X kötés az alkil-halogenidet jelöli.

#### 3.1.1. Peptidázok és észterázok

A peptidáz elnevezés mellett ma már a proteináz és a proteáz is szinonimaként használt, a disszertáció az utóbbi terminológiát használja. A proteázok további besorolása az alapján történik, hogy a katalízis milyen kémiai mechanizmus alapján zajlik. Így megkülönböztetünk szerin-, cisztein-, treonin-, aszpartil-, glutamil-, aszpargil- és metalloproteázokat (1).

Az aszpartil proteázok által katalizált reakciókban a legtöbb esetben, két aszpartát oldallánc együtt képes megkötni és aktiválni egy katalitikus vízmolekulát és így elhasítani egy peptid kötetést. Besorolásuk negyedleges szerkezetük alapján az AA-tól az AF-ig terjed. Az AA csoportra, amelybe a pepszin és a retrovirális proteázok is tartoznak, jellemző, hogy a katalitikus aszpartátot egy konzervált Xaa-Xaa-Asp-Xbb-Gly-Xbb motívum öleli körül, ahol az Xaa hidrofób aminosavakat, míg az Xbb szerint vagy treonint jelölhet (2).

Az észterázok között az elhasítandó észter-kötés típusa alapján megkülönböztetünk karboxil-észter-, tioészter- és foszfo monoészter-hidrolázokat. A karboxil-észterázok egyik

nagyobb csoportja a lipázoké vagy triacil-glicerol hidrolázoké, amelyek jellegzetessége, hogy hosszú láncú zsírsavakat képes felszabadítani lipidekből (3).

### **3.1.2. Aszpartil proteázok és lipázok szerepe emberi megbetegedésekben**

A hidrolázok, ezen belül a részletesebben bemutatott lipázok és aszpartil proteázok alapvető szerepet töltenek be az emberi szervezetben. Az aszpartil proteázok egyik jellemző képviselője a gyomorban a fehérjék emésztését végző pepszin, amellyel a retrovírus proteázok közeli rokonságban állnak, funkcióik viszont teljes mértékben eltérnek, utóbbi a retrovírusok szaporodásában tölt be esszenciális szerepet. Lipázok a gyomorban és a vékonybélbe ürített hasnyálban találhatóak a legnagyobb mennyiségben, ahol a triacil-glicerolok emésztését végzik. Más lipázok a lipoproteinek átalakításában játszanak szerepet.

A retrovírusok elsősorban az immunsejteket fertőzik, így immundeficienciával vagy leukémiával asszociálhatóak. A lipázok leginkább funkcióvesztéses mutációk révén állhatnak kapcsolatban megbetegedésekkel, így lipáz deficienciát okozva. Emellett egyes mutánsoknak a szekréciója sem történik meg, amely az ER stressz válasz beindításával jár.

A lipáz mutációk vizsgálata, valamint a retrovirális proteázok működésének alaposabb megismerése nagyban hozzájárulhat az általuk kiváltott betegségek potenciális terápiás lehetőségeinek felderítéséhez, gyógyszerek fejlesztéséhez.

A disszertáció további részei a viszonylag kevésbé ismert HTLV-2, valamint a HTLV-3 proteázok karakterizációját és a HTLV-1 részletesebb bemutatását tartalmazza, valamint a krónikus pankreatitisz tanulmányozásához kapcsolódóan a nem-szekretálódó G233E mutáns hasnyálmirigy lipáz (PNLIP) által kiváltott celluláris hatásokat vizsgálja.

## 3.2. Retrovírusok

### 3.2.1. A deltaretrovírusok

A humán T-limfotróp vírusok (HTLV) a retrovírusok delta nemzetségébe tartoznak a marha leukémia vírussal (BLV) és a „*simian*” T-limfotróp vírusokkal (STLV) egyetemben, utóbbival együtt alkotva a „*primate*” T-limfotróp vírusok (PTLV) csoportját. A humán patogén retrovírusok közül a HTLV-1-et fedezték fel elsőként (4). Ezt nem sokkal később követte a HTLV-2 (5), valamint a *lentivirus* nemzetségbe tartozó humán immundeficiencia vírus 1 (HIV-1) izolálása (6-8). A T-limfotróp vírusok további tagjait, a HTLV-3 és a HTLV-4 vírusokat is azonosították (9-10). Az STLV vírusok nem-humán főemlősöket képesek megfertőzni, továbbá több HTLV-1 törzs esetében is feltételezhető, hogy STLV-1 eredetűek (11).

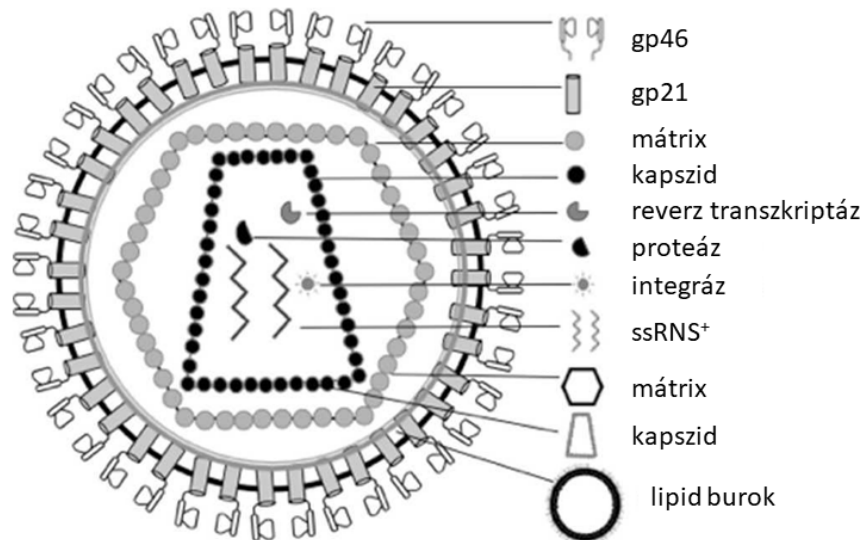
A HTLV-1 világszerte elterjedt, a fertőzöttek számát 5-10 millióra becsülik (12), leginkább anyatejes táplálással, szexuális kontaktussal vagy vér kontaminációval terjed (13). A HTLV-2 előfordulásáról nem állnak rendelkezésre részletes adatok, de szintén jelentős számú populációt érint (14), a HTLV-3 és HTLV-4 vírusokat eddig még csak Kamerunban izolálták (15).

A HTLV-1 képes olyan súlyos megbetegedéseket okozni, mint a felnőtt T-sejtes leukémia (ATLL) és a trópusi spasztikus paraparézis/HTLV-1 asszociált mielopátia (TSP/HAM). Ezekon kívül több HTLV-1 asszociált megbetegedés is ismert, mint például az *uveitis* és a *bronchiectasis* (16). A fertőzés jellemzően sokáig rejtve maradhat, hosszú látencia-idővel rendelkezik. Betegség a fertőzöttek 5-10%-ánál alakul ki, ebből mintegy 5% ATLL (17-18) és 3% TSP/HAM (19-20). Habár a HTLV-2-t egy „*hairy*” T-sejt leukémiás betegben izolálták (5), jelenétét nem hozták összefüggésbe a leukémia kialakulásával, viszont kapcsolatba hozták neurológiai megbetegedésekkel (21). Ezekkel szemben a HTLV-3 és HTLV-4 vírusokat még nem hozták kapcsolatba megbetegedéssel.

### 3.2.2. A retrovírusok szerkezete

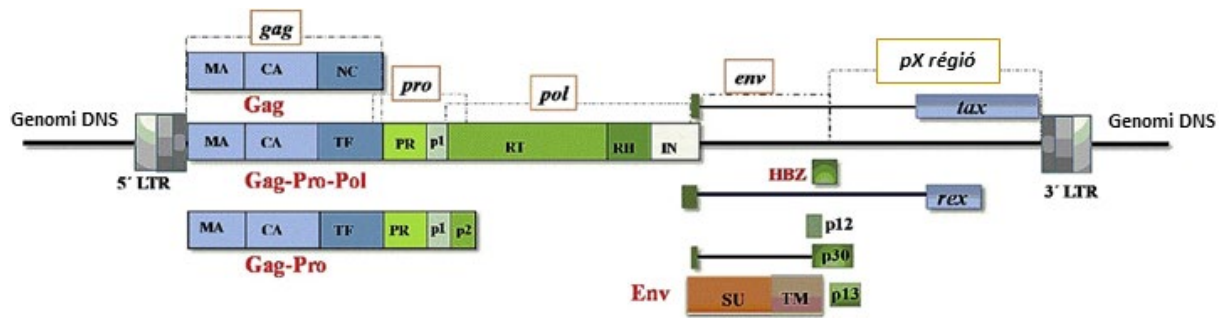
A retrovírusok között megkülönböztetünk egyszerű és összetett retrovírusokat (22), a HTLV az utóbbiak közé tartozik, így az esszenciális Gag, Pro, Pol és Env alkotóelemeken kívül más, kiegészítő és szabályozó fehérjéket is kódol. A 100 nm-es átmérőjű vírus lipid burokkal rendelkezik, amely felszínén az *env* gén által kódolt glikoproteinek heterodimerjei is kifejeződnek. Ezen belül a mátrix (MA), majd a kapszid (CA) rétegek találhatóak. A kapszidban

lokalizálódnak a vírus enzimei, a reverz transzkriptáz, az integráz (IN) és a proteáz (PR), valamint kettő, a nukleokapsziddal (NC) szorosan kapcsolódó pozitív szálú virális genomi RNS is (2. ábra).



**2. ábra. Az érett HTLV vírusok morfológiája.** Az egyszálú, pozitív virális RNS a kapszidban található, amelyet a nukleokapszid vesz körbe. Szintén itt található a reverz transzkriptáz, az integráz és a proteáz. A nukleokapszidot a mátrix fogja közre. A vírust egy lipid burok borítja, amelybe virális transzmembrán (TM) (gp21) és a felületi alegység (SU) (gp46) glikoproteinek ágyazódnak be. Készült Brites és mtsai, 2021 alapján (23).

A HTLV-1 genomját két hosszú terminális ismétlődés (long terminal repeat, LTR) fogja közre, az 5' LTR számít a fő promóternek, ebből az irányból íródik át Gag, Gag-Pro vagy Gag-Pro-Pol polifehérje a kereteltolódás (frameshift) függvényében. A *gag* gén által kódolt Gag fehérjéből a retrovirális proteáz általi hasítással jönnek létre a strukturális MA, CA és NC proteinek. A Gag-Pro prekurzorból (*gag* és *pro* kódolja) a nukleokapszid helyett az úgynevezett „transframe protein 1” (TF), a proteáz és két kisebb fehérje a p1 és p2 processzálódik. A Gag-Pro-Pol poliproteinből hasítódik ki a MA, CA, TF, PR és a p1 mellett a reverz transzkriptáz, az RNáz H és az integráz is. Az *env* gén az envelope glikoprotein elemeit kódolja, amelyek proteolitikus hasítás által transzmembrán (TM) és a felületi alegység (SU) fehérjékre tagolódnak (24). A 3' LTR közelében fejeződnak ki a pX régió által kódolt fehérjék, a p12, p13, p30, a p8, ami a p12 proteolitikus hasításából származik (25), valamint a transzaktivátor fehérje (Tax), Rex vagy az antisense HTLV-1 bZIP faktor (HBZ) fehérjék is (3. ábra). A HTLV-2 és HTLV-3 genomi organizációja a HTLV-1-gyel főbb elemeiben megegyezik, különbségek a pX régió esetében találhatóak.



**3. ábra. A HTLV-1 genom szerkezete.** Az 5' LTR és 3' LTR régió között a *gag* a strukturális Gag poliproteint kódolja. A *pro*, *pol* és *env* gének további esszenciális fehérjéket, illetve a pX régió főként szabályozó fehérjéket kódol. Készült Soltani és mtsai., 2019 alapján (26).

### 3.2.3. A HTLV vírusok életciklusa

A HTLV vírusok életciklusa nagymértékben hasonló, viszont a HTLV-3 esetében ez még kevésbé feltárt. Elsősorban T-sejteket fertőznek, de képesek más immunsejtekbe is bejutni, mint a dendritikus sejtek (27), a makrofágok vagy a monociták (28). A HTLV-1 a CD4, a HTLV-2 a CD8 T-sejteket preferálja, míg a HTLV-3 hasonló mértékben képes megfertőzni mindkettő sejtípust. A fertőzést sejt felszíni receptorhoz való kötődés előzi meg. A HTLV-1 a neuropilin-1, glükóz transzporter-1 (GLUT-1) és a heparán-szulfát proteoglikán (HSPG) alkotta komplexhez kötődik, a HTLV-2 nem igényli a HSPG jelenlétét, míg a HTLV-3 általi fertőzéshez nem feltétlenül szükségesek ezek a molekulák (29), a GLUT-1-nek viszont lehet szerepe (30). A membránnal való fúziót követően megtörténik a virális RNS reverz transzkripciója duplaszálú DNS-sé, amelyet a kapszid mag megmaradt részeiből kialakult úgynevezett preintegrációs komplex kialakulása követ, amely képes bejutni a sejtmagba, majd a gazdasejt genomjába integrálódni. Ezt követően a gazdasejt apparátusát felhasználva megkezdődik a virális poliproteinek transzlációja és expressziója. A folyamatban a Rex fehérje a virális mRNS-hez és az exportin 1-hez kötődve mediálja az RNS citoplazmába való transzportját (31). A Gag poliproteinek a plazmamembrán irányába transzlokálódnak, ahol megkezdődik az oligomerizációjuk (32). A Gag, Gag-Pro és Gag-Pro-Pol fehérjéket a virális proteáz hasítja funkcionális egységekre, így megtörténhet a vírus összeszerelődése és érése, majd a vírus jellemzően sejt-sejt kapcsolaton keresztül bejut egy másik sejtbe vagy lefűződik (4. ábra).

A HTLV vírusok életciklusa nagy mértékben hasonlít a HIV-1 víruséhoz, főbb elemeikben megegyeznek. Az egyik legnagyobb különbség a transzmisszió módjában figyelhető meg. Míg a HIV-1 főként szabad virionok formájában képes fertőzni, a HTLV-1

esetében ez nem túl hatékony (33) és sokkal jellemzőbb a sejt-sejt kontaktus (34), amely interakció kialakításában a p8 fehérje is fontos szerepet játszik (35).

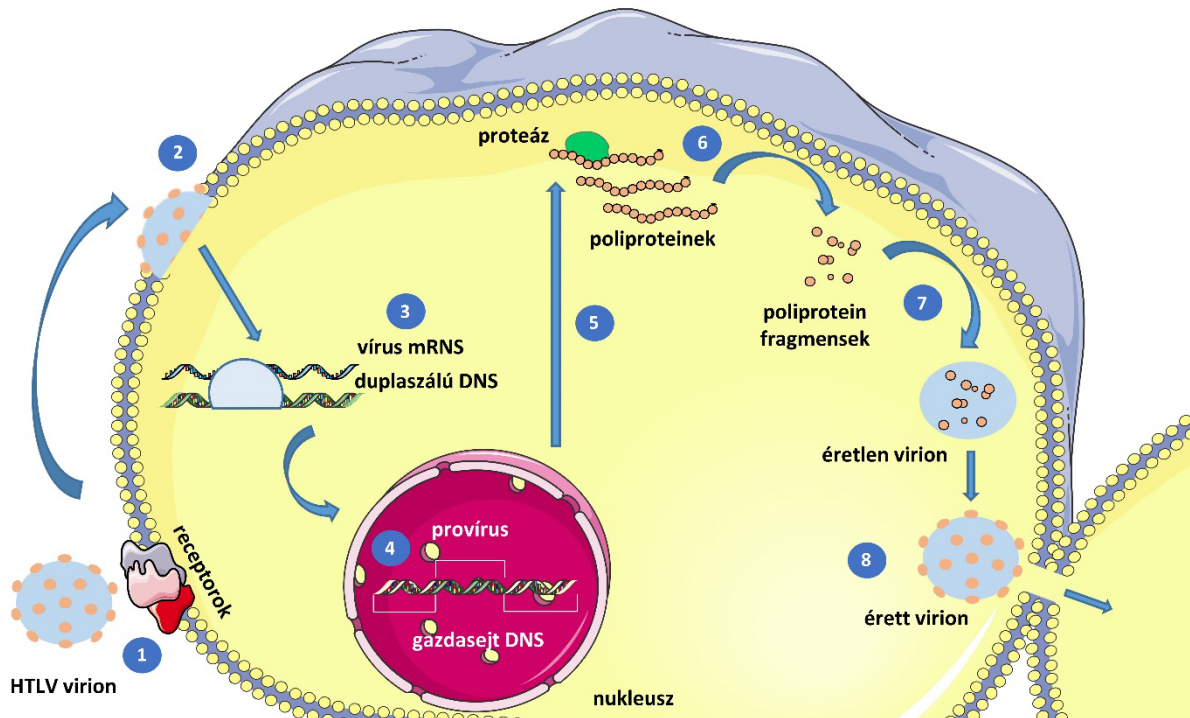
A fertőzés későbbi szakaszában inkább a klonális expanzió a jellemző. A HTLV-1 viszonylag alacsony variabilitása (egy egyénben) is azt támasztja alá, hogy a genomi DNS-be beépülve, azzal együtt, mitotikus osztódással szaporodik, vagyis a virális örökítőanyag replikációját a többet hibázó reverz transzkriptáz helyett, a celluláris DNS polimerázok végezik (34).

A T-sejtek osztódását a virális Tax fehérje segíti elő, elsősorban a sejtosztódás és sejthalál jelátviteli útvonalak szabályozásának megváltoztatásával. Egyrészt a sejtek túlélését egyszerre több szignál transzdukciós útvonalon is biztosítja. Az NF $\kappa$ B útvonalat folyamatosan aktívan tartja (36), az IKK $\alpha$ /IKK $\beta$ /IKK $\gamma$  komplex aktiválása mellett a nem-kanonikus útvonalat is képes stimulálni a p100 fehérje processzálásával (37). Aktiválja az AKT szerin/treonin kinázt is, ezzel szintén elősegítve a sejtek túlélését (38). A proliferáció fenntartását a p53 inaktiválásán keresztül éri el (39). Megakadályozza az apoptózist egyes anti-apoptotikus gének (pl. XIAP, survivin, Bcl-2,) expressziójának fokozásával, valamint a kaszpáz-3, -7, -9 és -8 gátlásával. A sejtciklust az S-fázis gének transzkripciójának fokozásával, valamint az M-fázisba lépést közvetlenül az anafázis promótáló komplex (APC) aktivációjával befolyásolja. Egyes DNS javítómechanizmusokat is gátol, ezzel elősegítve instabilitását (40). Ezekon kívül a Tax az 5'LTR promóter aktiválásával, a saját transzaktiválódását is elősegíti (41).

A HTLV-1 fertőzés akár évtizedeken át felismerhetetlen marad az immunrendszer számára. Ezt a vírus által kódolt szabályozó fehérjék finomhangolása teszi lehetővé, ami egyfajta egyensúlyt teremt a vírus replikáció és a szervezet immunválasza között (42). A p12 fehérje szerepe a folyamatban, hogy az MHC-I molekulák nehézláncához kötődve annak proteozómális degradációját segíti elő (43), emellett a HBZ a virális promóterhez kötődött fehérje komplex részeként csökkenti a virális fehérjék transzkripcióját (44).

A HTLV-2 (45) és HTLV-3 (29) vírusok életciklusa a HTLV-1-hez képest kevésbé ismert. A HTLV-2 esetében legrészletesebben az általa kódolt Tax2 tanulmányozták, amelynek szekvenciája a HTLV-1 Tax szekvenciájával 85%-os azonosságot mutat. Funkcióik is hasonlóak, viszont a Tax2 a nem-kanonikus NF $\kappa$ B útvonalat nem aktiválja, továbbá a kanonikus útvonal aktiválását is kevesebb és eltérő interakciós partnerekkel valósítja meg. A HTLV-2 is rendelkezik egy 3' irányból átíródó fehérjével (APH-2), amely szintén csökkenti a virális fehérjék transzkripcióját, viszont a HBZ-vel ellentétben nem rendelkezik N-terminális doménnal és kevesebb funkcióval bír (45). A HTLV-3 által kódolt Tax3 is aktiválja az NF $\kappa$ B útvonalat és gátolja a p53 tumorszuppresszort. A Tax2-höz képest nagyobb hasonlóságot mutat

a HTLV-1 Tax fehérjéhez, mivel doménszerkezetük nagyrészt megegyezik és intranukleárisan lokalizált a Tax2-vel ellentétben, amely a citoplazmában található (46). Habár a HTLV-3 is rendelkezik egy antisense (APH-3) és több kiegészítő fehérjével, ezek funkciói még nem ismertek (29).



**4. ábra. A HTLV vírusok életciklusa.** A HTLV vírusok életciklusának főbb szakaszai: (1) a vírus interakciója a receptor molekulákkal (neuropilin-1/NRP1, HSPG, GLUT-1), (2) fúzió a sejtmembránnal és a vírusburok elvesztése, (3) a virális RNS reverz transzkripciója duplaszálú DNS-sé, (4) a provirális DNS integrációja a gazdasejt genomjába, (5) a virális fehérjék transzkripciója és translációja, (6) a poliproteinek hasítása funkcionális egységekre, (7) vírus összeszerelődés és érés, (8) a sejt elhagyása. Az ábra a Servier Smart Medical Art alkalmazásával készült.

### 3.2.4. HTLV-1 kezelési stratégiák

Későbbi felfedezése ellenére a HIV-1 vírus elleni terápiák fejlesztése nagyobb figyelmet kapott a HTLV-1-hez képest, elsősorban a magasabb egészségügyi kockázata és szélesebb elterjedése miatt. A HIV-1 ellen már számos típusú gyógyszer elérhető, amelyekkel az életciklusának egyes fázisai akadályozhatók/szabályozhatók és a nagy hatékonyságú antiretrovirális terápia (HAART) (64) részeként sikeresen alkalmazhatóak. Bár a szerkezeti, életciklusbeli hasonlóságuknál, valamint filogenetikai közelségüknél fogva a HIV-1 ellen kifejlesztett gyógyszerek potenciális terápiás alkalmazások lehetnek, ennek ellenére a HTLV-1 ellen nem bizonyultak hatásosnak (65).

A HTLV-1 okozta megbetegedéseket a vírus altípusától és a betegség progressziójának minőségétől függően jellemzően konvencionális kemoterápiával, a zidovudine (AZT) és az interferon-alfa (IFN) kombinációjával, vagy hematopoetikus őssejtek beültetésével kezelik (66). Egyes betegeknél sikerült az alkalmazott terápiákkal megfékezni a fertőzést, de sok esetben ez visszatérhet és az ATLL-ben szenvedő betegeknél továbbra is magas a mortalitás (66).

A HIV-1 terápiában elért sikereket nagyrészt specifikus gyógyszerek alkalmazásával érték el. A HTLV-1-gyel kapcsolatos kutatásokban is rendre előkerülnek ilyen lehetőségek, eddig alacsony terápiás hatékonysággal. A stratégiák egyrészt a HIV-1 ellenes terápiában sikeresen alkalmazott célpontokat igyekeznek a HTLV-1 esetén is előtérbe helyezni, tehát a vírus sejtbe való bejutását megakadályozni a burokfehérje glikoproteinek vagy receptoraik támadásával, illetve a vírus életciklusában szerepet játszó enzimek, a reverz transzkriptáz, az integráz és a proteáz működését tervezik gátolni inhibitorok fejlesztésével. Másrészt ezektől eltérő megközelítéseket is próbálnak alkalmazni, mint a például vakcinák vagy monoklonális antitestek fejlesztése. Az utóbbi években engedélyezték az ibalizumab alkalmazását, amely a vírus sejtbe való bejutását gátolja meg a CD4-gp120 komplex kialakulásának megakadályozásával (67).

Lamb és munkatársai a vírus és a gazdasejt fúzióját megakadályozó, inhibitoroként funkcionáló szintetikus peptideket vizsgáltak, amely felépítése a TM burokfehérjét mimikálja (68). A korábban már említett AZT egy nukleozid analóg, amely a reverz transzkriptázt célozza és a HTLV-1 ellenes terápiában már alkalmazzák. Emellett egy másik nukleozid, a tenofovir is képes gátolni a vírusok transzmisszióját egerekben (69). Egyes HIV-1 integráz inhibitorok is képesek hatékonyan csökkenteni a vírusszámot *in vitro* (70).

Egy alternatív célpont lehet az extracelluláris vezikulák támadása is. Szerepük a sejt-sejt kapcsolatokban, így a fertőzés progressziójában ismert. Emellett a HTLV-1 által okozott betegségek esetében is vizsgálták jelentőségüket, viszont a HTLV molekulákat tartalmazó vezikulák kialakulásának specifikus gátlása kihívás lehet (71).

A HIV-1 elleni terápia esszenciális részét képezi a proteáz inhibitorok alkalmazása. Jelenleg tíz különböző inhibitor érhető el a klinikumban, a tipranavir kivételével peptid alapúak, szerkezetük a természetes szubsztrátokét mimikálja. A darunavir és a tipranavir a katalitikus hely mellett egy másodlagos kötőhellyel is rendelkezik, amely képes gátolni a dimerizációt (72-74). A HIV-1 PR ellen kifejlesztett inhibitorokat eddig nem tudták sikeresen alkalmazni a HTLV-1 elleni terápiában, ami az *in vitro* kísérletekben tapasztalt magas gátlási állandó ( $K_i$ ) értékekkel is magyarázható. A tanulmányok nem korlátozódnak a terápiában használatos

inhibitorok vizsgálatára, számos kísérleti HIV-1 PR gátlószert is jellemeztek. A peptidalapú inhibitorok mellett például a DMP-323-at, amely egy ciklikus urea. Kísérleteik során messze a HIV-1 PR-ra jellemző  $K_i$  fölötti értékeket figyeltek meg (63, 75). A HIV-1 PR-hoz nagyobb hasonlóságot mutató HIV-2 PR esetében is csak a klinikai HIV-1 PR inhibitorok egy része lehet potenciális gátlószer (76). Az eddig szerzett tapasztalatok alapján szükséges a HTLV-1-re specifikus gátlószerek fejlesztése. Az indinavir a többi HIV-1 PR inhibitorhoz képest hatékonyabban gátolja a HTLV-1 PR-t, viszont a meghatározott gátlási állandó messze elmarad a HIV-1 inhibitorok nM-os értékétől, annak közel ezerszerese. Több tanulmányban is modellezték az indinavir és a HTLV-1 PR aktív helyében lévő aminosavak interakcióját (77-79), ezzel jó alapot nyújtva az indinavir alapú inhibitor fejlesztésnek. A darunavirral komplexet képező HTLV-1 PR kristályszerkezete alapján is folynak kutatások, egyes darunavir analógokkal 0,01-0,1  $\mu$ M gátlási állandót is elértek (80). Az inhibitor kutatások másik ága a HTLV-1 PR szubsztrátokat veszi alapul. A sejtbe való megfelelő penetráció elérése érdekében itt is kis méretű 4-10 tagú peptideket fejlesztenek. Az egyik jó példa egy tetrapeptid inhibitor, a KNI-10774a, nem természetes aminosavakat tartalmazó inhibitor, ami 13 nM-os  $IC_{50}$  értékkel rendelkezik (81). Mások az IB-268 (KTKVL-r-VVQPK) és az IB-269 (APQVL-r-PVMHP) inhibitorokkal érték el gátló hatást (62), amelyek 10-tagú peptidek, a hasítóhelyen egy redukált peptidkötést (-r) tartalmaznak, szekvenciájuk a HTLV-1 MA/CA, valamint a CA/NC hasítóhely szekvenciákon alapul. Retro-inverz inhibitorokat is vizsgálnak, amit a peptid szekvencia megfordításával és az L-aminosavak D-konfigurációra cserélésével állítanak elő (82).

Az HIV-1 PR elleni terápiában eddig elfogadott inhibitorok és a kísérleti fázisban lévők legnagyobb része is az enzimek aktív helyét célozza, kompetitív módon gátolják működésüket, a specifikusan HTLV-1 PR ellenes inhibitorok is ezt a stratégiát követik. Az aktív centrum geometriáját akár egy mutáció is megváltoztathatja olyan mértékben, hogy az inhibitor számára már hozzáférhetetlen legyen. A HIV-1 PR rendkívül nagy variabilitása miatt jelentős a rezisztens mutánsok száma (83), ezzel fenntartva a HIV-1 PR inhibitorokkal kapcsolatos kutatások lendületét. A kompetitív mellett a non-kompetitív és az allosztérikus inhibitorok fejlesztése is párhuzamosan zajlik, ezen inhibitorok egy része a dimerizációt gátolja (84). A polioxometalátok pedig hatékonyan képesek a lebeny régióval interakcióba lépni, viszont a klinikai fázisban toxikusnak mutatkoztak (85).

A HTLV-1-re jellemző horizontális replikációs stratégia miatt (86-88) a TM, RT, IN és PR-t gátlószerek leginkább a fertőzés korai fázisában lehetnek hatásosak. A klonális expansió gátlásához a Tax fehérje lehet jó célpont. Az ST1926 nevű szintetikus retinoid a Tax fehérje

szintjének csökkentése mellett növelte az apoptózist és a p53 szintjét is malignáns T-sejteken (89). A parazitaellenes gyógyszerként alkalmazott niklozamid a Tax fehérje lebomlását indukálta a proteosómán keresztül (90). A ritonavir egy HIV-1 PR inhibitor, amely a HTLV-1 PR ellen nem volt hatásos, viszont HTLV-1 vírussal fertőzött sejtekhez adva gátolták az NF- $\kappa$ B aktivációt (91).

A kutatások nem csak a vírus egyes alkotóelemeinek megcélzására korlátozódnak, hanem az ATLL sejtek felületén található molekulákhoz kötődő monoklonális antitestek fejlesztése is zajlik. A mogamulizumab a CCR4 receptorhoz kötődik, Japánban alkalmazzák leukémiás megbetegedések kezelésére, köztük az ATLL-re, eddig korlátozott sikerrel (66). A CCR4 mellett CD25, transferrin receptor és KIR3DL2 ellenes antitesteket is fejlesztenek (66).

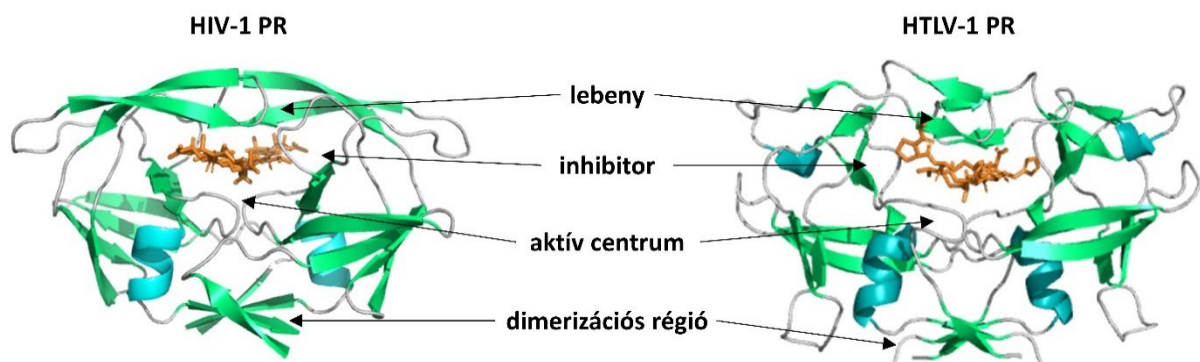
A HIV-1-hez képest a HTLV-1 szekvenciája jelentősen konzerváltabb, így a vakcinák fejlesztése is nagyobb potenciális hatékonyságot hordoz magában. Ezek egy része a Tax fehérjéből származó peptideket fejez ki (92).

### 3.2.5. A HTLV proteáz

A HTLV proteázok az aszpartil proteázok AA, A2(A) családjába tartoznak. Az aszpartil proteázok által katalizált reakciókban a legtöbb esetben, ahogy a HTLV-1 proteázoknál is, két aszpartát oldallánc együtt képes megkötni és aktiválni egy katalitikus vízmolekulát és így elhasítani egy peptid kötést. A csoport tagjaira jellemző a nagyfokú szekvencia divergencia, viszont szerkezetileg hasonlóak és több konzervált régió található bennük. Az A2(A) alcsalád legismertebb képviselője a HIV-1 PR, de ide tartoznak a HTLV proteázok is. Esetükben a katalitikus aszpartátot C-terminális irányból kettő leucin előzi meg, míg az aszpartátot követően treonin, glicin és alanin található. A többi retrovirális proteázhoz hasonlóan egy aktív helyet tartalmaz, amelyet a két monomer homodimerként együtt alakít ki (2) (**5. ábra**).

