

# **DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

## **A Ty1 retrotranszpozon proteáz enzimatiskus sajátságainak és humán tripszinek gátolhatóságának vizsgálata**

**Gazda Lívía Diána**

**Témavezető: Dr. Tózsér József**



**DEBRECENI EGYETEM**

**MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIAI DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2023**

## Tartalomjegyzék

<b>RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE</b> .....	<b>5</b>
<b>1. BEVEZETÉS</b> .....	<b>7</b>
1.1 <i>A Ty1 retrotranszpozon eredetű proteáz karakterizálása</i> .....	7
1.2 <i>A humán tripszin izoformák szulfatálásának hatása és szekretálódó SPINK1 mutációk vizsgálata</i> .....	8
<b>2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS</b> .....	<b>9</b>
2.1 <i>A proteázokról általában</i> .....	9
2.2 <i>Aszpartil proteázok</i> .....	10
2.2.1 <i>Az aszpartil proteázok csoportosítása</i> .....	10
2.2.2 <i>Az aszpartil proteázok hatásmechanizmusa</i> .....	12
2.2.3 <i>Aszpartil proteáz gátlószerek</i> .....	13
2.3 <i>A retrotranszpozonok</i> .....	16
2.3.1 <i>A Ty1 retrotranszpozon genomja és életciklusa</i> .....	16
2.3.2 <i>A retrotranszpozon eredetű proteázok</i> .....	19
2.4 <i>Szerin proteázok</i> .....	20
2.4.1 <i>A szerin proteázok osztályozása</i> .....	20
2.4.2 <i>A szerin proteázok hatásmechanizmusa</i> .....	23
2.4.3 <i>A szerin proteázok gátlószerei</i> .....	24
2.5 <i>A hasnyálmirigy</i> .....	25
2.5.1 <i>A hasnyálmirigy és az általa termelt proteázok</i> .....	25
2.5.2 <i>A hasnyálmirigy-gyulladás és genetikai háttere</i> .....	26
2.6 <i>A humán tripszinogének</i> .....	28
2.6.1 <i>A humán tripszinogének izoformái</i> .....	28
2.6.2 <i>A tripszinek aktivitásának szabályozása</i> .....	30
2.7 <i>A SPINK1</i> .....	31
2.7.1 <i>A SPINK1 gén és mutációi</i> .....	31
2.7.2 <i>A SPINK1 fehérje</i> .....	34
2.7.3 <i>További SPINK fehérjék</i> .....	35
<b>3. CÉLKITŰZÉSEK</b> .....	<b>37</b>
<b>4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</b> .....	<b>38</b>
4.1 <i>A Ty1 proteáz vizsgálata</i> .....	38
4.1.1 <i>A Ty1 proteáz klónozása, expressziója és tisztítása</i> .....	38

4.1.2 A Ty1 proteáz azonosítása Western-blot módszerrel.....	39
4.1.3 Aktivitás mérések szintetikus oligopeptid szubsztrátokkal.....	39
4.1.4 A pH, NaCl koncentráció, hőmérséklet és urea hatása a Ty1 proteáz aktivitására...	40
4.1.5 A Ty1 proteáz gátlás vizsgálata.....	40
4.1.6 Fluoreszcens fehérje szubsztrátok klónozása, expressziója és tisztítása.....	41
4.1.7 A fluoreszcens fehérje szubsztrátok vizsgálata SDS gélelektroforézissel.....	42
4.1.8 A fluoerszcens szubsztrátok analízise gélelektroforézissel.....	43
4.1.9 Kinetikai mérések fluoreszcens fehérje szubsztrátokon.....	44
4.1.10 In silico analízis, a Ty1 proteáz modellezése.....	45
4.1.11 Minta előkészítés és Mátrix-asszisztált lézer deszorpciós, ionizációs, repülési idő mérésén alapuló tömegspektrometriatömegspektrometria (MALDI-TOF MS).....	46
<b>4.2 A SPINK1 vizsgálata.....</b>	<b>48</b>
4.2.1 Expressziós plazmidok.....	48
4.2.2 Sejtkultúrák és transzfekció.....	48
4.2.3 Western-Blot.....	49
4.2.4 A SPINK1 expressziója és tisztítása.....	49
4.2.5 A tripszinogén expressziója és tisztítása.....	50
4.2.6 Koncentráció meghatározások.....	50
4.2.7 Az egyensúlyi állandók meghatározása.....	51
4.2.8 Enzim asszociáció vizsgálata.....	51
4.2.9 Enzim disszociáció vizsgálata.....	52
<b>5. EREDMÉNYEK.....</b>	<b>54</b>
<b>5.1 A Ty1 proteáz vizsgálata.....</b>	<b>54</b>
5.1.1 A Ty1 proteáz klónozása, expressziója és tisztítása.....	54
5.1.2 Ty1 proteáz aktivitás esszé szintetikus oligopeptid szubsztrátokkal.....	55
5.1.3 Kinetikai mérések fluoreszcens fehérje szubsztrátokon.....	59
5.1.4 Hasítóhelyek azonosítása a rekombináns fluoreszcens szubsztrátokban.....	62
5.1.5 Ty1 proteáz gátolhatóságának vizsgálata.....	64
5.1.6 In silico vizsgálatok.....	65
<b>5.2 A SPINK1 vizsgálata.....</b>	<b>72</b>
5.2.1 Szekretálódó missens SPINK1 variánsok.....	72
5.2.2 A tripszin-SPINK1 komplex modellezése.....	73
5.2.3 A vad típusú és N34S SPINK1 kötődése a humán tripszinekhez.....	75
5.2.4 A tripszin átmeneti gátlása SPINK1 inhibitorral.....	79

5.2.5 A tripszin szulfatálás gyengíti a SPINK1 kötést.....	81
5.2.6 A SPINK1 Y43 szerepe a humán tripszinek kötésében.....	82
5.2.7 A misszensz SPINK1 mutánsok kötődése a natív human tripszinekhez.....	82
<b>6. MEGBESZÉLÉS.....</b>	<b>87</b>
6.1 A Ty1 proteáz biokémiai karakterizálása.....	87
6.2 A szekretálódó SPINK1 variánsok vizsgálata.....	89
<b>7. ÖSSZEFOGLALÁS.....</b>	<b>93</b>
<b>7. SUMMARY.....</b>	<b>94</b>
<b>8. IRODALOMJEGYZÉK.....</b>	<b>95</b>
<b>9. TÁRGYSZAVAK/KEYWORDS.....</b>	<b>112</b>
<b>10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....</b>	<b>113</b>
<b>11. FÜGGELÉK.....</b>	<b>114</b>

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ASPRV1	retrovírus-szerű aszpartil proteáz 1
BLV	marha leukémia vírus ( <i>Bovine leukemia virus</i> )
CA	kapszid fehérje
Ddi1	DNS károsodás által indukálódó protein ( <i>DNA damage-inducible protein 1</i> )
DMSO	dimetil-szulfoxid
DTT	ditiotreitól
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
HEK293T	humán embrionális vese sejtvonal
HIV	humán immundeficiencia vírus ( <i>human immunodeficiency virus</i> )
HIV-1 PR	I-es típusú humán immundeficiencia vírus proteáz
HFV	humán foamy vírus
HPLC	magasnyomású folyadékkromatográf
HTLV-1	1-es típusú humán T-sejtes leukémia vírus
HRP	tormaperoxidáz ( <i>horseradish peroxidase</i> )
IC <sub>50</sub>	50%-os gátláshoz tartozó inhibitor koncentráció
IN	integráz
IPTG	izopropil-β-D-tiogalaktopiranozid
k <sub>cat</sub>	katalitikus sebességi állandó
k <sub>cat</sub> /K <sub>M</sub>	specifitási állandó
K <sub>i</sub>	gátlási állandó
K <sub>M</sub>	Michaleis-Menten állandó
LTR	hosszú terminális ismétlődés ( <i>long terminal repeat</i> )
MA	mátrix fehérje
MALDI-TOF MS	mátrix-asszisztált lézer deszorpciós, ionizációs, repülési idő tömegspektrometria
MBP	maltóz-kötő fehérje ( <i>maltose-binding protein</i> )
MS	tömegspektrometria
NC	nukleokapszid fehérje
P1, P2, P3, P4, P5	szubsztrát aminosavrésze
PBS	foszfát-pufferelt sóoldat ( <i>phosphate-buffered saline</i> )

Pipes	piperazin-N, N'-bisz(2-etánszulfonsav)
pol	retrovírusok enzimjeit kódoló gén, polimeráz
PR	proteáz
S1, S2, S3, S4, S5	az enzim szubsztrátkötő helyei
SPINK1	Kazal 1-es típusú szerin proteáz inhibitor
TBS	Tris-pufferelt sóoldat ( <i>Tris-buffered saline</i> )
TTBS	0,05% Tween 20 detergenst tartalmazó TBS oldat
Tween20	polioxietilén (20)-szorbitán-laurát
Ty1 PR	Ty1 retrotranszpozon eredetű proteáz
UC <sub>50</sub>	50%-os disszociációhoz tartozó urea koncentráció
XMRV	xenotróp egér leukémia vírussal rokon vírus

# 1. BEVEZETÉS

A proteázok, peptidázok vagy proteinázok minden élő szervezetben megtalálhatóak, az emésztéstől a véralvadásig számos élettani folyamatban fontos szerepet töltenek be. A proteázok működési mechanizmusának megértése fontos mind az ipar mind az élettudományok, orvostudomány szempontjából.

## 1.1 A Ty1 retrotranszpozon eredetű proteáz karakterizálása

A Ty1 retrotranszpozon egy a számos *Saccharomyces cerevisiae* retrotranszpozon közül. A Ty1 retrotranszpozon életciklusa nagyon hasonló a retrovírusok életciklusához. A proteáz feladata a fehérje prekursor Gag-Pol poliprotein limitált proteolízise azaz feldarabolása strukturális fehérjékre és enzimekre. A retrovirális proteázok az antiretrovirális terápiának fontos célpontjai, ezért tanulmányozásuk kiemelten fontos. A retrovirális és retrovírus-szerű proteázok összehasonlító jellegű analízise segíthet megérteni azokat a mechanizmusokat, amik a proteáz inhibitorok ellen létrejött rezisztencia kialakulásában vesznek részt. Jelenleg a retrovírus-szerű, különösen a retrotranszpozon eredetű proteázokra vonatkozóan korlátozottan állnak rendelkezésre szerkezeti és biológiai információk.

Munkánk során a Ty1 retrotranszpozon eredetű proteáz (Ty1 PR) fő jellemzőit vizsgáltuk. A fehérje natív és His-fúziós formáit expresszáltuk *Escherichia coli* sejtekben, majd tisztítás után vizsgáltuk a rekombináns fehérjék aktivitását mesterséges oligopeptid és rekombináns fluoreszcens fehérje szubsztrátokon, amelyek a természetesen előforduló és módosított hasítóhelyeket tartalmazták. A proteáz aktivitását megvizsgáltuk különböző körülmények között, így eltérő pH-n, hőmérsékleten, különböző urea koncentráció, illetve változó NaCl koncentráció mellett egyaránt. Optimális körülmények mellett vizsgáltuk az enzim kinetikai paramétereit, valamint gátlási profilját különböző retrovirális proteáz inhibitorokkal. A Ty1 proteázt az I-es típusú humán immundeficiencia vírus proteáz (HIV-1 PR) ellen kifejlesztett és az antiretrovirális terápiában használt gátlószerek egyike sem gátolta. Homológ modellezéssel jósoltuk a Ty1 proteáz negyedleges szerkezetét, melyet felhasználtunk a kísérletes vizsgálatok eredményeinek értelmezéséhez, illetve a retrovirális és retrovírus-szerű proteázok sajátágaival való összehasonlításához is.

## 1.2 A humán tripszin izoformák szulfatálásának hatása és szekretálódó SPINK1 mutációk vizsgálata

A humán hasnyálmirigy számos emésztő enzimet választ ki, ezek között szerepel több proteáz és azok izoformái is, mint például a tripszin, a kimotripszin, az elasztáz és a karboxipeptidáz. Ezek úgynevezett zimogén formában szekretálódnak és csak később, a duodénumban alakulnak aktív formájukká limitált proteolízis által. Ha ez az aktiválási esemény idő előtt a hasnyálmirigyben történik meg, egy gyulladásos állapot, hasnyálmirigy-gyulladás alakul ki. A szervezet természetes szabályozó mechanizmusa a korai, nem kívánatos aktiválódás ellen egy hasnyálmirigy-eredetű tripszin inhibitor, a Kazal 1-es típusú szerin proteáz inhibitor (SPINK1) termelése és szekréciója a hasnyálmirigyben. Számos mutáns SPINK1 variánst hoztak összefüggésbe a hasnyálmirigy-gyulladás kialakulásával, ennek magyarázata a defektív tripszin-kötés és -gátlás lehet. A humán tripszin két fő izoformája a kationos és anionos tripszin. Ezen enzimek poszttranszlációs módosításon mennek keresztül, ami során a fehérje láncban a 154. pozícióban található tirozin oldallánca szulfatálódik, megváltoztatva ezzel az S2' szubsztrátkötő zsebet. Munkánk során vizsgáltuk a betegekben kimutatott különböző SPINK1 mutáns (N34S, N37S, K41N, I42M, P55S, R65Q és Q68R) fehérjék kötődését a szulfatált (azaz natív kationos) és az anionos tripszinhez, illetve azok rekombináns technikával előállított változatához. Vizsgáltuk továbbá a SPINK1 Y43A és Y43R mesterséges mutációk (betegekben nem megfigyelt) hatását a Y154 mutáns tripszinnel való kölcsönhatásra.

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1 A proteázokról általában

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

A ribozimek kivételével az enzimek mind fehérje természetű molekulák. A fehérje természetű enzimeket hét csoportba sorolhatjuk a katalizált reakció alapján: oxidoreduktázok, transzferázok, hidrolázok, liázok, izomerázok, ligázok és transzlokázok. A proteázok a hidrolázok csoportjába tartoznak, a fehérjéket peptidekre, aminosavakra bontják a peptidkötéseik hidrolízise révén. A különböző proteázok eltérő fehérje szekvenciákat, peptideket ismernek fel és hasítanak. Ez az specifitás teszi lehetővé a különböző funkcióik betöltését.

A proteázok osztályozása alapvetően a katalitikus mechanizmus vagy a hasított kötés pozíciója alapján történik. Utóbbi szempont szerint megkülönböztethetünk exo- és endopeptidázokat annak alapján, hogy a fehérjelánc végén vagy közepén hasítanak, illetve az exopeptidázokon belül amino- és karboxipeptidázokat. A pH preferencia alapján alkalikus, neutrális és savas proteázokat különböztethetünk meg. A katalitikus mechanizmus, azaz a katalízisért felelős aminosav alapján pedig hét alcsoportba sorolhatjuk őket: szerin, cisztein, treonin, aszpartil, glutamát és metalloproteázok, valamint aszparagin peptid liázok (**Laskar és Chatterjee, 2009**).

A legismertebb proteázok emésztőenzimek, mint például a gyomorban termelődő pepszin, ami egy aszpartil proteáz, vagy a hasnyálmirigyben termelődő tripszin, ami a szerin proteázok csoportjába tartozik. A virális proteázok közül a legjobban karakterizált a HIV-1 proteáz, ami terápiás célpontként is szolgál, ezért a retrovirális és retrovírus-szerű aszpartil proteázok karakterizálása az utóbbi évtizedekben előtérbe került. Növényi proteázok közül ismert például a bromelin, ami az ananászban található, a papain, amit a papaya gyümölcsből nyernek és húsok érlelésére használják a húsiparban.

## 2.2 Aszpartil proteázok

### 2.2.1 Az aszpartil proteázok csoportosítása

Az aszpartil proteázok közül számos enzim ismert és jól karakterizált, ebbe a csoportba tartozik például a pepszin, renin, katepszin D, katepszin E. A Nemzetközi Biokémiai és Molekuláris Biológiai Unió (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, IUBMB) besorolása szerint az aszpartil proteázok az általuk katalizált reakció alapján a hidrolázok (EC 3.) csoportjába sorolhatóak, amelyek peptidkötés hasítására képesek (EC 3.4) és ezen belül olyan endopeptidázok, amelyek katalitikus helyén aszpartát aminosav található (EC 3.4.23). Az aszpartil proteázokat a MEROPS adatbázis tovább bontja és 5 klánba sorolja: AA, AC, AD, AE és AF (**1. táblázat**). Az AA klán enzimjeire összességében jellemző, hogy a katalitikus aszpartát körüli motívum a következő: Xaa-Xaa-Asp-Xbb-Gly-Xbb, ahol az Xaa hidrofób aminosav, az Xbb pedig szerin vagy treonin. Az AA klánon belül az A1 családba sorolt enzimek, amelyek eukarióta eredetűek, úgynevezett két lebenyű enzimek, a két lebeny, azaz két fehérjelánc között helyezkednek el a katalitikus aminosavak, az aktív centrumot képezve. Az ebbe a családba sorolt proteázok génje génduplikációval jött létre az evolúció során, a második lebeny az elsőből evolválódott, erre példa a pepszin szerkezete (**Handbook of Proteolytic Enzymes, Chapter 1, 3. oldal, Fujinaga és mtsai, 1995**). Az A1 családban található enzimekre jellemző, hogy az enzimen belüli két lebeny aminosav szekvenciája jelentősen eltér, viszont a harmadlagos szerkezetük nagyon hasonló. Ez felveti a kérdést, hogy a génduplikáció előtt az eredeti génről átíródó egyetlen fehérjelánc, ami egy aszpartátot tartalmaz, hogyan töltötte be a szerepét.

Erre válaszként szolgálhat az AA klán A2 családja, amely virális eredetű aszpartil proteázokat foglal magába, mint például az 1-es típusú humán immundeficiencia vírus (HIV-1) proteáz (PR) (**Rowlings és Barrett, 1995**) vagy a *Drosophila melanogaster* eredetű Gypsy transzpozon peptidáz (**Marlor és msai, 1986**). A virális enzimek esetén nem beszélhetünk génduplikációról. Egy fehérjeláncot kódoló gén íródik át és két monomer fehérjelánc dimerizációja hozza létre az aktív enzimet.

