

Doktori (PhD) értekezés tézisei

REKOMBINÁNS FLUORESZCENS FÚZIÓS FEHÉRJE- ALAPÚ *IN VITRO* PROTEÁZ VIZSGÁLATI MÓDSZER KIDOLGOZÁSA ÉS ALKALMAZÁSA KINETIKAI ÉS SPECIFICITÁSI VIZSGÁLATOKBAN

Bozóki Beáta

Témavezető: Dr. Tózsér József



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Sejt és Immunbiológiai Doktori Iskola

Debrecen, 2020

REKOMBINÁNS FLUORESZCENS FÚZIÓS FEHÉRJE-ALAPÚ *IN VITRO*
PROTEÁZ VIZSGÁLATI MÓDSZER KIDOLGOZÁSA ÉS
ALKALMAZÁSA KINETIKAI ÉS SPECIFICITÁSI VIZSGÁLATOKBAN

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az Elméleti orvostudomány tudományágban

Írta: Bozóki Beáta, okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Sejt-és Immunbiológiai Doktori
Iskolája

Témavezető: Prof. Dr. Tózsér József, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Erdődi Ferenc, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Gál Péter, az MTA doktora
Dr. Szabó Judit, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Biokémiai és
Molekuláris Biológiai Intézet
2015. február 16.

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Pongrácz Judit Erzsébet, az MTA doktora
Dr. Emri Tamás, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szabó Gábor, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Pongrácz Judit Erzsébet, az MTA doktora
Dr. Emri Tamás, PhD
Dr. Kvell Krisztián, MD, PhD
Dr. Kókai Endre, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK,
I. sz. Belgyógyászati Intézet
"A" Épület Előadóterme
2020. szeptember 11. 13:00

1. BEVEZETÉS

1.1. *In vitro* proteáz vizsgálati módszerek

A proteázok alapvető alkotóelemei minden élő szervezetnek a vírusoktól az emberekig. Az emberi genom 2%-a, míg a fertőző organizmusok 1-5%-a proteázokat kódol. Egy adott szervezet teljes proteáz készletét degradómnak nevezik, mely szinte az összes biológiai folyamatban szerepet játszik. A proteolitikus rendszerben bekövetkező változások számos patológiás állapot kialakulásáért felelősek lehetnek, mint például neurodegeneratív rendellenességek, gyulladásos, daganatos vagy kardiovaszkuláris megbetegedések. A proteázok kulcsfontosságú enzimek számos fertőző mikroorganizmus és vírus életciklusában, ennek okán potenciális terápiás célpontokká, diagnosztikus és prognosztikus biomarkerekké váltak. Jelentőségük miatt nagy szükség van olyan *in vitro* és *in vivo* módszerek kifejlesztésére, melyek egyaránt alkalmasak akár az ismeretlen funkciójú és specificitású, úgynevezett 'árva proteázok' tulajdonságainak feltérképezésére vagy akár a már ismert proteázok további vizsgálataira.

A proteolitikus aktivitás mennyiségi meghatározása függ az alkalmazott szubsztrát típusától, a vizsgálni kívánt enzimaktivitás mértékétől és az alkalmazott detektálási rendszer érzékenységi és pontossági követelményeitől. Általában az *in vitro* proteáz vizsgálati módszerek a proteolitikus aktivitást teljes fehérjék vagy szintetikus peptidmolekulák alkalmazásán keresztül térképezik fel.

Sokoldalú tulajdonságaiknak köszönhetően a szintetikus peptid-alapú technológiák a legnépszerűbbek. Ezen szubsztrátokat általában valamilyen riporter (fluoreszcens, kromogén vagy lumineszcens) csoporttal módosítják. A számos kifejlesztett, oligopeptid-alapú technológia közül az idő- és költséghatékony, nagy áteresztőképességű rendszerek a legkedveltebbek. Az *in vitro* proteáz vizsgálati módszerek lehetnek (i) homogén, (ii) elválasztáson-alapuló vagy (iii) heterogén formátumúak. A homogén és elválasztáson-alapuló módszerek esetében mind a szubsztrát, mind pedig a proteáz a vizes oldatban van jelen. Az első esetben a szubsztrát átalakulása során keletkező jelet közvetlenül a reakcióelegyből detektálják, a minta további kezelése nélkül. Ezzel szemben az elválasztáson-alapuló módszerek esetében a terméket és/vagy a megmaradt szubsztrátot a reakció lineáris tartományában történő leállítása után elkülönítik. A heterogén módszerek esetében azonban a szubsztrátot

valamilyen szilárd felszínen immobilizálják, míg a vizsgálni kívánt proteáz a vizes fázisban található oldott formában.

A géntechnológia és rekombináns 'fehérjemérnökség' új lehetőségeket hozott a proteázokat vizsgálató módszerek fejlesztésének területén is, jelentős részben a fehérje-alapú szubsztrátok alkalmazásával. Ezeket a szubsztrátokat általában kifejezetten egyedi kísérleti céloknak megfelelően tervezik, így gyakran csak egyetlen hasítási helyet tartalmaznak. Ezzel szemben a természetes fehérje-szubsztrátok több hatítási helyet is tartalmazhatnak, ami szűkítheti azok felhasználási lehetőségeit. A mikrobiális expressziós rendszerek révén a rekombináns fehérjék jól reprodukálható, költséghatékony, kényelmes és hatékony körülmények között termelthetők, azonban kihívást jelenthet a fehérjék oldékonyságával, konformációs állapotukkal, stabilitásukkal, valamint az alacsony kitermeléssel és esetleges toxicitással kapcsolatos problémák megoldása. Ezen nehézségek megoldására különböző, úgynevezett fúziós címkéket fejlesztettek ki, melyek alkalmazásával javítani lehet a rekombináns fehérjék tulajdonságain. Általában egy fúziós címke önmagában történő használata nem jelent teljeskörű megoldást minden problémára, ezért a különböző kísérleti igényeknek megfelelően a vizsgált fehérjéhez akár több címkét is kapcsolhatnak. Az oligopeptid szubsztrát-alapú módszerekhez hasonlóan az *in vitro* rekombináns fehérje-alapú rendszerek nagy része is fluoreszcens detektáláson alapul. Néhány esetben a fluoreszcens csoportot kémiai úton vagy egy fluoreszcensen jelölt antitesten keresztül kapcsolják a szubsztráthoz, de az esetek nagy részében a detektálandó fluoreszcencia forrása genetikailag kódolt fluoreszcens fehérje. A fluoreszcens fehérjetechnológia legújabb fejlesztéseinek köszönhetően a különböző kísérleti igények kielégítésére a fluoreszcens fehérjék széles választéka elérhető.

1.2. 1-es típusú humán immundeficiencia vírus (HIV-1) retropepszin

A szerzett immunhiányos tünetegyüttest (AIDS) okozó humán immundeficiencia vírus (HIV) kétségtelenül az egyik legismertebb és legalaposabban vizsgált retrovírus. A HIV epidemiológiai jelentőségének következtében a különböző kutatócsoportok számos erőfeszítést tettek azért, hogy a különböző virális alkotóelemek szerepét megismerjék, és olyan hatékony antiretrovirális inhibitorokat fejlesszenek, melyek a vírus (különösen a HIV-1) életciklusának kritikus elemeit célozzák. A HIV-1 retropepszin, más néven HIV-1 proteáz (PR), a vírus érési és összerendeződési mechanizmusában betöltött szerepének köszönhetően az antivirális terápiák egyik legfontosabb

célpontja. A HIV-1 PR 99 aminosavból áll és szabad formában a szerkezete C₂-es szimmetriát mutat. Az aktív enzim két azonos alegységből álló dimerként funkcionál, az aktív hely a monomerek közötti mélyedésben helyezkedik el. A terápiában is alkalmazott HIV-1 proteáz inhibitorok is a proteáz aktív helyéhez képesek kötődni. A terápia során is kialakuló, rezisztens vírusmutánsok gyors kialakulása a vírus heterogenitásának és gyors szaporodásának következménye, melyhez hozzájárul a virális reverz transzkriptáz magas hibaszázalékkal jellemezhető működése és a proteáz inhibitorok alkalmazása nyomán kialakuló szelekciós nyomás is. Habár számtalan próbálkozás történt a rezisztens vírusformákkal szemben nagy hatékonyságot mutató szelektív inhibitorok létrehozására, új típusú inhibitorok fejlesztésére továbbra is nagy szükség van.

1.3. Dohány karcolatos vírus (*Tobacco Etch Virus*) NIa proteáz (TEV PR)

A TEV a *Potyviridae* család tagja, melyet a növényi vírusok gazdaságilag egyik legfontosabb csoportjaként tartanak számon, ugyanis tagjai világszerte számos háziásított növényt fertőznek, valamint komoly mezőgazdasági és biológiai károkat okoznak. A vírus pozitív szálú mRNS genommal rendelkezik. Az erről kifejezett poliproteint három proteáz, a P1, a HC-Pro és a ' nukleáris inklúziós fehérje a' (NIa) hasítja. Az NIa proteáz, másnéven TEV PR, a virális poliproteinekből proteolízissel szabadul fel és kritikus szerepet tölt be a vírus érési folyamataiban. A TEV PR elsődleges szerkezete nagyon hasonlít a pikornavírusok 3C proteázának a szerkezetéhez. A katalitikus triádot a His45, Asp81 és a Cys151 aminosavak alkotják.

Bazan és mtsai (1988) vizsgálatai bizonyították, hogy TEV PR-hoz hasonló virális cisztein proteázok szerkezetileg és funkcionálisan is homológiát mutatnak a tripszin-szerű szerin proteázokkal. Jelentős különbség azonban, hogy nukleofilként a szerin hidroxil-csoportja helyett a cisztein tiol-csoportját alkalmazzák. A P1' pozícióban a Pro kivételével bármilyen aminosav előfordulhat anélkül, hogy a proteolitikus aktivitás jelentősen csökkenne. Ez gyakorlatilag az jelenti, hogy a ENLYFQ↓S/G kanonikus hasítási szekvencia C-terminálisához bármilyen fehérjeszekvencia kapcsolható anélkül, hogy az a TEV PR általi hasítást befolyásolná.