A HTLV-1 proteázt először 1989-ben izolálták (47), ezt több *in vitro* tanulmány is követte, ahol megfigyelték a Gag poliprotein hasadását és azonosították a MA, CA és NC fehérjéket (48). Később a MA/CA, CA/NC, TF1/PR, PR/p1, p1/RT, RT/RH és RT/IN hasítóhelyeket is meghatározták (49). A HIV-1 PR esetében megfigyelték, hogy képes hasítani celluláris fehérjéket is (50), köztük egyes citoskeletális fehérjéket, a Bcl-2-t vagy a prokaspáz 8-at, ami a CD4 T-sejtek nekrozisához vagy apoptózisához vezet. A HTLV proteázok esetében még nem azonosították a gazdasejtben hasítóhelyeket, viszont elképzelhető, hogy a HIV-1 PR-hoz hasonlóan a HTLV PR-oknak is lehet további funkciója, amely a HTLV eltérő szaporodási stratégiája miatt valószínűleg más, a proliferációt elősegítő folyamatokat érinthet.

A HTLV-1 PR a HIV-1 PR-nál nagyobb, a monomerek 125 aminosavat tartalmaznak, a HIV-1 PR 99 aminosavával szemben. Az „extra” aminosavak legnagyobb része a C-terminálison található. Ez főleg hidrofób aminosavakból áll és csak a deltaretrovírusokra jellemző. A C-terminálison található aminosavakról korábban Hayakawa és munkatársai azt állapították meg, hogy az autoproteolízishez legalább öt aminosav szükséges (G111-L115) (51). A HTLV-1 PR hajlamos az autoproteolízisre *in vitro*, ezért a legtöbb kutatás során az L40I stabilizált mutánst vagy további mutációkat is tartalmazó fehérjét (C90A, C109A) vizsgálnak. Mások az L40I stabilizáló mutációt és az N-terminálison His jelölést tartalmazó 115 aminosav hosszúságú HTLV-1 PR-t vizsgálva a teljes hosszúságú konstrukcióhoz hasonló enzimaktivitást tapasztaltak (52). Később munkacsoportunk vizsgálta a vad típusú PR-t és egy stabilizáló mutációkat (L40I, C90A, C109A) tartalmazó konstruktot is (52), amelyek 125, 120 és 116 aminosav hosszúságúak voltak, de csak a teljes hosszúságú és az öt aminosavval rövidített proteáznál figyeltek meg aktivitást és megállapították, hogy P116-L125 aminosavaknak a dimer stabilitásában lehet fontos szerepe (53). A retrovirális proteázok dimerizációjában az N- és a C-terminális egyes aminosavai vesznek részt,  $\beta$ -redőket kialakítva, valamint a katalitikus Asp-nál a H-kötések rendszere, az úgynevezett tűzoltófogás („*fireman's grip*”) (54). A HTLV-1 PR a lebeny („*flap*”) régióban a HIV-1 PR-hoz képest két extra aminosavat tartalmaz, így egy kiterjedtebb szubsztrátkötő helyet alakít ki (55) és megtöri a lebeny hajtű struktúráját a hidrogén kötések megszakításán keresztül, ezzel egy hélix-szerű struktúrát eredményez (55). A HIV-1 és HTLV-1 PR-ok szerkezetét az **5. ábra** szemlélteti.

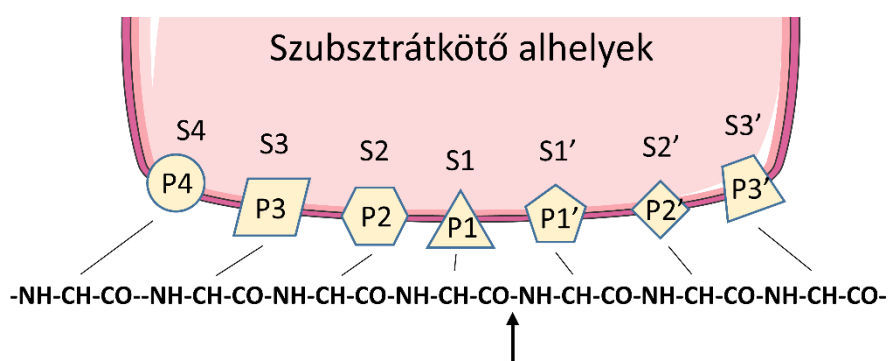


**5. ábra.** A HIV-1 és HTLV proteázok szerkezete. A HIV-1 PR (PDB ID: 5HVP) (56) és HTLV-1 PR (PDB ID: 3LIY) (57) inhibitorokkal alkotott komplexeinek kristályszerkezete. A funkcionálisan jelentős régiók az ábrán nyilakkal jelöltek.

A két proteáz között a teljes szekvencia tekintetében csak ~28% az azonosság, ennek ellenére röntgen krisztallográfias elemzések szerint nagy a szerkezeti hasonlóságuk, ez egyrészt az aktív hely konzerváltságából fakad, ott nagyobb fokú, 45%-os az azonosság, másrészt a

dimerizációban részt vevő aminosavakban is alacsony a variabilitás. A konzervált aminosavaknak a negyedleges szerkezet fenntartásában, a fehérje megfelelő feltekeredésében és dinamikai jellemzőinek kialakításában is fontos szerepük lehet (58).

A HTLV-1 PR ismert természetes hasítóhelyeinek változatos a szekvenciája, de túlsúlyban vannak a hidrofób oldalláncok, illetve a P1 helyen leucin található, akárcsak a többi HTLV PR-nál. A nagyobb lebeny miatt a HTLV-1 PR esetén hét szubsztrátkötő zsebet különböztetünk meg (S4-S3'). A szubsztrát aminosavak és a szubsztrátkötő helyek elnevezésénél a Schechter és Berger (1967) által meghatározott nomenklaturát alkalmazzuk (6. ábra).



**6. ábra. A szubsztrát és a szubsztrátkötő zsebek elnevezése.** Az elnevezések a Schechter és Berger (1967) által leírt nomenklaturát követik. A szubsztrátkötő helyeket a hasítóhelytől az N-terminális felé távolodva S1, S2, S3, S4, a C-terminális irányába S1', S2' és S3' nevekkkel jelöltük, a kötődő szubsztrát aminosav oldalláncait P1, P2, P3, P4, valamint P1', P2' és P3' jelöli.

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

általánosságban jellemző, hogy a hasítóhelytől távolabb eső szubsztrátkötő helyek viszonylag variábilisak, mind a résztvevő aminosavak számában és minőségében, mind a kötődő szubsztrát aminosav oldallánc tekintetében. A hasítóhelyhez közeledve a zsebek egyre konzerváltabbak beleértve a HTLV-1 és HIV-1 proteázokat is (55) (59-61).

A legtöbb retrovirális proteázokkal foglalkozó tanulmányban a természetes hasítóhelyeket reprezentáló oligopeptideket alkalmaznak szubsztrátként. Legrészletesebben a HIV-1 PR-t vizsgálták, a deltaretrovírusok tekintetében eddig csak a HTLV-1 és BLV proteázok aktivitását kutatták. A jelenlegi irodalmi adatok azt mutatják, hogy a HTLV-1 PR a HIV-1 PR-nál jelentősen szűkebb specificitással rendelkezik. Retrovirális proteáz hasítóhelyeket tartalmazó szubsztrátokkal végzett mérésekben, amely során a HIV-1 és HTLV-1 mellett a HIV-2, a ló vészes vérszegénységet okozó vírus (EIAV), a rous szarkóma vírus (RSV), a Mason-Pfizer majom vírus (MMTV), a BLV és a rágcsáló leukémia vírus (MuLV) hasítóhelyeit is vizsgálták, azt figyelték meg, hogy a HIV-1 PR a szubsztrátok jelentős részét hasította, ez alól kivételt csak egyes MuLV és RSV hasítóhelyek jelentettek, míg a HTLV-1 PR a vizsgált szubsztrátok csak mintegy 40%-át (62). Ezzel szemben hasonló szubsztrátsorozaton mért adatok szerint a BLV PR a HIV-1 PR-hoz mérhető szélességű specificitással rendelkezik (63). Ezt a megállapítást erősítik a HTLV-1 CA/NC hasítóhellyel végzett kísérletek is, ahol a hasítóhelyet egy-egy ponton módosították a P4-P1' helyeken. Habár a HTLV-1 PR a szubsztrátok jelentős részénél mutatott katalitikus aktivitást, a P2-P1' helyeken kevésbé tolerálta az aminosav cserét, ellentétben a BLV PR-zal. Specificitást tekintve a BLV PR nagyobb hasonlóságot mutat a HTLV-1 PR-hoz, a HIV-1-hez képest nagyobb hatékonysággal és szélesebb specificitással hasította a HTLV-1 CA/NC oligopeptideket, valamint az P2 és P1 helyeken a HTLV-1 PR-hoz hasonlóan jobban preferálta a nagy, hidrofób aminosav oldalláncokat (63).

### **3.3. A krónikus pankreatitisz és rizikófaktorai**

#### **3.3.1. A krónikus pankreatitisz**

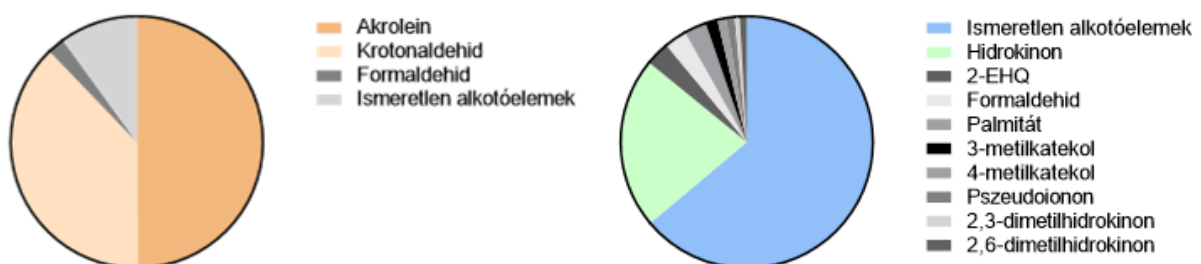
A krónikus pankreatitisz (KP) a pankreász krónikus gyulladása, ami a folyamatosan fennálló gyulladás eredményeként alakulhat ki. Jellemző jelei a parenchimális vagy intraduktális kalcifikáció, pankreatikus fibrózis, az exokrin és endokrin állomány elégtelen működése, így együtt jár egyes emésztőenzimek hiányával vagy megváltozott viselkedésével, valamint az endokrin mirigyek elvesztését is okozhatja. Ezek eredményeképpen emésztési

nehézségek, diabétesz és fájdalom alakulhatnak ki, az életminőség jelentős romlását okozva, valamint a várható élettartam is csökken. A betegség nem fordítható vissza, de a progressziója és a tünetek súlyossága enyhíthető (93).

A tünetek akut pankreatitisszel kezdődnek, ami a betegek 20-30%-ánál visszatérő akut pankreatitisként, 10%-ánál KP-ként folytatódik, ez utóbbi akár a pankreász rákos elváltozásához is vezethet, amely a 11. leggyakoribb ráktípus. A KP 100000 főből megközelítőleg 50-et érint (94-95).

Habár az epekövek kialakulása a legfőbb kiváltó oka az akut pankreatitisznek (96), a KP elsősorban az alkoholfogyasztás következményeként alakul ki (97). Ez leginkább a hosszú távon „nagy fogyasztók” számára jelent kockázatot (98). A hatásmechanizmus nem pontosan ismert, viszont a toxikus metabolitok, pl. zsírsav-etil-észterek (99), az ER stressz vagy az oxidatív stressz (100) is szerepet játszhat.

Dohányzás a második leggyakoribb független rizikófaktor (101), bár élesen nem lehet elválasztani az alkohol okozta KP-től a két tényező gyakori együttes jelenléte miatt. A dózis itt is fontos szerepet játszik (102). A dohányfüst több ezer komponensből áll, ennek ellenére a toxicitásért csupán kis számú vegyület felel, amit a **7. ábra** foglal össze. A gázfázisban az akrolein és a krotonaldehid hozzájárulása a legjelentősebb. Mindkettő  $\alpha$ ,  $\beta$  telítetlen aldehid. *In vitro* tanulmányok szerint negatívan befolyásolják a sejtek életképességét, valamint gyulladást és ER stresszt is kiváltanak (103). A partikuláris fázisban a hidrokinon (HQ) váltja ki a legjelentősebb negatív hatást. Életképesség csökkentő hatása mellett ER és oxidatív stresszt kiváltó hatása is ismert (104-106).

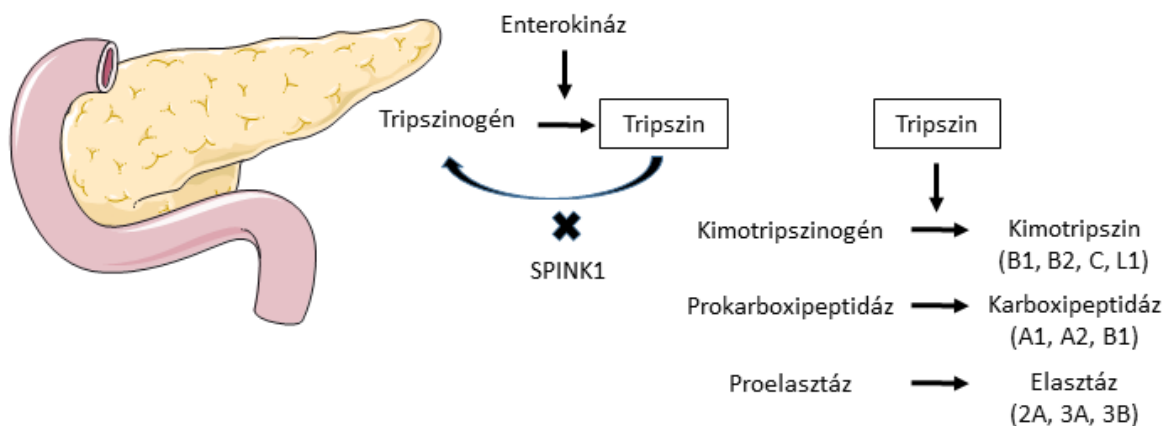


**7. ábra. A dohányfüst citotoxicitásért felelős molekulái.** A bal oldalon a gáz fázisban, a jobb oldalon a partikuláris fázisban szereplő anyagok találhatóak. A 2-EHQ a 2-etilhidrokinont, a 2,3-DMHQ a 2,3-dimetilhidrokinont, a 2,6-DMHQ pedig a 2,6-dimetilhidrokinont jelöli. Az adatok az anyagok citotoxicitáshoz való hozzájárulásuk mértékét fejezik ki százalékban (Stabbert és mtsai., 2017. alapján) (107).

### 3.3.2. Örökletes pankreatitisz

A KP-t egyéb tényezők is kiválthatják, az előbbieknél jelentősen kisebb gyakorisággal, ezek egyik típusa az örökletes pankreatitisz, amelyet egyes, az acinus sejtek által szekrécióna termelt emésztőenzimek, vagy azokkal szoros kapcsolatban lévő fehérjék mutációi okoznak. Leggyakrabban a humán kationos tripszint kódoló *PRSSI* az érintett gén.

A tripszin központi szerepet tölt be a pankreász által kódolt emésztőenzimek működésében (8. ábra). Az enzimek aktivációja a patkóbélben történik. A folyamat a vékonybélben termelt enterokináz általi hasítással kezdődik, ami a tripszinogént tripszinné alakítja.



**8. ábra. A kationos tripszin kapcsolata a pankreász által szekretálódó egyéb fehérjékkel.** A tripszinogén aktivációját az enterokináz végzi. A tripszin ezt követően kaszkádszerűen végzi más emésztőenzimek aktivációját is. Az ábra a Servier Smart Medical Art alkalmazásával készült.

A tripszinhez hasonlóan más emésztőenzimek is inaktív, zimogén formában szekretálódnak, aktivációs peptidet tartalmaznak az N-terminálisukon (108). Ezt követően a keletkező tripszin is képes a tripszinogén aktiválására. Az enterokináz szűk specificitással rendelkezik, az emésztőenzimek közül kizárólag a tripszinogén aktivációját végzi, a többi zimogén fehérjét (kimotripszinogén, karboxipeptidáz, proelasztáz, profoszfolipáz, kallikreinogén, prokolipáz) a tripszin aktiválja (109), azok autoaktivációra nem képesek. A tripszin működése az aktiváción kívül a szintén acinus sejtek által termelt SPINK1 inhibitorral és a kimotripszinogén C-vel (CTRC) is szabályozott (110).

### 3.3.3. Örökletes pankreatitisz: tripszin útvonal

A legtöbb genetikai mutációkkal kapcsolatos KP megbetegedés a kationos tripszin működésének megváltozásával magyarázható, az első mutáció (R122H) felfedezése is a *PRSSI*-hez kötődik (111). Ezek egy része a tripszinogén korai aktivációját okozza, amely így már a hasnyálmirigyben is képes autoaktiválódni, ezzel önmérsztést kiváltva gyulladást okozni (112). A tripszin az autoaktiváció elősegítése mellett az Arg122-Val123 közötti peptidkötést hasítva a tripszinogén degradációját is indukálja, az R122H mutánsnál ez utóbbi folyamat sérült. A degradációhoz szükséges a Leu81 utáni hasítás is, amelyet a CTRC végez a tripszinogén kalcium-kötő régiójában. A tripszin degradációja is hasonló módon történik, de a hasítóhelyek nagyobb termodinamikai stabilitása miatt, ez a folyamat az előbbinél sokkal lassabb. A CTRC szerepe szintén kettős, ugyanis a Phe18 aminosav utáni hasítással a tripszinogén aktivációs peptidében stimulálja a tripszin általi autoaktivációt, ami a Lys23 melletti hasítással történik meg. Mutációk hatására nem csak az említett folyamatok valamelyike lehet működésképtelen, hanem a köztük lévő egyensúlyi állapot is megváltozik, a tripszin túlzott aktivitásához vezetve. Az A16V és az N29I *PRSS1* mutációnál a CTRC általi hasítás lesz hatékonyabb, ezzel emelve az aktív tripszin mennyiségét (113).

A CTRC-t érintő mutációk is válhatnak ki pankreatitist, gyakoriságuk a *PRSS1* mutációk által kiváltott KP-hez képest kisebb, viszont legnagyobb részük a tripszinnel való kapcsolatán keresztül fejt ki negatív hatását. A mutánsok egy része inaktív. Ezt okozhatja a CTRC szekréción defektusa, valamint a megfelelően szekretálódó variánsok között is található csökkent enzimatisz aktivitást mutató fehérje. Ez együtt jár a tripszin aktivitás növekedésével, ugyanis így nem tud szabályozódni a CTRC által. A tripszin általi hasításra érzékeny mutánsok szintén ezt okozzák (110, 114).

A *SPINK1* fehérje szintén a pankreász acinus sejtjei által szekretálódik és a *PRSS1* inhibitoraként funkcionál. Egyes mutációk csökkent szekréción okoznak vagy a *PRSS1*-hez való kötődés kinetikáját befolyásolják negatívan (115), így hozzájárulhatnak a tripszin hasnyálmirigyen belüli aktivitásához.

### 3.3.4. Endoplazmatikus retrikulum stressz

A pankreász acinus sejtjei által termelt emésztőenzimek mutációi a fehérje nem megfelelő feltekerődését is okozhatják, ezzel szekréción defektust is képesek okozni, amely a fehérjék sejtben belüli felhalmozódásával is együtt járhat és az így termelődött fehérjék a

proteozómális vagy az autofágiás útvonalakba is bekapcsolódhatnak. A legtöbb esetben ezen fehérjék termelődése együtt jár az ER stressz mértékének növekedésével is. Az erre adott sejtes stresszválaszt az úgynevezett „*unfolded protein response*” (UPR) néven írhatjuk le, amely egy, olyan szignalizációs útvonal, amelynek célja a sejtes homeosztázis visszaállítása, viszont a hosszú idejű, feloldatlan stressz sejthalálhoz vezethet.

Az UPR-nek három fő szignál fehérjéje ismert, az „*inositol requiring enzyme-1*” (IRE1), a „protein kináz RNS-szerű ER kináz” (PERK) és az „aktiváló transzkripciós faktor 6” (ATF6). Közös jellemzőjük, hogy az ER membránban komplexként vannak jelen és immunoglobulin-kötő fehérjét (BiP) kötnek, amely az útvonalak aktiválódásának hatására szabaddá válik és chaperonként viselkedve képes a nem megfelelően feltekeredett fehérjékhez kapcsolódni (116).

Az IRE1 útvonal membránkötött központi fehérjéje az IRE1, amely stressz hatására dimerizálódik és autofoszforilálódik. Kináz aktivitása mellett endoribonukleázként is funkcionál. Utóbbi során stresszhatásra az érett X-boksz-kötő fehérje 1 (XBP-1) mRNS-éből hasít ki egy intront, az erről átíródó rövidebb fehérje transzkripciós faktorként viselkedve szabályozza egyes ER chaperon fehérjék, köztük a BiP, az ER asszociált degradáció (ERAD) és lipid szintézisben résztvevő fehérjék expresszióját (117-118). Emellett „IRE1-dependent decay of mRNA” (RIDD) aktivitással is rendelkezik, mely során a rosszul feltekerődő fehérje génjének mRNS-ét hasítja, ezzel csökkentve az ER terhelését, viszont ez hosszabb távon az ER chaperonok és anti-apoptotikus fehérjék mRNS-ének degradációjához is vezethet, ezzel növelve az apoptózis esélyét (119-120), továbbá a kináz aktivitásán keresztül képes beindítani a c-jun N-terminális kináz (JNK) útvonalat is, amely szintén apoptózishoz vezethet. A kináz aktivitás, az előzőhöz hasonlóan, a TRAF2 foszforilálásán keresztül az NF $\kappa$ B útvonalat is indukálja (121).

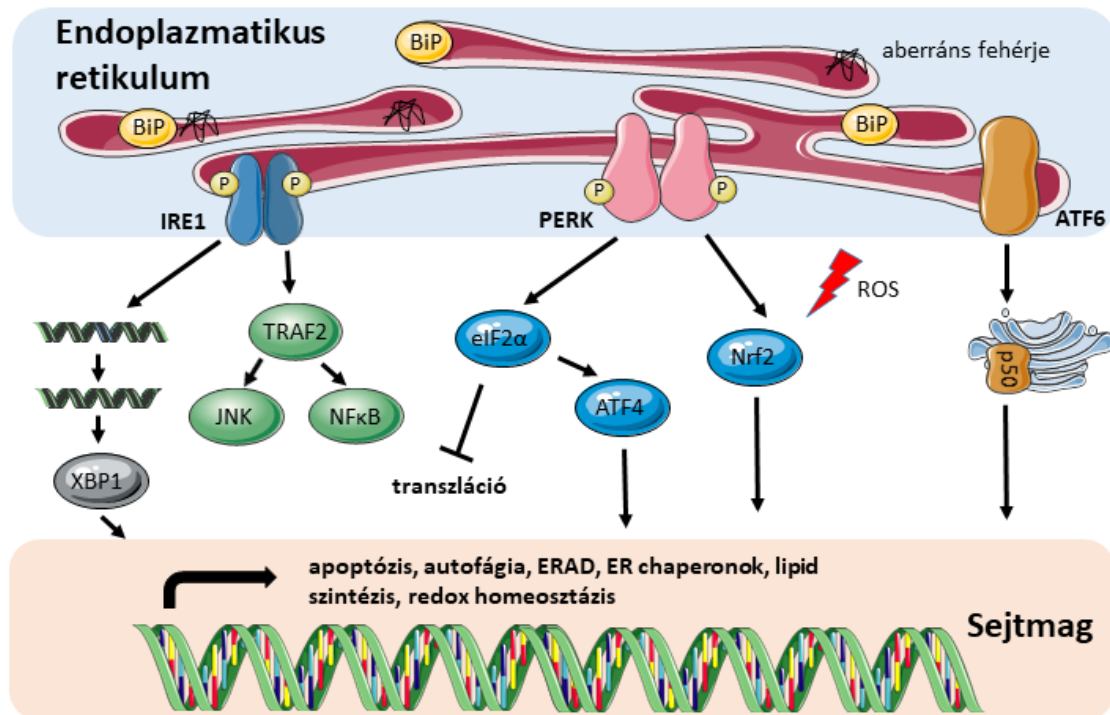
Az ER-kináz (PERK) az eIF2 $\alpha$  foszforilálása által gátolja a fehérje transzlációt, viszont az ATF4 transzlációját ez nem érinti, amely a sejtmagba bejutva aktiválja a Bcl-2 családba tartozó fehérjék, vagy a pro-apoptotikus C/EBP homológ fehérje (CHOP) transzkripcióját. A foszforilálás emellett az oxidatív stresszre adott válaszként az antioxidáns glutation (GSH) átíródását is elősegíti. Szintén az eIF2 $\alpha$  szignál útvonalon keresztül elősegíti az autofagoszóma kialakulását is (122).

A transzkripciós faktor 6 (ATF6) (p90) aktiválódása következtében a Golgi-ba vándorol, ahol a transzmembrán S1P és S2P által katalizált reakcióban egy nagyobb (p50) és egy kisebb (p40) fehérjére hasítódik (123). Az előbbi képes bejutni a sejtmagba, ahol transzkripciós faktorként elősegíti az UPR-ben érintett egyes gének átíródását, jelentős átfedésben az IRE1 és PERK által indukált transzkripcióval.

Az ER stressz a reaktív oxigén gyökök (ROS) által is képes aktiválódni. A sejtekben a normál működés során is termelődik ROS, amely elsősorban a mitokondriumban és az ER-ban halmozódik. A fehérjék feltekerődése az ER-ban történik, ahogy a diszulfid-hidak kialakítása is, amely együtt jár ROS képződéssel. A folyamat a protein diszulfid izomeráz (PDI) ER oxidáz 1 (ERO1) általi oxidációjával indul, majd a feltekerendő fehérje tiol csoportja reagál az oxidált PDI-vel. Az ERO1 molekuláris oxigént használ akceptorként, így hidrogén-peroxid képződik. A redukált PDI-t nem csak az ERO1, hanem a GSSG is oxidálhatja a GSH:GSSG aránytól függően (124). A PDI nem csak a névadó PDI vagy PDI1 diszulfid izomerázt takarja, ez egy enzimsalád, amelyek az itt leírt funkciótól eltérő mechanizmusokkal is rendelkeznek, jelentős részük chaperonként is működik (125), ez magyarázhatja az ER stressz során megemelkedett szintjüket, valamint egyes tagjai (ERP57, ERP72, P5) a PDI-vel közel megegyező mennyiségben vannak jelen (126).

Az UPR és az oxidatív stressz szoros kapcsolatban áll egymással. A tartósan magas ROS szint a fehérjék oxidálását, így rossz feltekerődését is okozhatja, ezzel erősebb választ indukálva. Egyes mutáns fehérjék nem megfelelő feltekerődési mechanizmusa beindíthatja az UPR választ, az oxidatív feltekerődési folyamatokba újra-újra bekapcsolódik, ezzel kimerítve a GSH készletet ROS felhalmozódáshoz vezetve (127). Szoros kapcsolatukat az is bizonyítja, hogy a PDI esszenciális aktivátora a PERK útvonalnak (128), az ERP72 pedig az ATF6 UPR válaszhoz szükséges (129).

A "*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*" (Nrf2) központi szerepet tölt be az ER stressz és oxidatív stressz szabályozásában. Az UPR útvonalban aktiválódhat a PERK foszforilálódásával az ATF4, JNK fehérjéken keresztül, valamint az oxidatív stresszre adott válaszként is. Transzkripció faktoroként indukálja a redox homeosztázisban részt vevő gének átíródását (116). Ezek egyike az NAD(P)H kinon dehidrogenáz 1 (NQO1), amely a stresszre adott válaszként reduktázként funkcionál, amelyhez az aktív centrumában található FAD-on keresztül a NAD(P)H-t használja donorként. Emellett ismert a szerepe bizonyos fehérjék stabilizációjában és egyes fehérjék mRNS-ének kötésével azok szabályozásában is részt vesz (130). Az UPR főbb lépéseit a **9. ábra** szemlélteti.



**9. ábra. Endoplazmatikus retikulum stressz útvonalak.** A rosszul feltekerődő fehérjék által indukált ER stressz választ három transzmembrán fehérje mediálja, az IRE1, a PERK és az ATF4. A szignalizációs folyamat során a BiP disszociál a fehérjékről, valamint több gén transzkripciója indukálódik a homeosztázis visszaállítása érdekében. Az ábra a Servier Smart Medical Art alkalmazásával készült.

### 3.3.5. Örökletes pankreatitisz: aberráns fehérje útvonal

A hasnyálmirigy által termelt, normál esetben szekretálódó fehérjék feltekeredési defektusa legtöbbször együtt jár az UPR válasz aktiválódásával, ami a CHOP transzkripció növekedéséhez és apoptózishoz vezethet.

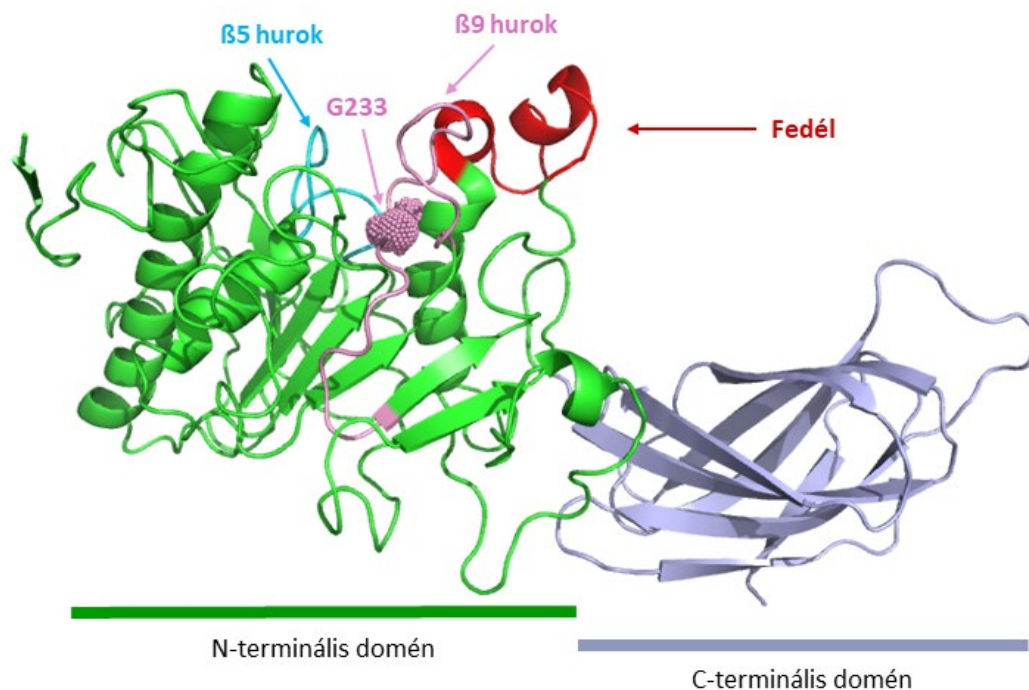
Habár a legtöbb kationos tripszin variáns megfelelően szekretálódik (131), ezen az útvonalon is képesek pankreatitist okozni. Egyes nem-szekretálódó mutánsok az ER stressz kiváltása mellett a sejten belül autoaktiválódnak, ezzel programozott sejthalált indukálva (132).

A tripszin mellett más emésztőenzimeket is érintenek a nem megfelelően feltekerődött fehérjét eredményező mutációk. Az így termelődött fehérjék hatása viszont a tripszintől független, elsősorban az UPR-re vezethetőek vissza. Ezek között megemlítendő a CTRC, CPA1, CEL, viszont a feltekerődési defektus más szekréción fehérjét is érinthet, a stresszválasz súlyossága a termelődő fehérje mennyiségével lehet kapcsolatban. A SPINK-1 mutánsok kivételt képeznek a csoportban, ugyanis nem funkcionális inhibitoroként nem képes gátolni a tripszin aktiválódását, ennek ellenére a G48E, D50E, Y54H és R67C mutánsokat még nem hozták összefüggésbe hasnyálmirigy gyulladással (110).