A MEROPS adatbázis a Ty1 retrotranszpozon proteázt az AA klán A11 családjába azon belül pedig az A11B alcsaládba helyezi. A család másik ága az A11A *Drosophila melanogaster* Copia transzpozon proteázt tartalmazza.

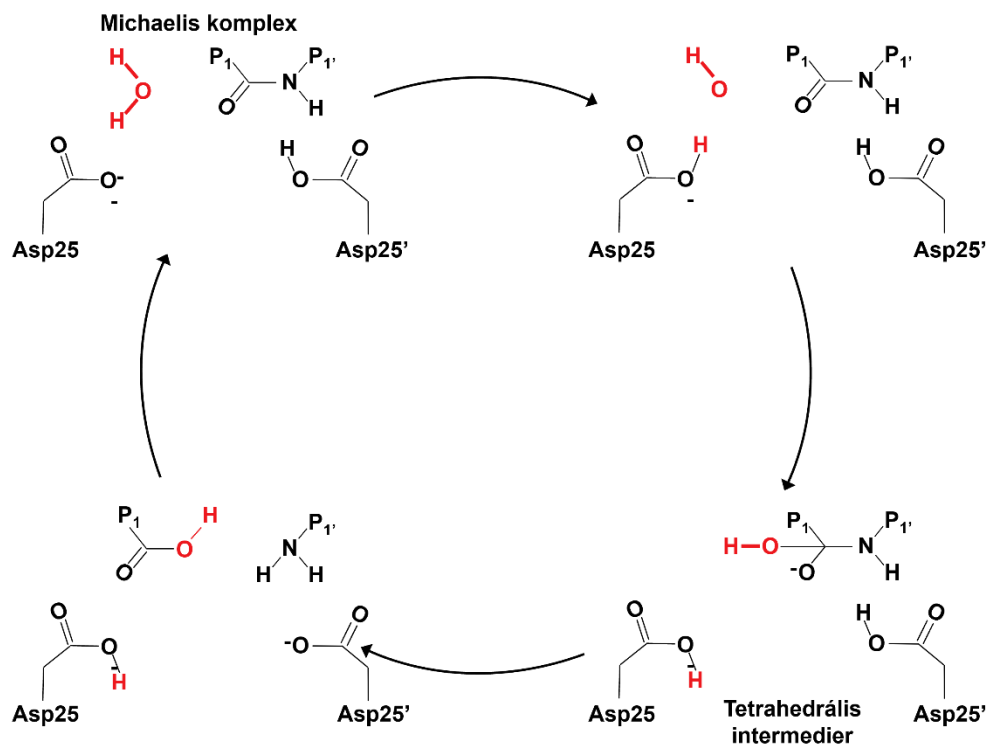
**1. táblázat Az aszpartil proteázok csoportosítása.** A baloldalon a klánok és alcsoportjaik, a jobb oldalon katalitikus aminosavak és 1-1 példa található.

<b>Aszpartil peptidázok</b>	
<b>Klán AA</b>	<b>Katalitikus aminosavak: Asp, Asp vagy His</b>
Család	
A1A	pepszin A (Homo sapiens)
A1B	nepentezin (Nepenthes gracilis)
A2A	HIV-1 retropepszin (humán immunodeficiencia vírus típus 1)
A2B	Ty3 transzpozon peptidáz (Saccharomyces cerevisiae)
A2C	Gypsy transzpozon peptidáz (Drosophila melanogaster)
A2D	Osvaldo retrotranszpozon peptidáz (Drosophila buzzatii)
A2E	retrotranszpozon peptidáz (Schizosaccharomyces pombe)
A2G	retrotranszpozon 17.6 peptidáz (Drosophila melanogaster)
A2H	retropepszin (walleye dermal sarcoma vírus)
A3A	karfiol mozaik vírus endopeptidáz (karfiol mozaik vírus)
A3B	bacilliform vírus protáz (rice tungro bacilliform vírus)
A9	spumapepszin (humán spumaretrovírus)
A11A	Copia transzpozon (Drosophila melanogaster)
A11B	Ty1 transzpozon peptidáz (Saccharomyces cerevisiae)
A28	DNS-károsodás indukált fehérje 1 (Saccharomyces cerevisiae)
A32	PerP peptidáz (Caulobacter crescentus)
A33	bőr aszpartil proteáz (Mus musculus)
<b>Klán AC</b>	<b>Katalitikus aminosavak: Asp, Asp</b>
Család	
A8	szignál peptidáz II (Escherichia coli)
<b>Klán AD</b>	<b>Katalitikus aminosavak: Asp, Asp</b>
Család	
A22A	presenilin 1 (Homo sapiens)
A22B	impas 1 peptidáz (Homo sapiens)
A24A	IV típusú prepilin peptidáz típus M1 (Pseudomonas aeruginosa)
A24B	preflagellin peptidáz (Methanococcus maripaludis)
<b>Klán AE</b>	<b>Katalitikus aminosavak : Asp (or Glu), Asp, His (or Lys)</b>
Család	
A25	gpr peptidáz (Bacillus megaterium)
A31	HybD peptidáz (Escherichia coli)
<b>Klán AF</b>	<b>Katalitikus aminosavak: Asp, Asp, Asp, His</b>
Család	
A26	omptin (Escherichia coli)

Az eukarióta/celluláris és vírus-eredetű aszpartil proteázok nem csak harmadlagos szerkezetükben és az aktív centrumban található aminosavakban hasonlítanak, hanem pH optimumuk is általában alacsony érték, mint például a HIV-1 proteáz pH 4-6 körüli optimuma (**Boross és mtsai, 1999**) vagy a humán pepszin igen alacsony, pH 2 optimuma (**Foltmann, 1988**). Kivétel ezek közül a humán foamy vírus (HFV) proteáz, amely pH optimuma semleges körüli (pH 6,6-6,8) (**Fenyőfalvi és mtsai, 1999**).

### 2.2.2 Az aszpartil proteázok hatásmechanizmusa

A celluláris aszpartil peptidázok szubsztrátkötő zsebe a fehérje dimer közepén, térben az N- és C-terminális találkozási felett található és általában 7 vagy 8 aminosavat foglal magába, amelyet S5-S3`-ként jelölünk. A szubsztrátkötő zseb közepén helyezkedik el a két aszpartát aminosav, amelyek a Asp-Thr/Ser-Gly-Thr/Ser motívumban találhatóak meg, ami fenttartja a karboxil csoportok számára megfelelő környezetet. A virális enzimekben a szubsztrátkötő zseb rövidebb, S3-S3`-ként írható le (**Wlodawer és Erickson, 1993**). Az aszpartil, glutamát és metallo peptidázok abban különböznek a szerin, cisztein és treonin peptidázoktól, hogy a peptidkötést megtámadó nukleofil nem egy nukleofil aminosav oldallánc, hanem egy aktivált vízmolekula. Az aszpartil proteázok aktív centrumában általában két - a katalízis szempontjából fontos - aszpartát aminosav található, azonban egyes enzimekben a második aszpartátot más aminosav helyettesíti. Az aszpartil proteázok katalitikus aktivitásának mechanizmusát (**Suguna és mtsai, 1987; Brik és Wong, 2002**) a következőképp írták le: A katalízisben részt vevő egyik aszpartát deprotonált formája megtámadja a szubsztrát karbonil csoport szénatomját egy aktivált vízmolekulán keresztül (**1. ábra**). A karbonil csoport oxigénjét eközben protonálja a másik aszpartát és kialakul egy tetraédes átmeneti állapot. Végül a szubsztrát amid csoportja protonálódik ami a tetraédes állapot felbomlásához vezet és a szubsztrát a peptidkötés helyén két termékre hasad. Érdekes, hogy az eddig leírt aszpartil proteázok mindegyike endopeptidáz, pedig a hasítás mechanizmusa nem kizáró oka az exopeptidáz aktivitásnak.



**1 ábra. Az aszpartil proteázok katalitikus mechanizmusa.**

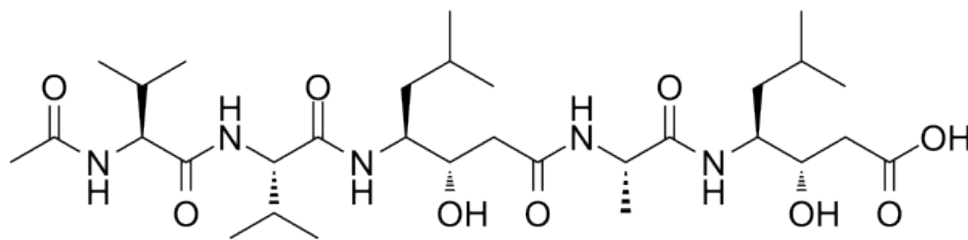
A retrovirális proteázok aktív helyre jellemző motívuma a (D-S/T-G), az itt található aminosavak között erős hidrogénkötések alakulnak ki, ezt tűzoltó fogásnak (*fireman's grip*) nevezzük. A HIV-1 proteáz katalitikus aminosavai a következők: D-T-G. A Thr 26 és Thr26' a dimerizációban tölt be fontos szerepet, a treonin alaninra történő cseréje esetén a hiányzó hidroxil csoportok okozta instabilitás miatt katalitikus aktivitás nem figyelhető meg (Strisovsky és mtsai, 2000). Az Asp25 és Asp25' aminosavak a szubsztráttal kerülnek direkt kölcsönhatásba és a katalízisben fontos szerepet töltenek be, a Gly27 és Gly27' aminosavak pedig a szubsztrát kötésben és stabilizációjában vesznek részt (Mager, 2001).

### 2.2.3 Aszpartil proteáz gátlószerek

Az aszpartil proteázok általános erős inhibitora a hat aminosavból (Iva-Val-Val-Sta-Ala-Sta; Iva: izovaleril, Sta: sztatín) álló peptid, a pepsztatin A, amelyet először *Actinomyces* fajokból izoláltak 1970-ben (Umezawa és mtsai, 1970). Nevét onnan kapta, hogy a pepsztin már pikomoláris koncentrációban is gátolja (Marciniszyn és mtsai, 1976) illetve egy ritka aminosavat is tartalmaz, sztatint (4-amino-3-hidroxi-6-metilheptánsav), az A betű pedig az *Actinomyces* törzseket jelöli. A pepsztatin A az eukarióta/celluláris eredetű proteázok erős inhibitora (Knight és Barrett, 1975) (Pourmotabbed és mtsai, 1982), például a katepszin D

50%-os gátláshoz tartozó inhibitor koncentráció ( $IC_{50}$ ) 8,8 nM, renin esetében 6,6  $\mu$ M és pepszinre pedig 14 nM-t mértek (**Katoh és mtsai, 1987**).

Egy évvel később a pepsztatin A N-acetil származékát (Ac-Val-Val-Sta-Ala-Sta-OH; Ac: acetyl) *Streptomyces naniwaensis* törzsből izolálták (**Sato és Murao, 1971**). A pepsztatin és az acetyl-pepsztatin (**2. ábra**) az aszpartil proteázok aktív centrumához kötődik, a peptid közepén elhelyezkedő sztatín OH csoportja a víz helyett az aktív centrum aszpartátjaival kölcsönhatva tetraédes állapotot hoz létre, így a víz molekula kiszorul a reakcióból. Az acetyl-pepsztatin majdnem azonos kémiai szerkezettel rendelkezik, mint a pepsztatin A, azonban az acetyl-pepsztatin hatékonyabb gátlószere a retrovirális eredetű proteázoknak, mint a pepsztatin A *in vitro* kísérletekben. A gátlási képességét a HIV-1 és HIV-2 proteázokra már a nyolcvanas évek végén megállapították, pH 4,7 értéken a HIV-1 proteázra a  $K_i=20$  nM (**Richards és mtsai, 1989a**), a HIV-2 proteázra pedig  $K_i=5$  nM (**Richards és mtsai, 1989b**). A pepsztatin A  $IC_{50}$  értéke HIV-1 PR-ra 1,8  $\mu$ M (**Lee és mtsai, 1998**), ami gyenge gátlást jelent. Az acetyl-pepsztatin a pepsztatin A-nál jobb gátlószernek bizonyult a xenotrópikus egér leukémia vírussal-rokon vírus (XMRV) proteázra is (**Matúz és mtsai, 2012**). A pepsztatin A relatíve magas, 0,1-0,5 mM  $IC_{50}$  értékeket mutat az 1-es típusú humán T-sejtes leukémia vírus (HTLV-1), a Moloney egér leukémia vírus (MMLV) és a marha leukémia vírus (BLV) proteázokra is (**Katoh és mtsai, 1987**). A retrotranszpozon eredetű humán retrovírus-szerű aszpartil proteáz 1 (ASPRV1) esetében is 15,5  $\mu$ M  $IC_{50}$  értéket mértek (**Golda és mtsai, 2020b**). A pepsztatinokat nem használják a klinikumban, azonban hatásmechanizmusuk megértése az első és második generációs HIV-1 proteáz inhibitorok kifejlesztésében fontos szerepet játszott, ezeknek a gátlószereknek a többsége ugyanis peptid-mimetikus. A HIV-1 proteáz gátlószerek úgynevezett erős kötődésű kompetitív inhibitorok, a proteáz aktív centrumáért versengenek a virális poliproteinekkal, így gátolva a vírus életsiklusát, a virális fehérjék érését.



**2. ábra.** Az acetil-pepszatin szerkezete. Kép forrása: Medchemexpress (<https://www.medchemexpress.com/>).

Az ismert HIV-1 proteáz gátlók a pepszatin származékok mellett a következők: atazanavir, darunavir, fosamprenavir, indinavir, lopinavir, nelfinavir, ritonavir, saquinavir, tipranavir és DMP-323. Ezek közül első generációs inhibitor az indinavir, nelfinavir, ritonavir, saquinavir és amprenavir, második generációs inhibitor az atazanavir, darunavir, fosamprenavir, lopinavir, tipranavir. Jelen tanulmány készítésekor az amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerbiztonsági Felügyelet (*Food and Drug Administration*, FDA) szerint a klinikumban az ismert HIV-1 proteáz inhibitorokból hatot használnak. Ezek a következők: atazanavir, darunavir, fosamprenavir, ritonavir, saquinavir és tipranavir. A tipranavir és darunavir, illetve a klinikumban nem alkalmazott DMP-323 kivételével az összes inhibitor peptid-mimetikus. A tipranavir és a darunavir a HIV-1 proteáz aktív centrum mutációinak jobban ellenáll, mint a többi gátlószer ugyanis előbbi kevesebb hidrogénkötéssel kötődik (**Larder és mtsai, 2000**), utóbbinak pedig a molekuláris flexibilitása biztosít nagyobb rugalmasságot (**Purohit és Sethumadhavan, 2009; De Meyer és mtsai, 2004**). A HIV-1 és HIV-2 proteázok erős gátlószere a DMP-323, amelyet az ismert inhibitorok háromdimenziós szerkezete alapján terveztek és állítottak elő. A proteáz inhibitorok napjainkban kezdenek kiszorulni a HIV terápiás szerek közül, ennek oka pedig az ellenük gyorsan kialakuló rezisztencia. Ennek ellenére a ritonavir ismét a figyelem középpontjába került, hiszen a COVID-19 betegek kezelésére elfogadott Paxlovid gyógyszer a SARS-CoV-2 fő proteáz inhibitora (nirmatrelvir) mellett ritonavirt is tartalmaz, melynek célja a nirmatrelvir stabilitásának növelése azáltal, hogy annak metabolizmusát gátolja (**Mótyán és mtsai, 2022**). A retrovírus és retrovírus-szerű proteázok és inhibitoraik tanulmányozása ezért kiemelten fontos az új inhibitorok fejlesztésében.

## 2.3 A retrotranszpozonok

A retrotranszpozonok egy speciális fajtái a “mozgékony” genetikai elemeknek, azaz a transzpozonoknak. A retrotranszpozonok RNS intermedieren keresztül íródnak át, majd az erről keletkező DNS-t illesztik be a genomba (**Xiong és Eickbush, 1990**). Ezen genetikai elemek megtalálhatóak minden eukarióta élőlényben, a prokariótákban azonban nem fordulnak elő. Az élesztő eredetű retrotranszpozonok mindegyike kivétel nélkül a hosszú terminális ismétlődést tartalmazó, ún. *long terminal repeat* (LTR)-retrotranszpozonok csoportjába tartozik (**Maloy és Hughes, 2013**). Ezt a csoportot két alcsoportra bonthatjuk, a *Ty1-copia* és a *Ty3-gypsy* csoportokra. A *Saccharomyces cerevisiae* sarjadzó élesztő genomja számos LTR retrotranszpozont tartalmaz, amelyek közül a legtöbb tanulmány a Ty1 retrotranszpozonra irányul (**Coffin és mtsai, 1997; Curcio és mtsai, 2015**).

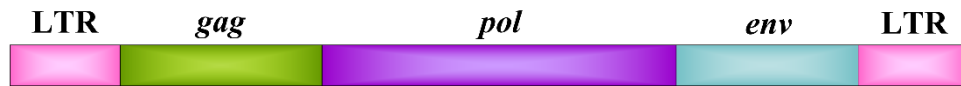
### 2.3.1 A Ty1 retrotranszpozon genomja és életciklusa

A Ty1 genom 5918 bázispár hosszúságú, valamint ahogy az a retrovírusokra is jellemző, a genom mindkét végén azonos, 334 bázis párból álló LTR szekvenciák találhatóak. Az LTR szekvenciák végén megtalálható a 5'-TG...CA 3' invertált ismétlődő szekvencia és a három jól megkülönböztethető domén: U3, R és U5. A génről átíródó transzkripten a 38 nukleotid hosszúságú U5 régió az 5' végen, míg a 240 nukleotid hosszúságú U3 régió a 3' végen helyezkedik el, az 56 nukleotid hosszú R régió pedig megtalálható a processzáldott transzkript mindkét végén (**Curcio és mtsai, 2015**).

