

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

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

Golda Mária

Témavezető: Prof. Dr. Tózsér József



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2021

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
1. BEVEZETÉS	7
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	9
2.1. ASZPARTIL PROTEÁZOK	9
2.2. RETROVÍRUS-SZERŰ ASZPARTIL PROTEÁZOK AZ EUKARIÓTA GENOMBAN	17
2.2.1. <i>peg10</i> (apai kromoszómáról expresszáladó gén 10).....	19
2.2.2. <i>ASPRV1</i> (retrovírus-szerű aszpartil proteáz 1).....	24
3. CÉLKITŰZÉS	28
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	29
4.1. PEG10 FEHÉRJE VIZSGÁLATOK	29
4.1.1. <i>In silico</i> analízis.....	29
4.1.2. <i>PEG10</i> szekvenciák módosítása és klónozása.....	29
4.1.3. Rekombináns <i>PEG10</i> fehérje expressziója eukarióta sejtekben.....	33
4.1.4. <i>HEK293T</i> sejtek lízise.....	33
4.1.5. Rekombináns fluoreszcens szubsztrát termeltetése prokarióta sejtekben.....	34
4.1.6. <i>In vitro</i> proteolitikus aktivitásvizsgálat.....	35
4.1.7. A pH optimum meghatározása.....	35
4.1.8. Western-blot analízis.....	35
4.1.9. A proteolitikus aktivitás gátolhatóságának <i>in vitro</i> ellenőrzése.....	37
4.1.10. Életképesség vizsgálat (<i>MTT assay</i>).....	37
4.1.11. Sejtprolifерáció vizsgálat (áramlási citometria).....	38
4.2. ASPRV1 FEHÉRJÉK VIZSGÁLATA	38
4.2.1. <i>In silico</i> vizsgálat.....	38
4.2.2. <i>SASPáz</i> formák klónozása és mutagenezise.....	39
4.2.3. <i>GST-SASPáz</i> fehérjék expressziója és tisztítása.....	40
4.2.4. Szintetikus oligopeptid szubsztrátok.....	41
4.2.5. <i>GST-SASP14</i> enzimaktivitás mérése.....	41
4.2.6. Kinetikai paraméterek meghatározása.....	42
4.2.7. <i>GST-SASP14</i> gátolhatósági vizsgálata <i>HIV-1</i> proteáz inhibitorokkal.....	43
4.2.8. Autoaktiváció vizsgálata.....	43
4.2.9. Hasítási hely azonosítása <i>HPLC-(+)</i> <i>ESI-TOF</i> módszerrel.....	44
4.2.10. Hasítási hely azonosítása <i>MALDI-TOF-MS</i> módszerrel.....	45
4.2.11. Statisztikai elemzés.....	46

5.	EREDMÉNYEK	47
5.1.	PEG10 VIZSGÁLATA	47
5.1.1.	<i>In silico</i> vizsgálati eredmények	47
5.1.2.	PEG10 fehérjék tranziens expressziójának ellenőrzése	49
5.1.3.	PR _{PEG10} proteolitikus aktivitás bizonyítása	51
5.1.4.	Proteolitikus hasítóhely becslése	52
5.1.5.	PEG10 ubikvitinálása	55
5.1.6.	PR _{PEG10} transz-aktivitás vizsgálata	57
5.1.7.	A pH hatása az autoproteolízisre	59
5.1.8.	HIV proteáz inhibitorok hatása a PEG10 autoproteolízisre	59
5.1.9.	Életképesség és sejtproliferáció vizsgálata	60
5.2.	ASPRV1 VIZSGÁLATA	64
5.2.1.	ASPRV1 <i>in silico</i> vizsgálati eredmények	64
5.2.2.	Mutációk tervezése a SASPáz fehérjékben	66
5.2.3.	GST-fúziós fehérjék expressziója és tisztítása	67
5.2.4.	GST-SASP14 enzim vizsgálatok	68
5.2.5.	Optimális pH és ionkoncentráció meghatározása	70
5.2.6.	Urea-disszociációs állandó (UC ₅₀) meghatározása	71
5.2.7.	Szubsztrát specificitás vizsgálat	73
5.2.8.	Foszforiláció hatása a szubsztrát hidrolízisre	76
5.2.9.	Gátolhatósági vizsgálat HIV-1 proteáz inhibitorokkal	77
5.2.10.	GST-SASP28 enzimformák autoproteolízisének vizsgálata	81
5.2.11.	Autoaktiváció jelenségének bizonyítása	84
6.	MEGBESZÉLÉS	86
7.	ÖSSZEFOGLALÁS	94
7.	SUMMARY	95
8.	IRODALOMJEGYZÉK	96
9.	TÁRGYSZAVAK/KEYWORDS	109
10.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	110
11.	FÜGGELÉK	112

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ASPRV1	retrovírus-szerű aszpartil proteáz 1; <i>retroviral-like aspartic protease 1</i>
CA	kapszid fehérje
Coomassie	„Coomassie Brilliant Blue 250” fehérje festék
Ddi1	DNS károsodás által indukálódó protein; <i>DNA damage-inducible protein 1</i>
DMSO	dimetil-szulfoxid
DTT	ditiotritol, (2S,3S)-1,4-bis-szulfanilbután-2,3-diol
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
ESI	elektroporlasztásos ionizáció
<i>gag</i>	retrovírusok szerkezeti fehérjéjét kódoló csoportspecifikus antigén
GAPDH	gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz
GFP	zölden fluoreszcensfehérje; <i>green fluorescent protein</i>
GST	glutation S-transzferáz
HaCaT	humán keratinocita sejtvonal
HEK293T	humán embrionális vese sejtvonal
HIV	humán immundeficiencia vírus
HPLC	magasnyomású folyadékkromatográf
HRP	tormaperoxidáz; <i>horseradish peroxidase</i>
IC ₅₀	50 %-os gátláshoz tartozó inhibitor koncentráció
IN	integráz
IPTG	izopropil-β-D-tiogalaktopiranozid
k _{cat}	katalitikus sebességi állandó
k _{cat} /K _M	specifitási állandó
K _i	gátlási állandó

K_M	Michaleis-Menten állandó
LTR	hosszú, ismétlődő DNS szekvencia; <i>long terminal repeat</i>
MA	mátrix fehérje
MALDI	mátrix segített lézer deszorpció/ionizáció
MBP	maltóz kötő fehérje; <i>maltose-binding protein</i>
MES	2-(N-morfolino)-etán-szulfonsav
MS	tömegspektrometria
MTT	3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólium-bromid
NC	nukleokapszid fehérje
OD ₆₀₀	optikai denzitás 600 nm hullámhosszon mérve
P1, P2, P3, P4, P5	szubsztrát aminosavrésze (Schechter és Berger [1967] alapján)
PBS	foszfát-pufferelt sóoldat; <i>Phosphate-buffered saline</i>
PEI	polietilénimin
<i>peg10</i>	apai kromoszómáról expresszáldó gén 10; <i>paternally expressed gene 10</i>
PEG10	<i>peg10</i> gén által kódolt fehérje
Pipes	piperazin-N, N'-bisz(2-etánszulfonsav)
PMSF	fenil-metil-szulfonil-fluorid
<i>pol</i>	retrovírusok enzimjeit kódoló gén, polimeráz
PR _{PEG10}	<i>peg10</i> gén által kódolt proteáz enzim
QqTOF	kvadrupól-repülési idő analizátor
RF	olvasási keret; <i>reading frame</i>
RF1 _{PEG10}	<i>peg10</i> gén által kódolt első olvasási keret, fő PEG10 fehérje
RF1/RF2 _{PEG10}	<i>peg10</i> gén által kódolt első és második olvasási keret, PEG10 poliprotein
fsRF1/RF2 _{PEG10}	keretelesűszás mutáns RF1/RF2 _{PEG10}

S1, S2, S3, S4, S5	az enzim szubsztrátkötő helyei (Schechter és Berger [1967] alapján)
SASPáz	bőr-specifikus aszpartil proteáz, <i>skin-specific aspartic protease</i>
SASP37	transzmembrán doménnel rendelkező teljes méretű SASPáz fehérje
SASP28	28 kDa molekulaméretű SASPáz enzim előfehérje
SASP14	14 kDa molekulaméretű enzimfehérje
TBS	Tris-pufferelt sóoldat; <i>Tris-buffered saline</i>
TOF	repülési idő analizátor
TTBS	TBS oldat kiegészítve 0,05 % Tween20 detergenssel
Tween 20	polioxietilén(20)-szorbitán-laurát
UC ₅₀	50 %-os disszociációhoz tartozó urea koncentráció

1. BEVEZETÉS

Az 1990-ben indult Humán Genom Projekt eredménye rávilágított a mobilis genetikai elemek biológiai fontosságára. Az evolúció során a humán genom ezen elemek amplifikációjának sorozatán ment keresztül, melyek többsége RNS intermedier útján integrálódott. Összefoglaló néven ezeket az elemeket retroelemeknek nevezzük. Bár az integrálódott szekvenciák egy része nem-kódoló DNS szakasz, vannak mégis olyan retrotranszpozon-, illetve retrovírus-eredetű kódoló szekvenciák, melyekről transzlálódó fehérjék kulcsszerepet játszhatnak akár prenatálisan, az embrionális fejlődés során, akár a születést követően is. Ennek következtében a csíravonalba integrálódott szekvenciák a mai napig érdekes kutatási területét jelentik nem csak a molekuláris biológiának, hanem az orvostudománynak is.

A *peg10* (*paternally expressed gene 10*) egy retrotranszpozon eredetű gén, mely a szekvencia-analízisek alapján 125 millió éve integrálódott a ma élő eleve szülő emlősök csíravonalába. Bár az evolúció során elvesztette hosszú ismétlődő terminális szekvenciáit (*long terminal repeat*, LTR), ezzel együtt a transzpozícióra való képességét, mégis a Ty3/Gypsy retrotranszpozon eredetére utalnak az erősen konzervált régiói, valamint a specifikus, a humán génállományban rendkívül ritka, -1 irányú riboszómális kereteltolódás révén végbemenő transzlációs mechanizmus megléte is. A *peg10* létezését 2001-ben három, egymástól független munkacsoport is leírta. Az ezt követő években megjelent vizsgálati eredmények bizonyították, hogy a *peg10* expressziója esszenciális az embrionális fejlődés korai szakaszában, egereken végzett vizsgálatok alapján hiánya letális, míg a fehérje posztnatális expressziós zavara számos súlyos betegséggel mutat összefüggést. Bár több jelentős publikáció is megjelent szerepével kapcsolatban, a tanulmányok egy része azonban csupán PEG10 megjelöléssel azonosítja a fehérjét, így nem kapunk minden esetben információt az első olvasási keretről átíródó (RF1_{PEG10}) és/vagy a teljes hosszúságú olvasási keretről szintetizálódó poliprotein (RF1/RF2_{PEG10}) arányáról a vizsgált mintákban. Kíváncsiságunkat tovább erősítette, hogy az utóbbi években megjelent tanulmányok is pusztán említés szintjén tesznek utalást a kereteltolódás révén keletkezett RF1/RF2_{PEG10} fehérjében található aszpartil proteáz meglétére, mely enzimnek a teljes PEG10 fehérje „életében” betöltött szerepe jelenleg még tisztázatlan. Érdeklődésünk éppen ezért a keveset tanulmányozott *peg10* által kódolt aszpartil proteázra irányult.

További példa a domesztikálódott, majd a gazdaszervezetben kulcsszerepet betöltő enzimfehérjét kódoló génre a retrovírus-szerű aszpartil proteáz 1 (*asprv1*). Retrovirális eredetére a virális proteázokkal való nagyfokú szekvencia hasonlóság mellett az enzim autoaktivációra való képessége és homodimer formában való működése is utal. Funkcióját tekintve fontos szerepet játszik az epidermisz profillagrin-fillagrin átalakulásában, ezért más néven bőr specifikus aszpartil proteáznak is nevezik (*skin-specific aspartic protease*, SASPáz). Bár az ASPRV1 fehérjéről szóló tanulmányok túlnyomó többsége az epidermiszben betöltött szerepét vizsgálja, egy 2017-ben megjelent publikáció új irányt jelölt ki a fehérje kutatásának. Hawkins és munkatársai humán és egér ICAM1⁺ neutrofil granulocitákban kimutatták az ASPRV1 fehérje expresszióját. A tanulmány továbbá rámutatott mRNS szinten történő mennyiségi különbségeire kontroll, enyhébb vagy súlyosabb tüneteket mutató szklerózis multiplex betegek mintái között. Mindezen eredmények rávilágítanak, hogy bár sok mindent tudunk a fehérjéről, további vizsgálatok szükségesek a teljesebb kép eléréséhez. Kísérleteinkkel tehát az enzim működésének pontosabb megismerése volt a cél. Megvizsgálni az enzimfehérje működésének optimális körülményeit, szubsztrátkötő zsebek aminosav-preferenciáját, különböző, akár klinikumban is alkalmazott proteáz inhibitorok enzimműködésre gyakorolt gátlási hatékonyságát, mely ismeretek a jövőben terápiás szempontból is fontosak lehetnek.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

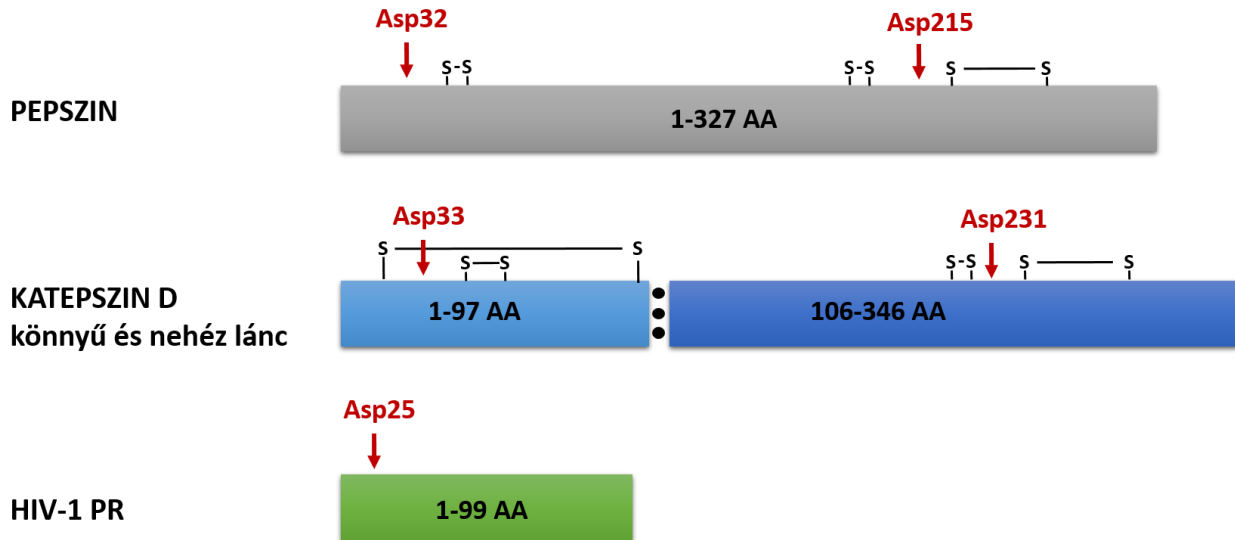
2.1. Aszpartil proteázok

Az aszpartil proteázok a négy legjelentősebb proteolitikus enzimescsoport egyikét alkotják, míg többi tagját a szerin-, cisztein- és metalloproteázok jelentik. Az IUBMB (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) nemzetközileg alkalmazott besorolási rendszere alapján, mely az enzimeket a katalizált reakció szerint osztályozza, EC 3.4.23. katalógusszámmal regisztrálta az aszpartil proteázokat. Az EC rövidítés az *Enzyme Commission* kifejezésből ered, míg a számozás alapján a hidrolázok (EC 3.), ezen belül is a peptidkötés hasítását végző peptidázok/proteázok (EC 3.4.) csoportjába tartoznak, melyben az endopeptidázok/proteinázok katalitikus aszpartátja nélkülözhetetlen a szubsztrát hidrolízise során (EC 3.4.23.). A MEROPS adatbázis alapján tovább bonthatjuk az aszpartil proteázok családját, melyek közül megemlíthetjük az eukariótákban kódolt celluláris/pepszin-szerű aszpartil proteázokat (A1), egy igen fontos csoportot képviselnek a virális proteázok/retropepszinek is (A2), mely csoport jól ismert és a mai napig intenzíven kutatott példája az 1-es típusú humán immundeficiencia vírus (HIV-1) proteáza (PR) (**Rowlings és Barrett, 1995**), de akár kiemelhetjük az eukarióta genomban megtalálható, retrovírus-szerű aszpartil proteázokat is (DNS károsodás által indukálódó protein 1, Ddil [A28.003]; retrovírus-szerű aszpartil proteáz 1, ASPRV1 [A28.004]).

Az említett csoportok katalitikus aktivitásához két aszpartát együttműködésére van szükség az enzim aktív centrumában. Azonban míg az eukarióta enzimek esetében előfordul, hogy egy fehérjelánc megfelelő harmadlagos szerkezetének kialakulása révén kerülnek kölcsönhatásba a katalitikus aminosavak, mint például a pepszin esetében az Asp32 és az Asp215 (**Fujinaga és mtsai, 1995**), vagy poszt-transzlációs módosítás révén a proformából felszabaduló fehérjeláncok belső diszulfid hidak és hidrofób kölcsönhatások által alkotott stabil szerkezete segíti a megfelelő konformáció kialakulását – erre példa a katepszin D könnyű és nehéz lánc (**Kobayashi és mtsai, 1992**) - addig a virális eredetű proteázok két monomer fehérjelánca homodimert alkotva alakítja ki a katalízis helyét biztosító aktív centrumot (**1. ábra**)(**Dunn és mtsai, 2002**).

Közös jellemzője a celluláris és virális enzimeknek, hogy relatíve alacsony pH optimummal bírnak. Példaként említhetjük a gyomornedvben azonosított pepszin (pH 2) (**Foltmann, 1988**) vagy a lizoszómális katepszin D (pH 3,5) (**Barrett, 1970**) optimum értékeit, valamint az egér leukémia

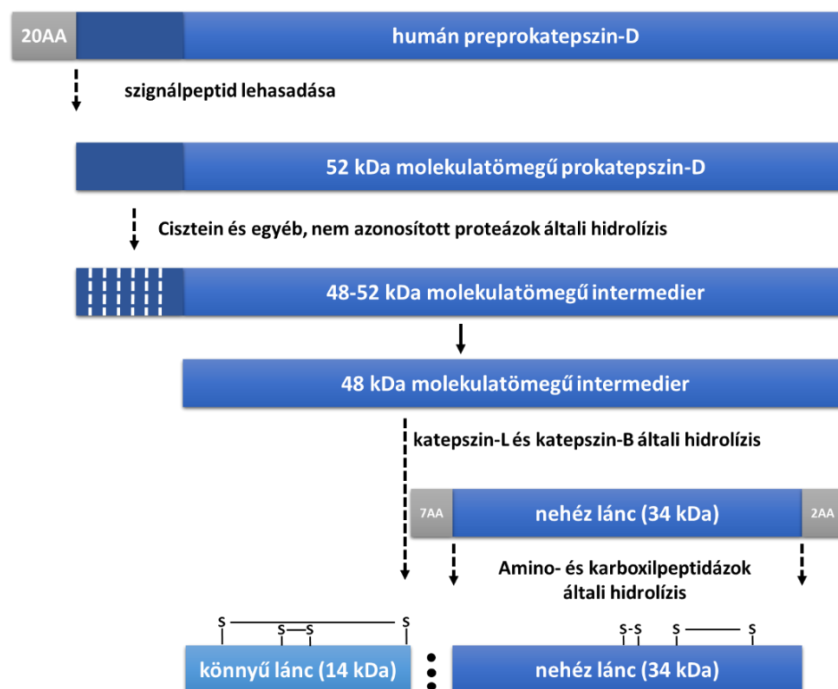
vírus (MLV) (pH 5,0) (Fehér és mtsai, 2006), illetve a humán patogén vírusok közül a HIV-1 (pH 4-6) (Boross és mtsai, 1999) enyhén savas pH értéken mért aktivitási maximumát is. Azonban találunk példát arra is az embert fertőző vírusok között, melyek aszpartil proteázainak működési optimuma közel semleges pH értéket mutat, ilyen pl. a humán foamy vírus (HFV) (pH 6,6-6,8) (Fenyőfalvi és mtsai, 1999).



1. ábra. Aszpartil proteázokban a katalitikus Asp aminosavak helyzete. Pepszin és katepszin D esetében jelöltük a fehérjeszerkezeteket stabilizáló diszulfid hidakat (S-S) és a katepszin D esetében a könnyű és nehéz láncot összekötő hidrofób kölcsönhatást (●). A számozás a pepszin esetében Foltmann (Foltmann, 1988), a katepszin D esetében Baldwin (Baldwin és mtsai, 1993), míg a HIV-1 proteáz esetében Louis (Louis és mtsai, 2000) munkái alapján van feltüntetve.

A legtöbb aszpartil proteáz proformában szintetizálódik, ahogy egyéb más extracelluláris proteáz is. A prekursorok, vagy zimogén formák több lépéses érési folyamaton mennek keresztül, mely az aktív forma kialakulását eredményezi, ami a katepszin D esetében is egy jól tanulmányozott folyamat (2. ábra). A katepszin D szintézise a durva felszínű endoplazmatikus retikulumban (RER) történik preproenzim formájában. A szintetizálódott fehérje számos, de nem autoproteolitikus hasításon megy keresztül, míg a szintetizálódott formától eljut az érett fehérjéig. Transzlációval egyidejű (kotranszlációs) módosítás révén lehasítódik a szignál szekvencia, melynek köszönhetően létrejön a közel 52 kDa molekulaméretű prokatepszin D. Ezt követően a fehérje további celluláris enzimek általi proteolízisen megy keresztül, mely eredményeként 48-52

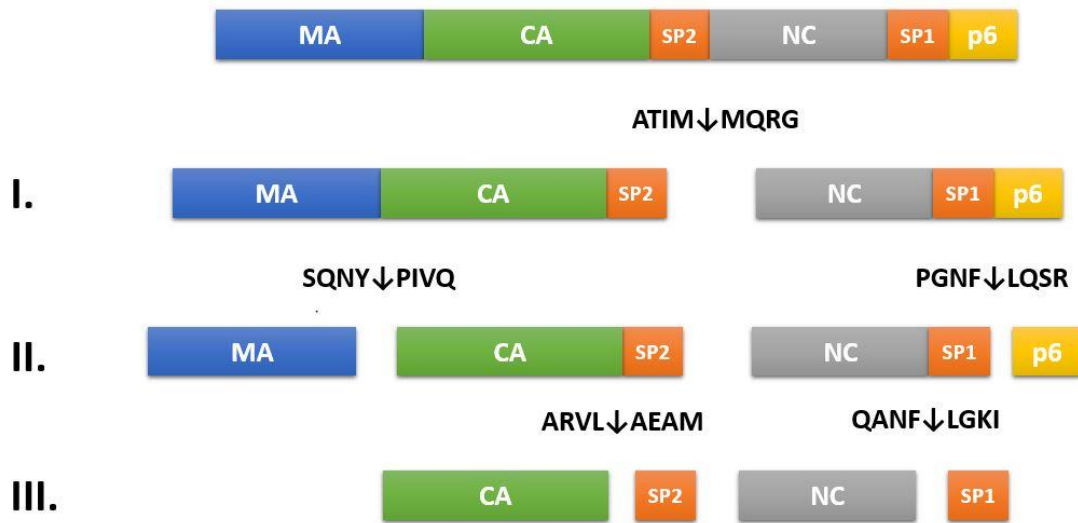
kDa közötti molekulatömegű köztes termékek keletkeznek. Végül a 48 kDa-os fehérjét két cisztein proteáz, a katepszin-L és katepszin-B további két termékre bontja. Létrejön a kisebb molekulatömegű könnyűlánc (14 kDa), illetve a 34 kDa molekulatömegű nehézlánc, melyről további aminosavak hasítódnak le, N-terminálisan (7 aa) és C-terminálisan (2 aa) egyaránt (**Laurent-Matha, 2006**). A kialakult fehérjeláncok konformációját 4 diszulfid híd (Cys27-Cys96, Cys46-Cys53, Cys222-Cys226 és Cys265-Cys-302) és hidrofób kölcsönhatás stabilizálja, mely szerkezetben a két katalitikus aszpartát funkcióképes közelségbe kerül egymással (**Baldwin és mtsai, 1993; Minarowska és mtsai, 2008**).



2. ábra. A humán katepszin D érésének sematikus ábrázolása. Az ábrán jelöltük a fehérjeszerkezetet stabilizáló diszulfid hidakat (S-S), valamint a könnyű és nehéz láncot összekötő hidrofób kölcsönhatást (•). Az ábra Laurent-Matha és munkatársai közleménye alapján készült (**Laurent-Matha és mtsai, 2006**).

A HIV-1 esetében a vírus saját aszpartil proteáza végzi a fehérjeérés proteolitikus lépéseit. Példként említhetjük a vírus 55 kDa méretű Gag poliproteinjét, amely a gag (csoportspecifikus antigén) génszakaszról a gazdasejt citoszoljában transzlálódik, majd a vírus érése során 3 fő szerkezeti fehérjére hasítódik. A mátrixra (MA), mint membrán-kötő doménre, a kapszid (CA) és a nukleokapszid (NC) doménekre, ezeken felül pedig még található egy rövid p6 domén, valamint

két rövid összekötő szakasz is (*short linear peptide*, SP) (Freed, 2015). *In vitro* vizsgálatok alapján öt fő hasítóhelyet azonosítottak a Gag fehérjében, melyek hasítási sorrendje és a hasítás frekvenciája eltért egymástól (3. ábra). Kezdő lépésként a NC-SP1-p6 domén elválasztása történik a Gag fehérje N-terminális részétől, majd a MA lehasítódik a CA-SP2 fehérjeszakasztól, ezzel egyidejűleg a p6 domén elválása is megtörténik a NC-SP1-től. Végezetül az SP1 és SP2 rövid összekötő szakaszok is leválnak a NC és CA fehérjékről (Pettit és mtsai, 1994). A hasítóhelyek mutációs vizsgálataival bebizonyították, hogy a vírus „életképessége” szempontjából nemcsak a hasítás sorrendje fontos, hanem a teljes folyamat lejátszódása is (Coren és mtsai, 2007; Lee és mtsai, 2009).

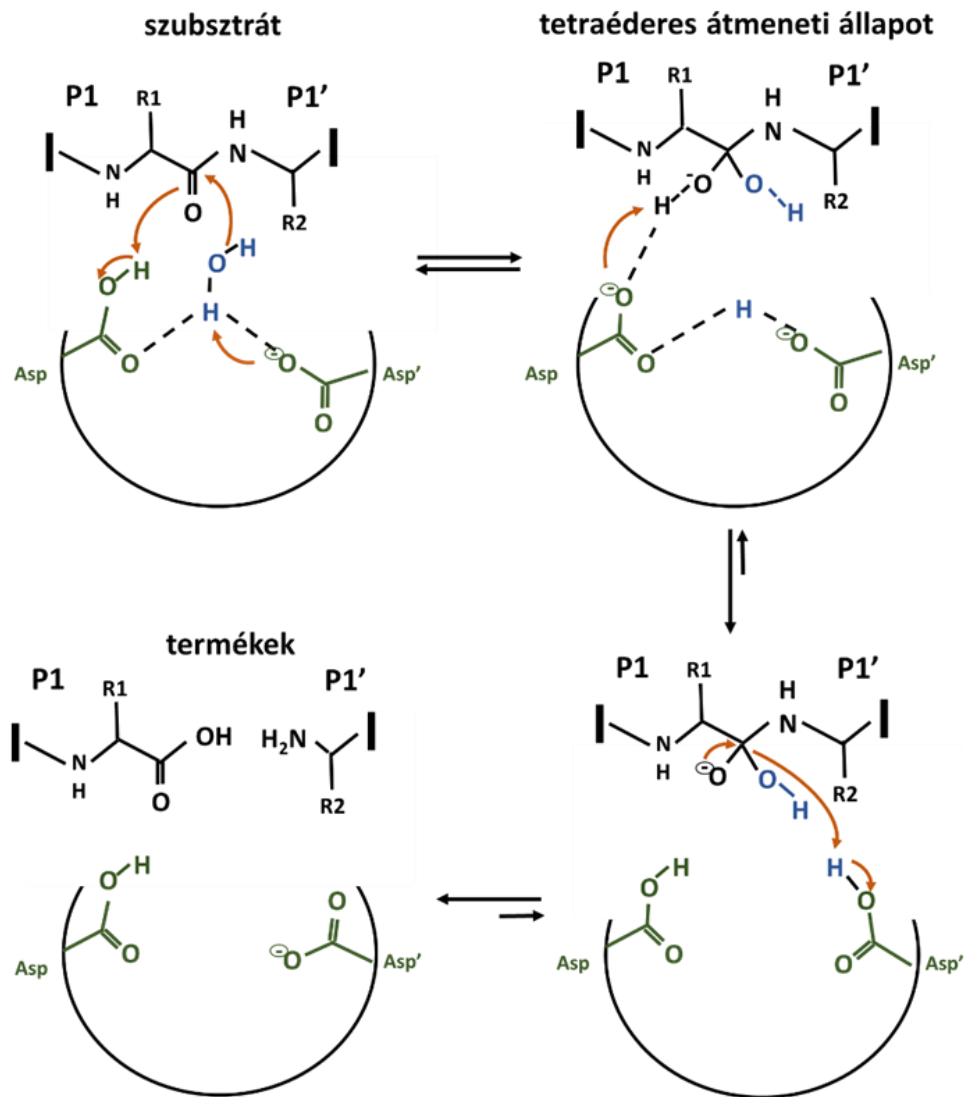


Semleges pH értéken a hasítás sorrendje: SP2↓NC (1x) > SP1↓p6 (9x) ≥ MA↓CA (14x) > CA↓SP2 (400x)

3. ábra. A HIV-1 Gag processzálas lépései és intermedierjei. Az ábrán feltüntetett aminosav szekvenciák közé illesztett fekete nyilak jelzik a Gag fehérje öt hasítási helyét. A processzálas három fő fázisát I-III. számozás jelöli. A hasítási helyek szekvenciái alatt *in vitro* kísérleti rendszerben, semleges pH-n meghatározott reakciósebességek viszonyát látjuk az első hasítási hely (SP2↓NC) reakciósebességéhez viszonyítva (Pettit és mtsai, 1994).

Az aszpartil proteázok általi hidrolízis mechanizmusának általánosan elfogadott sémáját először Suguna és munkatársai írták le 1987-ben (4. ábra) (Suguna és mtsai, 1987). Elméletük szerint a két katalitikus Asp közül csak az egyik található protonált formában (proton donor), míg

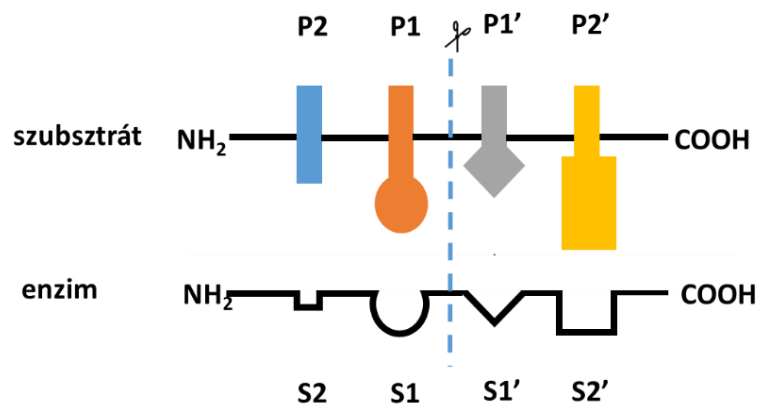
a másik deprotonált forma (proton akceptor) az aszpartátok között elhelyezkedő nukleofil vízmolekulát aktiválva megtámadja a szubsztrát peptidkötésben található karbonil csoportjának szénatomját. Mindeközben a karbonilcsoport oxigénje protonálódik az aktív hely másik aszpartátja révén, létrehozva egy tetraédeses átmeneti állapotot. A szubsztrát amid csoportjának protonálása és átrendeződése a tetraédeses állapot felbomlását eredményezi, majd a szubsztrát a folyamat végén két termékre hasad (**Brik és Wong, 2002**).



4. ábra. Peptid hasítás általános sémája aszpartil proteázok esetében. Az ábrán a vízmolekulák atomjai kék színnel, míg a katalitikus aszpartátok és a reakcióban résztvevő funkció csoportok zöld színnel jelöltek. A hasítás általános sémáját bemutató ábra Brik és Wong ábrája alapján készült (**Brik és Wong, 2002**).

A retrovirális proteázok esetében az aktív hely katalitikus aminosavai (D-S/T-G) hidrogénkötések hálózatán keresztül kapcsolódnak egymáshoz, melyet más néven tűzoltófogásnak (*fireman's grip*) nevezhetünk. A HIV-1 tripletet alkotó aminosavak (D-T-G) katalízisben betöltött szerepét kísérletes vizsgálatokkal is igazolták. A motívum Asp25 és Asp25' aminosavai közvetlen kapcsolatba kerülnek a szubsztráttal/inhibitorral, így módosítása az enzimfehérje inaktivációjához vezetett. A Thr 26 és Thr26' között kialakuló erős hidrogénkötés az enzimdimer stabilitásában, így a tűzoltófogás kialakításában játszik fontos szerepet. Ugyanis míg a Thr26 és Thr26' Ala-ra történő szubsztitúciója a katalitikus aktivitás megszűnéséhez vezetett a kapcsolat kialakításához szükséges –OH csoportok hiánya miatt, addig a kovalensen kapcsolt Ala-mutáns monomerek képesek voltak a szubsztrát hidrolízisre (Strisovsky és mtsai, 2000). A triád harmadik tagját képviselő Gly27 és Gly27' a szubsztrát befogadásában és stabilizálásában vesz részt, segítve ezzel a katalitikus Asp-ok szubsztrát támadását (Manger, 2001).

A szubsztrátkötő zsebek és a zsebekbe illeszkedő szubsztrát aminosavrészek egységes elnevezését 1967-ben vezette be Schechter és Berger (Schechter és Berger, 1967). A hasítási helytől N-terminális irányba haladva P1, P2, stb., míg C-terminális irányban P1', P2', stb. elnevezéseket alkalmazzuk. Az enzim szubsztrátkötő alhelyeinek megnevezése az előzőek analógiaként S1, S2, stb., illetve S1', S2', stb. (5. ábra).



5. ábra. Szubsztrát aminosavrészeinek és a szubsztrátkötő alhelyeknek a jelölése. Az ábrán szaggatott kék vonallal jelöljük a hasítás helyét. Az N-terminális és a C-terminális irányába haladva található aminosavrészeket növekvő számozását jelöltük az ábrán. Az ábra Schechter és Berger illusztrációja alapján készült (Schechter és Berger, 1967).

Az aszpartil proteázok általános inhibitoraként az irodalom a pepsztatint említi. Umezawa és munkatársai 1970-ben *Actinomyces* baktériumból izolálták a pepsztatin molekulát, mely só-származékaival együtt alkalmas pepszin inhibitornak bizonyult (**Umezawa és mtsai, 1970**). Szerkezetét tekintve a pepsztatin A egy pentapeptid (izovaleril-Val-Val-Sta-Ala-Sta-OH), mely két sztatin aminosavat tartalmaz. Gátló hatását a központi helyen található sztatin hidroxil csoportja (**6. ábra**) és az enzim katalitikus Asp-jai közötti direkt kölcsönhatással fejt ki, így mimikálva a tetraédes átmeneti állapot létrejöttét, kizárva ezzel a vízmolekulával való kölcsönhatást (**Fitzgerald és mtsai, 1990; Fujinaga és Chernai 1995**).



6. ábra. A pepsztatin A szerkezeti képlete. A központi helyzetben lévő sztatin piros színnel látható kiemelve. Kép forrása: *Cambridge MedChem Consulting*.

Reverzibilis, peptid-mimetikus inhibitoroként a pepsztatin több más celluláris aszpartil proteázt is gátol, példaként megemlíthetjük a katepszin D (**Knight és Barrett, 1975**) és a renin enzimfehérjéket is (**Pourmutabed és mtsai, 1982**). Katoh és munkatársai *in vitro* kísérlet során meghatározták az 50 %-os gátláshoz tartozó inhibitor koncentrációt (IC₅₀) a katepszin D (8,8 nM), a pepszin (14 nM) és a renin esetében is (6,6 μM), mely eredmények alapján igen hatékony inhibitornak bizonyult (**Katoh és mtsai, 1987**). Virális proteázok gátlása esetén azonban már kevésbé minősül hatékony inhibitornak. Ugyanebben a tanulmányban az 1-es típusú humán T-sejtes leukémia vírus (HTLV-1), a marha leukémia vírus (BLV) és a Moloney egér leukémia vírus (MMLV) proteázok esetében a pepsztatin A csupán viszonylag magas koncentráció (0,1-0,5 mM) alkalmazása mellett volt alkalmas inhibitor-hatás kiváltására (**Katoh és mtsai, 1987**).

A pepsztatin A felfedezésével szinte egyidőben egy másik munkacsoport, Sato és Murao *Streptomyces naniwaensis* fajból aszpartil proteázok gátlására alkalmas új inhibitorot izolált (S-PI, mint *Streptomyces*-pepszin inhibitor) (**Sato és Murao, 1971**), melyről a vizsgálatok során kiderült, hogy gyakorlatilag a pepsztatin A N-acetil származéka (acetil-pepszatin, Ac-Val-Val-Sta-Ala-Sta-

OH) (**Fukumara és mtsai, 1971**). Az acetil-pepszatin HIV-1 ($K_i=20$ nM, pH 4,7) (**Richards és mtsai, 1989a**) és HIV-2 ($K_i=5$ nM, pH 4,7) (**Richards és mtsai, 1989b**) proteázok hatékony inhibitorának bizonyult. Gátlási képességét pepszatin A inhibitorral együtt HIV-1 és xenotrópikus egér leukémia vírussal-rokon vírus (XMRV) proteázok esetében is összehasonlították, és *in vitro* kísérleti eredmények alapján hatékonyabb inhibitornak mutatkozik, mint a pepszatin A (**Matúz és mtsai, 2012**).

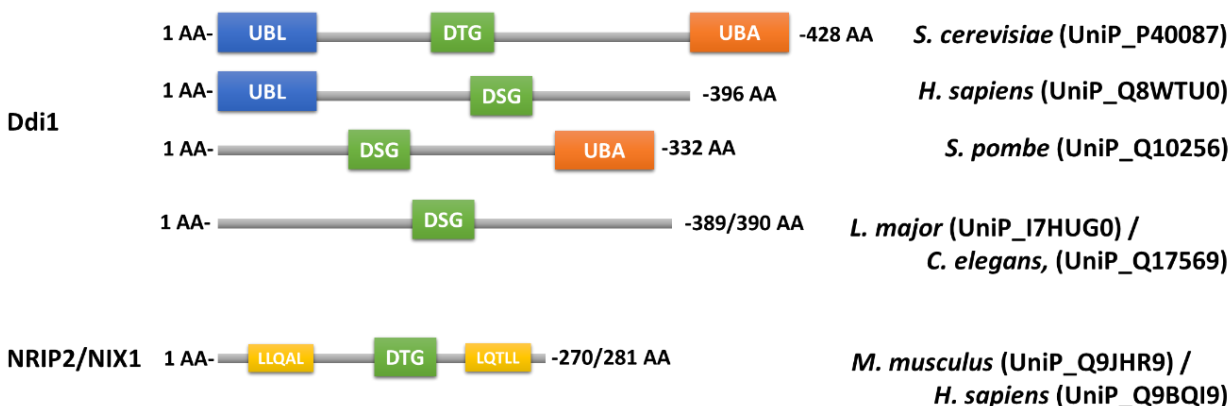
Habár a pepszatinokat a klinikumban nem alkalmazzák, gátlási mechanizmusuk megismerése nagyban hozzásegítette a tudományt új hatóanyagok kifejlesztéséhez humán patogén vírusokkal szemben. A HIV-1 esetében kifejlesztett első és második generációs inhibitorok többsége peptid-mimetikus, melyek az enzim aktív centrumához kötődve gátolják a Gag és Gag-Pol fúziósfehérjék hidrolízisét, így a vírusérést. Kivételt képez ezalól a tipranavir és a darunavir, melyek nem peptid-mimetikus inhibitorok (**1. táblázat**). A tipranavir a többi inhibitorhoz képest kevesebb hidrogénkötéssel képes kötődni a HIV proteázhoz, mely nagyobb rugalmasságot biztosít az inhibitornak az enzim aktív helyet érintő változásaiban (**Larder és mtsai, 2000**). A darunavir „molekuláris flexibilitásának” köszönhetően szintén az enzim különböző régióihoz képes kötődni (aktív hely, lebeny régió), így alkalmazkodni tud a proteáz enzim szerkezetében bekövetkező módosulásokhoz (**De Meyer és mtsai, 2004; Purohit és Sethumadhavan, 2009**). Napjainkban az első generációs inhibitorok közül a ritonavirt már csak „érzékenyítő hatóanyagként” (*booster drug*) használják HIV fertőzött betegek terápiájában, más inhibitorokkal kombinálva (**Mahdi és mtsai, 2015**). A ritonavir ugyanis a citokróm P-450 3A4 (CYP3A4) enzimrendszerre gyakorolt gátló hatása miatt növeli a CYP3A4 által oxidált más anti-HIV gyógyszerek plazmakoncentrációját, ezáltal javítva a klinikai hatékonyságot (**Sevrioukova és Poulos, 2010**). Érdeemes azonban megjegyezni, hogy a HIV PR gátlására használt inhibitorokkal szembeni gyorsan kialakuló rezisztencia visszavetette a peptid-mimetikus inhibitorok klinikai használatát.