### 3.3.6. Humán pankreász lipáz

A humán pankreász lipáz a PRSS1-hez hasonlóan nagy mennyiségben (133) szekretálódik a hasnyálmirigyben, majd a vékonybélben katalizálja a trigliceridek hidrolízisét zsírsavakká, rövidebb és hosszabb láncú trigliceridek hasítását is hatékonyan végzi. Működését a kolipáz segíti, ezzel ellentétes hatást fejtenek ki az epesavak, melyek a lipáz aktivitást képesek gátolni (134). Habár a kolipáz és az epesavak nem esszenciálisak, a trigliceridek hatékony emésztéséhez és felszívódásához elengedhetetlenek.

Két fő szerkezeti egysége van, az N- és a C-terminális domén. Az N-terminális domén részt vesz az aktív hely kialakításában, a szubsztrátok hozzáférését az aktív centrumhoz egy fedél és két hurok domén ( $\beta 5$ ,  $\beta 9$ ) szabályozza. A kolipáz a lipázhoz annak C-terminálisán keresztül kapcsolódik és a fedél stabilitását biztosítja, mind nyitott, mind pedig zárt állapotában. A C-terminálison található hidrofób hurok régióknak szerepe lehet egyes lipidek megkötésében is (10. ábra). Az epesavak micellák képződését mediálják, amelyek jelenlétében nyitott konformáció figyelhető meg, a fedél és a  $\beta 5$  hurok helyzete megváltozik, a felszíni oldalláncok a fedéllel és a kolipázzal együtt egy kiterjedt hidrofób felszínt alakítanak ki ezzel elősegítve a lipidek megkötését.



**10. ábra. A PNLIP szerkezeti képe.** A humán pankreász lipáz kristályszerkezete (PDB: 1LPB). A funkcionálisan jelentős régiók az ábrán nyilakkal jelöltek. A domének jelölése Xiao és Lowe, 2015 alapján (135) történt.

A PNLIP közeli rokonságban áll a pankreász lipáz-szerű fehérje 1 és 2 (PNLIPRP1 és PNLIPRP2) proteinekkel, aktivitással csak az utóbbi rendelkezik (136). A karboxil-észter lipáz (CEL) a PNLIP-nél szélesebb specificitással rendelkezik, a trigliceridek bontása mellett koleszteril-észterek, foszfolipidek és más lipidek hidrolízisét is végzi (137).

A CEL lipáz szintén két fő domént tartalmaz (N- és C-terminális domén). A C-terminális domén prolin-gazdag tandem ismétlődéseket tartalmaz, ennek száma variábilis a populációban, 40%-uk 16 ismétlődéssel rendelkezik. Ez a régió a CEL stabilitásáért is felelős és mutációja feltekerődési rendellenességet okozhat, ami együtt járhat az UPR válasz beindulásával, mint a CEL-MODY (138), vagy a CEL-HYB esetében, ami a szintén a CEL lókuszon található CELP-vel rekombinálódva hibrid fehérjét eredményez és expressziója ER stresszt indukál (139).

A PNLIP számos mutációja ismert. Egyes variánsok lipáz deficienciát okoznak, ami együtt jár az étkezéssel bevitt lipidek felszívódási zavarával (134, 140). A KP-szel még nem hozták egyértelműen kapcsolatba, viszont több mutáció is nagy kockázatot hordoz magában. Egyes variánsok nagyobb aktivitással rendelkeznek, mások nem megfelelően szekretálódnak. Utóbbi mutációkat a T221M kivételével csak heterozigóta formában detektálták és nem hozták kapcsolatba KP-szel. A PNLIP fehérje mutációi érzékenyebbé tehetik azt a PRSS1 és a CTRC általi degradációra, egyes nem alkoholos KP-ben szenvedő betegekben megtalálhatóak ilyen protein variánsok, viszont a KP és a mutációk közötti kapcsolatot még nem tárták fel (141). A nem-szekretáló PNLIP variánsok esetében (A174P, T221M, G233E, C254R és V454F) bebizonyosodott azok ER stresszt fokozó hatása is. Ezek közül több mutáció is az aktív hely közelében található, a Gly233 a  $\beta$ 9 huroknak is a része. Az eddigi kísérletek HEK és AR42J sejtvonalakon *in vitro* vizsgálták ER-ra kifejtett hatást. Mind az öt fehérje variáns esetében megfigyelhető volt az XBP-1 mRNS érés fokozódása, valamint a BiP mRNS szintjének növekedése. Az AR42J patkány acinus sejtvonal esetében ezek a hatások intenzívebbek voltak (142-143), amit magyarázhat a sejt viszonylag kiterjedt ER-a.

## 4. CÉLKITŰZÉSEK

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

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

Az örökletes krónikus pankreatitisz kialakulását a nem megfelelően feltekeredett, normál esetben szekretálódó fehérjék mutációi is okozhatják. A dohányzás, mint ettől független rizikó faktor lehet jelen. Feltételezzük, hogy a dohányzás és a genetikai rizikófaktorok együttes jelenléte egymás hatását erősítheti. A genetikai tényezők modelljeként egy eddig kevésbé tanulmányozott humán hasnyálmirigy lipáz (PNLIP) variánst (G233E) alkalmaztunk. Hipotézisünket egy humán (HEK293AD) és egy patkány hasnyálmirigy sejtvonallal (AR42J) alkalmazásával kívántuk igazolni. Célunk volt:

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

## 5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 5.1. HTLV proteázok karakterizálása

#### 5.1.1. HTLV-1, HTLV-2 és HTLV-3 proteázok expressziója

A HTLV-1 PR expressziójához az enzim kódoló szekvenciájának pET11a expressziós plazmidba klónozott stabilizált (L40I, C90A és C109A) változatát használtuk fel (53). A HTLV-2 PR termeléséhez egy bakteriális expresszióra kodon optimalizált szekvenciát rendeltünk (Genscript Biotech). A HTLV-3 PR esetében a Pyl43 strain kodon optimalizált szekvenciáját alkalmaztuk. A proteáz szekvenciáját pCR2.1-TOP0 plazmidból klónoztuk pET11a expressziós vektorba az NdeI és BamHI restriktációs endonukleázok segítségével.

Az expressziós plazmidokat BL21(DE3) *E. coli* sejtekbe (New England Biolabs) transzformáltuk hősokkal (42°C, 90 másodperc). A transzformált sejteket ampicillinnel kiegészített Luria-Bertani (LB) médiumban növesztettük 37°C-on rázatás mellett, 0,6-0,8 OD<sub>600</sub> közötti érték eléréséig. A fehérje expressziót 1 mM izopropil-β-D-tiogalaktopiranozid (IPTG) hozzáadásával indukáltuk, amit további inkubáció követett (37°C, 3 óra) folyamatos rázatás mellett.

#### 5.1.2. HTLV-1, HTLV-2 és HTLV-3 proteázok tisztítása

Az expressziót követően a sejteket centrifugálással (Sorvall Lynx 4000) gyűjtöttük be (4000 g, 20 perc, 4°C). A sejteket „A” pufferbe (50 mM Tris-HCl, 1 mM ditiotritol (DTT), 1 mM etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA), pH 8,2) oldottuk, majd szonikálással (Branson Sonifier 450) tártuk fel. Ezt 25000 g-n egy centrifugálási lépés követte 20 percig 4°C-on. A zárványtesteket tartalmazó pelletet ezt követően „B” pufferbe oldottuk (50 mM Tris-HCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 1 v/v % Triton X-100, pH 8,2). Ez a tisztítási lépés a korábban HTLV-1 PR-ra leírt módszerben (62) nem volt jelen. Két centrifugálási lépést követően a pelletet „C” pufferben oldottuk fel (50 mM Tris-HCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 1 v/v % Triton X-100, 1 M urea, pH 8,2), végül a pelletet szolubilizáltuk „D” pufferben (50 mM Tris-HCl, 7,5 M guanidin-HCl, 5 mM DTT, 5 mM EDTA, pH 8,2). A fehérjéket SDS-PAGE (14 vagy 16%-os poliakrilamid gél) segítségével választottuk el. Az analízishez a mintákat vízzel 10x térfogatra hígítottuk.

A szolubilizálást követően a fehérjéket reverz-fázisú HPLC módszerrel Äkta Purifier (Amersham Pharmacia Biotech) készüléken POROS R2 oszlopon (Thermo Fisher Scientific) tisztítottuk. A szeparáláshoz növekvő víz/acetonitril (0-100%) grádienszt alkalmaztunk 1 ml/perc áramlási sebesség mellett, 0,05% trifluoroacetát (TFA) jelenlétében. Az eluált frakciók tisztaságát SDS-PAGE (14 vagy 16%) segítségével ellenőriztük. A legnagyobb tisztaságú (>90%) frakciókkal dolgoztunk tovább.

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

### 5.1.3. Oligopeptidek és inhibitorok

HTLV-1, HTLV-2 és HTLV-3 PR hasítóhelyeket reprezentáló oligopeptideket alkalmaztunk szubsztrátként. Kísérleteink során a mátrix/kapszid (MA/CA), a kapszid/nukleokapszid (CA/NC), a „*transframe*” protein/proteáz (TF1/PR) és a PR/p1 hasítóhelyeket vizsgáltuk. Az oligopeptideket a BioBasictól rendeltük, a további retrovirális proteáz hasítóhelyeket tartalmazó (62-63), illetve a vad típusú és P4, P3, P2, P1 vagy P1' helyen módosított HTLV-1 MA/CA (KTKVL\*VVQPK) hasítóhelyet tartalmazó oligopeptidek (144) kutatócsoportunkban már rendelkezésre álltak. A peptid szubsztrátok por formában érkeztek és vízben oldott formában használtuk fel.

Az IB-268 (KTKVL-r-VVQPK) és IB-269 (APQVL-r-PVMHP) inhibitorok redukált peptidkötést tartalmaznak és Dr. Ivo Blaha (Ferring Leciva, Prága, Csehország) szintetizálta. A DMP-323, ami a HIV-1 PR egy szorosán kötődő inhibitora (145) és további, a HIV-1 ellenes terápiában jelenleg is vagy korábban alkalmazott inhibitorok (atazanavir, darunavir, indinavir, ritonavir, saquinavir) (76) kutatócsoportunkban már dimetil-szulfoxidba (DMSO) oldva rendelkezésre álltak.

### 5.1.4. HTLV-1, HTLV-2 és HTLV-3 proteázok aktivitásának vizsgálata

A kinetikai vizsgálatokhoz 10 µl 2x töménységű inkubációs puffert (0,5 M K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 4 M NaCl, 10 v/v % glicerol, 10 mM DTT, pH 5,6), 5 µl HTLV-1, HTLV-2 vagy HTLV-3 proteázt (az aktív enzimek koncentrációja 0,1-34,4 nM) és 0,5-5 µl természetes HTLV PR hasítási helyet reprezentáló oligopeptid szubsztrátot (0,05-1,10 mM végkoncentráció) alkalmaztunk. A reakció végtérfogata 20 µl volt, amit desztillált vízzel egészítettünk ki erre, ha szükséges volt.

A reakciókat az enzim hozzáadásával indítottuk el és 37°C-on 0,5-4 órán át inkubáltuk, majd 180 µl 1 v/v % TFA hozzáadásával állítottuk le.

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

A hasítási termékeket és a szubsztrátot Nova-Pack C18 (3.9 mm × 150 mm, Waters) RP-HPLC oszlopon választottuk el egymástól LaChrom (Merck-Hitachi) készüléken. A szeparáláshoz 0-100% víz-acetonitril gradiens alkalmaztunk 0,05% TFA jelenlétében, 2 ml/perc áramlási sebesség mellett.

A kinetikai paramétereket a szubsztrátra és a kapott termékekre számított csúcs alatti terület értékek alapján, az adatok Michaelis-Menten egyenletre illesztésével határoztuk meg. A pH optimum meghatározásához Gauss egyenletet, míg a NaCl koncentráció és a hőmérséklet optimumának meghatározásához lineáris regressziót alkalmaztunk. A  $k_{cat}/K_M$  katalitikus konstansok kiszámításához figyelembe vettük az aktív enzim koncentrációját, amelyet aktív centrum titrálással határoztunk meg egy korábban leírt módszer alapján (75).

#### **5.1.5. HTLV-1, HTLV-2 és HTLV-3 proteázok számára optimális pH, hőmérséklet és NaCl koncentráció meghatározása**

A pH, a hőmérséklet és az ionerősség hatásának vizsgálatához az enzimreakciókat 2x META pufferben (100 mM MES [2- (N-morfolino)-etánszulfonsav], 200 mM Tris, 100 mM nátrium-acetát) végeztük. A reakcióelegyek 10 µl puffert, 5 µl enzimet és 5 µl szubsztrátot tartalmaztak. A reakciókat az enzim hozzáadásával indítottuk el, az inkubálás és a reakcióközegek vizsgálata a HTLV-1, HTLV-2 és HTLV-3 proteázok aktivitásának vizsgálata c. fejezetben (5.1.4) leírtak szerint történt.

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

#### **5.1.6. HTLV-2 és HTLV-3 proteázok aminosav preferenciáinak meghatározása**

A HTLV-2 és HTLV-3 PR aminosav preferenciájának a HTLV-1 proteázéhoz való összehasonlításához a HTLV-1 PR CA/NC hasítási helyet (KTKVL\*VVQPK) reprezentáló vad

típusú, illetve a P4, P3, P2, P1 és P1' helyen módosított szubsztrátokat alkalmaztunk. Annak tanulmányozására, hogy az S5 és S4 zsebek részt vesznek-e a szubsztrát felismerésében, rövidített szubsztrát variánsokat (P4-P5' és P3-P5') vizsgáltunk. Az enzimreakciókat a HTLV-1, HTLV-2 és HTLV-3 proteázok aktivitásának vizsgálata c. fejezetben (5.1.4) részben leírt módon végeztük. A 20 µl-es reakcióelegy 10 µl 2x inkubációs puffert, 5 µl HTLV-1, HTLV-2 vagy HTLV-3 proteázt (az aktív enzimek végkoncentrációja 0,1-34,4 nM értékek között változott) és 5 µl szubsztrátot (0,4-0,5 mM végkoncentráció) tartalmazott. A reakciókat az enzim hozzáadásával indítottuk el, amit 0,5-4 óra inkubáció követett 37°C-on. A reakciókat 180 µl 1 v/v % TFA hozzáadásával állítottuk le. Minden szubsztrát esetében relatív aktivitás értékeket határoztunk meg. A kapott értékek összehasonlítása során minden esetben a KTKVL\*VVQPK szubsztrátra kapott értéket tekintettük 100%-nak.

#### **5.1.7. HTLV-1, HTLV-2 és HTLV-3 proteázok gátolhatóságának vizsgálata**

A reakcióelegy 4,8 µl szubsztrátot (0,40-0,43 mM-os végkoncentráció), 0,2 µl inhibitor, 5 µl enzimet (HTLV-1, HTLV-2 és HTLV-3 PR) és 10 µl 2x inkubációs puffert tartalmazott. A szubsztrátok a HTLV-2 és HTLV-3 MA/CA hasítási helyet reprezentálták. A HIV-1 PR inhibitorok esetén 100 µM-os törzsoldat koncentrációt, míg az IB-268 és IB-269 inhibitorok esetében 0,5-100 µM-t alkalmaztunk. Az inhibitorokat DMSO-ba oldottuk, ezért 0,2 µl DMSO-t adtunk a kontroll mintákhoz. Az IB-269 inhibitor (0-125 nM végkoncentráció) alkalmaztuk az aktív enzim mennyiségének meghatározásához.

#### **5.1.8. HTLV-2 és HTLV-3 proteázok irányított mutagenézise**

A HTLV-2 és HTLV-3 PR kódoló szekvenciákat az N-terminálison kiegészítettük egy 8 aminosavból álló linkerrel, amely megfeleltethető a TF1/PR természetes hasítási hely P8-P1 oldalláncainak. Az így kapott szekvenciát pMALc2x vektorba klónoztuk, amely lehetővé tette, hogy a fehérje, az N-terminálison maltóz-kötő fehérjével (MBP) fuzionált formában termelődhessen. A klónozást „*overlap extension*” PCR módszerrel végeztük, a PCR terméket EcorI és BamHI restrikciós endonukleázokkal emésztettük, majd ligáltuk a pMALc2x vektorba. Ezt a HTLV-2 (L37D, L37N, L57G, A59I és F67Q) és a HTLV-3 PR (I37D, I37N, L57G, A59I és F67Q) helyspecifikus mutagenézise követte QuikChange II mutagenesis kittel (Agilent), ahol a gyártó által leírt protokollt követtük. Az alkalmazott primerek listáját az **1. táblázat**

mutatja be. A vad típusú, és a mutációkat tartalmazó konstrukciókat szekvenálással ellenőriztük (Genomi Medicina és Bioinformatikai Szolgáltató Laboratórium, Debreceni Egyetem).

**1. táblázat. A HTLV-2 és HTLV-3 proteázok irányított mutagenéziséhez alkalmazott oligonukleotid primerek listája.** A FWD a forward, a REV a reverse primereket jelöli (Sigma-Aldrich).

Név	FWD/REV	Primer Szekvencia
HTLV-2 PR N-terminális linker	FWD	5' - AGGATTTTCAGAATTCCCCGACCAGGACATCTCAATA CTTCCGCTGATTCCGCTGCGTCAAC-3'
	REV	5' -CTAGAGGATCCTTACAGCAGTTGATGCGGTGA CGGTCGTCCGGC-3'
HTLV-3 PR N-terminális linker	FWD	5' -AGGATTTTCAGAATTCCTTACATCTCCACGTAC AATTCTTCCCCTCATACCTTGTCCCAACAAAG-3'
	REV	5' -GCGGATCCTTAGAGAACACTTGAGGGTTG-3'
L37D	FWD	5' -GGCGCGGACGATACGGTCATT-3'
	REV	5' -AATGACCGTATCGTCCGCGCC-3'
L37N	FWD	5' -GGCGCGGACAACACGGTCATT-3'
	REV	5' -AATGACCGTGTTGTCCGCGCC-3'
HTLV-2 PR L57G	FWD	5' -ACGCTGATCGGCGGCCAGT-3'
	REV	5' -ACTGGCGCCCGGATCAGCGT-3'
A59I	FWD	5' -ATCCTGGGCATTAGTGGTCAG-3'
	REV	5' -CTGACCACTAATGCCAGGAT-3'
F67Q	FWD	5' -AACACGCAACAGAACTGCTG-3'
	REV	5' -CAGCAGTTTCTGTTGCGTGTT-3'
I37D	FWD	5' -GGGGCGGACGATACTGTTCTC-3'
	REV	5' -GAGAACAGTATCGTCCGCCCC-3'
I37N	FWD	5' -GGGGCGGACAACACTGTTCTC-3'
	REV	5' -GAGAACAGTGTGTTGTTCCGCCCC-3'
HTLV-3 PR L57G	FWD	5' -ACCACTGTCGGCGGCGCAGGC-3'
	REV	5' -GCCTGCGCCCGGACAGTGGT-3'
A59I	FWD	5' -GTCTTAGGCATTGGCGGGCCA-3'
	REV	5' -TGGCCCGCCAATGCCTAAGAC-3'
F67Q	FWD	5' -ACCAGCAAGCAGAAGATCCTG-3'
	REV	5' -AGGATCTTCTGCTTGCTGGT-3'

### 5.1.9. HTLV-2 és -3 proteázok autoprocesszáló képességének vizsgálata

Az expressziós konstruktokat BL21(DE3) *E.coli* sejtekbe transzformáltuk hőszökkel (42°C, 90 másodperc). A rekombináns HTLV-2 és HTLV-3 proteázokat egy N-terminális MBP fúziós címkével fuzionált formában expresszáltattuk (MBP-HTLV-2 és MBP-HTLV-3). Az expressziót 1 mM IPTG hozzáadásával indukáltuk, majd a sejteket lizáltuk szonikálás segítségével „A” pufferben. A sejtizátumokat 16%-os poliakrilamid gélen futtattuk. Az SDS-

PAGE elektroforézist követően a fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltuk (100V, 1 óra). A Western-blotot a kutatócsoport által korábban optimalizált protokoll alapján végeztük (146). A membránt 1 órán át 5%-os tejport tartalmazó TTBS oldatban (Tris-pufferelt sóoldat, pH 7,5, 0,01% Tween20 detergenssel kiegészítve) blokkoltuk. Elsődleges antitestként anti-MBP monoklonális antitestet 1:4000 hígításban (4°C, 16 óra) (E8030S, New England Biolabs), míg másodlagosként egy anti-nyúl HRP-konjugált antitestet 1:10000 hígításban (szobahő, 1 óra) (1706515, BioRad) alkalmaztunk. A fehérjéket kemilumineszcens szubsztrát segítségével detektáltuk (Thermo Fisher Scientific), AGFA orvosi röntgen film felhasználásával (kék), KODAK Medical X-ray processor 102 előhívó készülék segítségével.

## **5.2. A főbb cigarettafüst komponensek és a G233E PNLIP mutáció vizsgálata**

### **5.2.1. Expressziós plazmidok és adenovírus vektorok**

A PNLIP expressziójához egy korábban leírt (141-143), a PNLIP C-terminálisán egy dekahisztidin (His<sub>10</sub>) fúziós címkét tartalmazó pcDNA3.1(-) vektorba klónozott konstrukciót használtunk. Az aminosavak számozása az iniciátor metioninnal kezdődik.

A lipáz kódoló szekvenciát tartalmazó adenovírusokat Humán embrionális vese (HEK) 293AD sejtekben amplifikáltuk (143). Az adenovírusokat fagyasztás-olvasztás ciklusokkal szabadítottuk ki a sejtekből, majd anion-cserélő oszlopokon tisztítottuk (Pierce Strong Anion Exchange Mini Spin Columns, Thermo Scientific). Az oszlopokat 0,4 ml 0,1 M nátrium-hidroxiddal mostuk, majd centrifugáltuk (1 perc, 2000 g), ezt egy másik mosási lépés követte 0,4 ml 0,1 M nátrium-acetát pufferrel (pH 5,0) (1 perc, 2000 g). Az oszlopokat mintapufferrel (50 mM HEPES, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Tween-20, pH 8,0) equilibráltuk, centrifugáltuk. Az equilibrálás ismételt elvégzését követően az adenovírusokat tartalmazó sejtlyúzátumokat mintapufferrel 10x-re hígítottuk, az oszlopra pipettázuk, majd centrifugáltuk (3 perc, 2000 g). Az oszlopokat 0,2 M NaCl-dal kiegészített mintapufferrel mostuk, majd 1 M NaCl-tartalmú mintapufferrel eluáltuk. A tisztított adenovírust tartalmazó oldatokat kiegészítettük 0,1 ml 50 v/v % glicerollal, majd felhasználásig -70°C-on tároltuk. A vírus titereket IFU/ml (infectious unit/ml) mértékegységben határoztuk meg (AdEasy Viral Titer Kit, Agilent). Az adenovírusok legalább 10 hónapig stabilak voltak a tárolás során.

### **5.2.2. Sejtkultúrák és géntranszfer**

A HEK293AD sejteket DMEM (magas glükóztartalmú DMEM tápoldat, kiegészítve 10 v/v % FBS, 50 U/ml penicillin és 50 µg/ml streptomycin oldatokkal) sejtkultúra médiumban tartottuk fenn 37°C-on sejtkultúra inkubátorban. A kísérleteket megelőző napon 12 lyukú sejtenyészítő lemezre (180000/lyuk) helyeztük a sejteket 0,5 ml médiumban. Az elágazó láncú polietilénimin (PEI) oldatot egy korábban leírt módon készítettük (147). A transzfekcióhoz 12 µl PEI oldatot kevertünk össze 2 µg plazmid DNS-sel, Opti-MEM médiumban. 20 perc inkubációt követően (szobahő) az elegyet hozzáadtuk a sejtekhez, majd sejtkultúra inkubátorba helyeztük a sejtenyészítő lemezt. 6 óra elteltével a médiumot eltávolítottuk, foszfáttal pufferelt

sóoldattal (PBS) mostuk a sejteket, majd 50 U/ml penicillinnel 50 µg/ml streptomycinnel kiegészített Opti-MEM oldatra cseréltük a felülúszót.

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

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

### **5.2.3. Kémiai kezelések**

Az akroleint, a krotonaldehidet és a hidrokinont a Sigma-Aldrich-től vásároltuk. Az akrolein és krotonaldehid törzsoldatokat (200 mM) közvetlenül a kísérleteket megelőzően készítettük el DMSO-val hígítva. A hidrokinont vízbe oldottuk (200 mM) és felhasználásig - 20°C-on tároltuk. A HEK293AD és AR42J sejteket 10-200 µM végkoncentrációjú oldatokkal kezeltük, ahogy az ábra aláírásokban szerepel.

### **5.2.4. Életképesség vizsgálatok**

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

### 5.2.5. Áramlási citometria

A mérésekhez eltávolítottuk a médiumot a HEK293AD és az AR42J sejtekről, majd 0,5x töménységű tripszinnel (Gibco) felszedtük a sejteket a sejttenyésztő lemezről. Ezt követően a sejteket mikrocentrifuga csövekbe transzferáltuk és kétszer mostuk és centrifugáltuk (100 g, 5 perc) 1 ml PBS-ben. A sejthalált FITC Annexin V / Dead Cell Apoptosis Kit (Invitrogen) segítségével karakterizáltuk a gyártó leírása szerint. A sejteket a FITC-konjugált Annexin V-tel és a propídium-jodiddal történő inkubációt követően átszűrtük (MES szűrő), FACS csövekbe helyeztük, majd BD FACSAria III áramlási citométerrel (BD Biosciences) (DE-ÁOK, BMBI Óssejt Kutató Laboratórium) 488 nm lézert 530/30 BP szűrővel a FITC és 561 nm lézert 610/20 BP szűrővel a propídium-jodid mérésekhez.

### 5.2.6. SDS-poliakrilamid gélelektroforézis

48 órával a transzfekciót követően begyűjtöttük a HEK293AD (200 µl) és AR42J (40 µl) sejtekről a médiumot és a benne található fehérjéket 10% triklór-ecetsavval kicsaptuk, majd centrifugáltuk (17000 g, 10 perc). A pelletet 100 mM DTT-vel kiegészített Laemmler pufferben vettük fel és hődenaturáltuk (95°C, 5 perc). A mintákat 12%-os SDS-PAGE gélen futtattuk meg, majd a fehérjéket Coomassie Brilliant Blue R-250 festékkel tettük láthatóvá.

### 5.2.7. RT-PCR és qPCR analízisek

Az RNS-t NucleoSpin RNA Plus kit (Macherey-Nagel) segítségével izoláltuk és 2 µg mennyiséget reverz transzkripciónak vetettünk alá (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems). Az így kapott cDNS-ből PCR segítségével határoztuk meg az érett XBP-1 mRNS mennyiségét humán (131) és patkány (148) XBP-1 primerpárokkal. A PCR termékeket 2%-os agaróz gélen futtattuk meg és denzitometriával (Quantity One, BioRad) értékeltük ki. Az átírt cDNS-ből meghatároztuk a BiP, CHOP, GAPDH és az NQO1 gének expressziós szintjét egy korábban leírt qPCR protokoll szerint (143). A kísérletekhez a felsorolt TaqMan próbákat (Thermo Scientific) használtuk fel: BIP/HSPA5 (Hs00607129\_gH, Rn00565250\_m1), CHOP/DDIT3 (Hs00358796\_g1, Rn00492098\_g1), ERP72 (Rn00587766\_m1), GAPDH (Hs02758991\_g1, Rn01775763\_g1), Nqo1 (Hs00168547\_m1, Rn00566528\_m1) és PDI (Rn00564459\_m1).

### 5.2.8. Fehérje immunoblot

A sejteket kétszer megmostuk PBS-sel, felkapartuk a sejttenyésztő lemezről és 1 ml PBS-be oldottuk. Ezt egy centrifugálás (850 g, 10 perc) követte. A sejteket ismétlődő fagyasztás-olvasztás ciklusokkal tártuk fel 200 µl, inhibitorokkal (cOmplete Mini Protease Inhibitor Cocktail, Roche) kiegészített lízis pufferben (Reporter Lysis Buffer, Promega), majd az elegyet centrifugáltuk (2400 g, 5 perc) és a felülúszót begyűjtöttük. A Western-blot kísérletek során az AR42J lizátumból 2,5 µg, míg a HEK293AD sejtekből származó fehérjékből 5 µg-ot használtunk fel, amit Laemmli pufferbe oldottunk és hődenaturáltunk. Ezt SDS-PAGE követte 12%-os gélen, majd transzferálás nitrocellulóz membránra (100V, 1 óra). A membránt 1 órán át 5% tejport tartalmazó TTBS oldatban blokkoltuk, majd 1:15000 hígításban GAPDH ellenes antitestet (G9545, Sigma-Aldrich) adtunk (1 óra) az elegyhez és HRP-konjugált anti-nyúl antitestet (1706515, Bio-Rad) használtunk (1 óra) másodlagos antitestként 1:10000 hígításban. A PNLIP jelenlétének kimutatásához HRP-konjugált anti-His antitestet (34460, Qiagen) alkalmaztunk 1:2000 hígításban, szintén 1 óra inkubáció mellett. A fehérjéket kemilumineszcens szubsztrát segítségével detektáltuk (Thermo Fisher Scientific), Azure 600 (Azure Biosystems) géldokumentációs rendszer segítségével.

### 5.2.9. Statisztikai analízis

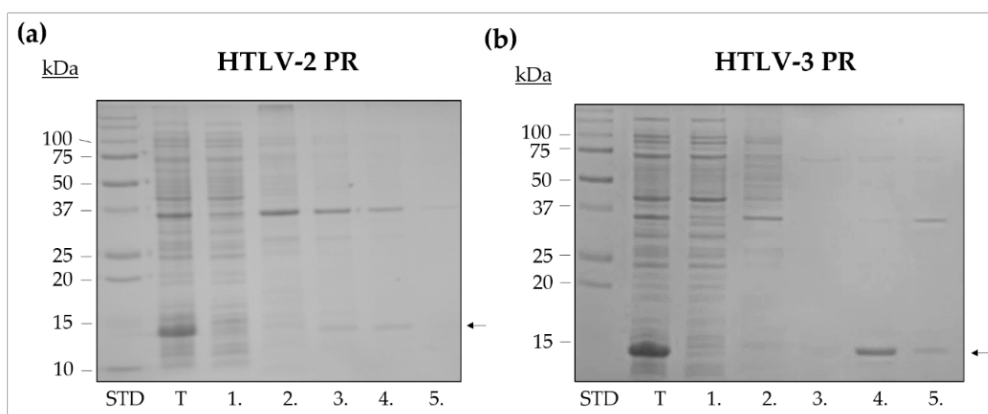
A bemutatott adatok az eredmények átlagát mutatják szórással (SD). Az eredményeket a MedCalc programmal (MedCalc Software) analizáltuk, T-próbának vetettük alá, ahol a <0,05-nél kisebb P-értékeket tekintettük szignifikánsnak. Az adatok ábrázolását GraphPad 5 (Prism) szoftverrel végeztük.