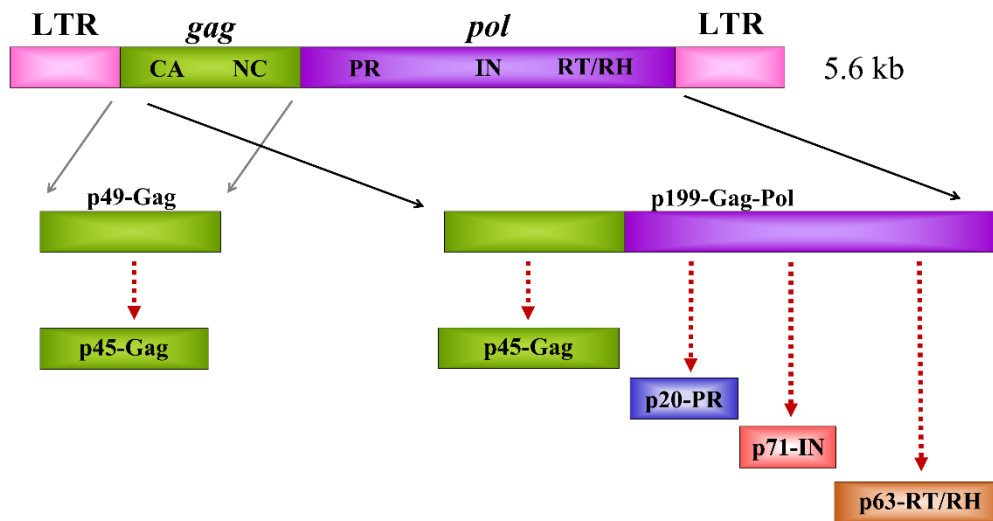
A Ty1 retrotranszpozíciója replikatív módon történik, a folyamat két retrotranszpozont eredményez, az eredeti retrotranszpozont, illetve annak a másolatát a genomban. A retrotranszpozícióban részt vevő fehérjéket a retrotranszpozon genom kódolja. A Ty1 genom két részlegesen átfedő nyitott olvasási keretet tartalmaz (*open reading frame*, ORF), a *gag* és *pol* génekét (**Coffin és mtsai, 1997**). A *gag* ORF a Gag prekursor fehérjét (p49-Gag) kódolja, ami kapszid és nukleinsav chaperon funkciókkal rendelkezik. Az R régió utolsó három nukleotidja a *gag* első kodonja, illetve a *gag* és a *pol* szekvenciák egy 38 bp hosszúságú szakaszok átfednek egymással. A Ty1 genomról az mRNS-t a celluláris RNS Polimeráz II (Pol II) írja át, majd az RNS érésen megy keresztül. Az érett mRNS egy hét nukleotidból álló szignált tartalmaz, ami +1 riboszómális frameshiftet vezet a *gag* ORF-en, így váltva a *pol* ORF-re és ezáltal a Pol expressziójára (**Clare és msai, 1988**). A

kereteltolódás (frameshift) után Gag-Pol prekurzor poliprotein (p199-Gag-Pol) transzlálódik, ami a proteáz, integráz és reverz transzkriptáz enzimeket kódolja (3.ábra).

### A) Retrovírus



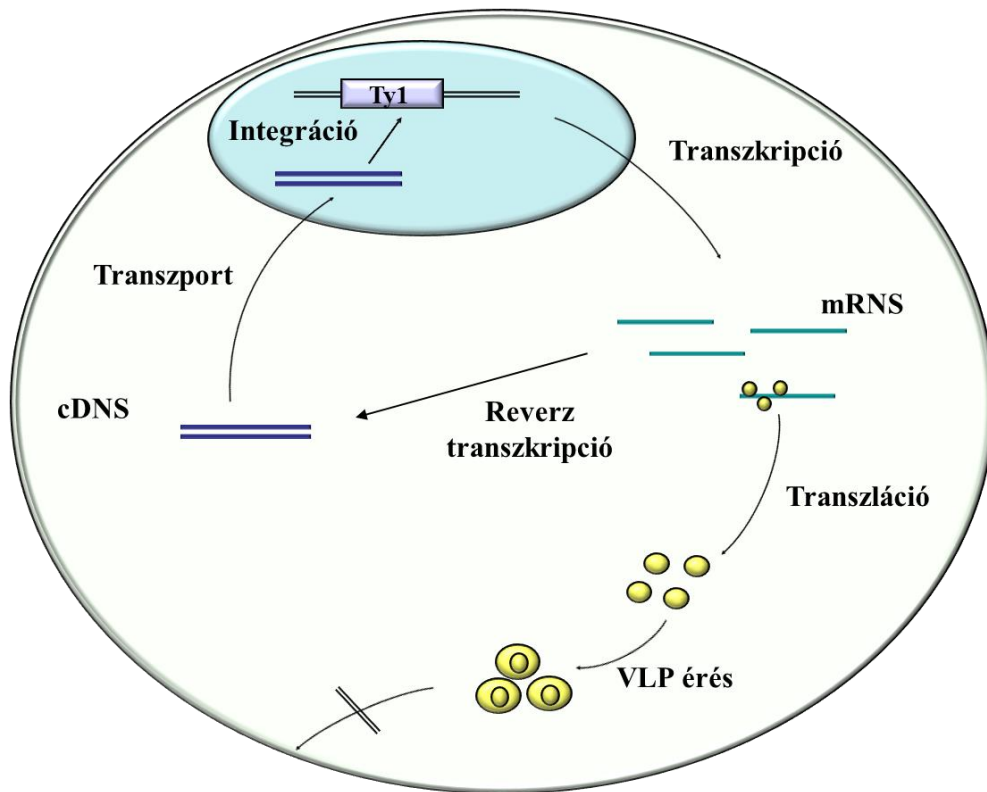
### Ty1 retrotranszpozon



### B)

**3. ábra. A retrovírusok és a Ty1 retrotranszpozon genomja.** (A) A retrovírusok és a Ty1 retrotranszpozon genomjának sematikus ábrázolása. (B) A Ty1 *gag* és *gag-pol* ORF-ről átíródó fehérjék. A piros szaggatott vonalak a Ty1 proteáz által a prekurzor poliproteinből processzálandó fehérjéket jelölik. A számok a fehérjék molekulatömegét jelentik (kDa).

A retrovírusokhoz hasonlóan a prekurzor fehérjék limitált proteolízise a Ty1 replikációs ciklusának is fontos részét képezi, amit a proteáz hajt végre, ami első lépésként autoprocesszálandóság révén saját magát fogja kihasítani a p199-Gag-Pol fehérjéből. A strukturális fehérjék a Gag és a Gag-Pol prekurzor poliproteinekről processzálandóak (Adams és mtsai, 1987; Müller és mtsai, 1987; Youngren és mtsai, 1988). Ahogy azt fentebb említettük, előbbi a p45-Gag fehérje, utóbbi a p199-Gag-Pol fehérje, ami proteázra, integrázra és reverz transzkriptázra hasítódik, amely fehérjék a megfelelő retrovirális fehérjékhez hasonlóak (Garfinkel és mtsai, 1991; Mellor és mtsai, 1985). Habár az LTR retrotranszpozonok és retrovírusok életciklusa hasonló, az extracelluláris lépések hiánya miatt a retrotranszpozonok életciklusa a sejten belülre korlátozódik (4. ábra), így nem fertőzőképesek (Curcio és mtsai, 2015).



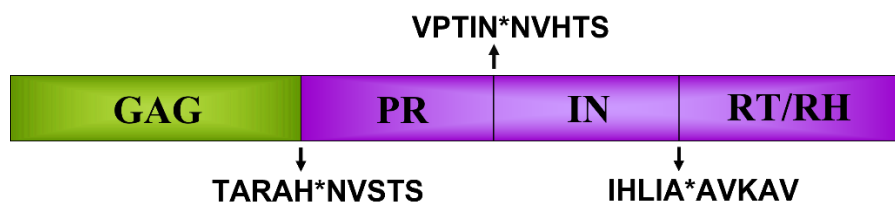
**4. ábra.** A Ty1 retrotranszozon életciklusa *Saccharomyces cerevisiae* sejtben. A ciklus első lépéseként a sejtmagban található (világoskék kör) Ty1 genom átíródik mRNS-re (zöld vonalak) melyekről a vírus-szerű részecskék (VLPs, virus like particles, sárga körök jelölik) fognak átíródni, az érésüket követően ezek a fehérjék összeépülnek (két sárga kör egymásba illszetve), de a sejtől nem jutnak ki. Az mRNS-ről továbbá cDNS (kék dupla vonal) íródik át a retrotraszozon kódolt reverz transzkriptáz által, ami a sejtmagba transzportálódik és beintegrálódik az élesztő genomba.

Ennek oka, hogy az *env* gén, ami a burok fehérjét kódolja, hiányzik a retrotranszozon genomból. A Ty1 mRNS, Gag és Gag-Pol fehérjéből kihatódó strukturális és enzim fehérjék, amiket vírus-szerű részecskéknek is nevezünk, vírus-szerű képletekké állnak össze, amik intracelluláris érésen mennek keresztül (**Brookman és mtsai, 1995; Roth és mtsai, 2000**). A Ty1 fehérjék érése után, a Ty1 RNS-ről, reverz transzkripció által íródik át a Ty1 genom (cDNS). Az átíródást nukleáris import követi és a cDNS, az integráz enzim által a sejt genomba integrálódik (**Curcio és mtsai, 1992; Curcio és mtsai, 2003; Moore és mtsai, 1998; Moore és msai, 2000; Friedl és mtsai, 2010**). Az integráció után az életciklus újramezdődhet.

### 2.3.2 A retrotranszpozon eredetű proteázok

Annak ellenére, hogy a retrovírus-szerű proteázokról a tudásunk egyre nő, a retrotranszpozon-eredetű proteázok biokémiai, enzimatikus és struktúrális jellemzőiről rendelkezésre álló adat igen kevés. Az egyetlen retrotranszpozon eredetű proteáz, amelyet munkacsoportunkon kívül rekombináns formában tisztítottak és karakterizáltak, a *Drosophila melanogaster* Copia Gag prekursor fehérje (**Athauda és mtsai, 2006**). A *S. cerevisiae* Ty1 retrotranszpozon és a *D. melanogaster* Copia retrotranszpozon proteáz ugyan a Copia transzpozon endopeptidáz családba tartoznak (family A11) a MEROPS adatbázis szerint (**Rawlings és mtsai, 2018**), azonban távoli rokonságban állnak egymástól ezen a családon belül (**Malik és mtsai, 2001**).

A 20 kDa nagyságú monomer aszpartil proteáz N-terminális részét a Ty1 retrotranszpozon gag ORF 3' és a pol ORF 5' vége egy rövid részen átfedésben kódolja. A Ty1 proteáz processzálni útvonala és szerepe a vírus-szerű fehérjék létrehozásában már számos kutatás célpontja volt (**Garfinkel és mtsai, 1991; Merkulov és mtsai, 1996, Merkulov és mtsai, 2001; Lawler és mtsai, 2001**). Az ismert, hogy a Ty1 proteázban megtalálható a retrovirális aszpartil proteázok konszenzus katalitikus motívuma, a D-S/T-G-A szekvencia, illetve, hogy a proteáz a p199-Gag-Pol prekursor fehérjéről funkcióképes vírus-szerű fehérjéket hasít le. A limitált proteolízis a Gag/proteáz (Gag/PR, RAH\*NVS), proteáz/integráz (PR/IN, TIN\*NVH) és integráz/reverz transzkriptáz (IN/RT, LIA\*AVK) hasítóhelyeken történik, amelyeket előzőleg kémiai szekvanálással azonosítottak (**Garfinkel és mtsai, 1991; Merkulov és mtsai, 1996**) (**5. ábra**). A prekursor fehérje először a Gag/PR hasítóhelyen hasítódik el, és ez a lépés szigorúan hőmérséklet-függő (**Lawler és mtsai, 2002**). Kísérletes adatok nem állnak rendelkezésre a Ty1 retrotranszpozon eredetű proteázról, illetve a homológ modellezésen alapuló szerkezet sem került publikálásra, ezért a szerkezeti hasonlóság a retrovirális és Ty1 retrotranszpozon proteáz között ismeretlen volt tanulmányunk megjelenése előtt (**Gazda és mtsai, 2020**).



**5. ábra. A Ty1 proteáz hasítóhelyei.** A hasítóhelyeket a genomról átíródott prekursor poliproteinben a nyilak jelölik. A Gag fehérjerész zöld színnel, az enzim fehérjéket lila színnel jelöltük.

## 2.4 Szerin proteázok

### 2.4.1 A szerin proteázok osztályozása

A szerin, treonin és cisztein peptidázok abban különböznek az aszpartil, glutamát és metalloproteázoktól, hogy a víz helyett az aktív centrum nukleofilje egy aminosav rész. Ebből következőleg az acil intermedierek csak a szerin, treonin és cisztein peptidázok által katalizált reakciókban jöhetnek létre. Szerin peptidáznak nevezzük azokat a proteázokat, ahol a katalitikus aktivitás a szerin hidroxil csoportján alapszik, ami nukleofilként fogja támadni a peptidkötést a szubsztrátban.

A szerin proteázok szerkezete alapján két nagy csoportot különböztetünk meg: a kimotripszin-szerű és a szubtilizin-szerű szerin proteázokat (**Hedstrom, 2002**).

A szekvencia, a negyedleges szerkezet, valamint a katalitikus aminosavak sorrendjére alapozva körülbelül 14 klánt és 50 családot különböztethetünk meg a szerin proteázokon belül (**2. táblázat**). A katalitikus folyamat általában a szerinen kívül, ami a nukleofil hordozza, egy proton donor vagy általános bázis bevonását is megköveteli. A PA, PC, SB, SC, SH, SK és SS klánokban a proton donor a hisztidin, a katalitikus triád harmadik tagja pedig a hisztidin imidazolium gyűrűjének orientációjában működik közre. A harmadik aminosav általában aszpartát, vagy az SH klánban egy második hisztidin, illetve glutamát a PC és SS klánokban. A PA(S) szubklán S1 családja a legjobban karakterizált proteázokat foglalja magába, mint a kimotripszin és tripszin. Az enzimek peptidáz alegysége két doménes struktúrát mutat, mindkét domén tartalmaz egy  $\beta$  hordót és az aktív centrum a két domén között helyezkedik el. Az ilyen doménekkal rendelkező szerin peptidázok mind az SA klánba tartoznak, de mára már világos, hogy ez az evolúciós vonala a peptidázoknak szintén magába foglalja a cisztein peptidázokat, ezért a szerin és cisztein peptidázok családjait a klán PA azon belül is két szubklánba, a PA(S) és a PA(C) szubklánokba soroljuk. A katalitikus triád

sorrendje His, Asp és Ser a PA(S) szubklánban, és a negyedleges szerkezet főként  $\beta$  redőkből áll. Minden peptidáz a klánban endopeptidáz, egyetlen proteáz, a *Porphyromonas gingivalis* dipeptidil peptidáz 7 kivételével és a csoportban megtalálhatunk RNS vírus, baktérium archae és eukarióta eredetű enzimeket is. Az S1 család a legnagyobb a PA(S) szubklánon belül, mind a megszekvenált fehérjék, mind pedig a különböző peptidáz aktivitás számában. A család szintén tartalmaz olyan enzimeket, ahol a peptidáz aktivitás nem ismert. A szubsztrát specificitást az S1 zseb specificitása dominálja, az itt található aminosav szolgáltatja a karbonil csoportot a peptidkötés hasításához (**Sichler és mtsai, 2002**). A legtöbb peptidáz az S1 családon belül prekurzorként szintetizálódik, egy N-terminális szignált tartalmaz, aminek az eltávolítása limitált proteolitikus hasítást igényel, így aktiválva az enzimet (**Handbook of Proteolytic Enzymes, Elsevier, Chapter 559, 2491. oldal**).

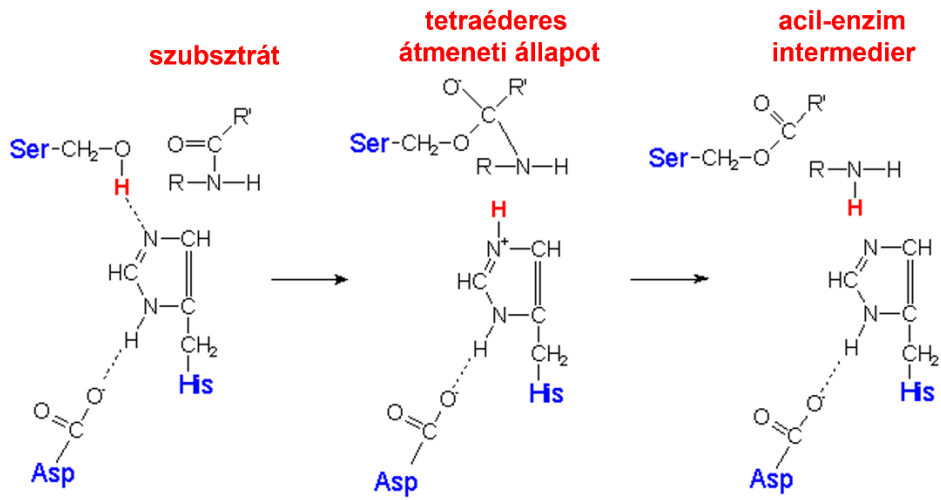
**2. táblázat. Az szerin proteázok csoportosítása.** A baloldalon a klánok és alcsoportjaik, a jobb oldalon katalitikus aminosavak és 1-1 példa található.