Számos előnyös tulajdonságának köszönhetően, a TEV PR az egyik legjobban karakterizált és biotechnológiai célokra leggyakrabban alkalmazott proteolitikus enzim. Széles körben alkalmazzák affinitás kromatográfiás tisztításokhoz használt fúziós címkék eltávolítására.

1.4. Venezuelai ló-láz *encephalitis* vírus 2-es számú nem-szerkezeti fehérje proteáz (VEEV PR)

A VEEV a *Togaviridae* család *Alphavirus* csoportjának tagja, haszonállatokban, valamint emberekben agyvelőgyulladásos megbetegedéseket okozhat. Elsősorban Közép- és Dél-Amerika területein elterjedt. Az alfavírusok kisméretű, burokkal rendelkező, 70 nm-es átmérőjű gömb alakú vírusok. A kb. 11 kilobázis nagyságú virális mRNS genom két cisztronból áll: (i) egyik nyitott leolvasási keret (ORF) a genom 2/3-adát teszi ki, és egyetlen poliproteinként fejeződik ki (nsP123 vagy nsP1234), mely a nem-szerkezeti fehérjét tartalmazza; (ii) a másik ORF a szerkezeti fehérjét kódolja és a fertőzés késői fázisában fejeződik ki.

A nem-szerkezeti fehérjék az nsP123 vagy nsP1234 poliproteinekből szabadulnak fel, és elsődleges szerepet játszanak a virális replikációs komplex kialakításában. A poliprotein hasítása az nsP2 fehérje C-terminális doménjének (nsP2pro) proteolitikus aktivitása révén valósul meg. Az alfavírusok esetében az nsP2pro a nem-szerkezeti poliproteint három különböző helyen hasítja, melyek az nsP1/nsP2, az nsP2/nsP3 és az nsP3/nsP4 nem-szerkezeti fehérjék között helyezkednek el. Továbbá úgy vélik, hogy az nsP2pro fontos szerepet tölt be a veleszületett immunitás korai válaszainak neutralizálásában más, IV-es genetikai csoportba tartozó vírusokhoz hasonlóan, mint például a pikornavírusok, flavavírusok vagy koronavírusok, beleértve az olyan új patogéneket is, mint a közel-keleti légúti és súlyos akut légzőszervi szindróma járványát okozó koronavírusok (MERS, SARS-CoV és -CoV2). Korábban a VEEV nsP2 fehérje, valamint a MERS és SARS koronavírusok papain-szerű cisztein proteázai között szerkezeti hasonlóságokat is leírtak. Mindezek alapján a VEEV nsP2pro-t potenciális antivirális terápiás célpontként tartják számon.

Ezek az enzimek bizonyos fokú szekvencia-specifitást mutatnak, ezért potenciálisan alkalmasak lehetnek *in vitro* fúziós címkék rekombináns fehérjékről történő eltávolítására is, erre a célra történő alkalmazhatóságukat kutatócsoportunk korábban, a Makromolekuláris Krisztallográfiás Laboratóriummal (NCI, NIH, Maryland, USA) kollaborációban már vizsgálta három alfavírus proteáz esetében. A sindbis vírus (SIN), a semliki erdei vírus (SFV) és a VEEV nsP2pro doménjeinek előállítására bakteriális expressziós rendszerben történt. A proteázok aktivitásának méréséhez különböző fúziós fehérje szubsztrátokat, valamint a három vírus természetes hasítási helyeit reprezentáló szintetikus oligopeptid szubsztrátokat használtunk. Mivel a három enzim által felismert hasítási szekvencia nagyon hasonló, a proteolitikus

aktivitást nemcsak az adott virális proteáz természetes hasítóhelyeit mintázó szubsztrátokon teszteltük, hanem keresztreakciókban is. Az oligopeptid szubsztrát-alapú vizsgálatokban csak három enzim-szubsztrát pár: (i) VEEV PR – SFV nsP1/nsP2 (SFV-1), (ii) SFV PR – SFV nsP1/nsP2 és a (iii) SFV PR nsP3/nsP4 esetében tudtunk kinetikai paramétereket is meghatározni. Az egyes párok esetében a meghatározott k_{cat}/K_M értékek az alábbiak lettek: (i) $0.028 \pm 0.005 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$, (ii) $0.036 \pm 0.008 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ és (iii) $0.277 \pm 0.050 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$, melyek minden esetben lényegesen alacsonyabb katalitikus hatékonyságot jeleznek összehasonlítva a TEV és dohány érfoltosság vírus (TVMV) proteázok katalitikus hatékonyságával. Továbbá, mivel a fúziós fehérje-alapú szubsztrátokon vizsgált aktivitásuk is viszonylagosan gyengének bizonyult, megállapítottuk, hogy ugyan az alfavírus proteázok elméletileg elégséges szekvencia-specifitást mutatnak ahhoz, hogy alkalmasak legyenek fúziós címkék eltávolítására, a gyakorlatban azonban jelen formájukban nem bizonyultak hatékonyabbnak a széleskörben sikeresen alkalmazott potivírus proteázokhoz képest.

2. CÉLKITŰZÉS

Számos kitűnő biológiai és kémiai-alapú módszert hoztak már létre a különböző enzimek proteolitikus aktivitásának vizsgálatára, valamint újonnan felfedezett proteázok szubsztrátjainak azonosítására, azonban sok esetben ezek a módszerek nem rendelkeznek kellő érzékenységgel, drágák, idő- és munkaigényesek, illetve számos esetben csak bizonyos proteáz csoportok vizsgálatára használhatóak, továbbá csak részleges lefedettséget biztosítanak és nem, vagy csak részben alkalmasak kinetikai mérésekre. Ennek megfelelően, továbbra is nagy szükség van olyan nagy áteresztőképességű és kvantitatív módszerek kifejlesztésére, melyek új előnyöket kínálnak vagy a már meglévő módszerek előnyeit egyesítik.

A munka során az alábbi célokat tűztük ki:

- 1) Egy olyan, cserélhető kazettás expressziós vektorrendszer létrehozása rekombináns fúziós fehérje szubsztrát előállításához, amely egy N-terminális-hexahisztidin címke (His₆), egy maltóz-kötő fehérje (MBP), egy TEV PR hasítási hely, egy klónozó kazetta, és egy C-terminális fluoreszcens fehérje (FP) kódoló szekvenciáját tartalmazza.
- 2) A rekombináns szubsztrátok expressziós és tisztítási körülményeinek optimalizálása és alkalmazása egy kvantitatív, nagy áteresztőképességű, sokoldalúan felhasználható, fluoreszcens detektáláson alapuló proteáz vizsgálati platform kifejlesztéséhez. A módszert a HIV-1 és TEV PR használatával kívántuk beállítani, és ezután VEEV PR specificitási vizsgálatokban terveztük használni.
- 3) Korábban, a Zhang és mtsai (2009) által expresszált VEEV PR (nsP2pro-1) *in vitro* vizsgálataiban alacsony enzimaktivitást tapasztaltak, ezért olyan további VEEV PR formák létrehozását terveztük, ahol a proteáz domén N-terminálisához kapcsolnánk (i) a teljes N-terminális domént (VEEV nsP2) vagy a (ii) Ala436-Met457 által kódolt régiót (VEEV nsP2pro-2). Az új enzimformák *in vitro* aktivitását olyan His₆-MBP-mEYFP szubsztrátokon kívántuk tesztelni, melyek az SFV-1 hasítóhely vad típusú vagy P5, P4, P2, P1, P1', és P2' variánsait tartalmazzák.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. A szubsztrátok „üres” expressziós vektorjának előállítása.

A pDest-His₆-MBP-FP plazmidokat Gateway technológia alkalmazásával állítottuk elő a Tropea és mtsai (2007) által leírtak alapján. A lineáris DNS szekvenciákat, melyeket a pDON221 donor vektoron keresztül a pDEST-His₆ vektorba kívántuk transzferálni, egy kétlépéses polimeráz láncreakcióban (PCR) sokszoroztuk fel. A klónozási lépéseket egyedileg tervezett N1 és C oligonukleotid primerek alkalmazásával, a gyártó leírása szerint végeztük.

3.2. A szubsztrátot kódoló rövid duplaszálú DNS szakaszok előállítása random mutagenézissel.

A SFV-1 szekvenciát kódoló komplementer oligonukleotid primerek összekapcsolásával létrehozott DNS szakaszt - a *Bam*HI és *Nhe*I restrikciós endonukleázokkal linearizált - pT7-Blue-3 plazmidba ligáltuk. A P1' aminosavat kódoló triplet random mutagenézisét a QuickChange Lightning Multi-Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) felhasználásával végeztük, a gyártó leírásának megfelelően olyan oligonukleotid primert alkalmazva, melyben a P1' helyért felelős kodont degeneráltuk. A plazmidokat a Qiagen Plasmid Midi Kit használatával tisztítottuk. Az SFV-1 hasítási helyet kódoló mutált DNS szekvenciákat kivágtuk a tisztított plazmidokból *Nhe*I és *Pac*I enzimekkel, majd 15%-os ureát tartalmazó poliakrilamid gélen elválasztottuk, és Qiaex II Gel Extraction Kit használatával tisztítottuk ki a gélből.

3.3. A szubsztrátot kódoló expressziós vektor előállítása ligálással.

A vizsgálni kívánt proteáz hasítási helyét kódoló DNS szakaszokat random mutagenézissel vagy komplementer oligonukleotid primerek összekapcsolásával állítottuk elő, majd *Nhe*I és *Pac*I enzimekkel linearizált pDest-His₆-MBP-FP plazmidba ligáltuk. Másnap 100 µL *E. coli* BL21(DE3) kompetens sejtet transzformáltunk a ligációs eleggyel (15 µL), hősokk módszert alkalmazva. A kinőtt kolóniákból tisztított plazmidokat kapilláris DNS szekvenálással ellenőriztük.