## 6. EREDMÉNYEK

### 6.1. A HTLV proteázok jellemzése

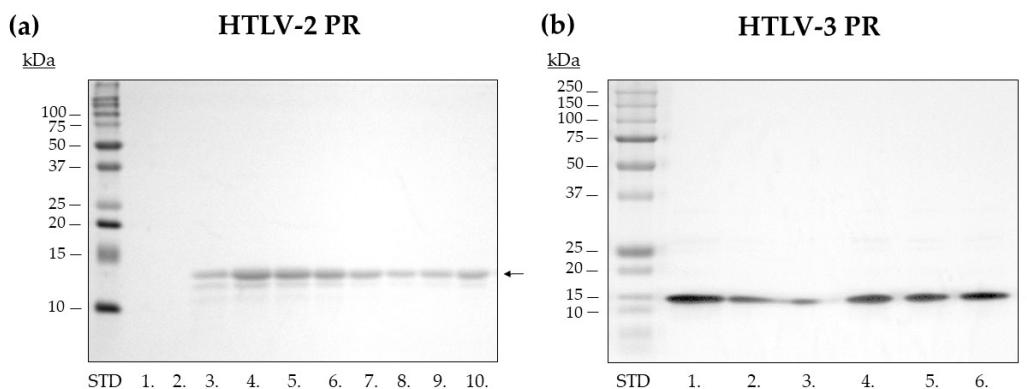
#### 6.1.1. A HTLV proteázok expressziója és tisztítása

A HTLV-1, -2 és -3 proteázokat BL21(DE3) *E. coli* sejtekben expresszáltuk, minden enzim esetében inklúziós testből. A fehérjék inklúziós testből való extrakciója volt a tisztítás első lépése, itt szintén, minden enzimre azonos kondíciókat alkalmaztunk. A HTLV-2 és -3 proteázokat korábban mások nem vizsgálták, így szükséges volt szolubilizációjuk, tisztításuk optimalizálása. Ehhez egy korábban a HTLV-1 PR-ra leírt protokollt vettünk alapul (62). A szolubilizáció során egy további mosó lépést is alkalmaztunk (részletek az Anyagok és módszerek című fejezetben). A HTLV-2 és HTLV-3 PR szolubilizációját a **11. ábra** mutatja be.



**11. ábra.** A HTLV-2 (a) és a HTLV-3 (b) proteázok izolálása inklúziós testből. A STD rövidítés a molekulásúly markert jelöli. A mintákat SDS-PAGE segítségével analizáltuk: a T a teljes sejtizátumot az (1) a felülúszót jelöli. A teljes sejtizátum centrifugálását követően a pelletet (2) „B” pufferbe oldottuk, majd a pelletet „C” pufferben oldottuk és két centrifugálási lépést követően (3-4) végül „D” pufferben oldottuk (5). A nyilak a proteázt jelölik.

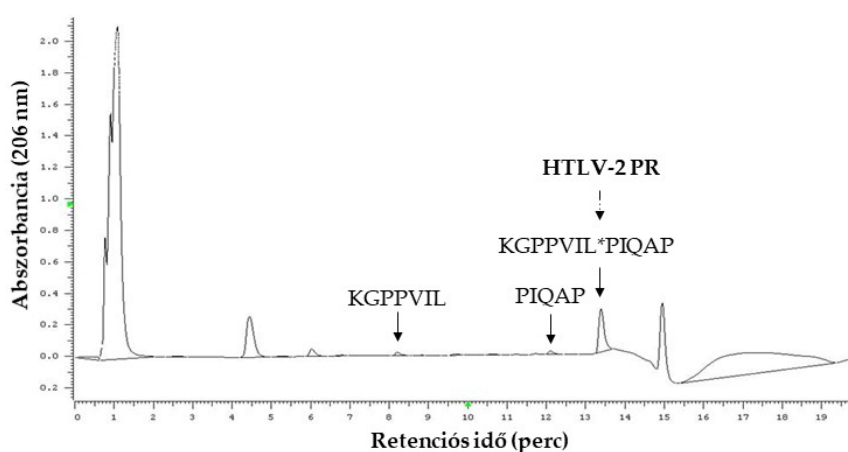
A szolubilizálást követően a fehérjéket reverz-fázisú HPLC-vel tisztítottuk. Az eluált frakciókat begyűjtöttük és SDS-PAGE gélen ellenőriztük (**12. ábra**). A ~37 kDa méretű feltételezhetően nem specifikus szennyezők (**11. ábra**), amelyeket a tisztítás következő fázisában sikerült eltávolítani, a reverz-fázisú HPLC oszlopon való tisztítást követően a begyűjtött eluátumokban (**12. ábra**) már nem volt detektálható. A legnagyobb tisztaságú frakciókat (>95%) dializáltuk „E” puffer ellenében, a fehérjék megfelelő feltekeredésének elérése céljából.



**12. ábra. A HTLV-2 és HTLV-3 PR tisztítása.** A reprezentatív SDS-PAGE gélképek a tisztított HTLV-2 (13,8 kDa) (a) és HTLV-3 PR (13,3 kDa) (b) frakciókat mutatják be. A proteázok sávjait nyilak jelölik. A STD rövidítés a molekulásúly markert jelöli, a begyűjtött frakciókat számokkal jelöltük. A HTLV-2 PR esetében a 8., míg a HTLV-3 PR esetében a 4. frakciót (>90% tisztaság) használtuk a további vizsgálatokhoz.

### 6.1.2. Az optimális reakciókörülmények meghatározása és az enzimek stabilitásának vizsgálata

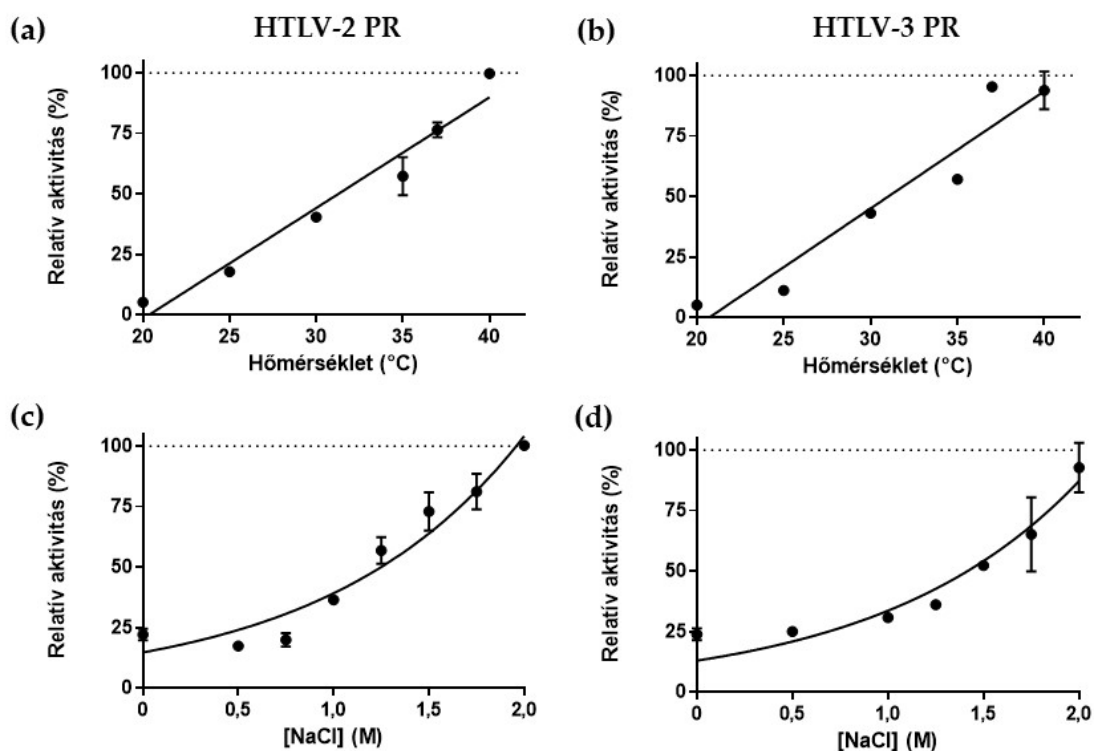
Vizsgáltuk a különböző reakciókörülmények (hőmérséklet, pH, ionerősség) hatását a HTLV-2 és HTLV-3 PR aktivitására, valamint az összehasonlítás érdekében meghatároztuk a HTLV-1 PR pH optimumát is. Az enzimreakciókat követően a szubsztrátot és a hasítási termékeket reverz-fázisú HPLC módszerrel választottuk el egymástól, a **13. ábra** egy reprezentatív kromatogramot mutat be. Az aktivitásmérések során a HTLV-1, HTLV-2 és HTLV-3 PR természetes hasítóhelyeit reprezentáló oligopeptid szubsztrátokat alkalmaztunk.



**13. ábra. A HTLV-1 PR/P1 oligopeptid szubsztrát hasítása HTLV-2 proteázzal.** A nyilak a szubsztrát és a hasítási termékek csúcsát jelölik a reprezentatív kromatogramon. A szubsztrát és a termékek szekvenciáját szintén jelöltük. A szaggatott nyíl a szekvenciában csillaggal jelölt hasítási helyet mutatja. A hasítási hely a szubsztrát és a hasítási termékek molekulásúlya alapján lett meghatározva mátrix-asszisztált lézer deszorpció/ionizáció-tömegspektrometriával (MALDI-TOF MS, Proteomika Szolgáltató Laboratórium, Debreceni Egyetem).

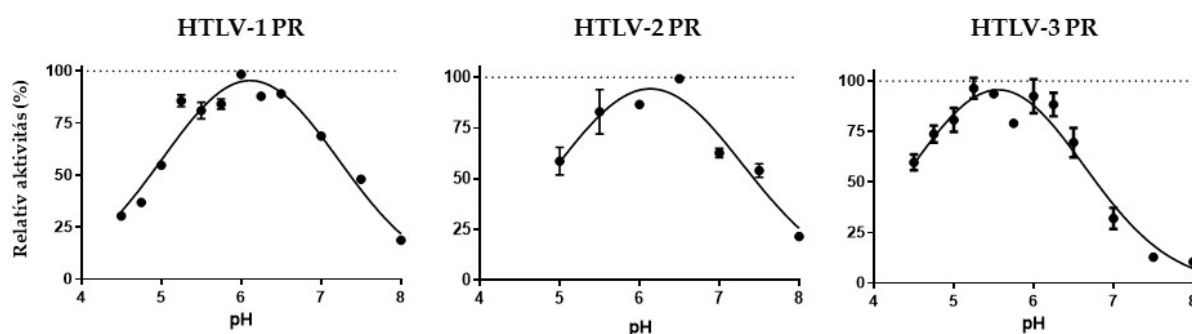
Mind a HTLV-2, mind a HTLV-3 PR aktivitása növekedett az emelkedő hőmérséklet hatására, a legnagyobb aktivitást ~40°C-on mutatták, míg alacsonyabb hőmérsékleten (35°C) a teljes aktivitásnak már a jelentős mértékű (~40%) csökkenése volt megfigyelhető. (14. ábra). Korábbi proteáz mérésekkel összhangban úgy találtuk, hogy a 37°C-os hőmérséklet megfelelő számukra. A HTLV-1 proteázon kívül (62) (75) a BLV (149), valamint a HIV-1, HIV-2 PR, EIAV, MMTV és a humán „foamy” vírus (HFV) PR-ra (60) is ezt a hőmérsékletet alkalmazták.

Az ionerősség növelésére az aktivitás emelkedésével reagált a HTLV-2 és HTLV-3 PR is. A legmagasabb aktivitást 2 M NaCl koncentrációnál tapasztaltuk (14. ábra). Korábban a HTLV-1 PR esetén is hasonló tendenciát figyeltek meg (52). Ez a fajta aktivitás változás a retrovirális proteázok közös jellemzője (150), beleértve a HIV-1 (151), HFV (152), BLV (153) és más retrovírus-szerű proteázokat is, pl. Ty1 retrotranszpozon PR (154), vagy a humán retrovírus-szerű aszpartil proteáz 1 (ASPRV1) (155).



**14. ábra.** Az ionerősség és a hőmérséklet hatása a HTLV-2 és HTLV-3 PR aktivitására. A grafikonok a hőmérséklet (a és b) valamint a NaCl koncentráció (c és d) hatását mutatják a HTLV2 (a és c) és HTLV-3 (b és d) proteázok aktivitására. A HTLV-2 és HTLV-3 PR vizsgálatához HTLV-2 PR/P1 és HTLV-3 TF1/PR hasítóhelyeket reprezentáló oligopeptid szubsztrátokat használtunk. Minden esetben a legmagasabb aktivitást tekintettük 100%-nak. Az ábrák a kapott adatok átlagát mutatják be, a szórások a két mért érték közötti különbséget reprezentálják (SD, n=2).

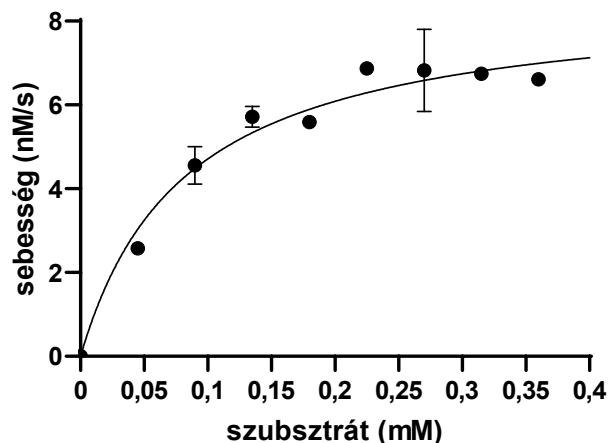
Az enzimek pH-függését a 4,5-8,0 közötti tartományban vizsgáltuk. A HTLV-1 (pH  $6,11 \pm 0,03$ ) és a HTLV-2 PR (pH  $6,14 \pm 0,06$ ) pH optimuma közel azonos volt, míg a HTLV-3 PR pH-optimuma alacsonyabbnak adódott (pH  $5,56 \pm 0,04$ ) (**15. ábra**). Az eredményeink azt mutatják, hogy a HTLV-1 PR pH-optimuma kissé magasabb, mint a korábban Ha és mtsai. által meghatározott (pH 5,2–5,3) érték (156). A HTLV proteázok pH-optimuma hasonló a többi retrovirális proteázra jellemző enyhén savas értékhez, pl. a HIV-1 PR (pH 4,0–6,0) (151), a BLV PR (pH 4,0–6,5) (153), a HFV PR (pH 6,6) (152), vagy az ASPRV1 PR ( $6,27 \pm 0,02$ ) (155) esetében kapott értékhez.



**15. ábra. A HTLV proteázok pH-optimumának meghatározása.** A HTLV-1, HTLV-2 és HTLV-3 PR vizsgálatához HTLV-1 PR/P1, HTLV-2 PR/P1 és HTLV-3 TF1/PR hasítóhelyeket reprezentáló oligopeptid szubsztrátokat használtunk. Minden esetben a legmagasabb aktivitást tekintettük 100%-nak. Az ábrák a kapott adatok átlagát mutatják be, a szórások a két mért érték közötti különbséget reprezentálják (SD, n=2).

### 6.1.3. A katalitikus tulajdonságok összehasonlítása

A HTLV proteázok katalitikus hatékonyságának meghatározásához az egyes HTLV proteázok autoproteolitikus hasítóhelyeit (MA/CA, CA/NC, TF1/PR, PR/P1) reprezentáló oligopeptideket használtunk (**16. ábra**) (**2. táblázat**). A HTLV-1 PR/P1 hasítási hely az irodalomban korábban PR/P3 (53) és PR/Px (62) néven is szerepelt. A mérésekhez az legoptimálisabb helyett a korábban a HTLV-1 proteáz számára optimális kondíciókat (62, 149) alkalmaztuk (0,25 M  $K_3PO_4$ , 2 M NaCl, 5 v/v % glicerol, 5 mM DTT, pH 5,6, 0,5-4 óra, 37 °C), az enzimreakciókhoz a kinetikai paraméterek jobb összehasonlíthatósága érdekében.

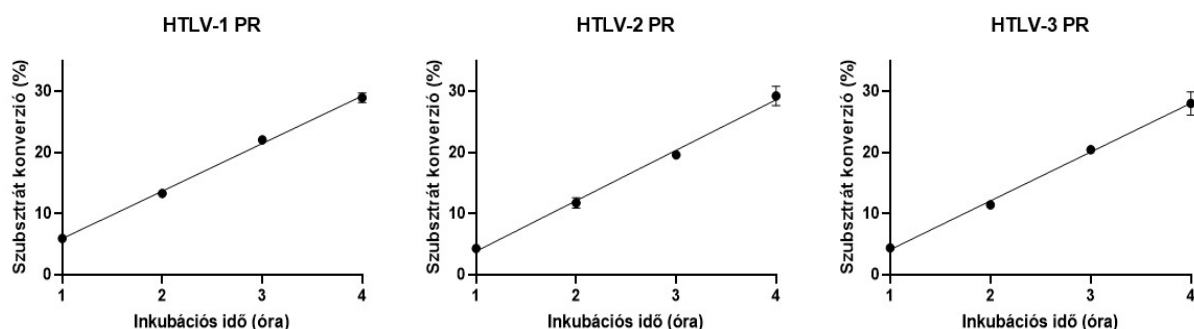


**16. ábra** A HTLV proteázok enzimkinetikai paramétereinek meghatározását bemutató reprezentatív ábra. A bemutatott kísérletben a HTLV-3 PR aktivitásának vizsgálatához a HTLV-3 TF1/PR hasítóhelyet reprezentáló oligopeptid szubsztrátot használtuk (0,25 M  $K_3PO_4$ , 2 M NaCl, 5 v/v % glicerol, 5 mM DTT, pH 5,6, 1 óra, 37 °C). Az ábra a mért értékek átlagát mutatja be, a szórások a két mért érték közötti különbséget reprezentálják (SD, n=2).

**2. táblázat.** A HTLV proteázok katalitikus hatékonysága természetes HTLV hasítóhelyeket reprezentáló oligopeptid szubsztrátok alkalmazásánál. A szekvenciákban a hasítóhelyet csillag jelöli. Rövidítések: MA (mátrix), CA (kapszid), NC (nukleokapszid), TF (*transzframe*). <sup>1</sup> A HTLV-1 szubsztrátok vizsgálata HTLV-1 PR-zal irodalmi adat (53).

Szubsztrát	Szekvencia	$k_{cat}/K_M [mM^{-1}s^{-1}]$		
		HTLV-1 PR	HTLV-2 PR	HTLV-3 PR
HTLV-1 MA/CA	APQVL*PVMHP	85,2 ± 26,1 <sup>1</sup>	5,5 ± 1,0	32,5 ± 6,7
HTLV-1 CA/NC	KTKVL*VVQPK	150,6 ± 15,1 <sup>1</sup>	67,2 ± 33,4	30,1 ± 15,4
HTLV-1 TF1/PR	DPASIL*PVIIP	3,8 ± 0,6 <sup>1</sup>	0,4 ± 0,1	1,2 ± 0,4
HTLV-1 PR/P1	KGPPVIL*PIQAP	288,3 ± 73,6 <sup>1</sup>	20,6 ± 2,8	238,4 ± 60,1
HTLV-2 MA/CA	TTQCF*PILHP	14,4 ± 4,3	4,3 ± 0,5	37,8 ± 20,2
HTLV-2 TF1/PR	SPRTIL*PLIP	4,9 ± 1,1	132,5 ± 42,5	5,0 ± 1,1
HTLV-2 PR/P1	PHQLL*PIATP	10,7 ± 4,8	92,2 ± 41,4	7,5 ± 2,7
HTLV-3 MA/CA	ASQCL*PILHP	40,9 ± 10,4	2,6 ± 0,4	19,7 ± 4,4
HTLV-3 CA/NC	KNKIL*MIQPK	nem hasadt	1,4 ± 0,2	0,8 ± 0,3
HTLV-3 TF1/PR	PRTIL*PVIPL	109,8 ± 29,3	11,8 ± 2,0	11,8 ± 2,0
HTLV-3 PR/P1	PSKVL*PVLAP	7,0 ± 2,6	2,1 ± 0,3	22,6 ± 5,8

Bizonyos mérések hosszabb inkubációs időt igényeltek, ami nem járt együtt az enzim aktivitásának csökkenésével vagy inaktivációjával. A HTLV-1, HTLV-2 és HTLV-3 PR stabilitását HTLV-3 PR/P1 szubsztráton ellenőriztük az idő függvényében (1-4 óra) (17. ábra).



**17. ábra. A HTLV proteázok stabilitásának vizsgálata az idő függvényében.** Az ábrák a kapott adatok átlagát mutatják be, a szórások a két mért érték közötti különbséget reprezentálják (SD, n=2).

A HTLV-1 PR a vizsgált szubsztrátok közül a HTLV-1 PR hasítóhelyeket reprezentáló szubsztrátokon mutatta a legmagasabb  $k_{cat}/K_M$  értékeket (53). A HTLV-2 és HTLV-3 PR hasítóhelyek alkalmazása során alacsonyabb értékeket figyeltünk meg. A HTLV-3 CA/NC kivételével minden szubsztrátot képes volt elhasítani a proteáz, ugyanezt a peptidet a HTLV-2 és a HTLV-3 PR is alacsony hatékonysággal hasította. A HTLV-1 PR enzimreakciók során a legalacsonyabb  $k_{cat}/K_M$  értéket a HTLV-1 TF1/PR hasítóhelyen figyeltük meg, amelyet a HTLV-2 és HTLV-3 PR is hasonló hatékonysággal hasított.

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

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

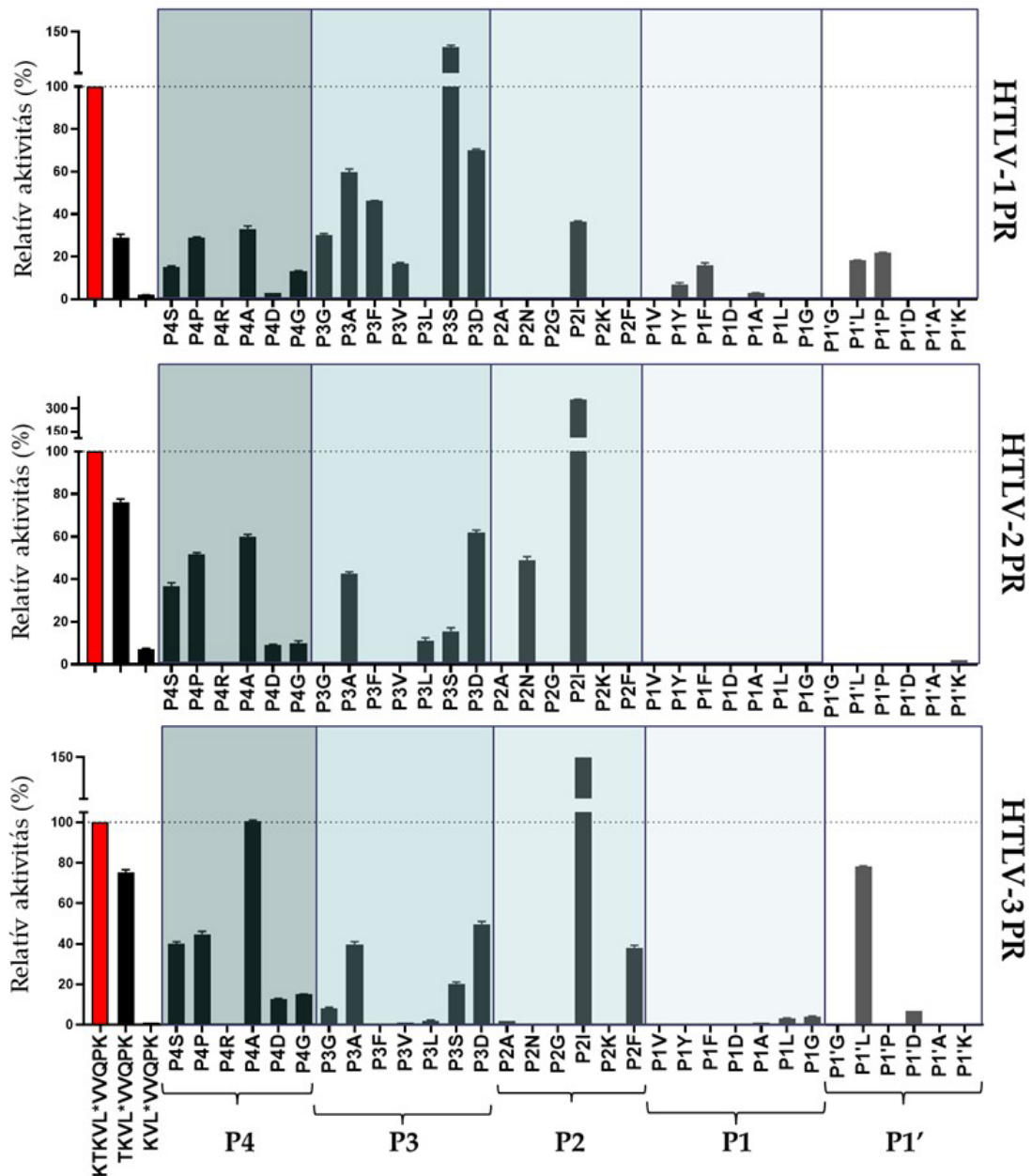
Vizsgáltuk az enzimek aktivitását HIV-1, EIAV, RSV, MMTV, MPMV, BLV, és MuLV PR hasítóhelyeket reprezentáló szubsztrátokon is (**3. táblázat**). Habár a HTLV-1 PR képes volt hasítani bizonyos szubsztrátokat (62), a HTLV-2 és a HTLV-3 PR a vizsgált oligopeptidek egyikénél sem mutatott katalitikus aktivitást (**3. táblázat**), ami azt jelzi, hogy a HTLV-1 PR, a HTLV-2 és a HTLV-3 PR-hoz képest szélesebb specificitással rendelkezik. Egyes vizsgált peptidek gátolták a HTLV-1 vagy a HIV-1 PR-t 0,1 mM-nál nagyobb koncentrációk alkalmazásánál, ennél fogva elképzelhető, hogy egyes szubsztrátoknak hasonló hatása lehet a HTLV-2 és a HTLV-3 PR-ra is.

**3. táblázat. A HTLV proteázok katalitikus hatékonysága különböző retrovirális proteáz hasítóhelyeket reprezentáló oligopeptid szubsztrátok alkalmazásánál.** A szekvenciákban a hasítóhelyet csillag jelöli. Rövidítések: MA (mátrix), CA (kapszid), NC (nukleokapszid), TF (*transframe*), RT (reverz-transzkriptáz), IN (integráz). Azokat a méréseket, ahol nem történt hasítás, n.h. rövidítéssel jelöltük. <sup>1</sup> A HIV-1 és HTLV-1 proteázra vonatkozó értékek irodalmi adatok (62). Az oligopeptideken található oldékonyságot növelő, de nem hasítóhelyet alkotó aminosavakat aláhúzással jelöltük. Az RSV P3/NC szubsztrát koncentrációjának az emelése, a HTLV-1 PR aktivitásának a csökkenését okozta (62).

Szubsztrát	Szekvencia	$k_{cat}/K_M$ ( $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ )			
		HIV-1 <sup>1</sup>	HTLV-1 <sup>1</sup>	HTLV-2	HTLV-3
HIV-1 MA/CA	VSQNY*PIVQ	45,3	n.h.	n.h.	n.h.
HIV-1 CA/P2	KARVL*AEAMS	90	n.h.	n.h.	n.h.
HIV-1 P2/NC	TATIM*MQRGN	74	n.h.	n.h.	n.h.
HIV-1 NC/P1	ERQAN*FLGKI	1	n.h.	n.h.	n.h.
HIV-1 TF/PR	VSFNF*PQITL	6,9	n.h.	n.h.	n.h.
HIV-1 PR/RT	CTLNF*PISP	24,1	n.h.	n.h.	n.h.
EIAV MA/CA	PSEEEY*PIMID	15,2	0,7	n.h.	n.h.
EIAV PR/RT	AKLVL*AQLSK	13,4	n.h.	n.h.	n.h.
EIAV RT/RH	KEEIM*LAYQG	18,3	<0,01	n.h.	n.h.
RSV P2B/P10	PPYVG*SGLYP	n.h.	n.h.	n.h.	n.h.
RSV P10/CA	PVVAM*PVVIK	n.h.	0,1	n.h.	n.h.
RSV CA/P3	IAAAM*SSAIQ	n.h.	n.h.	n.h.	n.h.
RSV P3/NC	IQPLIM*AVVNR	318	>100	n.h.	n.h.
RSV NC/PR	PPAVS*LAMTM	0,13	n.h.	n.h.	n.h.
RSV PR/RT	RATVL*TVALH	1,9	0,3	n.h.	n.h.
RSV RT/IN	TFQAY*PLREA	0,18	n.h.	n.h.	n.h.
MMTV		6,9	n.h.	n.h.	n.h.
MMTV	DSKAF*LADTW	7,5	n.h.	n.h.	n.h.
MMTV P3/P8	DELIL*PVKRK	1,5	2,6	n.h.	n.h.
MMTV P8/N	PPVGFAG*AMA	<0,01	n.h.	n.h.	n.h.
MMTV N/CA		0,9	0,01	n.h.	n.h.
MPMV P12/CA	PKDIF*PVTET	0,2	0,2	n.h.	n.h.
BLV MA/CA	PPAIL*PIISE	0,3	164,5	n.h.	n.h.
BLV CA/NC	KQPAIL*VHTPG	n.h.	n.h.	n.h.	n.h.
BLV PR/P13	PPMVG*VLDAP	0,04	0,7	n.h.	n.h.
MuLV MA/P12	PRSSLY*PALTP	0,2	n.h.	n.h.	n.h.
MuLV P12/CA	TSQAF*PLRAG	8,7	n.h.	n.h.	n.h.
MuLV NC/PR	TQTSLL*TLDDQ	n.h.	n.h.	n.h.	n.h.
MuLV RT/IN	TSTLL*IENSS	n.h.	n.h.	n.h.	n.h.

### 6.1.4. Aminosav preferenciák vizsgálata

A HTLV proteázok aminosav preferenciáinak meghatározásához vad típusú HTLV-1 CA/NC (KTKVL\*VVQPK), az eredeti P5-P5'-től N-terminálisan rövidített P4-P5', P3-P5', valamint teljes hosszúságú, P4, P3, P2, P1 vagy P1' pozícióban módosított oligopeptid szubsztrátokat alkalmaztunk (18. ábra).



**18. ábra.** A HTLV-1, HTLV-2 és HTLV-3 PR P4-P1' aminosav preferenciáinak vizsgálata. A relatív aktivitások meghatározásához HTLV-1 CA/NC oligopeptid szubsztrát analógokat alkalmaztunk. A 10, 9 és 8 tagszámú szubsztrátok vizsgálatának eredményét is itt tüntettük fel. A vad típusú KTKVL\*VVQPK szubsztráton mért relatív aktivitás értékeket tekintettük 100%-nak. Csak az 1%-nál nagyobb relatív aktivitás értékeket ábrázoltuk. Az ábrák a kapott adatok átlagát mutatják be, a szórások a két mért érték közötti különbséget reprezentálják (SD, n=2).

A vad típusú szubsztráthoz (KTKVL\*VVQPK) képest a P4-P5' rövidített szubsztrátokon mindhárom HTLV proteáz alacsonyabb aktivitást mutatott. A legrövidebb P3-P5' szubsztrátot nem, vagy csak elhanyagolható mértékben hasították (**18. ábra**). A meghatározott relatív aktivitás adatok összhangban vannak a korábban a HTLV-1 proteáznál tapasztalt alacsonyabb katalitikus konstansokkal (144). A rövidített szubsztrátok alkalmazása során szintén alacsonyabb értékek voltak megfigyelhetőek, bizonyítva az S4 és S5 szubsztrát felismerő helyek jelentőségét a HTLV-2 és HTLV-3 PR esetében is.

A P4 pozíció mutációit mindhárom proteáz jól tolerálta. A kapott eredmények összhangban vannak azzal a megállapítással, hogy a HTLV-1 PR egy viszonylag nagy, hidrofób S4 szubsztrátkötő zsebbel rendelkezik (60-62). A P4 variánsok monitorozása során azt tapasztaltuk, hogy a HTLV proteázok hasonló aminosavakat preferálnak. A legalacsonyabb relatív aktivitást a P4-Gly és a P4-Asp szubsztrátoknál figyeltük meg, míg a P4-Arg variánst egyik enzim sem hasította (**18. ábra**).