1. táblázat. Klinikailag engedélyezett HIV inhibitorok. A táblázat Mahdi és mtsai. közleménye alapján készült (Mahdi és mtsai, 2015).

INHIBITOR	RÖVIDÍTÉS	GENERÁCIÓ	MEGJEGYZÉS
Saquinavir	SQV	I.	
Ritonavir	RTV	I.	kombinált terápiában alkalmazott, farmakokinetikai hatáserősítő szer
Indinavir	INV	I.	
Nelfinavir	NFV	I.	
Amprenavir	APV	I.	klínikumban ma már nem alkalmazott
Lopinavir/+Ritonavir	LPV	II.	fix-dózisú kombinált terápia
Atazanavir	ATV	II.	
Fosamprenavir	FPV	II.	
Tipranavir	TPV	II.	nem peptid-mimetikus
Darunavir	DRV	II.	nem peptid-mimetikus

2.2. Retrovírus-szerű aszpartil proteázok az eukarióta genomban

Míg az endogén aszpartil proteázok két-lebenyű (bilobális) szerkezeti felépítéssel rendelkeznek, mely az evolúció során génduplikáció eredményeképpen jöhetett létre (pepszin), addig egyes retrovírus, vagy retrotranszpozon eredetű aszpartil proteázok génjei csak egy katalitikus domént kódolnak és nagy valószínűséggel a retrovírusokra jellemző homodimer kialakítására képesek. (Krylov és Koonin, 2001). Ilyen, az eukarióta genomban is megtalálható retroelem a Ddi1 fehérje (*DNA-damage inducible 1*). A gén által kódolt fehérje domén szerkezetét tekintve élesztőben egy centrálisan elhelyezkedő aszpartil proteáz domént, N-terminálisan egy ubikvitin-szerű domént (*ubiquitin-like*, UBL), C-terminálisan pedig egy ubikvitin-asszociált (*ubiquitin-associated*, UBA) domént tartalmaz. Ezzel ellentétben humán és egér ortológok vizsgálatakor az aszpartil proteáz motívumon kívül csak az UBL domén, a *Schizosaccharomyces pombe* esetében az UBA domén, míg a fonálféreg *Caenorhabditis elegans* és az egysejtű *Leishmania major* esetében csak az aszpartil proteáz domén azonosítása történt meg PSI-BLAST keresés és SMART (*Simple Modular Architecture Research Tool*) módszer alkalmazásával (7. ábra) (Schultz és mtsai, 2000).



7. ábra. A Ddi1-fehérje család doménszerkezete és homológjai. Az ábrán kék szín jelöli az ubikvitin-szerű domént (UBL), zöld szín az aszpartil proteáz domént (a D-T-G illetve D-S-G az Asp-Thr/Ser-Gly konszenzus szekvencia motívumot jelöli), narancssárga az ubikvitin-asszociált domént (UBA), és citromsárga a LXXLL nukleáris receptor kötő motívumokat. Az ábra a korábban közölt összehasonlítás (Krylov és Koonin, 2001) módosításával készült az UniProt adatbázis adatai (2020.11.18.) alapján.

Az élesztő Ddi1 (*yeast* Ddi1, yDdi1) fehérje szerepét, mint extra-proteaszómális ubikvitin receptort már leírták. Ugyanis az általa hordozott UBA domén képes felismerni és megkötni a poliubikvitin láncsal megjelölt fehérjéket, míg UBL doménjén keresztül ideiglenesen a proteaszóma 26S alegységéhez kötődik, így segítve a poliubikvitinált fehérjék proteaszómális lebontását (Díaz-Martínez és mtsai, 2006). Az erősen konzervált aszpartil proteáz domén funkciója ma még nem ismert, feltételezések szerint azonban szerepet játszhat a sejtciklus kontrollálásában, mint egy eddig nem azonosított deubikvitináló enzim (Krylov és Koonin, 2001).

A humán genom két Ddi1-szerű fehérjét kódol: a 396 aminosav hosszúságú Ddi homológ 1 (*human* Ddi1, hDdi1) és a 399 aminosav hosszúságú Ddi homológ 2 (*human* Ddi2, hDdi2) fehérjéket. Genomszerveződésük alapján azt feltételezik, hogy a hDdi2 az eredeti élesztő yDdi1 ortológ, melyről retrotranszpozícióval jöhetett létre a hDdi1. Bár szekvenciájukban egyaránt megtalálható az UBL és az aszpartil proteáz domén, az UBA domén hiányzik (7. ábra). Ezért a humán Ddi1-szerű fehérjék szerepe a degradációra ítélt fehérjék proteaszómához történő szállításában és irányításában még nem tisztázott (Siva és mtsai, 2016).

A Ddi1 ortológ keresések során azonosítottak egy új csoportot az emlős genomban, mely a magreceptor-interakciós fehérje 2 nevet kapta (*nuclear receptor-interacting protein 2*, NRIP2), az irodalomban gyakran említik neuron interakciós faktor X 1-ként is (*neuronal-interacting factor X*

1, NIX-1). A fehérje kizárólag a központi idegrendszer neuronjaiban expresszálódik és LQTL motívumával (192-196 aa) a magreceptorok, míg fordított irányultságú LLQAL motívumával (87-91 aa) specifikusan retinsav (RAR) és tiroid hormon receptorokkal (TR) való kölcsönhatások kialakítására képes (7. ábra) (Greiner és mtsai, 2000). Nukleáris receptor-kötő motívumai között található egy D-T-G aszpartil-proteáz motívum, melynek szerepe a sejt funkcióját illetően nem ismert.

A 2000-es évek elején további két, az aszpartil proteázokra jellemző konszenzus katalitikus motívumot hordozó fehérjét fedeztek fel. Elsőként a kizárólag apai kromoszómáról expresszálódó PEG10 fehérjét, melyet egyidejűleg három munkacsoport is leírt (Ono és mtsai, 2001; Shigemoto és mtsai, 2001; Volf és mtsai, 2001), majd pedig a humán epidermiszben expresszálódó SASPáz-t (Bernard és mtsai, 2005).

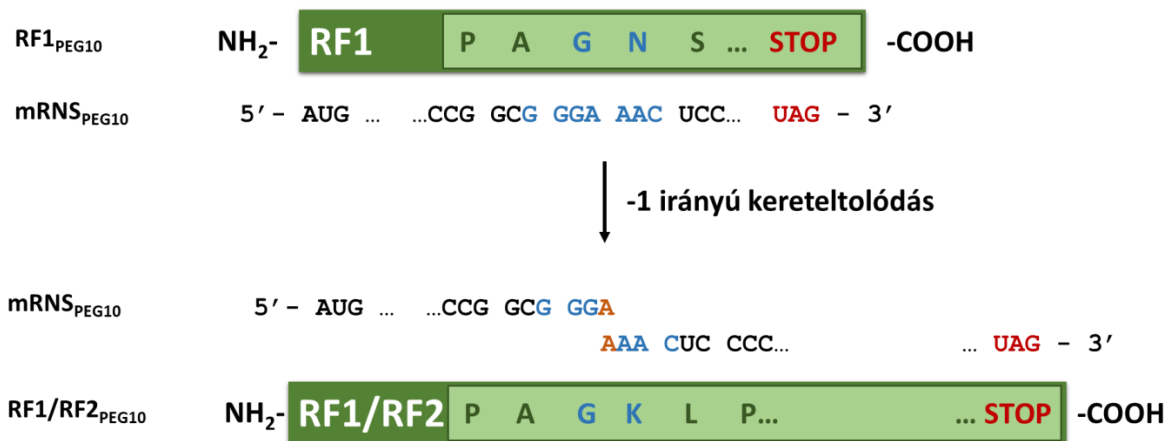
2.2.1. *peg10* (apai kromoszómáról expresszálódó gén 10)

A *peg10* a humán genomba integrálódott (7q21.3), retrotranszpozon eredetű gén, mely kizárólag apai kromoszómáról expresszálódik, míg anyai allélről történő transzkripciója DNS metilációval gátolt (Ono és mtsai, 2001). Az emberi genom több imprintált gént is hordoz, melyek többsége az egyedfejlődésben és/vagy növekedésben játszik fontos szerepet (Ishida és Moore, 2012). A *peg10* is egy ilyen imprintált régióban (*maternally imprinted gene cluster*) helyezkedik el egy másik, szintén apai allélről expresszálódó *sarcoglycan epsilon* gén (SCGE; 7q21.3) mellett (Ono és mtsai, 2001).

A *peg10*-ről több transzkript variáns is átíródhat (*peg10*-A 6573 bp, *peg10*-B 6584 bp), melyek közül a *peg10*-B alternatív splicing eredménye (Lux és mtsai, 2010). Azonban a különböző szövetekben expresszálódó PEG10 fehérje variánsok megjelenéséért nem csak az alternatív splicing és a különböző translációs start helyek tehetők felelőssé, hanem a humán génállományban igen ritka -1 irányú riboszómális kereteltolás translációs mechanizmusa, valamint a poszt-transzlációs autoproteolízis is (Clark és mtsai, 2007; Lux és mtsai, 2010).

A programozott riboszómális kereteltolódást (+/- irányultság) 1985-ben publikálták először (Craigén és mtsai, 1985; Jacks és Varmus 1985). Bár baktériumok és vírusok esetében is ismert a jelenség, celluláris géneknél rendkívül ritka mechanizmusnak számít. A *peg10* esetében a retrotranszpozonokra és retrovírusokra is jellemző -1 irányú kereteltolódást figyelték meg (Clark

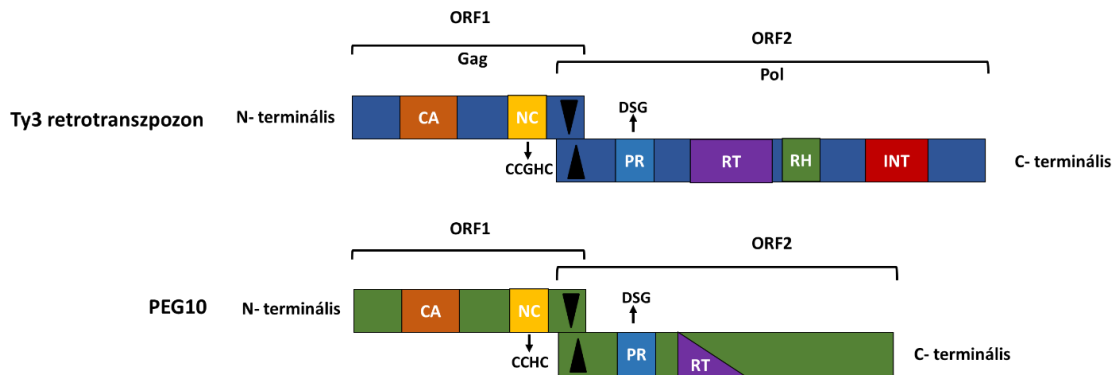
és mtsai, 2007). A mechanizmus működéséért egy 7 nukleotidból álló úgynevezett „csúszószekvencia” felelős, mely követi az általános mintázatot X XXY YYZ (amelyben X: U,G vagy A; az Y: U vagy A; míg a Z: U, C vagy A), ami a *peg10* esetében G GGA AAC szekvenciának felel meg (Clark és mtsai, 2007; Lux és mtsai, 2010). Amennyiben nem történik keretváltás, az mRNS csúszószekvenciát követően UAG stop kodonnal zárja a transzlációt, míg -1 ugrás esetén az olvasási keret váltásának köszönhetően végigíródhat a teljes RF1/RF2_{PEG10} fehérjét kódoló szekvencia (8. ábra). A -1 irányú kereteltolódás hatékonysága irodalmi adatok alapján 10-30 % közé tehető *peg10* esetében (Shigemoto és mtsai, 2001; Lux és mtsai, 2005).



8. ábra. A -1 irányú kereteltolódás következtében keletkező PEG10 fehérjeformák. A csúszószekvenciát kék színnel, a STOP kodont piros színnel, míg a -1 ugrás (csúszás) helyét narancs színnel jeleztük.

A *peg10* LTR-retrotranszpozon eredetére nem csak a ritka transzlációs mechanizmusa, hanem a konzervált domén szerkezete is utal. Az LTR-retrotranszpozonok végein megtalálható a jellegzetes hosszúságú ismétlődő szekvencia (*long terminal repeat*, LTR), az egymást átfedő nyitott olvasási keretek (*open reading frame*, ORF1 és ORF2) és az általuk kódolt CA és NC szerkezeti fehérjéket kódoló *gag*, valamint a PR, reverz transzkriptáz (RT) és integráz (IN) enzimeket kódoló *pol* (9. ábra) (Dodonova és mtsai, 2019). Habár a *peg10* az evolúció során elvesztette LTR régióit, bilobális CA-szerű doménjével (Campillos és mtsai, 2006), cink-ujj (CX₂CX₄HX₄C) és erősen konzervált aszpartil proteáz motívumaival (D-S-G), valamint a nem teljes-hosszúságú reverz transzkriptáz régiójával (Volf és mtsai, 2001) az LTR-

retrotranszpozonok Ty3/Gypsy családjába sorolható (9. ábra). A retrovírusoktól eltérően a retrotranszpozonokból hiányzik a burokfehérjéket kódoló gén (*envelope, env*) és az életciklusukban nincs extracelluláris állapot (Dodonova és mtsai, 2019). Azonban míg a szintén Ty3/Gypsy retrotranszpozon családból származó Arc fehérje esetében kimutatták, hogy képes CA-szerű struktúrákat kialakítani és extracelluláris vezikulába lefűződve információt átadni célfehérjéknek mRNS formájában (Pastuzyn és mtsai, 2018; Ashley és mtsai, 2018), addig a *peg10* transzpozíciójára, vagy az Arc fehérjéhez hasonló, nem-indukált CA-szerű struktúra kialakítására ma még nincs bizonyíték (Abed és mtsai, 2019). A jövőben mindazonáltal izgalmas kutatási iránynak bizonyulhat a PEG10 extracelluláris formában történő lefűződésének vizsgálata, ugyanis a PEG10, hasonlóan az Arc fehérjéhez, konzervált N- és C-terminális CA doménnel rendelkezik (Campillos és mtsai, 2006; Myrum és mtsai, 2015).



9. ábra. A Ty3 retrotranszpozon és a PEG10 sematikus doménszerkezete. A kereteltolódás helyét fekete háromszögekkel jelezzük. Rövidítések: ORF, nyitott olvasási keret (*open reading frame*); MA, mátrix-szerű domén; CA, kapszid-szerű domén; NC, nukleokapszid-szerű domén cink ujj motívummal (CCGHC és CCHC); PR, aszpartil proteáz domén (D-S-G motívummal); RT, reverz transzkriptáz, ami PEG10 esetében nem teljes-hosszúságú; RH, RNázH; INT, integráz. A Ty3 doménszerkezetét bemutató ábrarész (Sandmeyer és Clemens, 2010) és a PEG10-et bemutató ábrarész is irodalmi adatok alapján készült (Volf és mtsai, 2001; Campillos és mtsai, 2006).

A PEG10 aszpartil proteáz doménjének vizsgálatára kevés információt találunk az irodalomban. A katalitikus aktivitás megfigyelését először 2005-ben publikálták (Lux és mtsai, 2005). Lux és munkatársai COS-1 sejteket transzfektáltak *peg10* szekvenciákat hordozó plazmid DNS-sel, míg kontrollként üres plazmidot alkalmaztak. A transzlálódó fehérjét N-terminálisan His₆-címkével fuzionálták (^{His}PEG10-RF1, ^{His}PEG10-RF1/2), mely a fehérje kimutatásában volt segítségükre. A ^{His}PEG10-RF1/2 fehérjét kódoló DNS plazmid transzfekcióját követően, Western-blot technika segítségével, nem csak a teljes méretű PEG10-RF1/2 és PEG10-RF1 fehérjét sikerült

kimutatniuk, hanem egy közel 35 kDa molekulatömegű terméket is, melyet PEG10 által hasított N-terminális fragmentnek neveztek el (PEG10-CNF) (Lux és mtsai, 2005).

Clark és munkatársai szintén bizonyították a *peg10* által kódolt aszpartil proteáz aktivitását. Az általuk vizsgált emlősök fehérjeszekvenciáinak PEG10 ortológjainak összehasonlításakor erősen konzervált régióként azonosították az aszpartil proteáz domént (Clark és mtsai, 2007). Funkcionalitásának bizonyítására mutációkat hoztak létre a PEG10 ORF1-2 fúziósfehérjét kódoló szekvenciában. Az első mutáció (*frameshift* mutáns 1) egy plusz nukleotid inzercióját jelentette a csúszószekvenciát követő 1441. pozícióban (NM_015068), ezzel elérve a teljes PEG10 fehérje (ORF1-2 olvasási keret) átíródását. A második mutáció esetében a csúszószekvenciában (1436. pozíció) hajtottak végre A→G szubsztitúciót a konzervált motívum integritásának megszakítása céljából (G GGG AAC T, a cserélt nukleotid félkövér, aláhúzott jelölést kapott), így befolyásolva a -1 irányú csúszás lehetőségét (*frameshift* mutáns 2). A harmadik mutáció esetében a proteáz proteolitikus aktivitását gátolták a katalitikus aminosav cseréjével (Asp→Ala), a *frameshift* helyen nem történt változtatás. A PEG10 fehérje variánsokat kódoló DNS szekvenciákkal COS-7 sejteket transzfektáltak, majd a termelődött fehérjéket Western-blot technika segítségével mutatták ki.

Eredményeiket összefoglalva elmondhatjuk, hogy a vad típusú-, illetve a *frameshift* mutáns 1 szekvenciákkal transzfektált COS-7 sejtekben proteolitikus termékek is kimutathatóak voltak (anti-ORF1 és anti-ORF2 antitestek alkalmazásával), míg sem a *frameshift* mutáns 2, sem pedig a katalitikusan inaktív proteáz domént tartalmazó PEG10 esetében ez nem volt tapasztalható. Clark és munkatársai továbbá megállapították, hogy a proteáz mutáns fehérje esetében a *frameshift* hatékonysága lényegesen javult az eredeti szekvenciát kódoló mintához viszonyítva (eredeti ~20 %-ról ~65 %-ra növekedett) (Clark és mtsai, 2007).

A PEG10 fehérje sejten belüli lokalizációját vizsgálva detektálták a citoplazmában és a sejtmagban is egyaránt (Tsou és mtsai, 2003; Lux és mtsai, 2005; Okabe és mtsai, 2003), mely feltételezhetően a kötőpartner(ek) jelenlététől is függ. PEG10 esetében, az egyik legjelentősebb kölcsönható fehérjét Okabe és munkatársai igazolták. Tanulmányukban a SNU423 hepatóma sejtvonalon vizsgálták a PEG10 fehérje sejtnövekedésre gyakorolt hatását. Az SNU423 sejtvonalban a PEG10 nem expresszálódik endogén módon, így stabil transzfekciónak révén juttatták be a fehérjét expresszáló konstruktot. Összehasonlítva a kontroll mintákat a PEG10 fehérjét expresszáló vonallal, szignifikáns különbséget tapasztaltak. Míg a kontrollsejtek növekedése

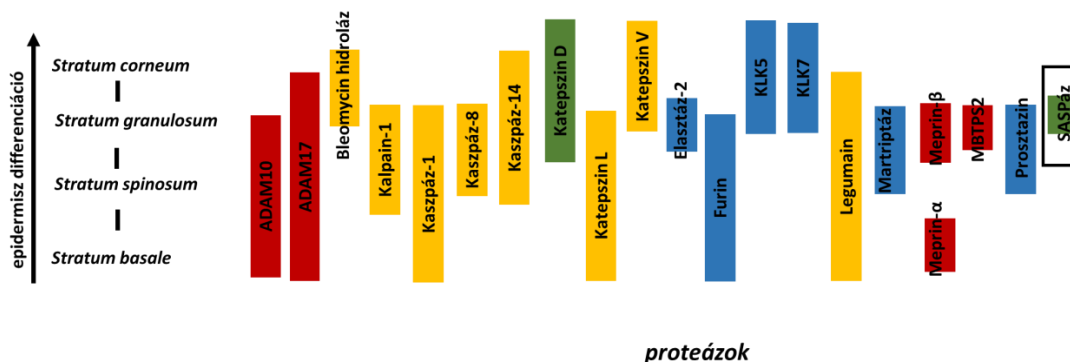
éhezés alatt (0,1 % FBS tartalmú tápfolyadékban) drasztikusan lecsökkent, a PEG10 fehérjét expresszáló sejtek tovább osztódtak. A munkacsoport bizonyította, hogy a PEG10 fehérje E3 ubikvitin-protein ligázzal (SIAH1) képes kölcsönhatásba lépni, mely fehérje részt vesz a lebontásra ítélt proteinek ubikvitinációjában és proteaszóma általi megsemmisítésében. Öt különböző máj sejtvonalon (HepG2, Huh7, Alexander, SNU423, SNU475) vizsgálták a SIAH1 fehérje hatását (rekombináns adenovírus-alapú vektor, Ad-SIAH1), melynek indukált expressziója egyértelműen az életképes sejtek számának a csökkenéséhez vezetett. Annak bizonyítására azonban, hogy a PEG10 ezt a folyamatot blokkolni képes, stabil transzfekcióval létrehozott SNU423-PEG10 sejteket fertőztek Ad-SIAH1 vektorral. Azokban a kontroll a sejtekben, melyekben a SIAH1 fehérjeexpresszió dominált, megnövekedett sejthalált tapasztaltak, míg PEG10 fehérjével történő koexpressziója anti-apoptotikus hatással bírt (**Okabe és mtsai, 2003**). Bár a PEG10 anti-apoptotikus hatását más munkacsoportok is megfigyelték már (**Li és mtsai, 2006; Yoshibayashi és mtsai, 2007**), érdekességképpen megemlíthető, hogy a daganatellenes hatással bíró kurkumin jelenlétében PEG10 fehérje downreguláció is megfigyelhető (**Kreutz és mtsai, 2018**).

További bizonyított interakciós partnerként megemlíthetjük az aktivin-szerű kináz 1-et (*activin receptor-like kinase 1*, ALK1), amely a TGF- β -1 családba tartozó sejtmembrán receptor. Lux és munkatársai koimmunprecipitációval vizsgálták az RF1_{PEG10} TGF- β receptorcsalád (I. és II. típusú) több tagja közötti kölcsönhatást a receptorfehérjék indukált expressziója révén COS-1 sejtekben. Az eredmény alapján kizárólag az ALK1 mutatott erős interakciót PEG10 fehérjével. A PEG10 ALK1-kötő régiója a PEG10-RF1 fehérje majd 200 aminosavnyi szekvenciáját érinti (*PEG10-RF1/ALK1-interaction region* [PAIR]; 76-275 aa), míg az ALK1 fehérjében két doménből álló struktúra (*ALK1/PEG10-RF1 interaction domain*, APID1 és APID2) felelős a PEG10 fehérje kötéséért, melyek egymástól 100 aminosav távolságban találhatóak. Koimmunprecipitációs vizsgálatok szerint azonban a PEG10-RF1⁷⁶⁻²⁷⁵ kötőrégió önmagában nem alkalmas az ALK1 kötésére, vélhetően a fehérjét érintő konformációs változások miatt (**Lux és mtsai, 2005**).

Bár a PEG10 fehérje széleskörű irodalommal rendelkezik, a tanulmányok jelentős része csak említés szintjén foglalkozik a *peg10* által kódolt proteázzal. Erősen konzervált jellege, valamint bizonyított katalitikus aktivitása indokolja az enzimfehérje szerepének alaposabb vizsgálatát.

2.2.2. ASPRVI (retrovírus-szerű aszpartil proteáz 1)

A bőr jelenti a legelső védelmi vonalat a szervezetünk és a külvilág között. Integritásának és homeosztázisának fenntartásához proteolitikus kaszkádok aktivációja és a célfehérjék processzálása szükséges (8. ábra) (DeVeer és mtsai, 2014). Az epidermiszben azonosított első proteolitikus kaszkádok olyan enzimfehérjék csoportjai, melyek ugyanazt a fiziológiai folyamatot látják el. Ilyen például a kallikrein-rokon peptidáz (KLK) kaszkád, mely azonosítása a hámlás (deszkvamáció) jelensége és a KLK proteázok (KLK5, KLK7, KLK14) aktivációs kapcsolatának vizsgálata során történt (Brattsand és mtsai, 2005; Borgono és mtsai, 2006), de megemlíthetjük a membrán kötött matriptázt és prosztazint is, melyek a végső differenciációs lépésben játszanak fontos szerepet (Netzel-Arnett és mtsai, 2006). 2005-ben azonban egy további szereplőt is azonosítottak az epidermisz differenciációban, mely az aszpartil proteázok csoportjába tartozik.

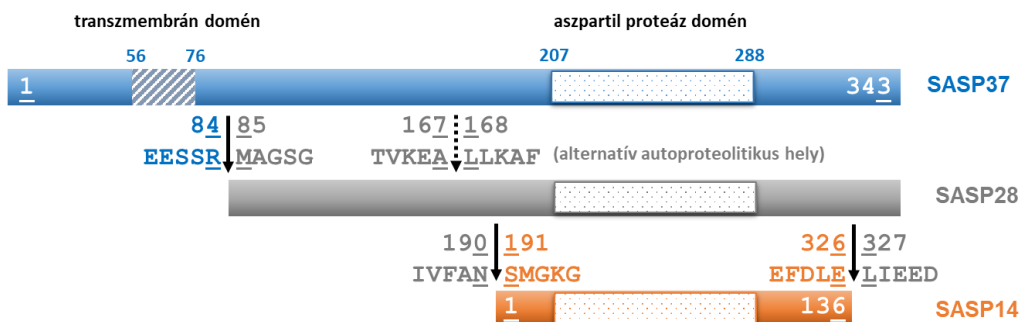


10. ábra. A hámréteg differenciációjában résztvevő enzimfehérjék és elhelyezkedésük. A proteáz családok külön színnel jelöltek (metalloproteáz: piros, cisztein proteáz: sárga, aszpartil proteáz: zöld, szerin proteáz: kék). Rövidítések: ADAM, diszintegrin és metalloproteáz domént tartalmazó fehérje 10; KLK, kallikrein-rokon peptidáz; MBTPS2, membrán-kötött transzkripciós faktor proteáz-2; SASPáz, bőr-specifikus aszpartil proteáz. Az ábra DeVeer és munkatársai közleménye alapján készült (De Veer és mtsai, 2014).

Bernard és munkatársai epidermális differenciációt és a benne résztvevő fehérjék funkcióját vizsgálták. A differenciációhoz kapcsolt fehérjék expressziós profiljának 2D elektroforézissel történő ellenőrzésekor egy 14 kDa molekulatömegű, 5,8-as izoelektromos ponttal rendelkező fehérjét szekvencia analízisnek vetettek alá, mely 100 %-os azonosságot mutatott egy intron nélküli "munu" nevű gén szekvenciájával (2p13.3). A gén által kódolt teljes fehérje 342 aminosav hosszúságúnak bizonyult (37 kDa, pI 5,3), míg alternatív formája 28,5 kDa méretű (259 aa, pI 5,22). Online adatbázisok segítségével több jellegzetes domént, illetve egy aszpartil proteáz motívumot azonosítottak a fehérjében. Megfigyelték, hogy a fúziós fehérjeforma autoproteolízisen

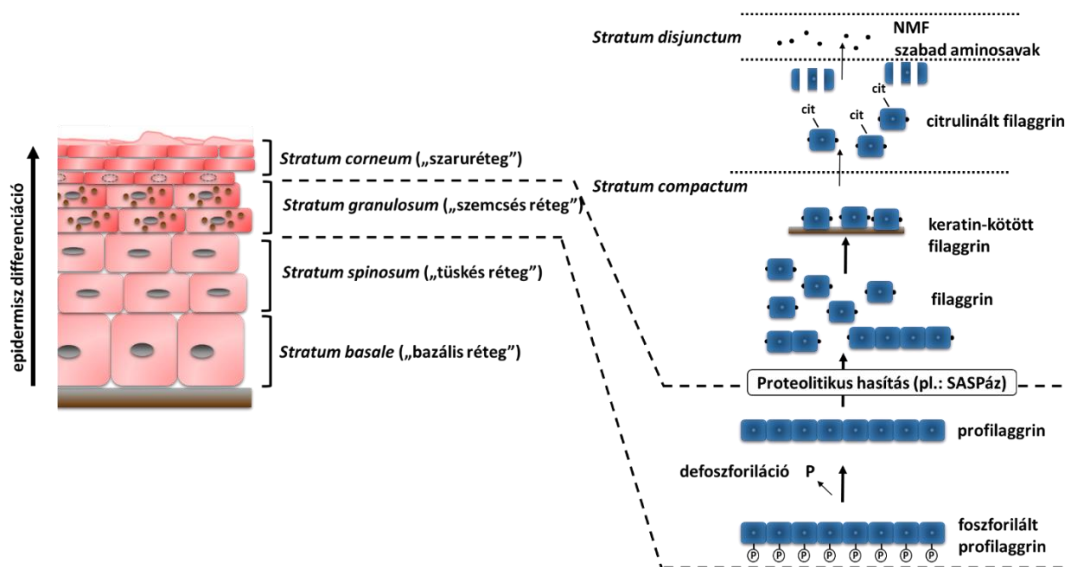
megy keresztül, mely indinavirral (HIV-1 PR inhibitor) gátolható (**Bernard és mtsai, 2005**). Az újonnan azonosított bőrspecifikus enzimfehérjét SASPáz-nak nevezték, de elterjedten alkalmazza az irodalom a poliprotein általános megnevezéseként az ASPRV1 rövidítést is.

A *stratum granulosum*-ban expresszálódó, vélhetően enzimatikusan inaktív poliprotein processzálódása után kisebb méretű darabokra fragmentálódik, amelyek nevüket a molekulatömegük mérete alapján kapták (**Bernard és mtsai, 2005; Matsui és mtsai, 2006**). A teljes méretű SASP37 fehérje egy transzmembrán doménnel rendelkezik, mely a 28 kDa molekulatömegű SASP28 előfehérjéből hiányzik. A SASP28 autoprocesszálódásával keletkező 14 kDa-os fehérje (SASP14) pedig csak egy proteáz doménnel bír (**11. ábra**) (**Bernard és mtsai, 2005**).



11. ábra. SASPáz fehérjék és autoproteolitikus helyeik sematikus ábrája. Az ábrán feltüntetett számozások a SASP37 forma szerint jelöltek.

Az érett SASP14 enzim természetes szubsztrátjának a profilaggrin (pro-FLG) tekinthető, más egyéb természetes szubsztrát ezidáig nem került azonosításra. A pro-FLG több mint 400 kDa molekulatömeggel rendelkezik, és filaggrin (FLG) ismétlődésekből áll. Érése során a pro-FLG a legtöbb esetben a GSFLY↓QVST monomer linker szekvenciáknál hasítódik (a nyíl a szekvencián belüli hasítási helyet jelöli), amely az FLG monomerek felszabadulásához vezet. A humán monomerek molekulatömege 37 kDa (**Matsui és mtsai, 2011**), melyek tovább fragmentálódnak rövidebb peptidekre, majd aminosavakra (**12. ábra**). A degradáció során felszabaduló termékek természetes nedvességet és védelmet biztosítanak a bőr számára külső környezeti behatások ellen (*natural moisturizing factors*, NMF) (**Matsui és mtsai, 2011**).



12. ábra. Az epidermisz differenciáció rétegei és a profilaggrin-filaggrin átalakulás sematikus ábrája. Rövidítés: NMF *natural moisturizing factors*, természetesen hidratáló elemek. Az ábra Matsui és munkatársai munkája alapján készült (Matsui és mtsai, 2011).

A pro-FLG-nak az ASPRV1 általi processzálását, valamint a bőrvédő funkciójának jelentőségét helyspecifikus mutagenézissel, valamint ASPRV1 gén-kiütött egerek felhasználásával is igazolták (Bernard és mtsai, 2005; Matsui és mtsai, 2006; Matsui és mtsai, 2011). Az ASPRV1-nek szerepe lehet a bőr regenerációján túl, amelyet egérmodell kísérletekkel megerősítettek (Hildenbrand és mtsai, 2010), a bőr elszarusodásodási zavarát érintő *ichthyosis* (halbőrűség) nevű betegség kutyákban (Brauer és mtsai, 2017) és emberekben történő kialakulásában is (Boyden és mtsai, 2020). Ugyanis az ASPRV1 fehérjét kódoló gén heterozigóta misszensz mutációi az autoproteolitikus hely közelében (K199E; R311P; P314T) a fehérje funkcionális zavarait okozzák. A mutációk leginkább a proteolitikus képesség elvesztésével járnak érintve az autoproteolízist és a fillaggrin processzálást (Boyden és mtsai, 2020). A betegség tünetei mögött lappangó molekuláris mechanizmusok kevésbé ismertek, így további vizsgálatok szükségesek a nem-processzálódó ASPRV1 és filaggrin felhalmozódás következményeinek megértéséhez.

Korábbi tanulmányok kizárólag az ASPRV1 fehérje epitéliumban történő expressziójára és funkciójára fókuszáltak, nemrég azonban kiderült, hogy az ASPRV1 egér és humán immunrendszer ICAM⁺ neutrofil granulocitáiban is kifejeződik (Hawkins és mtsai, 2017). Nagy mennyiségben azonosították mRNS-ét neutrofil granulocitákban más fehérvérsejtekkel ellentétben, mennyiségi emelkedése pedig kimutatható súlyos szklerózis multiplex betegségben

szenvedő betegek agyi lézióiban (**Hawkins és mtsai, 2017**). Ezen eredmények az ASPRV1 új, immunsejtekben is jelentős szerepét támasztják alá gyulladásos folyamatok, különösen a már igazolt autoimmun *encephalomyelitis* és a szklerózis multiplex esetében (**Hawkins és mtsai, 2017**). Miközben az enzim néhány funkcionális tulajdonságát feltárták egyes munkacsoportok (**Bernard és mtsai, 2005; Matsui és mtsai, 2006; Matsui és mtsai, 2011**), a fehérje karakterizálására továbbra is nagy szükség van bőr- és immun-elváltozások célterápiáiban való fontosságára tekintettel (**Hawkins és mtsai, 2017; Woodberry és mtsai, 2018; Yang és mtsai, 2019**).

3. CÉLKITŰZÉS

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

A PEG10 fehérje szabályozott expressziója kulcsszereppel bír mind az embrionális fejlődés során, mind pedig posztnatálisan. A kifejeződésében bekövetkező változások súlyos betegségekkel állnak összefüggésben, azonban az irodalomban említett utalások többsége csupán PEG10 megjelöléssel azonosítja a fehérjét, míg az RF1/RF2_{PEG10} poliprotein erősen konzervált aszpartil proteáz doménjének szerepe a fehérje életében ma még tisztázatlan. Kutatásaink célja az enzimfehérje aktivitásának ellenőrzése, működésének biokémiai jellemzése és sejtes rendszerben történő vizsgálata volt.

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

Mindezek alapján a következő célok megvalósítását tűztük ki:

- A retrotranszpozon eredetű PR_{PEG10} fehérje vizsgálatára alkalmas expressziós konstruktok létrehozása. A PR_{PEG10} enzim működéséhez szükséges megfelelő körülmények (pl.: pH optimum) és a proteolízis stratégiájának (cisz/transz-aktivitás) meghatározása, gátolhatóságának vizsgálata, valamint a módosított PEG10 fehérjék sejtek életképességére és proliferációjára gyakorolt hatásának tanulmányozása.
- A GST címkével fuzionált SASP14 enzim optimális működési körülményeinek és HIV proteáz inhibitorokkal szembeni érzékenységének tesztelése, kinetikai paraméterek meghatározása, az autoaktiváció jelenségének igazolása, továbbá annak vizsgálata, hogy a hasítási helyeket érintő mutációk milyen hatást gyakorolnak a GST-SASP28 enzimfehérje autoproteolízisére.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. PEG10 fehérje vizsgálatok

4.1.1. *In silico* analízis

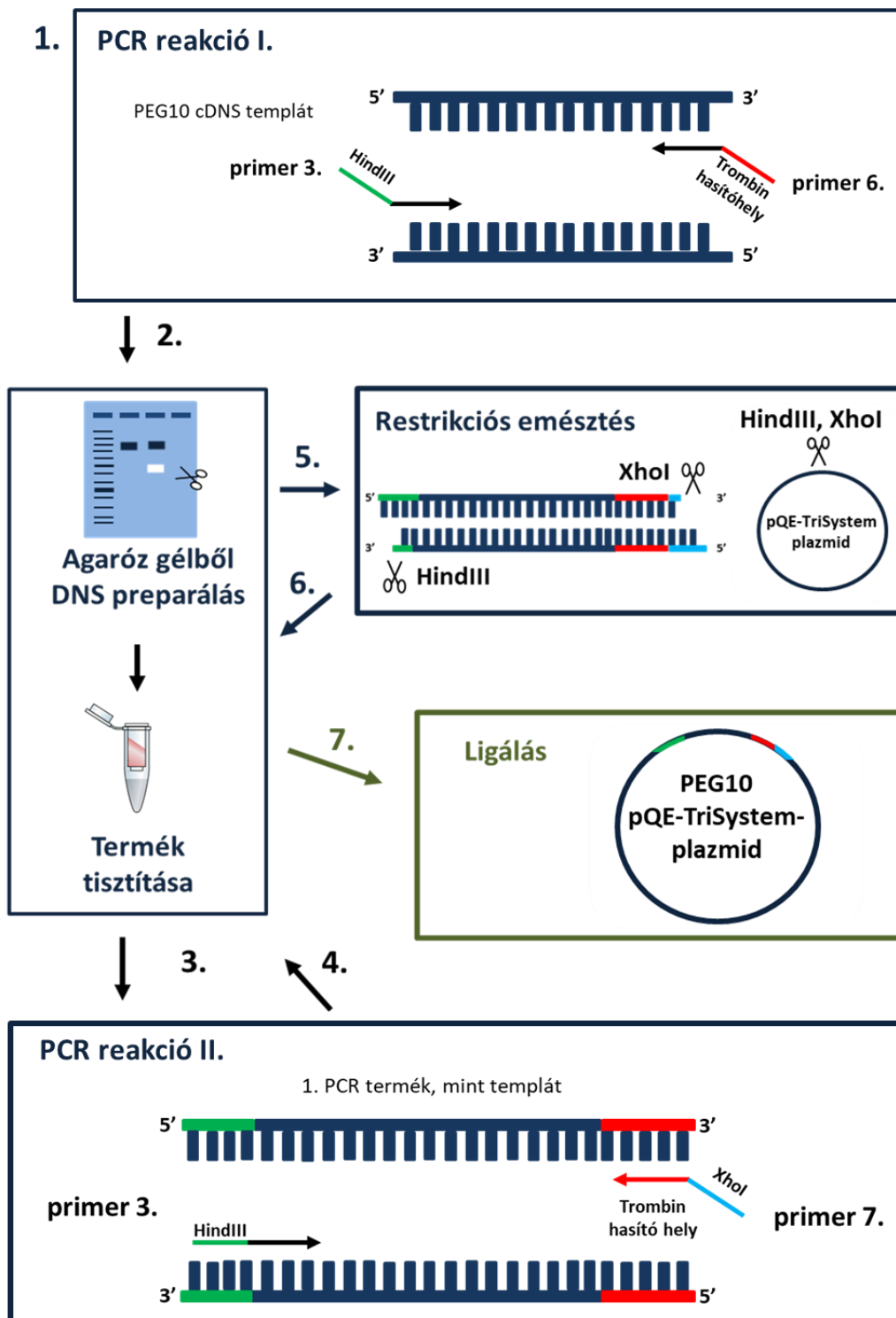
A PR_{PEG10} szekvencia másodlagos szerkezetének jóslását *Jpred4* szerver segítségével végeztük (UniProtKB: Q86TG7). A rendezetlenségre vonatkozó adatokat az *IUPred* webszerverrel jósltuk meg. Az RF1/RF2_{PEG10} 346-477 régió homológ modelljének felépítéséhez *Modeller9v13* programot alkalmaztunk, melyhez a lovak fertőző kevésvérűsége vírus (*Equine Infectious An(a)emia*), az EIAV proteáz (PDBID: 1FMB), a hDdi1 (PDBID: 3S8I) és yDdi1 (PDBID: 2I1A) fehérjék kristályszerkezetét használtuk templátként. A molekulászerkezetek a *PyMOL Molecular Graphics System* (1.3 verziószám, Schrödinger, LLC, New York, USA) programmal készültek. A humán PEG10 fehérje ubikvitinálódó helyeinek jóslása az *UbiSite* (**Huang és mtsai, 2016**), *BDM-PUB* (<http://bdmpub.biocuckoo.org/>) és *UbPred* (**Radivojac és mtsai, 2010**) online webszerverek segítségével történt. Az *in silico* elemzéseket minden esetben Dr. Mótyán János András végezte.

4.1.2. PEG10 szekvenciák módosítása és klónozása

A humán PEG10 cDNS szekvenciáról (hh04271, Kazusa DNA Research Institute, Kisarazu, Japán) a vizsgálatunk tárgyát képező PEG10 fehérjét kódoló DNS szakaszokat pQE-TriSystem expressziós plazmidba klónoztuk, melyet Prof. Dr. Papp Zoltán (Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Kardiológiai Intézet, Klinikai Fiziológiai Tanszék) bocsátott a rendelkezésünkre.

A klónozáshoz a HindIII és XhoI restriktív enzimeket (*New England Biolabs*, Ipswich, MA, USA) választottuk. Mivel a *peg10* szekvencia önmagában is tartalmaz XhoI hasító helyet (661-666 bp), így a klónozást megelőző lépésként szükséges volt elvégezni egy úgynevezett szinoním pontmutációt, mely tönkretette a restriktív enzim hasítóhelyét a *peg10* cDNS-ben, de az aminosav szekvencia sértetlen maradt. A mutációt *QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit* (*Agilent Technologies*, Santa Clara, CA, USA) segítségével hoztuk létre, amelyhez használt oligonukleotid primerek szekvenciáját a **2. táblázat** mutatja. A mutagenézis lépéseit a kit-hez mellékelte protokoll alapján végeztük.