3.4. Szubsztrátok expressziója és a sejtek feltárása

Éjszakai kultúrát (5 mL) indítottunk az expressziós vektorral transzformált *E. coli* BL21(DE3) sejtekből, majd másnap a szuszpenziót 50 mL tápoldatba oltottuk át (100 µg/mL ampicillint tartalmazó LB médium), és a sejteket 500 mL Erlenmeyer lombikban rázatva növesztettük. Kisebb léptékű expresszió

esetén 2,5 mL éjszakai kultúrát oltottunk át 15 mL, 100 µg/mL ampicillint tartalmazó LB médiumba, 50 mL-es centrifuga csőben végezve a sejtek növesztését. A sejteket 37 °C-on növesztettük amíg a 600 nm-en mért abszorbancia (OD₆₀₀) el nem érte a 0,6-0,8 közötti értéket. A fehérjeexpressziót 1 mM izopropil β-d-1-tiogalaktopiranozid (IPTG) hozzáadásával indukáltuk, melyet 3 óra inkubáció követett 37 °C-on. A 15 mL-es expresszió esetében az inkubáció hossza 4 óra volt 37 °C-on. A sejteket centrifugálással gyűjtöttük össze (Jouan CR 412, 4000 g, 15 perc, 4 °C) és a pelleteket a feltárás előtt minimum 1 órán keresztül -70 °C-on tároltuk. A sejtek lízise előtt a sejt pelletet hagytuk felolvadni jégen 15 percen keresztül, majd felfuszpendáltuk 2 mL lízis pufferben (50 mM nátrium-acetát, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, 0,05 % Tween 20, 25 µg/ml PMSF, pH 8,0). A 15 mL-es expresszió esetében 1 mL lízis puffert alkalmaztunk, mely lizozimot (1 mg/mL) és DN-ázt is tartalmazott (10 U/mL), majd időnként szuszpendálva 10 percen keresztül inkubáltuk jégen. Ezután a szuszpenziót mikrocentrifugacsövekbe mértük és 3 percen keresztül szonikáltuk, majd lecentrifugálást követően (Eppendorf 5415D, 10000 g, 15-20 perc, szobahőmérsékleten) a felülúszót összegyűjtöttük.

3.5. A VEEV nsP2pro-2 kinetikai méréseiben használt szubsztrátok expressziója

A SFV-1 hasítási hely vad típusú, P4-Glu, P4-Thr, P4-Arg, P4-Gly, P1-Gly, P1'-Thr, és P2'-Ser variánsainak expressziója a 3.4 fejezetben leírtaknak megfelelően történt. A sejteket OD₆₀₀=0,5-0,6 érték eléréséig növesztettük 37 °C-on, majd az IPTG-vel történő indukció után a szuszpenziót 2 órán keresztül rázattuk 37 °C-on. Ezután a fehérje transzlációt tetraciklin (200 µg/mL) hozzáadásával állítottuk le, miután a kultúrát további 2 órán keresztül rázattuk 37 °C-on.

3.6. A szubsztrátok tisztítása

A megfelelő rekombináns szubsztrátot tartalmazó sejt-lizátumot nikkel-nitrilotriacetáttal (Ni-NTA) bevont mágneses agaróz gyöngyökre (Qiagen vagy Cube Biotech) mértük. A szuszpenziókat 20-60 percig szobahőmérsékleten folyamatos forgatás mellett inkubáltuk. A szubsztrát-kapcsolt mágneses gyöngyöket (*substrate-associated magnetic beads*, SAMB) háromszor mostuk 1 % Tween 20 (pH 7,0) oldattal, mosó pufferrel (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 5 mM imidazol, 0,05 % Tween 20, pH 7,0) és hasítási pufferrel (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 0,05 % Tween 20, pH 7,0) DynamagTM-2 mágneses állvány segítségével. Ezután a szubsztrátokat eluáló puffer alkalmazásával

eluáltuk a gyöngyök felszínéről. A 3.12-3.15 fejezetekben leírt vizsgálatok során az A-típusú eluáló puffert (100 mM EDTA, 0,05 % Tween 20, pH 8,0), míg a 3.16-3.18-as fejezetekben leírt kísérletekben B-típusú eluáló puffert (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 500 mM imidazol, 0,05 % Tween 20, pH 8,0) használtuk. Ezt követően puffercserét végeztünk 10K-s centrikon csövek segítségével, a puffert reakció pufferre cseréltük. A teljes fehérje koncentrációt BCA fehérjemérési módszerrel, vagy az abszorbancia 280 nm-en történő mérésével (NanoDrop) állapítottuk meg, az ExPASy ProtParam programmal számított elméleti extinkciós koefficiens és molekulatömeg értékeket alapul véve.

3.7. A szubsztrátok kalibrálása

Az eluáló, illetve hasítási pufferben oldott tisztított szubsztrátokból hígítási sort készítettünk, majd az oldatokat fekete mikrotiter-lemezekre mértük. A relatív fluoreszcencia intenzitás (RFU) értékeket Biotek Synergy2, H1 vagy Victor Wallac 1420 készülékekkel detektáltuk az mApple, mTurquoise2, mEYFP és mCherry fluoreszcens fehérjék gerjesztési és emissziós hullámhosszainak megfelelően. A korrigált RFU értékeket a szubsztrát koncentráció függvényében (mM) ábrázoltuk, majd lineáris regressziót végeztünk. Az illesztett egyenes paramétereit Microsoft Excel 2010 (Microsoft) programmal határoztuk meg. A vizsgálati adatok kiértékelésének előfeltétele, hogy a korrigált RFU értékek egyenes arányosságot mutassanak a hozzájuk tartozó koncentráció értékekkel, a vizsgálat során alkalmazott koncentráció-tartományban.

3.8. A VEEV nsP2 és a VEEV nsP2pro-2 expressziós plazmidok klónozása

A VEEV nem-szerkezeti fehérjék cDNS szekvenciáit kódoló plazmidokat Dr. Christine L. Pugh (U.S. Army Research Institute of Infectious Diseases) bocsájtotta rendelkezésünkre. A különböző VEEV PR enzimformákat kódoló plazmidokat Gateway technológiával állítottuk elő a Tropea és mtsai (2007) által leírt módszer alapján. A VEEV nsP2 és VEEV nsP2pro-2 fehérjéket kódoló lineáris DNS szekvenciákat egy kétlépéses PCR protokoll alkalmazásával felsokszoroztuk, majd a pDON221 donor vektoron keresztük pDESTTM-17 (továbbiakban pDEST-His₆) és pDEST-His₆-MBP vektorokba klónoztuk, a gyártó leírásának megfelelően. A megfelelő klónok kiválasztása és feldúsítása után a pBB2546 (pDEST-His₆-VEEVnsP2), pBB2547 (pDEST-His₆-VEEVnsP2pro-2), pBB2549 (pDEST-His₆-MBP-VEEVnsP2), és

pBB2550 (pDEST-His₆-MBP-VEEVnsP2pro-2) plazmidokat Qiagen Miniprep Kit használatával izoláltuk.

3.9. VEEV nsP2pro-2 és VEEV nsP2 expressziója

Az expressziót pBB2546, pBB2547, pBB2549 és pBB2550 plazmidokkal transzformált *E. coli* Rozetta sejtekben végeztük, 1000 mL LB tápoldatban (125 µg/mL ampicillin, 30 µg/mL klóramfenikol, 0,2% glükóz). A sejteket 37 °C-on OD₆₀₀=0,5-0,6 közötti érték eléréséig, majd a fehérje expressziót 1 mM IPTG-vel indukáltuk, és a szuszpenziót 4 órán keresztül rázattuk 30 °C-on. A His₆-MBP-VEEV nsP2 fehérje vízdoldékonyságának növelése érdekében a 18 °C-on, egy éjszakán át tartó expresszió lehetőségét is vizsgáltuk. A sejteket centrifugálással gyűjtöttük össze (5000 rpm, 10 perc) és a pelleteket felhasználásig -80 °C-on tároltuk.

3.10. VEEV nsP2pro-2 fehérje tisztítása

A His₆-MBP-VEEV nsP2pro-2 fehérjét expresszáló bakteriális sejteket 50 mL jéghideg A pufferben (50 mM nátrium-foszfát, 150 mM NaCl, 25 mM imidazol, pH 7,5) szuszpendáltuk fel. A sejteket APV Gaulin Model G homogenizátor (Invensys, Albertslund, Denmark) segítségével 10000 psi-n lizáltuk, majd lecentrifugáltuk (30000 g, 30 perc, 4 °C). A felülúszót 0,22 µm-es polieterszulfon membránon keresztül szűrtük, majd A pufferrel ekvibrált HisTrap FF crude affinitás kromatográfiás oszlopra (15 mL, GE Healthcare, Piscataway, NJ) vittük fel. A fehérjét az oszlopról lineáris gradienssel eluáltuk 5-50 % B pufferrel (50 mM nátrium-foszfát, 150 mM NaCl, 500 mM imidazol, pH 7,5). A fúziós fehérjét nagy mennyiségben tartalmazó frakciókat egyesítettük, majd Amicon YM30 membrán (Millipore, Billerica, MA) használatával töményítettük. Ezt követően hatszorosára hígítottuk 50 mM nátrium foszfátot és 150 mM NaCl-ot tartalmazó pufferrel (pH 7,5) annak érdekében, hogy az oldat imidazol koncentrációját kb. 25 mM-ra csökkentsük.