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

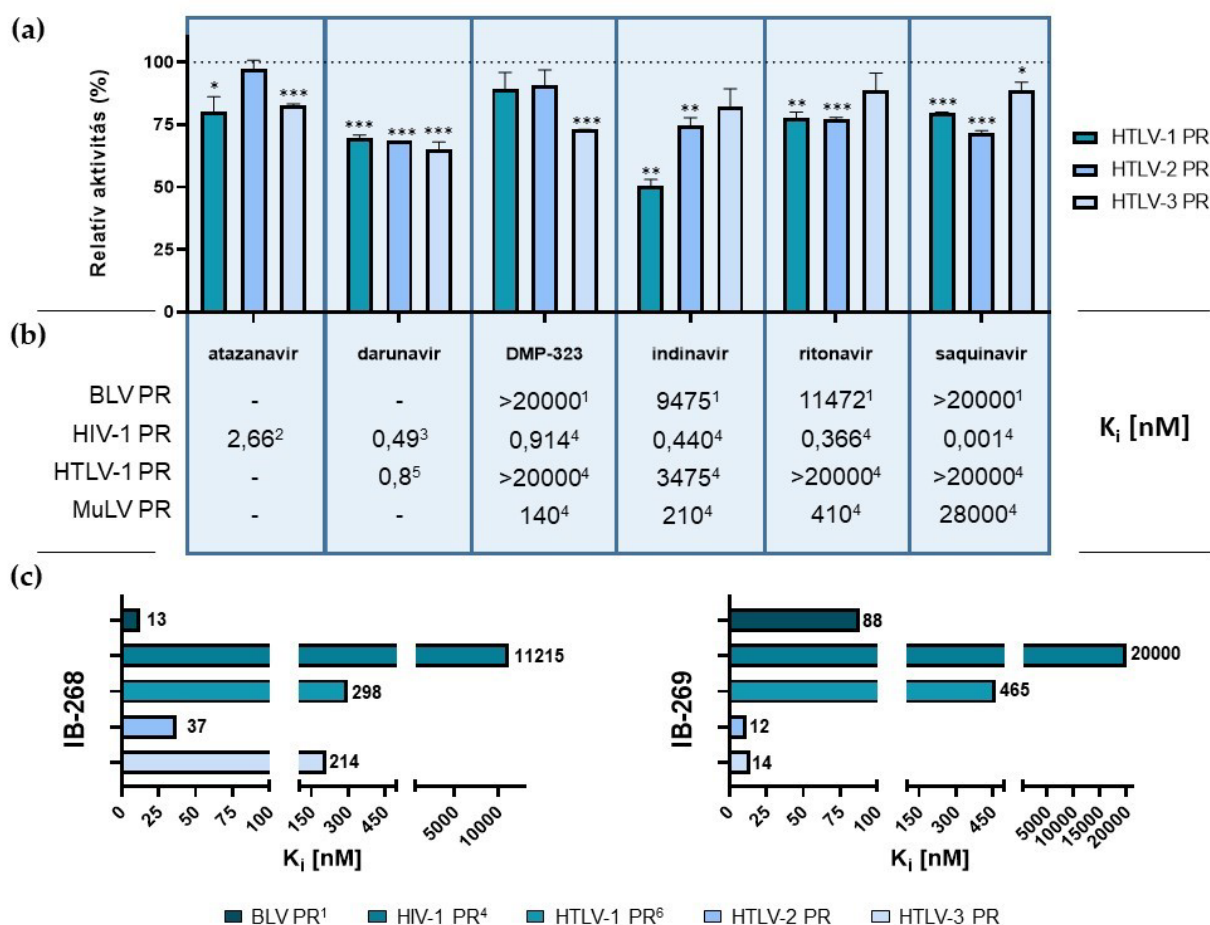
A P2 variánsok közül mindhárom proteáz a P2-Ile mutánst preferálta leginkább, a HTLV-2 és HTLV-3 PR esetében a vad típusú szubsztrátnál is magasabb relatív aktivitás értéket mutatva. Hasonlóan egy korábbi P2 mutánsok monitorozásával foglalkozó tanulmányhoz (144) mi is azt tapasztaltuk, hogy az S2 zsebben az izoleucin a leginkább elfogadott oldallánc, míg a P2-Asn és a P2-Lys nem elfogadható a HTLV1 PR számára. A P2-Asn a HTLV-2 PR viszonylag jó szubsztrátja, bár a szubsztrátkötő zseb összetétele ezt nem indokolja.

A P1 pozícióban a P1-Tyr és P1-Phe mutánsokat csak a HTLV-1 PR tolerálta. Ezeket a variánsokat korábban jó szubsztrátnak találták (144). A HTLV-3 nem hasította a P1-Ala mutánst, a P1-Leu és a P1-Gly variánsokat kis hatékonysággal processzálta, míg a HTLV-2 egyik szubsztrát variánst sem hasította legalább 1%-os hatékonysággal (**18. ábra**).

A korábbi eredményekkel összhangban a HTLV-1 PR-zal végzett kísérleteink során mi sem tapasztaltuk a P1'-Ala, -Gly vagy -Lys szubsztrát variáns hasítását (141), valamint a HTLV-2 és HTLV-3 PR-oknak is rossz szubsztrátjai voltak a P1'-Leu kivételével a HTLV-3 PR esetében (**18. ábra**).

### 6.1.5. Gátlásvizsgálatok

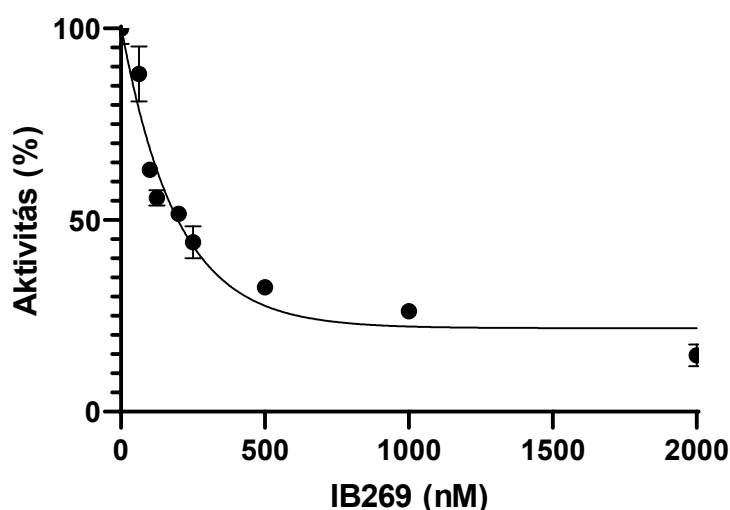
A HTLV-2 és HTLV-3 PR gátlhatóságát több, a HIV-1 elleni terápiában használt inhibitorral (atazanavir, darunavir, indinavir, ritonavir és saquinavir), valamint a DMP-323-mal vizsgáltuk, amely szintén egy hatékony HIV-1 PR inhibitor. Az inhibitorokat 1  $\mu$ M-os végkoncentrációban alkalmaztuk és enyhe gátlóhatást fejtettek ki, ami minden esetben kevesebb volt, mint 50% (19. ábra).



**19. ábra.** A HTLV-1, a HTLV-2 és a HTLV-3 PR gátlása különböző inhibitorokkal. (a) HIV-1 proteáz inhibitorok (1  $\mu$ M végkoncentráció) hatása a relatív aktivitásra. A kontroll reakciók DMSO-t tartalmaztak, az itt kapott értékeket tekintettük 100%-nak. Az ábrák a kapott adatok átlagát mutatják be, a szórások a két mért érték közötti különbséget reprezentálják (SD, n=2). (b) Az inhibitorok relatív hatékonyságának összehasonlításához feltüntettük az ábrán a BLV, HIV-1, HTLV-1 és MuLV PR gátlására az irodalomban elérhető K<sub>i</sub> értékeket: <sup>1</sup> (63), <sup>2</sup> (157), <sup>3</sup> (158), <sup>4</sup> (75), <sup>5</sup> (80). Az értékek összehasonlíthatóságának garantálása érdekében minden bemutatott adat Edans/Dabcyl fluoreszcens oligopeptid szubsztráttal végzett kísérleteken alapul (0,25 M K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 2 M NaCl, 5 v/v % glicerol, 5 mM DTT, pH 5,6, 1 óra, 37 °C). (c) Az IB-268 és IB-269 inhibitorokra a BLV (63), HIV-1 (75), HTLV-1 (53), HTLV-2 és a HTLV-3 proteázok esetében meghatározott K<sub>i</sub> értékek összehasonlítása.

A kapott adatok összhangban vannak a korábban a BLV, a HTLV és az MuLV proteázokra meghatározott  $K_i$  értékekkel, amelyekre szintén alacsony gátolhatóságot mutattak ki (19. ábra). A legnagyobb gátló hatást a darunavir fejtette ki (25-30%) a három HTLV PR gátlási vizsgálata során. Ezzel szemben az indinavir csak a HTLV-1 PR-ra fejtett ki jelentősebb gátló hatást.

A HIV-1 PR gátlószerek mellett végeztünk kísérleteket kettő kísérleti HTLV-1 PR inhibitorral is (IB-268, IB-269) (20. ábra). A  $K_i$  értékeket a HTLV-1 PR-ra korábban már meghatározták, ami az IB-268 esetén 298 nM, az IB-269-nél 465 nM volt (62), viszont a HIV-1 PR ellenében nem bizonyult hatékonynak (75). Az IB-268 a HTLV-2 PR-ra kapott inhibíciós állandó a HTLV-1 PR-nál megállapítottak közel tizede, míg a HTLV-3 PR a HTLV-1 PR-hoz hasonló értéket mutatott. Az IB-269-nél a HTLV-2 és HTLV-3 proteázok aktivitása hasonló mértékben gátlódott, jelentősen hatékonyabban, mint a HTLV-1 PR.



**20. ábra.** A gátlásvizsgálatokat bemutató reprezentatív ábra. A gátlási állandó meghatározása során az IB-269 inhibitor hatását vizsgáltuk a HTLV-2 PR aktivitására, szubsztrátként a HTLV-2 TF1/PR hasítóhelyet reprezentáló oligopeptid szubsztrátot használtuk. Az ábra a mért értékek átlagát mutatja be, a szórások a két mért érték közötti különbséget reprezentálják (SD, n=2).

#### 6.1.6. Szekvencia analízis és szubsztrátkötő helyek vizsgálata

A HTLV proteázok szekvenciája jelentős eltéréseket mutat, a szekvenciák közötti azonosság kis mértékű. A HTLV-1 proteázzal a HTLV-2 PR 50%-ban, a HTLV-3 49%-ban egyezik. Utóbbi kettő 57%-os azonosságot mutat, viszont a szubsztrátkötésért felelős régiókban magasabb fokú a konzerváltság (HTLV-1/HTLV-2 PR: 82%, HTLV-1/HTLV-3 PR: 56%, HTLV-2/HTLV-3 PR: 76%). A szubsztrátkötő zsebek tekintetében az S4 alhelyen a

legnagyobb a variabilitás, ahol a HTLV1 és a HTLV-2 proteázok között 57% az azonosság, a HTLV-3 PR esetében szintén 57%, míg a HTLV-2 és HTLV-3 PR között csupán 43%. Az S1 alhelyhez közeledve magasabb fokú a konzerváltság. A HTLV-2 és HTLV-3 PR S3 zsebének összetétele megegyezik, a HTLV-1 tőlük egy aminosavban tér el. A HTLV-1 és HTLV-3 PR S2 zsebe csak a 37-es pozícióban tér el egymástól, a HTLV-1/HTLV-2 és a HTLV-2/HTLV-3 proteázok között is csupán 2 aminosavban van eltérés. A HTLV-2 és HTLV-3 PR S1 zsebe azonos összetételű, a HTLV-1 PR a 10-es pozícióban tér el a többi HTLV proteázétól. Az S4-S1 szubsztrátkötő zsebek összetételét a HTLV-1 PR esetében kutatócsoportunk tagjai korábban már meghatározták (60-61), munkánk során a HTLV-2 és HTLV-3 proteázok szubsztrátkötő zsebeinek összetételét a szekvenciák összehasonlítása (21. ábra) alapján határoztuk meg (4. táblázat).

	1	10	20	30	40	50	
<b>HIV-1</b>	PQITLW--QRPLVTIKIG-----GQLKEALLDTGADDTVLE-EMN-LPGRWKPKMIGGIGGF						
<b>HTLV1</b>	PVIPLDPARRPVIIKAQVDTQTSHPKTIEALLDTGADMTVLPIALFSSNTPLNKNTSVLGAGGQ						
<b>HTLV2</b>	PLIPLRQQQQPILGVRI SVMGQT PQPTQALLDTGADLTVIPQTLVPGVPVKLHDTLIILGASGQ						
<b>HTLV3</b>	PLIPLSQRRQPILHVQVSFSNTSPVGVQALLDTGADITVLPAYLCPDPSNLQDTTVLGAGGP						
	*:***	::*::	....	*	:*****:*:*	* .	*:* :***.*
		60	70	80	90		
<b>HIV-1</b>	I-K-VRQY-DQILIEIC-G-HKAIG-TVLVG-PTPVNIIGRNLLTQIGCTLNF-----						
<b>HTLV1</b>	TQDHF <sup>63</sup> KL <sup>70</sup> TS <sup>80</sup> LPV <sup>90</sup> LIRL <sup>100</sup> PF <sup>110</sup> RT <sup>120</sup> TP <sup>125</sup> IVLT <sup>130</sup> SCLVDTKNNWAIIGRDALQQCGVLYLPEAKGPPVIL						
<b>HTLV2</b>	TNTQ <sup>63</sup> FKLL <sup>70</sup> QT <sup>80</sup> PLHI <sup>90</sup> FL <sup>100</sup> PF <sup>110</sup> RR <sup>120</sup> SP <sup>125</sup> VILSCLLDTHNKWTIIGRDALQQCGLLYL <sup>130</sup> PDDPSPHQLL						
<b>HTLV3</b>	STSK <sup>63</sup> FKIL <sup>70</sup> PR <sup>80</sup> PVHI <sup>90</sup> HL <sup>100</sup> PF <sup>110</sup> RK <sup>120</sup> Q <sup>125</sup> PVTLT <sup>130</sup> SCLIDTNDQWTIIGRDALQQCSSLYLADQPS--SVL						
	:	:**:	*: * ****	*: *:**:**::**:**:*****.	***.: .	:	.*

**21. ábra. A HIV-1 és a HTLV proteázok szekvencia illesztése.** A HIV-1 és HTLV-1 proteáz szerkezet-alapú szekvenciaillesztését már egy korábbi tanulmányban tárgyalták (159). A konszenzus aktív hely motívumokat aláhúzással jelöltük. A szekvencia számozását a HIV-1 és a HTLV-1 PR-oknál külön jelöltük. Az aminosav oldallánc hasonlóságot (., :) és az azonosságot (\*) is jelöltük. A szekvenciában az azonos aminosavakat félkövér betűtípus jelzi.

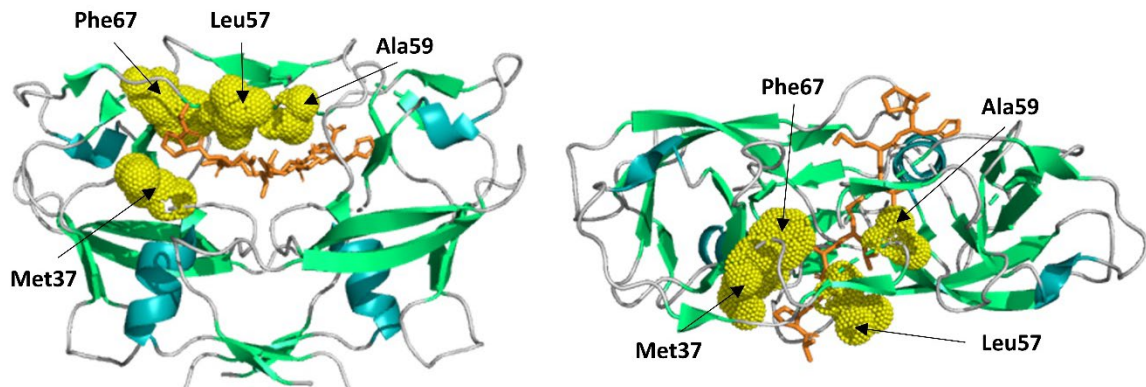
**4. táblázat. A HIV-1 és HTLV-proteázok S4-S1 szubsztrátkötő zsebeinek aminosav összetétele.** A HTLV proteázoknál az ekvivalens pozícióban lévő, de különböző oldalláncokat félkövér betűtípussal és aláhúzással jelöltük. #A HIV-1 és HTLV-1 PR esetében a szubsztrátkötő zsebek összetételét kutatócsoportunk munkatársai korábbi vizsgálatok során határozták meg (60-61).

S4				S3				S2				S1			
HIV-1#	HTLV-1#	HTLV-2	HTLV-3	HIV-1#	HTLV-1#	HTLV-2	HTLV-3	HIV-1#	HTLV-1#	HTLV-2	HTLV-3	HIV-1#	HTLV-1#	HTLV-2	HTLV-3
D30	<u>M37</u>	<u>L37</u>	<u>I37</u>	R8	<u>R10</u>	<u>Q10</u>	<u>Q10</u>	A28	A35	A35	A35	R8	<u>R10</u>	<u>Q10</u>	<u>Q10</u>
M46	<u>S55</u>	<u>L55</u>	<u>T55</u>	D29	D36	D36	D36	D30	<u>M37</u>	<u>L37</u>	<u>I37</u>	L23	L30	L30	L30
I47	<u>V56</u>	<u>I56</u>	<u>V56</u>	G48	L57	L57	L57	V32	V39	V39	V39	D25	D32	D32	D32
G48	L57	L57	L57					I47	<u>V56</u>	<u>I56</u>	<u>V56</u>	G27	G34	G34	G34
V56	F67	F67	F67					G48	L57	L57	L57	G49	G58	G58	G58
Q58	<u>L69</u>	<u>L69</u>	<u>I69</u>					G49	G58	G58	G58	I50	A59	A59	A59
L76	L91	L91	L91					I50	A59	A59	A59	T80	-	-	-
								L76	L91	L91	L91	P81	-	-	-
								I84	I100	I100	I100	V82	W98	W98	W98
												I84	I100	I100	I100

#### 6.1.7. Az autoproteázáló képesség vizsgálata

A HTLV-1 PR esetében már tanulmányozott mutációkat (62) alkalmaztuk a HTLV-2 és HTLV-3 PR autoproteolízisének vizsgálatához is. A HIV-1 és a HTLV proteázok között kisebb fokú a szekvenciák közötti azonosság, mint a HTLV-1, -2 és -3 proteázok között. A mutagenézis során a HTLV proteázok aminosavait olyan aminosavakra cseréltük, melyek az adott pozícióban a HIV-1 proteázban található aminosavnak felelnek meg. A mutációk célja annak vizsgálata volt, hogy a HTLV proteázok milyen mértékben érzékenyek a lebenyeket (57. és 59. pozíciók) és az aktív centrumot (37. és 67. pozíciók) érintő mutációkra (**22. ábra**). A módosított aminosavak mindegyike részt vesz valamely szubsztrátkötő zseb felépítésében (**4. táblázat**). A 37. pozícióban lévő aminosav maradék az S2 és S4 zsebek, míg a 57. pozícióban lévő az S2-S4 zsebek részét képezi, az 59. és 67. pozíciókban található pedig az S1-S2, valamint a S4 zsebek felépítésében vesznek részt. A L57 konzervált a HTLV PR-ok között, a HIV-1 PR-ban ezzel megfeleltetett pozíció (E48) mutációja leucinra felelős az indinavir és a saquinavir elleni toleranciáért (160). HTLV-1 PR-nál az L57G mutáns nem mutatott aktivitást a HTLV-1 CA/NC szubsztráton (62). A HIV-1 és HIV-2 PR I50 oldalánca feltételezhetően szerepet játszik a lebeny régió mobilitásában, a HTLV-1 PR esetében az ennek megfeleltethető

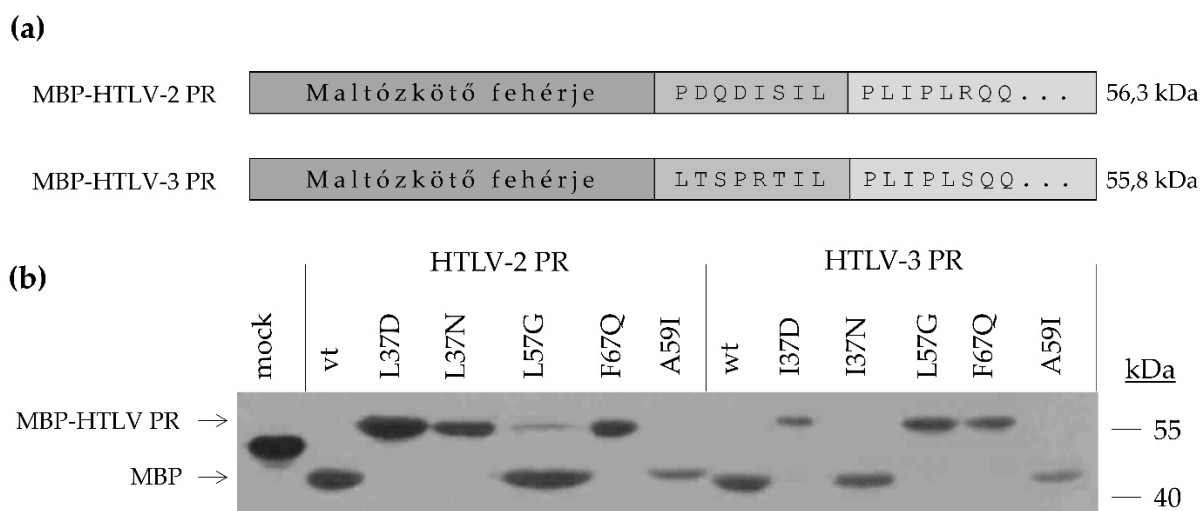
pozícióban az A59I mutáció az enzim inaktiválódását okozta (62). Az F67 az S4 zseb része, az enzim nem tolerálja ebben a pozícióban a glutaminra történő cserét (F67Q mutáció) (62).



**22. ábra. A HTLV-1 PR szerkezete.** A HTLV-1 PR szerkezete statin-tartalmú peptid inhibitorral komplexben oldal és felülnézetből (PDB ID: 3LIY) (57). Az inhibitor narancssárga színnel, a mutált aminosav oldalláncok felszínét (37., 57., 59. és 67. pozíció) térkitöltő ábrázolás jelöli.

A HTLV-2 és HTLV-3 PR autoproteolízis vizsgálatához az enzimeket fúziós fehérjeként expresszáltuk, ami az N-terminálisán egy MBP-t és egy 8 aminosav hosszúságú linker szekvenciát tartalmazott. Ez a szakasz megfelel a Gag-Pro poliproteinben a proteázt N-terminális irányban megelőző, az autoproteolitikus hasítóhelyet tartalmazó szakasznak (**23. ábra**), mely lehetővé teszi a proteáznak a fúziós fehérjéből való processzáldást. A folyamatot Western-blot technikával vizsgáltuk (**23. ábra**) és a hasítási hatékonyságokat összehasonlítottuk a korábban HTLV-1 PR-nál megfigyelttel (**5. táblázat**).

A proteázok hasonlóan reagáltak a mutációkra, különbségek a 37-es és 57-es pozícióban eltérő konstrukciók esetében mutatkoztak. A 37-es helyen található aminosav aszparginra cserélése megakadályozta a processzáldást az MBP-HTLV-1 és MBP-HTLV-2 PR esetében, viszont az MBP-HTLV-3 PR-nál nem okozott változást. Az L57G mutáció hatását a HTLV-1 PR aktivitására korábban már vizsgálták HTLV-1 CA/NC szubsztráton, az autoprocesszáldást külön nem tanulmányozták (62). Az MBP-HTLV-3 PR szintén érzékenyen reagált a mutációra ebben a pozícióban, az MBP-HTLV-2 PR-ra kihatására viszont nem volt hatással.



**23. ábra. Az MBP-HTLV-2 és MBP-HTLV-3 PR fúziós fehérjék sematikus ábrázolása és autoproteolízisük vizsgálata.** (a) A fúziós fehérjék tartalmaznak egy N-terminális MBP jelölést (sötétszürke), amely egy 8 aminosav hosszúságú linker (szürke) szekvenciához kapcsolódik, ami megfelel poliproteinben a proteáz előtt található aminosavaknak, ez végül a proteáz szekvenciájához (világosszürke) kapcsolódik. (b) Reprezentatív Western-blot kép három párhuzamos kísérlet alapján. A vad típusú (vt) és a mutáns enzimek autoproteolízisét Western-blot segítségével tanulmányoztuk. Egy „üres” (mock), csak MBP-t kifejező pMalc2x vektort alkalmaztunk kontrollként. Az üres vektorról transzlálódott MBP nagyobb molekulású, mint a fúziós fehérjéből lehasított MBP, ezt egy, a C-terminálison jelenlévő extenzió okozhatja.

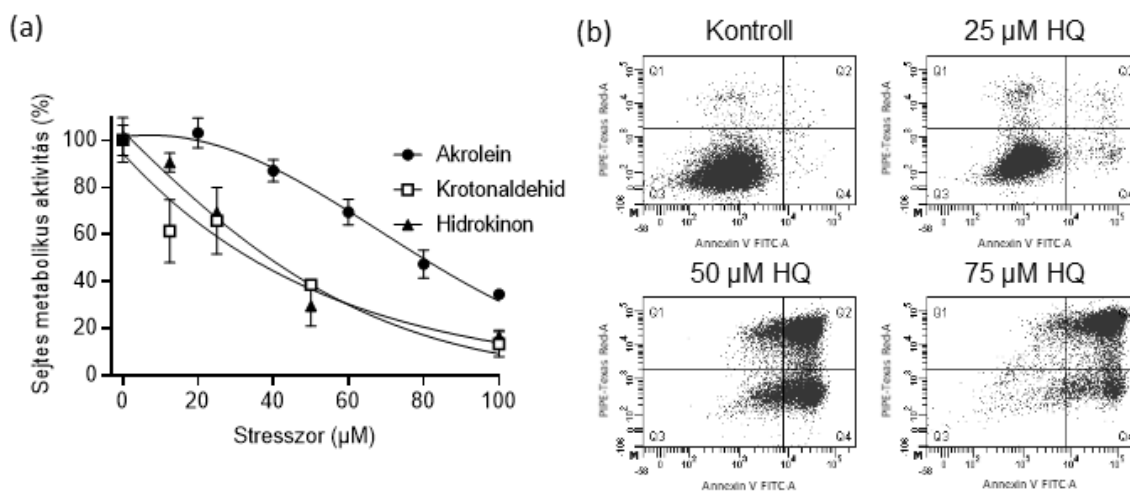
**5. táblázat. Mutációk hatása az MBP-HTLV proteázok autoproteolitikus aktivitásra.** #Az MBP-HTLV-1 PR mutánsokra vonatkozó adatok kutatócsoportunk korábbi vizsgálataiból származnak (62).

Pozíció/Új oldallánc	HTLV PR	Enzim forma	Autoprocesszálás
-	HTLV-1 #	vad típus	igen
	HTLV-2	vad típus	igen
	HTLV-3	vad típus	igen
37 (D)	HTLV-1 #	M37D	nem
	HTLV-2	L37D	nem
	HTLV-3	I37D	nem
37 (N)	HTLV-1 #	M37N	nem
	HTLV-2	L37N	nem
	HTLV-3	I37N	igen
57 (G)	HTLV-1 #	L57G	nincs adat
	HTLV-2	L57G	igen
	HTLV-3	L57G	nem
59 (I)	HTLV-1 #	A59I	nincs adat
	HTLV-2	A59I	igen
	HTLV-3	A59I	igen
67 (Q)	HTLV-1 #	F67Q	nem
	HTLV-2	F67Q	nem
	HTLV-3	F67Q	nem

## 6.2. A hidrokinon és G233E PNLIP mutáció kapcsolatának vizsgálata

### 6.2.1. A cigarettafüst fő komponenseinek hatása a HEK293AD sejtek életképességére

A cigarettafüst fő alkotóelemei hatásának karakterizálása céljából HEK293AD sejteket vizsgáltunk emelkedő koncentrációjú akrolein, krotonaldehid vagy hidrokinon jelenlétében. A sejtek hozzávetőleges életképességét a sejtek metabolikus aktivitásának vizsgálatával határoztuk meg (24. ábra).



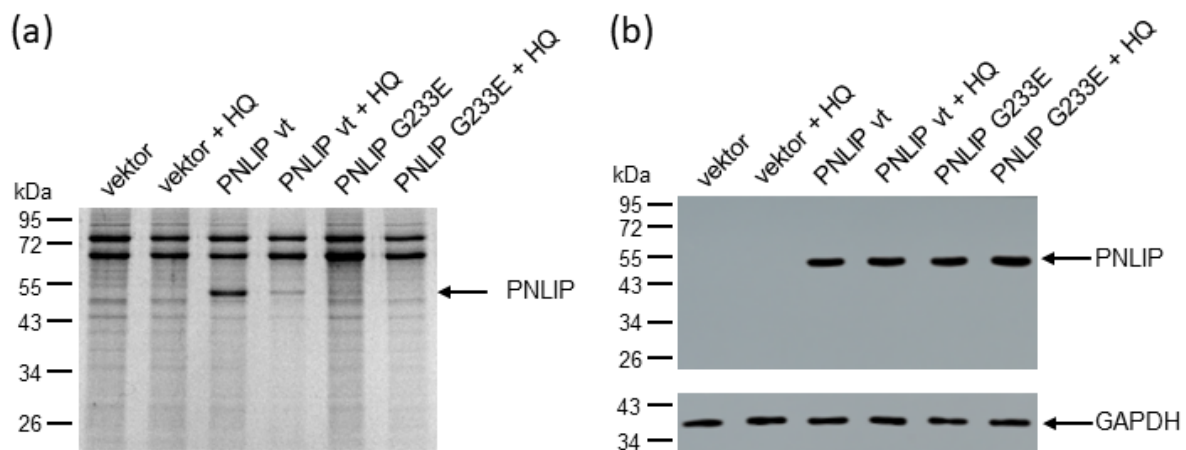
**24. ábra.** A HEK293AD sejtek életképessége a vizsgált füst komponensek jelenlétében. (a) A sejteket akroleinnel, krotonaldehiddel vagy hidrokinonnal (HQ) kezeltük. Az inkubációt (24 óra, 37°C) követően a sejtes metabolikus aktivitást MTT teszttel határoztuk meg az Anyagok és módszerek fejezetben leírtak szerint. A kezetlen sejtekre kapott értékeket tekintettük 100%-nak. Az ábra a kapott adatok átlagát mutatja be szórással (SD, n=3). (b) A sejteket HQ-nal kezeltük (24 óra, 37°C), ezt követően FITC annexin V-vel és propídium-jodiddal festettük meg, végül áramlási citometriával vizsgáltuk az Anyagok és módszerek fejezetben leírtak szerint. Az x tengely a FITC annexin V, az y a propídium-jodid fluoreszenciáját mutatja be a három kísérleten alapuló reprezentatív ábrán.

Az akrolein 20 µM-os koncentráció értékig nem befolyásolta a sejt metabolizmust, viszont magasabb koncentráció értékeknél fokozatosan csökkentette a sejtek életképességét. Ezzel szemben a HQ és a krotonaldehid már alacsony koncentráció alkalmazásánál is jelentős életképesség csökkenést okozott, 100 µM-os koncentráció több, mint 80%-os életképesség csökkenéssel járt együtt. A metabolikus aktivitásra gyakorolt jelentős hatása és a jó tárolhatósága miatt a HQ-t vizsgáltuk részletesebben. Áramlási citometria segítségével vizsgáltuk, hogy a csökkent sejtes metabolikus aktivitás összefüggésbe hozható-e programozott sejthalállal vagy nekrozissal, ehhez FITC annexin V és propídium-jodid festékekkel jelölt sejtek mennyiségét követtük emelkedő HQ koncentráció hatására (24. ábra). 25 µM

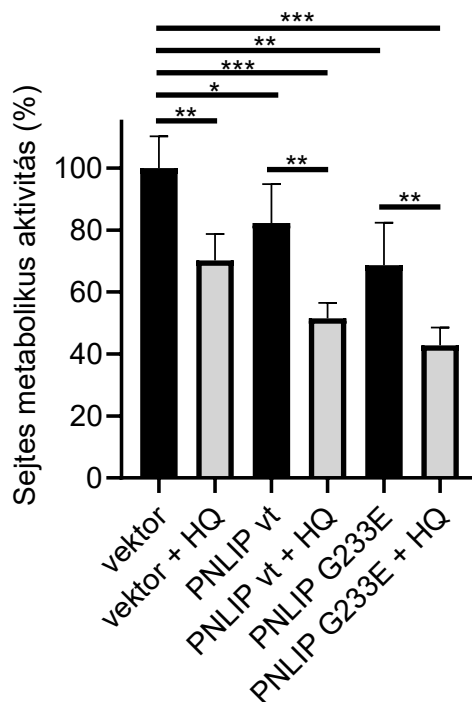
koncentrációjú HQ nem okozott jelentős hatást, viszont a magasabb, 50 és 75  $\mu\text{M}$ -os HQ alkalmazása során programozott sejthalált figyeltünk meg, amit a FITC annexin V festékekkel jelölt sejtek arányának növekedéséből állapítottunk meg, amelyet a propidium-jodiddal festett sejtek mennyiségének növekedése követett.