<b>Szerin peptidázok</b>	
<b>Klán PA(S)</b>	<b>Katalitikus aminosavak: His, Asp, Ser</b>
Család	
S1A	kimotripszin A ( <i>Bos taurus</i> )
S1B	glutamil endopeptidáz ( <i>Staphylococcus aureus</i> )
S1C	DegP peptidáz ( <i>Escherichia coli</i> )
S1D	lizil endopeptidáz ( <i>Achromobacter lyticus</i> )
S1E	streptogrizin A ( <i>Streptomyces griseus</i> )
S1F	szerin peptidáz (humán astrovírus)
S3	togavirin ( <i>Sindbis vírus</i> )
S6	IgA1-specifikus szerin-típusú proлил endopeptidáz ( <i>Neisseria gonorrhoeae</i> )
S7	flavivirin (sárgaláz vírus)
S29	hepacivirin (hepatitis C vírus)
S30	potyvírus P1 peptidáz (plum pox potyvírus)
S31	pestivírus NS3 poliprotein peptidáz (borjú vírusos hasmenés vírus)
S32	equine arteritis vírus szerin endopeptidáz (equine arteritis vírus)
S39A	sobemovírus peptidáz (cocksfoot mottle vírus)
S39B	luteovírus peptidáz (potato leaf roll luteovírus)
S46	dipeptidil-peptidáz 7 ( <i>Porphyromonas gingivalis</i> )
S55	SpoIVB peptidáz ( <i>Bacillus subtilis</i> )
S64	Ssy5 peptidáz ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )
S73	gpO peptidáz ( <i>Enterobacteria</i> fág P2)
S75	szerin peptidáz (white bream vírus)
<b>Klán PB(S)</b>	<b>Katalitikus aminosavak: Ser</b>
<b>Klán PC(S)</b>	<b>Ser, His, Glu</b>
<b>Klán SB</b>	<b>Asp, His, Ser vagy Glu, Asp, Asp, Ser</b>
<b>Klán SC</b>	<b>Ser, Asp, His</b>
<b>Klán SE</b>	<b>Ser, Lys</b>
<b>Klán SF</b>	<b>Ser, Lys (His)</b>
<b>Klán SH</b>	<b>His, Ser, His</b>
<b>Klán SJ</b>	<b>Ser, Lys vagy Ser, Arg</b>
<b>Klán SK</b>	<b>Ser, His, Asp vagy Ser, Lys vagy Ser, His, Ser, Glu</b>
<b>Klán SP</b>	<b>His, Ser</b>
<b>Klán SQ</b>	<b>Ser</b>
<b>Klán SR</b>	<b>Lys, Ser</b>
<b>Klán SS</b>	<b>Ser, Glu, His</b>
<b>Klán ST</b>	<b>Ser, His</b>

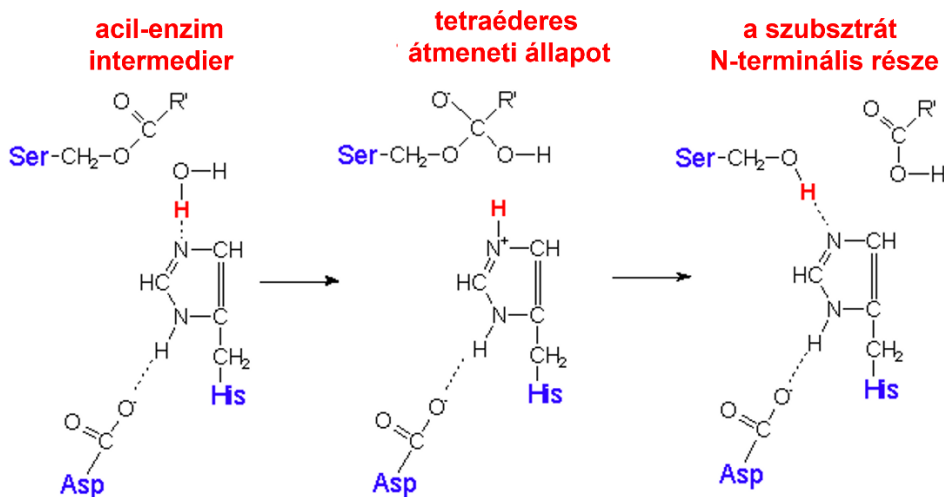
#### 2.4.2 A szerin proteázok hatásmechanizmusa

A szerin proteázok szubsztrátjai az enzim felszínéhez kötődve olyan konformációt vesznek fel (**6. ábra**), hogy a polipeptid lánc az aktív helyre, a szubsztrátkötő zsebekbe fog illeszkedni és így a karbonil csoport szénatomja az aktív centrum szerinjéhez (S200 - patkány anionos tripszin, genetikai számozás szerint) térben közel kerül (**Craik és mtsai, 1987**). A reakció első lépése során egy enzim-szubsztrát komplex alakul ki, majd a második lépés során ez egy vízmolekula segítségével felbomlik. A kovalens tetraédes átmeneti állapot úgy fog létrejönni, hogy az S200 hidroxil csoport fogja nukleofil módon támadni a szubsztrát peptidkötésben található karbonil szénatomját. A H63 proton donorként segíti a reakciót, a szerin hidroxil csoportról proton transzferálódik a hisztidinre. Ezt a plusz pozitív töltést a D107 fogja stabilizálni (**Craik és mtsai, 1987**), a tetraédes átmeneti állapotot pedig az oxianion zseb fogja stabilizálni. A G198 és S200 imino csoport a karbonil csoport negatív oxigénjével hidrogén hidat hoz létre, így alakul ki az oxianion lyuk. A szubsztrátnál az átmeneti állapot erősebben kötődik az enzimhez, ezért az aktiválási szabad energia csökkenni fog. Az átmeneti állapot úgy szűnik meg, hogy a H63-ről a proton transzfer történik a peptidkötés nitrogénjére, ezáltal a peptidkötés felbomlik. Ezután egy acil-enzim komplex és távozó csoport marad az átmeneti tetraédes állapotból. Az utolsó lépés deacilezés, ahol egy vízmolekula nukleofil módon támadja az acil-enzimet, amiben a H63 szintén közreműködik és újra tetraédes átmeneti állapot alakul ki. Végül ez is felbomlik és a karboxisav termék, valamint a S200 szabaddá válik (**Ishida és Kato, 2003**).

## Acilálás



## Deacilálás



6. ábra Az szerin proteázok katalitikus mechanizmusa

### 2.4.3 A szerin proteázok gátlószerei

A szerin proteázok és inhibitoraik a legjobban kutatott fehérje komplexek közé tartoznak. A különböző típusú inhibitorokat a hatásmechanizmusuk alapján különböztetjük meg és három csoportba sorolhatjuk, i) kanonikus vagy más néven standard mechanizmusú, ii) nem-kanonikus és iii) serpin-típusú inhibitorokról beszélhetünk. A kanonikus inhibitorok egy konvex-kötő hurkon keresztül kötődnek az enzimekhez, amely az aktív centrumba illeszkedik. A gátlási mechanizmus nagyon hasonlít egy ideális szubsztrát kötéséhez. A nem-

kanonikus inhibitorok az N-terminális régiójuk segítségével kötődnek a proteázokhoz, a szerpinek pedig a kanonikus inhibitorokhoz hasonlóan a szubsztráthoz hasonlóan kötődnek az enzimhez, de ezekben az inhibitorokban a kötő hurok egyetlen peptidkötésének hidrolízise jelentős szerkezeti változáshoz vezet.

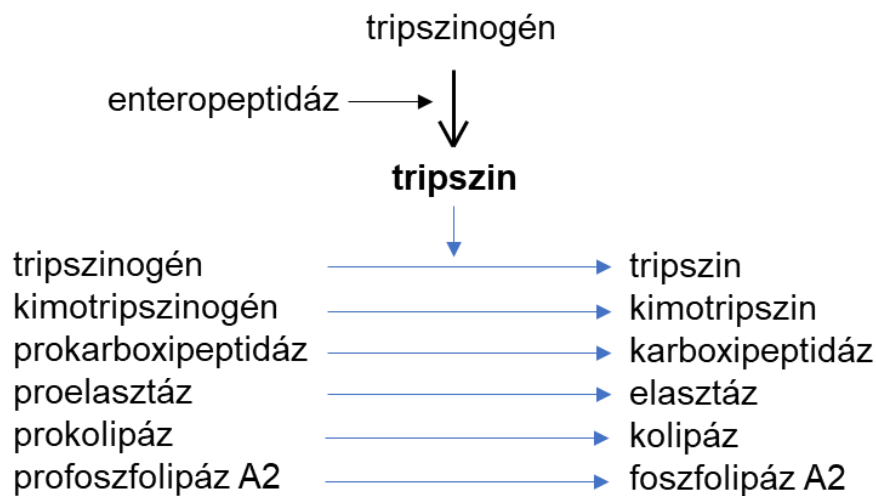
Az SPINK1 inhibitorot Kazal és munkatársai mutatták ki szarvasmarha hasnyálmirigyből 1948-ban. A humán formát 1976-ben izolálták és szekvenálták meg (**Pubols és mtsai, 1976**). Az irodalomban sok helyen PSTI-ként említik (*pancreatic secretory trypsin inhibitor*), de az utóbbi időben a SPINK1 (*serine protease inhibitor, Kazal type I*) név terjedt el. A Kazal típusú inhibitorok a természetben sok helyen előfordulnak (**Bartelt és mtsai, 1977; Odani és mtsai, 1983**), példaként megemlíthetjük a tojásban található ovomukoidot vagy az emlősökben kimutatott akrozin inhibitorokat (**Laskowski és mtrársai, 1980; Bode és Huber, 1992**). A Kazal domént egy  $\beta$ -lemez és egy  $\alpha$ -hélix alkotja, amit három diszulfid híd stabilizál. A  $\beta$ -lemezen belül három antiparallel  $\beta$ -redő helyezkedik el. A Kazal típusú inhibitorokban egy vagy több Kazal domén található, amelyek egyenként tartalmazzák a reaktív helyeket. Specificitásuk eltérő, különböző szerin proteázokat képesek gátolni, mivel a P1 pozícióban elhelyezkedő aminosavak változhatnak (**Laskowski és mtrársai, 1980; Bode és Huber, 1992**). A SPINK1 reaktív hurokban a P1-P1' helyeken K41 és I42 aminosavakat találunk (**Bartelt és mtsai, 1977**).

## 2.5 A hasnyálmirigy

### 2.5.1 A hasnyálmirigy és az általa termelt proteázok

A hasnyálmirigy az abdomenben mélyen ülő, hosszú lapos szerv, amely egy része a gyomor és gerinc között található, másik része pedig a vékonybél kezdeti szakaszán a duodenumon ülve helyezkedik el. A hasnyálmirigy két fontos funkciót tölt be, külső és belső elválasztású mirigyként is működik: az emésztőrendszer része, valamint kritikus szabályzója a vércukorszintnek. Belső elválasztású endokrin mirigyként a Langerhans sejtek hormonokat termelnek, amelyek a vércukorszint fenttartásában játszanak szerepet úgy, mint inzulin, glukagon, gasztrin és amilin. A szerv főként acinus sejtekből áll, és exokrin mirigyként emésztő enzimeket termel és juttat a ductusokba, amelyek a vékonybél felső szakaszában, a duodenumban végződnek. Naponta körülbelül 200-800 mL hasnyál termelődik, ami lipázt, amilázt és proteázokat is tartalmaz. A szekretin a bolygóideg intrapancreatikus kolinerg neuroonjain keresztül aktiválja az enzim termelést és bikarbonát kiválasztást. A részlegesen

emésztett táplálék a gyomorból a duodénumba kerül, ahol a hasnyállal és az epével keveredik. A táplálék ezután a vastagbélbe kerül (**Camilleri és Vazquez, 2014**). A hasnyálban található proteázok a táplálék fehérjéit di- és tripeptidekre, valamint aminosavakra bontják, amiket aztán a bélhámsejtek vesznek fel másodlagos aktív szimporttal. Ezek a proteázok a következők: tripszin, kimotripszin, elasztáz és karboxipeptidáz. Szubsztrátkötő zsebük összetétele és ezért szubsztrát specificitásuk is eltér, így különböző helyen hasítják a táplálék fehérjéket. Az elasztáz, kimotripszin és tripszin a szerin proteázok csoportjába sorolható, a karboxipeptidáz pedig metallopeptidáz. Az enzimek zimogén formában, proenzimként termelődnek. A bélhámsejtekben termelt enteropeptidáz által aktivált tripszin fogja autoaktiváció révén a tripszinogéneket, illetve a többi proteázt is hasítani (**7. ábra**). A propeptid hasítása a zimogéneknél konformáció változást okoz, így hozva létre az aktív enzimeket (**Neurath és mtsai, 1989**). Ha az aktiválás nem a duodénumban történik, hanem a hasnyálmirigyben, az önmésztődéséhez vezet.



**7. ábra. A hasnyál emésztőenzimek aktiválása a duodenumban.** A hasnyálba kiválasztott tripszinogént az enteropeptidáz fogja limitált proteolízissel aktiválni a duodénumban, ami ezután saját magát is képes lesz hasítani és így aktiválni (fekete nyilak). Az aktiválódott tripszin ezután a többi emésztő enzimet fogja aktiválni (kék nyilak).

### 2.5.2 A hasnyálmirigy-gyulladás és genetikai háttere

A proteázok az emberi szervezetben is fontos szerepet töltenek be, részt vesznek például a táplálék emésztésében, a véralvadásban, a komplement rendszer aktiválódásában,

az apoptózisban, a sejtfehérjék proteozómában történő lebontásában. Aktivitásukat azonban szabályozni kell, a fehérje-bontó képességük a szervezetre káros is lehet, ha nem megfelelő helyen és időben aktiválódnak. A proteázok expressziójának és szekréciójának szabályozásán kívül a szervezet az aktiválódás gátlására specifikus inhibitorokat is termel, amelyek általában szintén fehérje természetű molekulák. A hasnyálmirigy acinus sejtjei külső elválasztású mirigyként a proteázokat, illetve tripszineket inaktív, zimogén formában termeli, amik granulomok formájában halmozódnak fel és választódnak ki a duodenumba. A tripszineket a vékonybélhámsejtek kefeszegélyében termelődő enterokináz fogja proteolitikus hasítással aktiválni a duodenomban (**Mellanby és mtsai, 1912**). A szervezet természetes védekező mechanizmusaként a zimogén tripszin formák mellett a SPINK1 is kiválasztódik, védve ezzel a hasnyálmirigyét a korai tripszin aktiválódástól (**Greene és mtsai, 1976; Rinderknecht, 1986**). Ha azonban a védőmechanizmus nem megfelelően működik, a tripszinek a hasnyálmirigyben ektópiásan aktiválódnak és emészteni kezdik a hasnyálmirigy szövetet, ami szövetkárosodást, nekrozist okoz és így hasnyálmirigy-gyulladásához vezet. A hasnyálmirigy-gyulladásnak akut és krónikus formáját különböztethetjük meg (**Pap és mtsai, 1998; Pap és mtsai, 2003**). Az akut forma epekő vagy alkohol fogyasztás következményeképp kialakult gyulladás, a krónikus forma esetén a gyulladás folyamatossá válik. Az örökletes hasnyálmirigy-gyulladás kialakulásában részt vevő géneket régóta vizsgálják, leírtak számos mutációt a kationos tripszin génjében (*PRSSI*), a SPINK1, illetve a kimotripszin C (CTRC), a cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor (CFTR) génjeiben (**Whitecomb és mtsai, 1996; Gorry és mtsai, 1997; Witt és mtsai, 1999; Ravnik-Glavac és mtsai, 1996; Sharer és mtsai, 1998; Witt és mtsai, 2000**) valamint a pankrász lipáz (PNLIP), karboxil-észter peptidáz (CEL), karboxipeptidáz A1 (CPA1), kimotripszin és elasztáz 3B (CELA3B) génjeiben is (**Lasher és mtsai, 2019; Toldi és mtsai, 2021; Fjeld és mtsai, 2015; Witt és mtsai, 2013; Rosendahl és mtsai, 2018; Moore és mtsai, 2019**). A kalcium-érzékeny receptor (CASR) szerepe egyelőre vitatott (**Takáts és mtsai, 2021**).

A humán kationos tripszinogén mutációi a tripszinogén lecsökkent degradációját vagy fokozott aktivációját okozzák (**Sahin-Tóth és Tóth, 2000; Sahin-Tóth, 2001; Sahin-Tóth, 2000; Szabó és Sahin-Tóth, 2012**). A leggyakoribb mutációként az R122H mutációt írták le, ezt körülbelül az esetek 70%-ában mutatták ki. A második leggyakoribb mutációként az N29I mutációt figyelték meg, amit az esetek 25%-ban, az A16V mutációt pedig az esetek 4%-ban mutatták ki (**Howes és mtsai, 2004; Applebaum és mtsai, 2001; Keim és mtsai, 2003**;

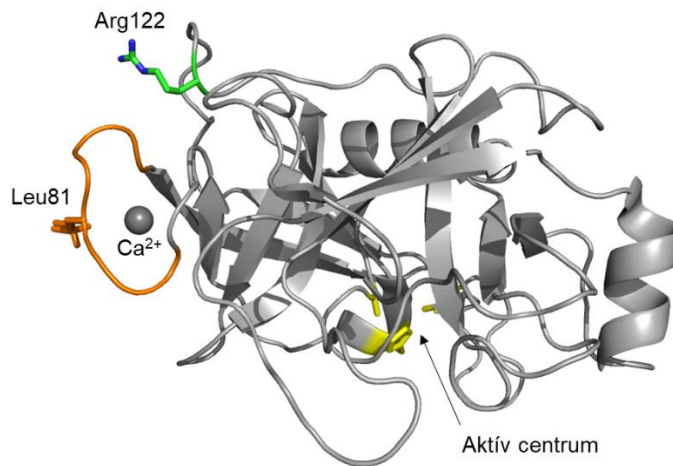
**Otsuki és mtsai, 2004**). Ezekon a mutációkon kívül több mutációt is leírtak betegekben, de ezek száma nem jelentős (**A lipcsei Egyetem adatbázisa, az adatbázis link az irodalomjegyzékben megtalálható**).

A krónikus pankreatitiszben azonosított SPINK1 mutációk közül több az inhibitor csökkent szekréciójához vezet, így a funkcióját nem tudja betölteni és ez kóros tripszin aktivitást okoz (**Zhou és Sahin-Tóth, 2011; Sahin-Tóth és mtsai, 2008; Sahin-Tóth, 2006**). Léteznek azonban olyan mutánsok, amelyek szekréciója nem érintett (N34S, N37S, K41N, I42M, P55S, R65Q és Q68R), így a mutáció hasnyálmirigy-gyulladás kialakulásában betöltött szerepe más mechanizmussal magyarázható. A mutánsok tripszin gátlási profilját kísérletes körülmények között még nem vizsgálták ezért munkacsoportunk célul tűzte ki a SPINK1 mutációk gátlási profiljának vizsgálatát a humán tripszinogénnel szemben.