A pQE-TriSystem plazmid eredeti konstrukciója alapján a termelődött rekombináns fehérjék C-terminálisan 8 hisztidin aminosavat tartalmazó véggel bővülnek, amely semmilyen módon nem választható le a fehérjéről. Annak érdekében, hogy a fúziós címke enzimatikusan eltávolítható legyen, trombin hasítóhelyet kódoló szekvenciát illesztettünk a PEG10 fehérjét kódoló DNS szekvencia és a hisztidin címke közé. A klónozás több lépésben történt, mely folyamat könnyebb értelmezhetőségét a **13. ábra** segíti. Az első reakció alatt felsokszorozítottuk a kívánt PEG10 kódoló DNS szekvenciát, melynek 5' végére HindIII, míg 3' végére trombin hasítóhelyet kódoló DNS-t illesztettünk a reakcióban használt oligonukleotid primerek segítségével (PCR reakció I.). Az így kapott PCR terméket agaróz-gélelektroforézissel elválasztottuk az anyaszáltól, majd gélextrakciós kit segítségével (ISOLATE II PCR and Gel Kit, *BIOLINE*, Meridian Life Science, Cincinnati, OH, USA) tisztítottuk. A következő PCR reakcióban a már tisztított terméket használtuk a reakció DNS templátjaként, míg az új primer szekvencia a trombin hasítóhellyel bővült DNS-hez kötődve XhoI hasítóhelyet illesztett a klónozendó DNS szálhoz (PCR reakció II.). Az így kapott második PCR reakció termékét agaróz gélből tisztítottuk (ISOLATE II PCR and Gel Kit, *BIOLINE*, Meridian Life Science, Cincinnati, OH, USA), majd pQE-TriSystem plazmiddal együtt HindIII és XhoI restriktív enzimek segítségével tettük kompetenssé a ligációra (gyári protokoll alapján, *New England Biolabs*, Ipswich, MA, USA). A restriktívan hasított nukleinsavakat az elválasztást követően ismételtén izoláltuk agaróz gélből (ISOLATE II PCR and Gel Kit, *BIOLINE*, Meridian Life Science, Cincinnati, OH, USA). A ligációhoz T4 DNA ligázt használtunk (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, USA) 1:5 moláris vektor/inzert arányban.



13. ábra. PEG10 szekvenciák klónozásának sematikus ábrája. Az ábrában használt zöld szín a HindIII, a piros szín a trombin, míg a világoskék szín az XhoI hasítóhelyeket jelöli. A reakciókhoz használt oligonukleotid primerek szekvenciáit a 2. táblázat tartalmazza.

Annak érdekében, hogy a RF1/RF2_{PEG10} fehérje transzlációjakor minden esetben megkapjuk a teljes hosszúságú klónozott szekvenciát, inzerciós mutagenézisre volt szükség. A mutagenézis során plusz egy nukleotidot építettünk a G-GGA-AAC csúszószekvenciába (G- GGA-AAA-C, a beillesztett nukleotid félkövér, aláhúzott jelölést kapott), melynek köszönhetően a kereteltolódást követő aminosavsorrenddel íródik át a _{fs}RF1/RF2_{PEG10} fehérje (**14. ábra**). A PR_{PEG10} aktivitásának vizsgálata érdekében további pontmutációkat hoztunk létre (D369A, D370A és S371A), mely mutációk a katalitikus triádot érintik.

A pontmutációk létrehozása *QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) segítségével történt. A kísérletek során mindig a gyári protokoll alapján jártunk el. A reakciókhoz felhasznált oligonukleotid primerek szekvenciáit a **2. táblázat** tartalmazza. A mutációk és a klónozás sikerességét minden esetben szekvenálással ellenőriztük.

2. táblázat. Oligonukleotid primerek szekvenciája PEG10 fehérjék klónozásához és mutagenéziséhez.

SORSZÁM	NÉV	SZEKVENCIA
1.	PEG10 XhoI mutagenézis	5'-gagctctcccacctggaggctgccaagtgcg-3'
2.	PEG10 <i>frameshift</i> mutagenézis	5'-cttcgcccggcgggaaaactccccggcccc-3'
3.	RF1 _{PEG10} és RF1/RF2 _{PEG10} pQE-TriSystem forward-HindIII	5'-gctcaagcttatgaccgaacgaagaagggac-3'
4.	RF2 _{PEG10} pQE-TriSystem forward- HindIII	5'-gctcaagcttaactccccggccccgctg-3'
5.	RF1 _{PEG10} pQE-TriSystem reverse1-Trombin	5'-ggatccacgcggaaccagcagcggggccggggagtttc-3'
6.	RF2 _{PEG10} és RF1/RF2 _{PEG10} pQE-TriSystem reverse1-Trombin	5'-ggatccacgcggaaccaggtacgttgccaggtgtgc-3'
7.	RF1 _{PEG10} , RF2 _{PEG10} és RF1/RF2 _{PEG10} pQE-TriSystem reverse2-XhoI	5'-ctactcgagggatccacgcgaaccag-3'
8.a	PR _{PEG10} _D369A/D370A forward	5'-ccgagccatgatcgcttctggtgcttctgg-3'
8.b	PR _{PEG10} _D369A/D370A reverse primer	5'-ccagaagcaccagaagcgatcatggctcgg-3'
9.a	PR _{PEG10} _S371A forward	5'-gagccatgatcgatgctggtgcttctggc-3'
9.b	PR _{PEG10} _S371A reverse	5'-gccagaagcaccagcatcgatcatggctc-3'
10.a	His ₆ -MBP- _{fs} RF1/RF2 _{PEG10} -mTurquoise2 forward	5'-gcttaattaaatgaccgagcgtcgctcgtg-3'
10.b	His ₆ -MBP- _{fs} RF1/RF2 _{PEG10} -mTurquoise2 reverse	5'-tagctagcgtcgcacatccttgccggg-3'

4.1.3. Rekombináns PEG10 fehérje expressziója eukarióta sejtekben

Tranziens fehérje termelésre HEK293T humán embrionális vese sejteket (*Invitrogen*, Carlsbad, CA, USA) használtunk. A sejteket 37 °C-on, 5 % CO₂ tartalmú inkubátorban tenyésztettük 10 % hőinaktivált főtális marhaszérumot (FBS), 1 % antibiotikumot (penicillin-streptomycin) és 1 % L-glutamint tartalmazó médiumban (*Dulbecco's modified Eagle's medium*, továbbiakban DMEM).

A transzfekciót megelőző nap a sejteket T75-ös (75 cm²) flaskába úgy osztottuk szét (~8x10⁶ sejt/T75), hogy másnapra közel 60 %-os konfluenciát elérjék. A tranziens transzfekciót polietilénimin (PEI, *Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, USA) segítségével végeztük. Két transzfekciós elegyet készítettünk, melyekből az egyik tartalmazta a kiválasztott PEG10 fehérjét expresszáló plazmid DNS-t (14µg) és 15 µg egyszerű „hordozó” DNS-t (lazac sperma DNS, *Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, USA), míg a másik oldat 150 mM NaCl-dal hígított PEI reagenst. A két oldatot elegyítést követően 20 percig inkubáltuk szobahőn. A sejteken lévő tápfolyadékot „üres” DMEM tápfolyadékokra (0 % FBS, 0 % penicillin-streptomycin, 0 % L-glutamin) cseréltük, majd a transzfekciós elegy hozzáadása után a sejteket 5 órán át inkubáltuk. Az inkubációs idő letelte után lecseréltük a médiumot friss tenyésztő oldatra (DMEM, 10 % FBS, 1 % penicillin-streptomycin, 1 % L-glutamin) és tovább inkubáltuk a sejteket ~18-20 órán át.

4.1.4. HEK293T sejtek lízise

A sejteket a transzfekciót követő nap tripszinnel kezeltük, majd centrifugálással begyűjtöttük (130 g, 8 perc, szobahő). A sejt pelletet kétszer átmostuk hideg foszfát-pufferelt sóoldattal (10,1 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7,4; *Phosphate-buffered saline* [PBS]), hogy megszabaduljunk a tripszin szennyezéstől, végül 500 µL proteáz inhibitor koktélt (cOmplete EDTA-free Protease Inhibitor Tablet, *ROCHE*, St. Louis, MO, USA) is tartalmazó PBS-ben vettük fel.

A sejteket (500 µL szuszpenzió) szonikálással tártuk fel (*Branson Sonifer 450*, *Branson Ultrasonic Corporation*, Danbury, Ct, USA), majd a lizált sejteket magas fordulatszámon centrifugáltuk (16000 g, 15 perc, 4 °C). A centrifugálás után kapott felülúszóval dolgoztunk tovább, mely tartalmazta a PEG10 fehérjét is. Az expresszió és a sejt lízis sikerességét Western-blot segítségével, anti-PEG10 antitest alkalmazásával tudtuk ellenőrizni.

4.1.5. Rekombináns fluoreszcens szubsztrát termeltetése prokarióta sejtekben

Rekombináns, fluoreszcens fehérjével fuzionált szubsztrát létrehozásához (His₆-MBP-_{fs}RF1/RF2_{PEG10} (1-345)-mTurquoise2) templát szekvenciaként bakteriális expresszióra alkalmas, kodon-optimalizált *peg10* cDNS-t alkalmaztunk (pGEX-4T-3-_{fs}RF1/RF2_{PEG10}; *GenScript Biotech*, Piscataway, NJ, USA). A kódoló szekvencia PCR technika alkalmazásával került felsokszorosításra. Az alkalmazott oligonukleotid primerek szekvenciáit a **2. táblázat** mutatja. A reakcióterméket agaróz gélelektroforézissel választottuk el a templát szekvenciától, majd a gélből történő DNS visszanyerését gélextrakciós kit segítségével (ISOLATE II PCR and Gel Kit, *BIOLINE*, Meridian Life Science, Cincinnati, OH, USA) végeztük. Ezt követően restrikciónal emésztettük mind az inzert, mind pedig a plazmid szekvenciát PacI és NheI endonukleázok alkalmazásával. Ismételt megfuttattuk a mintákat agarózgélben, majd a gélből izolált és tisztított vektor és inzert DNS-t (ISOLATE II PCR and Gel Kit, *BIOLINE*, Meridian Life Science, Cincinnati, OH, USA) ligáltuk (1:6 moláris vektor:inzert arány). A klónozás sikerességét szekvenálással validáltuk.

A teljes hosszúságú RF1 fehérjét és az RF2 egy rövid N-terminális régióját is tartalmazó His₆-MBP-_{fs}RF1/RF2_{PEG10} (1-345)-mTurquoise2 rekombináns fehérje termeltetésre BL21(DE3) *Escherichia coli* sejteket használtunk. Az expresszió indukálása 1mM izopropil-β-D-tiogalaktopiranoziddal (IPTG) történt (OD₆₀₀ 0,6-0,8), majd a transzlációt 16 °C-on, 6 óra inkubációval végeztük. A termelés végén a sejteket centrifugálással gyűjtöttük össze (Jouan CR 412, 4000 g, 10 perc, szobahő), ezt követően a pelletet lizozim (1 mg/mL) és fenil-metil-szulfonil-fluoridot (PMSF) (0,02 μg/mL) is tartalmazó lízis pufferben (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, 0,05 % Tween20, pH 8,0) vettük fel. A sejteket szonikálással lizáltuk (Branson Sonifer 450, *Branson Ultrasonic Corporation*, Danbury, Ct, USA).

A termeltetett fluoreszcens szubsztrátok tisztítása Ni-nitrilotriacetáttal (Ni-NTA) bevont mágneses agarózgyöngyökkel (*Qiagen*, Hilden, Germany) történt. A tisztítási lépések során a laborunk által korábban kidolgozott és optimalizált protokollt alkalmaztuk (**Bozóki és mtsai, 2018**). A tisztított szubsztráton a puffer cseréjét (20 mM piperazin-N, N'-bisz(2-etánszulfonsav) (PIPES), 100 mM NaCl, 0,05 % Tween20, pH 7,0) Amicon Ultra-10K ultrafiltrációs centrifugacsövekkel (*Merck-Millipore*, Burlington, MA, USA) végeztük. A tisztított fúziófehérjéről szükség szerint eltávolítható az N-terminális His₆-MBP címke, melyet a dohány

karcolatos vírus (*Tobacco Etch Virus*) NIa proteáz (TEV PR) által felismerésre és hasításra alkalmas ENLYFQ↓G szekvencia biztosít. A tisztított fehérjéket felhasználásukig 4 °C-on tároltuk.

4.1.6. *In vitro* proteolitikus aktivitásvizsgálat

A HEK293T sejtek lízisét követően a mintákat tárolásra is alkalmas semleges pH-jú puffer közeggel szemben (20 mM PIPES, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 10 % glicerol, 0,5 % Nonidet P-40, 2 mM DTT, pH 7,0) dializáltuk. A dialízist követően 120 µL mintához 20 µL proteáz inhibitor koktélt (cOmplete, EDTA-free proteáz inhibitor koktél; 7x töménységű stock) is tartalmazó oldatot mértünk, majd a mintákat 37 °C-on inkubáltuk egy éjszakán át, míg a kontroll minták azonnal fagyasztásra kerültek. Az inkubációt követően a fehérjék detektálását Western-blot technika segítségével, anti-PEG10 antitest alkalmazásával végeztük.

A PR_{PEG10} intermolekuláris hasítási vizsgálata (transz-aktivitás) His₆-MBP-_{fs}RF1/RF2_{PEG10} (1-345)-mTurquoise2 rekombináns fehérje szubsztráton történt. 5 µg tisztított szubsztráthoz _{fs}RF1/RF2_{PEG10} transzfektált HEK293T lizátumot adtunk, majd 20 órát inkubáltuk 37 °C-on. A fehérjék kimutatásához MBP és PEG10 ellenes antitesteket használtunk a Western-blot során, az alkalmazott elsődleges antitesteket és hígításaikat a **3. táblázat** tartalmazza.

4.1.7. A pH optimum meghatározása

A pH hatás vizsgálata a PR_{PEG10} aktivitására META pufferben (2x töménységű puffer összetétele: 0,1 M 2-(N-morfolino)-etán-szulfonsav (MES), 0,2 M Tris, 0,1 M Na-acetát, 2 M NaCl) történt. A lizált és tároló puffer ellen dializált mintákat 1:1 térfogat arányban mértük össze különböző pH-jú META pufferekkel (pH 5,0-8,0), majd inkubáltuk a mintákat 37 °C-on 20 órát. A reakcióelegyek pontos pH-ja 5,4, 5,7, 6,0, 6,5, 6,9, 7,4 és 7,9 volt. Az aktivitás kimutatása érdekében a fehérjéket Western-blot technika segítségével detektáltuk.

4.1.8. Western-blot analízis

A fehérjemintákat a megelőző kísérletektől függően (pl.: expresszió vagy sejtízis hatékonyságának ellenőrzése, vagy aktivitás-mérés) készítettük elő Western-blot vizsgálathoz. A fehérje-koncentráció jellemzésére az azt megkövetelő kísérletekben belső kontrollt alkalmaztunk (anti-GAPDH), egyéb esetben az azonos körülmények biztosítása (fehérje termelés esetén:

megegyező sejtszám és DNS plazmid koncentráció; *in vitro* kísérletekben: azonos térfogatok alkalmazása, összfehérje koncentráció meghatározása) elegendőnek bizonyult az eredmények értékeléséhez.

Minden esetben a mintákhoz SDS mintafelvívő puffert mértünk, majd 95 °C-on 10 percig denaturáltuk a fehérjéket. Az így előkészített mintákat 14 %-os SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) megfuttattuk, majd nitrocellulóz membránra transzferáltuk 100 V feszültség alkalmazása mellett, 70 percig, elektroforézis puffert alkalmazva a futtatáshoz (20 % metanol, 25 mM Tris, 192 mM glicin, pH 8,3). A membránt 5 %-os sovány tejpport tartalmazó Tris-pufferelt sóoldatban (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 7,5; *Tris-buffered saline* [TBS]) blokkoltuk 1 órát szobahőn. A következő lépésben elsődleges antitesttel inkubáltuk a membránt, eltérő hígításokat alkalmazva a különböző antitestek esetében (**3. táblázat**). Az elsődleges antitesteket 0,1 % sovány tejpport és 0,05 % Tween20 detergenst is tartalmazó TBS pufferben (TTBS) oldottuk, az inkubációt pedig éjszakán át 4 °C-on végeztük.

3. táblázat. PEG10 fehérje Western-blot vizsgálatok során alkalmazott elsődleges antitestek listája.

NÉV	TÍPUS	FAJ	HIGÍTÁS	FORGALMAZÓ	TERMÉK SZÁM
Anti-GAPDH	poliklonális	nyúl	1:15000	Sigma-Aldrich	G9545
Anti-MBP	monoklonális	nyúl	1:20000	New England Biolabs	E8030S
Anti-PEG10	poliklonális	egér	1:2000	Sigma-Aldrich	SAB1400438-50UG
Anti-ubikvitin	poliklonális	nyúl	1:500	Dako Cytomation	Z0458

Másnap a nem kötődött antitesteket TTBS pufferes mosással távolítottuk el a membrán felszínéről (3 x 15 perc). Az elsődleges antitestre specifikus, torma-peroxidázzal (HRP) konjugált másodlagos antitesteket (anti-egér, A4416 *Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, USA; anti-nyúl, 170-6515 *Bio-Rad*, CA, USA) szintén 0,1 % sovány tejpport is tartalmazó TTBS pufferben oldottuk a szükséges hígításban. Egy órás szobahőn végzett inkubációt követően a nem kötődött másodlagos antitesteket is TTBS pufferes mosással (3 x 15 perc) távolítottuk el a membrán felszínéről. A fehérjéket *SuperSignal WestPico* (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, USA) kemilumineszcens szubsztrát segítségével tettük láthatóvá.

4.1.9. A proteolitikus aktivitás gátolhatóságának *in vitro* ellenőrzése

A PR_{PEG10} autoprocesszálas *in vitro* gátolhatóságát pepsztatin A, lopinavir, nelfinavir, saquinavir, darunavir és tipranavir (NIH AIDS Reagent Program) inhibitorokkal teszteltük. Az $\text{fsRF1/RF2}_{\text{PEG10}}$ transzfektált HEK293T lizátumokhoz dimetil-szulfoxidban (DMSO, *Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, USA) oldott HIV inhibitorokat mértük 10 μM -os végkoncentrációban, majd a mintákat 37 °C-on inkubáltuk 20 órát. A kontroll minta a bemért inhibitorokkal megegyező koncentrációban DMSO-t tartalmazott, inhibitor nélkül. A fehérjék kimutatása Western-blot technika segítségével, anti-GAPDH és anti-PEG10 antitestek felhasználásával történt.

4.1.10. Életképesség vizsgálat (MTT assay)

A citotoxicitás vizsgálatát metil-tiazol-tetrazol reagens (MTT assay, *Invitrogen*, Carlsbad, CA, USA) segítségével végeztük. A vizsgálatokat 16 órával megelőzően a 96-lyukú tenyésztőedénybe HEK293T vagy HaCaT sejtet mértünk ki (10000 sejt/lyuk), hogy a másnapi vizsgálatokhoz közel 70-80 % konfluenciát érjenek el. A transzfekciót *Lipofectamine LTX&PLUSTM* reagens (*Invitrogen*, Carlsbad, CA, USA) segítségével végeztük a gyártó által megadott leírás alapján. 100 ng/lyuk plazmid DNS-t és 0,5 μL /lyuk *Lipofectamine* reagenst OptiMEM médiumban oldottunk, 5 percig inkubáltuk az oldatokat szobahőmérsékleten, majd a DNS-t tartalmazó OptiMEM-et 1:1 térfogatarányban összekevertük a *Lipofectamine*-t tartalmazó oldattal. A DNS-lipid elegyet tovább inkubáltuk 20 percig szobahőmérsékleten. Az inkubációs idő alatt a sejteken a tenyésztő tápfolyadékot lecseréltük friss OptiMEM-re (90 μL), majd hozzámértük lyukanként az előinkubált transzfekciós elegyet. 5 órával később ismét lecseréltük a sejteken a médiumot friss DMEM-re.

Az életképesség vizsgálatot a transzfekciót követő nap végeztük. A sejtekhez 1 mM koncentrációban mértünk MTT reagenst, majd a beállított protokolt követve 4 órát inkubáltuk 37 °C-on. A sárga színű tetrazolium gyűrű az élő sejtekben lila színű formazánná redukálódik, mely kristályok beoldására DMSO-t alkalmaztunk. Spektrofotométer (Wallac 1420 victor2, *Wallac Oy*, Turku, Finland) segítségével 544 nm-en mértük a minták abszorbanciáját. Kontrollként „üres” pQE-TriSystem plazmidot használtunk (mock kontroll), a transzfekció hatékonyságát pedig a fluoreszcens fehérjét kódoló pQE-TriSystem-GFP plazmiddal transzfektált sejtek fluoreszcenciájának mérésével ellenőriztük.

4.1.11. Sejtprolifерáció vizsgálata (áramlási citometria)

A HEK293T és HaCaT sejteket 6-lyukú sejttenyésztőedénybe mértük 3×10^5 sejt/lyuk sejtszámmal. A sejteket DMEM tenyésztő tápfolyadékban egy éjszakán át hagytuk letapadni. Másnap a sejteken lecseréltük a tápfolyadékot antibiotikum-mentes OptiMEM médiumra (750 μ L) és RF1_{PEG10}, RF1/RF2_{PEG10}, f_sRF1/RF2_{PEG10} vagy D370A-f_sRF1/RF2_{PEG10} szekvenciát kódoló plazmid DNS-sel (3 μ g/lyuk) transzfektáltuk *Lipofectamine LTX&PLUSTM* reagenst (5 μ L/lyuk) használva, a gyártó utasításai alapján. A DNS-lipid komplexet cseppenként adtuk a sejtekhez, majd 5 órát inkubáluk. Az inkubációs idő letelte után lecseréltük a sejteken lévő tápfolyadékot 10 % FBS-t is tartalmazó DMEM tenyésztő tápfolyadékra, majd további 36 órát inkubáltuk a sejteket. A kontroll minták estében „üres” pQE-TriSystem plazmidot használtunk (mock kontroll), a transzfekció sikerességét pQE-TriSystem-GFP plazmiddal transzfektált sejtek fluoreszcenciájának mérésével ellenőriztük. A sejtprolifерáció vizsgálatát áramlási citométerrel végeztük (FACS Calibur, BD *Biosciences*, San Jose, CA, USA) FITC-konjugált egér anti-humán Ki67 antitest (11-5699-41, *eBioscience*, San Diego, CA, USA) alkalmazásával.

4.2. ASPRV1 fehérjék vizsgálata

4.2.1. In silico vizsgálat

A SASP14 szekvencia alapján történő másodlagos szerkezet jóslását (UniProtKB: Q53RT3) *PredictProtein* (Yachdav és mtsai, 2014), *JPred4* (Drozdetsky és mtsai, 2015), *DSC* (King és Sternberg, 1996), *SOPMA* (Geourjon és Deléage, 1995), *GOR4* (Garnier és mtsai, 1996) webserverek segítségével végeztük. A hidropátias index értékeket irodalmi adatokból nyertük (Kyte és Doolittle, 1986). A templát kereséséhez *SWISS-MODEL Workspace* (Waterhouse és mtsai, 2018), a homológ modell készítéséhez *Modeller 9v13* (Sali és Blundell, 1993) programokat alkalmaztunk. A homológ modell készítéséhez az EIAV (PDBID: 1FMB), a hDdi1 (PDBID: 3S8I) és yDdi1 (PDBID: 2I1A) proteázok kristályszerkezetét használtuk templátként. A szubsztrátkötő zsebek térfogatának számítását korábban publikált módszer alapján végeztük, melyhez a *Sybyl SiteID* modulját alkalmaztuk (Bagossi és mtsai, 2005; Eizert és mtsai, 2008). A számításokat a *Silicon Graphics Fuel* munkaállomásokon (Silicon Graphics International, Fremont, CA, USA) futtatott *Sybyl* programcsomaggal (Tripos Inc., St. Louis, MO, USA) hajtottuk

vége. A molekulaszervezetet megjelenítéséhez a *PyMOL Molecular Graphics System* (1.3 verziószám, Schrödinger, LLC, New York, USA) programot használtuk. A stabilitás-vizsgálatot az *I-Mutant 2.0* webszerver segítségével végeztük (Capriotti és mtsai, 2005), míg a többszörös szerkezet-alapú molekula-illesztés *mTM-Align* szerver segítségével történt (Dong és mtsai, 2018). Az *in silico* elemzéseket minden esetben Dr. Mótyán János András végezte.

4.2.2. SASPáz formák klónozása és mutagenézise

A SASP28 és SASP14 fehérjéket kódoló cDNS szekvenciát (GeneID: 151516) PCR technika alkalmazásával sokszoroztuk fel, pCMV6-XL4-asprv1 vektort (OriGene, Rockville, MD, USD) használva templátként. A PCR reakció során használt oligonukleotidok szekvenciáit a **4. táblázat** mutatja. A felsokszorozott inzertek agaróz gélelektroforézissel lettek elválasztva az anyaszáltól, majd a szükséges DNS-t tartalmazó gépreparátumokból gélextrakciós kit (QIAquick Spin Kit, Qiagen, Hilden, Germany) segítségével nyertük vissza a nukleinsavakat. Ezt követte az inzertek és a pGEX-4T-3 expressziós plazmid emésztése BamHI és EcoRI restriktív enzimekkel. A ligáláshoz T4 DNS ligázt (Quick ligation Kit, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) alkalmaztunk, majd a cirkuláris plazmidokat DH5 α *Escherichia coli* kompetens sejtbe transzformáltuk 42 °C-on történő hősokk alkalmazásával. A transzformálást követően kolónia PCR segítségével választottuk ki a megfelelő baktérium telepeket. A SASP28 autoprocesszáló helyeinek mutációit (A167G, L168G, A189K, N190I) *QuikCange Lightning Multi Site-Directed* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) mutagenézis kit segítségével hoztuk létre a gyártó által ajánlott protokollt követve. A mutagenézishez használt oligonukleotid primerek szekvenciáit a **4. táblázat** mutatja. A klónozás, illetve a mutagenézis sikerességét minden esetben szekvenálással validáltuk. A SASPáz enzimformák előállításához szükséges klónozást és mutagenézist Nagy Katalin végezte.

4. táblázat. Oligonukleotid primerek szekvenciája az ASPRV1 fehérjék klónozásához és mutagenéziséhez.

NÉV	SZEKVENCIA
forward-BamH1-SASP37	5'-gataggatccgggagcccaggggc-3'
forward-BamH1-SASP28	5'-gataggatccgccgggagcggagcc-3'
forward-BamH1-SASP14	5'-gataggatccagcatcggtaagggc-3'
reverse-EcoR1-SASP37/28	5'-ctattgaattctcagtgggatagctcctgccg-3'
reverse-EcoR1-SASP14	5'-ctattgaattctcactccaggtcaaactcatcttccag-3'
SASP28-A189K/N190I	5'-ctgcccagagagatcgtctttaagatcagcatgggtaagggctac-3'
SASP28-A167G/L168G	5'-gggactgtgaaagagggcggcctgaaggcctttggg-3'

4.2.3. GST-SASPáz fehérjék expressziója és tisztítása

A SASPáz fehérjéket *Escherichia coli* BL21(DE3) kompetens sejtekben expresszáltattuk. A baktériumkultúrákban a fehérje expressziót 1 mM IPTG-vel indukáltuk (OD₆₀₀ 0,6-0,8), majd további 3 órát inkubáltuk őket 37 °C-on. Az inkubációs idő leteltével a sejteket centrifugálással (5000 g, 20 perc, 4 °C) begyűjtöttük. A sejt pellet feltárását szarkozilt is tartalmazó lízis pufferben (0,01 M Na₂HPO₄, 0,15 M NaCl, 5 mM EDTA, 2 % szarkozil, pH 7,4) szonikálással (Branson Sonifier 450) végeztük. A lizátumot lecentrifugáltuk (10000 g, 20 perc, 4 °C), majd a felülúszóval dolgoztunk tovább.

A szolubilizált, 0,22 µm pórusméretű szűrőn (*Merck-Millipore*, Burlington, MA, USA) átszűrt GST-fúzionált fehérjéket 0,3 % szarkozil és 3 % Triton X-100 detergens jelenlétében affinitás-kromatográfiával tisztítottuk (Bio-Scale Mini Profinity GST Cartridge, *Bio-Rad*, Hercules, CA, USA) Äkta prime (*Amersham Pharmacia Biotech*, Little Chalfont, UK) készülék használatával. Az eluálás során gyűjtött frakciókat 6-8 kDa pórusméretű cellulóz membrán segítségével dializáltuk tárolópuffer ellen (20 mM PIPES, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 10 % glicerol, 0,5 % NP-40, pH 7,0). A tisztított fehérje koncentrációját BCA módszerrel határoztuk meg (*Pierce BCA Protein Assay Kit*, *Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, USA).

A fehérjék tisztaságának ellenőrzését és méret szerinti elválasztását SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel végeztük 14 és 16 %-os elválasztó gélek alkalmazásával. A fehérje mintákhoz mintafelvívő puffert adtunk (6x töménységű puffer összetétele: 300 mM Tris, 12 % SDS, 20 % glicerol, 3 % β-merkaptotanol, 0,1 % brómfenolkék), majd 95 °C-on 10 percig denaturáltuk őket. A fehérjék festését *Coomassie Brilliant Blue* és *PageBlue* festékekkel végeztük. A gélképek denzitometriás elemzését *GelAnalyzer* szoftver segítségével végeztük (www.gelalyzer.com).

4.2.4. Szintetikus oligopeptid szubsztrátok

A HIV-1 MA és CA fehérjék közötti természetes hasítóhelyet, illetve a P2 és P3 helyen aminosav módosítást tartalmazó szintetikus oligopeptid szubsztrátok - melyeket korábban szilárd fázisú peptidszintézissel állították elő - a kutatócsoport rendelkezésre álltak (**Bagossi és mtsai, 2005, Eizert és mtsai, 2008**). A természetes és a módosított profillagrin (pro-FLG) szekvenciákat reprezentáló szintetikus oligopeptideket a *BioBasic* cégtől szereztük be (*BioBasic*, Markham, ON, Canada). A P4-foszforillált GpSFLY↓QVSTH peptidet 50 % DMSO-ban, míg a többi szubsztrátot desztillált vízben oldottuk.

4.2.5. GST-SASP14 enzimaktivitás mérése

Az aktivitás mérését 20 µL reakcióterfogóban végeztük, a reakcióközeg 10 µL 2x töménységű ASPRV1-reakciópuffert (0,5 M Na-foszfát, 4 M NaCl, 10 % glicerol, 10 mM DTT, pH 5,6), 5 µL tisztított enzimet (végkoncentráció: 25-600 nM) és 5 µL szubsztrátot (végkoncentráció: 0,24-1,2 mM) tartalmazott. A reakcióelegyet 37 °C-on inkubáltuk 1 órát, ezt követően a reakciót 180 µL 1 %-os trifluoecetsav (TFA) segítségével állítottuk le. A kapott elegyet fordított fázisú kromatográfiás oszlopra (Nova-Pak C18, 3,9 x 150 mm, Waters Associates, Inc.) injektáltuk automata injektor segítségével (Merck Hitachi HPLC). Lineáris víz-acetonitril grádiens alkalmazásával (**5. táblázat**), 0,05 % TFA jelenlétében, 206 nm-en követve különítettük el egymástól a szubsztrátot, termékeket és a pufferkomponenseket. A kromatográfiás görbe csúcs alatti területének integrációs értékéből állapítottuk meg a hidrolízis mértékét. Minden esetben legalább két párhuzamos mérést végeztünk és a mérések átlagával számoltunk. A szubsztrátot és a termékeket a retenciós idők alapján azonosítottuk. Az adatokat *GraphPad Prism 5.01* program segítségével értékeltük.

5. táblázat HPLC grádiens program enzimaktivitás vizsgálatokhoz

IDŐ (perc)	ÁRAMLÁSI SEBESSÉG (mL/perc)	MOZGÓFÁZIS	
		„A”- víz 0,05 % TFA (V/V %)	„B”-acetonitril 0,05 % TFA (V/V %)
0,0-10,0	2,0	100 %	0 %
10,0-15,0	2,0	80 %	20 %
15,0-16,0	2,0	70 %	30 %
16,0-18,0	2,0	50 %	50 %
18,0-20,0	2,0	0 %	100 %

4.2.6. Kinetikai paraméterek meghatározása

Az enzimkinetikai paraméterek meghatározását a P2 helyen módosított HIV-1 MA/CA fehérje hasítóhelyét reprezentáló szintetikus oligopeptid szubsztrát felhasználásával végeztük el (VSQ \underline{L} Y↓PIVQ, a módosítás aláhúzással jelölve), növekvő szubsztrát koncentráció (végkoncentráció: 0,24-1,2 mM) jelenlétében. A reakció körülményeket úgy állítottuk be a kinetikai paraméterek meghatározása során, hogy a szubsztrát hidrolízise 20 % alatt maradjon. Az alkalmazott reakciókörülmény megegyezett a fent leírtakkal. Figyelembe véve a csúcsokhoz tartozó integrációs értékekből meghatározott peptid-mennyiséget, majd az inkubációs időt (60 perc), meghatároztuk a reakcióbességet. A kinetikai paraméterek meghatározását öt különböző szubsztrátkoncentráció esetében meghatározott kezdeti reakciósebesség értékek alapján, nem-lineáris illesztéssel határoztuk meg. A Michaelis-Menten állandó (K_M) értéket a maximális reakciósebesség 50 %-os értékéhez tartozó szubsztrátkoncentráció meghatározásával kaptuk.

Az aktív enzim mennyiségét aktív centrum-titrálással határoztuk meg. A kísérlet során a 20 μ L végtérfogatú reakcióelegy 10 μ L 2x töménységű ASPRV1-reakciópuffert, 4,8 μ L oligopeptid szubsztrátot (végkoncentráció: 1,15 mM; VSQ \underline{L} Y↓PIVQ), 0,2 μ L DMSO-ban oldott indinavir inhibitor (végkoncentráció: 0,02-10 μ M), valamint 5 μ L tisztított enzimet tartalmazott. A 12 különböző inhibitor koncentráción mért párhuzamos mérések relatív aktivitás értékeit ábrázoltuk az inhibitor koncentráció függvényében, majd a *GraphPad Prism 5.01* program segítségével nem-lineáris regressziós módszerrel görbét illesztettünk az értékekre. A függvény lineáris szakaszára eső pontjaira illesztett egyenes segítségével meghatároztuk az aktív enzim koncentrációját. A katalitikus állandót (k_{cat}) a maximális reakciósebesség és az aktív enzim hányadosaként definiáltuk.

A pH optimum meghatározását és az ionerősség aktivitásra gyakorolt hatásának vizsgálatát VSQ \underline{L} Y↓PIVQ oligopeptid szubsztráton (végkoncentráció: 190 μ M), 2x töménységű META inkubációs pufferben (0,1 M MES, 0,2 M Tris-HCl, 0,1 M Na-acetát) mértük. Míg a pH optimum mérésnél a reakció 2 M végkoncentrációjú NaCl-ot tartalmazott és a puffer sorozat pH tartománya 5,0-9,0 közötti volt, addig az ionerősség hatásának vizsgálatánál a NaCl-ot 0-2 M közötti koncentráció-tartományban alkalmaztuk (pH 6,0). A reakcióelegyeket 37 °C-on inkubáltuk 1 órán át, majd 1 %-os TFA oldattal állítottuk le a reakciót. A reakcióelegyeket a korábban leírt HPLC-alapú módszerrel vizsgáltuk, a szubsztrátokat és termékeket 206 nm hullámhosszon detektáltuk. A

hidrolízis mértékét a görbék alatti területek integrációs értékeiből számoltuk, majd a párhuzamos mérések eredményeit a pH/NaCl koncentráció esetében számolt relatív aktivitás függvényében ábrázoltuk (*GraphPad Prism 5.01 program*). Az ionerősség enzimaktivitásra gyakorolt hatásának vizsgálatát Nagy Katalin végezte.

Az urea-disszociációs állandót (UC_{50}), mely alatt az enzimaktivitás 50 %-os csökkenését eredményező urea koncentrációt értjük, VSQLY↓PIVQ szekvenciájú oligopeptid szubsztráton (végkoncentráció: 1,2 mM) határoztuk meg. A reakciópuffer (2x töménységű puffer összetétele: 0,1 M MES, 0,2 M Tris-HCl, 0,1 M Na-acetát, 4 M NaCl, pH 6,26) növekvő koncentrációban ureát (végkoncentráció: 0-2 M) tartalmazott. A reakcióelegy összetétele, valamint az inkubálási körülmények megegyeznek az előzőekben leírtakkal. A mintákat HPLC analízisnek vetettük alá és 206 nm-en követtük a változásokat. Növekvő urea koncentráció függvényében ábrázoltuk a párhuzamos mérésekből származó relatív aktivitás értékeket. A nem-lineáris illesztést *GraphPad Prism 5.01* program segítségével végeztük.

4.2.7. GST-SASP14 gátolhatósági vizsgálata HIV-1 proteáz inhibitorokkal

A gátolhatósági vizsgálat során a következő inhibitorokat teszteltük: acetil-pepszatin, pepszatin A, indinavir, tipranavir, saquinavir, nelfinavir, darunavir, lopinavir és amprenavir. Az inhibitorokat DMSO-ban oldottuk az acetil-pepszatin kivételével, mely beoldására 50 %-os ecetsavat használtunk. Az ASPRV1-reakciópufferhez 0,46 mM végkoncentrációjú VSQLY↓PIVQ oligopeptid szubsztrátot és 10 μ M végkoncentrációjú inhibitorot mértünk, míg a reakciót 150 nM GST-SASP14 enzim hozzáadásával indítottuk. A kontroll minták esetében a reakcióelegybe gátlószer helyett DMSO-t, az acetil-pepszatin kontroll mintájához pedig 50 %-os ecetsavat adtunk. A gátlási állandó (K_i), illetve az aktív enzim koncentráció meghatározásához indinavir inhibitorot használtunk 0-10 μ M végkoncentrációban. A reakcióelegyekben a DMSO végkoncentrációja <1 % volt.

4.2.8. Autoaktiváció vizsgálata

Annak megállapítására, hogy a GST-SASP28 formából processzáldó (kihasadó) SASP14 enzim nagyobb aktivitással rendelkezik a prekursorhoz képest, a szubsztrát hidrolízist a processzáldott SASP14 mennyiségi növekedésének függvényében vizsgáltuk. A kísérlet során a tisztított GST-SASP28 formát ASPRV1-reakciópufferben előinkubáltuk 0, 5, 15, 30 és 60 percig

37 °C-on. Az előinkubációt követően a minták egyik felét SDS-PAGE analízisnek vetettük alá, mely eredményéből denzitometriás elemzés segítségével határoztuk meg a GST-SASP28 proforma és a SASP14 enzim mennyiségi eloszlását, míg a másik feléhez VSQLY↓PIVQ szekvenciájú oligopeptid szubsztrátot mértünk és további 5 percet inkubáltuk a mintákat 37 °C-on. A reakciót 1 %-os TFA oldattal állítottuk le, majd a reakcióelegyet HPLC analízisnek vetettük alá. A meghatározott relatív aktivitás értékeit hasonlítottuk a denzitometriásan meghatározott ASPRV1 enzimformák arányaihoz.

4.2.9. Hasítási hely azonosítása HPLC-(+) ESI-TOF módszerrel

A hasítási hely szintetikus oligopeptid szubsztrátok felhasználásával történő azonosítása során a reakcióelegyet a 4.2.5 alfejezetben leírtak szerint állítottuk össze. A hasítási reakciókat 37 °C-on inkubáltuk egy éjszakán keresztül, majd HPLC-ESI-TOF módszer alkalmazásával végeztük el az analízist.

A HPLC-MS méréseket egy termosztált automata mintaadagolóval (5 °C) és kolonnatérrel ellátott (35 °C) Waters 2695 típusú szeparációs készülékkel végeztük. Az alkalmazott kolonna egy VDSphere PUR 100 C18-M-SE (4,6 × 150 mm, 5 µm) fordított fázisú kromatográfiás oszlop volt. Eluensként vizet (0,02 V/V % hangyasav, A eluens) és acetonitrilt (0,02 V/V % hangyasav, B eluens) alkalmaztunk. A komponensek elválasztásához kétféle gradiens elúciót alkalmaztunk, melyek pontos paramétereit az **6. táblázat** tartalmazza. Az elektroporlasztásos ionforrással (ESI) felszerelt MicroTOF-Q típusú Qq-TOF MS készüléket pozitív ionmódban használtuk, a porlasztóra kapcsolt feszültség 4 kV volt. A szárítógáz hőmérséklete 200 °C volt, míg áramlási sebessége 7L/perc. A porlasztáshoz nitrogén gázt (1,6 bar) használtunk. A mérések rögzítését egy 2 GHz frekvencián működő digitalizálóval regisztráltuk. A tömegspektrumokat Bruker ESI tune mix oldattal kalibráltuk. Az előkészített minták HPLC-MS vizsgálatát Dr. Nagy Tibor végezte a Debreceni Egyetem TTK Alkalmazott Kémiai Tanszékén.