A fúziós fehérjét ezután 70:1 v/v arányban polihisztidin címkével kapcsolt TEV PR-zal (5 mg/mL) emésztettük egy éjszakán keresztül, 4 °C-on. A hasítási termékeket A pufferrel ekvibrált HisTrap FF crude affinitás kromatográfiás oszlopra injektáltuk (20 mL). A VEEV nsP2pro-2-t nagy mennyiségben tartalmazó átfolyó frakciókat egyesítettük, Amicon YM30 membránnal kb. 10 mg/mL-s koncentrációra töményítettük, majd géliszűrő pufferrel (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM Tris (2-karboxietil) foszfin-hidroklorid (TCEP), pH 7,5) ekvibrált HiPrep 26/60 Sephacryl S200 oszlopra (GE Healthcare) injektáltuk. A VEEV nsP2pro-2 frakciókat egyesítettük és töményítettük. A

tisztított VEEV nsP2pro-2 koncentrációja 2,9 mg/mL volt, melyet a 280 nm-en mért abszorbanancia érték, valamint az ExPASy ProtParam program által számolt teoretikus extinkciós koefficiens és molekula tömeg értékeket alapul véve állapítottunk meg. Az enzimet tárolócsövekbe mértük, majd folyékony nitrogénbe mártva fagyasztottuk, és további felhasználásig -80 °C-on tároltuk.

3.11. Ni-NTA mágneses gyöngy-alapú vizsgálati módszer

A hasítási pufferben szuszpendált gyöngyökből törzsoldatot készítettünk, melyből a vizsgálati mintákat kívántuk elkészíteni. Az alkalmazott hasítási puffer térfogata függött az egyedi kísérletes igényektől és minden esetben a mágneses gyöngyök sűrűsége, valamint a vizsgálati minták tervezett száma és térfogata alapján számoltuk ki. Az idő- és pH-függés, valamint a gátlást vizsgáló kísérletek esetén egyenlő mennyiségű, míg a szubsztrát-függő kísérletek esetében növekvő mennyiségű homogén SAMB szuszpenziót mértünk 2 mL-es Protein Lobind típusú mikrocentrifuga csövekbe (Eppendorf). A csöveket mágneses állványra helyeztük, a felülúszót eltávolítottuk és a gyöngyökre egyenlő térfogatú hasítási puffert mértünk. Az enzim, enzim puffer vagy elúciós puffer hozzáadása után a reakciópuffer végső térfogata 70 μ L volt.

A szubsztrát kontrol (C) mintákat a reakció (R) mintákhoz hasonlóan készítettük el, azonban a hasítási puffer helyett eluáló puffert használtunk. Az R mintákkal párhuzamosan szubsztrát vak (B) mintákat is készítettünk, ahol az enzim helyett az enzim tároló pufferét mértünk az elegyekbe.

A csöveket mágneses állványra helyeztük, majd a reakciókat a gyöngyök elválása után a felülúszó leszívásával állítottuk le. Ezután lemértük a felülúszók fluoreszcenciáját. Az R mintákban a keletkező C-terminális fluoreszcens termék mennyiségét úgy számoltuk ki, hogy a B minták RFU értékeivel korrigált RFU értékeket elosztottuk a hasítási pufferben oldott tisztított szubsztrátra felvett kalibrációs egyenes meredekségével. A C minták felülúszójában található (eluált) szubsztrát mennyiségét úgy számoltuk ki, hogy az eluáló puffer esetében mért fluoreszcencia értékkel korrigált RFU értékeket elosztottuk az eluáló pufferben oldott tisztított szubsztrátra felvett kalibrációs egyenes meredekségével. Az egyes R mintákban a szubsztrátok anyagszámosságának kiszámításához meghatároztuk a minták elkészítéséhez használt SAMB törzsoldatban a szubsztrát koncentrációját (mM) az alábbiak alapján: $c_{SAMB} = (c_C \times V_r) / V_{SAMB}$, ahol c_{SAMB} a SAMB törzsoldat anyagszámossága; a c_C a C mintában lévő szubsztrát anyagszámossága; V_r a

végleges reakcióterfogat és a V_{SAMB} pedig a C minta előkészítésekor bemért SAMB törzsoldat térfogata.

3.12. A HIV-1 PR időfüggő kinetikai mérései

A His₆-MBP-VSQNY↓PIVQ-mTurquoise2 (1,6 μM) és His₆-MBP-VSQNY↓PIVQ-mApple (2,4 μM) szubsztrátokat HIV-1 PR-zal (36,4 nM) hasítottuk, majd a reakcióközegeket 37 °C-on folyamatos rázatás (600 rpm) mellett inkubáltuk 0, 20, 40 és 60 percig, majd a keletkező termék fluoreszcenciáját mértük a felülülőban. A keletkező C-terminális fluoreszcens termék anyagmennyiségét ábrázoltuk az eltelt idő (perc) függvényében. Az adatsorra a GraphPad Prism 5.0 verziójú programmal egyenest illesztettünk és meghatároztuk a regressziós paramétereket.

3.13. HIV-PR gátlás vizsgálatok

A HIV-1 PR (36,4 nM) gátlásának vizsgálatához amprenavirt használtunk 0,001-1 μM közötti koncentráció-tartományban, szubsztrátként His₆-MBP-VSQNY↓PIVQ-mTurquoise2 rekombináns fehérjét alkalmaztunk (0,028 mM). A mintákat 60 percig 37 °C-on, folyamatos rázatás (600 rpm) mellett inkubáltuk. A kezdeti sebesség értékeket (nMs⁻¹) az amprenavir koncentráció (nM) logaritmusának függvényében ábrázoltuk. Az IC₅₀ értéket (50%-os gátláshoz tartozó inhibitor koncentráció) a GraphPad Prism 5.00 verziójú program használatával határoztuk meg, 5-paraméteres logisztikus görbeillesztéssel. Az illesztés alapján meghatároztuk az oldatban lévő aktív enzim koncentrációját (6,05 nM), melyet a kinetikai paraméterek és a gátlási állandó meghatározásához használtunk fel.

3.14. A HIV-1 PR szubsztrátfüggő kinetikai mérései

A növekvő koncentrációjú His₆-MBP-VSQNY↓PIVQ-mTurquoise2 és His₆-MBP-VSQNY↓PIVQ-mApple szubsztrátokat HIV-1 PR-zal (36,4 nM) hasítottuk. A reakcióközegeket folyamatos rázatás mellett (600 rpm) 60 percig 37 °C-on inkubáltuk. A kezdeti reakciósebesség értékeket (nMs⁻¹) a kezdeti szubsztrát koncentráció (mM) függvényében ábrázoltuk. A kinetikai paramétereket a Michaelis-Menten-féle nem-lineáris görbeillesztés alapján a GraphPad Prism 5.00 verziójú szoftver használatával határoztuk meg. A szubsztrát konverzió minden mérési pontban 20 % alatt volt.

3.15. TEV PR aktivitás vizsgálatok

A szubsztrátfüggő kinetikai mérések a 3.14-es fejezetben leírtak szerint történtek azzal az eltéréssel, hogy a szubsztrátokat 45,7 nM végkoncentrációjú

TEV PR-zal emésztettük 30 °C-on. Az enzim pH-függésének vizsgálatához a TEV PR-t (91,4 nM) His₆-MBP-VSQNY↓PIVQ-mTurquoise2 rekombináns szubsztráttal (0,03 mM) inkubáltuk. A pH hatását az enzim aktivitására pH 6,0-8,5 tartományban vizsgáltuk, 0,5 értékenként növelve a hasítási puffer pH-ját. A mért kezdeti sebesség értékeket (nMs⁻¹) a pH függvényében ábrázoltuk. A legmagasabb kezdeti sebesség értéket 7,0 pH-jú pufferben mértük, ehhez viszonyítva vizsgáltuk meg a többi minta esetében mért kezdeti sebesség értékeket. A szignifikancia vizsgálatát t-próbával végeztük.

3.16. A VEEV nsP2pro-2 mikrotiter lemez-alapú specificitási vizsgálatai

A VEEV nsP2pro-2 specificitását a vad típusú vagy módosított SFV-1 hasítási helyet tartalmazó His₆-MBP-mEYFP szubsztrátokon vizsgáltuk. A vizsgálatot a Ni-NTA mágneses gyöngy-alapú vizsgálati módszer 96-lyukú mikrotiter lemezre adaptált protokollja szerint végeztük. A mérések során a His₆-MBP-mEYFP szubsztrátokat (1-5 µM) VEEV nsP2pro-2 enzimmal (2,1-6,0 µM) 30 °C-on inkubáltuk, folyamatos rázatás mellett (600 rpm). Az inkubációs idő a P5, P4, P1, and P2' variánsok esetében 40 perc, míg a P1' variánsok esetében 20-22 óra volt. A vizsgálati minták végtérfogata 70 µL/lyuk volt. A mérés során használt pufferek összetétele, megegyezett a 3.6-os fejezetben leírtakkal, azzal az eltéréssel, hogy a pufferek pH-ját 7,5-ös értékére állítottuk. A kísérletek során lapos aljú 96-lyukú mikrotiter lemezeket (Greiner BioONE or Qiagen) használtunk 96-lyukú mikrotiter lemezzel kompatibilis mágneses állvánnyal (Magnet Type A, Qiagen), Az inkubálási és mosási lépések alatt a lemezeket ráztuk (IKA MS3). A termékek és szubsztrátok koncentrációjának meghatározása a 3.11-es fejezetben leírt módon történt. A VEEV nsP2pro-2 hasítási preferenciáját a különböző szubsztrátok között a szubsztrát konverziós értékei (%) alapján vizsgáltuk. A vad típusú szubsztrát és P5, P4, P2, P1 és P2' variánsok konverziós értékei közti különbség szignifikanciáját párosítatlan t-próbával és egyszempontos varianciaanalízissel (ANOVA) is vizsgáltuk.

3.17. VEEV nsP2pro-2 aktivitás idő-függésének vizsgálata

A vad típusú His₆-MBP-SFV-1-mEYFP szubsztrát (0,02 mM) hasításához VEEV nsP2pro-2 enzimet (3,0 µM) használtunk, a reakcióelegyeket 0, 5, 10, 15, 20, 30, 50 és 70 percig inkubáltuk 30 °C-on, a minták folyamatos rázatása mellett (600 rpm). A fluorimetriás mérést követően az R mintákban keletkező C-terminális fluoreszcens termék anyagmennyiségét (nM) ábrázoltuk az idő

(perc) függvényében. Az adatokat a GraphPad 5.00 verziójú szoftverrel illesztett egyenes paraméterei alapján értékeltük.