## **2.6 A humán tripszinogének**

### *2.6.1 A humán tripszinogének izoformái*

A legjobban karakterizált enzimek a szerin proteázok közül a tripszinek (**Chen és mtsai, 2004**). A tripszinek a hasnyál emésztőenzimeinek körülbelül 20%-át teszik ki. A tripszinek a lizin és arginin bázikus aminosavak utáni peptidkötések hidrolízisét katalizálják. A tripszin izoformáit izoelektromos fókuszálással lehet elválasztani. A humán hasnyálmirigy három izoformát termel: kationos, anionos és mezotripszinogén (**Rinderknecht és mtsai, 1973; Rinderknecht és mtsai, 1984**). A hasnyálban túlnyomó többségben a kationos (**8. ábra**) (60-65%) és anionos izoforma (30-50%) fordul elő. A mezotripszinogén a hasnyál összes tripszin tartalmának csak alig, 3-10%-át teszi ki, ez az arány patológiás esetekben eltérhet.



**8. ábra. A humán kationos tripszin szerkezete.** A bemutatott oldalláncok a vad típusú proteáznak megfelelőek. A narancssárga szín a  $\text{Ca}^{2+}$ -kötő hurkot jelöli, középen a  $\text{Ca}^{2+}$ -ionnal (gömb). Az aktív centrumot sárga szín jelöli. Pálcika modellel feltüntettük a L81 és R122 aminosavakat is, amelyek a tripszin degradációjában töltenek be fontos szerepet. Az ábra a fehérje röntgenkristallográfiával meghatározott szerkezeti koordinátái alapján készült (PDBID: 2RA3) (Salameh és mtsai, 2008).

Habár a humán tripszinogén 9 génjéből három expresszálódik (PRSS1, PRSS2, PRSS3), mégsem három izoforma létezik. Megkülönböztetünk egy negyedik izoformát is, az agyi tripszinogént, ami a PRSS3 gén alteratív splicingjával jön létre (Rinderknecht és mtsai, 1984). A három tripszint kódoló gén közül kettő a 7-es kromoszóma hosszú karján, a mezotripszin pedig a 9-es kromoszómán helyezkedik el. A tripszinogének a pankreász acinus sejtjeinek durva felszínű endoplazmatikus retikulumán termelődnek, majd a szignál peptid lehasad és a tripszinogének a Golgi komplexbe kerülnek. Itt a proenzimek koncentrálnak szekretorikus vezikulumokba, zimogén granulomokba transzportálódnak, végül neurális és hormonális stimulusokra ürülnek a hasnyálmirigy vezetéken keresztül a duodenumba (Rinderknecht, 1986).

Mindhárom tripszin izoforma pre-formája tartalmaz egy N-terminális szignál peptidet, ami 15 aminosavból áll - ez lehasad mielőtt a tripszinogének a Golgi komplexbe kerülnek - és egy 8 aminosavból álló aktivációs peptidet. Az aktív tripszinek pedig a szignál peptid és aktivációs peptid rész lehasadása után megmaradó 224 aminosavból állnak. A szignál peptid nélküli zimogén tripszinogének aminosav szekvenciáját a 9. ábra szemlélteti. A harmadlagos szerkezetet diszulfid hidak stabilizálják. Az anionos tripszinogén esetében négy, a mezotripszinogénben és kationos tripszinogénben pedig öt diszulfid hidat találunk a szerkezetben (Nyauhucha és mtsai, 1997, Kenesi és mtsai, 2003).



tripszin az autoaktiválás során az így létrejövő pre-formát háromszor gyorsabban fogja hasítani (Szmola és Sahin-Tóth, 2007). Az autoaktiválás során a tripszin a tripszinogént a K23-I24 peptidkötésnél hasítja, a degradáció pedig az R122-V123 peptidkötés hasításán keresztül történik (Whitcomb és Lowe, 2007). Ez azonban önmagában nem elég az enzim inaktiválásához, mert az R122-V123 peptidkötés a két domént összekötő hurokban helyezkedik el és a hasított fehérje lánc darabok diszulfid híd kötések révén kötve maradnak. A kimotripszin C a tripszin inaktiválásában is részt vesz. A tripszint a L81-E82 pozícióban hasítja (Szmola és Sahin-Tóth, 2007), ami önmagában szintén nem jár aktivitás veszteséssel, azonban ha az R122 és L81 után is bekövetkezik a hasítás, a tripszin elveszti aktivitását. A kationos tripszinben a E75-E85 szakaszon helyezkedik el a  $\text{Ca}^{2+}$ -kötő hurok, ami térben közel helyezkedik el az R122 aminosavhoz, illetve magába foglalja a L81 aminosavat is. Ebből kifolyólag a magas  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció a tripszin autodegradációját és a kimotripszin C általi degradációt is csökkenteni fogja, ugyanis a  $\text{Ca}^{2+}$ -kötő hurok  $\text{Ca}^{2+}$ -ot köt, ami kimerevíti a szerkezetet és gátolja a tripszin hasítását mindkét peptidkötésnél. Az alacsony  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció viszont a tripszin degradációjának fog kedvezni.

## 2.7 A SPINK1

### 2.7.1 A SPINK1 gén és mutációi

A humán SPINK1 gén az 5. kromoszóma 5q32 régiójában helyezkedik el, körülbelül 7,5 kb hosszú és 4 exonból áll, ami 79 aminosavat kódol, egy 23 aminosavból álló szignál peptid résszel. Az érett fehérje nem tartalmaz poszttranszlációs módosítást, molekulásúlya 6,2 kDa. A reaktív rész, ami a tripszin számára szubsztrátként is szolgál a 3-as exonban található.

A SPINK1 expresszálódik a belsejtekben (Shibata és mtsai, 1986, Freeman és mtsai, 1990) májban, gyomorban, epevezetékben és epehólyagban, tüdőben, vesében, petefészekben és emlőkben is (Fukayama és mtsai, 1986, Marchbank és mtsai, 1996, Shibata és mtsai, 1987). Daganatos elváltozásokban is kimutatták az expresszióját (Stenman és mtsai, 2002), valamint leírták prosztata elváltozások esetén is (Paju és mtsai, 2007). A SPINK1-et az akut fázis fehérjék közé is sorolják (Ogawa és mtsai, 1988), mivel gyulladások és sérülések esetén megnövekedett szérum szintet figyeltek meg (Matsuda és mtsai, 1985, Ogawa és mtsai, 1985, Tanaka és mtsai, 1988, Shibata és mtsai, 1988, Lason és mtsai, 1986). Feltételezhető, hogy a SPINK1 mutációk a hasnyálmirigyben megváltoztatják a tripszin-

SPINK1 közötti kölcsönhatást ezzel befolyásolva a proteáz/inhibitor egyensúlyt a hasnyálmirigyben (**Kume és mtsai, 2006**). Witt és munkatársai a hasnyálmirigy-gyulladás genetikai okainak vizsgálata során nem találtak a PRSS-1 vagy a CFTR génben mutációt, leírtak viszont egy 18%-ban hordozott mutációt a SPINK1-ben, egy mutációt a harmadik exonban, a c.101A>G tranzíciót. Ez az N34S mutáció gyakrabban fordul elő krónikus hasnyálmirigy-gyulladásos betegekben (16,2%), mint egészséges kontrollokban (1,9%) (**Witt és mtsai, 2000**). Azt azonban, hogy ez a variáns hogyan játszik szerepet a hasnyálmirigy-gyulladás kialakításában, vizsgálták ugyan, de csak szemikvantitatív módon, így nem volt konklúzív, ezért célul tűztük ki a tripszin gátlási profil vizsgálatát. A SPINK1 gén intronjaiban, promoterben, illetve splice helyein is számos mutációt leírtak (**Hegyí és mtsai, 2017**).

Napjainkig 19 aminosav cserével járó mutációt azonosítottak a SPINK1 inhibitorban. (**3. táblázat**). Ezeknek jelentős része, 12 mutáció a SPINK1 elégtelen szekrécióját okozza. Hét mutáció esetében azonban nem figyelték meg a szekréció elégtelenségét, illetve szerepük a hasnyálmirigy-gyulladásban tisztázatlan maradt, ezért kerültek a figyelmünk központjába. A mutációk helyét a SPINK1 fehérjében a **10. ábra** szemlélteti. Két mutáció (K41N és I42M) az inhibitor reaktív hurokban található, míg a többi az inhibitor vázában helyezkedik el. A tripszin a SPINK1 gátlás alóli felszabadulás első lépéseként a reaktív hurokban található K41-I42 peptidkötést hasítja, amit az R67-Q68 közötti peptidkötés, illetve az inhibitoron belül több helyen történő hasítás követ (**Szmola és Schneider mtsai, 2003; és mtsai, 1973; Schneider és Laskowski, 1974; Kikuchi és mtsai, 1989**). Felmerült tehát a kérdés, hogy a K41N, illetve az I42M mutációnak lehet-e szerepe a SPINK1 tripszin általi degradációjában, illetve a kötés erősség megváltoztatásában. Az N34S, N37S, P55S, R65Q és Q68R mutációk hatásmechanizmusa, illetve szerepe a hasnyálmirigy-gyulladás kialakulásában szintén nem volt ismert, ezért ezeket a mutánsokat is vizsgáltuk jelen dolgozatban.



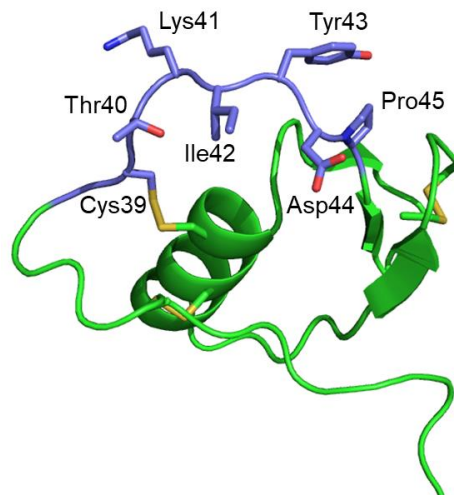
**3. táblázat. Krónikus hasnyálmirigy-gyulladásban szenvedőkben és egészséges kontroll csoportban kimutatott missense mutációk az érett SPINK1 fehérjében.** Az exon 1 missense mutánsokat, amelyek hatással vannak a szekréción szignálra, kizártuk a táblázatból. Munkánk során a félkövér betűtípussal kiemelt variánsokat vizsgáltuk, amelyek normál szekréción mutattak. A homozigóta hordozók (hh) száma az összes esetszám mellett zárójelben látható. Az adatok a pancreasgenetics.org, illetve a gnomad.broadinstitute.org weboldaláról származnak (2020. július 9).

Exon	Nukleotid csere	Aminosav csere	Krónikus hasnyálmirigy-gyulladás estek száma	Egészséges kontroll csoportesetek száma	Hordozó frekvencia (gnomAD)
<b>exon 3</b>	<b>c.101A&gt;G</b>	<b>p.N34S</b>	<b>1889 (238 hh)</b>	<b>402 (9 hh)</b>	<b>1,8%</b>
<b>exon 3</b>	<b>c.110A&gt;G</b>	<b>p.N37S</b>	<b>3</b>		<b>0,04%</b>
<b>exon 3</b>	<b>c.123G&gt;C</b>	<b>p.K41N</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	nincs adat
<b>exon 3</b>	<b>c.126A&gt;G</b>	<b>p.I42M</b>	<b>1</b>		<b>0,006%</b>
exon 3	c.133C>T	p.P45S	2		nincs adat
exon 3	c.137T>A	p.V46D	1		nincs adat
exon 3	c.143G>A	p.G48E	1	1	nincs adat
exon 3	c.150T>G	p.D50E	1		0,0004%
exon 3	c.160T>C	p.Y54H	2		nincs adat
<b>exon 3</b>	<b>c.163C&gt;T</b>	<b>p.P55S</b>	<b>50 (1 hh)</b>	<b>57 (1 hh)</b>	<b>0,9%</b>
exon 3	c.190A>G	p.N64D	2		nincs adat
exon 3	c.193C>T	p.R65W	1		0,003%
<b>exon 3</b>	<b>c.194G&gt;A</b>	<b>p.R65Q</b>	<b>6 (1 hh)</b>	<b>2</b>	<b>0,1%</b>
exon 4	c.198A>C	p.K66N	2		0,023%
exon 4	c.199C>T	p.R67C	4	2	0,003%
exon 4	c.200G>A	p.R67H	15	1	0,32%
<b>exon 4</b>	<b>c.203A&gt;G</b>	<b>p.Q68R</b>	<b>1</b>		<b>0,02%</b>
exon 4	c.206C>T	p.T69I	1		0,001%
exon 4	c.236G>T	p.C79F	1		nincs adat

### 2.7.2 A SPINK1 fehérje

A SPINK1-et (**11. ábra**) a hasnyálmirigy acinus sejtjei termelik, majd a zimogén granulomokba kerül, amelyek nevükből adódóan a szekretált zimogén proenzimeket tartalmazzák. A szekretált SPINK1 a hasnyálban található összes fehérje mennyiségének 0,1-0,8%-át teszi ki. Ez a mennyiség az össztripszin aktivitás nagyjából 20%-át képes semlegesíteni (**Rinderknecht és mtsai, 1986**). A tripszinnel azonos mennyiségű, azaz ekvimoláris SPINK1 a proteázzal komplexet képez, azonban a tripszin hasítani képes az inhibitor az R67-E68 pozícióban, így a gátlás csak átmeneti (**Laskowski és mtsai, 1953**;

**Kikuchi és mtsai, 1989**). Ennek magyarázata az lehet, hogy a gátolt tripszin a duodénumban újra aktiválódhat és így az emésztésben be tudja tölteni a szerepét (**Tschesche és mtsai, 1974**). A SPINK1 nem gátolja se a többi emésztőenzimet, se az enterokinázt. Mivel számos szövetben expresszálódik, így több tanulmány központjába is került, kimutatták például, hogy gátolja a spermiumokban található akroztint (**Huhtala és mtsai, 1984**), illetve a granzim A-t (**Tsuzuki és mtsai, 2003**).



**11. ábra. A SPINK1 szerkezete szalag ábrázolásban.** A reaktív hurok aminosavak (kék) a vad típusú SPINK1-nek megfelelően kerültek ábrázolásra. A modellt a PDBID 1CGI kristályszerkezet felhasználásával (Hecht és mtsai, 1991) készítettük (Dr. Szabó András munkája).

### 2.7.3 További SPINK fehérjék

A SPINK családba több gén is tartozik, az emberi genomon további SPINK géneket találunk. Az ezekről a génekről expresszálódó fehérjék mind Kazal típusú inhibitorok és szerepük a különböző szövetek védelme a proteolízistól. A SPINK2 gén a 4-es kromoszóma hosszú karján helyezkedik el és az ondóhólyagban, herékben, mellékherékben expresszálódik (**Rockett és mtsai, 2004**). A SPINK4 gén a 9-es kromoszóma rövid karján található és bélben, monocitákban (**Metsis és mtsai, 1992**) és az idegrendszerben fejeződik ki (**Norberg és mtsai, 2003**). A SPINK5, -5L2, -5L3, -6, -7 és -9 gének a SPINK1-hez hasonlóan szintén az 5q32 régióban helyezkednek el. A SPINK5 gén hámszövetben fejeződik ki, leírták a mellékpajzsmirigyben, pajzsmirigyben, bőrben, szájüregben és nemi ductusokban (**Magert és mtsai, 1999**). Mutációk a SPINK9 (**Brattsand és mtsai, 2009**) és SPINK5 génekben a Netherton szindróma nevű bőrbetegséget okozzák (**Bitoun és mtsai, 2002, Bitoun és mtsai, 2003**) A SPINK5L2 funkciója ismeretlen, a SPINK5L3-t plazminogén deficienciával, a

SPINK7-et pedig nyelőcső rákkal asszociálták, míg a SPINK6 és SPINK9 bőr-specifikus Kazal-típusú inhibitorai, szerepük a kallikrein gátlása (**a *genecards.org* oldalon elérhetőek az adatok a különböző SPINK fehérjékről**).

### 3. CÉLKITŰZÉSEK

Kitűzött céljaink a következők voltak:

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

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

## 4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 4.1 A Ty1 proteáz vizsgálata

#### 4.1.1 A Ty1 proteáz klónozása, expressziója és tisztítása

A Ty1 Gag-PR-His<sub>6</sub>-t kódoló pET11a vektort Dr. J.F. Lawler kutatócsoportja (The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland, USA) bocsájtotta rendelkezésünkre. A His<sub>6</sub> címkével fúzionált és a fúziós címkét nem tartalmazó Ty1 proteáz kódoló (543 bp hosszúságú) szekvenciát pET11a vektorba klónoztuk PCR módszerrel, a fent említett szekvenciát használva templátként, BamHI és NdeI restriktions endonukleázokkal. A plazmidokat High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid) segítségével preparáltuk. A szekvenciákat és a klónozás sikerességét szekvenálás segítségével ellenőriztük BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit-et (Applied Biosystems) használva, a kiértékelést ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) szoftverrel végeztük.

A tisztított plazmidokat BL21(DE3) *Escherichia coli* sejtekbe transzformáltuk, majd a baktérium kultúrát 100 ml Luria-Bertani (LB) médiumban 0,1% (w/v) ampicillinnel kiegészítve 37°C-on növesztettük amíg elérte a 0,6–0,8 600 nm-en mért optikai denzitást. A fehérje expressziót 1 mM izopropil β-D-1-tiogalaktopiranozid (IPTG) hozzáadásával indukáltuk és 4 órán keresztül 26°C-on inkubáltuk. A baktérium sejteket 6000 g-n, 4°C-on, 20 percig centrifugáltuk Thermo Scientific Sorvall Lynx 4000 centrifugával. A felülúszó eltávolítása után a sejt pelletet 10 ml lízis pufferben vettük fel (20 mM Tris-HCl, 5 mM imidazol, 0,5 mM NaCl, 10% glicerol, pH 8,0) (Lawler és mtsai, 2001) és 9 percig szonikáltuk jégen. A lizált mintát 20 percig 12000 g-n centrifugáltuk 4°C-on. Míg a Ty1 Gag-PR-His<sub>6</sub> fehérjét a szolubilis frakcióból nyertük ki, a Ty1 PR-t az inszolubilis frakcióból, amit 5 ml guanidin HCl-tartalmú pufferben vettünk fel (50 mM Tris-HCl, 6 M guanidin-HCl, pH 8,0). A nem-fúzionált natív Ty1 proteáz géliszűrővel tisztítottuk Superose 12 10/300 GL oszlopon (GE Healthcare) Äkta Purifier készülék (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) segítségével. A Ty1 Gag-PR-His<sub>6</sub> fehérjét Ni-kelát affinitás kromatográfiával tisztítottuk His-Trap oszlopon (GE Healthcare) Äkta Prime készülékkel (Amersham Pharmacia Biotech). A fehérjék tisztaságát a 14%-os poliakrilamid gélen végzett elektroforézis eredménye alapján határoztuk meg. A fehérjét tartalmazó frakciókat „élesztő *in vivo*-szerű” puffer ellen dializáltuk (50 mM foszfát puffer, 300 mM KCl, 245 mM glutamát, 50 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, pH 6,8) (Eunenn és mtsai, 2014) 16 órán át

4°C-on, majd 10K, valamint 3K Amicon Ultra 0,5 ml centrifugacsövek segítségével (Merck, Millipore) ultraszűréssel koncentráltuk. A fehérjekoncentráció meghatározását Bradford módszerrel (Sigma) végeztük.