6. táblázat HPLC grádiens programok

GRÁDIENS ELÚCIÓ SORSZÁMA	IDŐ (perc)	ÁRAMLÁSI SEBESSÉG (mL/perc)	MOZGÓFÁZIS	
			„A”-víz 0,02 % CH ₂ O ₂ (V/V %)	„B”-acetonitril 0,02 % CH ₂ O ₂ (V/V %)
grádiens elúció I.	0,0	1,5	100 %	0 %
	0,0-13,3	1,5	20 %	80 %
	13,3-18,5	1,5	30 %	70 %
	18,5-21,0	1,5	50 %	50 %
	21,0-25,0	1,5	0 %	100 %
grádiens elúció II.	0,0-10,0	1,5	100 %	0 %
	10,0-25,0	1,5	7 %	93 %
	25,0-30,0	1,5	12 %	88 %
	30,0-35,0	1,5	50 %	50 %
	35,0-45,0	1,5	0 %	100 %

4.2.10. Hasítási hely azonosítása MALDI-TOF-MS módszerrel

A GST-SASP28 és autoproteolitikus hely-mutáns enzimfehérjék pontos hasítási pozíciójának meghatározásához a fehérjéket reakciópufferben inkubáltuk (37 °C) egy éjszakát. Az inkubációt követően a közeget víz ellen dializáltuk, majd *Eppendorf Concentrator plus* készülékkel töményítettük, mely során 5 mL mintatérfogatot 300 µL-re redukáltunk. A minta MALDI-TOF-MS előkészítéséhez C18 töltetű ZipTip pipettahegyeket (*Merck-Millipore*, Burlington, MA, USA) alkalmaztunk a maradék sómennyiség eltávolítására és a minta további töményítésére.

A mintákat 2,5-dihydroxybenzoésav (DHB) mátrix felhasználásával készítettük elő. A mátrixot 0,1 % TFA-t is tartalmazó víz/acetonitril oldatába (1:1) oldottuk be (100 mg/mL). 1 µL mátrix és 1 µL minta mennyiségét mértük a mintatartó lemezre, majd hagytuk levegőn beszáradni. A MALDI-TOF MS méréseket *Bruker Autoflex Speed* tömegspektrométerrel kiviteleztük. Az összes mintánál lineáris módot használtunk, melynél az ionforrások feszültsége 19,5 kV és 18,3 kV volt. A készülék 500 Hz-en működtetett szilárdfázis lézerrel volt felszerelve (355 nm, ≥100 µJ/pulzus), amellyel 5000 lövést alkalmaztunk. A tömegspektrumokat *Bruker Protein Calibration Standard I.* oldattal kalibráltuk. Az előkészített minták MALDI-TOF-MS vizsgálatát Dr. Nagy Tibor végezte a Debreceni Egyetem TTK Alkalmazott Kémiai Tanszékén.

4.2.11. Statisztikai elemzés

A statisztikai elemzéseket a PEG10 és ASPRV1 mérések esetében is GraphPad QuickCalcs ingyenes online számológép használatával végeztük (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1.cfm>). Az értékeket $p < 0,05$ esetében szignifikánsnak tekintettük.

5. EREDMÉNYEK

5.1. PEG10 vizsgálata

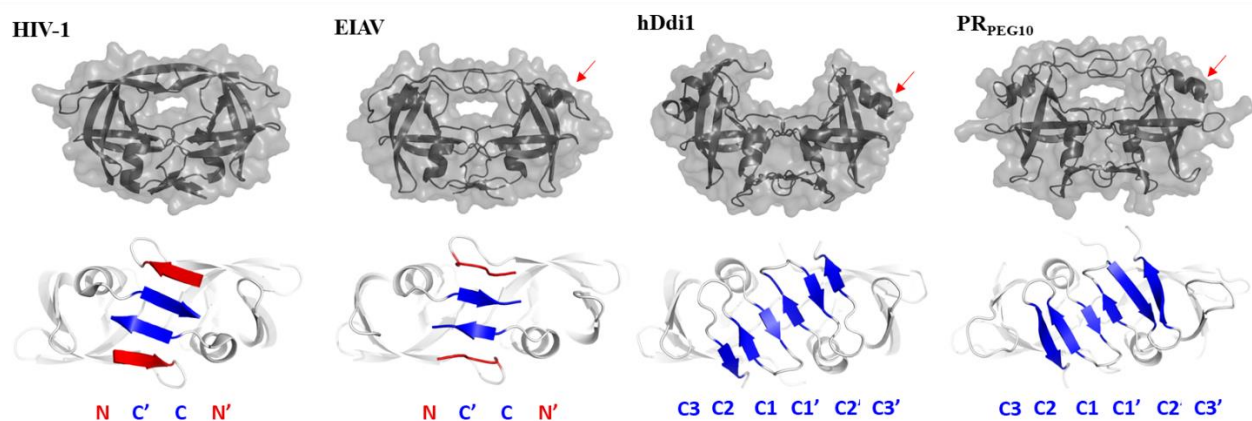
5.1.1. *In silico* vizsgálati eredmények

A PR_{PEG10}-ra vonatkozó szerkezeti adatok csupán korlátozott mértékben álltak rendelkezésre, kristályszerkezetét vagy oldatfázisú szerkezetét a mai napig nem határozták meg, így szerkezeti jellemzőinek vizsgálatára *in silico* módszereket alkalmaztunk. Az analízisek eredménye alapján a PR_{PEG10} konzervált aktívhely motívuma és másodlagos szerkezeti elemei hasonlóságot mutatnak a retrovírus és retrovírus-szerű proteázokéhoz (**14. ábra**). Míg a PR_{PEG10} szerkezet rendezetlenségének jóslása azt mutatja, hogy a kereteltolódás közvetlen közelében található régió (247-348 aa) nem rendezett szerkezetű, addig a katalitikus D-S-G-A motívum közelében elhelyezkedő régió α -helikális konformációt vesz fel (**14. ábra**). Ez a rövid helikális szakasz nem található meg a legtöbb retrovirális PR-ban, kivételt képeznek azonban az EIAV PR (Gutschina és mtsai, 1996), valamint a hDdi1 és yDdi1 proteázok (Sirkis és mtsai, 2006). A PR_{PEG10} domén C-terminális régiójának elemzése három β -redőt jelenlétét jósolta, melyek rövid hurokrégióval kapcsolódnak (*loop*), ez alapján a homodimer PR_{PEG10} dimerizációs régiójában összesen hat β -redő feltételezhető.

yDdi1	---TQVPMLYINIEIN---NYPVKAFVDTGAQTTIMSTR LA KTGLSRMIDKRFI GE ARG-VGT--
hDdi1	-----VTMLYINCKVN---GHPLKAFVDSGAQMTIMSQA CA ERCNIMRLVDRRWA GV AKG-VGT--
EIAV PR	VTYNLEKRP TTIV LI N ---DTP LN VLLDTGADTSVLT TA HYNRLKYRGR-K--YQGTGIGGVGGNV
HIV-1 PR	POITLWQRP LVTIKI G---GOLKEALLDTGADDTVLE E --MN----LPG-R--WKPKMIGGIGGFI
PR _{PEG10}	---SPHLQV MLQIHL PGRHTL FVRAMID SGASGNFID HE YVAQNGIPLRIK-DWP-ILVEAIDGRP
	△△
yDdi1	GKII GRIHQ AQVKIET---QYIPCSFTVL-DTDIDVLI GLD M LKR H LACVD LKENVLR IA -E-VETSFLSEAEIPK
hDdi1	QR IIGRVH LAQIQIEG---DFLQCSFSIL EDQ PMDMLL GLD M LRR HQC SID LKKNV LV IGTTGTQTYFLPEGELP-
EIAV PR	E-T-FST-PVTIKKKG---RHIKTRMLVA-DIPV-TILGRDILQDLGA KLVL -----
HIV-1 PR	K-VROY-QOILIEICG---HKAIGTVLVG-PTPV-NIIGRNLLTQIGC TLNF
PR _{PEG10}	IASG PVVHETHDLIVDL GDHREVL SFDV TQS PFF PVVLGV RWLST HDPNITWSTRSIVF DSEYCR YHCRM Y -----

14. ábra. A PR_{PEG10} szerkezet-alapú szekvencia-illesztése néhány retrovirális és retrovírus-szerű proteáz szekvenciával. A másodlagos szerkezetek jelölése élesztő (yDdi1; 2I1A.pdb) és humán Ddi1 (hDdi1; 3S8I.pdb), az EIAV (1FMB.pdb) és a HIV-1 (7HVP.pdb) proteázok esetében a kristályszerkezeti adatok, míg a PR_{PEG10} esetében a felépített homológ modell alapján történt. A D-S/T-G-A aktív hely motívum félkövér betűkkel jelölt, a másodlagos szerkezeti elemek félkövér és aláhúzott jelölést kaptak, amelyben a zöld szín az α -hélixeket mutatja. A kék szín a β -redőket jelöli, kivéve a dimerizációs felszín felépítésében is résztvevő N-terminális redőket, melyek pirosak (EIAV és HIV-1 proteázok). Az üres háromszögek az értekezésben bemutatott, PR_{PEG10} módosított aminosavakat jelölik (D370A és S371A). A szekvencia-illesztést Dr. Mótján János András készítette.

A homodimer PR_{PEG10} feltételezett szerkezetét homológ modellezéssel jósoltuk (**15. ábra**). Mivel az enzim N- és C-terminális határai kísérletesen még nem igazoltak, így a javasolt és alkalmazott doménhatárok csak hozzávetőlegesek. A feltételezett N-terminális vég (Ser346) előtt található régió, illetve a *frameshift* hely környezete (Gly319 és Lys320) nem mutat rendezettséget, mely alapján feltételezhető, hogy ezek a régiók már nem vesznek részt a globuláris proteáz kialakításában. A PR_{PEG10} C-terminális végére jósolt három β -redő hasonlóságot mutat a Ddi1 fehérjék dimerizációs régiójával, mely hasonlóság alapján a homodimer PR_{PEG10} esetében is hat β -redőt tartalmazó dimerizációs régiót modelleztünk. Továbbá, a Ddi1 és EIAV proteázok alkalmas templátnak bizonyultak a helikális inzert felépítéséhez is (**15. ábra**) (**Gutschina és mtsai, 1996**). A lebeny régió zárt konformációban történő megjelenítéséhez az EIAV PR kristályszerkezete adta a megfelelő templátot, ugyanis a Ddi1 fehérjék teljes hosszúságú lebeny régiói az elektronsűrűség térképeken nem látszanak (**15. ábra**) (**Sirkis és mtsai, 2006**). Habár a PR_{PEG10} és a választott templátok közötti szekvencia azonosság alacsony volt (kevesebb, mint 20 %), a modellezéshez választott fehérjék mégis alkalmas templátnak bizonyultak, hiszen a retrovirális és retrovírus-szerű proteázokra az irodalmi adatok alapján a szerkezetek nagymértékű hasonlósága jellemző, a szekvenciák közötti jelentősebb mértékű különbségek ellenére is.



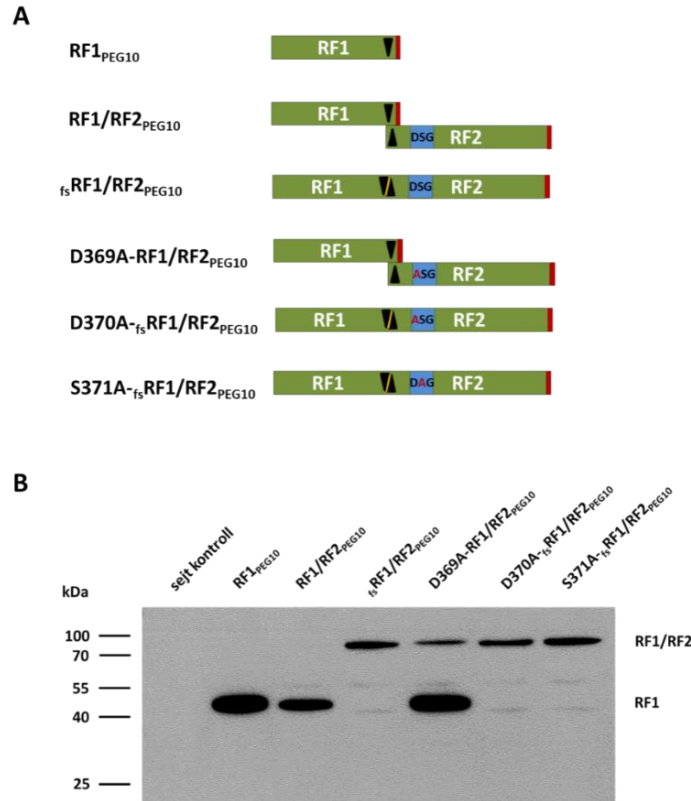
15. ábra. A PR_{PEG10} jósolt szerkezete hasonlóságot mutat más homodimer aszpartil proteázéhoz. A fehérje szerkezeteket a HIV-1 (PDBID: 7HVP), az EIAV (PDBID: 1FMB) és a hDdi1 (PDBID: 3S8I) proteázok esetében kristályszerkezeti adatok, míg a PR_{PEG10} esetében a homológ modell szerkezet alapján ábrázoltuk. A felső képek esetében a piros nyilak az aktív hely közelében lévő helikális inzertet jelölik. A proteázok dimerizációs régióját kiemelve láthatjuk az alsó képeken, melynél az N- és a C-terminális β -redőket piros és kék színek jelölik. Az ábrát Dr. Mótyán János András készítette.

Habár a HIV-1 PR esetében az N- és C-terminális β -redők egyaránt részt vesznek a dimerizációs régió kialakításában és a redők alternáló elrendezése nagymértékű stabilitást biztosít a homodimer számára, addig a PR_{PEG10} dimerizációs régió felépítése a Ddi1 fehérjékéhez hasonló, melyet kizárólag C-terminális és nem-alternáló β -redők építenek fel (**15. ábra**). A proteáz domén feltételezett C-terminálisa a harmadik β -redő közvetlen közelében található, mely várhatóan nem folytatódik hosszabb C-terminális kiterjesztésben, ugyanis erre a régióra szekvencia alapján nem jósolható másodlagos szerkezeti elem.

A jósolt modellszerkezet segítségünkre volt a proteáz biokémiai jellemzésében, mutációk tervezésében és a hasítóhely jóslásában.

5.1.2. PEG10 fehérjék tranzienst expressziójának ellenőrzése

A pQE-TriSystem plazmidba klónozott szekvenciák vizsgálatát elsőként a klónok expressziójának ellenőrzésével, a transzlálódott fehérjék detektálhatóságának vizsgálatával kezdtük. A PEG10 fehérjék előállítását HEK293T sejtvonalban történt. Bár a *The Human Protein Atlas* (<https://www.proteinatlas.org>) adatbázisa alapján alacsony RNS expressziót mutat a sejtvonal, mindez fehérje szinten nem volt detektálható Western-blot vizsgálataink során. A létrehozott variánsok bemutatásához azonos HEK293T sejt számot transzfektáltunk megegyező DNS plazmid koncentrációval, majd a teljes sejtlizátumokat Western-blot analízisnek vetettük alá (**16. ábra**). A PEG10 fehérje azonosítására alkalmas, kereskedelmi forgalomban elérhető antitestek kizárólag RF1_{PEG10}-specifikusak, így kísérleteinkhez a teljes RF1_{PEG10} (1-325 aa) szekvenciával immunizált, egérből származó poliklonális antitestet használtunk, mely nem alkalmas az RF2_{PEG10} kimutatására. Fontos megjegyezni, hogy a kísérletben a megjelent különböző fehérje formák mennyiségi összehasonlítása az alkalmazott antitest poliklonális jellege miatt nem volt lehetséges.



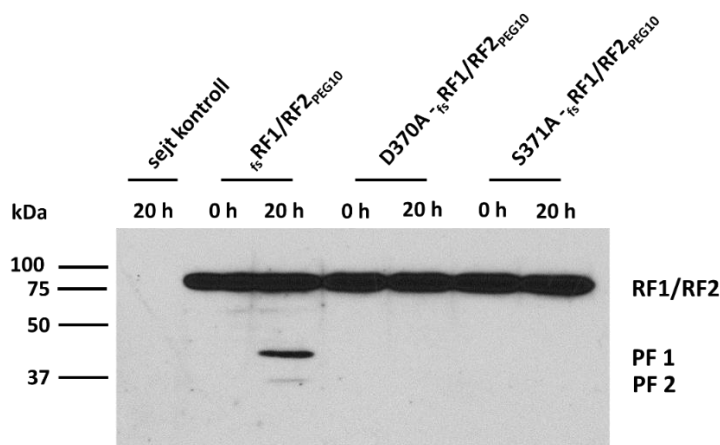
16. ábra. A vizsgált PEG10 formák sematikus ábrázolása és detektálása Western-blottal. (A) Zöld színnel jelölt az RF1 és RF2 olvasási keret, fekete háromszög jelzi a „csúszószekvenciát”, míg piros jelölés a translációs STOP kodon helyzetét jelzi. A sárga vonallal érintkező fekete háromszögek esetében az RF1 és RF2 azonos olvasási keretben helyezkedik el. Kék háttérrel a konszenzus katalitikus motívum van kiemelve, a módosított pozícióban lévő aminosav piros színnel van jelölve. **(B)** A HEK293T sejtekben expresszált PEG10 fehérje formák ellenőrzése anti-PEG10 antitest segítségével, Western-blot technika alkalmazásával történt.

A Western-blot kísérletek során HEK293T sejtizátumot használtunk kontrollként. A létrehozott variánsok közül az RF1_{PEG10} képviseli az endogén PEG10 expressziót mutató sejtekben nagyobb százalékban előforduló PEG10 fehérjét. Az RF1/RF2_{PEG10} poliproteint kódoló szekvencia esetében a -1 irányú kereteltolódás lehetősége ugyan adott a transláció során, de a kereteltolódás hatékonysága (Lux és mtsai, 2010), illetve RF2_{PEG10} aszpartil proteázának proteolitikus aktivitása befolyásolhatja a megfigyelt PEG10 fehérjék megjelenését (lásd a katalitikusan inaktív D369A-_{fs}RF1/RF2_{PEG10} mutáns esetében a 16. ábrán). Mivel a kereteltolódás frekvenciája nem szabályozható, a kísérleteink központjában pedig a PR_{PEG10} vizsgálata állt, a probléma kiküszöbölésére olyan mutáns változatot hoztunk létre, mely biztosítja számunkra minden esetben a poliprotein átíródását (_{fs}RF1/RF2_{PEG10}). A proteolitikus aktivitás bizonyítására a katalitikus triád

aminosavait mutáltuk az irodalmi bevezetőben részletezett ismeretekre alapozva. Kicseréltük az aktivitásért (D369A-_{fs}RF1/RF2_{PEG10} és D370A-_{fs}RF1/RF2_{PEG10}), illetve a homodimer stabilizálásért (S371A-_{fs}RF1/RF2_{PEG10}) felelős aminosavakat az enzim D-S-G motívumában. A mutációkra visszavezethető expressziós különbséget nem tapasztaltunk a D370A-_{fs}RF1/RF2_{PEG10} és a S371A-_{fs}RF1/RF2_{PEG10} fehérjék között.

5.1.3. PR_{PEG10} proteolitikus aktivitás bizonyítása

A rekombináns fehérjék összehasonlításának következő lépésében inkubációt követően hasonlítottuk össze azokat a variánsokat, melyeknél *frameshift* mutáció található (_{fs}RF1/RF2_{PEG10}, D370A-_{fs}RF1/RF2_{PEG10} és S371A-_{fs}RF1/RF2_{PEG10}). A kísérlet célja a PR_{PEG10} processzálo képességének bizonyítása volt, illetve vizsgálni terveztük a katalitikus triádot érintő mutációk proteolitikus aktivitásra gyakorolt hatását is. A kísérlet során a HEK293T sejtekben expresszálatott fehérjéket a sejtfeltárást követően 20 órát inkubáltuk, majd Western-blot technika segítségével ellenőriztük a változást (17. ábra).

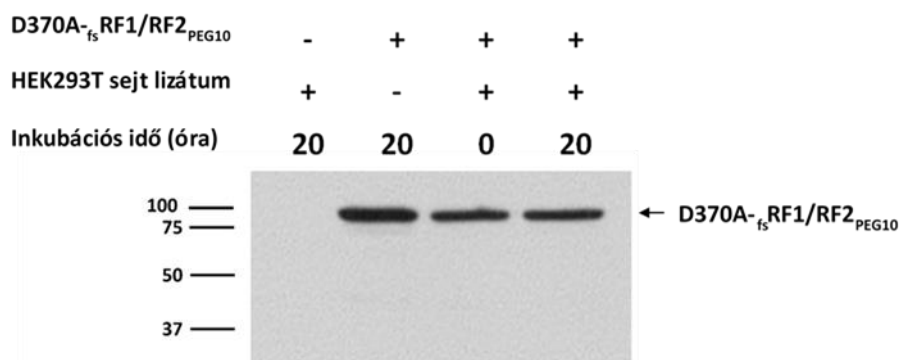


17. ábra. Reprezentatív ábra a PEG10 proteolitikus fragmentek megjelenésére. A HEK293T sejtvonalban termelt PEG10 fehérjék autoproteolitikus aktivitásának vizsgálata *in vitro* körülmények között. A fehérjéket anti-PEG10 antitest segítségével azonosítottuk. Inkubáció során az aktív proteázt expresszálo sejtekben két proteolitikus terméket detektáltunk (PF1 és PF2), míg a katalitikus mutánsok esetében nem történt változás.

A _{fs}RF1/RF2_{PEG10} fehérje esetében inkubációt követően a teljes méretű fehérjéhez képest két új sáv (~45 kDa és ~37 kDa molekulaméretű) volt megfigyelhető. A megjelenő fehérje-sávokat proteolitikus fragment 1 (PF1) és proteolitikus fragment 2 (PF2) néven említjük a továbbiakban

(17. ábra). A megjelenő fragmentek a PR_{PEG10} autoprocesszálo képességét mutatják, ugyanis a katalitikus triádot érintő mutációkat hordozó variánsok (D370A-_{fs}RF1/RF2_{PEG10} és S371A-_{fs}RF1/RF2_{PEG10}) egyikénél sem tapasztaltunk változást.

Bár a kísérleteink során minden esetben használtunk proteáz inhibitor koktélt (cOmplete EDTA-free Protease Inhibitor Tablet, ROCHE, St. Louis, MO, USA), mely széles spektrumban gátolja a szerin és cisztein proteázokat, azonban az aszpartil proteázok mellett a metalloproteázok sem gátoltak. Annak a lehetőségnek a kizárására, hogy a teljes sejtlizátumban található egyéb enzimek hasítják a PEG10 fehérjét, a katalitikusan inaktív D370A-_{fs}RF1/RF2_{PEG10} fehérjét nem-transzfektált HEK293T sejtek teljes lizátumával inkubáltuk (18. ábra). A kísérlet eredményét bemutató Western-blot ábra egyértelműen alátámasztja az előző kísérletben levont következtetésünket, miszerint a _{fs}RF1/RF2_{PEG10} inkubációját követően megjelenő fragmensek a PR_{PEG10} katalitikus aktivitásának termékei, nem pedig egyéb celluláris proteázok hasítása következtében keletkeznek.

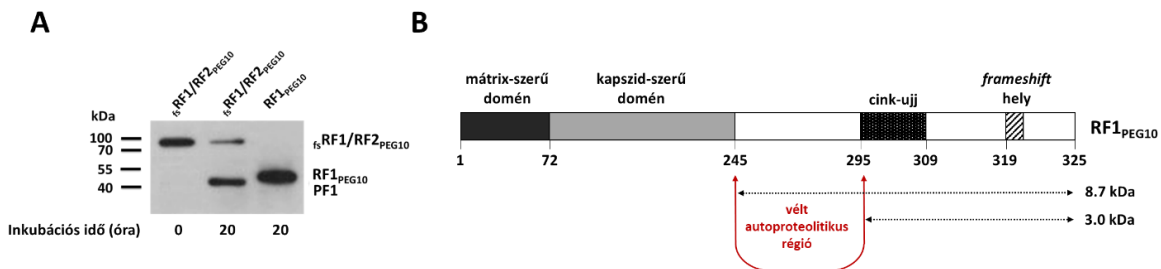


18. ábra. A HEK293T celluláris proteázai nem hasítják a PEG10 fehérjét. A katalitikusan inaktív D370A-_{fs}RF1/RF2_{PEG10} fehérjét HEK293T sejtek teljes lizátumával inkubáltuk, majd az inkubációt követően Western-blot technika segítségével, anti-PEG10 antitest használatával azonosítottuk a fehérjéket.

5.1.4. Proteolitikus hasítóhely becslése

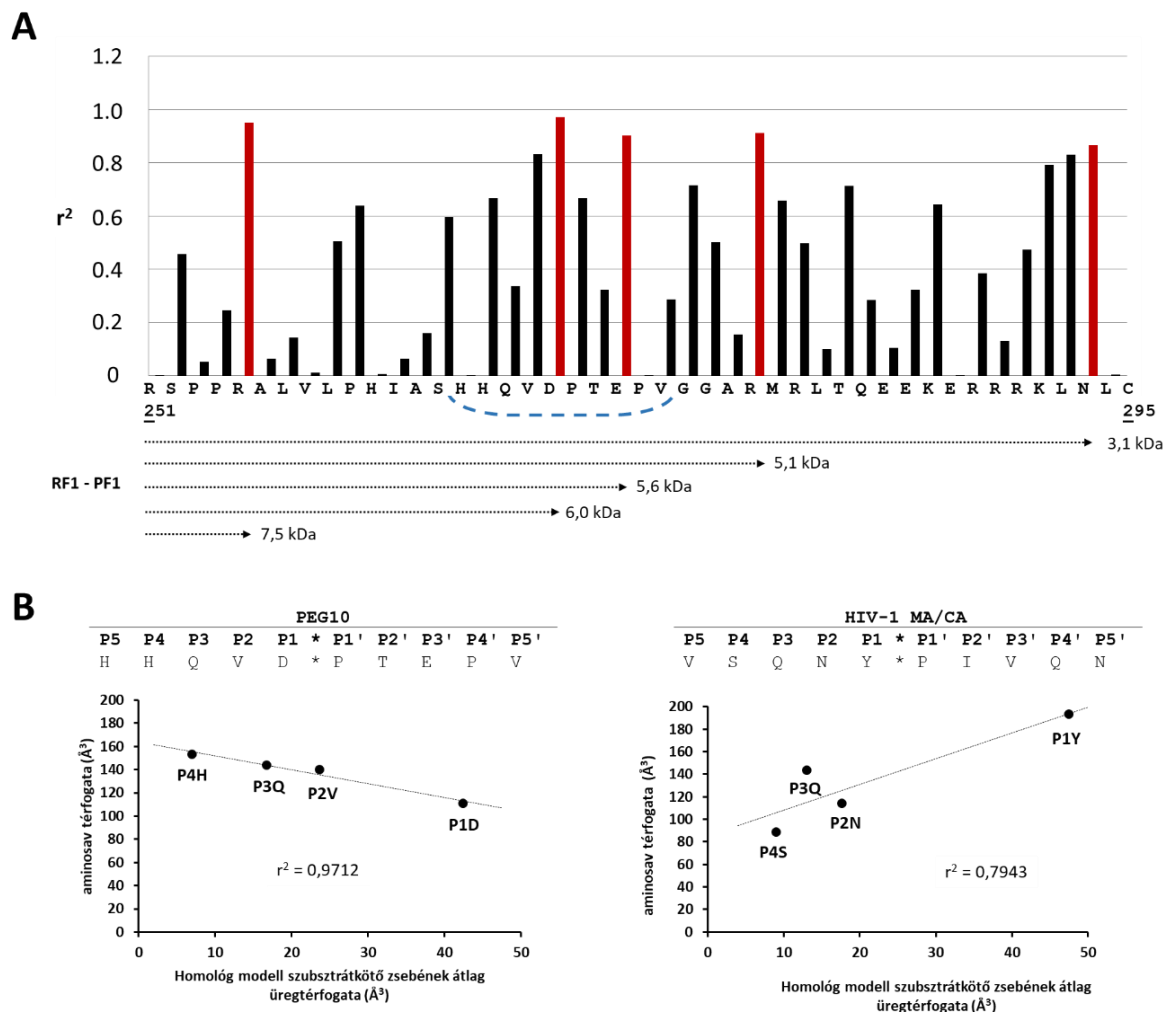
A homológ modellen alapuló számítások segíthetik a specificitás vizsgálatokat (Bagossi és mtsai, 2005; Eizert és mtsai, 2008) és *in vitro* kísérleti eredményekkel együtt jósolhatóvá teszik a hasítási hely szekvenciáját. A retrovirális proteázok közül a HIV-1 PR az egyik legjobban vizsgált enzimfehérje. Több jósló programot is kifejlesztettek már, melyek képesek egy célszekvenciában megbecsülni a hasítás helyét (pl. *HIVcleave* web szerver), azonban egy kevésbé vizsgált proteáz esetében ezek a programok nem, vagy az enzimek közötti különbségek miatt csak nem

megbízhatóan alkalmazhatóak és sok esetben nem áll rendelkezésre kellő mennyiségű kísérletes információ jósló algoritmus kidolgozásához. Mivel az autoproteolitikus felismerő szekvenciá(k) a PR_{PEG10} esetében ismeretlen(ek) és egyéb specificitás-vizsgálatok sem történtek, a homológ modell szerkezeten alapuló számításokat végeztünk a PEG10 fehérjén belüli autoproteolitikus hasítási hely azonosítására. *In vitro* vizsgálati eredményeinkből tudjuk, hogy az RF1_{PEG10} és PF1 proteolitikus fragment molekulatömegbeli különbséget mutat (**19. A ábra**), mely különbség számításaink alapján közel 4-5 kDa-nak bizonyult. Az adatok alapján tehát a hasítás helye az RF1_{PEG10} fehérje CA-szerű doménje és a cink-ujj motívuma közé volt jósolható (**19. B ábra**).



19. ábra. Autoproteolitikus régió becslése RF1/RF2_{PEG10} fehérjében *in vitro* eredmények alapján. A PF1 és RF1_{PEG10} fehérjék molekulatömege közötti különbséget Western-blot analízisek eredménye alapján határoztuk meg, az ábrán három független kísérletből származó reprezentatív eredmény szerepel (**A**). A becslés alapján a hasítási hely a keretelésűzés szekvencia elé tehető, a C-terminális CA-szerű domén és a cink-ujj motívum közé (**B**).

A lehetséges hasítási hely becslése érdekében a P4-P1 aminosavak térfogatát viszonyítottuk az S4-S1 szubsztrátkötő zsebek számított térfogatához. A négy aminosav hosszúságú szakaszok korrelációs vizsgálata (**20. A ábra**) alapján a legmagasabb értékeket HHQVD↓PTEPV szekvencia esetén kaptuk (**20. B ábra**), mely a potenciális hasítási helynek felelhet meg a következő okok miatt: i) az S4-S1 szubsztrátkötő zsebek mérete alapján ezen szekvencia P4-P1 aminosavai mutatják a legvalószínűbb kapcsolatot; ii) a P3 és P3' pozícióban Gln és Glu aminosavak vannak, mely összhangban van az S3 szubsztrátkötőzseb hidrofil aminosav-összetételével; és iii) a javasolt szekvencia hasonlít az 1-es típusú retrovírus proteáz hasítási helyeire (**Tözsér, 2010**), amelyek a P1' helyzetben Pro-t tartalmaznak. Fontos azonban megjegyezni, hogy az 1-es típusú hasítóhelyek P1 pozícióban aromás aminosavat tartalmaznak, míg az általunk jósolt szekvenciában a P1 helyzetben Asp található. Ez nem egyedi, a P1-Asp és P1'-Pro aminosavak a süllő epidermális hiperplázia vírus (*Walley epidermal hyperplasia virus*, WDSV) NC/PR hasítóhelye (TYPAD↓PIDC) esetében is megfigyelhetőek (**Tözsér, 2010**).



20. ábra. Autoproteolitikus régió *in silico* jóslása ${}_{\text{RF1/RF2}}\text{PEG10}$ fehérjében. Elvégeztük az $\text{RF1}_{\text{PEG10}}$ fehérje CA-szerű domén és cink-ujj motívum közötti szekvenciájának elemzését a potenciális hasítási hely megállapításához. A P4-P1 aminosavak térfogata összhangban van az S4-S1 szubsztrátkötő zsebek számított térfogatával (lásd a függelékben). **(A)** A feltételezett hasítási régióban meghatároztuk a korrelációs együtthatót (r^2). A legmagasabb értékek piros színnel jelöltek. Továbbá ezen hasítási pozíciók esetében bemutatjuk az $\text{RF1}_{\text{PEG10}}$ és PF1 fehérjék közötti molekulatömeg különbséget is (fekete szaggatott nyilak). A kék színű, szaggatott vonal a korreláció analízist bemutató grafikonban **(B)** alkalmazott PEG10 szekvenciát jelöli. **(B)** A korrelációs analízis alapján meghatározott hasítási szekvencia PEG10 esetében ${}^{266}\text{HQVD}\downarrow\text{PTEP}{}^{273}$. Összehasonlításképp elvégeztük a HIV-1 MA/CA ismert hasítási szekvenciájának korrelációs analízisét is a már publikált adatok alapján (**Bagossi és mtsai, 2005; Eizert és mtsai, 2008**). Az autoproteolitikus régió *in silico* jóslását és az ábrákat Dr. Mótyán János András készítette.

5.1.5. PEG10 ubikvitinálása

A fehérjék ubikvitinálódása a poszt-transzlációs módosítások közül az egyik legfontosabb szignál, mely dönthet a fehérje proteozómában történő lebontásáról, de egyéb, a fehérje szabályzását befolyásoló reverzibilis módosításként is működhet.

In vitro kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a rekombináns PEG10 fehérje esetében számított és a Western-blot kísérletek eredménye alapján meghatározott molekulatömegek eltérést mutatnak. Az eltérések valamilyen poszt-transzlációs módosításra utaltak, a különbségek mértéke alapján a fehérje ubikvitinálódását feltételeztük. A 76 aminosavból álló ubikvitin címke a fehérje molekulaméretét befolyásolja, mely ubikvitin-egységenként közel 8,5 kDa-nal növeli meg a fehérje molekulatömeget. *In silico* algoritmusok segítségével vizsgáltuk, hogy a PEG10 fehérje tartalmaz-e ubikvitinálódási helyeket, mely vizsgálatokhoz különböző programokat is felhasználtunk. A jósló algoritmusok mindegyike azonosított lehetséges módosítási helyet. A jósló értékeket, illetve a webszerverek által jelzett módosítás jóslásának megbízhatóságát az **7. táblázat** mutatja, melyben a módosítást hordozó szekvenciát és az ubikvitinálódó Lys aminosavakat félkövér betűstílussal és aláhúzással jelöltük.

7. táblázat. A PEG10 ubikvitináció jóslása. A BDM-PUB előrejelzéshez az alapértelmezett küszöbérték 0,3 volt; „-“ jelzés az adott pozícióra nem jósolt ubikvitinációt

POZÍCIÓ	SZEKVENCIA	PhosphoSitePlus		UbiSite	BDM-PUB	UbPred
		LTP ¹	HTP ²	érték / megbízhatóság	érték	érték / megbízhatóság
K19	INNLR K VMKQSE	0	0	0,311656 (alacsony)	0,89	0,72 (közepes)
K22	LREK V M K QSEENN	0	21	0,318768 (alacsony)	-	0,76 (közepes)
K36	LQSQV Q KLTEENT	0	10	0,526757 (magas)	-	0,86 (magas)
K85	PEDLPE K FDGNPD	0	0	0,553221(magas)	-	0,87 (magas)
K136	ARWASA K LERSHY	0	28	0,487195 (közepes)	1,87	-
K155	AFMMEM K HVFEDP	0	0	0,3167 (alacsony)	-	-
K168	QRREVA K RKIRRL	0	0	-	1,65	-
K170	REVA K RKIRRLRQ	0	0	-	1,87	-
K225	SHLEVA K SLSALI	0	0	0,380662 (közepes)	1,45	-
K249	RAAAAR K PRSPPR	0	0	-	3,50	-
K286	RLTQE E KERRRKL	0	1	0,438893 (közepes)	-	-
K291	EKERRR K LNLCY	0	22	0,290411 (alacsony)	0,49	-
K311	ADNCPA K ASKSSP	0	0	-	2,21	0,65 (alacsony)
K314	CPAKA K SSPAGK	0	0	0,301204 (alacsony)	3,80	0,68 (alacsony)
K320	KSSPA G KLPGPAV	0	0	0,494103 (közepes)	3,08	0,74 (közepes)
K393	GIPLR I KDWPILV	0	0	0,604822 (magas)	-	-
K567	FVARNV K DGLITP	0	62	0,44881 (közepes)	-	-
K586	AQVLQV K RGWKLQ	0	49	0,393159 (közepes)	0,94	-
K590	QV K RGW K LQVSYD	0	27	0,453299 (közepes)	1,94	-

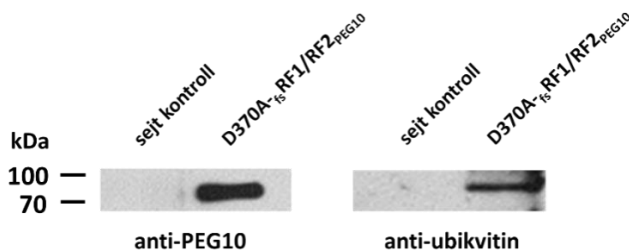
Az *in vitro* kísérleteink során, a kalkulált és Western-blot eredmények alapján meghatározott molekulatömegek közti eltérések alapján a *frameshift* mutációval rendelkező PEG10 variánsok esetében két ubikvitin kötődését feltételeztük. Annak bizonyítására, hogy valóban ubikvitin címke került a fehérjékre, az ubikvitinálódás kimutatására immunoblot technikát alkalmaztunk, ubikvitin-ellenes antitestet használva.

Mivel kísérleteinkben teljes sejtlizátumot vizsgáltunk, mely számos más, ubikvitinnel módosított fehérjét is tartalmazhat, tisztított PEG10 fehérjére volt szükségünk. A HEK293T sejtekben előállított, His₆-címkével jelölt fehérje tisztítását Ni-kelát affinitás kromatográfiával végeztük. A kísérlet kontrolljaként használt, nem-transzfektált HEK293T sejtlizátum azonos lépéseken ment keresztül, mint a vizsgált D370A-_{fs}RF1/RF2_{PEG10} fehérjét tartalmazó minta. A

¹ találatok száma, mely a tömegspektrometria módszerétől független azonosítás

² találatok száma, tömegspektrometrián alapuló azonosítás

mintákból két párhuzamos sorozatot futtattunk meg SDS-gélen, majd a nitrocellulóz membránra történő transzfert követően a membránt kettévágtuk, és külön inkubáltuk anti-PEG10 illetve anti-ubikvitin antitestekkel (**21. ábra**). A Western-blot kísérlet egyértelműen bizonyította a D370A-_{fs}RF1/RF2_{PEG10} fehérje ubikvitináltságát, míg a kontroll minta esetében nem kaptunk jelet a vizsgált molekulaméretnél.



21. ábra. PEG10 fehérje ubikvitináltságának bizonyítása Western-blot segítségével. Az affinitás kromatográfiával tisztított D370A-_{fs}RF1/RF2_{PEG10} fehérjét anti-PEG10 IgG segítségével azonosítottuk a tisztított frakciókban, majd a fehérjét anti-ubikvitin antitesttel is teszteltük. HEK 293T sejtlizátumot használtunk kontrollként, mely a D370A-_{fs}RF1/RF2_{PEG10} fehérje esetén alkalmazottal azonos mintaelőkészítésen ment végig (sejt lízis, Ni-kelát affinitás kromatográfia).

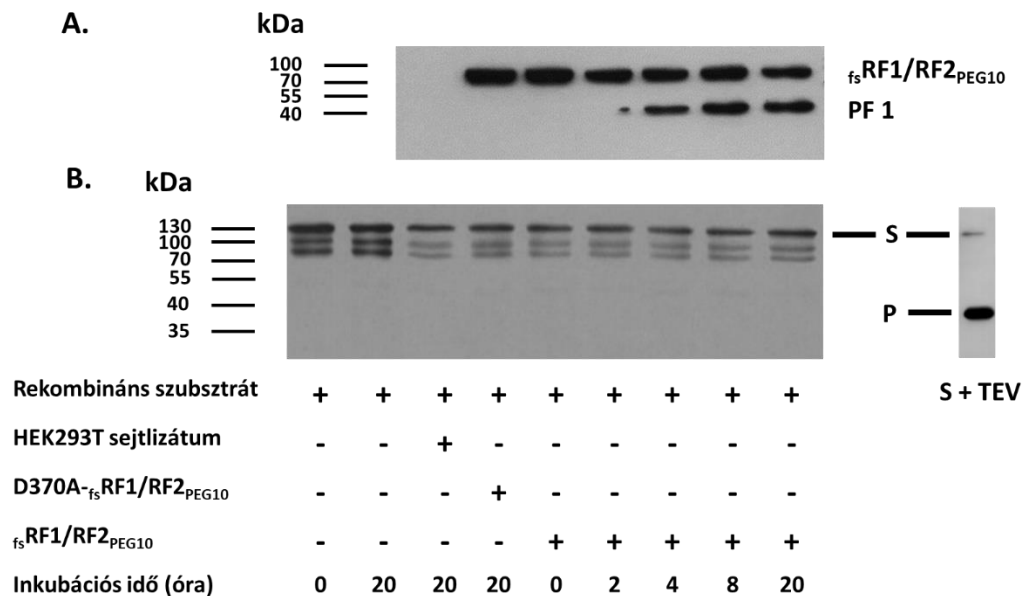
Azonban nem csak a teljes méretű PEG10 fehérjék esetében feltételezzük a módosítást. A két proteolitikus fragment (PF1 és PF2) molekulatömegbeli különbsége közel 8 kDa, mely pontosan 1 ubikvitin címkényi különbséget jelentene a proteolitikus fragmentek között (**17. ábra**). Ezt a hipotézist tovább erősíti az a tapasztalatunk, hogy a ~37 kDa méretű PF2 termék nem minden esetben azonosítható a Western-blot képeken, megjelenése esetleges. Ugyan próbálkoztunk a _{fs}RF1/RF2_{PEG10} fehérje tisztításával Ni-kelát affinitás kromatográfiával, majd pedig a tisztított fehérje PR_{PEG10} aktivitását is teszteltük, de sajnos autoprocesszálást nem tapasztaltunk a tisztított fehérje esetén. Mindez kizárta annak a lehetőségét, hogy anti-ubikvitin antitesttel megvizsgáljuk a proteolitikus fragmentek ubikvitináltságát. A feltételezést, miszerint a tapasztalt molekulatömegbeli különbség a proteolitikus fragmentek között ubikvitinálás következménye, megalapozottnak tekintjük, de a hipotézis bizonyítására további kísérletek szükségesek.