3.18. VEEV nsP2pro-2 szubsztrátfüggő kinetikai vizsgálata

A kinetikai méréseket olyan His₆-MBP-mEYFP szubsztrátokkal végeztük, melyek a vad típusú vagy mutáns (P4-Gln, P4-Thr, P4-Ala, P4-Gly, P1-Gly, P1'-Thr vagy P2'-Ser) SFV-1 hasítóhely szekvenciát tartalmaztak. A reakcióelegyeket 10 percig inkubáltuk 30 °C-on folyamatos rázatás (600 rpm) mellett. Az enzimkinetikai paraméterek meghatározása a 3.14-es fejezetben leírtak szerint történt. A katalitikus konstansok számolásakor 100%-os aktív enzimkoncentrációt feltételeztünk. A variánsok és a vad típusú szubsztrát k_{cat}/K_M értékei közötti különbség szignifikanciáját párosítatlan t-próba alkalmazásával határoztuk meg.

3.19. A rekombináns szubsztrátok oldatban történő hasítása

Az adott enzim specificitásának megfelelő tisztított rekombináns szubsztrátokat (0,01-0,03 mM) hasítási pufferben emésztettük HIV-1 PR-zal (4,1 μ M), TEV PR-zal (21 μ M) vagy VEEV nsP2pro-2 enzimmal (73 μ M). A reakciókat (70 μ L végtérfogat) 1-22 óráig inkubáltuk, a HIV-1 PR esetében 37 °C-on, míg a TEV PR és a VEEV nsP2pro-2 esetében 30 °C-on. A hasítást 6x-os denaturáló vagy nem-denaturáló mintapuffer hozzáadásával állítottuk le, majd a mintákat poliakrilamid-gélelektroforézissel (PAGE) vizsgáltuk.

3.20. A HIV-1 PR RP-HPLC-alapú kinetikai vizsgálata

Az enzimreakciók összeállításához 5 μ L, 2x-es töménységű hasítási pufferrel szemben dializált HIV-1 PR-t (430 nM), 10 μ L 2x-es töménységű hasítási puffert és 5 μ L szintetikus oligopeptid szubsztrát oldatot (0,47-2,35 mM), mely a vírus mátrix és kapszid fehérjéje között megtalálható természetes hasító helyet tartalmazza (VSQNY↓PIVQ). Az elegyet 37 °C-on 10 percen keresztül inkubáltuk, majd 9 térfogategységnyi 1%-os trifluorecetsav (TFA) hozzáadásával állítottuk le a reakciót. A mintákat autoinjektorral Nova-Pak C18 reverz-fázisú kromatográfiás oszlopra (Waters Associates, Inc.) injektáltuk, a szubsztrátok és a termékek elválasztását 0-100%-os víz-acetonitril gradiens alkalmazásával végeztük, 0,05%-os TFA jelenlétében. A peptideket 206 nm-en detektáltuk. A reakciókat 20%-nál alacsonyabb szubsztrát konverzió mellett vizsgáltuk. A kinetikai paraméterek meghatározását a 3.14-es fejezetben leírtak szerint végeztük. Az aktív enzim koncentrációjának meghatározása (22,05 nM) a 3.13-as fejezetben leírt körülmények között történt, a hasítási reakciók az

oligopeptid szubsztrát (0,47 mM) mellett amprenavirt is tartalmaztak (1-80 nM).

3.21. A fluoreszcens fehérjék PAGE vizsgálata és gélben történő renaturációja

A tisztított rekombináns szubsztrátokat és hasítási termékeket natív vagy nátrium-dodecil-szulfátot (SDS) tartalmazó PAGE módszerrel vizsgáltuk 14 %-os szeparáló és 4 %-os tömörítő gél használatával. A denaturáló PAGE esetében az elválasztást követően a gél legalább 30 percen keresztül vízben ráztattuk szobahőmérsékleten, hogy eltávolítsuk belőle az SDS-t, és ezáltal renaturáljuk a fluoreszcens fehérjéket. Ezzel szemben, a nem-denaturáló körülmények között elvégzett PAGE-t követően az elválasztott fehérjék természetes állapotukban maradtak, így a mosási lépés kihagyható volt. A fluoreszcens fehérjéket a festetlen gélben kék vagy UV hullámhosszú fénnel illumináltuk (AlphaImager gél dokumentációs rendszer, ProteinSimple). A gélek festéséhez PageBlue Protein Staining Solution-t alkalmaztunk, a detektált sávok intenzitásainak meghatározását a ImageJ 1.43 program és a GelAnalyzer 2010a programmal (www.gelalyzer.com) Dr. Mótyán János András végezte.

4. EREDMÉNYEK ÉS DISZKUSSZIÓ

4.1. Az expressziós vektor rendszer

Az „üres” pDEST-His₆-MBP-FP plazmidokat Gateway klónozó technológiával állítottuk elő. Ezek a plazmidok egy klónozó kazettát kódolnak, mely 5' végével egy His₆-MBP fúziós címkét, valamint egy a TEV PR hasítási szekvenciát kódoló DNS szakaszhoz kapcsolódik, valamint 3' végén egy FP-kódoló DNS szakaszhoz (ECFP, mTurquoise2, EGFP, mEYFP, mApple vagy mCherry) van hozzákapcsolva. Közös eredetüknek köszönhetően, a különböző FP-k gyakran azonos terminális szekvenciákat hordoznak, így az általunk tervezett N1 és C primerek minden olyan FP-k felszorzosítására is alkalmasak, melyek 5' és 3' szekvenciája megegyezik az EGFP-ével. A klónozó kazetta a *PacI* és *NheI* restrikciós endonukleázok hasítási szekvenciáját tartalmazza, ami lehetővé teszi a vizsgálni kívánt hasítási helyet kódoló DNS szekvencia ligálással történő beillesztését. A beillesztendő duplaszálú DNS szekvenciák létrehozhatóak akár (i) random mutagenézissel, vagy (ii) *E. coli*-kodon optimalizált, komplementer oligonukleotid primerek hibridizációjával. A klónozó kazettának köszönhetően a különféle szekvenciák egy egyszerű egy-lépéses PCR-val beilleszthetők az „üres” expressziós vektorba. A kívánt hasítási szekvenciát tartalmazó fluoreszcens fúziós szubsztrátok olcsó és hatékony előállítására révén lehetőség van szubsztrát könyvtárak létrehozására is. Fontos megjegyezni, hogy az N-terminális His₆ és MBP fúziós címkék, valamint a C-terminális fluoreszcens fehérje nem ugyanabba a leolvasási keretbe illeszkednek, ezért a megfelelően megtervezett duplaszálú DNS szakaszok beillesztése nélkül nem fejeződnek ki, csak sikeres ligációt követően expresszálódik a teljes hosszúságú fehérje.

4.2. Rekombináns fluoreszcens fúziós fehérje szubsztrátok

A rekombináns fúziós fehérje szubsztrátok tartalmaznak egy N-terminális His₆-MBP fúziós címkét, amit a TEV PR és a vizsgálni kívánt proteáz hasítási szekvenciái követnek, míg a C-terminálison egy FP variáns található. A His₆ fúziós címkén keresztül a szubsztrátot immobilizálni lehet különböző fémkeláttal burkolt felszíneken, továbbá lehetővé teszi a fehérjék immobilizált fém affinitás kromatográfiával (IMAC) történő tisztítását is. Az MBP fúziós fehérje növeli a vízzoldékonyságot és elősegíti a beillesztett fehérje megfelelő feltekeredését. A TEV PR hasítóhely egyfajta belső kontroll hasítási helyként szolgál, de alkalmassá teszi a szubsztrátot TEV PR aktivitás vizsgálatokra is. A

szubsztrát aggregációjának elkerüléséhez a vizsgálatok során a monomer FP-
ket tartalmazó konstruktokat (mTurquoise2, mEYFP, mApple és mCherry)
használtunk, de a módszer flexibilitása lehetővé teszi a kísérleti célokhoz és
eszközökhöz legmegfelelőbb FP forma alkalmazását is.

A rekombináns szubsztrátokat sikeresen expresszáltattuk *E. coli* BL21(DE3)
sejtekben 50 mL-es léptékben. Emellett az expressziót 15 mL végtérfogatra is
optimalizáltunk a 96-lyukú mikrotiter lemez-alapú specificitási vizsgálatokhoz.
Mivel néhány, *E. coli* által expresszált FP hosszú érési idővel rendelkezik, ezért
a feltekeredés elősegítése (ezáltal a szubsztrátoldat fluoreszcenciájának
növelése) érdekében a transzlációt az expresszió során tetraciklin kezeléssel
leállítottuk, így jártunk el a VEEV nsP2pro-2 kinetikai méréseihez használt
mEYFP-fuzionált szubsztrátok expressziója során is.

A sejteket natív körülmények között lizáltuk, és az oldott szubsztrátokat
tartalmazó sejtlyázátumot közvetlenül alkalmaztuk a Ni-NTA mágneses agaróz
gyöngy-alapú proteáz vizsgálatok mintaelőkészítéshez, vagy a szubsztrátok
tisztítására. A tisztított szubsztrátok felhasználhatóak kalibrációra, oldatban
történő hasításokhoz és/vagy PAGE vizsgálatokhoz.

4.3. Ni-NTA mágneses gyöngy-alapú proteáz vizsgálati módszer

A His₆-fúziós címkén keresztül a nikkel-kelát felületű gyöngyökhöz
kapcsolt szubsztrátok a vizsgálni kívánt proteázzal emészthetőek. Az
immobilizációs kölcsönhatás erős természetének köszönhetően a módszer
jellemzője a szennyező fehérjék viszonylag alacsony szintje és a magas jel-zaj
arány. A hasítást követően az N-terminális hasítási termékek és a hasítatlan
szubsztrátok egyaránt a gyöngyök (SAMB) felületéhez kötve maradnak, míg a
C-terminális fluoreszcens termékek a felülúszóba kerülnek, és a gyöngyök
szeparációja után nagy érzékenységgel detektálhatóak.