#### *4.1.2 A Ty1 proteáz azonosítása Western-blot módszerrel*

A fehérjéket nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) választottuk el 14%-os poliakrilamid gélen, majd nitrocellulóz membránra transzferáltuk 70 perc alatt 100 V-on. Referenciaként ProSieve PreStained Protein Ladder Plus (Lonza) fehérje létrát használtunk. A szabad kötőhelyeket a membrán 2% tejpport tartalmazó Tris-pufferelt sóoldatban (TBS, pH 7,5) 1 órán át szobahőmérsékleten történő rázatásával blokkoltuk. A Ty1 fehérjék azonosítására (Gag-PR-His<sub>6</sub> és PR-His<sub>6</sub>) Western-blot módszert használtunk. Az elsődleges antitestet (egér anti-His, 460693, Invitrogen) 1:5000 hígításban használtuk (0,24 µg/ml) TBS + Tween20 (TTBS) + 0,1% tejpport tartalmazó pufferben. A membránt 2 órán át inkubáltuk az elsődleges antitesttel, szobahőmérsékleten, majd háromszor 15 percig mostuk TTBS pufferrel, végül 1 órán át inkubáltuk szobahőmérsékleten a másodlagos antitesttel (torma peroxidázzal konjugált kecske anti-egér másodlagos antitest, A4416, Sigma). A membránt végül háromszor 15 percig mostuk TTBS pufferrel majd a detektáláshoz SuperSignal West Pico kemilumineszcens szubsztrátot (Thermo Scientific) használtunk.

#### *4.1.3 Aktivitás mérések szintetikus oligopeptid szubsztrátokkal*

A mérésekhez használt oligopeptid szubsztrátok előállítását munkacsoportunk előzőleg már leírta (**Tózsér és mtsai, 1996**). A reakciók 10 µl „A” peptid puffert (20 mM PIPES, 100 mM NaCl, 0,5% Nonidet P-40, 10% glicerol, 2 mM dithiotreitol (DTT), pH 7,0), 5 µl tisztított Ty1 PR-His<sub>6</sub> (Ty1 Gag-PR-His<sub>6</sub>-ből processzáldott proteáz) vagy Ty1 PR-t, illetve 5 µl vízben oldott oligopeptid szubsztrátot (2 mg/ml) tartalmaztak. A különböző reakcióközegeket 2-5 órán át inkubáltuk 30°C-on. Az enzimreakciót 180 µl 1% trifluoroecetsav (TFA) hozzáadásával állítottuk le.

A hasítási termékeket HPLC módszerrel választottuk el 0-100% víz-acetonitril grádienssel 0,1 % TFA jelenlétében Merck Hitachi készülékkel. Az enzimkinetikai méréseket a Ty1 PR/IN hasítóhelyet reprezentáló oligopeptid szubsztráttal (VPTIN\*NVHTS) végeztük el (0,2–1,2 mM), a reakciókat 400–1600 nM Ty1 PR hozzáadásával indítottuk, majd 30°C-on

2 órán át inkubáltuk. A Ty1 PR-His<sub>6</sub> esetén 500–1500 nM enzimet adtunk a reakciókhoz és 2,5 órán át inkubáltuk. A kinetikai paramétereket a 20% hidrolízis alatti mérési adatokból számoltuk, amit a GraphPad Prism 5.00 Windows operációs rendszerre készült verzióval (GraphPad Software, La Jolla California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)) ábrázoltunk. A statisztikai különbségeket GraphPad QuickCalcs web szerveren értékeltük ki (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest2>).

#### *4.1.4 A pH, NaCl koncentráció, hőmérséklet és urea hatása a Ty1 proteáz aktivitására*

A különböző reakciókörülmények hatását a Ty1 proteáz aktivitására a VPTIN\*NVHTS szekvenciájú szintetikus oligopeptid szubsztráton vizsgáltuk. A reakciók összetétele a következő volt: 10 µl „B” peptid puffer (100 mM 2-(N-morfolino)-etán-szulfonsav (MES), 200 mM Tris, 100 mM Na-acetát), 5 µl vízben oldott szubsztrát (0,47 mM), valamint 5 µl enzim. A Ty1 PR-His<sub>6</sub> aktivitás pH optimum értékének vizsgálata során az enzim reakciót 4 órán át 30°C -on inkubáltuk, 6,5-től 9,0-ig terjedő pH érték skálán. A NaCl koncentráció hatását az aktivitásra szintén „B” peptid pufferben határoztuk meg, 0,5-től 2 M-ig terjedő NaCl koncentráció mellett 5 órán át 30°C-on inkubáltuk a reakciókat. A proteáz hőmérsékleti optimumát „A” peptid pufferben határoztuk meg 18-től 37°C-ig terjedő skálán. Az urea disszociációs állandó (UC<sub>50</sub>, a homodimer enzim aktivitásának 50%-os csökkenését eredményező urea koncentráció) meghatározását „B” peptid pufferben (pH 8,0) végeztük el, a reakciók 0,05-0,25 M ureát tartalmaztak és 4 órán át 30°C-on inkubáltuk.

#### *4.1.5 A Ty1 proteáz gátlás vizsgálata*

A gátlási vizsgálatok során különböző HIV-1 proteáz gátlószerek hatását vizsgáltuk Ty1 PR-His<sub>6</sub> aktivitására. Az atazanavir, nelfinavir, saquinavir, darunavir, amprenavir, lopinavir és tipranavir HIV-1 proteáz gátlószerek (**Mahdi és mtsai, 2015**), az acetil-pepszatin és pepsztatin A általános aszpartil proteáz inhibitorok (**Matúz és mtsai, 2012**), valamint a DMP-323 (**Fehér és mtsai, 2002**) gátlószer rendelkezésünkre álltak a kutatócsoport korábbi munkáiból. A reakciók 10 µl „A” peptid puffert, 4,8 µl oligopeptid szubsztrátot (VPTIN\*NVHTS, 0,44 mM), 5 µl tisztított Ty1 PR-His<sub>6</sub> enzimet (400–1600 nM), valamint 0,2 µl inhibitort tartalmaztak. A törzsoldatok a DMSO-ban oldott inhibitorokat ≤100 nM koncentrációban tartalmazták. A kontroll reakciókhoz 0,2 µl DMSO-t adtunk. A reakciókat 2 órán át 30°C-on inkubáltuk. Az 50%-os gátláshoz tartozó inhibitor koncentráció

(IC<sub>50</sub>) meghatározásához az acetil-pepszatint 100 nM-tól 1000 nM-ig terjedő koncentráció tartományban alkalmaztuk.

#### 4.1.6 Fluoreszcens fehérje szubsztrátok klónozása, expressziója és tisztítása

A fluoerszcens fehérje szubsztráttal végzett kinetikai mérésekhez a munkacsoportunk által kidolgozott kísérletes rendszert alkalmaztuk (**Bozóki és mtsai, 2018**), a rekombináns fehérjék előállításához az eredeti pDest-His<sub>6</sub>-MBP-mTurquoise2 expressziós plazmidot (maltóz-kötő fehérje, MBP; fluoreszcens fehérje, mTurquoise2) módosítottuk. A módosítás során az üres pDest-His<sub>6</sub>-MBP-mTurquoise2 plazmidot PacI és a NheI endonukleázokkal (New England Biolabs) hasítottuk. A fragmenseket 1% agaróz gélelektroforézissel választottuk el, a linearizált plazmidot NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kittel (Macherey-Nagel) nyertük ki a gélből. A klónozáshoz használt oligonukleotid (**4. táblázat**) tartalmazta a BamHI restrikciós enzim hasítóhelyét, valamint a (GGGGS)<sub>4</sub> flexibilis linkert kódoló szekvenciát. Az oligonukleotidot a tisztított linearizált pDest-His<sub>6</sub>-MBP-mTurquoise2 plazmiddal (150 ng) inkubáltuk 2 percig 65°C-on, majd 2 percig 4°C-on, majd T4 DNS ligáz puffer (10X) és T4 DNS ligáz (New England Biolabs) hozzáadása után a reakciót 16 órán át 16°C-on inkubáltuk. A ligált konstruktot (5 µl) hősokkal TOP10 *E. coli*-eredetű kompetens sejtbe transzformáltuk, majd ampicillin-szelektív LB agar lemezen növesztettük. A szelektált telepeket LB tápfolyadékban növesztettük, majd a plazmidokat High-Speed Plasmid Mini Kit-tel (Geneaid) izoláltuk, BigDye1 Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit-tel (Applied Biosystems) készítettük elő és kapilláris DNS szekvenálási eljárással ellenőriztük a sequencing forward primer-rel (**4. táblázat**). A Ty1 retrotranszpozon proteáz hasítóhelyeit kódoló szevenciákat a BamHI és PacI restrikciós endonukleázokkal (New England Biolabs) linearizált pDest-His<sub>6</sub>-MBP-(GGGGS)<sub>4</sub>-mTurquoise2 plazmidba klónoztuk. Az endonukleázokkal hasított linearizált plazmidot először 1% agaróz gélen futtatuk meg, NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit-tel (Macherey-Nagel) tisztítottuk, végül 150 ng tisztított linearis plazmidot 200 ng oligonukleotid primer-rel inkubáltunk és ligáltunk (**4. táblázat**).

4. táblázat. A klónozáshoz használt oligonukleotid primerek listája. A táblázatban szereplő oligonukleotidok szekvenciája a <http://rb.med.unideb.hu/index.php/research/oligos> weboldalon is megtalálható.

Név	Szekvencia
Ty1 PR forward	5'-GCGCATATGAATGTATCCACATCTAATAACTCTCC-3'
Ty1 PR reverse	5'-CGCGGATCCATTGATGGTGGGTACGG-3'
Új klónózó kazetta forward	5'TAATCTTCTGGATCCGGTGGCGGCGGCTCAGGTGGTGGTCTCGGGTGGCGGCGG TTCGGGCGGTGGTGGCTCAG-3'
Új klónózó kazetta reverse	5'CTAGCTGAGCCACCACCGCCCGAACCGCCGCCACCCGAGCCACCACCACCTGAGC CGCCGCCACCGGATCCAGAAGATTAAT-3'
PR/IN 10aa wt forward	5'- TAAAGTACCCACCATCAATAATGTCCATACAAGTG - 3'
PR/IN 10aa wt reverse	5'- GATCCACTTGTATGGACATTATTGATGGTGGGTACTTTAAT - 3'
PR/IN 20aa wt forward	5'- TAAACCATCAAATATCTCCGTACCCACCATCAATAATGTCCATACAAGTGAAAGT ACACGCAAAG - 3'
PR/IN 20aa wt reverse	5'- GATCCTTTGCGTGTACTTTCACTTGTATGGACATTATTGATGGTGGGTACGGAGATAT TTGATGGTTTAAT - 3'
PR/IN 20aa mut forward	5'- TAAAGGAGGCGGGGGTGGAGTACCCACCATCAATAATGTCCATACAAGTGGAGGC GGGGGTGGAG - 3'
PR/IN 20aa mut reverse	5'- GATCCTCCACCCCGCCTCCACTTGTATGGACATTATTGATGGTGGGTACTCC ACCCCGCCTCCTTTAAT - 3'
IN/RT 10aa wt forward	5'- TAAAATTCACCTGATTGCAGCTGTAAAAGCAGTAG - 3'
IN/RT 10aa wt reverse	5'- GATCCTACTGCTTTTACAGCTGCAATCAGGTGAATTTTAAT - 3'
IN/RT 20aa wt forward	5'- TAAAAGATCGAAGAAACGAATTCACCTGATTGCAGCTGTAAAAGCAGTAAAATCAA TCAAACCAG - 3'
IN/RT 20aa wt reverse	5'- GATCCTGGTTTGATTGATTTTACTGCTTTTACAGCTGCAATCAGGTGAATTCGTTTCTT CGATCTTTTAAT - 3'
Gag/PR 10aa wt forward	5'- TAAAACAGCCAGGGCTCACAATGTATCCACATCTG - 3'
Gag/PR 10aa wt reverse	5'- GATCCAGATGTGATACATTGTGAGCCCTGGCTGTTTTAAT - 3'
Gag/PR 20aa wt forward	5'- TAAAAATTCGAAATCGAAAACAGCCAGGGCTCACAATGTATCCACATCTAATAACTC TCCAGCG - 3'
Gag/PR 20aa wt reverse	5'- GATCCGCTGGGAGAGTTATTAGATGTGGATACATTGTGAGCCCTGGCTGTTTTCGATT TCGAATTTTAAT - 3'
szekvenáló forward primer	5'-GATGAAGCCCTGAAAGACGCGCAG-3'

#### 4.1.7 A fluoreszcens fehérje szubsztrátok vizsgálata SDS gélelektroforézissel

A rekombináns fluoreszcens szubsztrátokat BL21(DE3) *E. coli* sejtvonalon expresszáltuk, ahogy azt korábban már leírtuk (Bozóki és mtsai, 2018; Mótyán és mtsai, 2018; Bozóki és mtsai, 2019). A His<sub>6</sub> címkével ellátott rekombináns fluoreszcens szubsztrátokat a szolubilis frakcióból tisztítottuk, a felülúszót 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk folyamatos forgatás mellett Ni-NTA (Qiagen) mágneses gyöngyökkel. A gyöngy és felülúszó elválasztásához Dynamag™-2 magnetic particle concentrator mágneses állványt

(Thermo Fischer Scientific, Invitrogen) használtunk, majd pufferrel mostuk (50 mM Na-acetát, 300 mM NaCl, 5 mM imidazol, 0,05% Tween20, pH 7,0). Végül a mágneses gyöngyökhöz kötött szubsztrátokat „A” (10 mM PIPES, 75 mM NaCl, 0,25% Nonidet P-40, 5% glicerol, 75 mM KCl, 12,5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 61,25 mM Na-glutamát, 12,5 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,125 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,05% Tween20, pH 7,0) vagy „B” reakció pufferrel mostuk (50 mM MES, 100 mM Tris, 50 mM Na-acetát, 150 mM NaCl, 75 mM KCl, 12,5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 61,25 mM Na-glutamát, 12,5 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,125 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,05% Tween20, pH 8,0) (5. táblázat).

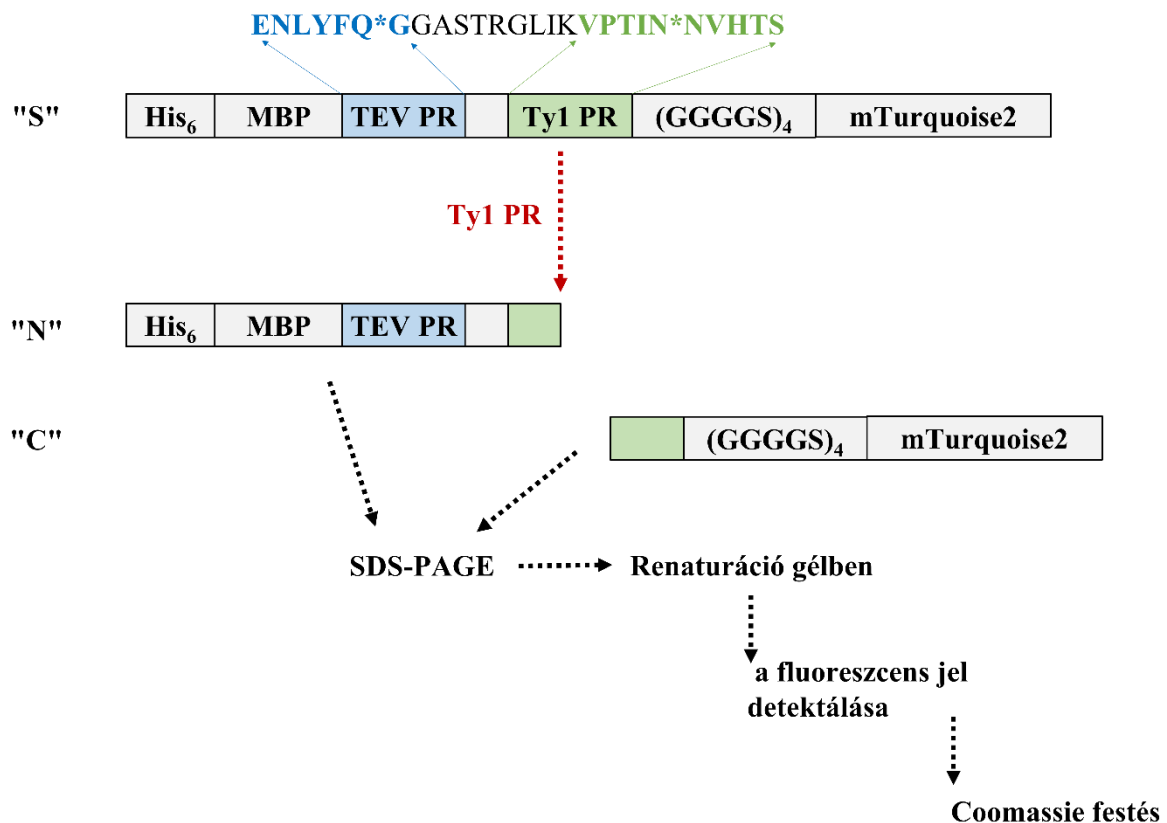
**5. táblázat. A fluoreszcens fehérje szubsztrátok vizsgálatához használt „A” és „B” reakció pufferek összetétele.** A „B” reakció puffer több NaCl-ot, valamint kevesebb detergenst tartalmazott.