### 6.2.2. A szekréció vizsgálata, valamint a hidrokinon és a nem megfelelően feltekeredett PNLIP mutánsnak a HEK293AD sejtek életképességére gyakorolt hatása

Korábbi tanulmányok már vizsgálták a G233E mutáns PNLIP szekrécióját. A vad típusú lipázzal ellentétben a nem megfelelően feltekeredő variáns nem szekretálódott HEK293T és AR42J sejtekben (141) (143). A G233E mutáns PNLIP expresszióját HEK293AD sejtekben eddig nem vizsgálták. A szekréció ellenőrzéséhez tranziens transzfekcióval juttattuk be a vad típusú és mutáns lipázt kifejező plazmidokat, begyűjtöttük a kondicionált médiumot, majd SDS-PAGE módszerrel analizáltuk (25. ábra). Az említett sejtvonalakhoz hasonlóan a HEK293AD sejtek is csak a vad típusú PNLIP-t szekretálták, így alkalmasak az általunk végezni kívánt kísérletekhez. A HQ szekrécióra gyakorolt hatását is követtük, 25  $\mu\text{M}$  HQ hozzáadása a sejtekhez csökkentette a vad típusú lipáz szekrécióját, ugyanakkor nem volt hatással az intracelluláris PNLIP szintekre (25. ábra).



**25. ábra. A hidrokinon (HQ) PNLIP szekrécióra gyakorolt hatása HEK293AD sejteken.** A transzfekciót követő napon a sejteket 25  $\mu\text{M}$  HQ-nal kezeltük (24 óra, 37°C). (a) A médiumba szekretálódott PNLIP fehérjét SDS-PAGE módszerrel analizáltuk. (b) A PNLIP és GAPDH fehérjéket a sejtizátumban Western-blot módszerrel detektáltuk. Az ábrákon a vad típusú fehérjét vt rövidítéssel jelöltük.



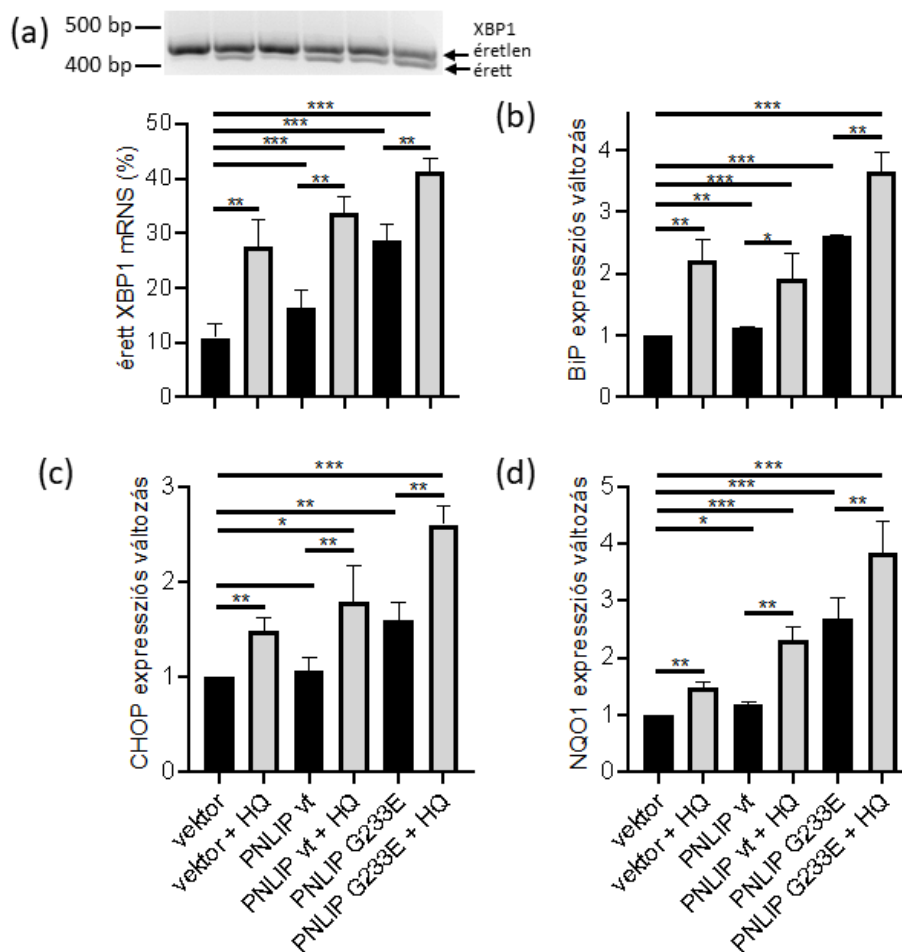
**26. ábra. A hidrokinon (HQ) hatása a vad típusú és mutáns lipázt expresszáló HEK293AD sejtek életképességére.** A transzfekciót követően (24 óra) inkubáltuk a sejteket HQ (0 és 25  $\mu$ M) jelenlétében (24 óra). A sejtes metabolikus aktivitást MTT teszttel határoztuk meg az Anyagok és módszerek részben leírtak szerint. Az üres pcDNA3.1(-) vektorral transzfektált sejtekre kapott értékeket tekintettük 100%-nak, a vad típust vt rövidítéssel jelöltük. Az ábra a kapott adatok átlagát mutatja be szórással (SD, n=3). \*\*P  $\leq$  0,01; \*\*\*P  $\leq$  0,001.

A HQ és a mutáns PNLIP összeadó hatásának vizsgálatához HEK293AD sejteket transzfektáltunk vad típusú és mutáns lipázt kifejező plazmiddal, majd HQ-nal (0, 25  $\mu$ M) inkubáltuk a sejteket (26. ábra). Az alkalmazott HQ koncentráció még nem járt együtt sejthalállal, így alkalmasnak bizonyult a korai sejtes válaszok vizsgálatára. Az üres vektorral transzfektált, HQ-nal nem kezelt sejteket tekintettük kontrollnak. A HQ jelenléte 30%-os metabolikus aktivitás csökkenésért volt felelős. Önmagában a vad típusú PNLIP 18%-kal, míg a mutáns jelentősebb, 31%-kal csökkentette a sejtek életképességét. A HQ és a vad típusú lipáz együttesen 48%, a HQ és a mutáns lipáz 57% csökkenésért volt felelős.

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

Egyes nem-szekretálódó PNLIP variánsok, például az általunk részletesebben tanulmányozott G233E ER stressz-ozó hatását HEK293T és AR42J sejteken már korábban bizonyítottuk (143). A HQ ER stresszre gyakorolt hatását is már több tanulmány is vizsgálta

más emlős sejteken (105) (161). A HQ és a G233E PNLIP mutáció ER stresszre gyakorolt hatásának vizsgálatához HEK293AD sejteket transzfektáltunk (tranzienst) vad típusú és mutáns lipáz tartalmazó plazmidokkal. A sejteket HQ-nal (0 és 25  $\mu$ M) inkubáltuk, majd az XBP-1 érést, illetve további ER stressz markerek, a BiP, a CHOP és az NQO1 mRNS szintjét határoztuk meg (27. ábra). Az üres plazmiddal transzfektált mintákat tekintettük kontrollnak. Az érett XBP-1 mRNS aránya a vad típusú lipáz kifejező sejteknél a kontrollhoz képest csak enyhén emelkedett, 16%-ra. A vad típusúhoz képest a mutánsok esetében közel kétszeres növekedést tapasztaltunk, amely tovább emelkedett HQ jelenlétében, 42%-ra, ami magasabb, mint a HQ önmagában kifejtett hatása (27. ábra).

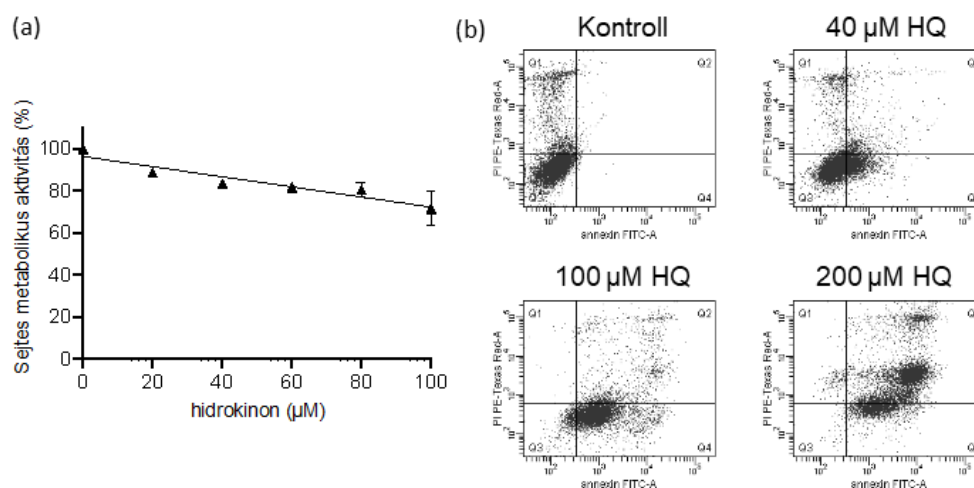


**27. ábra. A hidrokinon (HQ) ER stresszt kiváltó hatása vad típusú és mutáns lipáz expresszáló HEK293AD sejteken.** A transzfekciót követően (24 óra) inkubáltuk a sejteket HQ (0 és 25  $\mu$ M) jelenlétében (24 óra). Az XBP-1 (a), a BiP (b), a CHOP (c) és az NQO1 (d) mRNS szintjét az Anyagok és módszerek részben leírtak szerint vizsgáltuk. A üres pcDNA3.1(-) vektorral transzfektált sejtekre kapott értékeket tekintettük 100%-nak, a vad típust vt rövidítéssel jelöltük. A GAPDH szintjét alkalmaztuk referenciaként az adatok normalizálásához. Az ábra a kapott adatok átlagát mutatja be szórással (SD, n=3). \*P  $\leq$  0,05, \*\*P  $\leq$  0,01; \*\*\*P  $\leq$  0,001

A vad típusú PNLIP expressziója nem okozott változást a BiP mRNS szintjében, ezzel ellentétben a mutáns 2,5x növekedést váltott ki. A HQ 1,9-2,2x növekedést okozott a kontroll és a vad típust kifejező sejtekben. Amennyiben a mutánsokhoz adtunk HQ, a mutánsoknál tapasztaltnál magasabb, 3,6x változást regisztráltunk (27. ábra). A BiP mRNS-hez hasonló módon a CHOP mRNS szint tekintetében sem okozott jelentős változást a vad típusú PNLIP a kontrollhoz képest. A mutáns jelenléte 1,6x mértékben emelte a CHOP szintjét. A kontroll sejtekben a HQ hozzáadása ettől kissé alacsonyabb értékváltozással járt együtt és az előzőekhez hasonlóan a mutáns és a HQ együttes jelenléte okozta a legnagyobb 2,6x növekedést (27. ábra). Az NQO1 mRNS tekintetében sem emelte a vad típusú PNLIP a transzkripciót, a mutáns 1,6x változásért volt felelős. A HQ hozzáadása szintén az mRNS szintek emelkedését okozta, a legmagasabbat a mutánsal együtt történő alkalmazás esetén (2,5x) (27. ábra).

#### 6.2.4. A HQ hatása az AR42J sejtek életképességére

A HQ hatását AR42J patkány hasnyálmirigy sejteken is vizsgáltuk, amelyet a kísérleteket megelőzően dexametazonnal differenciáltunk. A sejteket HQ-nal inkubáltuk (0 és 40  $\mu\text{M}$ , 24 óra), majd monitoroztuk a sejtek életképességét a metabolikus aktivitásuk mérésén keresztül (28. ábra). A HQ koncentrációját 100  $\mu\text{M}$ -ig emeltük, ami viszonylag csekély, 20%-os életképességcsökkenéssel járt együtt, a HEK293AD sejtekhez képest kisebb érzékenységet mutatva a sejtek.

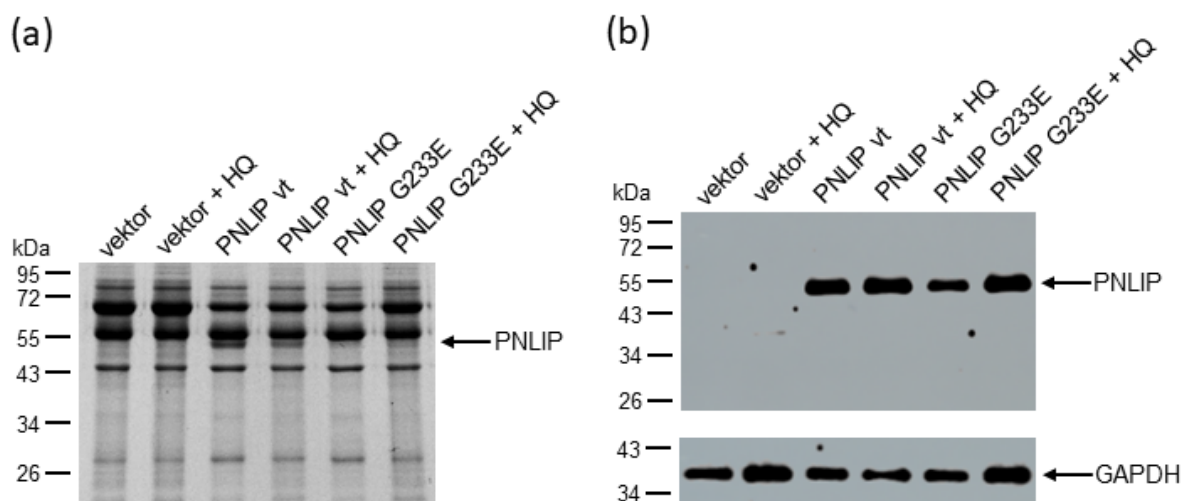


**28. ábra. Az AR42J sejtek életképessége HQ jelenlétében.** A sejteket HQ-nal kezeltük (0-100  $\mu\text{M}$ , 24 óra). A sejt metabolikus aktivitást MTT teszttel határoztuk meg az Anyagok és módszerek részben leírt módon (a). A kezeltlen sejteket tekintettük 100%-nak. Az ábra a kapott adatok átlagát mutatja be szórással (SD, n=3). Az Annexin V és a propidium-jodid festődéseket áramlási citométerrel követtük az Anyagok és módszerek részben leírt módon (b). Az x tengely a FITC annexin V, az y a propidium-jodid fluoreszcenciáját mutatja be a 3 kísérleten alapuló reprezentatív ábrán.

Az apoptózis jelenlétének vizsgálatát különböző HQ koncentrációknál (0, 40, 100 és 200  $\mu\text{M}$ ) is elvégeztük. Ehhez annexin V és propídium-jodid festést alkalmaztunk, majd áramlási citométerrel figyeltük meg a sejteket (**28. ábra**). 40  $\mu\text{M}$ -os HQ koncentráció értékig a sejtek stabilak maradtak, annexin V pozitív sejtek csak 100  $\mu\text{M}$ -nál jelentek meg. Magasabb (200  $\mu\text{M}$ ) koncentrációnál a sejtek propídium-jodiddal is elkezdtek festődni. Az eredményeink azt mutatják, hogy az AR42J sejtek esetében a programozott sejthalál a HEK293AD sejtekhez képest magasabb HQ koncentráció jelenlétében figyelhető meg.

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

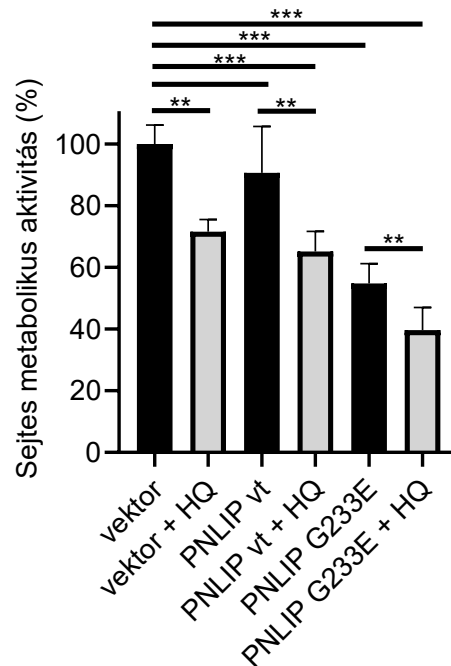
Vizsgáltuk a vad típusú és mutáns lipázt expresszáló AR42J sejteken a HQ (40  $\mu\text{M}$ ) szekrécióra gyakorolt hatását. A PNLIP mennyiségét a sejtekről begyűjtött médiumban és sejtlizátumokban is monitoroztuk (**29. ábra**). A korábban leírt megfigyeléseinkkel (143) összhangban a G233E variáns nem szekretálódott, továbbá a HQ jelentősen csökkentette a vad típusú PNLIP szekrécióját, míg az intracelluláris lipáz szintek nem változtak.



**29. ábra. A hidrokinon (HQ) PNLIP szekrécióra gyakorolt hatása AR42J sejteken.** A transzdukciót követő napon a sejteket 40  $\mu\text{M}$  HQ-nal kezeltük (24 óra, 37°C). (a) A médiumba szekretálódott PNLIP fehérjét SDS-PAGE módszerrel analizáltuk. (b) A sejtlizátumban található PNLIP és GAPDH fehérjét Western-blot módszerrel detektáltuk. Az ábrákon a vad típusú fehérjét vt rövidítéssel jelöltük.

A sejtes metabolikus aktivitáson keresztül vizsgáltuk, hogy a G233E PNLIP mutációnak és a HQ-nak van-e összeadódó hatása. Ehhez az AR42J sejteket vad típusú és mutáns PNLIP-t kódoló adenovírussal fertőztük, majd inkubáltuk HQ (0, 40  $\mu\text{M}$ ) jelenlétében (**30. ábra**). A HQ

hozzáadása 28%-kal csökkentette az életképességet, ami összevethető a HEK293AD sejtekre kapott adatokkal, ahol 25  $\mu$ M HQ-t alkalmaztunk. A vad típusú lipáz 9%-os csökkenést okozott, amennyiben HQ-t is adtunk a sejtekhez kissé erősebb hatást tapasztaltunk, mint a HQ egyedüli alkalmazásakor. A G233E PNLIP mutáció 45%-os csökkenésért volt felelős, ami 60%-ra emelkedett HQ hozzáadásakor (**30. ábra**).

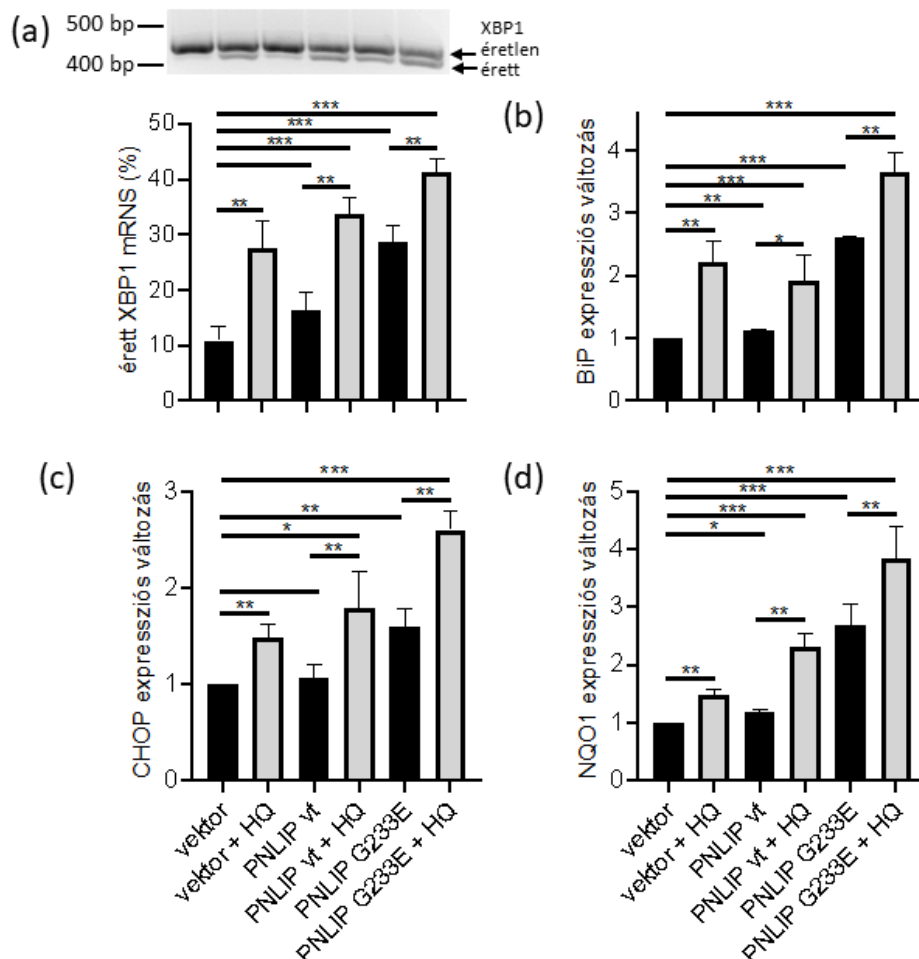


**30. ábra. A hidrokinon (HQ) hatása a vad típusú és mutáns lipázt expresszáló AR42J sejtek életképességére.** A transzdukción követően (24 óra) inkubáltuk a sejteket HQ (0 és 40  $\mu$ M) jelenlétében (24 óra). A sejtes metabolikus aktivitást MTT teszttel határoztuk meg az Anyagok és módszerek részben leírtak szerint. A üres vírussal transzdukált sejtekre kapott értékeket tekintettük 100%-nak, a vad típust vt rövidítéssel jelöltük. Az ábra a kapott értékek átlagát mutatja be szórással (SD, n=3). \*P  $\leq$  0,05, \*\*\*P  $\leq$  0,001

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

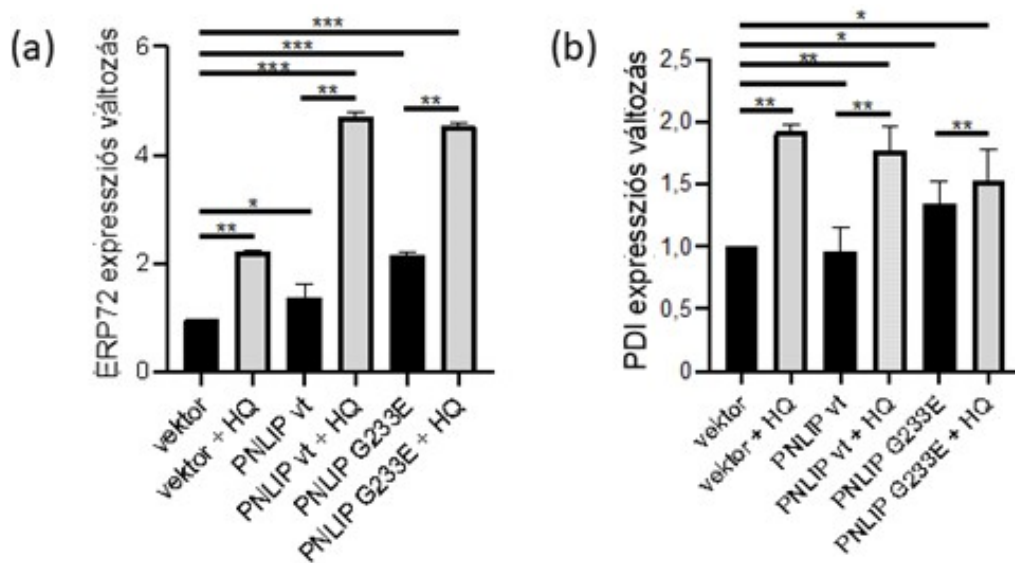
A HQ és a G233E PNLIP mutáció kapcsolatát az ER stressz tekintetében is vizsgáltuk, ehhez az éretlen/érett XBP-1 mRNA arányát, valamint a BiP, CHOP és NQO1 transzkripciós szintjét figyeltük meg (**31. ábra**). Az üres adenovírusal transzdukált sejteket tekintettük kontrollnak. Az érett XBP-1 mRNA aránya a kontroll és vad típusú lipázt kifejező sejtekben 12-16% között alakult, míg a G233E variáns esetén jelentősen, 37%-ra emelkedett. A HQ hozzáadása mind a kontroll, mind a vad típusú PNLIP-t expresszáló sejtekben 31%-os arányt okozott, a mutánst kifejező sejtekben viszont már 45%-ra, ami a legmagasabb érték a vizsgált kondíciók között (**31 a. ábra**). A vad típusú PNLIP-t kifejező sejtekben a BiP mRNA szintje

nem változott a kontrollhoz képest, a mutáns viszont közel 2,1x növekedésért volt felelős. A HQ jelentősen fokozta a BiP transzkripcióját (2,7-6,1), a legmagasabb értéket a G233E PNLIP mutáció jelenlétében elérve (31 b. ábra). A CHOP szintje a vad típusú PNLIP-t expresszáló sejtekben nem okozott jelentősebb változást, míg a G233E 2,1x növekedésért volt felelős. A HQ önmagában 3x emelkedéssel járt együtt, ami közel 6x-ra emelkedett a vad típusú és mutáns PNLIP jelenlétében (31 c. ábra). A HQ hozzáadása a sejtekhez 1,5x növekedést okozott az NQO1 transzkripciójában. Habár a vad típusú lipáz csak kis mértékben emelte a transzkripciót, amennyiben HQ is jelen volt az 2,3x mRNS szint-emelkedéssel járt együtt a HQ által kiváltott 1,5x változással szemben. A mutáns kifejeződése ettől is jelentősebben növelte az NQO1 szintjét, ami a HQ hozzáadásával tovább fokozódott (31 d. ábra).



**31. ábra. A hidrokinon (HQ) ER stresszt kiváltó hatása vad típusú és mutáns lipázt expresszáló AR42J sejteken.** A transzdukciót követően (24 óra) inkubáltuk a sejteket HQ (0 és 40  $\mu$ M) jelenlétében (24 óra). Az XBP-1 (a), a BiP (b), a CHOP (c) és az NQO1 (d) mRNS szintjét az Anyagok és módszerek részben leírtak szerint vizsgáltuk. A üres vírussal transzdukált sejtekre kapott értékeket tekintettük 100%-nak, a vad típust vt rövidítéssel jelöltük. A GAPDH szintjét alkalmaztuk referenciaként az adatok normalizálásához. Az ábra a kapott adatok átlagát mutatja be szórással (SD, n=3). \* $P \leq 0,05$ , \*\* $P \leq 0,01$ ; \*\*\* $P \leq 0,001$ .

Az oxidatív stressz jelenlétének további igazolására kettő protein diszulfid izomeráz, a PDI és az ERP72 transzkripcióját is vizsgáltuk AR42J sejteken. Az ERP72 mRNS szint tekintetében HQ hatására 2,1x növekedés volt megfigyelhető, míg a G233E variáns expressziója ezzel közel megegyező változást okozott, míg a vad típusú lipáz 1,4x emelkedésért volt felelős. A lipázt termelő sejtekben a HQ hozzáadása egyaránt 4,5x növekedés volt megfigyelhető az ERP72 mRNS szintjében (32 a. ábra). A vad típusú lipáz kifejeződése nem járt együtt változással a PDI mRNS szintjében, a mutáns is csak csekély, 1,3x emelkedést okozott. A HQ hozzáadása 1,5-1,9x növekedést okozott és a genetikai faktorok nem befolyásolták jelentősen (32 b. ábra).



**32. ábra. A hidrokinon (HQ) oxidatív ER stresszt kiváltó hatása vad típusú és mutáns lipázt expresszáló AR42J sejteken.** A transzdukciót követően (24 óra) inkubáltuk a sejteket HQ (0 és 40  $\mu$ M) jelenlétében (24 óra). Az ERP72 (a) és a PDI (b) mRNS szintjének változását az Anyagok és módszerek részben leírtak szerint határoztuk meg. A üres vírussal transzdukált sejtekre kapott értékeket tekintettük 100%-nak, a vad típust vt rövidítéssel jelöltük. A GAPDH szintjét alkalmaztuk referenciaként az adatok normalizálásához. Az ábra a kapott adatok átlagát mutatja be szórással (SD, n=3). \*\*P  $\leq$  0,01; \*\*\*P  $\leq$  0,001.

## 7. DISZKUSSZIÓ

A HTLV-2 és HTLV-3 vírusok működésének részletei a HTLV-1-hez képest kevésbé feltártak. A szekvencia és szerkezetbeli hasonlóságok miatt feltételezhetően a HTLV-2 és HTLV-3 proteázok is esszenciális szerepet töltenek be a vírusok életciklusában és hasonló működési sajátosságokkal rendelkeznek. A proteázok összehasonlító jellemzéséhez a természetes hasítási helyeket reprezentáló oligopeptideket alkalmaztunk szubsztrátként, így a kapott eredmények jól összevethetőek más retrovirális proteázokra hasonló rendszerben megállapított értékekkel. Az enzimeket bakteriális expressziós rendszerben expresszáztattuk, majd reverzfázisú HPLC módszerrel tisztítottuk. Elsőként az enzim aktivitásához optimális körülményeket határoztuk meg. A legmagasabb aktivitást 37°C közelében figyeltük meg, míg a NaCl koncentráció emelése hasonlóan a többi retrovirális proteázhoz, növelte az enzimek aktivitását (150). A pH optimumok is jó összhangban vannak más retrovirális proteázoknál tapasztaltakkal, a HTLV-3 PR optimuma kissé alacsonyabb (pH 5,6), mint a többi HTLV PR-é (pH 6,1). Míg az aszpartil proteázok pH optimuma az erősen savastól (pepszin) a neutrális (renin) pH-ig változhat, a retrovirális proteázok esetében a pH optimum reflektálhatja a bejutási mechanizmust. A receptor-mediált endocitózis során a pH optimum lehet az endoszóma pH-ja (savas), míg a közvetlen fúzió esetében sokkal inkább az intracelluláris pH.

A szubsztrátspecifitások összehasonlításához a HTLV és más retrovírus proteázok hasítóhelyeit reprezentáló szubsztrátokat alkalmaztunk, emellett egy HTLV-1 CA/NC hasítóhelyen alapuló P4-P1' módosított szubsztrát sorozatot is monitoroztunk. A HTLV-2 és HTLV-3 PR csak a HTLV hasítóhely szekvenciákat tartalmazó szubsztrátokat hasították, más retrovírus proteáz hasítóhelyen nem mutattak katalitikus aktivitást. Ez a szigorúbb specificitás összhangban van az evolúciós kapcsolatukkal, miszerint a HTLV-2 és HTLV-3 hasonlóbb egymáshoz, mint a HTLV-1 PR-hoz (162). Korábban a HTLV-1 PR mellett a szintén deltaretrovírus BLV, illetve a HIV-1 PR-t is vizsgálták hasonló szubsztrátosorozaton. Leginkább a HIV-1 PR tolerálta a szubsztrátok variabilitását, több különböző szekvencián belül is képes volt hasítani, a többi vizsgált PR-hoz képest kevésbé szigorú szubsztrátspecificitást mutatott. A deltaretrovírusokra jellemző replikációs stratégia miatt a lentivírusoknál konzerváltabbak, ami a szubsztrátpreferenciában is megmutatkozik, viszont a hasonló életciklus ellenére a deltaretrovírusok között is jelentős különbségek mutatkoznak, leginkább a BLV tér el a csoport többi tagjától, hasonlóan a HIV-1 PR-hoz széles spektrumban fogad el szubsztrátokat.