5.1.6. PR_{PEG10} transz-aktivitás vizsgálata

Irodalmi adatokból és saját kísérleti eredményekből is tudjuk, hogy a PEG10 poliprotein PR_{PEG10} endogén proteolitikus aktivitásának köszönhetően poszt-transzlációsan módosul (cisz-aktivitás), azonban intermolekuláris hasítási képességéről (transz-aktivitás) nem rendelkezünk

információval. A transz-aktivitás jelenségének kiderítésére létrehoztunk egy rekombináns szubsztrátot (His₆-MBP-f_sRF1/RF2_{PEG10}-mTurquoise2), mely a teljes méretű PEG10 fehérjéből az első 345 aminosavat tartalmazta (1-345 aa). Úgy becsültük, hogy ez a régió tartalmazza a feltételezett autoproteolitikus hasítási szekvenciáját, így amennyiben az enzim képes transz-aktivitásra, nagy eséllyel hasítani fogja a rekombináns szubsztrátot is.

A szubsztrát fehérjét BL21(DE3) sejtekben termeltettük, majd tisztítását Ni-NTA kötött mágneses agarózgyöngyökkel végeztük. Az így kapott His₆ és MBP címkével is fuzionált szubsztrátot a f_sRF1/RF2_{PEG10} fehérjét is tartalmazó HEK293T sejtek teljes lizátumával inkubáltuk, a változásokat pedig Western-blot technika segítségével követtük (anti-MBP és anti-PEG10 antitestek). A hasítási reakció mellett külön vizsgáltuk az enzim cisz-aktivitását is a fúziós forma proteolízisének nyomonkövetésével. A kísérlet eredménye alapján - bár intramolekuláris hasítás történt (**22. A ábra**) - a PR_{PEG10} nem volt képes hasítani a rekombináns szubsztrátot. A szubsztrát enzim általi „hozzáférhetőségét” TEV proteázzal végzett kontroll vizsgálattal igazoltuk (**22. B ábra**). Az előzetes hasítási reakciók során termékképződést nem tapasztaltunk, így fluorimetriás méréseket nem végeztünk.

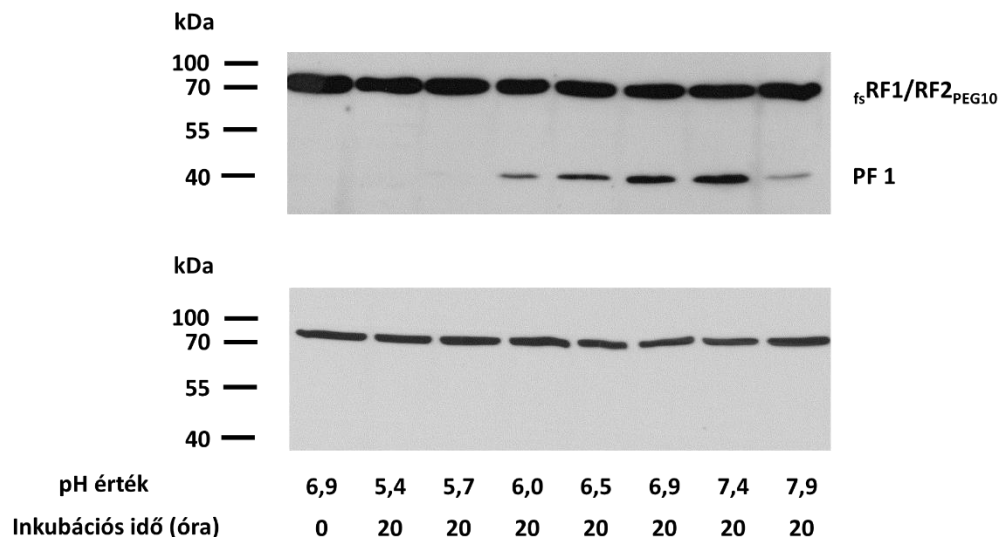


22. ábra. A PR_{PEG10} nem képes hasítani az autoproteolízis szekvenciát is tartalmazó rekombináns fehérjét. A tároló puffer ellen dializált f_sRF1/RF2_{PEG10} fehérjéket rekombináns szubsztráttal (S) inkubáltuk a táblázatban jelzett ideig. Western-blot technika segítségével, anti-PEG10 (**A**) és anti-MBP (**B**) antitestek alkalmazásával azonosítottuk a fehérjéket. Az eredmények alapján transz-aktivitás nem volt tapasztalható.

5.1.7. A pH hatása az autoproteolízisre

A PR_{PEG10} enzimfehérje optimális működését befolyásoló pH-t hét különböző pH értéken vizsgáltuk a pH 5-8 tartományban. A HEK293T sejtekben termeltetett, majd pedig a - PEG10 fehérjéket is tartalmazó - teljes sejtlizátumot tároló puffer ellen dializáltuk (pH 7,0). A különböző pH-jú META pufferekkel összemért sejtlizátumokat 20 órán át inkubáltuk, ezt követően pedig immunoblottal ellenőriztük a PF1 fragment megjelenését (**23. ábra**). A reakció kontrolljaként az autokatalízisre nem képes D370A-_{f_s}RF1/RF2_{PEG10} fehérjét is vizsgáltuk.

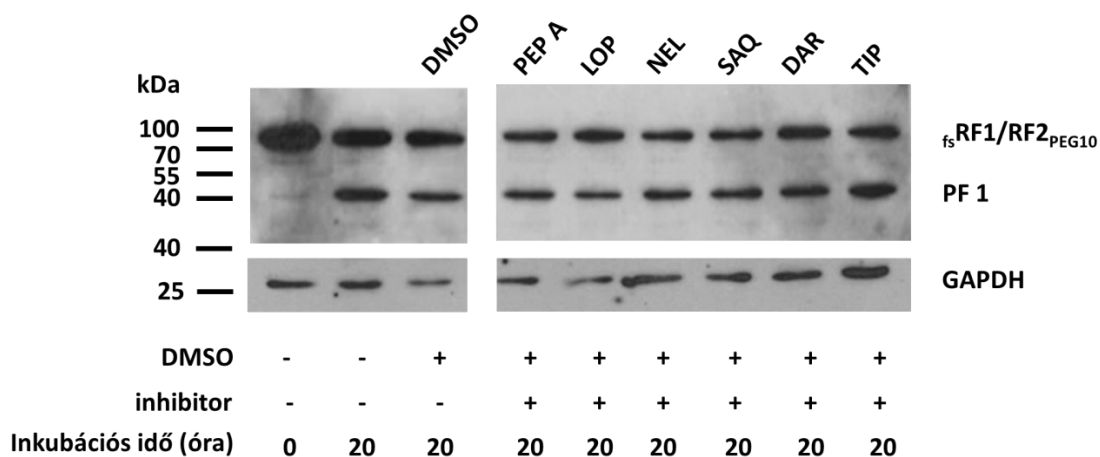
A vizsgálat eredménye alapján elmondható, hogy bár tapasztalunk proteolízist pH 6,0 és közel pH 8,0 körüli értékeken, az optimális pH tartomány a PR_{PEG10} számára közel neutrális (pH 6,9-7,4).



23. ábra. PEG10 fehérjék autoproteolízisének pH függése. A felső ábrarész az aktív proteázt tartalmazó f_s RF1/RF2_{PEG10}, míg az alsó a katalitikusan inaktív D370A- f_s RF1/RF2_{PEG10} mutáns vizsgálatát mutatja. A fehérjéket anti-PEG10 antitesttel detektáltuk.

5.1.8. HIV proteáz inhibitorok hatása a PEG10 autoproteolízisre

In vitro kísérletben vizsgáltuk néhány HIV proteáz inhibitor (pepszatin A, lopinavir, nelfinavir, saquinavir, darunavir és tipranavir) gátló hatását a PEG10 autoproteolízisére. A reakcióelegyhez a DMSO-ban oldott inhibitorok oldatát mértük, míg a kontroll minták esetében DMSO-val helyettesítettük a gátlószert (**24. ábra**).



24. ábra. HIV proteáz inhibitorok hatása a $fsRF1/RF2_{PEG10}$ fehérje *in vitro* körülmények között vizsgált autoproteolízisére. A Western-blot során anti-PEG10 és anti-GAPDH antitesteket használtunk a fehérjék kimutatásához. Az inhibitorok rövidítései: PEP A, pepsztatin A; LOP, lopinavir; NEL, nelfinavir; SAQ, saquinavir; DAR, darunavir; TIP, tipranavir.

A kísérlet során olyan gátlószereket próbáltunk ki, mint a klasszikus aszpartil proteáz inhibitornak számító pepsztatin A, első- (nelfinavir és saquinavir) és második generációs (lopinavir) peptid-mimetikus HIV PR gátlók, illetve „flexibilis” szerkezettel bíró második generációs HIV PR inhibitorok (darunavir és tipranavir). Az autoproteolízisre gyakorolt gátló hatást azonban egyik esetben sem tapasztaltunk, ami arra utal, hogy a PEG10 természetes rezisztenciával rendelkezik e gátlószerekkel szemben.

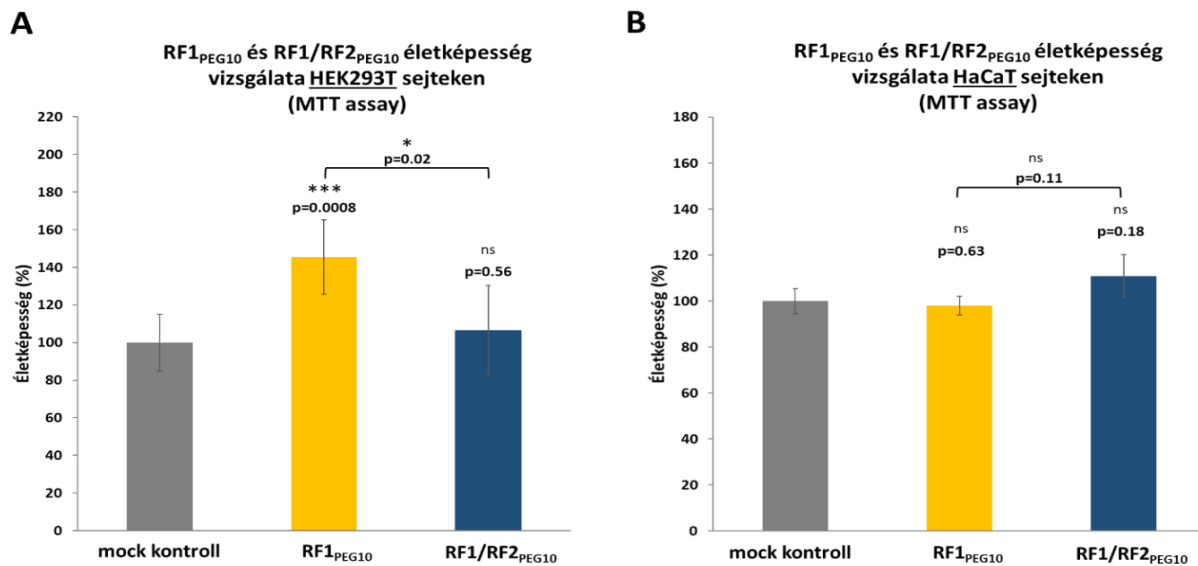
5.1.9. Életképesség és sejtproliferáció vizsgálata

A PEG10 több sejttípus daganatképzésében betöltött szerepének vizsgálatára számos irodalmat találunk (Tsou és mtsai, 2003; Okabe és mtsai, 2003; Ip és mtsai, 2007; Zang és mtsai, 2017). Éppen ezért fontosnak tartottuk a biokémiai vizsgálatok mellett, sejtekben is megvizsgáljuk a PR_{PEG10} túlzott mértékű expressziójának (overexpresszió) hatását a sejtek életképességére, illetve magára a sejtproliferációra.

Első lépésben endogén expresszió során megjelenő fő PEG10 fehérjét kódoló szekvenciákkal transzfektáltunk HEK293T és HaCaT sejteket. A két vizsgált fehérje közül az $RF1_{PEG10}$ tartalmazza a Gag-szerű fehérjét C-terminálisán egy cink-ujj doménnel, míg az $RF1/RF2_{PEG10}$ esetében a kereteltoldás lehetősége adott, így a proteáz domén átíródása is

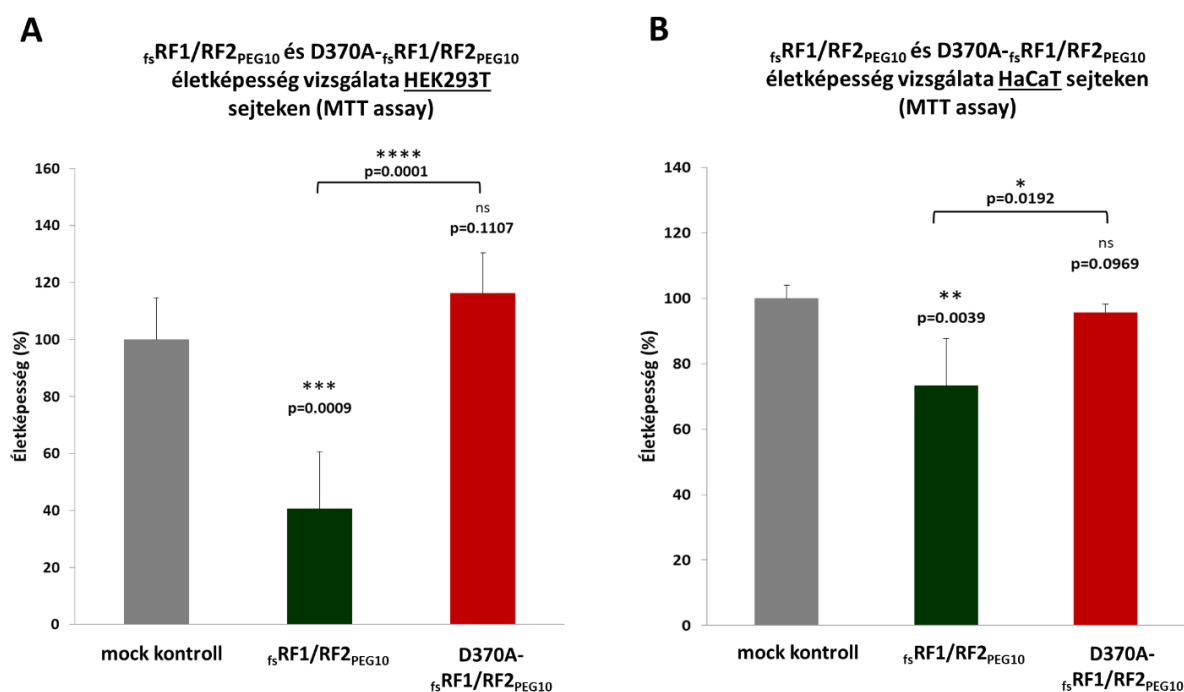
megettörténhet, azonban a frameshift hatékonysága irodalmi adatok alapján csupán 10-30 % közé tehető (Shigemoto és mtsai, 2001; Lux és mtsai, 2005). Az átíródás frekvenciája nem szabályozható, ugyanakkor az RF1_{PEG10} főfehérje mellett megjelenik az RF1/RF2_{PEG10} poliprotein is. A kísérlet kontrolljaként üres, PEG10 fehérjét kódoló szekvenciát nem tartalmazó plazmid DNS-sel transzfektált sejteket tekintettünk (mock kontroll).

A transzfekciót követően a sejtek életképességét MTT assay segítségével vizsgáltuk (25. ábra). Az RF1_{PEG10} fehérjét expresszáló HEK293T sejtek életképessége szignifikánsan növekedett a kontroll csoporthoz képest, míg RF1/RF2_{PEG10} esetében nem tapasztaltunk számottevő változást egyik sejtvonalnál sem. Amennyiben a PEG10 fehérjéket expresszáló sejtek eredményeit hasonlítottuk össze, az RF1_{PEG10} fehérjéket termelő HEK293T sejtek esetében a tapasztalt növekedés továbbra is szignifikáns különbségnek mutatkozott az RF1/RF2_{PEG10}-transzfektált sejtekhez képest. Az alacsony frameshift hatékonyság miatt a vizsgált PEG10 formák fő fehérje terméke mindkét csoportban az RF1_{PEG10}. Feltételezésünk szerint azonban az RF1/RF2_{PEG10} poliprotein funkcióképes PR_{PEG10} doménje felelős lehet a kialakult különbségért.



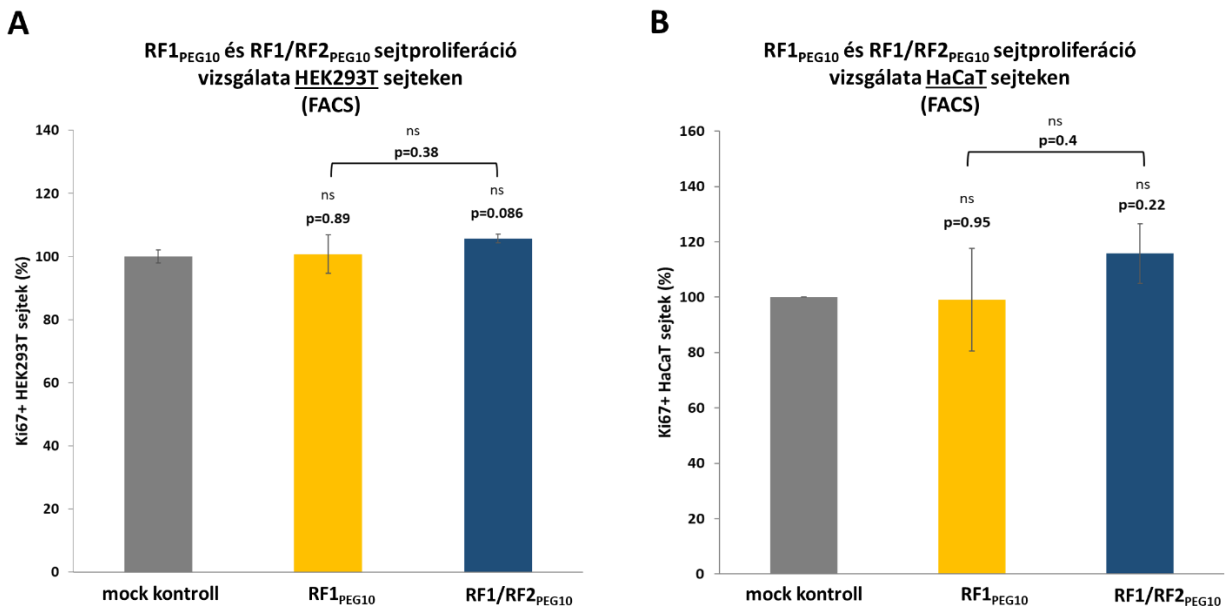
25. ábra. RF1_{PEG10} és RF1/RF2_{PEG10} fehérjéket expresszáló HEK293T és HaCaT sejtek életképességének vizsgálata. A PEG10 fehérjék életképességre gyakorolt hatását HEK293T (A) és HaCaT (B) sejteken vizsgáltuk. Az élő sejtek számát MTT assay segítségével határoztuk meg. A mock kontroll sejtek PEG10 szekvenciát nem tartalmazó, üres pQE-TriSystem plazmid DNS-sel transzfektáltak. Jelölések: ***p ≤ 0,001; *p ≤ 0,05; ns: nem szignifikáns (p > 0,05). A hibásávok szórást jelölnek (SD, n=3).

Annak bizonyítására, hogy a PR_{PEG10} fontos befolyásoló tényezője a sejtek életképességének, a katalitikusan aktív (_{fs}RF1/RF2_{PEG10}) és inaktív (D370A-_{fs}RF1/RF2_{PEG10}) szekvenciát tartalmazó plazmidokkal transzfektáltunk. Ebben az esetben a plazmidokról átíródó fehérjék nem függenek a kereteltolódás esetlegességétől, ugyanis a *frameshift* mutáció következtében a teljes kódoló szakasz transzlálódik. Amennyiben a mock kontroll mintákhoz viszonyítottuk az eredményeket (**26. ábra**), a katalitikusan inaktív PR_{PEG10}-t tartalmazó D370A-_{fs}RF1/RF2_{PEG10} fehérjét expresszáló sejtek életképességében nem tapasztalunk változást. Az aktív PR_{PEG10}-t tartalmazó _{fs}RF1/RF2_{PEG10} viszont már mindkét sejtvonal esetében jelentősen csökkentette az életképes sejtek arányát. Az eredmények alapján tehát megállapítható, hogy a PR_{PEG10} a vizsgált sejtekben az RF1_{PEG10} életképességet befolyásoló biokémiai folyamatait szabályozhatja, mely szabályozási folyamatok vizsgálata, molekuláris szinten történő feltárása a továbbiakban indokolt lehet.



26. ábra. _{fs}RF1/RF2_{PEG10} és D370A-_{fs}RF1/RF2_{PEG10} fehérjéket expresszáló HEK293T és HaCaT sejtek életképességének vizsgálata. MTT assay segítségével határoztuk meg a PR_{PEG10} hatását HEK293T (A) és HaCaT (B) sejtek életképességére. A mock kontroll sejtek PEG10 szekvenciát nem tartalmazó, üres pQE-TriSystem plazmid DNS-sel voltak transzfektálva. Jelölések: ****p ≤ 0,0001; ***p ≤ 0,001; **p ≤ 0,01; *p ≤ 0,05; ns: nem szignifikáns (p > 0,05). A hibásávok szórást jelölnek (SD, n ≥ 4).

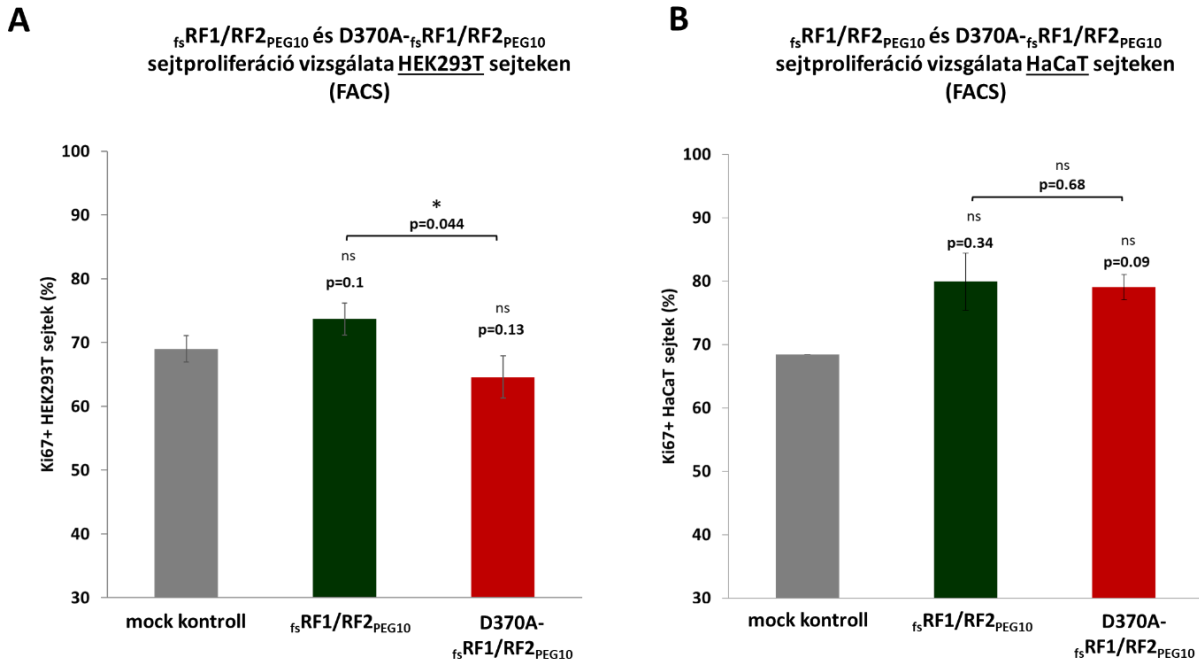
A különböző plazmidokkal végzett transzfekció hatását a sejtek növekedésére Ki67 fehérje kimutathatóságának vizsgálatával végeztük. A Ki67 fehérje jelen van a sejtciklus minden aktív fázisában (G1, S, G2, M), azonban a sejtek nyugalmi (G0) állapotban nem expresszálják (Li és mtsai, 2014). A fehérjét FITC-konjugált Ki67 ellenes antitesttel jelöltük, majd pedig áramlási citométerrel detektáltuk 36 órával a transzfekciót követően. A kísérlet során ebben az esetben is az üres, *peg10* szekvenciát nem tartalmazó DNS-sel transzfektált mintát tekintettük mock kontrollnak. Az RF1_{PEG10} és RF1/RF2_{PEG10} plazmidokkal transzfektált, növekedésre optimális körülmények között tartott sejtek nem mutattak változást a kontroll csoporthoz képest egyik PEG10 variáns esetében sem (27. ábra).



27. ábra. RF1_{PEG10} és RF1/RF2_{PEG10} fehérjéket expresszáló HEK293T és HaCaT sejtek proliferációs vizsgálata. A proliferáló sejtek számát transzfektált HEK293T (A) és HaCaT (B) sejtekben vizsgáltuk Ki67 fehérje kimutatásával, áramlási citométer segítségével (FACS). A mock kontroll sejtek PEG10 szekvenciát nem tartalmazó, üres pQE-TriSystem plazmid DNS-sel voltak transzfektálva. Jelölések: ns: nem szignifikáns ($p > 0,05$). A hibasávok szórást jelölnek (SD, $n=2$).

A *frameshift* mutánsok kontroll csoporthoz történő hasonlításakor szintén nem tapasztaltunk jelentős változást, azonban ha a $_{fs}$ RF1/RF2_{PEG10} és D370A- $_{fs}$ RF1/RF2_{PEG10} minták Ki67 pozitív sejteinek arányát hasonlítjuk össze, már szignifikáns eltérést tapasztalunk HEK293T sejtek esetében. A $_{fs}$ RF1/RF2_{PEG10} fehérje - a katalitikusan inaktív PR_{PEG10}-t expresszáló sejtekhez

viszonyítva - indukáló hatással volt a sejtek növekedésére. HaCaT sejtek esetében nem találtunk lényeges különbséget a sejtproliferáció vizsgálatokor, melyre magyarázat lehet a sejtek rövidebb duplikációs ideje (28. ábra).



28. ábra. A PR_{PEG10} hatása HEK293T és HaCaT sejtekproliferációs képességére. A proliferáló sejtek számát Ki67 fehérje kimutatásával, áramlási citométer segítségével (FACS) végeztük. A mock kontroll sejtek PEG10 szekvenciát nem tartalmazó, üres pQE-TriSystem plazmid DNS-sel transzfektáltak. Jelölések: * $p \leq 0,05$; ns: nem szignifikáns ($p > 0,05$). A hibásávok szórást jelölnek (SD, $n \geq 2$).

5.2. ASPRV1 vizsgálata

5.2.1. ASPRV1 *in silico* vizsgálati eredmények

A PR_{PEG10} -hoz hasonlóan a SASP14 esetében sem ismert a mai napig kísérletes módszerrel meghatározott szerkezet, így a szerkezeti jellemzők analizését *in silico* módszerekkel végeztük el.

A másodlagos szerkezetjósítás alapján, a SASP14 esetében a másodlagos szerkezeti elemek elrendeződése nagymértékű hasonlóságot mutat a homodimer aszpartil proteázokkal. Akárcsak a PR_{PEG10} predikció esetében, a SASP14 szerkezeti jóslása is a katalitikus motívum közelében egy helikális inzert, továbbá három C-terminális β -redő jelenlétére utalt, utóbbi alapján a PR_{PEG10} -hez

hasonló, összesen hat redőből álló dimerizációs régiót feltételeztünk a homodimer enzim esetében. A β -redők a SASP14 esetében is rövid hurokkal kapcsoltak. Az enzim a PEG10 fehérjéhez hasonlóan D-S-G-A szekvenciát tartalmaz, mely megfelel a retrovírus proteázok konzervált D-S/T-G-A aktívhely motívumának (**29. ábra**).

```

hDdi1 PR  ----VTMLYINCKVNGHPLKAFVDSGAQMTIMSQACAERC-NIMRLVDRRWAGVAK-----G-QRIIGR-
EIAV PR  VTYNLEKRPTTIVLINDTPLNVLLDTGADTSVLTTAHYNRLKYR-GR-KY-QGTGIG-GVG-GNVET-FS-
HIV-1 PR  PQITLWQRPLVTIRIGGQLKEALLDTGADDTVLEE--MN----L-PG-KW-KPKMIG-GIG-GFIKV-RO-
SASP14   ---SMGKGYYLKGKIGKVPVREFVDSGAQVSVVHPNLWEEV-TDGDLDTLQPFENVVKVANGAEMKILGV-

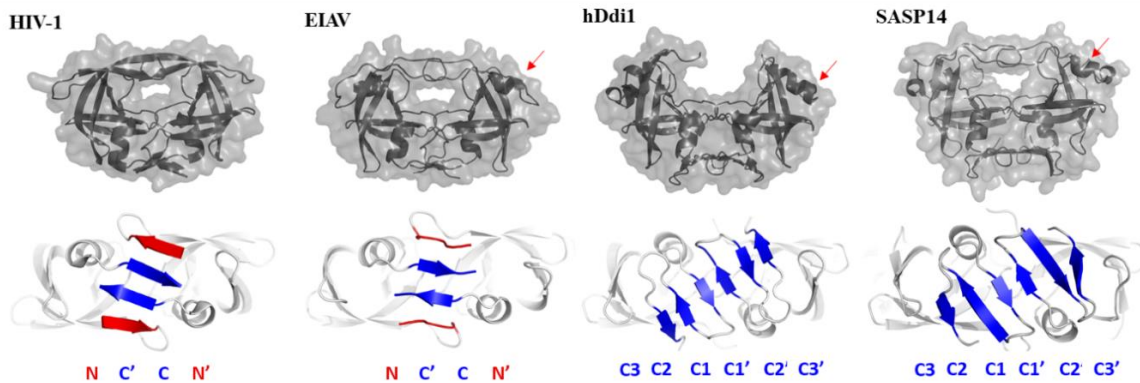
hDdi1 PR  VHLAQIQIEGDF-LQCSFSILEDQPMMLLGLDMLRRHQCSIDLKKNVLVIGTTGTQTYFLPEGELP
EIAV PR  TP-VTIKK-K-GRHIKTRMLVA-DIPV-TILGRDILQDLGAKLVL-----
HIV-1 PR  YDQIPVEIAGHK-AIGTVLVG-PTPV-NIIGRNLLTQIGATTLNF-----
SASP14   WDTAVSLGK-LK-LKAQFLVANASAEEAIIGTDVLODHNAILDFEHRTCTLKGKKFRLLP-----

```

29. ábra. Az ASPRV1 szerkezet-alapú szekvencia-illesztése néhány retrovirális és retrovírus-szerű proteáz szekvenciával. A másodlagos szerkezetek jelölése SASP14 PR esetében szerkezetjósoló program segítségével, míg a többi feltüntetett PR esetében meghatározott kristályszerkezet alapján történt (hDdi1: 3S8I.pdb; EIAV: 1FMB.pdb; HIV-1: 7HVP.pdb). A kék szín a β -redőket jelöli, kivéve a dimerizációs felszín felépítésében is résztvevő N-terminális β -redőket, melyek pirosak (EIAV és HIV-1 proteázok). A zöld szín az α -hélixeket mutatja. A szekvencia illesztést Dr. Mótyán János András készítette.

Noha a SASP14 esetében a mai napig nem rendelkezünk kísérletesen meghatározott háromdimenziós szerkezeti adatokkal, homológ modellezés alapján feltételezett 3D modelljét már az enzim azonosításakor publikálták (**Bernard és mtsai, 2005**). A modell elkészítéséhez azonban csak egyetlen templatstruktúrát alkalmaztak (EIAV PR) és a javasolt modellszerkezetet nem elemezték tovább. Saját kísérleteinkben azonban több templatot alkalmaztunk a pontosabb szerkezeti megjelenítés érdekében (**30. ábra**). A SASP14 fehérje C-terminálisára jósolt három β -redő jelenléte azt sugallta, hogy a homodimer SASP14 dimerizációs felülete hasonlít a Ddi1 fehérjééhez, így a dimer interfész felépítését a hDdi1 fehérje modell alapján végeztük. Az EIAV PR kristályszerkezetét a zárt konformációt mutató lebenyrégió modellezésére használtuk, ugyanis a PR_{PEG10} esetében is megemlített, Ddi1 fehérjék lebenyrégiójának rendezetlensége (**Sirkis és mtsai, 2006**) ebben az esetben is kizárta modellalaként való használhatóságát. Akárcsak a PR_{PEG10} estében, a szerkezetjósolás alapján a SASP14 is tartalmaz a katalitikus aminosavak közelében egy helikális inzertet, mely modellezéséhez az EIAV PR szintén jó templatnak bizonyult, többek között az aktív helyet körülvevő aminosavak nagy szekvencia-azonosságának köszönhetően (**Bernard és mtsai, 2005**).

Bár a kiválasztott templátok csak alacsony szekvencia-azonosságot mutattak az SASP14-gyel (<20%), mégis nagy szerkezeti hasonlóságot találunk közöttük (Sirkis és mtsai, 2006; Mótyán és mstai, 2020). Azonban fontos megjegyezni, hogy az adatok értelmezésénél figyelembe kell venni a modellek esetleges bizonytalanságait, így a pontos szerkezeti képeket csak kísérletes eredményekkel igazolhatjuk.



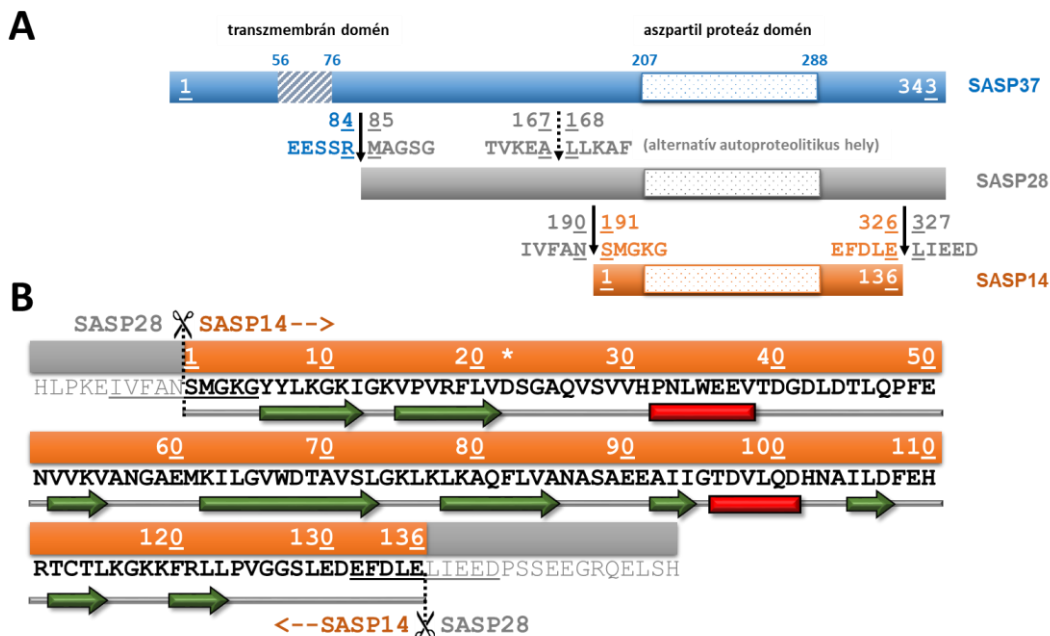
30. ábra. A homodimer aszpartil proteázok szerkezetével mutat hasonlóságot a SASP14 jósolt homológ modellje. A SASP14 esetében (1-124 aa) a jósolt szerkezeti modell, míg a HIV-1 PR (7HVP.pdb), az EIAV PR (1FMB.pdb) és a hDdi1 proteáz (3S8I.pdb) esetében a kristályszerkezeti adatok alapján jelenítettük meg a szerkezeteket. A piros nyíl a felső képeken a helikális inzerteket jelöli. Az alsó képek kiemelten mutatják a dimerizációs régiót, melyben az N- és C-terminális β -redők piros és kék színnel jelöltek. Az ábrát Dr. Mótyán János András készítette.

5.2.2. Mutációk tervezése a SASPáz fehérjékben

A vizsgált SASP14 enzimek esetében a Met2 aminosav (31. ábra) Ile-ra történő mutációját elvégeztük, mellyel az enzim stabilitás növelése és oxidációjának elkerülése volt a cél. A mutáció elvégzése nem befolyásolja az enzim működését, ugyanis a Met2 nem vesz részt szubsztrát-kötésben és a dimerizációban sem játszik szerepet, ugyanakkor szekvencia-alapú vizsgálat (I-Mutant 2.0) alapján ez a mutáció növeli az enzim stabilitását. Az M2I mutáns rekombináns SASP14 enzimformát vizsgáltuk *in vitro* kísérleteink során és tekintettük vad típusnak.

A GST-SASP28 forma esetében az autoproteolízis helyét érintő mutációkat vezettünk be és vizsgáltuk azok hatását az enzim processzáló képességére. Az A189K/N190I dupla mutáns esetében az N-terminális SASP14 processzáló hely P1 és P2 aminosavakat módosítottuk, míg az alternatív hasítóhely P1 és P1' pozíciójában található aminosavak módosításait a A167G/L168G/A189K/N190I négyszeres mutáns tartalmazta (31. ábra). Várakozásunk szerint az

N-terminális SASP14 processzáló hely (dupla mutáns) mutációját követően a hasítási pozíciót az alternatív hasítóhely veszi át, illetve az alternatív hely további mutációja (négyyszeres mutáns) megakadályozza az enzim autoproteolízisét.

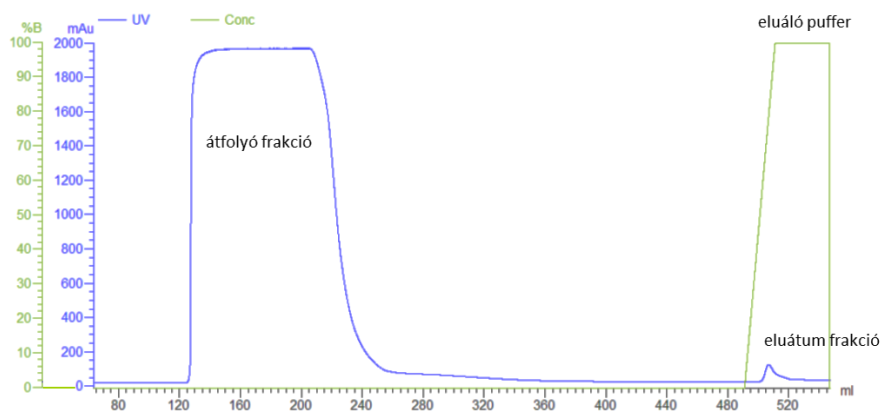


31. ábra. A SASP37, SASP28 és SASP14 enzimformák. (A) A különböző SASPáz fehérje formák eltérő színnel vannak jelezve. Az autoprocesszáló helyek szekvenciáit feltüntettük az ábrán. (B) A SASP14 fehérje (S1-E136) szekvenciáját és a jóssolt másodlagos szerkezetét bemutató ábra. A csillag a katalitikus aszpartát helyét jelöli a szekvenciában, míg az N- és C-terminális hasítóhelyek szekvenciái aláhúzással jelöltek. További jelölések: a zöld nyilak a β -redőket, míg a piros téglalapok az α -hélixeket mutatják.

5.2.3. GST-fúziós fehérjék expressziója és tisztítása

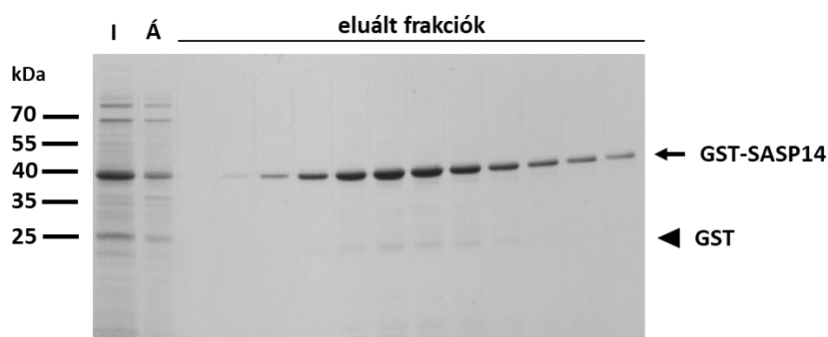
Az ASPRV1 fehérjék vizsgálatára létrehozott plazmid konstrukciók közül a SASP37 pre-proformát nem vizsgáltuk, ugyanis az irodalomból ismert volt, hogy a teljes hosszúságú fehérje hatékony expressziója *Escherichia coli* sejtekben, valamint a fehérje tisztítása problémás lehet, vélhetően a fehérje N-terminálisán jelen lévő transzmembrán régió jelenléte miatt (Bernard és mtsai, 2005).

A GST-fúziós címkével kapcsolt SASP14, illetve SASP28 fehérjéket BL21(DE3) baktérium sejtekben expresszáltuk, majd detergensnek jelenlétében szonikálással lizált mintákat affinitás kromatográfiával tisztítottuk (32. ábra).