A kidolgozott vizsgálati módszer hat fő lépésből áll. (i) A rekombináns
szubsztrátok immobilizálása SAMB szuszpenzió készítéséhez, mely tisztított
fehérje vagy sejtlyázátum használatával egyaránt történhet. Számos mosási lépést
követően a SAMB szuszpenziók felhasználásával összeállíthatóak a vizsgálati
minták. (ii) A hasítási reakciók indítása a proteáz hozzáadásával történik, mely
hatására a proteolitikus fragmensek a felülúszóba kerülnek. (iii) A hasítási
reakció leállítása a felülúszó mágneses gyöngyöktől való eltávolításával történik.
Az így elkülönített felülúszó csak a fluoreszcens hasítási termékeket és az
enzimet tartalmazza. (iv) A felülúszó átmérése egy mikrotiter lemez lyukaiba,
majd a minták fluoreszcenciájának mérése. (v) A szubsztrátok kalibrálása, a

vizsgálati minták pufferközegeiben oldott tisztított szubsztrátokból. (vi) A kiindulási szubsztrát és a keletkezett termék koncentrációjának meghatározása a felvett kalibrációs egyenesek meredekségei alapján.

A kidolgozott vizsgálati módszerben 3-féle mintatípust különítünk el. (i) reakció minta (R), mellyel a hasítás során keletkező terméket detektáljuk; (ii) a szubsztrát vak minta (B), mellyel a reakció során spontán disszociálódott szubsztrát mennyiségét mérjük; és (iii) a szubsztrát kontroll minta (C), mely alapján a reakcióközegben lévő szubsztrát koncentrációját állapíthatjuk meg.

A kalibrációt azért végezzük, hogy pontosan meg tudjuk állapítani a bevitt fluoreszcens szubsztrát és keletkezett termék mennyiségét. A kísérleteink során alkalmazott koncentráció tartományban az RFU értékek egyenes arányban változtak a szubsztrátkoncentrációval. Azonos C-terminális FP-vel rendelkező és azonos körülmények között kezelt szubsztrátokon elvégzett kalibrációk meredekségeiből számolt variancia koefficiens (CV%) értéke 15% alatt volt.

A kidolgozott módszer alapelvét korábban már alkalmazták hasonló proteáz vizsgálati technikákban, azonban az általunk kifejlesztett rendszer mégis egy újszerű proteáz vizsgálati eszközt nyújthat, mivel nemcsak magába foglalja a korábbi módszerek által kínált előnyöket, hanem részben továbbfejleszti azokat, növelve ezzel a módszer hatékonyságát. Teszi ezt azért, hogy valós elválasztáson alapul és lehetőséget kínál kinetikai paraméterek meghatározására is, melyet egy részletes szubsztrát kalibrációs folyamat támogat. A kifejlesztett módszer alacsony térfogatra optimalizált és nagy áteresztőképességű vizsgálati platformra adaptálható.

4.4. PAGE analízis és gélben történő renaturálás

A szubsztrátok és a keletkező termékek natív vagy redukáló PAGE módszerrel is vizsgálhatóak, a Ni-NTA mágneses gyöngy-alapú módszer alkalmazása és oldatban történő hasítást követően egyaránt. Kísérleteink során a HIV-1 PR, TEV PR és a VEEV nsp2pro-2 hasítási reakciókat vizsgáltuk. A mintaelőkészítést denaturáló és nem-denaturáló körülmények között is elvégeztük. A nem-denaturáló körülményekkel ellentétben a denaturáló mintaelőkészítés során SDS-t és β -ME-t is használtunk, illetve a mintákat a PAGE előtt hőkezelésnek vetettük alá.

A nem-denaturált minták esetében a fehérjék fluoreszcenciája a PAGE után szabad szemmel közvetlenül detektálható volt, illetve kék vagy UV fénnel történő illumináció után is. A denaturáló körülmények (SDS, β -ME és hő) hatására a fluoreszcens fehérjék is kitekerednek (denaturáció), így

fluoreszcenciájuk nem detektálható közvetlenül a PAGE után. Tapasztalataink alapján ezek a fehérjék képesek az ismételt feltekeredésre (renaturáció). A gélből desztillált vízzel történő mosással az SDS-t eltávolítottuk, így a fluoescens fehérjék részlegesen visszanyerték fluoreszcenciájukat. A gélben való renaturáció hatására a festetlen gélben az FP fluoreszcenciája ismét detektálhatóvá vált. Különbségeket tapasztaltunk az mApple és mTurquoise2 fehérjék újrafeltekeredési képességei között: az mTurquoise2 lényegesen jobb 'renaturációs' hajlamot mutatott, mint az mApple. A denzitometriás adatok alapján a renaturált mTurquoise2 sávintenzitása legalább 50%-os volt a nem-denaturáltéhoz képest. Ezzel szemben az mApple esetében ez az érték kb. 10%-os volt, mely UV illuminálás során volt detektálható. Az mApple (és a legtöbb dsRed-ből származtatott FP) piros színéért részben felelős acil-imine kötés a denaturáció során irreverzibilisen megszakadhat, mely magyarázhatja az mApple és mCherry esetében tapasztalt alacsony újrafeltekeredési képességet.

A denaturáló körülmények alkalmazásával ellentétben, a nem-denaturáló feltételek mellett előkészített minták esetében a hasítási termékek nem váltak el teljesen egymástól. A fehérje denaturáció/renaturáció előnye, hogy a hasítási termékeket el tudjuk választani a molekulatömegüknek megfelelően, mivel természetes töltésük és alakjuk nem befolyásolja az elválasztást, ugyanakkor a renaturáció után a megfelelő sávok beazonosíthatóak a fluoreszcenciájuk alapján. Ez nagyon hasznos lehet olyan esetekben amikor a fluoreszcenciával nem rendelkező termékek vagy szennyezők, a fluoescens termékekkel megegyező vagy ahhoz nagyon hasonló molekulatömeggel rendelkeznek. A denaturált hasítási termékek elválasztásával viszonylag kis különbségeket (kb. 2 kDa) is tudunk detektálni, ami fontos lehet olyan esetben, amikor a hasítás alternatív helyeken is bekövetkezik.

4.5. Általános módszerleírás és képi anyag elkészítése

Annak érdekében, hogy segítsük a kidolgozott vizsgálati módszer elsajátítását és sikeres alkalmazását, elkészítettünk egy oktatóvideót külön hangsúlyt fektetve a kritikus lépésekre. A képi anyag és a hozzá kapcsolódó részletes, írásos kísérleti protokoll az alábbi linken található meg: <https://www.jove.com/video/58824/use-recombinant-fusion-proteins-fluorescent-protease-assay-platform>.

4.6. A HIV-1 PR kinetikai és gátlási vizsgálati

Annak igazolására, hogy a kifejlesztett vizsgálati platform alkalmas enzimkinetikai paraméterek meghatározására, idő- és szubsztrátfüggő kinetikai

méréseket végeztük a HIV-1 PR felhasználásával, mTurquoise2- és mApple-kapcsolt szubsztrátokon. Az időfüggő kinetikai mérések eredményei alapján a fluoreszcens termékek képződése közel lineáris volt a vizsgált időtartományban, a szubsztrátfüggő kinetikai mérésekben alkalmazott legkisebb szubsztrátkoncentráció alatt. A hasítási reakciók jellemzéséhez és összehasonlításához a szubsztrátfüggő vizsgálatok adataiból kinetikai paramétereket számoltunk. A HIV-1 PR-ra meghatározott k_{cat}/K_M értékek az mApple és mTurquoise2 szubsztrátokon nagymértékben hasonlítanak egymásra ($18,5 \pm 1,40 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ és $19,69 \pm 0,14 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$) míg az individuális k_{cat} and K_M értékek lényegesen különböznek.

A mágneses gyöngy-alapú vizsgálati rendszerrel meghatározott HIV-1 PR kinetikai paramétereket összehasonlítottuk a szintetikus oligopeptid szubsztrátokat használó RP-HPLC-alapú módszerrel kapott értékekkel ($15,94 \pm 4,82 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$) és azt találtuk, hogy a meghatározott k_{cat}/K_M értékek ez esetben is nagyon hasonlóak voltak. Ugyanakkor az individuális kinetikai paraméterek jelentősen magasabbak voltak a szintetikus oligopeptid szubsztrátok esetében, melyet a szubsztrátok eltérő konformációs sajátosságaival lehet magyarázni. Az oligopeptid szubsztrátok a kötőhelyet egy kitekeredett formában reprezentálják, ezzel ellentétben a rekombináns fúziós fehérje szubsztrátok esetében a hasítási helyet tartalmazó régiók eltérő konformációs állapotokat vehetnek fel, flexibilitásukat, így a hasítóhelyek hozzáférhetőségét a csatolt fehérjék is befolyásolhatják. Kutatócsoportunk korábbi vizsgálatai során a HIV-1 PR VSQNY↓PIVQ oligopeptid szubsztráton mért specificitási konstans $45,3 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ értéknek adódott, ami magasabb az általunk meghatározott értéknél. Ennek oka lehet, hogy a korábbi méréseket nagyobb ionerősség (2M NaCl) és alacsonyabb pH (5,6) mellett végezték, míg méréseinkben ettől eltérő körülményeket alkalmaztunk (300 mM NaCl, pH 7,0) a Ni-NTA mágneses gyöngyök optimális működése érdekében. A kinetikai paraméterek meghatározásához alkalmazott aktív enzim koncentrációt az amprenavirral történt gátlási vizsgálatok alapján határoztuk meg. Az amprenavir hatását az HIV-PR aktivitására His₆-MBP-VSQNY↓PIVQ-mTurquoise2 rekombináns fehérje és VSQNY↓PIVQ oligopeptid szubsztrátokon egyaránt teszteltük. A Ni-NTA mágneses gyöngy-alapú gátlási vizsgálatok adataira illesztett dózis-hatás görbe alapján meghatároztuk az IC₅₀ (21,43 nM) és K_i értékeket (6,75 nM).