A P4-P1'pozíciókban módosított szubsztrátok monitorozása felfedte, hogy a HTLV proteázok aminosav preferenciája hasonló, de a HTLV-2 és HTLV-3 proteázok specificitása

nagyobb hasonlóságot mutatott egymáshoz. A két szekvencia közötti nagyobb hasonlóságot alapul véve a HTLV-1-hez képest, ez megegyezik a várt eredménnyel. A 32 vizsgált szubsztrát közül a HTLV-1 és HTLV-3 PR 17, míg a HTLV-2 PR 11 peptid hasítására volt képes, ami az összes vizsgált szubsztrát 53 és 34%-át jelenti. A specificitásbeli különbségek ellenére eredményeink arra utalnak, hogy a szubsztrátkötő helyek mérete hasonló egymáshoz mind a három vizsgált HTLV PR esetén. A decapeptidhez hasonlítva kisebb hasítási hatékonyságot tapasztaltunk az N-terminálisan rövidített nona- és oktapeptidek esetében, amelyekben a P5, vagy a P5-P4 oldalláncok hiányoztak. Ezekből arra következtethetünk, hogy a külső (S5 és S4) zsebek szintén részt vesznek a szubsztrát megkötésében a HTLV-1, -2 és -3 proteázok esetében. A HTLV-1 PR esetében korábbi kísérletek bizonyították az S5 zseb szerepét a szubsztrát felismerésében (144), viszont BLV PR esetében a rövidebb szubsztrátok alkalmazása nem járt együtt csökkent aktivitással (63).

Az aktív centrum mellett a proteáz más régiói is részt vehetnek a szubsztrátkötésben. A HTLV-1 PR esetében korábban leírtak egy úgynevezett szubsztrát-kötő árkot (*substrate groove* vagy *S-groove*), ami lehetővé teszi az interakciót az aktív hely S4-S4' szubsztrátkötő zsebeitől távolabb eső helyeken is, így az enzim képes kölcsönhatást kialakítani a P12-P5 (és P5'-P12') szubsztrát aminosav maradékokkal is az enzim felszínén (163). További vizsgálatok lehetnek szükségesek a hosszabb (pl. P12-P12') szubsztrátok és az enzim felszíni kötőhelyei közötti kapcsolatok analíziséhez, illetve a szubsztrát-kötő árok részletes karakterizálására a HTLV proteázok tekintetében.

A proteázok gátolhatóságát vizsgáltuk a HIV-1 ellenes terápiában is alkalmazott inhibitorokkal (atazanavir, darunavir, indinavir, ritonavir és saquinavir). A HTLV-1-hez (53, 62, 75) és a BLV-hez (63) hasonlóan a HTLV-2 és HTLV-3 PR ellen is csak alacsony gátlási hatékonyságot értek el. Míg az indinavir jó alap lehet a HTLV-1 PR elleni inhibitorok fejlesztése során, a HTLV-2 és HTLV-3 esetében mért alacsony gátlási hatékonyság miatt feltételezhetően más stratégia szükséges. A ritonavir sem fejtett ki proteázgátló hatást, a HTLV-1 fertőzés során megfigyelt NF- $\kappa$ B aktivációt gátló hatása (91) miatt mégis potenciális gátlószer lehet.

A HTLV-1 PR ellen kifejlesztett IB-268 és IB-269 inhibitorok hatékonyabban gátolták a HTLV-2 és HTLV-3, mint a HTLV-1 vagy HIV-1 PR-t. Az IB-269 volt a leghatékonyabb inhibitor a HTLV-2 és HTLV-3 PR ellen. Az előbbinél 12 nM, utóbbinál 14 nM volt a  $K_i$  értéke, amelyek hasonlóak a BLV PR-nál megfigyelt értékekhez (63), így jó alapot nyújthatnak terápiás inhibitorok fejlesztéséhez.

A HTLV-2 és HTLV-3 inhibitorokkal szembeni toleranciáját mutációkon keresztül vizsgáltuk. Proteáz mutánsok szintén készültek HIV-1-szerű oldalláncokkal az aktív centrumban a 37., 57., 59. és 67. pozíciókban, amelyek megfelelnek a HIV-1 PR 30., 48., 50. és 58. pozícióinak. Minthogy ezek a ligandkötő hely részei, hajlamosak a mutációkra. A mutációk hatását az enzimek autoproteolitikus aktivitására MBP-fúzionált fehérjék segítségével vizsgáltuk, mely fehérjék az MBP és a proteáz között a proteáz természetes hasítóhelyét reprezentáló összekötő szakaszt tartalmaztak, melyet az enzim hasítani képes. A fúziós címke jelenléte elősegítette a vad típusú proteáz megfelelő feltekeredését és autoprocesszálódását. A korábbi kísérleteinkben eltérő expressziós stratégiát alkalmaztunk, ezért nem volt célunk az MBP-fúzionált enzimekkel kinetikai vizsgálatok elvégzése, valamint a fúziós címke eltávolítása miatt sem volt lehetséges a közvetlen összehasonlítás a vad típusú proteázokkal. Az MBP-HTLV-1 PR esetében az M37D, M37N és F67Q pontmutációk megakadályozták az autoprocesszálódást (62), míg az MBP-HTLV-3 PR az I37N mutáció esetében képes volt kihatni magát. A kapott eredmények arra engednek következtetni, hogy a lebenyt alkotó oldalláncok (legalábbis az M37) a HTLV PR-okban különböző módon vesznek részt a fehérje feltekerődésben és a stabilizációban. A strukturális különbségek háttérének felderítéséhez további vizsgálatok szükségesek.

A retrovírusok két alapvetően különböző módon képesek replikálódni. A replikáció történhet úgy, hogy exogén virionok képződnek és ezek fertőzik meg a sejtet, mint a HIV-1 esetében, de integrált DNS formájában is, amikor a sejteket osztódásra készítetik/kényszerítik, mint a HTLV-1 esetében. Az előbbi stratégia magában hordozza a mutációk felhalmozódásának lehetőségét, amelyek felelősek lehetnek a vírusok jobb toleranciájáért és a rezisztencia gyors kialakulásáért a gyógyszerek ellen.

Korábbi tanulmányok szerint a HTLV-1 PR érzékenyebb a szubsztrátkötő helyet érintő mutációkra, mint a HIV-1 PR (62). A HTLV-2 és HTLV-3 PR szekvenciája hasonló mértékben különböző a HTLV-1-től, mint a HIV-1 és HIV-2 PR-októl. A HTLV vírusok hasonló replikációs stratégiája (főleg DNS formában) sokkal merevebb szubsztrátspecifitást okoz és kisebb toleranciát a mutációkkal szemben, míg a HIV-1 egy sokkal gyorsabb evolúción esett át és toleránsabbá váltak a mutációkkal szemben a nagy szelekciós nyomás alatt.

Összefoglalásként elmondható, hogy az eredményeink fontos információkkal szolgálnak a HTLV-2 és HTLV-3 biokémiai karakterisztikájáról, segítséget nyújthatnak specifikus inhibitorok fejlesztéséhez és hatékony HTLV elleni kezelésekhez, ami jelenleg is kihívás.

A dohányzás a krónikus pankreatitisz egyik leggyakoribb kiváltó oka, ettől függetlenül genetikai rizikófaktorok is kapcsolatba hozhatóak a betegséggel. Kísérleteink során arra a kérdésre kerestük a választ, hogy az említett rizikófaktorok között van-e összefüggés, szinergia. Ennek megválaszolására egy humán és egy patkány sejtvonalat alkalmaztunk. A homeosztázis egyensúlyát ER stressz útvonalra vagy az apoptózisra jellemző markerek jelenlétével és mennyiségi változásainak detektálásával vizsgáltuk, emellett a sejtek életképességéről is gyűjtöttünk információkat.

A dohányzás mimikálására a cigarettafüst leginkább citotoxikus alkotóelemeit (107), az akroleint, a krotonaldehidet és a hidrokinont alkalmaztuk. Több tanulmány igazolja, hogy a cigarettafüst kivonatok toxikusak és több humán sejtvonal esetében ER stresszt indukáló hatást gyakoroltak (164-165), emellett a pro-apoptotikus CHOP szintet is megemelhetik, így sejthalálhoz vezetve (103). A kivonatok ROS felhalmozódással is kapcsolatba hozták (166), amihez a HQ jelentősen hozzájárulhat, esetében bizonyították, hogy az antioxidáns rendszer kapacitását csökkenti és aktiválja az apoptotikus kaspázokat a hasnyálmirigyben (167). A dohányzás hasnyálmirigy exokrin elégtelenséget okozhat a KP során (168). A nikotin, vagy származéka a nitrozamin-kezon a leginkább tanulmányozott cigarettafüst komponensek közé tartoznak és felfedezték szerepüket a pankreász által termelt szekretórikus fehérjék intracelluláris retenciójában és korai aktiválódásában (169).

Elsőként az akrolein, krotonaldehid és hidrokinon, HEK293AD sejtek életképességére gyakorolt hatását vizsgáltuk. Az alkalmazott koncentrációk meghatározása irodalmi adatokon alapult, amelyek csak korlátozott mértékben elérhetőek. Az 1 db cigaretta elszívása után tüdőbe került krotonaldehid becsült koncentrációja 20  $\mu\text{M}$ , míg az akrolein esetében 80  $\mu\text{M}$  (170). Egy másik irodalmi forrás szerint a hidrokinon mennyisége 1 db cigaretta füstjében (típustól függően) átlagosan 50-129  $\mu\text{g}$ , az akrolein 75-181  $\mu\text{g}$ , míg a krotonaldehid 26-58  $\mu\text{g}$  mennyiségben van jelen. (171). Az egyetlen cigarettafüstpől tüdőbe jutó hidrokinon koncentrációról nincs elérhető irodalmi adat, a plazma koncentráció viszont a 60-70  $\mu\text{M}$  koncentrációt is elérheti rágcslóknál (172). Mindhárom ágens csökkentette a sejtek metabolikus aktivitását, dózistól függő mértékben. A legerősebb negatív hatást a krotonaldehid és a hidrokinon váltotta ki. Nagyobb stabilitása miatt a HQ-t választottuk a további megfigyelésekhez. A HQ csökkentette az AR42 patkány acinus sejtek életképességét is, viszont a HEK sejtekhez képest alacsonyabb érzékenységet tapasztaltunk. Ezt követően párhuzamosan végeztünk kísérleteket a két sejtvonallal. Feltételeztük, hogy az életképesség csökkenését az ER stressz okozza, így legrészletesebben ennek markereit vizsgáltuk. HQ jelenlétében mindkettő sejtvonalnál emelkedett az UPR útvonalban érintett érett XBP-1 mRNS aránya,

valamint a BiP mRNS szintje. Az oxidatív stressz marker NQO1 mRNS szintje is jelentősen emelkedett, az AR42J sejtvonalon további oxidatív stressz jelenlétében indukálódó géneket is vizsgáltunk, a PDI és az ERP72 diszulfid izomerázokat. Mindkettő esetében magasabb transzkripciós szintet figyeltünk meg HQ kezelés hatására. A pro-apoptotikus CHOP mRNS esetében is hasonló trend mutatkozott. Vizsgáltuk a sejthalál érintettségét is. Mindkettő sejtvonalnál megfigyeltük az annexin V és a propidium-jodid pozitív sejtek számának emelkedését, ami az apoptózis jelenlétére utal. A hatás kialakulásához az ER stressz markereknél alkalmazottnál magasabb HQ koncentráció volt szükséges. A HQ csökkentette a PNLIP szekréciónak a transzfektált/transzdukált sejtek esetében, intracelluláris mennyiségükben nem tapasztaltunk különbséget.

A szekretálódó, pankreász által expresszált enzimek nem megfelelő feltekerődése ER stresszhez vezethet, ami KP-ben folytatódhat. A feltekerődési defektust elsősorban pontmutációk okozzák és leginkább a PRSS1 génje érintett, de más fehérjéket is kapcsolatba hoztak a megbetegedéssel. Feltételezhető, hogy a kialakulás esélyét az aberráns fehérje nagy mennyisége, felhalmozódása növeli, így magas expressziós rátája miatt a PRSS1 mellett a CPA1 a másik legjellemzőbb rizikófaktor (173). A lipidbontást végző CEL és PNLIP az előbbiekhöz képest kisebb mennyiségben termelődik (173-174).

A CTRC szintén viszonylag alacsony expressziós rátával rendelkezik, egyik fő funkciója az aktív PRSS1 mennyiségének szabályozása, egyes mutációk hatására nem tudja ezt a szerepet betölteni, ami a tripszinogén korai, még a sejten történő aktiválódását okozhatja (113) és betegséghez vezethet (175). A C180T mutáns gyakran asszociálódik KP-szel, megfigyelték, hogy a dohányzóknál gyakrabban okoz megbetegedést, mint a nem dohányzóknál (176).

Egyes ritka, heterozigóta PNLIP mutációk a lipáz szekréciónak csökkenését okozzák, ami nem járt együtt az intracelluláris szint változásával. A variánsok egészséges és pankreatitiszben szenvedő betegekben is megtalálhatóak (141). Funkcionális vizsgálatok kimutatták, hogy a szekréciónak defektust a fehérjék nem megfelelő feltekerődése okozza, amelyek intracellulárisan is felhalmozódnak (143), emellett az UPR markerek (érett XBP-1 mRNS, BiP mRNS) mennyiségének növekedése is kimutatható volt.

A karboxil-észter lipáz heterozigóta CEL-MODY és CEL-HYB1 variánsai nem minden esetben asszociálódnak megbetegedésekkel, viszont a PNLIP-hez hasonlóan szintén az ER stressz markerek szintjének emelkedése volt megfigyelhető *in vitro* kísérletekben (90, 177). Egy CEL-HYB1 mutáns hordozó pankreatitiszben szenvedő betegnél a dohányzás abbahagyása a tünetek megszűnésével járt együtt (178). Mások bizonyították, hogy az etanol

és a füst együtt jelentősebb ER stressz választ képes indukálni patkány acinus sejteken, ezzel apoptózishoz vezetve (103). Hasonló összeadó hatást figyeltek meg a humán N256K CPA1 variánst hordozó egerek alkoholos etetése során. A kontroll, alkoholt nem fogyasztó egerekhez képest magasabb volt az UPR markerek szintje (179).

A PNLIP mutációk hatásának modellezésére a G233E variáns alkalmaztuk és vizsgáltuk az ER stressz markerek jelenlétét a HQ jelenlétében vagy hiányában. A mutáns önmagában is jelentős hatást váltott ki. Az életképesség csökkenése mellett az UPR markerek szintje nőtt, beleértve a pro-apoptotikus CHOP transzkripciójának fokozódását is. Kísérleteink során tehát igazoltuk, hogy a füst egyik fő komponense, a HQ és az aberráns, G233E mutációt tartalmazó PNLIP fehérje között kumulatív kapcsolat van, együttes jelenlétük erősebb stresszválaszt eredményez.

Az általunk kapott eredmények alapján a szinergia egyértelműen nem megerősíthető, viszont bizonyítják azt a feltételezést, hogy a krónikus pankreatitisz rizikófaktorai között kumulatív kapcsolat lehet. Egyes PRSS1 aberráns fehérje mutációk önmagukban is képesek betegséget kiváltani, ezt a fehérje nagy expressziós rátája magyarázhatja. A kisebb mértékben termelődő CTSC és CEL esetében a mutációk nem feltétlenül elegendőek a tünetek kiváltásához, viszont dohányzás jelenlétében a rizikó egyértelműen nő. A PNLIP esetében is igazolódni látszik, hogy bár a mutációk egészséges egyéneknél is megtalálhatóak (141) és ER stressz választ is kiváltanak (143), a pankreatitisz kialakulásához más tényezők is szükségesek lehetnek (93).

## 8. ÖSSZEFOGLALÁS

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

Munkánk során a HTLV-2 és -3 PR expressziójának és tisztításának optimalizálását, valamint biokémiai sajátosságok vizsgálatát végeztük el. Megállapítottuk, hogy a HTLV-2 és -3 PR-ok enzimikus sajátosságai nagymértékben hasonlóak és a HTLV-1 PR-nál szűkebb szubsztrát-specifitással rendelkeznek. A HTLV-1-hez hasonlóan a HTLV-2 és -3 PR-ok P4 és P3 aminosavak iránti toleranciája nagyobb, míg az S2-S1' zsebek szigorúbb aminosav-preferenciával rendelkeznek. Az általunk vizsgált HIV-1 PR inhibitorok nem voltak képesek a HTLV-2 és -3 PR hatékony gátlására, viszont az IB-268 és IB-269 kísérleti HTLV-1 PR inhibitorok jelentősen hatékonyabbnak bizonyultak. A mutáns HTLV-2 és -3 PR-okkal végzett autoprocesszálas-vizsgálatok alátámasztották, hogy eltérő replikációs stratégiájuk miatt a HTLV PR-ok a HIV-1 PR-hoz képest érzékenyebbek az aktív helyet érintő mutációkra. Eredményeink jó alapot biztosíthatnak a HTLV proteázok további kutatásához, segítséget nyújthatnak inhibitorok fejlesztéséhez és potenciális rezisztencia mutációk feltérképezéséhez.

A krónikus pankreatitisz kockázati tényezőivel kapcsolatos kutatásaink során a dohányzás hatásának modellezésére a HQ-t használtuk, a nem megfelelően feltekeredő fehérjét a G233E PNLIP mutánssal reprezentáltuk. A hozzáadásuk után azt tapasztaltuk, hogy önmagukban is csökkentették a sejtek életképességét, magasabb koncentrációjú HQ alkalmazása a programozott sejthalált is képes volt kiváltani, emellett a vad típusú PNLIP szekréciónak is gátolta. A HQ és a mutáns PNLIP együttes alkalmazása még jelentősebb változással járt együtt. Vizsgálatainkat az ER-ra gyakorolt hatás megfigyelésével folytattuk, ahol több, ER stressz marker transzkripcióját is vizsgáltuk. Az életképesség vizsgálatokkal ellentétben a vizsgált markerek expressziójának emelkedését tapasztaltuk, továbbá egy proapoptotikus marker (CHOP) mRNS szintjének változása is követte ezt a trendet. Így összefoglalva elmondható, hogy kísérleteink során a HQ és a G233E mutáns PNLIP fehérje kumulatív hatását tapasztaltuk, ami arra enged következtetni, hogy habár a nem megfelelően feltekeredő PNLIP mutánsok nem minden esetben hozhatóak egyértelműen összefüggésbe pankreász gyulladáshoz vezető megbetegedéssel, a dohányzás ennek kockázatát jelentősen képes emelni, vagy a PNLIP mutációkkal együtt súlyosabb tünetegyüttest okozni.

## 8. SUMMARY

The work presented in this PhD thesis describes our studies on two proteins that are correlated to the development of pathogenic phenotypes. Our work provides insights into the biochemical background of HTLV retroviral proteases' function and the relationship between smoking and the normally secreted but misfolded pancreatic lipases.

In this work we optimized protocols for the expression and purification of HTLV-2 and -3 PRs, the purified enzymes were used to investigate their biochemical properties. We found that the enzymatic properties of HTLV-2 and -3 PRs are highly similar and have a narrower substrate specificity than HTLV-1 PR. Similar to the HTLV-1 PR, the HTLV-2 and -3 PRs also have a higher tolerance to different P4 and P3 residues, while the S2-S1' binding pockets have a more strict amino acid preference. The HIV-1 PR inhibitors we tested were not able to inhibit HTLV-2 and -3 PRs efficiently, whereas the experimental HTLV-1 PR inhibitor IB-268 and IB-269 showed significantly higher efficacy. The studies on the autoprocessing ability of mutant HTLV-2 and -3 PRs confirmed that the HTLV PRs are more sensitive to the mutations of the active site as compared to HIV-1 PR, due to their different replication strategies. The data obtained from our studies may aid future characterization of HTLV proteases, including the development of inhibitors and mapping potential resistance mutations.

In our studies on the risk factors of chronic pancreatitis we used HQ to model the effects of smoking, while the misfolded proteins were represented by the G233E PNLIP mutant. We found that both HQ and the mutant PNLIP caused reduction of cell viability individually, higher concentrations of HQ induced programmed cell death and inhibited the secretion of the wild-type PNLIP, as well. The HQ and the mutant PNLIP together caused even more significant changes. We studied these effects on ER, as well, and investigated the transcription of several ER stress markers. In contrast to the observed changes of cell viability, this assay showed elevated expression of the studied markers and revealed increased mRNA level of a pro-apoptotic marker (CHOP). In conclusion, our experiments showed cumulative effect between HQ and a G233E mutant PNLIP protein, indicating that despite the improper folding of PNLIP mutants they are not always clearly associated with pancreatic inflammatory disease, and smoking can significantly increase the risk of this disease, or together with PNLIP mutations may cause more severe symptoms.

## 9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Rawlings ND, Barrett AJ, Thomas PD, Huang X, Bateman A, Finn RD. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(D1):D624-D32.
2. Rawlings ND, Barrett, A. J. Introduction: Aspartic and Glutamic Peptidases and Their Clans. In *Handbook of Proteolytic Enzymes*, 3rd Edition. Rawlings ND, Salvesen, G., editor: Elsevier; 2013. 1-3932 p.
3. Ali YB, Verger R, Abousalham A. Lipases or esterases: does it really matter? Toward a new bio-physico-chemical classification. *Methods Mol Biol.* 2012;861:31-51.
4. Poesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980;77(12):7415-9.
5. Kalyanaraman VS, Sarngadharan MG, Robert-Guroff M, Miyoshi I, Golde D, Gallo RC. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science.* 1982;218(4572):571-3.
6. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vénizet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science.* 1983;220(4599):868-71.
7. Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, Palker TJ, Redfield R, Oleske J, Safai B. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science.* 1984;224(4648):500-3.
8. Levy JA, Shimabukuro J. Recovery of AIDS-associated retroviruses from patients with AIDS or AIDS-related conditions and from clinically healthy individuals. *J Infect Dis.* 1985;152(4):734-8.
9. Calattini S, Chevalier SA, Duprez R, Afonso P, Froment A, Gessain A, Mahieux R. Human T-cell lymphotropic virus type 3: complete nucleotide sequence and characterization of the human tax3 protein. *J Virol.* 2006;80(19):9876-88.
10. Wolfe ND, Heneine W, Carr JK, Garcia AD, Shanmugam V, Tamoufe U, Torimiro JN, Prosser AT, Lebreton M, Mpoudi-Ngole E, McCutchan FE, Birx DL, Folks TM, Burke DS, Switzer WM. Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(22):7994-9.
11. Afonso PV, Cassar O, Gessain A. Molecular epidemiology, genetic variability and evolution of HTLV-1 with special emphasis on African genotypes. *Retrovirology.* 2019;16(1):39.
12. ECDC ECfDPaC. Geographical distribution of areas with a high prevalence of HTLV-1 infection. 2020.
13. Willems L, Hasegawa H, Accolla R, Bangham C, Bazarbachi A, Bertazzoni U, de Freitas Carneiro-Proetti AB, Cheng H, Chieco-Bianchi L, Ciminale V, Coelho-Dos-Reis J, Esparza J, Gallo RC, Gessain A, Gotuzzo E, Hall W, Harford J, Hermine O, Jacobson S, Macchi B, Macpherson C, Mahieux R, Matsuoka M, Murphy E, Peloponese JM, Simon V, Tagaya Y, Taylor GP, Watanabe T, Yamano Y. Reducing the global burden of HTLV-1 infection: An agenda for research and action. *Antiviral Res.* 2017;137:41-8.
14. Murphy EL, Cassar, O., Gessain, A. Estimating the number of HTLV-2 infected persons in the world. *Retrovirology.* 2015;12.
15. Anyanwu NCJ, Ella EE, Ohwofasa A, Aminu M. Re-emergence of human T-lymphotropic viruses in West Africa. *Braz J Infect Dis.* 2018;22(3):224-34.
16. Hirons A, Khoury G, Purcell DFJ. Human T-cell lymphotropic virus type-1: a lifelong persistent infection, yet never truly silent. *Lancet Infect Dis.* 2021;21(1):e2-e10.

17. Kondo T, Kono H, Miyamoto N, Yoshida R, Toki H, Matsumoto I, Hara M, Inoue H, Inatsuki A, Funatsu T, Yamano N. Age- and sex-specific cumulative rate and risk of ATLL for HTLV-I carriers. *Int J Cancer*. 1989;43(6):1061-4.
18. Koga Y, Iwanaga M, Soda M, Inokuchi N, Sasaki D, Hasegawa H, Yanagihara K, Yamaguchi K, Kamihira S, Yamada Y. Trends in HTLV-1 prevalence and incidence of adult T-cell leukemia/lymphoma in Nagasaki, Japan. *J Med Virol*. 2010;82(4):668-74.
19. Kaplan JE, Osame M, Kubota H, Igata A, Nishitani H, Maeda Y, Khabbaz RF, Janssen RS. The risk of development of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis among persons infected with HTLV-I. *J Acquir Immune Defic Syndr (1988)*. 1990;3(11):1096-101.
20. Maloney EM, Cleghorn FR, Morgan OS, Rodgers-Johnson P, Cranston B, Jack N, Blattner WA, Bartholomew C, Manns A. Incidence of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in Jamaica and Trinidad. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 1998;17(2):167-70.
21. Araujo A, Hall WW. Human T-lymphotropic virus type II and neurological disease. *Ann Neurol*. 2004;56(1):10-9.
22. Katz RA, Skalka AM. Generation of diversity in retroviruses. *Annu Rev Genet*. 1990;24:409-45.
23. Brites C, Grassi MF, Quaresma JAS, Ishak R, Vallinoto ACR. Pathogenesis of HTLV-1 infection and progression biomarkers: An overview. *Braz J Infect Dis*. 2021;25(3):101594.
24. Hattori S, Kiyokawa T, Imagawa K, Shimizu F, Hashimura E, Seiki M, Yoshida M. Identification of gag and env gene products of human T-cell leukemia virus (HTLV). *Virology*. 1984;136(2):338-47.
25. Edwards D, Fenizia C, Gold H, de Castro-Amarante MF, Buchmann C, Pise-Masison CA, Franchini G. Orf-I and orf-II-encoded proteins in HTLV-1 infection and persistence. *Viruses*. 2011;3(6):861-85.
26. Soltani A, Hashemy SI, Zahedi Avval F, Soleimani A, Rafatpanah H, Rezaee SA, Griffith R, Mashkani B. Molecular targeting for treatment of human T-lymphotropic virus type 1 infection. *Biomed Pharmacother*. 2019;109:770-8.
27. Macatonia SE, Cruickshank JK, Rudge P, Knight SC. Dendritic cells from patients with tropical spastic paraparesis are infected with HTLV-1 and stimulate autologous lymphocyte proliferation. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1992;8(9):1699-706.
28. Koyanagi Y, Itoyama Y, Nakamura N, Takamatsu K, Kira J, Iwamasa T, Goto I, Yamamoto N. In vivo infection of human T-cell leukemia virus type I in non-T cells. *Virology*. 1993;196(1):25-33.
29. Mahieux R, Gessain A. HTLV-3/STLV-3 and HTLV-4 viruses: discovery, epidemiology, serology and molecular aspects. *Viruses*. 2011;3(7):1074-90.
30. Jones KS, Lambert S, Bouttier M, Benit L, Ruscetti FW, Hermine O, Pique C. Molecular aspects of HTLV-1 entry: functional domains of the HTLV-1 surface subunit (SU) and their relationships to the entry receptors. *Viruses*. 2011;3(6):794-810.
31. Hakata Y, Umemoto T, Matsushita S, Shida H. Involvement of human CRM1 (exportin 1) in the export and multimerization of the Rex protein of human T-cell leukemia virus type 1. *J Virol*. 1998;72(8):6602-7.
32. Maldonado JO, Martin JL, Mueller JD, Zhang W, Mansky LM. New insights into retroviral Gag-Gag and Gag-membrane interactions. *Front Microbiol*. 2014;5:302.
33. Gross C, Thoma-Kress AK. Molecular Mechanisms of HTLV-1 Cell-to-Cell Transmission. *Viruses*. 2016;8(3):74.
34. Pique C, Jones KS. Pathways of cell-cell transmission of HTLV-1. *Front Microbiol*. 2012;3:378.

35. Van Prooyen N, Gold H, Andresen V, Schwartz O, Jones K, Ruscetti F, Lockett S, Gudla P, Venzon D, Franchini G. Human T-cell leukemia virus type 1 p8 protein increases cellular conduits and virus transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(48):20738-43.
36. Peloponese JM, Jr., Yeung ML, Jeang KT. Modulation of nuclear factor- $\kappa$ B by human T cell leukemia virus type 1 tax protein : Implications for oncogenesis and inflammation. *Immunol Res.* 2006;34(1):1-12.
37. Matsuoka M, Jeang KT. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and leukemic transformation: viral infectivity, Tax, HBZ and therapy. *Oncogene.* 2011;30(12):1379-89.
38. Jeong SJ, Dasgupta A, Jung KJ, Um JH, Burke A, Park HU, Brady JN. PI3K/AKT inhibition induces caspase-dependent apoptosis in HTLV-1-transformed cells. *Virology.* 2008;370(2):264-72.
39. Tabakin-Fix Y, Azran I, Schavinky-Khrapunsky Y, Levy O, Aboud M. Functional inactivation of p53 by human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein: mechanisms and clinical implications. *Carcinogenesis.* 2006;27(4):673-81.
40. Mohanty S, Harhaj EW. Mechanism of Oncogenesis by HTLV-1 Tax. *Pathogens.* 2020, 9(7):543.
41. Zhao LJ, Giam CZ. Human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) transcriptional activator, Tax, enhances CREB binding to HTLV-I 21-base-pair repeats by protein-protein interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(15):7070-4.
42. Virgin HW, Wherry EJ, Ahmed R. Redefining chronic viral infection. *Cell.* 2009;138(1):30-50.
43. Johnson JM, Nicot C, Fullen J, Ciminale V, Casareto L, Mulloy JC, Jacobson S, Franchini G. Free major histocompatibility complex class I heavy chain is preferentially targeted for degradation by human T-cell leukemia/lymphotropic virus type 1 p12(I) protein. *J Virol.* 2001;75(13):6086-94.
44. Clerc I, Polakowski N, Andre-Arpin C, Cook P, Barbeau B, Mesnard JM, Lemasson I. An interaction between the human T cell leukemia virus type 1 basic leucine zipper factor (HBZ) and the KIX domain of p300/CBP contributes to the down-regulation of tax-dependent viral transcription by HBZ. *J Biol Chem.* 2008;283(35):23903-13.
45. Martinez MP, Al-Saleem J, Green PL. Comparative virology of HTLV-1 and HTLV-2. *Retrovirology.* 2019;16(1):21.
46. Gessain A, Rua R, Betssem E, Turpin J, Mahieux R. HTLV-3/4 and simian foamy retroviruses in humans: discovery, epidemiology, cross-species transmission and molecular virology. *Virology.* 2013;435(1):187-99.
47. Hatanaka M, Nam SH. Identification of HTLV-I gag protease and its sequential processing of the gag gene product. *J Cell Biochem.* 1989;40(1):15-30.
48. Shuker SB, Mariani VL, Herger BE, Dennison KJ. Understanding HTLV-I protease. *Chem Biol.* 2003;10(5):373-80.
49. Oroszlan S, Luftig RB. Retroviral proteinases. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1990;157:153-85.
50. Yang H, Nkeze J, Zhao RY. Effects of HIV-1 protease on cellular functions and their potential applications in antiretroviral therapy. *Cell Biosci.* 2012;2(1):32.
51. Hayakawa T, Misumi Y, Kobayashi M, Yamamoto Y, Fujisawa Y. Requirement of N- and C-terminal regions for enzymatic activity of human T-cell leukemia virus type I protease. *Eur J Biochem.* 1992;206(3):919-25.
52. Kádas J, Boross P, Weber IT, Bagossi P, Matúz K, Tözsér J. C-terminal residues of mature human T-lymphotropic virus type 1 protease are critical for dimerization and catalytic activity. *Biochem J.* 2008;416(3):357-64.
53. Louis JM, Oroszlan S, Tözsér J. Stabilization from autoproteolysis and kinetic characterization of the human T-cell leukemia virus type 1 proteinase. *J Biol Chem.* 1999;274(10):6660-6.