32. ábra. Példa a GST-SASP14 vad típusú enzimfehérje affinitás kromatográfiával történő tisztítására. A fehérjét ÄKTA prime (Amersham Pharmacia Biotech) készülék segítségével GST Cartridge oszlop (BioRad) használatával tisztítottuk. Az injektált fehérje jelenlétét 280 nm hullámhosszon követtük (kék szín), míg a kötő- és eluáló pufferek váltását a zöld szín mutatja.

Affinitás kromatográfiát követően a GST-SASP14 fehérje frakciók tisztaságát SDS-PAGE segítségével ellenőriztük (**33. ábra**), majd a kiválasztott mintákat tároló puffer ellen dializáltuk. Hasonlóan tisztítottuk a GST-SASP28 fehérjét is, melynek vizsgálatát az 5.2.10. fejezetben mutatom be.

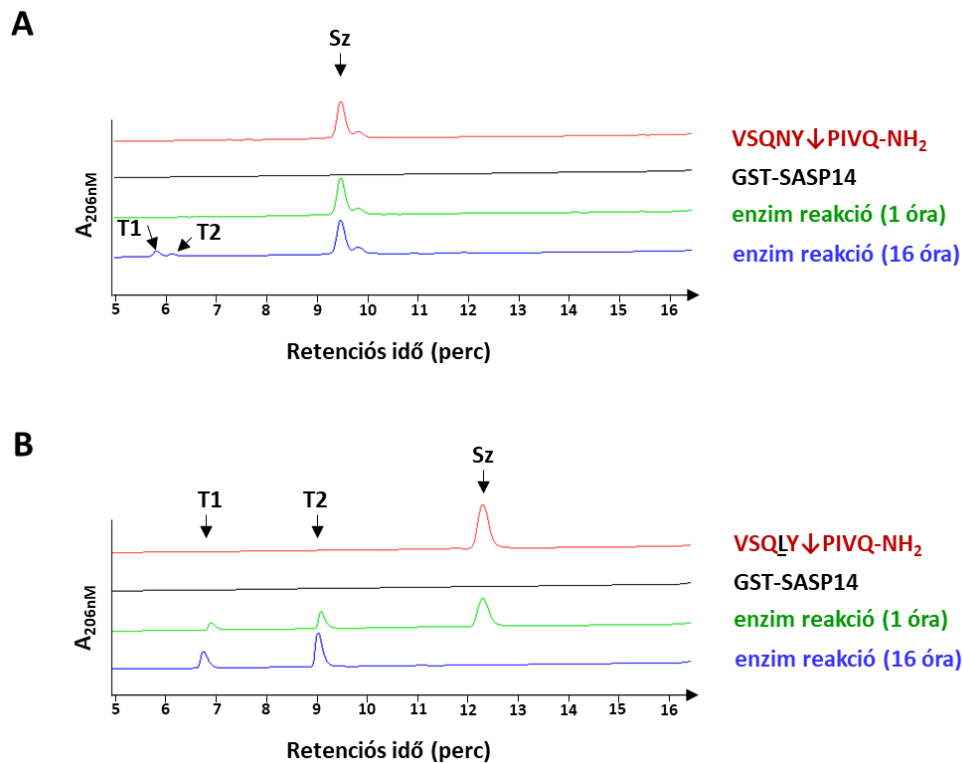


33. ábra. Reprezentatív gélkép a tisztított GST-SASP14 fehérje frakciókról. Az affinitás kromatográfiával tisztított fehérje frakciók ellenőrzését SDS-PAGE segítségével végeztük el. Elhanyagolható mennyiségű GST megjelenik néhány tisztított frakcióban, azonban a kódoló szekvencia alapján nem autoproteolízis eredménye. I: injektált minta; Á: átfolyó

5.2.4. GST-SASP14 enzim vizsgálatok

Az ASPRV1 biokémiai karakterizálása céljából enzimaktivitás méréseket végeztünk vad típusú és módosított HIV-1 MA/CA hasítóhelyet reprezentáló oligopeptid szubsztrátokon. Korábbi eredmények tapasztalatai alapján a természetes HIV-1 MA/CA hasítóhelyet reprezentáló

VSQNY↓PIVQ szekvenciát több különböző retrovirális proteáz is képes hidrolizálni (**Bagossi és mtsai, 2005; Eizert és mtsai, 2008**). A GST-SASP14 enzimmel végzett elsődleges hasítási reakciók alapján azonban 1 óra nem volt elegendő az enzim számára, míg egy éjszakás inkubációt követően is csupán minimális mértékű hidrolízis volt tapasztalható (**34. A ábra**).



34. ábra. HIV-1 MA/CA hasítóhelyet reprezentáló szubsztrátok hasítása GST-SASP14 proteázzal. Az ábra a természetes (**A**) és a módosított (**B**) szintetikus peptidszubsztrátok esetében mutatja a szubsztrátok és termékek elválasztásának reprezentatív HPLC kromatogramjait. Az ábrán pirossal jelölt a szubsztrát, feketeivel jelölt az enzim, zölddel (1 óra) és kékkel (16 óra) pedig a reakció kromatogramja szerepel az inkubációs időtől függően. A HPLC kromatogram alapján készült ábrákon Sz jelöléssel a szubsztrát csúcsot, míg T1 és T2 jelöléssel a termékeket jeleztük. A szubsztrát szekvenciáját érintő szubsztitúció fekete színnel és aláhúzással jelölt.

Korábban, a kutatócsoportunk által végzett összehasonlító specificitás vizsgálatok azt mutatták, hogy a HIV proteázokkal ellentétben, más retrovirális proteázok hidrofób S2 kötőzsebbel rendelkeznek, ezért a P2 helyen lévő Asn aminosav hidrofób aminosavra történő cseréje a vad típusú HIV-1 MA/CA hasító hely szekvenciában növelte a hidrolízis hatékonyságát több esetben (**Bagossi és mtsai, 2005**). A HTLV-1 és a HFV proteázoknál jelentős különbség volt tapasztalható az aminosavcserét követően, ugyanis míg a vad típusú szekvenciát nem, addig a P2-Leu variánst

már képesek voltak hasítani. Hasonlóan jelentős változás volt tapasztalható a BLV proteáz esetében is, melynél a P2-Leu módosított szekvencia 200-szor jobb szubsztrátnak bizonyult a vad típusú szekvenciához képest (**Bagossi és mtsai, 2005**). Ezen tapasztalatok alapján a HIV-1 MA/CA hasítóhely P2-Leu variánsát teszteltük GST-SASP14 enzim esetében is, és a vad típusú szekvenciával ellentétben megfelelő hasítási hatékonyságot tapasztaltunk, így ez a szubsztrát alkalmasnak bizonyult az enzimaktivitás jellemzésére (**34. B ábra**).

A GST-SASP14 proteáz Michaelis-Menten állandóra HIV-1 MA/CA P2-Leu szubsztráttal mért reakcióban 1,26 mM (K_M), katalitikus állandóra 0,034 s⁻¹ (k_{cat}), specificitási állandóra pedig 0,027 mM⁻¹s⁻¹ (k_{cat}/K_M) értéket határoztunk meg. A kapott értékeket táblázatba foglaltuk más retrovirális enzimekre meghatározott eredményekkel (**8. táblázat**). Bár a SASP14 enzim GST-fúziós formában meghatározott értékeit nem lehet teljes mértékben összehasonlítani a többi enzimre meghatározott kinetikai jellemzőkkel, azt a következtetést azonban levonhatjuk, hogy a GST-SASP14 enzim katalitikus hatékonysága a vizsgált szubsztráton nagyságrenddel kisebb a példaként említett retrovirális proteázokéhoz képest.

8. táblázat. Különböző homodimer aszpartil proteázok esetében meghatározott kinetikai állandók.

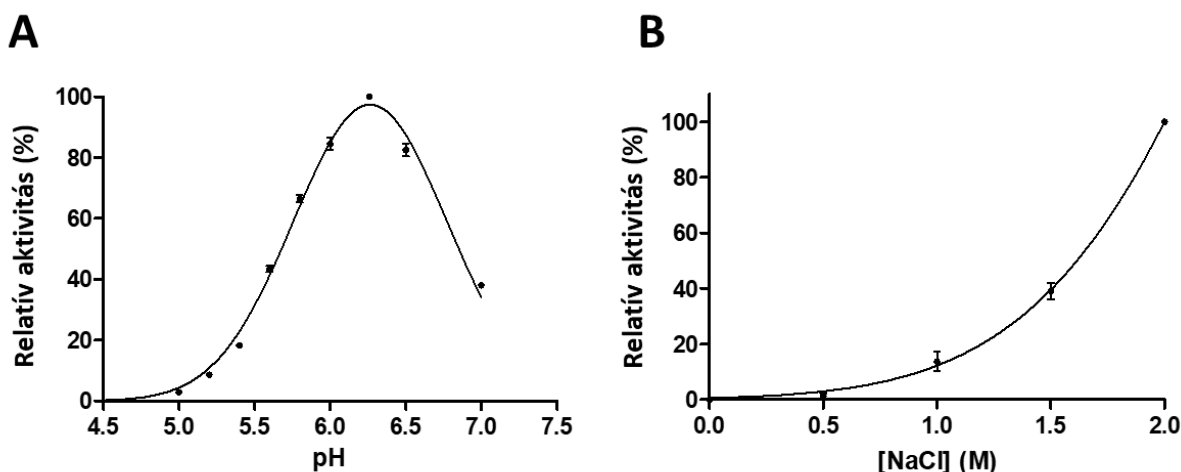
HASÍTÓHELY NEVE	SZEKVENCIA	PROTEÁZ	K_M (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_M (mM ⁻¹ s ⁻¹)	REFERENCIA
HIV-1 MA/CA	VSQNY↓PIVQ	GST-SASP14	nem hasadt			Golda és mtsai, 2020 b
		HIV-1	0,15	6,8	45,3	Tözsér és mtsai, 1991
		HIV-2	0,18	6,2	34,4	Tözsér és mtsai, 1992
		HTLV-1	nem hasadt			Tözsér és mtsai, 2000
HIV-1 MA/CA P2-Leu	VSQLY↓PIVQ	GST-SASP14	1,26	0,034	0,027	Golda és mtsai, 2020 b
		HIV-1	0,12	0,4	3,3	Tözsér és mtsai, 1991
		HIV-2	0,17	3,4	20,0	Tözsér és mtsai, 1992
		HTLV-1	0,26	0,05	0,2	Tözsér és mtsai, 2000

5.2.5. Optimális pH és ionkoncentráció meghatározása

Az extracelluláris pH a *stratum corneum* mélyebb rétegeiben közel semleges (pH 6,8), míg a felszínhez közeli pH érték savas (4,5-5,3) (**Matsui és Amagai, 2015; Ovaere és mtsai, 2009**). Az ASPRV1 szerepe a *stratum corneum*-ban arra enged következtetni, hogy az enzim optimális működéséhez savas pH tartomány szükséges, mindezt pedig irodalmi adatok is alátámasztják mind humán (**Bernard és mtsai, 2005**), mind pedig egér (**Matsui és mtsai, 2006**) fehérje esetében végzett vizsgálatok alapján.

Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a GST-SASP14 enzim pH optimuma közelebb található a *stratum granulosum* fiziológias pH értékéhez ($pH_{opt}=6,27\pm 0,02$), míg savas környezetben, mint például a *stratum corneum* felsőbb rétegei, veszt az aktivitásából (**35. A ábra**). Hasonlóan enyhén savas pH optimum értékkel rendelkezik HFV PR is (pH 6,6-6,8) (Fenyőfalvi és mtsai, 1999), a HIV-1 PR-zal összehasonlítva (pH 4-6) (Boross és mtsai, 1999) azonban lényegesen magasabb pH értéket kaptunk.

Hasonlóan a HFV (Fenyőfalvi és mtsai, 1999) és a HIV-1 (Boross és mtsai, 1999) proteázokhoz, a GST-SASP14 esetében is emelkedett enzimaktivitást tapasztaltunk az ionerősség növelésével (**35. B ábra**).



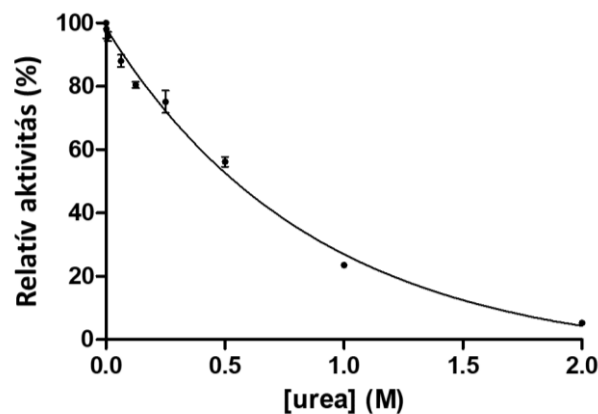
35. ábra. A pH és ionerősség hatása a GST-SASP14 enzim aktivitására. HIV-1 MA/CA P2-Leu módosított oligopeptid szubsztráton vizsgáltuk az enzim aktivitását különböző pH (A) és ionerősség (B) mellett (HPLC módszer). Az ábrákon a relatív aktivitás értékeket tüntettük fel növekvő pH (n=2) és sókoncentráció (n=3) függvényében. A hibásávok szórást jelölnek (SD).

5.2.6. Urea-disszociációs állandó (UC_{50}) meghatározása

A homodimerként aktív GST-SASP14 enzim stabilitását denaturáló ágens jelenlétében vizsgáltuk. A natív állapotban található fehérjék hidrofób magot és hidrofil felszínt alakítanak ki, mely energetikailag legkedvezőbb számukra. Ezért apoláris oldalláncaik többsége a hidrofób mag felé néz, mely denaturálószer (vagy akár magas hőmérséklet) hatására a fehérje letekeredésével a felszínre kerül. A letekeredett fehérje apoláris csoportjai és a víz által létrehozott klátrát szerkezet alacsony entrópiájú, melynek megszüntetésében az urea is szerepet játszik, stabilizálva ezzel a

letekeredett fehérjeláncot. Ezzel a nagyobb rendezettségű állapotból rendezetlen állapotba került fehérje szerkezetében történt konformáció változás befolyásolja az enzimatis tulajdonságot is. Az urea-indukálta denaturáció mechanizmusáról több elméletet is találunk az irodalomban (Bennion és Dagett, 2003; Zangi és mtsai, 2009; Auton és mtsai, 2007; Wang és mtsai, 2014).

Urea-disszociációs állandó (UC_{50}) alatt a dimerként aktív enzimaktivitásának 50 %-os csökkenését eredményező urea koncentrációt értjük (Liu és mtsai, 2005). Meghatározásához növekvő urea koncentráció (végkoncentráció: 0-2 M) jelenlétében vizsgáltuk az aktív homodimer GST-SASP14 proteáz stabilitását (36. ábra).



36. ábra. GST-SASP14 urea-disszociációs értékének meghatározása. HIV-1 MA/CA P2-Leu módosított oligopeptid szubsztrátot használtunk enzimaktivitás mérésre urea jelenlétében. Az ábrán a relatív aktivitás értékeket növekvő ureakonzentráció függvényében ábrázoltuk. A hibasávok szórást jelölnek (SD, n=2).

A kapott stabilitási értéket egy táblázatba foglaltuk a munkacsoportunk által korábban HIV-1, XMRV (Matúz és mtsai, 2012) és Ty1 retrotranszpozon (Gazda és mtsai, 2020) proteázok esetében mért értékekkel (9. táblázat). Az UC_{50} értékek alapján megállapítható stabilitásbeli különbségek részben az enzimek eltérő felépítésű dimerizációs felszínével (*dimer interface*) magyarázhatóak. Maga a dimerizációs felszín a molekulák közötti fő kölcsönható felületként definiálható, így azoknál a proteázoknál, ahol alternáló N- és C-terminális β -redők erősítik a molekulák közötti kapcsolatot (pl. HIV-1 PR) szignifinánsabban magasabb intermonomer kölcsönhatás-sűrűség állapítható meg, mint azoknál a fehérjéknél, amelyeknél csak C-terminális, nem ismétlődő β -redő található (pl. XMRV és Ddi proteázok) (Mótyán és mtsai, 2020). Utóbbi proteázokhoz hasonlóan a SASP14 dimerizációs felszínét is kizárólag C-terminális β -redők alkotják, ami relatíve alacsonyabb dimer stabilitást biztosít a homodimer számára.

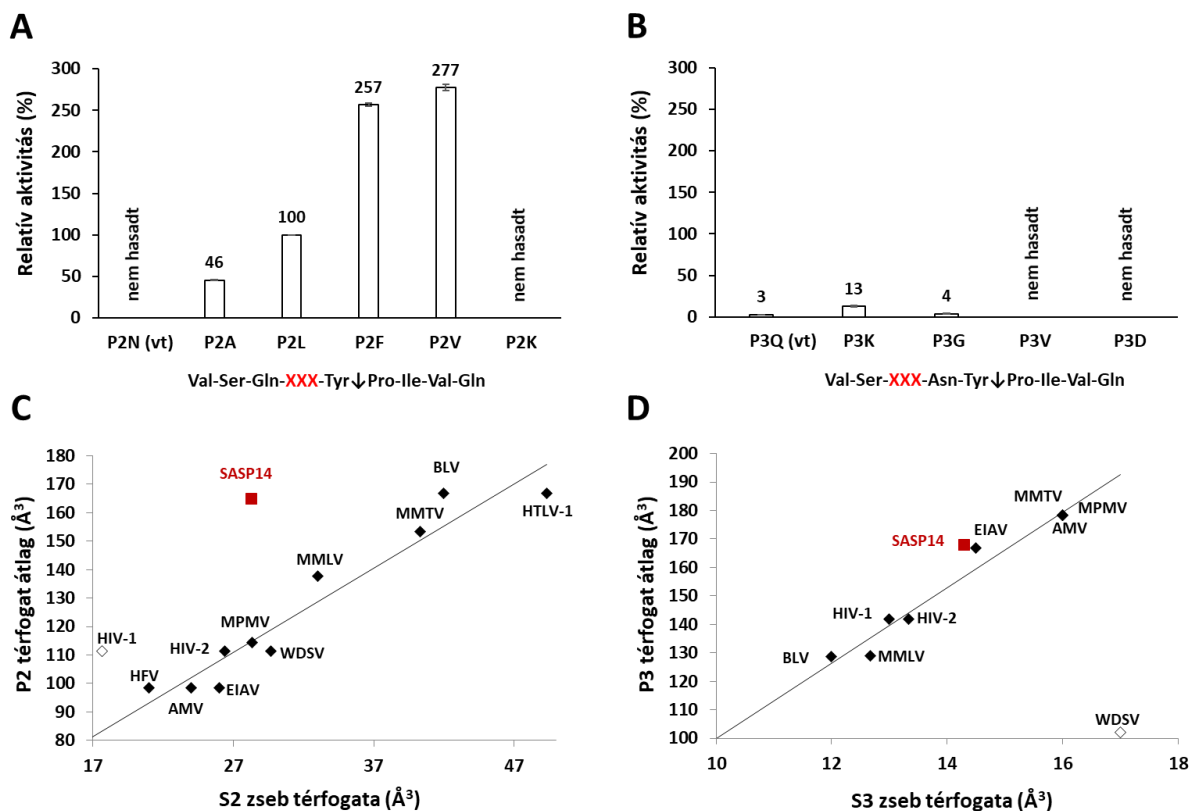
9. táblázat. Különböző homodimer aszpartil proteázok esetében meghatározott UC₅₀ értékek.

ENZIM	UC ₅₀ (M)	REFERENCIA
GST-SASP14	0,54 ± 0,06	Golda és mtsai, 2020 b
HIV-1 PR	1,47	Matúz és mtsai, 2012
XMRV PR	0,2	Matúz és mtsai, 2012
Ty1 PR	0,05	Gazda és mtsai, 2020

5.2.7. Szubsztrát specificitás vizsgálat

A GST-SASP14 enzim S2 és S3 szubsztrátkötő helyeinek aminosav preferenciáját a HIV-1 MA/CA (VSQNY↓PIVQ) hasítóhely P2 és P3 pozícióban módosított variánsait reprezentáló szintetikus oligopeptid szubsztrátok felhasználásával vizsgáltuk (**37. ábra**).

Az összemért reakcióelegyeket 1 órát inkubáltuk a P2 módosított szubsztrátokkal (**37. A ábra**). A természetes hasító helyet tartalmazó, vad típusú (VSQNY↓PIVQ szekvenciájú) szubsztrát esetében 1 óra alatt nem, míg 16 órás inkubációs időt követően csupán kismértékű hidrolízist tapasztaltunk. Eredményeink összhangban vannak azokkal a munkacsoportunk által korábban publikált adatokkal, melyekben több retrovirális proteáz aminosav preferenciáját vizsgálták (**Bagossi és mtsai, 2005**). A SASP14 enzim hidrofób S2 zsebbel rendelkezik, a kötőhely térfogata azonban nagyobb, mint a HIV-1 proteáz esetében (**37. C ábra**). Kísérleteinkből továbbá kiderült, hogy az S2 szubsztrátkötő hely hidrofób tulajdonsága, illetve a szubsztrát P2 pozíciójában található aminosavak hidrofób jellege meghatározó a hidrolízis hatékonyságának szempontjából.



37. ábra. GST-SASP14 enzim aminosav preferenciája P2 és P3 módosított szubsztátokon. Szintetikus HIV-1 MA/CA vad típusú (VSQNY↓PIVQ), P2, illetve P3 mutáns szubsztátokon vizsgáltuk a GST-SASP14 enzim aktivitását. A szubsztitúció helyét XXX-el jelöltük. Relatív aktivitás értéket határoztunk meg a vad típusú és P2 (A), illetve P3 (B) mutánsok esetében is, melyeknél a P2-Leu mutáns esetében tapasztalt aktivitást tekintettük 100 %-nak. A szórást a hibásávok mutatják (SD, n=2). Az ábra C és D részén szereplő grafikonokon fekete színnel a munkacsoportunk által korábban meghatározott értékeket ábrázoltuk (Bagossi és mtsai, 2005; Eizert és mtsai, 2008), pirossal a saját, SASP14 esetében meghatározott értékek szerepelnek. A grafikonokon az *in vitro* aktivitás-mérések alapján a leginkább preferált két P2 aminosav térfogatának átlagát ábrázoltuk az S2 (C) és S3 (D) szubsztátok zseb térfogatának függvényében. Az üres rombuszokkal jelölt értékeket kihagytuk a korrelációs analizisből.

A P3-módosított oligopeptid szubsztátok hidrolízise 1 órás reakcióidő mellett nem volt detektálható, ezért az inkubációs időt 16 órára növeltük (37. B ábra). A vizsgált oligopeptid szubsztátok közül a P3-Val és -Asp mutánsok 16 óra alatt sem hasadtak, illetve a többi vizsgált peptid (P3-Gln, -Lys és -Gly) esetében tapasztalható hidrolízis mértéke is igen alacsony volt. A tesztelt mutációk közül a P3-Lys mutáns esetében tapasztaltuk a legnagyobb mértékű hasítást, azonban ez a mutáns még így is szignifikánsan rosszabb szubsztátja volt a SASP14 enzimnek, mint az összehasonlításban 100 % relatív aktivitási értékű P2-Leu mutáns (1 órás reakcióidő).

A HIV-1 MA/CA vad típusú, illetve P2 és P3 módosított oligopeptid szubsztátokat GST-SASP14 enzimmel mértük össze, a reakciót 37 °C-on inkubáltuk 16 órát. A pontos hasítási hely meghatározásához a hasított és hasítatlan oligopeptid szubsztátokat HPLC-ESI-TOF analízisnek vetettük alá. A meghatározott m/z értékeket [M+H]⁺ és a számolt molekulatömegek minden esetben összhangban voltak a kísérletesen meghatározott értékekkel, eredményeinket a **10. táblázat** foglalja össze.

10. táblázat. Szintetikus oligopeptid szubsztátok hasítási helyeinek meghatározása tömegspektrometriával (HPLC-MS). A rövidítések jegyzékei lábjegyzetben olvashatóak.

NÉV	SZEKVENCIA	SZUBSZTRÁT		TERMÉK 1		TERMÉK 2	
		m/z [M+H] ⁺ mért (kalkulált)	Ri (perc)	m/z [M+H] ⁺ mért (kalkulált)	Ri (perc)	m/z [M+H] ⁺ mért (kalkulált)	Ri (perc)
vad típus ^{am1}	VSQNY↓ ² PIVQ	1046,567 (1046,563)	11,1	610,283 (610,283)	6,3	455,301 (455,298)	6,7
P2-Ala ^{am}	VSQAY↓PIVQ	1003,565 (1003,557)	11,6	567,282 (567,277)	20,5 ^{a3}	455,303 (455,298)	19,9 ^a
P2-Phe ^{am}	VSQFY↓PIVQ	1079,594 (1079,588)	15,4	643,306 (643,309)	11,1	455,296 (455,298)	6,5
P2-Leu ^{ac4}	VSQLY↓PIVQ	1046,584 (1046,588)	15,6	609,324 (609,324)	11,0	456,284 (456,281)	8,2
P2-Val ^{am}	VSQVY↓PIVQ	1031,584 (1031,588)	13,2	595,308 (595,309)	8,3	455,300 (455,298)	6,7
P3-Gly ^{am}	VSGNY↓PIVQ	975,529 (975,526)	11,1	539,248 (539,246)	6,0	455,300 (455,298)	6,6
P3-Lys ^{am}	VSKNY↓PIVQ	1046,602 (1046,599)	8,7	610,322 (610,320)	4,2	455,302 (455,298)	6,5

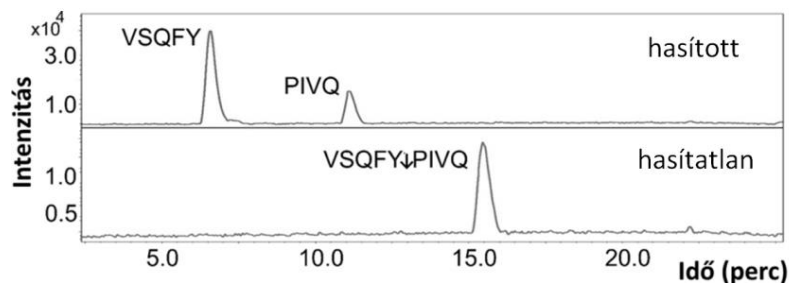
Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a szubsztátok mind a vad típusú, mind pedig a P2 és P3 módosított peptidek esetében is a P1-Tyr és P1'-Pro aminosavak között hasadtak (**38. ábra**), amely megegyezik a HIV-1 PR hasítási pozíciójával, alternatív hasítási helyet nem detektáltunk.

¹ amid-terminált peptid

² hasítási pozíció jelzése

³ grádiens elúció II. alkalmazása (6. táblázat)

⁴ sav-terminált peptid

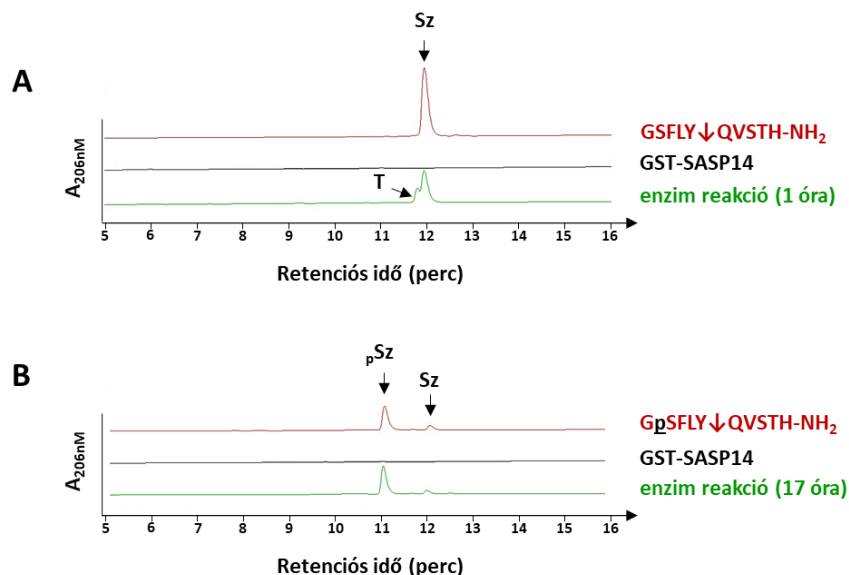


38. ábra. Példa a hasított és hasítatlan (konrtoll minta) oligopeptidok HPLC-MS báziscsúcs-kromatogramjára. A nyíl a hasítási pozíciót jelzi az oligopeptid szekvenciában.

5.2.8. Foszforiláció hatása a szubsztrát hidrolízisre

Irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy a fillagrin (FLG) a translációt követően foszforilálódik, melynek feltételezések szerint szerepe lehet a FLG egységeket összekötő szakaszok proteolízisének, így a FLG fehérjeérésének megakadályozásában, ugyanis a hasítási helyek foszforilációja miatt a szubsztrát hasítása gátódik (**Sandilands és mtsai, 2009**). A *PhosphoSite* adatbázisban található adatok szerint (**Hornbeck és mtsai, 2015**), a humán FLG linker szekvenciákban a konzervált P1-Tyr többsége foszforilált, illetve a P6, P3' és P4' aminosavak foszforiláltsága szintén valószínűsíthető. A P4-Ser foszforilációra ugyan van irodalmi adat, de a poszt-transzlációs módosítás hatása a proteolitikus processzálas jelenségére a mai napig nem tisztázott (**Yang és mtsai, 2012**). Továbbá ismert, hogy a P1-Tyr aminosav foszforiláltsága megakadályozza a HIV-1 PR általi szubsztrát hidrolízist, mindezt a molekulamodellzés is megerősíti, ugyanis a túl nagy és negatív töltésű foszforilált P1-Tyr S1 zsebhez történő kötődése kedvezőtlen (**Tözsér és mtsai, 1999**).

Azt feltételezve, hogy a szubsztrát foszforiláltsága hasonlóan gátló hatással lehet az ASPRV1 PR-ra, vizsgáltuk a természetes, azaz a fillagrin processzálo helyet reprezentáló szubsztrát, valamint annak P4-foszforilált formája hasíthatóságát. Kísérletünkben a vad típusú GSFLY↓QVSTH szekvencia hidrolízise megállapítható volt (**39. A ábra**), ugyanakkor a P4 pozícióban foszforilált oligopeptid (GpSFLY↓QVSTH) már nem bizonyult megfelelő szubsztrátnak a GST-SASP14 enzim számára (**39. B ábra**). Eredményeink alátámasztják a FLG egységeket összekötő szekvenciák esetében tapasztalható foszforiláció jelentőségét, mely valóban hozzájárulhat a processzálas gátlásához, így a FLG fehérje éérésének szabályozásához.



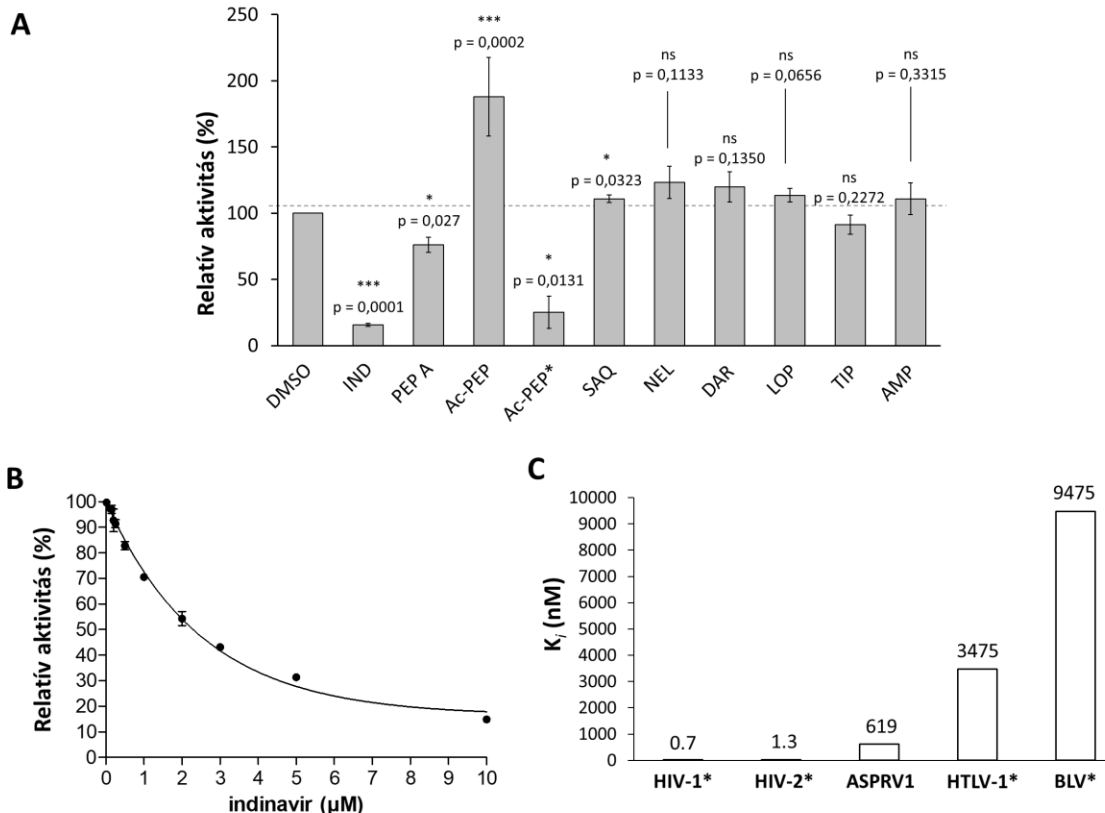
39. ábra. A pro-fillagrin szekvencia foszforilálása gátolja a szubsztrát GST-SASP14 általi hidrolízisét. A szintetikus oligopeptid szubsztrátok oldékonysága eltér, a vad típus hasítóhely szekvenciát (GSFLY↓QVSTH) reprezentáló szubsztrát (A) vízben jól oldódik, míg a módosított szubsztrát (GpSFLY↓QVSTH) (B) beoldása DMSO oldószer (50 %) segítségével történt. A HPLC kromatogram alapján készült ábrákon Sz jelöléssel a szubsztrát csúcsot, pSz jelöléssel a foszforilált peptid csúcsát, míg T jelöléssel a terméket jeleztük. Az ábrán piros színnel jelölt a szubsztrát, feketével jelölt az enzim, zölddel pedig az enzimreakció (1 óra, 17 óra).

5.2.9. Gátolhatósági vizsgálat HIV-1 proteáz inhibitorokkal

Irodalmi adatokból tudjuk, hogy a HIV-1 terápia során alkalmazott inhibitorok mellékhatásai között megjelenhetnek különböző bőr-problémák, mint például ajak szárazság, száraz bőr (*dermatitis*), súlyosabb esetben körömágygyulladás (*paronychia*), ajakgyulladás (*cheilitis*) (GarciaSilva és mtsai, 2000). Mivel az ASPRV1 szerkezeti hasonlóságot mutat más retrovirális proteázokkal, valószínűsíthető, hogy a HIV terápia során alkalmazott inhibitorok némelyike gátló hatással lehet az enzim aktivitására, esetlegesen ok-okozati összefüggésbe hozható HIV terápia esetén az említett bőrbetegségekkel.

Érdeklődésünk tehát olyan inhibitorok tesztelése felé irányult, melyek az aktív antivirális terápia (HAART) során alkalmazott HIV-1 proteáz gátlószerek közé tartoznak. Az általunk vizsgált gátlószerek az indinavir, tipranavir, saquinavir, nelfinavir, darunavir, lopinavir és amprenavir voltak. Továbbá teszteltük a pepsztatin A és acetyl-pepsztatin vegyületeket is, mint általános aszpartil proteáz gátlókat.

A gátló hatást 10 μM -os inhibitor végkoncentráció mellett vizsgáltuk, HPLC-alapú módszerrel követve az oligopeptid szubsztrátok hasítását. A tesztelt inhibitor panel alapján az indinavir gátló hatása volt a legjelentősebb (**40. A ábra**), amely az irodalomban megtalálható adatokkal összhangban van (**Bernard és mtsai, 2005**). Korábban Bernard és munkatársai már vizsgálták az SASPáz autoprocesszálásának gátolhatóságát, SDS-PAGE módszer segítségével igazolták, hogy az indinavir 100 μM végkoncentrációban képes az autoproteolízis gátlására. Saját kísérleti adataink alapján ez a gátlás azonban már 10 μM -os inhibitor koncentráció esetén is megfigyelhető volt. A gátló hatás értékének számszerűsítéséhez meghatároztuk a gátlási állandót (K_i), mely során növekvő inhibitor koncentráció függvényében, állandó szubsztrát koncentráció mellett vizsgáltuk a reakciósebesség változását (**40. B ábra**). Amennyiben összevetjük az eredményeinket a munkacsoportunk által korábban más proteázok esetében publikált adatokkal, láthatjuk, hogy a HIV-1 és HIV-2 proteázok esetében meghatározott értékekhez képest gyengébb, viszont a HTLV-1 és BLV proteázok esetében kapott K_i értékek alapján nagyságrenddel jobb inhibitora az indinavir a GST-SASP14-nek (**40. C ábra**).



40. ábra. GST-SASP14 gátlóhatósági vizsgálata aszpartil proteáz gátlókkal. (A) GST-SASP14 relatív aktivitás értékei 10 μM-os inhibitor végkoncentráció esetén. Az enzimelekciót 37°C-on végeztük 1 órás inkubációs idővel (szubsztrát szekvencia: VSQLY↓PIVQ). Inhibitorok: IND, indinavir; PEP A, pepsztatin A; Ac-PEP, acetyl-pepsztatin; SAQ, saquinavir; NEL, nelfinavir; DAR, darunavir; LOP, lopinavir; TIP, tipranavir; és AMP, amprenavir. # Ac-PEP esetében 15,5 μM-os koncentrációt is vizsgáltunk. A reakciók kontrollja inhibitor helyett DMSO-t tartalmazott. Jelölések: ns=nem szignifikáns, $p > 0,05$; *, $p \leq 0,05$; ***, $p \leq 0,001$. A hibásávok szórás jelölnek (SD, $n=2$). (B) A GST-SASP14 enzim aktivitását növekvő indinavir koncentráció mellett vizsgáltuk, a K_i meghatározása érdekében. Az ábrán feltüntetett hibásávok szórás jelölnek (SD, $n=2$). (C) A GST-SASP14 indinavir esetében meghatározott K_i értékének összehasonlítása más retrovírus proteázokra meghatározott értékekkel. * A HIV-1 és HIV-2 (Brower és mtsai, 2008), BLV (Sperka és mtsai, 2007), és HTLV-1 proteázok esetében (Bagossi és mtsai, 2004) megadott K_i értékek irodalmi adatok.

A klasszikus aszpartil proteáz gátlónak tekintett pepsztatin A Bernard és munkatársai kísérleteiben 1 mM-os végkoncentrációban sem volt hatással a GST-SASP14 enzimforma processzáló képességére (Bernard és mtsai, 2005), mely azonban az általunk alkalmazott érzékenyebb módszerrel vizsgálva (HPLC analízis) szignifikáns különbséget mutatott a kontroll reakcióhoz képest. További gátlószerek, melyek tesztelését mi is elvégeztük (saquinavir, amprenavir), nem gátolták a szubsztrát átalakulást.

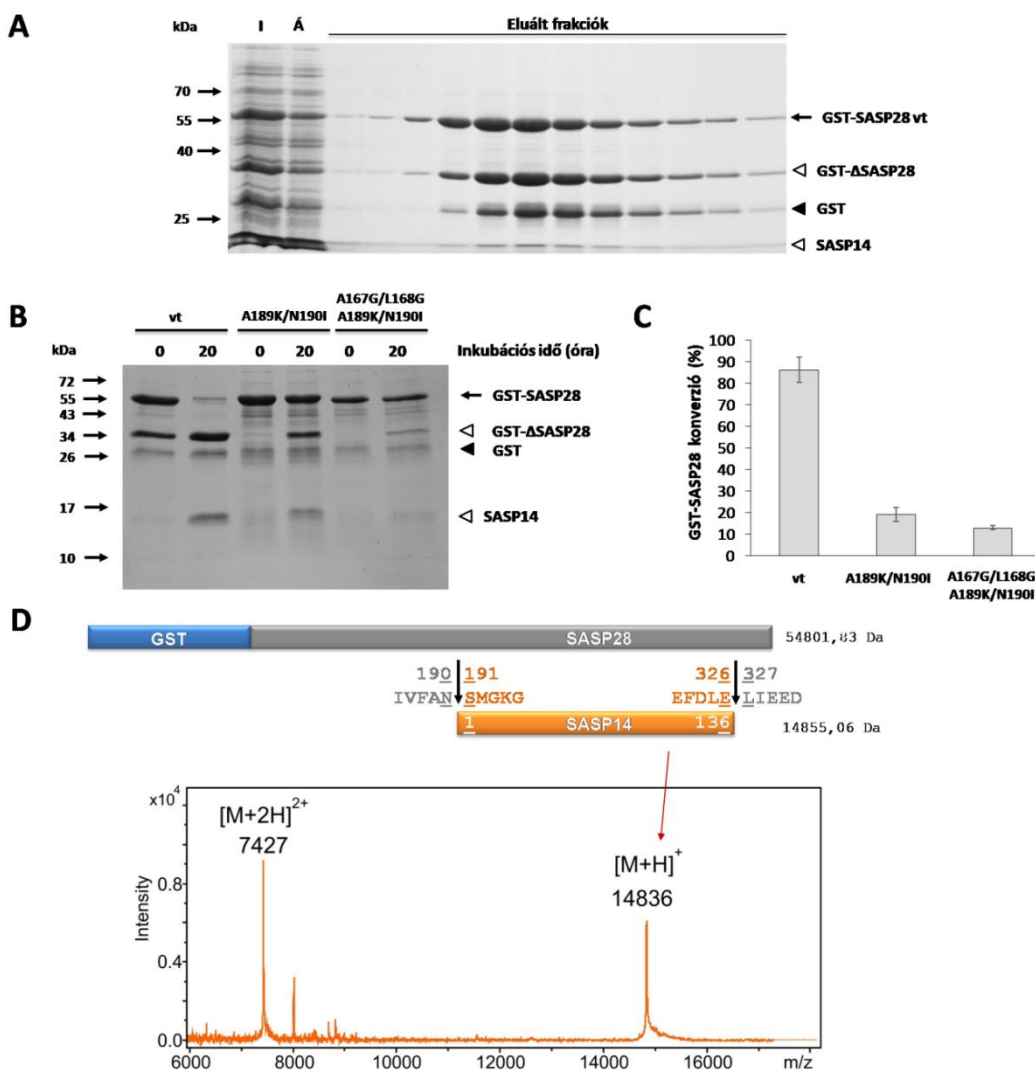
Az általunk vizsgált további inhibitorokra vonatkozóan, úgy, mint a tipranavir, lopinavir, nelfinavir, darunavir és acetil-pepszatin, nem álltak rendelkezésre irodalmi adatok a SASPáz gátolhatóságára vonatkozóan. Eredményeink alapján a tipranavir, lopinavir, nelfinavir és darunavir esetében nem volt gátolt a szubsztrát hidrolízis, míg az acetil-pepszatint vizsgálva egy, a már HIV-1 PR esetében publikált jelenséget figyeltünk meg. Az acetil-pepszatin inhibitor 10 μM végkoncentrációban mérve a reakcióelegyhez fokozott enzimaktivitást, míg növelve az inhibitor koncentrációját szignifikáns gátlást tapasztaltunk a kontroll reakcióhoz képest. A HIV-1 PR esetében a jelenséget az acetil-pepszatin dimerstabilitásra gyakorolt hatásával magyarázták (**Todd és Freire, 1999**). Kristályszerkezeti vizsgálatok alapján azonban az acetil-pepszatin kizárólag az enzim aktív helyéhez kötődik HIV-1 és XMRV proteázok esetében is, és nincs adatunk az enzim egyéb felszínéhez való kötődéséről, sem a megnövelt proteolitikus aktivitás jelenségéről más retrovirális, illetve retrotranszpozon eredetű enzim esetében.