4.7. A TEV PR kinetikai és pH-függő mérései

A TEV PR kinetikai méréseit His₆-MBP-VSQNY↓PIVQ-mTurquoise2 és -mApple szubsztrátokon végeztük. A meghatározott specificitási konstansok a különböző szubsztrátokon közel azonosnak bizonyultak ($2,08 \pm 0,26 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ és $1,81 \pm 0,35 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$) illetve a Kapust és mtsai (2002) által korábban szintetikus oligopeptid szubsztrátokon meghatározott értékekkel is nagyon hasonlóak voltak ($3,08 \pm 0,67 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Ezzel szemben az individuális kinetikai paraméterek jelentősen különböztek az eltérő szubsztrát típusok között, ami ez esetben is a különböző típusú szubsztrátok konformációs különbségével magyarázható. Továbbá, a reakciókörülmények közötti különbségek szintén hozzájárulhatnak a kinetikai paraméterek között tapasztalt eltérésekhez, ugyanis az oligopeptid-alapú vizsgálatot magasabb ionerősség (400 mM NaCl) és redukáló ágensek jelenlétében végezték, míg a Ni-NTA mágneses gyöngy-alapú módszer esetében az ionerősség alacsonyabb volt (300 mM NaCl) és a pufferközeg nem tartalmazott redukáló ágenseket.

A TEV PR-on végzett kísérletek kitűnő lehetőséget adtak arra, hogy a Ni-NTA mágneses gyöngy-alapú módszer alkalmazhatóságát különböző pH körülmények között is demonstráljuk. A TEV PR aktivitását pH 6,0-8,5 közötti tartományban vizsgáltuk. A Parks és mtsai (1995) által közölt eredményekkel összhangban nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a pH 6,5 és pH 8,5 közötti tartományban a pH 7,0 értéken mért kezdeti sebességhez képest. Tapasztalataink alapján a Ni-NTA gyöngyök és a His₆ fúziós címkével kapcsolt szubsztrát közötti kölcsönhatás jelentősen gyengül pH 6,0 értéken, és a gyártói leírásnak is megfelelően ezen a pH értéken az intakt szubsztrát nagymértékű (> 15%) disszociációját tapasztaltuk.

4.8. A különböző VEEV PR konstruktokat kódoló expressziós vektorok

Munkánk célja a VEEV nsP2pro-1-hez képest magasabb aktivitást mutató VEEV PR forma előállítás volt, ezért olyan expressziós plazmidokat hoztunk létre, melyek két új VEEV PR konstruktot kódoltak. (i) Az egyik a majdnem teljes hosszúságú VEEV nsP2 fehérjeszekvenciát kódolta (Gly1-Thr785). Das és mtsai (2014) korábbi eredményei arra utaltak, hogy a Chikungunya vírus nsP2 proteolitikus aktivitása feltételezhetően függ mind az N- és C-terminális doméntól és elképzelhető, hogy a két domén között valamilyen funkcionális kölcsönhatás van. (ii) A másik, általunk VEEV nsP2pro-2-nek nevezett konstrukt, a Zhang és mtsai (2009) által expresszált nsP2pro-1 forma N-terminális meghosszabbítása a Ala436-Met457 régióval. Ez a régió tartalmaz

egy erősen konzervált szekvenciaszakaszt, és feltételezhetően a proteolitikus aktivitás szempontjából szerkezeti fontossággal bír. A N-terminális módosításán túl, mindkét konstrukt esetében a Thr785-nál termináltuk a szekvenciát.

Mind az VEEV nsP2 és a VEEV nsP2pro-2 formát kódoló nyitott leolvasási keretet sikeresen beklónoztuk pDEST-His₆ és pDEST-His₆-MBP expressziós vektorokba egyaránt.

4.9. Az VEEV PR konstruktok expressziója és tisztítása

A fehérjék Rozetta *E.coli* sejtekben történő expresszáltatása során azt tapasztaltuk, hogy az IPTG-vel történő indukció után (30 °C-on 4 órán keresztül rázatva) mind a His₆-, mind pedig a His₆-MBP-vel kapcsolt VEEV nsP2pro-2 formák nagymértékben kifejeződnek, azonban az alkalmazott körülmények között csak a His₆-MBP-vel kapcsolt forma bizonyult vízben oldhatónak. Ezek az eredmények összhangban vannak a korábban leírt eredményekkel, miszerint az N-terminálisan kapcsolt MBP-fúzió elősegíti a fehérje vízben való oldhatóságát és megfelelő fehérjeszerkezet kialakulását.

A VEEV nsP2 esetében sem a His₆- sem pedig a His₆-MBP-vel kapcsolt forma nem fejeződött ki nagymértékben és egyik konstrukt sem bizonyult vízoldékonnak, mely nem javult sem az expressziós hőmérséklet csökkentésének sem pedig az inkubálás meghosszabbításának hatására.

Mindezek alapján azt feltételezzük, hogy a His₆-kapcsolt forma gyenge oldhatósága az inherens szerkezeti tulajdonságok következménye, mely javítható lehet MBP-vel történő fúzióval, ahogyan azt a His₆-MBP-VEEV nsP2pro-2 esetében is tapasztaltuk. Azonban a His₆-MBP-VEEV nsP2 fehérje viszonylagosan nagy mérete miatt (~131 kDa) feltehetően elnyomja az MBP kedvező hatását és gátolja az nagymértékű expressziót a kísérleteinkben alkalmazott körülmények esetén.

A VEEV nsP2pro-2 fehérjét sikeresen kitisztítottuk a His₆-MBP-kapcsolt fúziós formából, a Zhang és mtsai (2009) által az nsP2pro-1 esetében leírt a tisztítási körülmények és laboratóriumi eszközök alkalmazásával. A végterméket az SDS-PAGE vizsgálatok után min. 95%-os tisztaságúnak ítéltük.

4.10. A VEEV nsP2pro-2 specifictási vizsgálatai

A VEEV nsP2pro-2 aktivitását olyan His₆-MBP-mEYFP szubsztrátokon vizsgáltuk, melyek a vad típusú SFV-1 hasítóhelyet (EYHAGA↓GVVETP) vagy annak különböző variánsait tartalmazták.

A hasítóhelyhez közeli elhelyezkedése miatt, a P1' pozícióban lévő Gly oldallánc fontosságát átfogóbban vizsgáltuk. Ebben a pozícióban az összes lehetséges természetes aminosavcsere hatását teszteltük, így összesen 19 P1'-módosított szubsztrátot hoztunk létre. A más alfavírus törzsekben előforduló természetes hasítási szekvenciák alapján további variánsokat is előállítottunk: P5-Gln, P4-Glu, P4-Thr, P4-Arg, P4-Gly, P2-Ala, P2-Val, P1-Gly, P1-Val, P2'-Pro, és P2'-Ser.

A különböző szubsztrát variánsok hasíthatóságát a vad típusú SFV-1 szekvenciát tartalmazó szubsztráthoz viszonyítva határoztuk meg. A 96-lyukú mikrotiter lemez-alapú vizsgálatok során mindegyik P1' variáns esetében lényegesen alacsonyabb szubsztrát konverziót tapasztaltunk a vad típushoz képest. A P4-Gln és P4-Thr variánsok esetén a szignifikánsan magasabb szubsztrát konverziót detektáltunk a vad típushoz képest, míg a P4-Arg és a vad típus közötti különbség nem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak. A konverziós értékek a vad típushoz viszonyított kismértékű csökkenését tapasztaltuk a P4-Gly, P1-Gly, P2'-Pro és P2'-Ser variánsok esetében, míg a P5-Gln, P2-Ala, P2-Val és P1-Val mutáns szubsztrátok esetében csupán elhanyagolható mértékű konverziót tapasztaltunk. Mindezen esetekben a különbségek statisztikailag szignifikánsnak bizonyultak. Az egytényezős ANOVA és a párosítatlan t-próba minden vizsgált esetben egymással megegyező eredményt hozott. A kapott eredmények egy beküldés előtt álló kézirat részét képezik, a kísérletes eredményeket az enzim-szubsztrát komplexek *in silico* szerkezeti analízisével kívánjuk értelmezni, mely vizsgálatok Dr. Mótyán János András munkájának részét képezik.

4.11. VEEV nsP2pro-2 kinetikai vizsgálatai

Sikeresen meghatároztuk a VEEV nsP2pro-2 proteázra vonatkozó k_{cat} , K_M és k_{cat}/K_M értékeket a vad típusú, valamint P4-Glu, P4-Thr, P4-Ala, P4-Gly, P1-Gly, P1'-Thr vagy P2'-Ser variánsokat tartalmazó His₆-MBP-SFV-1-mEYFP rekombináns szubsztrátokon.

A mikrotiter lemez-alapú specificitási vizsgálat eredményeivel összhangban, a legmagasabb katalitikus aktivitást a P4-Gln variáns esetében mértük (kb. 5-szörös különbség a vad típushoz képest). A P4-Thr és P4-Arg mutánsokon az enzim hasítási hatékonysága vad típusú szubsztráthoz viszonyítva kb. 3,7-szer és 1,7-szer nagyobb volt, habár a P4-Arg esetében ez a különbség nem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak. A P4-Gly, P1-Gly, és P2-Ser variánsokra meghatározott k_{cat}/K_M értékek a vad típusra kapott k_{cat}/K_M

érték alsó hibahatárába esnek, és hasonlóknak bizonyultak. Ezzel szemben a P1'-Thr mutáns esetében a proteáz katalitikus hatékonyságát megközelítőleg 4-szer alacsonyabbnak mértük a természetes szekvenciához képest, és ez a különbség statisztikailag szignifikáns volt.