54. Wlodawer A, Gustchina A. Structural and biochemical studies of retroviral proteases. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1477(1-2):16-34.
55. Li M, Laco GS, Jaskolski M, Rozycki J, Alexandratos J, Wlodawer A, Gustchina A. Crystal structure of human T cell leukemia virus protease, a novel target for anticancer drug design. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(51):18332-7.
56. Fitzgerald PM, McKeever BM, VanMiddlesworth JF, Springer JP, Heimbach JC, Leu CT, Herber WK, Dixon RA, Darke PL. Crystallographic analysis of a complex between human immunodeficiency virus type 1 protease and acetyl-pepstatin at 2.0-Å resolution. *J Biol Chem*. 1990;265(24):14209-19.
57. Satoh T, Li M, Nguyen JT, Kiso Y, Gustchina A, Wlodawer A. Crystal structures of inhibitor complexes of human T-cell leukemia virus (HTLV-1) protease. *J Mol Biol*. 2010;401(4):626-41.
58. Rucker P, Horn AH, Meiselbach H, Sticht H. A comparative study of HIV-1 and HTLV-I protease structure and dynamics reveals a conserved residue interaction network. *J Mol Model*. 2011;17(10):2693-705.
59. Tözser J, Weber IT. The protease of human T-cell leukemia virus type-1 is a potential therapeutic target. *Curr Pharm Des*. 2007;13(12):1285-94.
60. Eizert H, Bander P, Bagossi P, Sperka T, Miklóssy G, Boross P, Weber IT, Tözsér J. Amino acid preferences of retroviral proteases for amino-terminal positions in a type 1 cleavage site. *J Virol*. 2008;82(20):10111-7.
61. Bagossi P, Sperka T, Fehér A, Kadas J, Zahuczky G, Miklóssy G, Boross P, Tözsér J. Amino acid preferences for a critical substrate binding subsite of retroviral proteases in type 1 cleavage sites. *J Virol*. 2005;79(7):4213-8.
62. Kádas J, Weber IT, Bagossi P, Miklóssy G, Boross P, Oroszlan S, Tözsér J. Narrow substrate specificity and sensitivity toward ligand-binding site mutations of human T-cell Leukemia virus type 1 protease. *J Biol Chem*. 2004;279(26):27148-57.
63. Sperka T, Miklóssy G, Tie Y, Bagossi P, Zahuczky G, Boross P, Matúz K, Harrison RW, Weber IT, Tözsér J. Bovine leukemia virus protease: comparison with human T-lymphotropic virus and human immunodeficiency virus proteases. *J Gen Virol*. 2007;88(Pt 7):2052-63.
64. Thompson MA, Aberg JA, Cahn P, Montaner JS, Rizzardini G, Telenti A, Gatell JM, Günthard HF, Hammer SM, Hirsch MS, Jacobsen DM, Reiss P, Richman DD, Volberding PA, Yeni P, Schooley RT, International AIDS Society-USA. Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2010 recommendations of the International AIDS Society-USA panel. *JAMA*. 2010;304(3):321-33.
65. Futsch N, Mahieux R, Dutartre H. HTLV-1, the Other Pathogenic Yet Neglected Human Retrovirus: From Transmission to Therapeutic Treatment. *Viruses*. 2017;10(1).
66. El Hajj H, Tsukasaki K, Cheminant M, Bazarbachi A, Watanabe T, Hermine O. Novel Treatments of Adult T Cell Leukemia Lymphoma. *Front Microbiol*. 2020;11:1062.
67. Rizza SA, Bhatia R, Zeuli J, Temesgen Z. Ibalizumab for the treatment of multidrug-resistant HIV-1 infection. *Drugs Today (Barc)*. 2019;55(1):25-34.
6. Lamb D, Mirsaliotis A, Kelly SM, Brightly DW. Basic residues are critical to the activity of peptide inhibitors of human T cell leukemia virus type 1 entry. *J Biol Chem*. 2009;284(10):6575-84.
69. Miyazato P, Yasunaga J, Taniguchi Y, Koyanagi Y, Mitsuya H, Matsuoka M. De novo human T-cell leukemia virus type 1 infection of human lymphocytes in NOD-SCID, common gamma-chain knockout mice. *J Virol*. 2006;80(21):10683-91.
70. Rabaaoui S, Zouhiri F, Lancon A, Leh H, d'Angelo J, Wattel E. Inhibitors of strand transfer that prevent integration and inhibit human T-cell leukemia virus type 1 early replication. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(10):3532-41.

71. Al Sharif S, Pinto DO, Mensah GA, Dehbandi F, Khatkar P, Kim Y, Branscome H, Kashanchi F. Extracellular Vesicles in HTLV-1 Communication: The Story of an Invisible Messenger. *Viruses*. 2020;12(12).
72. Koh Y, Matsumi S, Das D, Amano M, Davis DA, Li J, Leschenko S, Baldrige A, Shioda T, Yarchoan R, Ghosh AK, Mitsuya H. Potent inhibition of HIV-1 replication by novel non-peptidyl small molecule inhibitors of protease dimerization. *J Biol Chem*. 2007;282(39):28709-20.
73. Pietrucci F, Vargiu AV, Kranjc A. HIV-1 Protease Dimerization Dynamics Reveals a Transient Druggable Binding Pocket at the Interface. *Sci Rep*. 2015;5:18555.
74. Hayashi H, Takamune N, Nirasawa T, Aoki M, Morishita Y, Das D, Koh Y, Ghosh AK, Misumi S, Mitsuya H. Dimerization of HIV-1 protease occurs through two steps relating to the mechanism of protease dimerization inhibition by darunavir. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(33):12234-9.
75. Bagossi P, Kádás J, Miklóssy G, Boross P, Weber IT, Tózsér J. Development of a microtiter plate fluorescent assay for inhibition studies on the HTLV-1 and HIV-1 proteinases. *J Virol Methods*. 2004;119(2):87-93.
76. Mahdi M, Szojka Z, Mótyán JA, Tózsér J. Inhibition Profiling of Retroviral Protease Inhibitors Using an HIV-2 Modular System. *Viruses*. 2015;7(12):6152-62.
77. Sohraby F, Aryapour H. Reconstruction of the binding pathway of an anti-HIV drug, Indinavir, in complex with the HTLV-1 protease using unaggregated unbiased molecular dynamics simulation. *Comput Biol Chem*. 2022;96:107616.
78. Sohraby F, Aryapour H. Comparative analysis of the unbinding pathways of antiviral drug Indinavir from HIV and HTLV1 proteases by supervised molecular dynamics simulation. *PLoS One*. 2021;16(9):e0257916.
795. Selvaraj C, Singh P, Singh SK. Molecular modeling studies and comparative analysis on structurally similar HTLV and HIV protease using HIV-PR inhibitors. *J Recept Signal Transduct Res*. 2014;34(5):361-71.
80. Lockbaum GJ, Henes M, Talledge N, Rusere LN, Kosovrasti K, Nalivaika EA, Somasundaran M, Ali A, Mansky LM, Yilmaz NK, Schiffer CA. Inhibiting HTLV-1 Protease: A Viable Antiviral Target. *ACS Chem Biol*. 2021;16(3):529-38.
81. Nguyen JT, Kato K, Kumada HO, Hidaka K, Kimura T, Kiso Y. Maintaining potent HTLV-I protease inhibition without the P3-cap moiety in small tetrapeptidic inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 2011;21(6):1832-7.
82. Awahara C, Tatsumi T, Furuta S, Shinjoh G, Konno H, Nosaka K, Kobayashi K, Hattori Y, Akaji K. Effect of prime-site sequence of retro-inverso-modified HTLV-1 protease inhibitor. *Bioorg Med Chem*. 2014;22(8):2482-8.
83. Louis JM, Ishima R, Torchia DA, Weber IT. HIV-1 protease: structure, dynamics, and inhibition. *Adv Pharmacol*. 2007;55:261-98.
84. Bouras A, Boggetto N, Benatalah Z, de Rosny E, Sicsic S, Reboud-Ravaux M. Design, synthesis, and evaluation of conformationally constrained tongs, new inhibitors of HIV-1 protease dimerization. *J Med Chem*. 1999;42(6):957-62.
85. Moskovitz BL. Clinical trial of tolerance of HPA-23 in patients with acquired immune deficiency syndrome. *Antimicrob Agents Chemother*. 1988;32(9):1300-3.
86. Kazanji M, Ureta-Vidal A, Ozden S, Tangy F, de Thoisy B, Fiette L, Talarmin A, Gessain A, de Thé G. Lymphoid organs as a major reservoir for human T-cell leukemia virus type 1 in experimentally infected squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*): provirus expression, persistence, and humoral and cellular immune responses. *J Virol*. 2000;74(10):4860-7.
87. Mortreux F, Kazanji M, Gabet AS, de Thoisy B, Wattel E. Two-step nature of human T-cell leukemia virus type 1 replication in experimentally infected squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *J Virol*. 2001;75(2):1083-9.

88. Moules V, Pomier C, Sibon D, Gabet AS, Reichert M, Kerkhofs P, Willems L, Mortreux F, Wattel E. Fate of premalignant clones during the asymptomatic phase preceding lymphoid malignancy. *Cancer Res.* 2005;65(4):1234-43.
89. El Hajj H, Khalil B, Ghandour B, Nasr R, Shahine S, Ghantous A, Abdel-Samad R, Sinjab A, Hasegawa H, Jabbour M, Hall WW, Zaatari G, Dbaibo G, Pisano C, Bazarbachi A, Darwiche N. Preclinical efficacy of the synthetic retinoid ST1926 for treating adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood.* 2014;124(13):2072-80.
90. Xiang D, Yuan Y, Chen L, Liu X, Belani C, Cheng H. Niclosamide, an anti-helminthic molecule, downregulates the retroviral oncoprotein Tax and pro-survival Bcl-2 proteins in HTLV-1-transformed T lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;464(1):221-8.
91. Dewan MZ, Uchihara JN, Terashima K, Honda M, Sata T, Ito M, Fujii N, Uozumi K, Tsukasaki K, Tomonaga M, Kubuki Y, Okayama A, Toi M, Mori N, Yamamoto N. Efficient intervention of growth and infiltration of primary adult T-cell leukemia cells by an HIV protease inhibitor, ritonavir. *Blood.* 2006;107(2):716-24.
92. Kannagi M, Hasegawa A, Nagano Y, Kimpara S, Suehiro Y. Impact of host immunity on HTLV-1 pathogenesis: potential of Tax-targeted immunotherapy against ATL. *Retrovirology.* 2019;16(1):23.
93. Kleeff J, Whitcomb DC, Shimosegawa T, Esposito I, Lerch MM, Gress T, Mayerle J, Drewes AM, Rebours V, Akisik F, Munoz JED, Neoptolemos JP. Chronic pancreatitis. *Nat Rev Dis Primers.* 2017;3:17060.
94. Hirota M, Shimosegawa T, Masamune A, Kikuta K, Kume K, Hamada S, Kihara Y, Satoh A, Kimura K, Tsuji I, Kuriyama S, Research Committee of Intractable Pancreatic Diseases. The sixth nationwide epidemiological survey of chronic pancreatitis in Japan. *Pancreatol.* 2012;12(2):79-84.
95. Yadav D, Timmons L, Benson JT, Dierkhising RA, Chari ST. Incidence, prevalence, and survival of chronic pancreatitis: a population-based study. *Am J Gastroenterol.* 2011;106(12):2192-9.
96. Yadav D, Lowenfels AB. Trends in the epidemiology of the first attack of acute pancreatitis: a systematic review. *Pancreas.* 2006;33(4):323-30.
97. Cote GA, Yadav D, Slivka A, Hawes RH, Anderson MA, Burton FR, Brand RE, Banks PA, Lewis MD, Disario JA, Gardner TB, Gelrud A, Amann ST, Baillie J, Money ME, O'Connell M, Whitcomb DC, Sherman S, North American Pancreatitis Study Group. Alcohol and smoking as risk factors in an epidemiology study of patients with chronic pancreatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2011;9(3):266-73; quiz e27.
98. Yadav D, Eigenbrodt ML, Briggs MJ, Williams DK, Wiseman EJ. Pancreatitis: prevalence and risk factors among male veterans in a detoxification program. *Pancreas.* 2007;34(4):390-8.
99. Bhopale KK, Falzon M, Ansari GA, Kaphalia BS. Alcohol oxidizing enzymes and ethanol-induced cytotoxicity in rat pancreatic acinar AR42J cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2014;50(4):373-80.
100. Waldron RT, Su HY, Piplani H, Capri J, Cohn W, Whitelegge JP, Faull KF, Sakkiah S, Abrol R, Yang W, Zhou B, Freeman MR, Pandol SJ, Lugea A. Ethanol Induced Disordering of Pancreatic Acinar Cell Endoplasmic Reticulum: An ER Stress/Defective Unfolded Protein Response Model. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2018;5(4):479-97.
101. Yen S, Hsieh CC, MacMahon B. Consumption of alcohol and tobacco and other risk factors for pancreatitis. *Am J Epidemiol.* 1982;116(3):407-14.
102. Andriulli A, Botteri E, Almasio PL, Vantini I, Uomo G, Maisonneuve P, ad hoc Committee of the Italian Association for the Study of the Pancreas. Smoking as a cofactor for causation of chronic pancreatitis: a meta-analysis. *Pancreas.* 2010;39(8):1205-10.
103. Lugea A, Gerloff A, Su HY, Xu Z, Go A, Hu C, French SW, Wilson JS, Apte MV, Waldron RT, Pandol SJ. The Combination of Alcohol and Cigarette Smoke Induces Endoplasmic

- Reticulum Stress and Cell Death in Pancreatic Acinar Cells. *Gastroenterology*. 2017;153(6):1674-86.
104. Shen DX, Shi X, Fu JL, Zhang YM, Zhou ZC. The role of thiol reduction in hydroquinone-induced apoptosis in HEK293 cells. *Chem Biol Interact*. 2003;145(2):225-33.
  105. Chen C, Cano M, Wang JJ, Li J, Huang C, Yu Q, Herbert TP, Handa JT, Zhang SX. Role of unfolded protein response dysregulation in oxidative injury of retinal pigment epithelial cells. *Antioxid Redox Signal*. 2014;20(14):2091-106.
  106. Huang J, Zhao M, Li X, Ma L, Zhang J, Shi J, Li B, Fan W, Zhou Y. The Cytotoxic Effect of the Benzene Metabolite Hydroquinone is Mediated by the Modulation of MDR1 Expression via the NF-kappaB Signaling Pathway. *Cell Physiol Biochem*. 2015;37(2):592-602.
  107. Stabbert R, Dempsey R, Diekmann J, Euchenhofer C, Hagemeister T, Haussmann HJ, Knorr A, Mueller BP, Pospisil P, Reininghaus W, Roemer E, Tewes FJ, Veltel DJ. Studies on the contributions of smoke constituents, individually and in mixtures, in a range of in vitro bioactivity assays. *Toxicol In Vitro*. 2017;42:222-46.
  108. Neurath H, Walsh KA. Role of proteolytic enzymes in biological regulation (a review). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1976;73(11):3825-32.
  109. Rinderknecht H. Activation of pancreatic zymogens. Normal activation, premature intrapancreatic activation, protective mechanisms against inappropriate activation. *Dig Dis Sci*. 1986;31(3):314-21.
  110. Hegyi E, Sahin-Tóth M. Genetic Risk in Chronic Pancreatitis: The Trypsin-Dependent Pathway. *Dig Dis Sci*. 2017;62(7):1692-701.
  111. Whitcomb DC, Gorry MC, Preston RA, Furey W, Sossenheimer MJ, Ulrich CD, Martin SP, Gates LK, Amann ST, Toskes PP, Liddle R, McGrath K, Uomo G, Post JC, Ehrlich GD. Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nat Genet*. 1996;14(2):141-5.
  112. Geisz A, Hegyi P, Sahin-Tóth M. Robust autoactivation, chymotrypsin C independence and diminished secretion define a subset of hereditary pancreatitis-associated cationic trypsinogen mutants. *FEBS J*. 2013;280(12):2888-99.
  113. Szabó A, Sahin-Tóth M. Increased activation of hereditary pancreatitis-associated human cationic trypsinogen mutants in presence of chymotrypsin C. *J Biol Chem*. 2012;287(24):20701-10.
  114. Beer S, Zhou J, Szabó A, Keiles S, Chandak GR, Witt H, Sahin-Tóth M. Comprehensive functional analysis of chymotrypsin C (CTRC) variants reveals distinct loss-of-function mechanisms associated with pancreatitis risk. *Gut*. 2013;62(11):1616-24.
  115. Szabó A, Toldi V, Gazda LD, 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*. 2021;296:100343.
  116. Xiong S, Chng WJ, Zhou J. Crosstalk between endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a dynamic duo in multiple myeloma. *Cell Mol Life Sci*. 2021;78(8):3883-906.
  117. Lee AH, Iwakoshi NN, Glimcher LH. XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol*. 2003;23(21):7448-59.
  118. Yoshida H, Matsui T, Hosokawa N, Kaufman RJ, Nagata K, Mori K. A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response. *Dev Cell*. 2003;4(2):265-71.
  119. Chen Y, Brandizzi F. IRE1: ER stress sensor and cell fate executor. *Trends Cell Biol*. 2013;23(11):547-55.
  120. Sakaki K, Yoshina S, Shen X, Han J, DeSantis MR, Xiong M, Mitani S, Kaufman RJ. RNA surveillance is required for endoplasmic reticulum homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(21):8079-84.

121. Tam AB, Mercado EL, Hoffmann A, Niwa M. ER stress activates NF-kappaB by integrating functions of basal IKK activity, IRE1 and PERK. *PLoS One*. 2012;7(10):e45078.
122. Kouroku Y, Fujita E, Tanida I, Ueno T, Isoai A, Kumagai H, Kominami E, Momoi T. ER stress (PERK/eIF2alpha phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. *Cell Death Differ*. 2007;14(2):230-9.
123. Haze K, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Mori K. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell*. 1999;10(11):3787-99.
124. Appenzeller-Herzog C. Glutathione- and non-glutathione-based oxidant control in the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci*. 2011;124(Pt 6):847-55.
125. Galligan JJ, Petersen DR. The human protein disulfide isomerase gene family. *Hum Genomics*. 2012;6:6.
126. Araki K, Iemura S, Kamiya Y, Ron D, Kato K, Natsume T, Nagata K. Ero1-alpha and PDIs constitute a hierarchical electron transfer network of endoplasmic reticulum oxidoreductases. *J Cell Biol*. 2013;202(6):861-74.
127. Haynes CM, Titus EA, Cooper AA. Degradation of misfolded proteins prevents ER-derived oxidative stress and cell death. *Mol Cell*. 2004;15(5):767-76.
128. Kranz P, Neumann F, Wolf A, Classen F, Pomsch M, Oecklenburg T, Baumann J, Janke K, Baumann M, Goepelt K, Riffkin H, Metzgen E, Brockmeier U. PDI is an essential redox-sensitive activator of PERK during the unfolded protein response (UPR). *Cell Death Dis*. 2017;8(8):e2986.
129. Yamamoto K, Sato T, Matsui T, Sato M, Okada T, Yoshida H, Harada A, Mori K. Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1. *Dev Cell*. 2007;13(3):365-76.
130. Ross D, Siegel D. The diverse functionality of NQO1 and its roles in redox control. *Redox Biol*. 2021;41:101950.
131. Keresztúri E, Szmola R, Kukor Z, Simon P, Weiss FU, Lerch MM, Sahin-Tóth M. Hereditary pancreatitis caused by mutation-induced misfolding of human cationic trypsinogen: a novel disease mechanism. *Hum Mutat*. 2009;30(4):575-82.
132. Keresztúri E, Sahin-Tóth M. Intracellular autoactivation of human cationic trypsinogen mutants causes reduced trypsinogen secretion and acinar cell death. *J Biol Chem*. 2009;284(48):33392-9.
133. Lugea A, Waldron RT, Mareninova OA, Shalbuva N, Deng N, Su HY, Thomas DD, Jones EK, Messenger SW, Yang J, Hu C, Gukovsky I, Liu Z, Groblewski GE, Gukovskaya AS, Gorelick FS, Pandol SJ. Human Pancreatic Acinar Cells: Proteomic Characterization, Physiologic Responses, and Organellar Disorders in ex Vivo Pancreatitis. *Am J Pathol*. 2017;187(12):2726-43.
134. Lowe ME. The triglyceride lipases of the pancreas. *J Lipid Res*. 2002;43(12):2007-16.
135. Xiao X, Lowe ME. The beta5-Loop and Lid Domain Contribute to the Substrate Specificity of Pancreatic Lipase-related Protein 2 (PNLIPRP2). *J Biol Chem*. 2015;290(48):28847-56.
136. Lowe ME. Properties and function of pancreatic lipase related protein 2. *Biochimie*. 2000;82(11):997-1004.
137. Hui DY, Howles PN. Carboxyl ester lipase: structure-function relationship and physiological role in lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *J Lipid Res*. 2002;43(12):2017-30.
138. Xiao X, Jones G, Sevilla WA, Stolz DB, Magee KE, Haughney M, Mukherjee A, Wang Y, Lowe ME. A Carboxyl Ester Lipase (CEL) Mutant Causes Chronic Pancreatitis by Forming Intracellular Aggregates That Activate Apoptosis. *J Biol Chem*. 2016;291(44):23224-36.

139. Cassidy BM, Zino S, Fjeld K, Molven A, Lowe ME, Xiao X. Single nucleotide polymorphisms in CEL-HYB1 increase risk for chronic pancreatitis through proteotoxic misfolding. *Hum Mutat.* 2020;41(11):1967-78.
140. Behar DM, Basel-Vanagaite L, Glaser F, Kaplan M, Tzur S, Magal N, Eidlitz-Markus T, Haimi-Cohen Y, Sarig G, Mormans C, Shohat M, Zeharia A. Identification of a novel mutation in the PNLIP gene in two brothers with congenital pancreatic lipase deficiency. *J Lipid Res.* 2014;55(2):307-12.
141. Lasher D, Szabo A, Masamune A, Chen JM, Xiao X, Whitcomb DC, Barmada MM, Ewers M, Ruffert C, Paliwal S, Issarapu P, Bhaskar S, Mani KR, Chandak GR, Laumen H, Masson E, Kume K, Hamasa S, Nakano E, Seltsam K, Bugert P, Müller T, Groneberg DA, Shimosegawa T, Rosendahl J, Férec C, Lowe ME, Witt H, Sahin-Tóth M. Protease-Sensitive Pancreatic Lipase Variants Are Associated With Early Onset Chronic Pancreatitis. *Am J Gastroenterol.* 2019;114(6):974-83.
142. Szabó A, Xiao X, Haughney M, Spector A, Sahin-Tóth M, Lowe ME. A novel mutation in PNLIP causes pancreatic triglyceride lipase deficiency through protein misfolding. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1852(7):1372-9.
143. Toldi V, Kassay N, Szabó A. Missense PNLIP mutations impeding pancreatic lipase secretion cause protein misfolding and endoplasmic reticulum stress. *Pancreatology.* 2021;21(7):1317-25.
144. Tözsér J, Zahuczky G, Bagossi P, Louis JM, Copeland TD, Oroszlan S, Harrison RW, Weber IT. Comparison of the substrate specificity of the human T-cell leukemia virus and human immunodeficiency virus proteinases. *Eur J Biochem.* 2000;267(20):6287-95.
145. Fehér A, Boross P, Sperka T, Miklóssy G, Kádas J, Bagossi P, Oroszlan S, Weber IT, Tözsér J. Characterization of the murine leukemia virus protease and its comparison with the human immunodeficiency virus type 1 protease. *J Gen Virol.* 2006;87(Pt 5):1321-30.
146. Golda M, Mótyán JA, Mahdi M, Tözsér J. Functional Study of the Retrotransposon-Derived Human PEG10 Protease. *Int J Mol Sci.* 2020;21(7).
147. Toldi V, Szabó A, Sahin-Tóth M. Inactivation of mesotrypsin by chymotrypsin C prevents trypsin inhibitor degradation. *J Biol Chem.* 2020;295(11):3447-55.
148. Szmola R, Sahin-Tóth M. Pancreatitis-associated chymotrypsinogen C (CTRC) mutant elicits endoplasmic reticulum stress in pancreatic acinar cells. *Gut.* 2010;59(3):365-72.
149. Zahuczky G, Boross P, Bagossi P, Emri G, Copeland TD, Oroszlan S, Louis JM, Tözsér J. Cloning of the bovine leukemia virus proteinase in *Escherichia coli* and comparison of its specificity to that of human T-cell leukemia virus proteinase. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1478(1):1-8.
150. Dunn BM, Gustchina A, Wlodawer A, Kay J. Subsite preferences of retroviral proteinases. *Methods Enzymol.* 1994;241:254-78.
151. Boross P, Bagossi P, Copeland TD, Oroszlan S, Louis JM, Tözsér J. Effect of substrate residues on the P2' preference of retroviral proteinases. *Eur J Biochem.* 1999;264(3):921-9.
152. Fenyőfalvi G, Bagossi P, Copeland TD, Oroszlan S, Boross P, Tözsér J. Expression and characterization of human foamy virus proteinase. *FEBS Lett.* 1999;462(3):397-401.
153. Menard A, Mamoun RZ, Geoffre S, Castroviejo M, Raymond S, Precigoux G, Hospital M, Guillemain B. Bovine leukemia virus: purification and characterization of the aspartic protease. *Virology.* 1993;193(2):680-9.
154. Gazda LD, Joóné Matúz K, Nagy T, Mótyán JA, Tözsér J. Biochemical characterization of Ty1 retrotransposon protease. *PLoS One.* 2020;15(1):e0227062.
155. Golda M, Mótyán JA, Nagy K, Matúz K, Nagy T, Tözsér J. Biochemical Characterization of Human Retroviral-Like Aspartic Protease 1 (ASPRV1). *Biomolecules.* 2020;10(7).

156. Ha JJ, Gaul DA, Mariani VL, Ding YS, Ikeda RA, Shuker SB. HTLV-I protease cleavage of P19/24 substrates is not dependent on NaCl concentration. *Bioorg Chem.* 2002;30(2):138-44.
157. Robinson BS, Riccardi KA, Gong Y, Guo Q, Stock DA, Blair WS, Terry BJ, Deminie CA, Djang F, Colonna RJ, Lin P. BMS-232632, a Highly Potent Human Immunodeficiency Virus Protease Inhibitor That Can Be Used in Combination with Other Available Antiretroviral Agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(8).
158. Kovalevsky AY, Liu F, Leshchenko S, Ghosh AK, Louis JM, Harrison RW, Weber IT. Ultra-high Resolution Crystal Structure of HIV-1 Protease Mutant Reveals Two Binding Sites for Clinical Inhibitor TMC114. *J Mol Biol.* 363(1).
159. Mótyán JA, Miczi M, Tózsér J. Dimer Interface Organization is a Main Determinant of Intermonomeric Interactions and Correlates with Evolutionary Relationships of Retroviral and Retroviral-Like Ddi1 and Ddi2 Proteases. *Int J Mol Sci.* 2020;21(4).
160. Korber BK, C.; Foley, B.; Hahn, B.; McCuthan, F.; Mellors, J.; Sodroski, J. Human Retroviruses and AIDS. Los Alamos Lab. Los Alamos NM 1997; III.50–III.60. .
161. Xiong R, Siegel D, Ross D. Quinone-induced protein handling changes: implications for major protein handling systems in quinone-mediated toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2014;280(2):285-95.
162. Bagossi P, Bander P, Bozóki B, Tózsér J. Discovery and significance of new human T-lymphotropic viruses: HTLV-3 and HTLV-4. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2009;7(10):1235-49.
163. Laco GS. HIV-1 protease substrate-groove: Role in substrate recognition and inhibitor resistance. *Biochimie.* 2015;118:90-103.
164. van Geenen EJ, Smits MM, Schreuder TC, van der Peet DL, Bloemena E, Mulder CJ. Smoking is related to pancreatic fibrosis in humans. *Am J Gastroenterol.* 2011;106(6):1161-6; quiz 7.
165. Sliwinska-Mosson M, Milnerowicz H, Jablonowska M, Milnerowicz S, Nabzdyk S, Rabczynski J. The effect of smoking on expression of IL-6 and antioxidants in pancreatic fluids and tissues in patients with chronic pancreatitis. *Pancreatol.* 2012;12(4):295-304.
166. Tagawa Y, Hiramatsu N, Kasai A, Hayakawa K, Okamura M, Yao J, Kitamura M. Induction of apoptosis by cigarette smoke via ROS-dependent endoplasmic reticulum stress and CCAAT/enhancer-binding protein-homologous protein (CHOP). *Free Radic Biol Med.* 2008;45(1):50-9.
167. Bahadar H, Maqbool F, Mostafalou S, Baeeri M, Gholami M, Ghafour-Boroujerdi E, Abdollahi M. The molecular mechanisms of liver and islets of Langerhans toxicity by benzene and its metabolite hydroquinone in vivo and in vitro. *Toxicol Mech Methods.* 2015;25(8):628-36.
168. Ru N, Xu XN, Cao Y, Zhu JH, Hu LH, Wu SY, Qian YY, Pan J, Zou WB, Li ZS, Liao Z. The Impacts of Genetic and Environmental Factors on the Progression of Chronic Pancreatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2021.
169. Barreto SG. How does cigarette smoking cause acute pancreatitis? *Pancreatol.* 2016;16(2):157-63.
170. Eiserich JP, van der Vliet A, Handelman GJ, Halliwell B, Cross CE. Dietary antioxidants and cigarette smoke-induced biomolecular damage: a complex interaction. *Am J Clin Nutr.* 1995, 62(6):1490-1500.
171. Bodnar JA, Morgan WT, Murphy PA, Ogden MW. Mainstream smoke chemistry analysis of samples from the 2009 US cigarette market. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2012, 64(1):35-42.
172. English JC, Deisinger PJ. Metabolism and disposition of hydroquinone in Fischer 344 rats after oral or dermal administration. *Food Chem Toxicol.* 2005;43(3):483-93.
173. Scheele G, Bartelt D, Bieger W. Characterization of human exocrine pancreatic proteins by two-dimensional isoelectric focusing/sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis. *Gastroenterology.* 1981;80(3):461-73.

174. Lombardo D, Guy O, Figarella C. Purification and characterization of a carboxyl ester hydrolase from human pancreatic juice. *Biochim Biophys Acta*. 1978;527(1):142-9.
175. Zhou J, Sahin-Tóth M. Chymotrypsin C mutations in chronic pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2011;26(8):1238-46.
176. LaRusch J, Lozano-Leon A, Stello K, Moore A, Muddana V, O'Connell M, Diergaard B, Yadav D, Whitcomb DC. The Common Chymotrypsinogen C (CTRC) Variant G60G (C.180T) Increases Risk of Chronic Pancreatitis But Not Recurrent Acute Pancreatitis in a North American Population. *Clin Transl Gastroenterol*. 2015;6:e68.
177. Fjeld K, Weiss FU, Lasher D, Rosendahl J, Chen JM, Johansson BB, Kirsten H, Ruffert C, Masson E, Steine SJ, Bugert P, Cnop M, Grützmann R, Mayerle J, Mössner J, Ringdal M, Schulz HU, Sendler M, Simon P, Sztromwasser P, Torsvik J, Scholz M, Tjora E, Férec C, Witt H, Lerch MM, Njolstad PR, Johansson S, Molven A. A recombined allele of the lipase gene CEL and its pseudogene CELP confers susceptibility to chronic pancreatitis. *Nat Genet*. 2015;47(5):518-22.
178. Tjora E, Gravdal A, Engjom T, Cnop M, Johansson BB, Dimcevski GG, Molven A, Fjeld K. Protein misfolding in combination with other risk factors in CEL-HYB1-mediated chronic pancreatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2021;33(6):839-43.
179. Orekhova A, Geisz A, Sahin-Tóth M. Ethanol feeding accelerates pancreatitis progression in CPA1 N256K mutant mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2020;318(4):G694-G704.

# 10. A PHD ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK



**DEBRECENI  
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400  
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

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

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

## A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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





**További közlemények**

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

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 16,798**

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

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

Debrecen, 2022.09.09.



## 11. TÁRGYSZAVAK/KEYWORDS

cigaretta füst	<i>cigarette smoke</i>
endoplazmatikus retikulum stressz	<i>endoplasmic reticulum stress</i>
hidrokinon	<i>hydroquinone</i>
HIV-1 proteáz inhibitor	<i>HIV-1 protease inhibitor</i>
HTLV	<i>HTLV</i>
humán pankreász lipáz	<i>human pancreatic lipase</i>
humán T-limfotróp vírus	<i>human T-lymphotropic virus</i>
krónikus pankreatitisz	<i>chronic pancreatitis</i>
lipáz mutáció	<i>lipase mutation</i>
retrovirális proteáz	<i>retroviral protease</i>

## 12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

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

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

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

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

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

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm **családomnak**, akik nélkül ez disszertáció nem valósulhatott volna meg.

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

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

## **13. FÜGGELÉK**