Összetétel	„A” reakció puffer	„B” reakció puffer
<b>Puffer komponensek</b>	10 mM PIPES (pH 7,0), 12,5 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM MES (pH 8,0), 100 mM Tris, 50 mM Na-acetát, 12,5 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
<b>Só 1</b>	75 mM KCl	75 mM KCl
<b>Só 2</b>	61,25 mM Na-glutamát	61,25 mM Na-glutamát
<b>Só 3</b>	12,5 mM MgSO <sub>4</sub>	12,5 mM MgSO <sub>4</sub>
<b>Só 4</b>	0,125 mM CaCl <sub>2</sub>	0,125 mM CaCl <sub>2</sub>
<b>Só 5</b>	75 mM NaCl	150 mM NaCl
<b>Detergens 1</b>	0,05% Tween 20	0,05% Tween 20
<b>Detergens 2</b>	0,25% Nonidet P-40	<i>nem tartalmazott Nonidet P-40 detergenst</i>
<b>Glicerol</b>	5% glicerol	<i>nem tartalmazott glicerolt</i>

#### 4.1.8 A fluoerszcens szubsztrátok analízise gélelektroforézissel

A rekombináns szubsztrátokat az oldatban való emésztéshez eluciós pufferrel (100 mM EDTA, 0,05% Tween20, pH 8,0) eluáltuk a mágneses gyöngyökről, majd 10K Amicon Ultra 0,5 mL ultraszűrő csövekkel (Millipore) használva az elúciós puffert vízre cseréltük. A reakciók 10 µl „A” peptid puffert, 5 µl rekombináns fehérje szubsztrátot (1–3 mg/mL) és 5 µl Ty1 proteázt (300–1200 nM) tartalmaztak, míg a kontroll reakciók 5 µl „élesztő *in vivo*-szerű” puffert az enzim helyett. Az enzim reakciókat 16 órán át 30°C-on inkubáltuk és (SDS-t és β-merkaptotetanolt is tartalmazó) Laemmli mintapufferrel állítottuk le. Gélelektroforézis előtt a fehérjéket 95°C-on 7 percig denaturáltuk. A hasítatlan szubsztrátokat a hasítási termékektől SDS-PAGE segítségével választottuk el, 16%-os poliakrilamid gélen. A

denaturálódott fluoreszcens fehérjéket a poliakrilamid gélben renaturáltuk, úgy, hogy az SDS-t a gél vízben történő rázatva inkubálásával (szobahőmérsékleten) távolítottuk el. A renaturáció után a gélben a fehérjéket kék átvilágító tálcán történő átvilágítással (Dark Reader transilluminator, Clare Chemical Research) illetve Coomassie festéssel (Page- Blue Protein Staining solution, Thermo Scientific) detektáltuk (12. ábra).



**12. ábra. A fluoreszcens szubsztrátok hidrolízise és analízise SDS-PAGE gélen.** A rekombináns fúziós fehérje hasításnak sematikus ábrázolása. A TEV és Ty1 proteáz hasítási helyeket kék és zöld szín jelöli. A piros nyíl a Ty1 hasítási helyét jelöli a szubsztrátban („S”) az N- és C-terminális hasítási termékeket az „N” és „C” betűk jelölik. Hasítás után a fragmentumokat SDS-PAGE-gel választottuk el. A gélből ezután vízzel kimostuk az SDS-t és renaturáltuk a fehérjéket, amit kék fényvel történő átvilágítással vagy Coomassie festéssel detektáltunk.

#### 4.1.9 Kinetikai mérések fluoreszcens fehérje szubsztrátokon

A kinetikai mérések során a fluoreszcens fehérje szubsztrátokat a Ni-NTA mágneses gyöngyökhöz immobilizáltuk és növekvő koncentrációban 2 ml-es Protein Lobind mikrocentrifuga csövekbe (Eppendorf) mértük. A gyöngyök és felülúszó elválasztásához Dynamag™-2 mágneses állványt (Thermo Fischer Scientific, Invitrogen) használtunk, majd a

szubsztrátokat tartalmazó gyöngyöket egyenlő térfogatú „A” vagy „B” reakció pufferben vettük fel. A szubsztrát koncentrációt Bradford assay-el állapítottuk meg. A koncentráció meghatározásához használt kontroll mintákkal és vak mintákkal is ugyanígy jártunk el, annak érdekében, hogy detektáljuk a nem-specifikus szubsztrát disszociációt a mágneses gyöngyökről. A szubsztrát koncentráció megállapításához használt kontroll mintákat eluáló pufferben inkubáltuk a kinetikai mérések alatt. A kinetikai mérésekhez a PR/IN (VPTIN\*NVHTS), IN/RT (IHLIA\*AVKAV) és a Gag/PR (TARAH\*NVSTS) természetes hasítóhelyeket reprezentáló fluoerszcens rekombináns fehérje szubsztrátokat használtuk. A szubsztrátok koncentrációja kísérletenként változó volt az expressziós hozam, feltárt szolubilis frakció fehérje tartalma, valamint a mágneses gyöngyök szubsztrát kötése miatt. A szubsztrátok koncentrációja maximum 0,08 mM-t ért el és a mérésekhez a fúziós címke nélküli Ty1 proteázt használtuk mikromoláris koncentrációkban. A mintákat 2 órán át 30°C-on inkubáltuk, majd az enzimreakciót a mágneses gyöngyök és a folyadék fázis fizikai elválasztásával állítottuk le. Az így kapott felülúszó fluoreszcenciáját Synergy2 multimode mikrotiter lemez-olvasó készülékkel mértük meg, 400/10 nm gerjesztési és 460/40 nm elnyelési tartományú filterekkel. A relatív fluoreszcens intenzitás (RFU) értékeket a vak mintákkal korrigáltuk, elosztottuk a referencia egyenes meredekségével, végül ábrázoltuk az így kapott szubsztrát koncentráció ( $\mu\text{M}$ ) függvényében. A szubsztrát kontroll mintákat a szubsztrát koncentráció meghatározásához használtuk, a szubsztrát koncentrációhoz tartozó fluoreszcencia értéket úgy számoltuk ki, hogy elosztottuk az eluáló pufferben mért RFU értékeket a referencia egyenes meredekségével. A kinetikai paramétereket kevesebb, mint 20% hidrolízisnél mértük és Michaelis-Menten nem-lineáris regresszió alapján határoztuk meg, GraphPad Prism 5.00 verziójú szoftver segítségével (GraphPad Software, La Jolla, California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

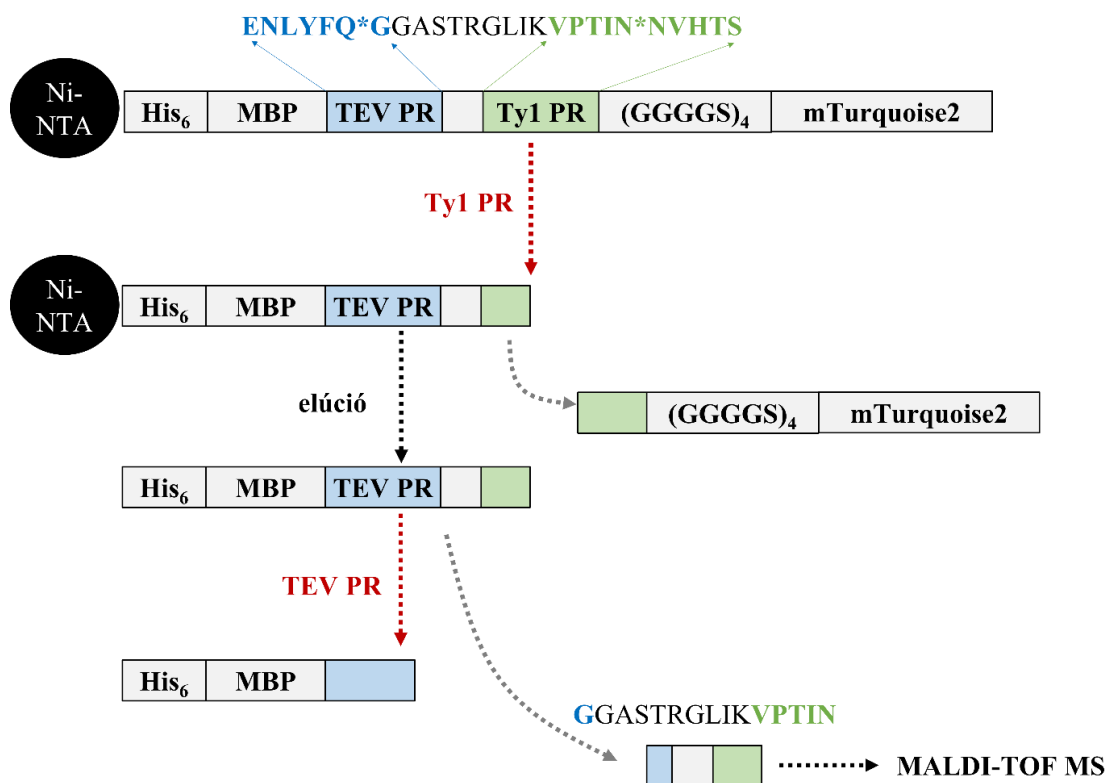
#### *4.1.10 In silico analízis, a Ty1 proteáz modellezése*

A másodlagos szerkezet jóslását PredictProtein szerver (**Yachdav és mtsai, 2014**) felhasználásával végezte munkacsoportunk a Ty1 proteáz szekvenciája alapján (UniProtKB: Q07793). A rendezetlenség jóslásához az IUPred web szervert (**Dosztányi és mtsai, 2005**) használtuk. A homológ modellezéshez templátként az élesztő DNS károsodás által indukálódó protein 1 (Ddi1) (PDBID: 2I1A) (**Sirkis és mtsai, 2006**) és a xenotróp egér leukémia vírussal rokon vírus (XMRV) proteáz (PDBID: 4EXH) (**Matúz és mtsai, 2012**)

szerkezetét használtuk, a szerkezetek felépítését a Modeller 9v13 (**Sali és Blundell, 1993**) szoftverrel végeztük. A szerkezetek megjelenítése a PyMOL Molecular Graphics System (Version 1.3 Schrödinger, LLC) szoftverrel történt. Az *in silico* analíziseket Dr. Mótyán János András végezte.

#### 4.1.11 Mintaelőkészítés és MALDI-TOF MS analízis

A mintaelőkészítés menetét a **13. ábra** szemlélteti. A Ni-NTA mágneses gyöngyökhöz kötöttük a rekombináns fehérje szubsztrátokat, majd a Ty1 proteázzal inkubáltuk „B” reakció pufferben 16 órán át 30°C-on. Inkubáció után a hasítási termékeket imidazol-tartalmú eluáló pufferrel eluáltuk (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 250 mM imidazol, pH 8,0). Az eluált frakciókat koncentráltuk, valamint 10K Amicon Ultra 0,5 ml ultraszűrő csövekkel (12000 g, 10 ismételt lépésben) az eluáló puffert 50 mM Tris pufferre (pH 8,0) cseréltük. A koncentrált mintákhoz a dohány karcolatos vírus (*Tobacco Etch Virus*, TEV) proteázt adtunk és 16 órán át 30°C-on inkubáltuk. A TEV proteázt kódoló plazmidot David S. Waugh (NCI-Frederick, USA) laborjától kaptuk és laborunkban a korábban leírt módszer szerint expresszáltuk és tisztítottuk (**Rachel és mtsai, 2001**). Inkubálás után a mintákban található hasítási termékek molekulatömegét mátrix-asszisztált lézer deszorpció, ionizáció, repülési idő mérésén alapuló tömegspektrometriával (MALDI-TOF MS) vizsgáltuk.



**13. ábra. A fluoreszcens szubsztrátok hidrolízisének és MALDI-TOF MS analízisre előkészítésének lépései.** A Ni-NTA gyöngyön immobilizált fluoreszcens szubsztrátokat először Ty1 proteázzal hasítottuk, eluáltuk, majd TEV proteázzal hasítottuk. Az alacsony molekulatömegű termékeket ezután MALDI-TOF MS analízisre küldtük.

A MALDI-TOF MS méréseket Dr. Nagy Tibor az Alkalmazott Kémia Tanszék munkatársa végezte el, Bruker Autoflex Speed tömeg spektrofotométer használatával. Minden minta esetében reflectron módot használtunk, ahol a reflectron feszültség 1, reflectron feszültség 2, ionforrás feszültség 1 és ionforrás feszültség 2 a következőképp volt beállítva: 21,00 kV, 9,55 kV, 19,00 kV and 16,65 kV. 500 Hz-en szilárd fázisú lézert alkalmaztunk (355 nm,  $\geq 100 \mu\text{J/pulse}$ ), 10000 pulzus összevonásával. A spektrumokat Peptide Calibration Standard kit segítségével (Bruker) értékeltük ki. A mintákat 2,5-dihidroxibenzoát (DHB) mátrixban készítettük elő 0,1% TFA-t tartalmazó víz-acetonitril (1:1) oldatban oldva, a koncentráció 100 mg/ml volt. 1  $\mu\text{l}$  mátrixot helyeztünk a lemezre és 1  $\mu\text{l}$  mintát adtunk hozzá, amit száradni hagyunk.

## 4.2 A SPINK1 vizsgálata

### 4.2.1 Expressziós plazmidok

Az expresszió vizsgálatához a vad típusú és mutáns SPINK1 fehérjéket kódoló DNS szekvenciát XhoI és BamHI restrikciós enzimekkel Dr. Szabó András pcDNA3.1(-) plazmidba klónozták (GenScript), C-terminális His<sub>10</sub> címkével, illetve anélkül. A fehérje tisztításokhoz a SPINK1 vad típusú és mutáns fehérjéket kódoló DNS szekvenciát korábban a SPINK-1-minigene-1 vektorba klónozták (**Kereszturi és mtsai, 2009**), amely a SPINK1 első intronját és egy C-terminális His<sub>10</sub> címkét is tartalmazott (SPINK1-His<sub>10</sub>) (**Kereszturi és mtsai, 2009**). A humán kationos tripszinogén (pTrapT7-Hu1, pcDNA3.1(-)-Hu1), humán anionos tripszinogén (pTrapT7-Hu2, pcDNA3.1(-)-Hu2) és tirozil protein szulfotranszferáz 2 (pcDNA3.1(-)-TPST2) expressziós plazmidok klónozását korábban már leírták, laborunkban ezekkel a plazmidokkal dolgoztunk (**Rónai és mtsai, 2009; Sahin-Tóth, 2000; Sahin-Tóth és Tóth, 2000, Kukor és mtsai, 2003; Nemoda és mtsai, 2006**).

### 4.2.2 Sejtkultúrák és transzfekeció

Humán embrionális vese sejteket (HEK293T) 6-lyukú sejtenyésző lemezen növesztettünk 10% magzati szarvasmarha szérummal (*fetal bovine serum*, FBS), 4 mM glutaminnal és 1x penicillin/sztreptomocinnal kiegészített 2 mL Dulbecco's Modified Eagle sejtenyésző médiumban (DMEM), 5% CO<sub>2</sub> inkubátorban. 70-90 %-os konfluenciánál a sejteket pcDNA3.1(-) plazmiddal (4 µg) transzfekeáltuk. A transzfekeációs elegyet úgy készítettük el, hogy a plazmidot 10 µl Lipofectamin 2000 és 0,25 ml Opti-MEM-hez adtuk és szobahőmérsékleten 20 percig inkubáltuk. A transzfekeáció során a felülúszót eltávolítottuk a sejtekről és a transzfekeációs elegyre cseréltük. A sejteket 15 órán át 5% CO<sub>2</sub> inkubátorban, 37°C-on inkubáltuk, majd a felülúszót eltávolítottuk a sejtekről és 1 mL PBS-sel (pH 7,4) mostuk őket, végül 1,5 ml Opti-MEM-et mértünk rájuk. A felülúszót végül 48 óra után távolítottuk el és 15% SDS-PAGE-el, illetve Western-blot-tal azonosítottuk a SPINK1 fehérjét.

#### 4.2.3 Western-Blot

Elektroforézis előtt a mintákat 2x Laemmli mintapufferrel és 1 M DTT-vel főztük 95°C-on 15 percig. A SPINK1-His<sub>10</sub> fehérjét Western-blottal mutattuk ki, a PVDF membránt blokkoló pufferbenben blokkoltuk (0,5% 1x blokkoló puffer és 0,1% Tween20), majd torna peroxidázzal konjugált anti-His antitesttel (penta-His HRP conjugate kit, katalógus szám 34460, Qiagen, Germantown, MD) 1:2000 arányban, 1 óráig inkubáltuk szobahőmérsékleten. A HRP aktivitást SuperSignal West Pico PLUS kemilumineszcens szubsztráttal (Thermo Scientific) detektáltuk. A His<sub>10</sub> címke nélküli, natív SPINK1 fehérjét szintén Western-blottal mutattuk ki, a PVDF membránt 10%-os tejpor oldatban blokkoltuk 1 órán át, majd egér monoklonális anti-SPINK1 antitesttel (MoBiTec PSKAN2 antibody, Boca Scientific, Dedham, MA) inkubáltuk 1:500 arányban, 1 éjszakán át. Másodlagos antitestként HRP-konjugált anti-egér IgG (katalógus szám HAF007, R&D Systems) antitestet használtunk 1:2000 hígítási arányban 1 órán át inkubáltuk a membránt. A HRP aktivitást SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity (Thermo Scientific) kemilumineszcens szubsztráttal detektáltuk.