A sörélesztő *Saccharomyces cerevisiae* Ty1 retrotranszpozon proteázához (**Gazda és mtsai, 2020**), vagy a PEG10 fehérje proteázához (PR_{PEG10}) hasonlóan (**Golda és mtsai, 2020 a**) a SASP14-et sem gátolták az amprenavir, darunavir, lopinavir, nelfinavir, saquinavir és tipranavir inhibitorok. Ezért megvizsgáltuk, hogy a HIV-1 PR rezisztencia mutációi előfordulnak-e az SASP14 szekvencia megfelelő pozícióiban (**41. ábra**). Megállapítottuk, hogy az SASP14-ben több olyan aminosav is található, amely megfelel a HIV-1 PR elsődleges vagy másodlagos rezisztencia mutációinak. Ezek közül csak három aminosav játszik szerepet a kötőhely kialakításában HIV-1 PR esetében: az I47 az S2 és S4 zsebekben, a Q58 az S4 zsebben, míg a V82 az S1 zseb esetén (**Bagossi és mtsai, 2005; Eizert és mtsai, 2008**). Az SASP14 V66 és A80 vad típusú aminosavai megfelelnek a HIV-1 PR Q58V és a G73A másodlagos rezisztencia mutációinak (**Weber és mtsai, 2015**), ennek ellenére kísérleteinkben a GST-SASP14 mégis gátolható volt indinavirral. Ugyan a SASP14 tartalmaz olyan aminosavakat, melyek a HIV-1 PR esetében hozzájárulhatnak a gátlószerekkel szembeni rezisztencia kialakulásához, ezek a hasonlóságok nem magyarázzák egyértelműen a SASP14 természetes rezisztenciáját bizonyos gátlószerekkel szemben, erre magyarázatot részletesebb szerkezeti vagy evolúciós vizsgálatok adhatnak.

expressziójakor tapasztalható autoproteolízis frekvenciájára és az expresszió során bekövetkező hatékonyabb processzálas már nem tette lehetővé a teljes hosszúságú rekombináns fehérje tisztítását (**Matsui és mtsai, 2011**). Egy másik, a P4 helyet érintő mutáció esetében az enzim azonban már lényegesen alacsonyabb autoproteolitikus aktivitást mutatott a vad típusú fehérjéhez képest (**Matsui és mtsai, 2011**). Saját kísérleteink során mi is tapasztaltuk a GST-SASP28-as formák expressziója és tisztítása során bekövetkező autoproteolízisét (**42. A ábra**).

További adatokat találunk az irodalomban arra vonatkozóan is, hogy az ASPRV1 N-terminális processzálo helyének (N190↓S191) eltávolításával alternatív hasítási hely jön létre (A167↓L168) (**Bernard és mtsai, 2005**), így kísérleteinket elsősorban az N-terminálisan található hasító helyek vizsgálatára terveztük. Létrehoztuk a GST-SASP28-A189K/N190I, illetve a GST-SASP28-A167G/L168G/A189K/N190I mutánsokat. Célunk annak vizsgálata volt, hogy az N-terminális hasítási szekvencia módosításának hatására a processzálas helye eltolódik-e az alternatív hasító hely irányába (dupla mutáns), míg a négyszeres mutáció esetében arra voltunk kíváncsiak, hogy a két hasítóhely egyszerre történő módosítása meggátolja-e a GST-SASP28 fehérje autoproteolízisét.

Az autoproteolízis vizsgálata során a tisztított vad típusú és módosított GST-SASP28 fehérjéket 37 °C-on inkubáltuk, az enzimaktivitás-mérés során is alkalmazott ASPRV1-reakciópufferben. Eredményeink azt mutatták, hogy a létrehozott mutációkkal nem sikerült az autoprocesszálas teljes gátlása, ugyanakkor annak hatékonysága jelentősen lecsökkent (**42. B és C ábra**). A kísérlet eredményét reprezentáló gékép alapján elmondhatjuk, hogy az A189K/N190I mutáció nem változtatta meg az alternatív hasító hely alkalmazásának gyakoriságát és a processzált termék méretei megegyeznek a vad típusú szekvencia esetében tapasztaltakkal. Kísérleti eredményünket MALDI-TOF-MS analízissel is megerősítettük, miszerint a számolt és az autoprocesszálast követően kimutatható SASP14 enzim molekulatömege közel azonos, nem mutatható ki, hogy alternatív processzálo helyen hasítás történt volna (**42. D ábra**).



42. ábra. A különböző GST-SASP28 formák autoproteolízis vizsgálata. (A) Reprezentatív SDS-PAGE gélkép a vad-típusú GST-SASP28 affinitás kromatográfiával történő tisztításáról. I: injektált minta, Á: átfolyó. (B) A tisztított GST-SASP28 enzimformákat 0 és 20 órát inkubáltuk. A fekete nyíl a teljes méretű GST-SASP28 fehérjét mutatja, az üres nyílhegy a már módosult fehérjeformát (GST-ΔSASP28) és a SASP14 enzimfehérjét, mint proteolitikus fragmenteket, a GST fekete nyíllal jelölt. (C) Az inkubációt követően denzitometriával határoztuk meg a prekursor forma átalakulásának mértékét, a vad típus esetében tapasztalt konverziót tekintettük 100 %-nak. A hibasávok szórását jelölnek (SD, n=2). (D) A kiprocesszálódott SASP14 enzimforma molekulatömegének meghatározása MALDI-TOF MS segítségével.

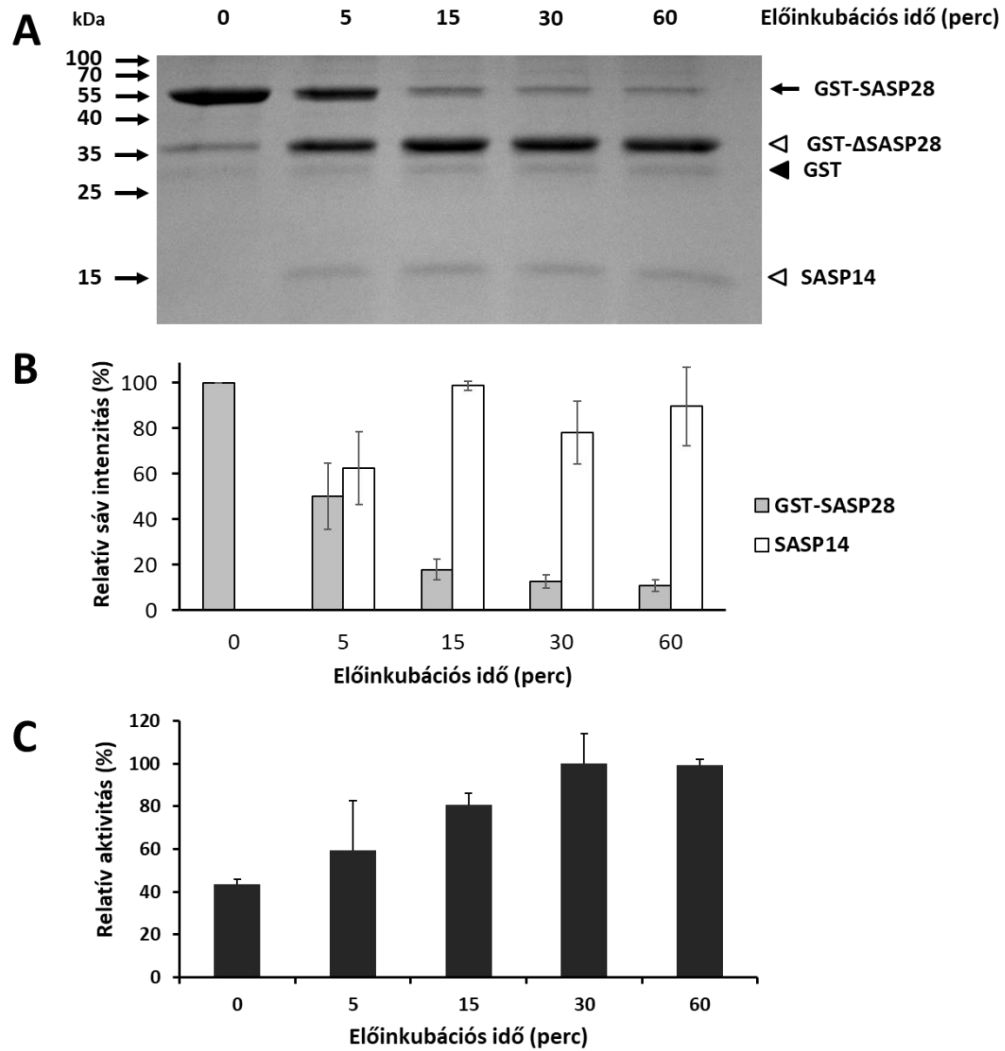
Habár a mutációk hatására nem változott a processzáló hely pozíciója a GST-SASP28 fehérjében, a proteolízis hatékonyságára ugyanez már nem mondható el. A kísérlet eredményét mutató gélkép denzitometriával végzett elemzése megmutatja, hogy a vad típusú aminosavszekvenciájú fehérjéből a vizsgált körülmények közel 80 %, míg a mutánsok esetében

nagyobb, mint 10 % -os hatékonysággal szabadul fel a SASP14 enzimforma 20 óra inkubációs idő alatt (**42. B és C ábra**). Az ismertetett eredményeink alapján megállapítható, hogy az N-terminális hasítóhely P2 és P1 pozícióban található aminosavak egyidejű mutációi (A189K/N190I) nem gátolják a processzálas képességét, csakúgy, mint a négyszeres mutációt hordozó fehérje (GST-SASP28- A167G/L168G/A189K/N190I) esetében sem. Szerettük volna összehasonlítani a GST-SASP28 és GST-SASP14 enzimek kinetikai paramétereit, de az önprocesszálas jelenségének teljes gátlása nélkül mindez nem volt lehetséges.

5.2.11. Autoaktiváció jelenségének bizonyítása

Az ASPRV1 fehérjére vonatkozó irodalom a fehérje autoproteolízisét autoaktivációként értelmezi (**Bernard és mtsai, 2005**), de valójában a SASP28 és a SASP14 enzimformák proteolitikus aktivitásának *in vitro* összehasonlítása ilyen értelemben még nem történt meg, nem állt rendelkezésre kísérletes információ arról, hogy a prekursor formához képest a processzált enzim valóban nagyobb aktivitással rendelkezik-e.

A kérdés megválaszolására olyan kísérletet terveztünk, melyben a GST-SASP28 és SASP14 formákat különböző arányban tartalmazó minták aktivitását mértük. Az önprocesszálas, így a SASP14 enzimforma megjelenését a GST-SASP28 jelzett ideig történő előinkubálásával biztosítottuk, a formák arányának változását SDS-PAGE analízist követően denzitometriával határoztuk meg (**43. A ábra**). A kiindulási mintában a GST-SASP28, míg az inkubációs idő növekedésével a processzáladott SASP14 enzim mennyisége dominált (**43. B ábra**).



43. ábra. Autoaktiváció jelenségének bizonyítása. (A) Reprezentatív SDS-PAGE gélkép, mely bemutatja a SASP14 enzimforma prekursor formából történő processzálását. A fekete nyíl a teljes méretű GST-SASP28 fehérjét mutatja, az üres nyílhegyek az autoproteolízis eredményeként felszabaduló GST- Δ SASP28 és SASP14 fehérjéket, a GST fehérjét fekete nyílhegy jelöli. (B) A relatív sávintenzitás értékek denzitometriával lettek meghatározva. A hibasávok szórást jelölnek (SD, n=3). (C) Az önprocesszálás enzimaktivitására gyakorolt hatását VSQLY \downarrow PIVQ oligopeptid szubsztráttal végzett enzimreakcióban határoztuk meg. A relatív aktivitás értékeket az előinkubációs idő függvényében ábrázoltuk. A hibasávok szórást jelölnek (SD, n=2).

6. MEGBESZÉLÉS

Munkánk első részében az eddig keveset tanulmányozott retrotranszpozon eredetű, humán PEG10 enzimfehérje vizsgálatával foglalkoztunk. Biokémiai jellemzéséhez HEK293T sejtekben expresszáltattuk a megtervezett PEG10 fehérjeformákat. Bár kísérletet tettünk a fehérjetermelésre és aktivitásának mérésre bakteriális rendszerben előállított PEG10 fehérjével is, azonban nem jártunk sikerrel. A prokarióta rendszerben történő fehérje expresszióknak sok előnye mellett nagy hátránya lehet, hogy egyrészt nem minden esetben sikerül a fehérjék megfelelő feltekeredése (*fold*ing) az eukarióta rendszerre jellemző dajkafehérjék hiánya miatt, másrészt a termeltetett fehérjék poszt-transzlációs módosulása mai ismereteink szerint egyáltalán nem, vagy nem megfelelően megy végbe. Ugyan az utóbbi években rohamosan nőtt a transzlációt követő fehérjemódosítások számának azonosítása és jellemzése a baktériumokban, mégis lényegesen kevesebb fehérjét érintenek, mint eukarióta rendszerekben (**Grangeasse és mtsai, 2015; Macek és mtsai, 2019**).

A PEG10 fehérjét HEK293T sejtekben tranziens transzfekcióval állítottuk elő, melyek detektálását teljes sejtlyizátumban, Western-blot technika alkalmazásával kivitelezttük. A tervezett fehérjekonstruktok C-terminálisan oktahisztidin címkével fúzionáltak, így az expresszáldott fehérjék és változásaik követésére hisztidin-ellenes antitest használatát is terveztük az anti-PEG10 IgG mellett. Míg a termelődött fehérje kimutatására valóban megfelelő a C-terminális oktahisztidin jelölés, a fehérjék inkubációja során bekövetkezett változások elemzésére már nem bizonyult alkalmasnak kísérleteinkben, így a fehérjék állandó nyomon követésére az anti-PEG10 antitestet használtunk.

A *frameshift* mutációnak köszönhetően a kizárólag poliproteinként transzlálódó f_s RF1/RF2_{PEG10} fehérje inkubációja során két, PEG10 ellenes antitesttel azonosítható fragment megjelenését tapasztaltuk (PF1: ~45 kDa és PF2: ~37 kDa). A PEG10 fehérjék kimutatására alkalmazott anti-PEG10 poliklonális antitest RF1_{PEG10}-specifikus (1-325 aa), tehát az inkubáció során megjelenő és az említett antitesttel kimutatható proteolitikus fragmentek az f_s RF1/RF2_{PEG10} fehérje N-terminális részének (Gag-szerű fehérje) felelhetnek meg (az RF1_{PEG10}, szekvencia alapján meghatározott molekulatömege 36,9 kDa). Saját megfigyeléseinket alátámasztja, hogy Clark és munkatársai által korábban leírt ~37 kDa molekulatömegű proteolitikus terméket szintén

ORF1-, illetve N-terminális fúziós címke elleni antitesttel is azonosították (Clark és mtsai, 2007). A PEG10 katalitikus aktivitásának egyértelmű bizonyítására inaktív enzimforma létrehozását terveztük. HIV-1 PR katalitikus aminosavainak (D-T-G) vizsgálati eredményeire alapozva aminosav szubsztitúciót hajtottunk végre a PEG10 fehérjék katalitikus triádjában. Ismert ugyanis, hogy a katalitikus aminosavakat érintő mutációk HIV-1 PR esetében teljes enzimgátlást (D25A), míg a dimerizációt érintő mutációk jelentős enzimaktivitás csökkenést (T26A/T26A, kovalensen kapcsolt monomerek), vagy katalitikusan inaktív monomerek kialakulását eredményezik (T26A/T26A, kovalensen nem kapcsolt monomer) (Strisovksy és mtsai, 2000). A PEG10 minták esetében tehát végrehajtottuk a katalitikus Asp→Ala mutációját (D370A-_{fs}RF1/RF2_{PEG10}), valamint feltételezve a PR_{PEG10} dimerizációját, a stabil tűzoltófogas („fireman’s grip”) kialakulásáért felelős katalitikus triád Ser-jét érintő aminosavcserét is elvégeztük (S371A-_{fs}RF1/RF2_{PEG10}). A mutációkat hordozó fehérjék inkubációja során nem tapasztaltuk plusz fehérjedarabok megjelenését. Így saját eredményeinkre is alapozva, a _{fs}RF1/RF2_{PEG10} minták inkubációját követően megjelenő fragmenteket proteolitikus terméként (PF) jellemezzük.

Annak bizonyítására, hogy nem egyéb celluláris enzimek eredményezik a proteolitikus fehérjedarabok megjelenését, a D370A-_{fs}RF1/RF2_{PEG10} fehérjét HEK293T sejtek teljes lizátumával inkubáltuk. A kísérlet során nem tapasztaltunk processzálást, így kizárhattuk a PEG10 fehérje más celluláris enzim általi nem-specifikus hasítását, és megerősítettük a PEG10 autoproteolitikus aktivitását (18. ábra).

Az autoproteolízis, így a proteolitikus termékek megjelenése is pH függő (23. ábra). Kísérleteink során megállapítottuk, hogy az optimális pH az enzimműködéshez közel semleges (pH 6,9-7,4), mely hasonlóságot mutat a HFV esetében meghatározott optimummal (pH 6,6).

Bár korábbi tanulmányokban találunk példát több, a PR_{PEG10} proteolitikus aktivitásának tulajdonított termék azonosítására humán és egér mintákban egyaránt, azonban a különböző sejtvonalak és szövetek között az expressziós és/vagy hasítási mintázat eltér (Lux és mtsai, 2005; Clark és mtsai, 2007; Abed és mtsai, 2019). Kísérleteink során a PF1 termék megjelenésére egyértelműen a PR_{PEG10} aktivitás indikátoraként tekintettünk, azonban a PF2 terméket nem minden esetben sikerült detektálnunk (17. ábra). Hipotézisünk szerint a PF2 termék megjelenésének esetlegessége, illetve a PF1 és PF2 molekulaméretben tapasztalt különbsége (8 kDa) a termékek poszt-transzlációs módosításának meglétét/hiányát jelentheti (pl.: ubikvitináció). Feltételezésünk

szerint a PF1 és a PF2 valójában ugyanannak a fragmentnek a módosított és nem-módosított változata. A hipotézis bizonyítását a megfelelő mennyiségű fehérje tisztíthatóságának nehézségei, valamint a tisztítást követő proteolitikus fragmentek megjelenésének hiánya akadályozta. A PEG10-hez hasonlóan azonban a hDdi2 (Siva és mtsai, 2016) és a yDdi1 (Sirkis és mtsai, 2006; Trempe és mtsai, 2016) fehérjék esetében is sikertelenül próbálkoztak különböző módszerekkel a tisztított fehérjék cisz- vagy transz-aktivitásának kimutatásával, ami arra utal, hogy e celluláris aszpartil proteázoknak a működése valamilyen specifikus, eddig nem azonosított celluláris faktor vagy körülmény jelenlétéhez lehet kötött. A jövőben további immunprecipitációs kísérletekkel kívánjuk alátámasztani a hipotézisünket.

A hasítási pozíció meghatározása tisztítható fehérje hiányában szintén nehéz feladat. A Western-blot kísérletek eredményeit alapul véve határoztuk meg a PF1 molekulatömegét, melyek alapján az önprocesszálas helyét a CA-szerű domén és a cink-ujj domén közé jósoltuk. A homológ modell szerkezete alapján meghatároztuk a szubsztrátkötő zseb méretét és felépítését, így az *in silico* és *in vitro* kísérletek eredményeiből jó megközelítéssel az autoproteolitikus szekvencia megállapítható (19. és 20. ábra). A legnagyobb valószínűséggel a HHQVD↓PTEPV szekvenciát azonosítottuk a PEG10 fehérjében, mint feltételezett hasítóhelyet, ez azonban nem hasonlít a legtöbb retrovirális proteáz felismerési szekvenciájára. Habár a P1 pozícióban található Asp aminosav nem jellemző a retrovirális proteázok hasítási hely szekvenciáira, mégsem egyedülálló. Példának hozható fel a WDSV proteáza, melynél az enzim természetes NC/PR hasítóhelye (TYPAD↓PIDC) P1 pozícióban Asp aminosavat tartalmaz. További példa lehet a BLV proteáz, amely hasította a P1 pozícióban aszpartátot tartalmazó módosított HTLV-1 CA/NC szekvenciát (KTKVD↓VVQPK). A BLV és a HTLV-1 szerkezet-vizsgálata alapján munkacsoportunk megállapította, hogy mindkét enzim hidrofób S1 kötőzsebbel rendelkezik (Eizert és mtsai, 2008), mégis a P1-Asp módosított szubsztrát hidrolízisére csak a BLV volt alkalmas, míg a HTLV nem (Sperka és mtsai, 2007). Mindez tehát a jóslással kapcsolatban óvatosságra int, nem lehet teljes bizonyossággal csupán a szubsztrátkötő zseb és a szubsztrát oldalláncok alapján megállapítani a pontos hasítási szekvenciát.

Az enzim hasítási stratégiájának (cisz/transz-aktivitás) vizsgálatát rekombináns szubsztráton végeztük. A kísérlet egyrészt segít választ adni arra a fontos kérdésre, hogy az enzim képes-e intermolekuláris hasításra, másrészt amennyiben igen, úgy a nagy koncentrációban tisztítható rekombináns szubsztráttal lehetséges a hasítási pozíció meghatározására is. A kísérlet

során azonban nem tapasztaltunk termékképződést (transz-aktivitás), miközben az önprocesszálas képessége megállapítható volt (cisz-aktivitás) (**22. ábra**). A transz-aktivitás hiánya véleményünk szerint magyarázható az ön-inaktiváció mechanizmusával, mely jelenséget korábban az alfavírus kapszid proteáz esetében is megfigyelték (**Aggarwal és mtsai, 2014**). Ezekben a vírusokban a poliprotein egy (kimotripszin-szerű) szerin proteázt tartalmaz, mely cisz-aktivitás révén processzáódik, részt vesz a poliprotein „érés” folyamatában és felszabadítja a CA fehérjét. Ez a folyamat előfeltétele a CA összerendeződésnek, és PR gátlást eredményez. Az önprocesszálast követően a hasítóhely konzervált P1 aminosava az enzim transz-aktivitását az aktív centrummal való interakció révén gátolja (**Aggarwal és mtsai, 2014**). Kapszid proteázok ön-inaktivációját más vírusok esetében is publikálták, mint például az Aura vírus, a Chikungunya vírus (**Aggarwal és mtsai, 2015**), a Sindbis vírus (**Choi és mtsai, 1991**) és a Semliki Forest vírus (**Morillas és mtsai, 2008**), de eddig retrovirális vagy retrovírus-szerű proteázok esetében nem írták le a jelenséget.

Vizsgálataink során különbséget tapasztaltunk a $_{fs}RF1/RF2_{PEG10}$ fehérje szekvenciája alapján számított (73 kDa) és a Western-blot kísérletek alapján meghatározott molekulatömegek (~95 kDa) között (**16-24. ábra**), mely alapján a poliprotein poszt-transzlációs módosulását feltételeztük. Eredményeink az irodalomban leírt tapasztalatokkal összhangban voltak, más csoportok is eltérést figyeltek meg a számított és kísérletesen meghatározott molekulaméretek között (**Lux és mtsai, 2005, Clark és mtsai, 2007**). A kalkulált különbség alapján a fehérje ubikvitinációját feltételeztük, mely feltételezést erősítette egyrészt az E3 ubikvitin fehérje ligáz 1 (SIAH1) és a PEG10 fehérje irodalomból is ismert kölcsönhatása (**Okabe és mtsai, 2003**), másrészt több, korábbi kvantitatív fehérje analízis eredménye (**Kim és mtsai, 2011; Lee és mtsai, 2011; Shi és mtsai, 2011; Wagner és mtsai, 2011**). A *PhosphoSite* adatbázisban (<http://www.phosphosite.org>) megtalálhatóak a PEG10 ismert poszt-transzlációs módosításai, beleértve az ubikvitinációt is, de saját *in silico* vizsgálataink szintén valószínűsítették az ubikvitin által módosítható pozíciókat (**7. táblázat**). A feltételezett módosítás(ok) bizonyítására D370A- $_{fs}RF1/RF2_{PEG10}$ fehérjét tisztítottunk Ni-kelet affinitás kromatográfiával, majd Western-blot analízisnek vetettük alá. Anti-PEG10 IgG segítségével azonosítottuk a fehérjét, míg az anti-ubikvitin antitest a poszt-transzlációs módosulást igazolta.

A PR_{PEG10} hasonlóságot mutat más retrovírus-szerű aszpartil PR-zal, azonban kevés tanulmány foglalkozott ezen enzimek HIV PR inhibitorokkal szembeni érzékenységével. Példaként említhető a Bernard és munkatársai által végzett kísérlet, melyben a dolgozat alapjául

szolgáló másik humán fehérje, az SASPáz önprocesszálására gyakorolt hatását vizsgálták néhány, a PEG10 esetében is tesztelt inhibitorral (**Bernard és mtsai, 2005**). A vizsgált inhibitorok, mint a pepsztatin A és saquinavir kísérleteikben nem gátolták a SAP14 enzim poliproteinből történő önprocesszálását, saját vizsgálataink azonban részben ellentmondanak eredményeiknek (**40. A ábra**). A hDdi2 fehérje esetében izotermikus titrációs kalorimetriával (ITC) meghatározott mérések szerint a saquinavir, nelfinavir, darunavir és acetil-pepszatin nem képes a fehérjéhez kötődni, így hatással sincs a hDdi2 PR aktivitására (**Siva és mtsai, 2016**). További példaként említhető a humán endogén retrovírus-K (HERV-K) PR, melynek szerkezete nagyobb hasonlóságot mutat a HIV-1 PR-zal, mint a többi, példaként felsorolt enzim, nagyobb érzékenységet is mutatott a darunavir és lopinavir inhibitor molekulákkal szemben (**Tyagi és mtsai, 2017**). Ezen adatok alapján azt látjuk, hogy a HIV PR inhibitoroknak gyenge, vagy egyáltalán semmilyen gátló hatása nincs a retrovírus-szerű humán proteázok nagy részére. Az általunk vizsgált inhibitorok sem befolyásolták a PR_{PEG10} autoproteolízisét (**24. ábra**), így a PR_{PEG10} gátlásának vizsgálatához specifikus inhibitorok tervezésére és tesztelésére lehet szükség a jövőben.

Sejtkultúras kísérleti rendszerünkben tranziens transzfeccióval juttatuk be a PEG10 fehérjéket kódoló DNS plazmidokat a sejtekbe, majd MTT assay és Ki67 fehérje kimutatásával határoztuk meg az élő, illetve az osztódó sejtek számát. Az irodalomból tudjuk, hogy a magas endogén expressziót mutató Alexander és Huh7 máj sejtvonalakban antiszensz-oligonukleotid általi csendesítéssel gátolták a PEG10 protein szintézist, mely hatására a sejtek életképessége csökkent, míg endogén mRNS expressziót nem mutató SNU423 sejtvonal életképes sejteinek száma nem változott (**Okabe és mtsai, 2003**). Esetünkben a kizárólag RF1_{PEG10} fehérjét expresszáló élő sejtek száma szignifikánsan több volt a kontroll csoporthoz képest, mely mutatja az RF1_{PEG10} fehérje jelentőségét az életképesség befolyásolásában (**25. ábra**). Ezzel ellentétben a *frameshift* lehetőségére biztosított RF1/RF2_{PEG10} poliprotein ezt az erősen szignifikáns változást nem mutatta (**25. ábra**), miközben a kizárólag poliprotein formájában expresszálódó, katalitikusan aktív PR_{PEG10} domént tartalmazó f_sRF1/RF2_{PEG10} fehérje határozottan csökkentette a sejtek életképességét (**26. ábra**). Míg az RF1/RF2_{PEG10} esetben túlnyomó mennyiségben az RF1_{PEG10} termelődik, addig a f_sRF1/RF2_{PEG10} esetében minden átíródó fehérje tartalmazza a PR_{PEG10} domént is, ezek alapján a sejtek életképességét a PR_{PEG10} jelenléte befolyásolhatja.

Kísérleti eredmények alapján arra következtetünk, hogy a PR_{PEG10} szabályzó szerepet tölthet be a PEG10 fehérje sejtekre gyakorolt hatásában, mely során negatív visszacsatolás útján segítheti az életképesség és proliferáció normál egyensúlyban tartását (**26. és 28. ábra**). A pontos molekuláris háttér nem ismeretes, azonban tudjuk, hogy fehérje-fehérje kölcsönhatás révén a PEG10 kapcsolatba kerül a SIAH1 ubikvitin-ligáz fehérjével. A SIAH1 enzim magas expressziót mutat a p53 által indukált apoptózis folyamata során, így a fehérje bármely nemű befolyásolása hatással lesz az élő sejtek számára. Okabe és munkatársai kimutatták a PEG10 fehérjével való kölcsönhatását, illetve bizonyították azt is, hogy a kölcsönható fehérjéket tartalmazó minták életképessége fokozott (**Okabe és mtsai, 2003**). A kölcsönhatás helyének definiálását a lineáris motívumok legnagyobb adatbázisában (*Eukaryotic Linear Motif*, ELM) megtalálhatjuk, mely a kölcsönhatás pozícióját a 253-261 aminosavak közötti régióra helyezi, ami pedig az általunk jósolt önprocesszáló hely közvetlen közelében található (265-274 aa). Bár a pontos PEG10-önprocesszáló hely azonosítása nem sikerült, szerkezetjósolásaink és molekulatömeg meghatározásaink alapján feltételezhető, hogy az autohidrolízist követően a proteolitikus fehérjének a SIAH1 fehérjével való kölcsönhatása változik, így csökkentve a sejtek életképességét. Hipotézisünk bizonyítására azonban további kísérletek szükségesek.

A disszertációban bemutatott munkánk másik jelentős részét az ASPRV1 vizsgálata teszi ki. Habár több tanulmányt publikáltak az enzim funkcióját vizsgálva (**Bernard és mtsai, 2005; Matsui és mtsai, 2006; Matsui és mtsai, 2011**), a biokémiai sajátságokról rendelkezésre álló információk hiányosak. Célunk volt tehát, hogy pontosabb képet kapjunk az enzim tulajdonságairól és szerkezeti jellemzőiről egyaránt.

A jósolt szerkezeti sajátságok és a felépített homológ modell alapján a SASP14 harmadlagos és negyedleges szerkezete megfelel a retrovirális proteázokénak (**29. ábra**), és fő szerkezeti jellemzőkben hasonlóságot mutat a Ddi1 fehérjékkel is (**30. ábra**), beleértve i) az aktív helyre jellemző konszenzus szekvencia motívumot ii) a helikális inzert meglétét az aktív hely motívum közelében, iii) a hat redőből álló dimerizációs régiót, mely csak C-terminális β -redőből áll és iv) a konszenzus hélix szekvenciáját. A teljes szerkezeti jellemzők alapján inkább a retrovírus-szerű (pl.: Ddi), mint a retrovirális proteázokkal mutat hasonlóságot (pl.: HIV1-PR) (**Mótyán és mtsai, 2020**), így nagymértékű hasonlóság figyelhető meg a már bemutatott PEG10 retrovírus-szerű proteázzal (**Golda és mtsai, 2020 a**), valamint az élesztő *Saccharomyces cerevisiae* Tyl retrotranszpozon proteáz szerkezeti jellemzőivel is (**Gazda és mtsai, 2020**).

Annak érdekében, hogy irodalomban publikált adatokkal összehasonlíthassuk saját eredményeinket, a SASP28 prekursor formát, valamint autoproteolízis során felszabaduló SASP14 enzimformát is GST-címkével fúzionálva termeltettük és vizsgáltuk, mely fúziós címke segítségünkre volt az expresszált fehérje affinitás kromatográfiával történő tisztítása során (**32. és 33. ábra**).

A GST-SASP14 enzim biokémiai vizsgálatát szintetikus oligopeptid szubsztráton végeztük, HPLC-alapú módszer felhasználásával. Az enzimműködéshez optimális körülményeket (pH és ionkoncentráció) definiáltuk elsőként, melyek alapján gyengén savas közeg és magas ionkoncentráció kedvez a szubsztrát hidrolíziséhez (**35. ábra**). A kinetikai állandók (K_M , k_{cat} és k_{cat}/K_M) megállapítását már az optimális körülmények figyelembevételével (**8. táblázat**), a HIV-1 MA/CA természetes hasítóhelyének P2L módosított szubsztrátján (VSQ \underline{L} Y↓PIVQ) végeztük. Bár az általunk vizsgált enzimforma fúziós címkével ellátott, ami ugyan befolyásolhatja az enzim homodimerek stabilitását (**Maru és mtsai, 1996; Kaplan és mtasi, 1997**), célunk nem az említett (nem-fúzionált formában vizsgált) retrovirális proteázok tulajdonságaival való szigorú összehasonlítás, hanem az irodalomban is vizsgált enzimforma kinetikai jellemzése volt. Az enzim dimerek denaturációra való érzékenységének vizsgálata (urea disszociáció) során azt tapasztaltuk (**36. ábra**), hogy bár irodalmi adatok alapján a GST-SASP14 stabilitását növelheti a fúziós címke, a címke nélküli HIV-1 PR enzim esetében a monomerek közötti kölcsönhatás lényegesen stabilabb (**9. táblázat**), mely főként a dimerizációs felületbeni eltérésekkel magyarázható.

Következő lépésben a GST-SASP14 S2 és S3 szubsztrátkötő helyek aminosav preferenciáját vizsgáltuk P2 és P3 módosított HIV-1 MA/CA szubsztrátokon (**37. ábra**). Eredményeink alapján az enzim S2 szubsztrátkötő zsebe előnyben részesíti a hidrofób aminosavakat, amely hasonló a retrovírus proteázok aminosav preferenciáihoz (**Bagossi és mtsai, 2005**). Az S3 kötőzseb vizsgálata esetén hidrolízist a P3 pozícióban lizint tartalmazó szubsztrát esetében tapasztaltunk. A homológ modell szerkezet analízise alapján a pozitívan töltött P3 oldallánccal való kölcsönhatások kialakításában szerepet játszhatnak a fehérje azon N- és/vagy C-terminális régiói is, melyek nem képezik szorosan a dimer interfész részét.

A GST-SASP14 gátolhatósági vizsgálata során több, a HIV-1 terápia során is alkalmazott, illetve általános aszpartil proteáz gátlóknak számító molekula tesztelését is elvégeztük. Míg az azonos koncentrációban tesztelt inhibitorok közül az indinavir bizonyult a leghatékonyabbnak,

addig a gátlószerek nagy részével szemben (tipranavir, saquinavir, nelfinavir, darunavir, lopinavir és amprenavir) az enzim nem mutatott érzékenységet (**40. ábra**). Bár az indinavir gátló hatását korábban már publikálták (**Bernard és mtsai, 2005**), a pepsztatin A és az acetil-pepsztatin inhibitorok esetében kutatócsoportunk írta le először, hogy képesek az ASPRV1 gátlására (**Golda és mtsai, 2020 b**). Érdekes jelenséget figyeltünk meg azonban az acetil-pepsztatin vizsgálata közben. Az inhibitor 10 μM -os végkoncentrációban történő alkalmazásakor a hidrolízis mértékének fokozódását, míg nagyobb koncentrációban (15,5 μM) annak gátlástát tapasztaltunk. A jelenséget korábban a HIV-1 PR esetében már megfigyelték, mely alapján az acetil-pepsztatin képes stabilizálni a kialakult dimer szerkezetet, így fokozva a hidrolízis hatékonyságát (**Todd és mtsai, 1999; Fitzgerald és mtsai, 1990**). A SASP14 enzim esetében ez a jelenség még nem ismert részleteiben, így további vizsgálatok szükségesek a pontos körülmények tisztázására.

A GST-SASP28 prekursor fehérjével végzett kísérleteink során tapasztaltuk, hogy a fehérje autoproteolízisen megy át, melynek eredményeként felszabadul a SASP14 enzimforma (**42. A ábra**). Bernard és munkatársai a jelenség leírásakor egy alternatív hasítóhelyet is azonosítottak a fehérjében (**Bernard és mtsai, 2005**), azonban vad típusú fehérjével végzett kísérleteinkben mi nem tapasztaltuk az alternatív hasítóhely használatát. Annak a kérdésnek a megválaszolására tehát, hogy az önprocesszáló hely szekvenciájának mutációja hatással van-e a hasítási pozíció alternatív processzálóhelyre történő áthelyeződésére, mutációk tervezésével és vizsgálatával igyekeztünk választ adni. A létrehozott két mutáns fehérjéjből az egyik az általános processzálóhely mutációját, míg a másik az általános- és az alternatív hasítóhely módosítását egyaránt hordozta. A vad típusú és a mutáns GST-SASP28 formák vizsgálatakor minhárom esetben tapasztaltunk autoproteolitikus termékek megjelenését, mely alapján kijelenthetjük, hogy az aminosav szubsztitúciók teljes gátlást nem okoztak, de az önprocesszálás hatékonysága jelentősen csökkent (**42. ábra**). A hasítási termékek méretében nem tapasztaltunk különbséget egyik vizsgált fehérjeforma esetében sem, ami arra utalt, hogy az alternatív hasítóhelyen nem történt hasítás, a mutációk ellenére sem.

Vizsgáltuk továbbá az autoaktiváció jelenségét, mely során összehasonlítottuk a GST-SASP28 és a proforma és a belőle felszabaduló SASP14 enzimek aktivitását. Az autoproteolízis folyamatát, illetve a két enzimforma arányát SDS-PAGE segítségével követtük nyomon, míg az enzimek katalitikus aktivitását oligopeptid szubsztráton határoztuk meg (**43. ábra**). Eredményeink alapján megállapítható, hogy az önprocesszálás során valóban autoaktiváció történik, mely a két forma katalitikus aktivitása közötti különbség alapján egyértelműen kijelenthető.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A doktori értekezésem alapjául szolgáló munkák során lehetőségem nyílt két, retrovírus-szerű humán aszpartil proteáz tanulmányozására.

A PR_{PEG10} vizsgálata céljából a teljes hosszúságú poliprotein átírását biztosító *frameshift* mutánst (f_sRF1/RF2_{PEG10}), valamint aktív hely-mutáns variánsok (D370A-f_sRF1/RF2_{PEG10} és S371A-f_sRF1/RF2_{PEG10}) kódoló szekvenciáit tartalmazó plazmidokat állítottunk elő. A HEK293T sejtvonalban, tranziens transzfekcióval termeltetett PEG10 fehérjéket és az enzimaktivitását Western-blot segítségével, RF1_{PEG10}-specifikus antitest alkalmazásával követtük nyomon. A szekvencia alapján számított és a kísérletes eredmények alapján meghatározott molekulatömegeli különbségek a fehérje ubikvitinációjára utaltak, melyet Western-blottal igazoltunk. Az autoproteolízis vizsgálata a PR_{PEG10} neutrális pH optimumát mutatta (pH 6,9-7,4). Kísérleteinkben igazoltuk a PR_{PEG10} intramolekuláris hasítását (PF1 és PF2 termékek megjelenése), ugyanakkor rekombináns fehérje szubsztráton végzett kísérleteinkben intermolekuláris kölcsönhatást nem tapasztaltunk. A pontos hasítási pozíciót *in vitro* kísérletekkel nem sikerült azonosítani, ezért azt *in silico* módszerrel becsültük. A PR_{PEG10} autoproteolízisének gátolhatóságát több HIV proteáz inhibitorral is teszteltük, gátló hatást azonban egyik esetben sem figyeltünk meg. A PR_{PEG10} sejtek életképességére és proliferációjára gyakorolt hatását HEK293T és HaCaT sejtvonalakon vizsgáltuk. Sejtkultúrák kísérleteinkben az expresszált PR_{PEG10} csökkentette az életképes sejtek számát, míg proliferációra gyakorolt hatását egyedül a katalitikusan inaktív D370A-f_sRF1/RF2_{PEG10} mutáns fehérjét expresszáló HEK293T sejtekkel összehasonlítva tapasztaltuk.