A vad típusú szubsztráton meghatározott kinetikai paramétereket összehasonlítottuk a VEEV nsP2pro-1 esetében közölt irodalmi adatokkal (Zhang és mtsai, 2009; Hu és mtsai, 2016). A korábban publikált és az általunk meghatározott K_M értékek közötti különbség nagy valószínűséggel az alkalmazott szubsztrátok szerkezeti különbségeiből fakad, ugyanúgy, ahogyan azt a TEV PR és a HIV-1 PR kinetikai mérésekben is tapasztaltuk. A k_{cat} és k_{cat}/K_M értékek nem teljesen összehasonlíthatóak, ugyanis jelenleg nincs a proteázra olyan elérhető szelektív inhibitor, amivel az aktív enzim titrálások elvégezhetőek lettek volna. Azonban, az alkalmazott reakciókörülmények között 100%-os enzim aktivitást feltételezve a k_{cat}/K_M értékek azonos nagyságrendbe esnek, ami azt sugallja, hogy a vizsgált VEEV nsP2pro konstruktok katalitikus hatékonysága megegyező azokon a különböző szubsztrát-típusokon, melyek a vad típusú SFV-1 hasítási helyet reprezentálják. Az eredmények azt mutatják, hogy a VEEV nsP2pro-1 Ala436-Met457 szegmenssel történő N-terminális meghosszabbítása nem okoz érdemi változást a VEEV proteáz *in vitro* aktivitásában.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk célja egy rekombináns fehérje szubsztrátokra optimalizált Ni-NTA mágneses gyöngy-alapú fluoreszcens proteáz vizsgálati módszer kifejlesztése és alkalmazása volt. Az tervezett szubsztrátok tartalmaznak egy N-terminális His₆ és egy MBP fúziós címkét, a TEV PR és a vizsgálni kívánt proteáz hasítási szekvenciáját, valamint egy C-terminális fluoreszcens fehérjét (FP). A szubsztrátokat expresszáló vektorba egy klónozó kazettát terveztünk, mely lehetővé teszi a vizsgálni kívánt hasítási szekvenciát kódoló, rövid DNS szakaszok egylépésben történő beillesztését.

A mágneses gyöngyhez immobilizált szubsztrátok alkalmazhatóságának igazolására enzimkinetikai, gátlási és pH optimum meghatározási vizsgálatokat végeztünk a TEV és HIV-1 PR-okra. A mikrocső-alapú mérésekhez kidolgozott módszert mikrotiter lemezre is optimalizáltuk. A fluorimetriás mérések mellett kidolgoztunk egy eljárást, mellyel a redukáló körülmények között végzett SDS-poliakrilamid gél elektroforézist követően a denaturált FP-k a gélben renaturálhatóak, majd a fluoreszcencia alapján detektálhatóak. A különböző FP-k újrafeltekeredési képessége eltérő volt. A mágneses gyöngy-alapú és a gél elektroforézissel történő vizsgálatokhoz egy részletes módszerleírást, valamint egy kapcsolódó oktatóvideót készítettünk. A kifejlesztett vizsgálati módszer tovább optimalizálható nagy áteresztőképességű és automatizált mérésekhez, és alkalmazható proteáz szubsztrátok azonosítására, gátlószerek vizsgálatára.

Célunk volt továbbá egy katalitikusan hatékonyabb VEEV PR enzimforma létrehozása is. A kifejlesztett módszert alkalmazva vizsgálatuk a létrehozott VEEV nsP2pro-2 proteáz *in vitro* aktivitását és specifitását. Ehhez olyan His₆-MBP-mEYFP rekombináns szubsztrátokat hoztunk létre, melyek az SFV-1 (EYHAGA↓GVVETP) hasítóhely vad típusú, illetve P5, P4, P2, P1, P1', vagy P2' variánsait tartalmazták. A vad típusú szubsztrát és hét variánsa esetében enzimkinetikai paramétereket is meghatároztunk. A mérések alapján a VEEV nsP2pro-2 enzimforma a P4-Gln és P4-Thr variánsokat szignifikánsan jobban, míg a P1'-Thr variánst szignifikánsan kisebb hatékonysággal hasította a vad típusú szubsztráthoz képest, míg a P4-Arg, P4-Gly, P1-Gly és P2'-Ser mutánsok esetében nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget. VEEV nsP2pro-2 nem bizonyult hatékonyabbnak a korábban már vizsgált VEEV nsP2pro-1 formához képest, azonban a specifitási vizsgálatok eredményei hozzájárulhatnak a további, alfavírusokat vagy egyéb IV. genetikai csoportba tartozó vírusokat célzó kutatásokhoz.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsőként szeretném őszinte köszönetemet kifejezni témavezetőmnnek, Dr. Tőzsér József professzor úrnak, amiért lehetőséget adott arra, hogy a Retrovirális Biokémiai Kutató Laboratórium kutatócsoportjában dolgozhassak és amiért folyamatos támogatásával, szemléletmódjával és hatalmas tudása által értékesen támogatta a munkámat.

Ezentúl, hálával tartozom, a 'legjobb laboros cimborámnak' Dr. Mótyán János Andrásnak, az értékes útbaigazításokért, remek ötleteiért, humoráért és a folyamatos támogatásáért a labor asztaltól a tudományos közlemények megjelenéséig.

Továbbá szeretnék külön köszönetet mondani a szerzőtársaimnak köztük Dr. Tóth Ferencnek a HIV-1 proteáz expressziós és tisztítási munkáinak elvégzéséért, Gazda Livia Diánának és Miczi Máriaónak a kinetikai és PAGE vizsgálatok kivitelezésében nyújtott segítségért.

Szeretném kifejezni hatalmas köszönetemet Dr. David S. Waugh-nak a közös munkáért és hogy lehetőséget adott a Campus Hungary Program TÁMOP-4.2.4B/2-11/1-2012-0001 által támogatott rövid kutatómunkára az általa vezetett Molekuláris Krisztallográfiás Laboratóriumban (NCI, MD, USA). Az ott töltött idő alatt végeztem a VEEV nsP2 és VEEV nsP2pro-2 enzimkonstruktok klónozási, expressziós és fehérjetisztítási munkáit.

Szeretném megköszönni Dr. Bácsi Attila professzor úrnak a lehetőséget, hogy a fluoreszcens méréseim során az Immunológiai Intézet Biotek Synergy2 készülékét használhattam, illetve Multimédia és E-learning Technikai Központ munkatársainak Zsadányi Györgynek, Tőgyi Balázsnak, Pöstényi Balázsnak és Király Zoltánnak a hang és képi anyag elkészítésében nyújtott szakmai segítséget.

Őszinte köszönetemet szeretném kifejezni a Retrovirális Biokémiai Kutató Laboratórium kollégáinak, akik az első pipettázásaimtól kezdve támogattak. Köszönöm Janics-Pető Szilviának, Dr. Matúz Krisztinának, Dr. Kádas Jánosnak és Golda Máriának a felbecsülhetetlen ötletbörzékét, csevegéseket, és a segítséget.

Hálával tartozom továbbá a Richter Gedeon Nyrt. munkatársainak, különösen Dr. Urbányi Zoltánnak, Dr. Megyeri Mártonnak és Dr. Bogsch Eriknek a folyamatos biztatásért és az egyetemi munkáim kapcsán tanúsított rugalmasságaikért.

A családom támogatása nélkül nem tudtam volna megvalósítani ezt a munkát, ezért különösen köszönöm a férjemnek, Csontos Kornélnak és gyermekeinknek Gergőnek és Patriknak, hogy támogatták a kutatói munkámat, még akkor is, ha emiatt távol kellett lennem Tőlük. Hálával tartozom édesanyámnak, a testvéremnek, édesapámnak, valamint a férjem szüleinek a folyamatos biztatásért és amiért mindig vigyáztak a kisfiaimra a nehezen kiszámítható időbeosztásom ellenére is.

Végül, de nem utolsó sorban, a dolgozatomat a nagyszüleimnek, Papp Sándornak és Sápi Juliannának ajánlom, a belém vetett soha véget-nem-érő hitükért, az élethez való példaértékű hozzáállásukért és a hihetetlenül inspiráló erejükért.

Munkámat anyagilag támogatta az Országos Tudományos Kutatási Alap és a GINOP-2.3.2-15-2016-00044 “PHARMPROT teaming” projekt.



Registry number:

DEENK/375/2019.PL

Subject:

PhD Publikációs Lista

Candidate: Beáta Bozóki

Neptun ID: SDC8DN

Doctoral School: Doctoral School of Molecular Cellular and Immune Biology

List of publications related to the dissertation

1. **Bozóki, B.**, Gazda, L., Tóth, F., Miczi, M., Mótán, J. A., Tózsér, J.: A recombinant fusion protein-based, fluorescent protease assay for high throughput-compatible substrate screening.
Anal. Biochem. 540-541, 52-63, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2017.11.001>
IF: 2.507
2. **Bozóki, B.**, Mótán, J. A., Miczi, M., Gazda, L., Tózsér, J.: Use of Recombinant Fusion Proteins in a Fluorescent Protease Assay Platform and Their In-gel Renaturation.
JoVE. 143, 1-15, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3791/58824>
IF: 1.108





List of other publications

3. Mótyán, J. A., Miczi, M., **Bozóki, B.**, Tőzsér, J.: Data supporting Ni-NTA magnetic bead-based fluorescent protease assay using recombinant fusion protein substrates.
Data in Brief. 18, 203-208, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dib.2018.03.031>
4. Bagossi, P., Bander, P., **Bozóki, B.**, Tőzsér, J.: Discovery and significance of new Human T-lymphotropic viruses: HTLV-3 and HTLV-4.
Expert Rev. Anti. Infect. Ther. 7 (10), 1235-1249, 2009.
IF: 2.857

Total IF of journals (all publications): 6,472

Total IF of journals (publications related to the dissertation): 3,615

The Candidate's publication data submitted to the iDEa Tudóstér have been validated by DEENK on the basis of the Journal Citation Report (Impact Factor) database.

20 November, 2019