Az ASPRV1 enzimfehérje GST-fúzionált formáit (GST-SASP14, GST-SASP28) BL21(DE3) sejtekben expresszáltattuk és a fehérjéket affinitás kromatográfiával tisztítottuk. Az *in vitro* enzimvizsgálatok során SDS-PAGE- és HPLC-alappú módszereket alkalmaztunk. A GST-SASP14 enzimkinetikai paramétereit (K_M , k_{cat} , k_{cat}/K_M), a pH, az ionerősség és az urea enzimaktivitásra gyakorolt hatását a HIV-1 MA/CA hasítóhely P2-Leu módosított variánsát reprezentáló oligopeptid szubsztráttal vizsgáltuk, valamint tanulmányoztuk az S2 és S3 szubsztrátkötő zsebek aminosav-preferenciáját. Igazoltuk az indinavir gátló hatását, kimutattuk, hogy a pepsztatin A és acetil-pepsztatin egyaránt képesek az enzim gátlására, valamint bizonyítottuk, hogy a GST-SASP28 prekursor autoproteolízise szükséges az ASPRV1 auto-aktivációjához, az autoproszálás vizsgálatát hasítóhely-mutánsok vizsgálatával is elvégeztük. Eredményeink hozzájárulnak a retrovirális és retrovírus-szerű fehérjék közti különbségek és hasonlóságok jobb megértéséhez.

7. SUMMARY

In my work I had the opportunity to study two retroviral-like human aspartyl proteases.

For the characterization of PR_{PEG10}, we designed expression constructs coding for the full-length polyprotein by a frameshift mutation (_{fs}RF1/RF2_{PEG10}), and plasmids coding for active site-mutant variants were also prepared (D370A-_{fs}RF1/RF2_{PEG10} and S371A-_{fs}RF1/RF2_{PEG10}). The presence and activity of the protein was followed in transiently transfected HEK293T cells by Western-blot using RF1_{PEG10}-specific antibody. The differences between the calculated (based on sequence) and observed (based on Western-blot) molecular weights indicated the ubiquitination of the protein, which was verified by using a specific antibody. The analysis of the autoproteolysis implied a neutral pH optimum of the PR_{PEG10} (pH 6.9-7.4). Although, we observed intramolecular cleavage of PR_{PEG10} (the autoproteolysis resulted in the release of PF1 and PF2 products), but we have not detected intermolecular interaction using a recombinant protein substrate. It was not possible to identify cleavage position *in vitro*, but was estimated *in silico*. Despite testing multiple HIV protease inhibitors, we observed no inhibitory effect in any cases. The effect of PR_{PEG10} on the viability and proliferation of HEK293T and HaCaT cell lines was also studied. The expressed PR_{PEG10} was found to decrease the number of viable cells, whilst its effect on the proliferation was observed only as compared to the HEK293T cells expressing the catalytically inactive D370A-_{fs}RF1/RF2_{PEG10} mutant.

The studied forms of ASPRV1 (GST-SASP14, GST-SASP28) were designed to contain an N-terminal GST-fusion tag, and were expressed in BL21(DE3) cells, followed by purification with affinity chromatography. Thereafter, SDS-PAGE- and by HPLC-based methods were applied for *in vitro* characterization. In case of GST-SASP14, the enzyme kinetic parameters (K_M , k_{cat} , k_{cat}/K_M), and the dependence of activity on pH optimum, ionic strength, and urea was determined by using an oligopeptide representing the P2-Leu-modified version of HIV-1 MA/CA cleavage site, furthermore, the amino acid preferences of S2 and S3 binding sites were also studied. We confirmed the inhibitory potential of indinavir, and proved the inhibitory effects of pepstatin and acetyl-pepstatin. We proved that autoproteolysis of GST-SASP28 precursor causes autoactivation of the enzyme, the self-processing was studied by autoproteolytic cleavage site mutant enzyme forms, as well. Our results provide valuable information which may help better understanding of differences between retroviral and retroviral-like proteases.

8. IRODALOMJEGYZÉK

- Abed M, Verschueren E, Budayeva H, Liu P, Kirkpatrick DS, Reja R, Kummerfeld SK, Webster JD, Gierke S, Reichelt M, Anderson KR, Newman RJ, Roose-Girma M, Modrusan Z, Pektas H, Maltepe E, Newton K, Dixit VM. The Gag protein PEG10 binds to RNA and regulates trophoblast stem cell lineage specification. *PLoS One*. 2019;14(4):e0214110.
- Aggarwal M, Dhindwal S, Kumar P, Kuhn RJ, Tomar S. trans-Protease activity and structural insights into the active form of the alphavirus capsid protease. *J Virol*. 2014;88(21):12242-53.
- Aggarwal M, Sharma R, Kumar P, Parida M, Tomar S. Kinetic characterization of trans-proteolytic activity of Chikungunya virus capsid protease and development of a FRET-based HTS assay. *Sci Rep*. 2015; 6;5:14753.
- Ashley J, Cordy B, Lucia D, Fradkin LG, Budnik V, Thomson T. Retrovirus-like Gag Protein Arc1 Binds RNA and Traffics across Synaptic Boutons. *Cell*.2018;172(1-2):262-274.e11.
- Auton M, Holthauzen LM, Bolen DW. Anatomy of energetic changes accompanying urea-induced protein denaturation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(39):15317-22.
- Bagossi P, Kádas J, Miklóssy G, Boross P, Weber IT, Tözsér 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.
- Bagossi P, Sperka T, Fehér A, Kádas 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.
- Baldwin ET, Bhat TN, Gulnik S, Hosur MV, Sowder RC 2nd, Cachau RE, Collins J, Silva AM, Erickson JW. Crystal structures of native and inhibited forms of human cathepsin D: implications for lysosomal targeting and drug design. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(14):6796-800.
- Barrett AJ. Cathepsin D. Purification of isoenzymes from human and chicken liver. *Biochem J*. 1970;117(3):601-7.
- Bennion BJ, Daggett V. The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(9):5142-7.
- Bernard D, Méhul B, Thomas-Collignon A, Delattre C, Donovan M, Schmidt R. Identification and characterization of a novel retroviral-like aspartic protease specifically expressed in human epidermis. *J Invest Dermatol*.2005;125, 278-287.
- Borgoño CA, Michael IP, Komatsu N, Jayakumar A, Kapadia R, Clayman GL, Sotiropoulou G, Diamandis EP. A potential role for multiple tissue kallikrein serine proteases in epidermal desquamation. *J Biol Chem*. 2007;282(6):3640-52.

- 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.
- Bozóki B, Gazda L, Tóth F, Miczi M, Mótyán JA, Tözsér J. A recombinant fusion protein-based, fluorescent protease assay for high throughput-compatible substrate screening. *Anal Biochem.* 2018 Jan;540-541:52-63.
- Boyden LM, Zhou J, Hu R, Zaki T, Loring E, Scott J, Traupe H, Paller AS, Lifton RP, Choate KA. Mutations in ASPRV1 Cause Dominantly Inherited Ichthyosis. *Am J Hum Genet.* 2020;107(1):158-163.
- Bauer A, Waluk DP, Galichet A, Timm K, Jagannathan V, Sayar BS, Wiener DJ, Dietschi E, Müller EJ, Roosje P, Welle MM, Leeb T. A de novo variant in the ASPRV1 gene in a dog with ichthyosis. *PLoS Genet.* 2017;13(3):e1006651.
- Brattsand M, Stefansson K, Lundh C, Haasum Y, Egelrud T. A proteolytic cascade of kallikreins in the stratum corneum. *J Invest Dermatol.* 2005;124(1):198-203.
- Brik A, Wong CH. HIV-1 protease: mechanism and drug discovery. *Org Biomol Chem.* 2003;1(1):5-14.
- Brower ET, Bacha UM, Kawasaki Y, Freire E. Inhibition of HIV-2 protease by HIV-1 protease inhibitors in clinical use. *Chem Biol Drug Des.* 2008;71(4):298-305.
- Capriotti E, Fariselli P, Casadio R. I-Mutant2.0: predicting stability changes upon mutation from the protein sequence or structure. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(Web Server issue):W306-10.
- Choi HK, Tong L, Minor W, Dumas P, Boege U, Rossmann MG, Wengler G. Structure of Sindbis virus core protein reveals a chymotrypsin-like serine proteinase and the organization of the virion. *Nature.* 1991;354(6348):37-43.
- Clark MB, Jänicke M, Gottesbühren U, Kleffmann T, Legge M, Poole ES, Tate WP. Mammalian gene PEG10 expresses two reading frames by high efficiency -1 frameshifting in embryonic-associated tissues. *J Biol Chem.* 2007;282(52):37359-69.
- Coren LV, Thomas JA, Chertova E, Sowder RC 2nd, Gagliardi TD, Gorelick RJ, Ott DE. Mutational analysis of the C-terminal gag cleavage sites in human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 2007;81(18):10047-54.
- Craig WJ, Cook RG, Tate WP, Caskey CT. Bacterial peptide chain release factors: conserved primary structure and possible frameshift regulation of release factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82(11):3616-20.
- De Meyer S, Azijn H, Surleraux D, Jochmans D, Tahri A, Pauwels R, Wigerinck P, de Béthune MP. TMC114, a novel human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor active against

- protease inhibitor-resistant viruses, including a broad range of clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(6):2314-21.
- De Veer SJ, Furio L, Harris JM, Hovnanian A. Proteases: common culprits in human skin disorders. *Trends Mol Med.* 2014;20(3):166-78.
- Díaz-Martínez LA, Kang Y, Walters KJ, Clarke DJ. Yeast UBL-UBA proteins have partially redundant functions in cell cycle control. *Cell Div.* 2006;1:28..
- Dodonova SO, Prinz S, Bilanchone V, Sandmeyer S, Briggs JAG. Structure of the Ty3/Gypsy retrotransposon capsid and the evolution of retroviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(20):10048-10057.
- Dong R, Pan S, Peng Z, Zhang Y, Yang J. mTM-align: a server for fast protein structure database search and multiple protein structure alignment. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(W1):W380-W386.
- Drozdetskiy A, Cole C, Procter J, Barton GJ. JPred4: a protein secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(W1):W389-94.
- Dunn BM, Goodenow MM, Gustchina A, Wlodawer A. Retroviral proteases. *Genome Biol.* 2002;3(4):REVIEWS3006.
- 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.
- 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):1321-1330.
- Fenyőfalvi G, Bagossi P, Copeland TD, Oroszlan S, Boross P, Tözsér J. Expression and characterization of human foamy virus proteinase. *FEBS Lett.* 1999;462, 397-401.
- 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.
- Foltmann B. Activation of human pepsinogens. *FEBS Lett.* 1988;241(1-2):69-72.
- Freed EO. HIV-1 assembly, release and maturation. *Nat Rev Microbiol.* 2015;13(8):484-96.
- Fujinaga M, Chernaiia MM, Tarasova NI, Mosimann SC, James MN. Crystal structure of human pepsin and its complex with pepstatin. *Protein Sci.* 1995;4(5):960-72.

- Fukumara M, Satoi S, Kuawana N, Murao S. Structure elucidation of new pepsin inhibitor (S-PI). *Agr. Biol. Chem.* 1971;35, 1310–1312
- García-Silva J, Almagro M, Juega J, Peña C, López-Calvo S, del Pozo J, Fonseca E. Protease inhibitor-related paronychia, ingrown toenails, desquamative cheilitis and cutaneous xerosis. *AIDS.* 2000;14(9):1289-91.
- Garnier J, Gibrat JF, Robson B. GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. *Methods Enzymol.* 1996;266:540-53.
- Gazda LD, Joóné Matúz K, Nagy T, Mótyán JA, Tózsér J. Biochemical characterization of Ty1 retrotransposon protease. *PLoS One.* 2020;15(1):e0227062.
- Geourjon C, Deléage G. SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Comput Appl Biosci.* 1995;11(6):681-4.
- Golda M, Mótyán JA, Mahdi M, Tózsér J. Functional Study of the Retrotransposon-Derived Human PEG10 Protease. *Int J Mol Sci.* 2020a;21(7):2424.
- Golda M, Mótyán JA, Nagy K, Matúz K, Nagy T, Tózsér J. Biochemical Characterization of Human Retroviral-Like Aspartic Protease 1 (ASPRV1). *Biomolecules.* 2020b;10(7):1004.
- Grangeasse C, Stülke J, Mijakovic I. Regulatory potential of post-translational modifications in bacteria. *Front Microbiol.* 2015;6:500.
- Greiner EF, Kirfel J, Greschik H, Huang D, Becker P, Kapfhammer JP, Schüle R. Differential ligand-dependent protein-protein interactions between nuclear receptors and a neuronal-specific cofactor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(13):7160-5.
- Gustchina A, Kervinen J, Powell DJ, Zdanov A, Kay J, Wlodawer A. Structure of equine infectious anemia virus proteinase complexed with an inhibitor. *Protein Sci.* 1996;5(8):1453-65.
- Hawkins RFW, Patenaude A, Dumas A, Jain R, Tesfagiorgis Y, Kerfoot S, Matsui T, Gunzer M, Poubelle PE, Larochelle C, Pelletier M, Vallières L. ICAM1+ neutrophils promote chronic inflammation via ASPRV1 in B cell-dependent autoimmune encephalomyelitis. *JCI Insight.* 2017;2(23):e96882.
- Hildenbrand M, Rhiemeier V, Hartenstein B, Lahrmann B, Grabe N, Angel P, Hess J. Impaired skin regeneration and remodeling after cutaneous injury and chemically induced hyperplasia in taps-transgenic mice. *J Invest Dermatol.* 2010;130,1922-1930.
- Hornbeck PV, Zhang B, Murray B, Kornhauser JM, Latham V, Skrzypek E. PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(Database issue):D512-20.

- Huang CH, Su MG, Kao HJ, Jhong JH, Weng SL, Lee TY. UbiSite: incorporating two-layered machine learning method with substrate motifs to predict ubiquitin-conjugation site on lysines. *BMC Syst Biol.* 2016;10 Suppl 1(Suppl 1):6.
- Ip WK, Lai PB, Wong NL, Sy SM, Beheshti B, Squire JA, Wong N. Identification of PEG10 as a progression related biomarker for hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 2007;250(2):284-91.
- Ishida M, Moore GE. The role of imprinted genes in humans. *Mol Aspects Med.* 2013;34(4):826-40.
- Jacks T, Varmus HE. Expression of the Rous sarcoma virus pol gene by ribosomal frameshifting. *Science.* 1985;230(4731):1237-42.
- Kaplan W, Hüsler P, Klump H, Erhardt J, Sluis-Cremer N, Dirr H. Conformational stability of pGEX-expressed *Schistosoma japonicum* glutathione S-transferase: a detoxification enzyme and fusion-protein affinity tag. *Protein Sci.* 1997;6(2):399-406.
- Katoh I, Yasunaga T, Ikawa Y, Yoshinaka Y. Inhibition of retroviral protease activity by an aspartyl proteinase inhibitor. *Nature.* 1987;329(6140):654-6.
- Kim W, Bennett EJ, Huttlin EL, Guo A, Li J, Possemato A, Sowa ME, Rad R, Rush J, Comb MJ, Harper JW, Gygi SP. Systematic and quantitative assessment of the ubiquitin-modified proteome. *Mol Cell.* 2011;44(2):325-40.
- King RD, Sternberg MJ. Identification and application of the concepts important for accurate and reliable protein secondary structure prediction. *Protein Sci.* 1996;5(11):2298-310.
- Knight CG, Barrett AJ. Interaction of human cathepsin D with the inhibitor pepstatin. *Biochem J.* 1976;155(1):117-25.
- Kobayashi T, Honke K, Gasa S, Fujii T, Maguchi S, Miyazaki T, Makita A. Proteolytic processing sites producing the mature form of human cathepsin D. *Int J Biochem.* 1992;24(9):1487-91.
- Kreutz D, Sinthuvanich C, Bileck A, Janker L, Muqaku B, Slany A, Gerner C. Curcumin exerts its antitumor effects in a context dependent fashion. *J Proteomics.* 2018;182:65-72.
- Krylov DM, Koonin EV. A novel family of predicted retroviral-like aspartyl proteases with a possible key role in eukaryotic cell cycle control. *Curr Biol.* 2001;11(15):R584-7.
- Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol.* 1982;157(1):105-32.
- Larder BA, Hertogs K, Bloor S, van den Eynde CH, DeCian W, Wang Y, Freimuth WW, Tarpley G. Tipranavir inhibits broadly protease inhibitor-resistant HIV-1 clinical samples. *AIDS.* 2000;14(13):1943-8.

- Laurent-Matha V, Derocq D, Prébois C, Katunuma N, Liaudet-Coopman E. Processing of human cathepsin D is independent of its catalytic function and auto-activation: involvement of cathepsins L and B. *J Biochem.* 2006;139(3):363-71.
- Lee KA, Hammerle LP, Andrews PS, Stokes MP, Mustelin T, Silva JC, Black RA, Doedens JR. Ubiquitin ligase substrate identification through quantitative proteomics at both the protein and peptide levels. *J Biol Chem.* 2011;286(48):41530-8.
- Lee SK, Harris J, Swanstrom R. A strongly transdominant mutation in the human immunodeficiency virus type 1 gag gene defines an Achilles heel in the virus life cycle. *J Virol.* 2009;83(17):8536-43.
- Li CM, Margolin AA, Salas M, Memeo L, Mansukhani M, Hibshoosh H, Szabolcs M, Klinakis A, Tycko B. PEG10 is a c-MYC target gene in cancer cells. *Cancer Res.* 2006;66(2):665-72.
- Li LT, Jiang G, Chen Q, Zheng JN. Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer. *Mol Med Rep.* 2015;11(3):1566-72.
- Liu F, Boross PI, Wang YF, Tozser J, Louis JM, Harrison RW, Weber IT. Kinetic, stability, and structural changes in high-resolution crystal structures of HIV-1 protease with drug-resistant mutations L24I, I50V, and G73S. *J Mol Biol.* 2005;354(4):789-800.
- Louis JM, Weber IT, Tözsér J, Clore GM, Gronenborn AM. HIV-1 protease: maturation, enzyme specificity, and drug resistance. *Adv Pharmacol.* 2000;49:111-46.
- Lux A, Beil C, Majety M, Barron S, Gallione CJ, Kuhn HM, Berg JN, Kioschis P, Marchuk DA, Hafner M. Human retroviral gag- and gag-pol-like proteins interact with the transforming growth factor-beta receptor activin receptor-like kinase 1. *J Biol Chem.* 2005;280(9):8482-93.
- Lux H, Flammann H, Hafner M, Lux A. Genetic and molecular analyses of PEG10 reveal new aspects of genomic organization, transcription and translation. *PLoS One.* 2010;5(1):e8686.
- Macek B, Forchhammer K, Hardouin J, Weber-Ban E, Grangeasse C, Mijakovic I. Protein post-translational modifications in bacteria. *Nat Rev Microbiol.* 2019;17(11):651-664.
- Mager PP. The active site of HIV-1 protease. *Med Res Rev.* 2001;21(4):348-53.
- Mahdi M, Szojka Z, Mótyán JA, Tözsér J. Inhibition Profiling of Retroviral Protease Inhibitors Using an HIV-2 Modular System. *Viruses.* 2015;7(12):6152-62.
- Maru Y, Afar DE, Witte ON, Shibuya M. The dimerization property of glutathione S-transferase partially reactivates Bcr-Abl lacking the oligomerization domain. *J Biol Chem.* 1996;271(26):15353-7.
- Matúz K, Mótyán J, Li M, Wlodawer A, Tözsér J. Inhibition of XMRV and HIV-1 proteases by pepstatin A and acetyl-pepstatin. *FEBS J.* 2012;279(17):3276-86.

- Matsui T, Kinoshita-Ida Y, Hayashi-Kisumi F, Hata M, Matsubara K, Chiba M, Katahira-Tayama S, Morita K, Miyachi Y, Tsukita S. Mouse homologue of skin-specific retroviral-like aspartic protease involved in wrinkle formation. *J Biol Chem.*2006;281, 27512-27525.
- Matsui T, Miyamoto K, Kubo A, Kawasaki H, Ebihara T, Hata K, Tanahashi S, Ichinose S, Imoto I, Inazawa J, Kudoh J, Amagai M. SAsPase regulates stratum corneum hydration through profilaggrin-to-filaggrin processing. *EMBO Mol Med.*2011;3, 320-333.
- Matsui T, Amagai M. Dissecting the formation, structure and barrier function of the stratum corneum. *Int Immunol.* 2015;27(6):269-80.
- Minarowska A, Gacko M, Karwowska A, Minarowski Ł. Human cathepsin D. *Folia Histochem Cytobiol.* 2008;46(1):23-38.
- Morillas M, Eberl H, Allain FH, Glockshuber R, Kuennemann E. Novel enzymatic activity derived from the Semliki Forest virus capsid protein. *J Mol Biol.* 2008;376(3):721-35.
- 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):1352.
- Myrum C, Baumann A, Bustad HJ, Flydal MI, Mariaule V, Alvira S, Cuéllar J, Haavik J, Soulé J, Valpuesta JM, Márquez JA, Martínez A, Bramham CR. Arc is a flexible modular protein capable of reversible self-oligomerization. *Biochem J.* 2015;468(1):145-58.
- Netzel-Arnett S, Currie BM, Szabo R, Lin CY, Chen LM, Chai KX, Antalis TM, Bugge TH, List K. Evidence for a matriptase-prostasin proteolytic cascade regulating terminal epidermal differentiation. *J Biol Chem.* 2006;281(44):32941-5.
- Okabe H, Satoh S, Furukawa Y, Kato T, Hasegawa S, Nakajima Y, Yamaoka Y, Nakamura Y. Involvement of PEG10 in human hepatocellular carcinogenesis through interaction with SIAH1. *Cancer Res.* 2003;63(12):3043-8.
- Ono R, Kobayashi S, Wagatsuma H, Aisaka K, Kohda T, Kaneko-Ishino T, Ishino F. A retrotransposon-derived gene, PEG10, is a novel imprinted gene located on human chromosome 7q21. *Genomics.* 2001;73(2):232-7.
- Ono R, Nakamura K, Inoue K, Naruse M, Usami T, Wakisaka-Saito N, Hino T, Suzuki-Migishima R, Ogonuki N, Miki H, Kohda T, Ogura A, Yokoyama M, Kaneko-Ishino T, Ishino F. Deletion of Peg10, an imprinted gene acquired from a retrotransposon, causes early embryonic lethality. *Nat Genet.* 2006;38(1):101-6.
- Ovaere P, Lippens S, Vandenabeele P, Declercq W. The emerging roles of serine protease cascades in the epidermis. *Trends Biochem Sci.* 2009;34(9):453-63.

- Pastuzyn ED, Day CE, Kearns RB, Kyrke-Smith M, Taibi AV, McCormick J, Yoder N, Belnap DM, Erlendsson S, Morado DR, Briggs JAG, Feschotte C, Shepherd JD. The Neuronal Gene Arc Encodes a Repurposed Retrotransposon Gag Protein that Mediates Intercellular RNA Transfer. *Cell*. 2018;172(1-2):275-288.e18.
- Pettit SC, Moody MD, Wehbie RS, Kaplan AH, Nantermet PV, Klein CA, Swanstrom R. The p2 domain of human immunodeficiency virus type 1 Gag regulates sequential proteolytic processing and is required to produce fully infectious virions. *J Virol*. 1994;68(12):8017-27.
- Pourmotabbed G, Chou HJ, Gregerman RI. Pepstatin inhibition of proteinase-free human renin. *Enzyme*. 1982;28(4):343-7.
- Purohit R, Sethumadhavan R. Structural basis for the resilience of Darunavir (TMC114) resistance major flap mutations of HIV-1 protease. *Interdiscip Sci*. 2009;1(4):320-8.
- Radivojac P, Vacic V, Haynes C, Cocklin RR, Mohan A, Heyen JW, Goebel MG, Iakoucheva LM. Identification, analysis, and prediction of protein ubiquitination sites. *Proteins*. 2010;78(2):365-80.
- Rawlings ND, Barrett AJ. Families of aspartic peptidases, and those of unknown catalytic mechanism. *Methods Enzymol*. 1995;248:105-20.
- Richards AD, Roberts R, Dunn BM, Graves MC, Kay J. Effective blocking of HIV-1 proteinase activity by characteristic inhibitors of aspartic proteinases. *FEBS Lett*. 1989;247(1):113-7.
- Richards AD, Broadhurst AV, Ritchie AJ, Dunn BM, Kay J. Inhibition of the aspartic proteinase from HIV-2. *FEBS Lett*. 1989;253(1-2):214-6.
- Sandilands A, Sutherland C, Irvine AD, McLean WH. Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. *J Cell Sci*. 2009;122(Pt 9):1285-94.
- Sandmeyer SB, Clemens KA. Function of a retrotransposon nucleocapsid protein. *RNA Biol*. 2010;7(6):642-54.
- Satoi S, Murao S. Studies on Pepsin Inhibitor (S-PI) from *Streptomyces naniwaensis*. *Agric. Biol. Chem*. 1971;35, 1482-1487
- Schechter I, Berger A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun*. 1967;27(2):157-62.
- Schultz J, Copley RR, Doerks T, Ponting CP, Bork P. SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains. *Nucleic Acids Res*. 2000;28(1):231-4.
- Sevrioukova IF, Poulos TL. Structure and mechanism of the complex between cytochrome P4503A4 and ritonavir. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(43):18422-7.

- Shi Y, Chan DW, Jung SY, Malovannaya A, Wang Y, Qin J. A data set of human endogenous protein ubiquitination sites. *Mol Cell Proteomics*. 2011;10(5):M110.002089.
- Shigemoto K, Brennan J, Walls E, Watson CJ, Stott D, Rigby PW, Reith AD. Identification and characterisation of a developmentally regulated mammalian gene that utilises -1 programmed ribosomal frameshifting. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(19):4079-88.
- Sirkis R, Gerst JE, Fass D. Ddi1, a eukaryotic protein with the retroviral protease fold. *J Mol Biol*. 2006;364(3):376-87.
- Sivá M, Svoboda M, Veverka V, Trempe JF, Hofmann K, Kožíšek M, Hexnerová R, Sedlák F, Belza J, Brynda J, Šácha P, Hubálek M, Starková J, Flaisigová I, Konvalinka J, Šašková KG. Human DNA-Damage-Inducible 2 Protein Is Structurally and Functionally Distinct from Its Yeast Ortholog. *Sci Rep*. 2016;6:30443.
- 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):2052-2063.
- Strisovsky K, Tessmer U, Langner J, Konvalinka J, Kräusslich HG. Systematic mutational analysis of the active-site threonine of HIV-1 proteinase: rethinking the "fireman's grip" hypothesis. *Protein Sci*. 2000;9(9):1631-41.
- Suguna K, Padlan EA, Smith CW, Carlson WD, Davies DR. Binding of a reduced peptide inhibitor to the aspartic proteinase from *Rhizopus chinensis*: implications for a mechanism of action. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(20):7009-13.
- Todd MJ, Freire E. The effect of inhibitor binding on the structural stability and cooperativity of the HIV-1 protease. *Proteins*. 1999;36(2):147-56.
- Tözsér J, Bagossi P, Boross P, Louis JM, Majerova E, Oroszlan S, Copeland TD. Effect of serine and tyrosine phosphorylation on retroviral proteinase substrates. *Eur J Biochem*. 1999;265(1):423-9.
- Tözsér J, Gustchina A, Weber IT, Blaha I, Wondrak EM, Oroszlan S. Studies on the role of the S4 substrate binding site of HIV proteinases. *FEBS Lett*. 1991;279(2):356-60.
- Tözsér J, Weber IT, Gustchina A, Bláha I, Copeland TD, Louis JM, Oroszlan S. Kinetic and modeling studies of S3-S3' subsites of HIV proteinases. *Biochemistry*. 1992;31(20):4793-800.
- 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.
- Tözsér J. Comparative studies on retroviral proteases: substrate specificity. *Viruses*. 2010;2(1):147-65.

- Trempe JF, Šašková KG, Sivá M, Ratcliffe CD, Veverka V, Hoegl A, Ménade M, Feng X, Shenker S, Svoboda M, Kožíšek M, Konvalinka J, Gehring K. Structural studies of the yeast DNA damage-inducible protein Ddi1 reveal domain architecture of this eukaryotic protein family. *Sci Rep.* 2016;6:33671.
- Tsou AP, Chuang YC, Su JY, Yang CW, Liao YL, Liu WK, Chiu JH, Chou CK. Overexpression of a novel imprinted gene, PEG10, in human hepatocellular carcinoma and in regenerating mouse livers. *J Biomed Sci.* 2003;10(6 Pt 1):625-35.
- Tyagi R, Li W, Parades D, Bianchet MA, Nath A. Inhibition of human endogenous retrovirus-K by antiretroviral drugs. *Retrovirology.* 2017;14(1):21.
- Umezawa H, Aoyagi T, Morishima H, Matsuzaki M, Hamada M. Pepstatin, a new pepsin inhibitor produced by Actinomycetes. *J Antibiot (Tokyo).* 1970;23(5):259-62.
- Volf J, Körting C, Scharl M. Ty3/Gypsy retrotransposon fossils in mammalian genomes: did they evolve into new cellular functions? *Mol Biol Evol.* 2001;18(2):266-70.
- Wagner SA, Beli P, Weinert BT, Nielsen ML, Cox J, Mann M, Choudhary C. A proteome-wide, quantitative survey of in vivo ubiquitylation sites reveals widespread regulatory roles. *Mol Cell Proteomics.* 2011;10(10):M111.013284.
- Wang C, Chen Z, Hong X, Ning F, Liu H, Zang J, Yan X, Kemp J, Musselman CA, Kutateladze TG, Zhao R, Jiang C, Zhang G. The structural basis of urea-induced protein unfolding in β -catenin. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2014;70(Pt 11):2840-7.
- Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, Heer FT, de Beer TAP, Rempfer C, Bordoli L, Lepore R, Schwede T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(W1):W296-W303.
- Wiederstein M, Sippl MJ. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(Web Server issue):W407-10.
- Woodberry T, Bouffler SE, Wilson AS, Buckland RL, Brüstle A. The Emerging Role of Neutrophil Granulocytes in Multiple Sclerosis. *J Clin Med.* 2018;7(12):511.
- Yachdav G, Kloppe E, Kajan L, Hecht M, Goldberg T, Hamp T, Hönigschmid P, Schafferhans A, Roos M, Bernhofer M, Richter L, Ashkenazy H, Punta M, Schlessinger A, Bromberg Y, Schneider R, Vriend G, Sander C, Ben-Tal N, Rost B. PredictProtein--an open resource for online prediction of protein structural and functional features. *Nucleic Acids Res.* 2014 (Web Server issue):W337-43.
- Yang F, Waters KM, Webb-Robertson BJ, Sowa MB, von Neubeck C, Aldrich JT, Markillie LM, Wirgau RM, Gritsenko MA, Zhao R, Camp DG 2nd, Smith RD, Stenoien DL. Quantitative phosphoproteomics identifies filaggrin and other targets of ionizing radiation in a human skin model. *Exp Dermatol.* 2012;21(5):352-7

Yang P, Li Y, Xie Y, Liu Y. Different Faces for Different Places: Heterogeneity of Neutrophil Phenotype and Function. *J Immunol Res.* 2019;2019:8016254.

Yoshibayashi H, Okabe H, Satoh S, Hida K, Kawashima K, Hamasu S, Nomura A, Hasegawa S, Ikai I, Sakai Y. SIAH1 causes growth arrest and apoptosis in hepatoma cells through beta-catenin degradation-dependent and -independent mechanisms. *Oncol Rep.* 2007;17(3):549-56.

Zhang M, Sui C, Dai B, Shen W, Lu J, Yang J. PEG10 is imperative for TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep.* 2017;37(1):510-518.

Zangi R, Zhou R, Berne BJ. Urea's action on hydrophobic interactions. *J Am Chem Soc.* 2009;131(4):1535-41.



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

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

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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

További közlemények

3. Kassay, N., Mótyán, J. A., Matúz, K., **Golda, M.**, Tózsér, J.: Biochemical Characterization, Specificity and Inhibition Studies of HTLV-1, HTLV-2, and HTLV-3 Proteases.
Life (Basel). 11 (2), 1-21, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/life11020127>
IF: 2.991 (2019)
4. Mahdi, M., Mótyán, J. A., Szojka, Z., **Golda, M.**, Miczi, M., Tózsér, J.: Analysis of the efficacy of HIV protease inhibitors against SARS-CoV-2-s main protease.
Viol. J. 17 (1), 1-8, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12985-020-01457-0>
IF: 2.579 (2019)





5. Miczi, M., **Golda, M.**, Kunkli, B., Nagy, T., Tőzsér, J., Mótyán, J. A.: Identification of Host Cellular Protein Substrates of SARS-COV-2 Main Protease.
Int. J. Mol. Sci. 21 (24), 1-19, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21249523>
IF: 4.556 (2019)

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 18,764

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

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

Debrecen, 2021.03.01.



9. TÁRGYSZAVAK/KEYWORDS

retrovírus-szerű proteáz

retroviral-like protease

Ty3/Gypsy retrotranszpozon

Ty3/Gypsy retrotransposon

aszpartil proteáz

aspartic protease

apai allélról expresszáldó gén 10 (*peg10*)

paternally expressed gene 10 (PEG10)

retrovírus-szerű aszpartil proteáz 1 (ASPRV1)

retroviral-like aspartic protease 1(ASPRV1)

bőrspecifikus aszpartil proteáz (SASPáz)

skin-specific aspartic protease (SASPase)

homológ modellezés

homology modeling

mutagenézis

mutagenesis

sejtprolifерáció és életképesség

cell proliferation and viability

ubikvitináció

ubiquitination

cisz-transz proteáz aktivitás

cis-trans protease activity

autoaktiváció

autoactivation

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

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

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

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

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

Köszönettel tartozom **Dr. Mohamed Mahdi-nak** és **Dr. Tóth Ferencnek** számtalan gyakorlati tanácsukért és támogatásukért!

Köszönöm **Dr. Szojka Zsófiának**, **Gazda Líviának**, **Janics-Pető Szilviának**, **Kassay Norbertnek**, **Miczi Máriónak**, **Toldi Vandának** baráti és szakmai segítségüket, a vidám és jó hangulatot, mely megteremtésével a kutatómunka is könnyebben haladt!

Külön köszönöm **Dr. Nagy Tibor** és **Nagy Katalin** szakmai támogatását!

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

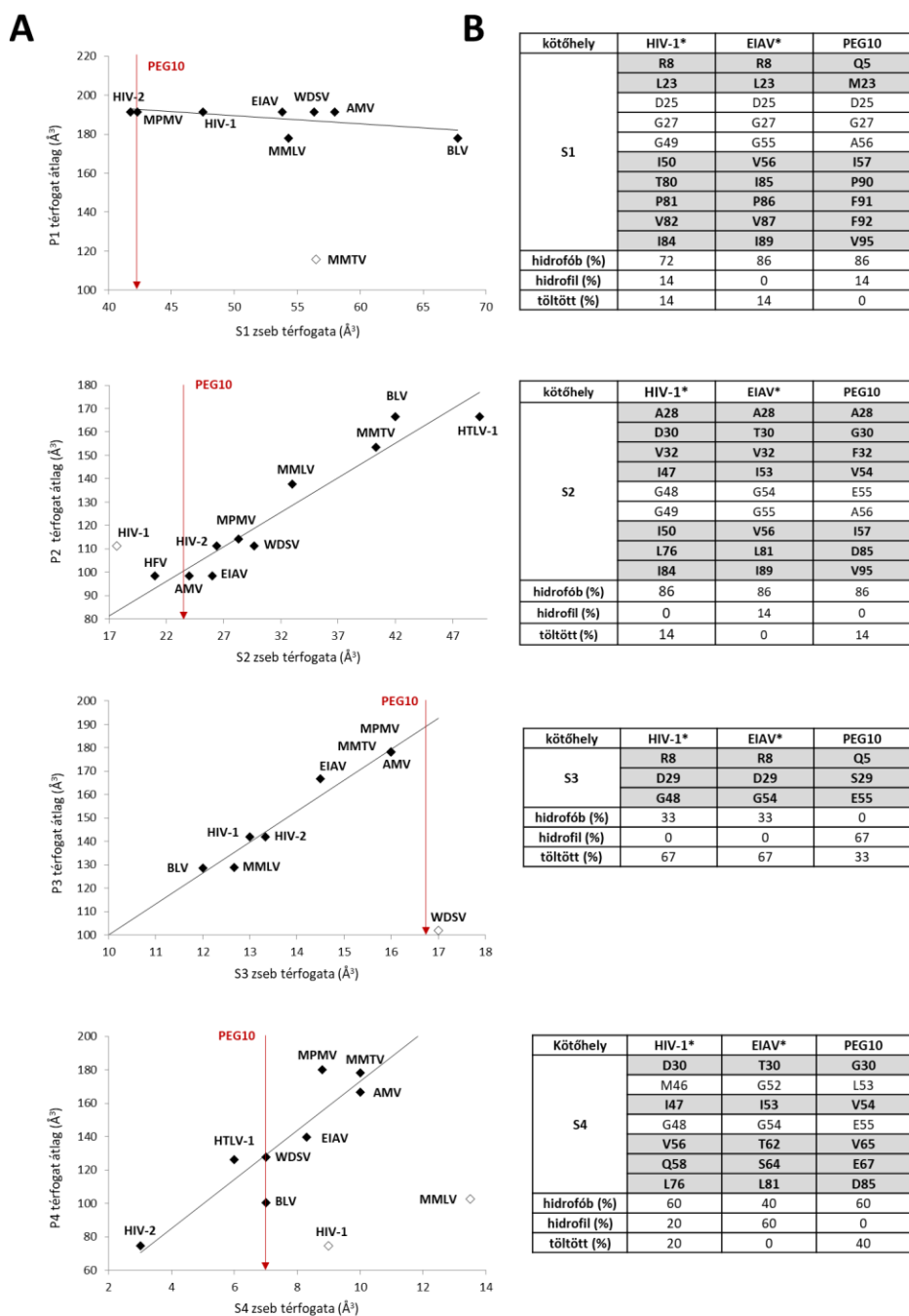
Szeretném megköszönni a **Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet dolgozóinak** az érdeklődésüket és a munkámat támogató barátságos hangulatot!

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

Kutatásaink kivitelezését a GINOP-2.3.2-15-2016-00044 számú „A gyógyszerkutatás újabb irányai: peptid-fehérje kölcsönhatások a magasabb rendű fehérjeszerveződések szabályozásában-PHARMPROT teaming” című pályázat, a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0023 „VÉD-

ELEM”, valamint a TÁMOP-4.2.2.D-15/1/KONV-2015-0016 pályázatok segítették. A tanulmány megszületését az Innovációs és Technológiai Minisztérium Felsőoktatási Intézményi Kiválósági Program NKFIH-1150-6/2019 számú programja, valamint az Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok (K-101591, NKFI-125238) segítették.

11. FÜGGELÉK



A szubsztrátkötő helyek tulajdonságainak vizsgálata. (A) A grafikonok a szubsztrátkötő zsebek méretének függvényében mutatják az adott zsebbe kötődő és leginkább preferált aminosavak átlagos térfogatát. A fekete rombusz szimbólumok mutatják a korreláció-analízishez használt, míg az üres rombuszok az analizisből kihagyott értékeket (Bagossi és mtsai, 2005; Eizert és mtsai, 2008). A PR_{PEG10} kötőhelyek esetében csak az átlagos zseb-térfogat értékek vannak feltüntetve (piros nyilak jelzik), mivel a

preferált aminosavak ezidáig nem kerültek kísérletesen meghatározásra. **(B)** A HIV-1 és EIAV proteáz szubsztrát kötőhelyeinek felépítését kutatócsoportunk korábbi munkái során határozták meg (**Bagossi és mtsai, 2005; Eizert és mtsai, 2008**), míg a PR_{PEG10} esetében a zsebeket felépítő aminosavak azonosítása a homológ modell és a szerkezetek illesztése alapján történt. A félkövér betűk az oldalláncok között interakciót jelzik. Az aminosavak csoportosítása a következők szerint történt: hidrofób: A, V, I, L, F, W, C, M, P és G, hidrofil: S, T, N, Q, Y és H, töltéssel rendelkező: D, E, K, és R.

Konferencia poszterek és előadások:

Golda Mária, Mótyán János András, Tózsér József: Functional study of the retrotransposon-derived protein PEG10. *4th Molecular Cell and Immune Biology Winter School*. Gallyatető, Magyarország, 2011. január 13. (poszter)

Golda Mária. Expression, purification and functional study of the retrotransposon-derived human protein PEG10. *8th Molecular Cell and Immune Biology Winter School*. Debrecen, Magyarország, 2015. január 9. (előadás)

Golda Mária, Mótyán János András, Tózsér József. Expression, purification and functional study of the retrotransposon-derived human protein PEG10. *International Conference on Biochemistry and Molecular Biology*. Párizs, Franciaország 2015. április 22-23. (poszter)

Golda Mária. Study of the retrotransposon-derived human protein PEG10. *9th Molecular Cell and Immune Biology Winter School*. Debrecen, Magyarország, 2016. január 8. (előadás)

Mótyán János András, Nagy Katalin, **Golda Mária**, Gazda Livia, Kassay Norbert, Tózsér József. Comparative Studies on Retroviral and Retroviral-Like Cellular Proteases. *Viruses 2016*. Bazel, Svájc, 2016. január 26-28. (poszter)

Golda Mária. Expression and analysis of the retrotransposon-derived protein PEG10. *10th Molecular Cell and Immune Biology Winter School*. Debrecen, Magyarország, 2017. január 6. (előadás)

Golda Mária, Mótyán János András, Mohamed Mahdi, Tózsér József. Study of the retrotransposon-derived human PEG10 protease. *Viruses 2020*. Barcelona, Spanyolország, 2020. február 5-7. (poszter)