#### 4.2.4 A SPINK1 expressziója és tisztítása

A HEK293T sejteket 70-90%-os konfluenciáig növesztettük T75 sejttenyésztő flasksokban, majd polietilénimin (PEI) illetve 10 µg expressziós vektor keverékével transzfektáltuk a sejteket (**Toldi és mtsai, 2020**). A sejteket 15 órán át inkubáltuk CO<sub>2</sub> inkubátorban, majd Opti-MEM-mel mostuk, végül 20 mL friss Opti-MEM-et mértünk rájuk. 48 óra inkubálás után a felülúszókat begyűjtöttük és újból 20 ml friss Opti-MEM-et mértünk a sejtekre. A SPINK1-His<sub>10</sub> fehérjét Ni-NTA Superflow Cartridge oszlopon tisztítottuk Akta Prime FPLC segítségével. Az oszlopot NPI-20 pufferben mostuk (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, pH 8,0) majd ~200 mL felülúszót injektáltunk 2 ml/perc sebességgel. Az oszlopot ezután 60 mL NPI-20 pufferrel mostuk, majd a SPINK1 fehérjét NPI-250 (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 250 mM imidazol, pH 8,0) pufferrel eluáltuk. A fehérjét tartalmazó frakciókat 20 mM Tris-HCl (pH 8,0) ellen dializáltuk, vagy 5 ml HiTrap sómentesítő oszloppal cseréltük le az eluáló puffert 20 mM Tris-HCl (pH 8,0) pufferre.

#### 4.2.5 A tripszinogén expressziója és tisztítása

A nem-szulfatált, rekombináns kationos tripszinogént (Hu1) és az anionos tripszinogént (Hu2) *Escherichia coli* BL21(DE3) baktérium sejtekben expresszáltuk. A sejteket 0,1 M Tris-HCl (pH 8,0), 5 mM EDTA pufferben szonikálással tártuk fel, majd centrifugáltuk 16000 g-n, 10 percig, 4 °C-on. A pelletet 4 M guanidin-HCl, 0,1 M Tris-HCl (pH 8,0), 2 mM EDTA és 30 mM DTT pufferben vettük fel, újra centrifugáltuk, végül a felülúszót 0,9 M guanidin-HCl, 0,1 M Tris-HCl (pH 8,0), 2 mM K-EDTA, 1 mM L-cisztein és 1 mM L-cisztein tartalmú pufferhez adtuk és egy éjszakán át inkubáltuk a fehérje folding elősegítésére. Az így kapott oldatból a tripszinogéneket ekotin-affinitás kromatográfiával tisztítottuk (Lengyel és mtsai, 1998; Király és mtsai, 2011). A szulfatált, natív tripszinogéneket humán hasnyálmirigy váladékból tisztítottuk MonoQ anion cserélő oszloppal, amit ekotin-affinitás kromatográfia követett (Sahin-Tóth és mtsai, 2006; Nemoda és mtsai, 2006). A nem-szulfatált és szulfatált tripszinogéneket HEK293T sejtekben is expresszáltuk, T75-ös flaskákban. A sejteket 10 µg pcDNA3.1(-)-Hu1 vagy pcDNA3.1(-)-Hu2 plazmiddal transzfektáltuk és 50 mM nátrium klorát jelenlétében növesztettük, ezzel gátolva az endogén ATP-szulfurilázt. A sejteket ko-transzfektáltuk 8 µg pcDNA3.1(-)-Hu1 vagy pcDNA3.1(-)-Hu2 plazmiddal és 2 µg pcDNA3.1(-)-TPST2 plazmid DNS-el. Utóbbi a tirozil protein szulfotranszferázt kódolja, amely a termelt tripszinogének szulfatálásáért felelős. A tripszinogéneket 200-400 ml sejtfeülúszóból tisztítottuk, ekotin-affinitás kromatográfiával. A zimogéneket humán enteropeptidázzal (R&D Systems, Minneapolis, MN) aktiváltuk és a tripszin koncentrációt titrálással határoztuk meg.

#### 4.2.6 Koncentráció meghatározások

A HEK293T sejtek által termelt SPINK1-His10 fehérje koncentrációját a sejtes felülúszóban humán tripszin elleni titrálással határoztuk meg. Felező hígítási sort készítettünk 96-lyukú lemezen 50 µl mintapufferben (0,1 M Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,05% Tween20, pH 8,0) és 50 µl tripszin oldatot (80 nM tripszin, 0,1 M Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,05% Tween20, pH 8,0) adtunk minden lyukhoz. Így a végtérfogat 100 µl volt, illetve minden lyukban 40 nM volt a tripszin végkoncentrációja. A reakciókat 30 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten majd 100 µl 200 µM-os Z-Gly-Pro-Arg-p-nitroanilidin szubsztrátot (szintén mintapufferben oldva) adtunk a lyukakhoz, így indítva a reakciókat. A tripszin aktivitását az inhibitor koncentráció függvényében ábrázoltuk, a SPINK1

koncentrációt a mérési pontokra illesztett egyenes X tengely keresztmetszetéből állapítottuk meg.

A marha tripszint p-nitrofenil p-guanidinobenzoáttal titráltuk (**Chase és mtsai, 1967**). Az *E. coli* BL21(DE3) sejtekben termeltetett ekotint a periplazmából nyertük ki majd tisztítottuk, ahogy azt már korábban leírták (**Király és mtsai, 2011**). Az ekotin koncentrációt úgy határoztuk meg, hogy marha tripszin ellen titráltuk. Ezt az ekotin törzsoldatot használtuk a humán tripszinek aktív centrum titrálására. A reakciók 25-50 nM tripszint tartalmaztak, és legalább 2 nagyságrenddel meghaladták az ekotin egyensúlyi disszociációs állandó értékét, amely 8,1 pM nem-szulfatált rekombináns kationos tripszinre, 3,2 pM nem-szulfatált rekombináns anionos tripszinre (*E. coli*-ban termelt), illetve 5,6 pM szulfatált kationos és 19,5 pM szulfatált anionos tripszinekre (hasnyálmirigyből tisztított). A SPINK1 koncentrációját szintén aktív centrum titrálással határoztuk meg 25-50 nM tripszinnel a reakciókban. Itt azokat az enzim törzsoldatokat használtuk, amelyeket az egyensúlyi állandók meghatározásánál is használtunk, a pontos mérések érdekében. A K41N SPINK1 mutáns esetében az inhibitor csak nagyon gyengén kötődött a tripszinhez, így a koncentrációját SDS-PAGE analízissel, Coomassie Blue festéssel, denzitometriával határoztuk meg, ismert koncentrációjú vad típusú SPINK1 standard-ot használva.

#### 4.2.7 Az egyensúlyi állandók meghatározása

A vad típusú és mutáns SPINK1 fehérjék kötődését a tripszin izoformákhoz az egyensúlyi állapotban a disszociációs állandó ( $K_D$ ) meghatározásával állapítottuk meg (**Szabó és mtsai, 2014; Szabó és mtsai, 2011**). A 0,2 ml térfogatú reakciókat 0,1 M Tris-HCl (150 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,05% Tween20, pH 8,0) pufferben állítottuk össze, állandó tripszin koncentráció mellett növekvő SPINK1 koncentrációval, majd 15 órán át inkubáltuk, kivéve K41N SPINK1 mutánst, amit 1 órán át inkubáltunk. Az egyensúly beállta után a szabad tripszin koncentrációját 5  $\mu$ l, 6 mM-os Z-Gly-Pro-Arg-AMC fluoreszcens szubsztrát felhasználásával határoztuk meg, fekete 96-lyukú platen, 380 nm excitációs és 460 nm emissziós hullámhosszon. A  $K_D$  értékeket a szabad tripszin és teljes inhibitor koncentráció függvényében határoztuk meg a következő egyenlettel:  $y = E - (E + x + \sqrt{K - ((E + x + K)^2 - 4Ex)})/2$ , ahol az x a független változó, a teljes inhibitor koncentráció; az y pedig a függő változó, a szabad tripszin koncentráció az egyensúly beállta után;  $K = K_D$ ; E pedig az össz-

tripszin koncentráció. A görbék legalább három mérés eredményének adataiból, globális illesztéssel készítettük.

#### 4.2.8 Enzim asszociáció vizsgálata

A SPINK-tripszin asszociációs sebességi állandót Szepessy és Sahin-Tóth közleményében leírtak alapján mértük meg (Szepessy és Sahin-Tóth, 2006). A reakciók 50 pM tripszint és 500 pM SPINK1-et tartalmaztak 0,1 M Tris-HCl pufferben (150 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,05% Tween20, pH 8,0), szobahőmérsékleten inkubálva. A tripszin aktivitását 3,75 µl 6 mM Z-Gly-Pro-Arg-AMC fluorogén szubsztrát hozzáadását követően mértük 96-lyukú platen, 380 nm gerjesztési és 460 nm kibocsájtási hullámhosszon. A pszeudo-elsőrendű állandót ( $k_{obs}$ ) úgy kaptuk meg, hogy a  $\ln(vt/v_0)$  szemilogaritmikus ábrázolásból kapott egyenes meredekségét a gátlási idő függvényében ábrázoltuk, ahol  $v_0$  a maximum, nem gátolt enzim aktivitás,  $vt$  a szabad enzim aktivitása, a következő egyenlet alapján:  $(-k_{obs})(idő)=\ln(vt/v_0)$ . A másodrendű asszociációs sebességi állandót ( $k_{on}$ ) a pszeudo-elsőrendű állandó és gátlószer koncentráció hányadosából számoltuk.

#### 4.2.9 Enzim disszociáció vizsgálata

A proteáz-inhibitor komplexet 11 nM SPINK1 és 10 nM végkoncentrációjú tripszin összekeverésével és 1 órán át 23°C-on történő inkubációjával készítettük el, 0,1 M Tris-HCl (150 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,05% Tween20, pH 8,0) pufferben. A reakciókat ezután 50 pM, 100 pM, 150 pM és 200 pM végkoncentrációra hígítottuk a fent említett pufferrel. A reakciókat 0,6 mM Z-Gly-Pro-Arg-AMC szubsztrát hozzáadásával indítottuk. A tripszin aktivitást fekete 96-lyukú lemezen, 380 nm excitációs és 460 nm emissziós hullámhosszon követtük szobahőmérsékleten. A parabolikus görbék a másodrendű polinominális egyenlettel illesztettük ( $y=a+bx+cx^2$ ), ahol a kvadratikus disszociációs koefficiens  $c=1/2$  kezdeti komplex koncentráció  $x$  disszociációs állandó,  $k_{off}$   $x$  átviteli (*turnover*) szám. Az illesztett  $c$  koefficiens a kezdeti komplexképződés koncentrációjának függvényében ábrázoltuk (pM), a  $k_{off}$ -ot (mp<sup>-1</sup>) az egyenes meredekségéből határoztuk meg. A tripszin átviteli számát a peptid szubsztrátra a kalibrációs egyenes segítségével, a disszociációs mérésekkel azonos kísérleti körülmények között állapítottuk meg. A szubsztrát hidrolízis

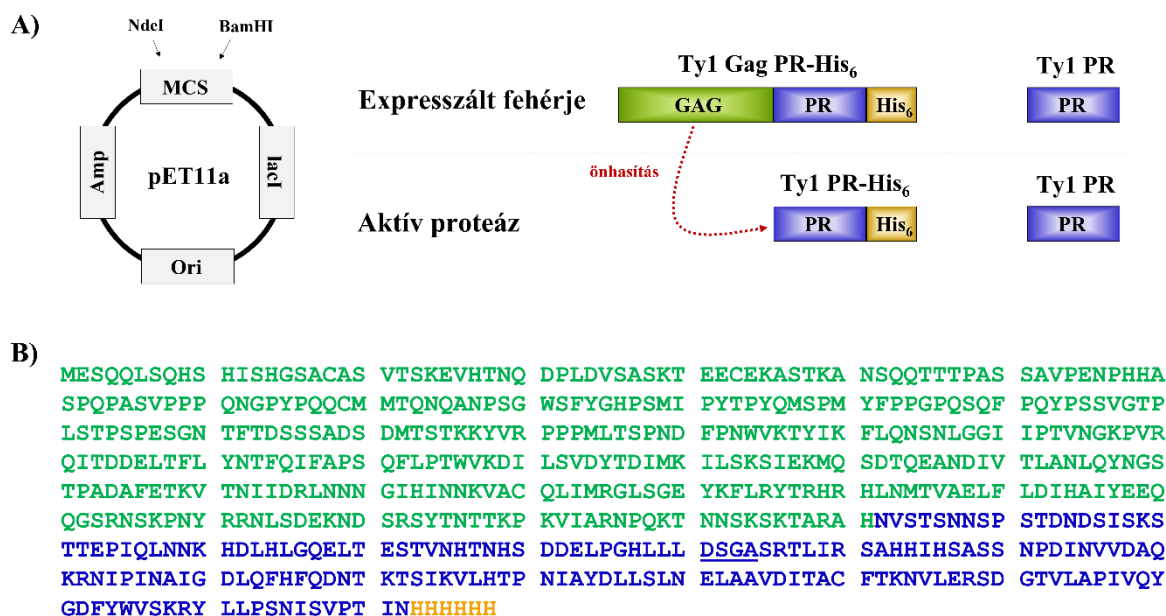
kezdeti sebességét (RFU/mp) az enzim koncentráció függvényében ábrázoltuk, az így kapott egyenes meredeksége az átviteli szám (RFU/mp/pM).

## 5. EREDMÉNYEK

### 5.1 A Ty1 proteáz vizsgálata

#### 5.1.1 A Ty1 proteáz klónozása, expressziója és tisztítása

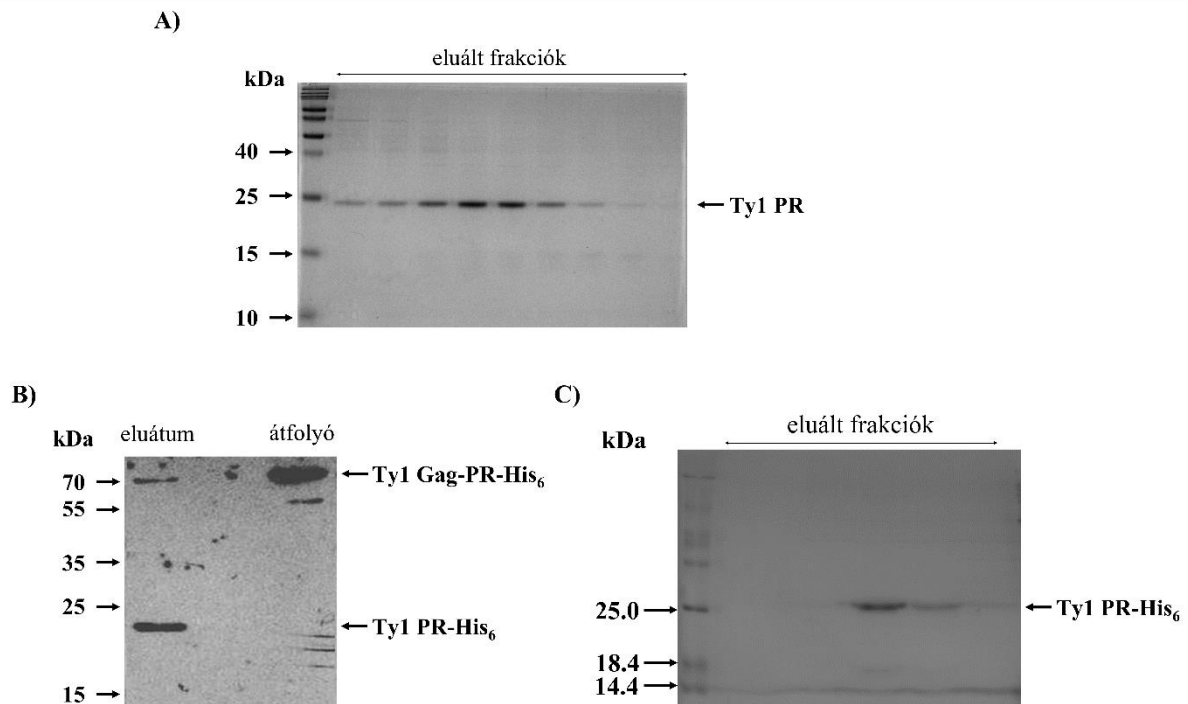
A Ty1 proteáz natív, His<sub>6</sub> fúziós címkét nem tartalmazó változatát pET11a plazmidba klónoztuk és szekvenálással ellenőriztük. A címke nélküli és a His<sub>6</sub> címkét tartalmazó (Ty1 Gag-PR-His<sub>6</sub>) Ty1 proteázt kódoló plazmidokat (**14. ábra**) egyaránt *E. coli* sejtekbe transzformáltuk.



**14. ábra. A Ty1 proteáz szekvenciája és processzálódása.** A) A Ty1 proteáz klónozása pET11a vektorba NdeI és BamHI restriktív enzimekkel. A Ty1 Gag-PR-His<sub>6</sub> prekursor poliproteint illetve a fúziós címke nélküli proteázt BL21(DE3) *E. coli* sejtekben expresszáltuk. A Ty1 PR-His<sub>6</sub> fehérje autoprocesszálódással (piros pontozott vonal) hasítódik ki a Gag-PR-His<sub>6</sub> prekursor fehérjéből. Rövidítések: Amp, ampicillin rezisztencia gén; lacI, lac represszor fehérjét kódoló szakasz; Ori, a bakteriális replikáció kiinduló pontja; MCS, multi klónzó hely. B) A Ty1 Gag-PR-His<sub>6</sub> prekursor poliprotein szekvenciája. Zöld: GAG fehérje; kék: proteáz; narancs: His<sub>6</sub>. A konszenzus aktív hely motívumot aláhúzás jelöli.

Ezt követően a Ty1 proteázt expresszáltuk, majd gélszűréssel tisztítottuk (**15A. ábra**). A Ty1 Gag-PR-His<sub>6</sub> fehérje feltételezhetően autoproteolízis révén processzálódott a Ni-kelát kromatográfiával történő tisztítás során, így a Ty1 Gag-PR-His<sub>6</sub> prekursor (molekulatömeg:

~72 kDa) fehérjéről a Ty1 PR-His<sub>6</sub> formája hasadt le (molekulatömeg: ~21 kDa). Ezt a jelenséget korábban már megfigyelték a Ty1 proteáz esetében (Merkulov és mtsai, 1996). A proteáz mindkét formáját azonosítottuk Western-blot módszerrel (15B. ábra). A processzált Ty1 PR-His<sub>6</sub>-t használtuk a biokémiai tulajdonságok vizsgálata során (15C. ábra).



**15. ábra. A Ty1 proteáz frakcióinak SDS gélelektroforézis és Western-blot analízise.** A) Gélszűrővel tisztított címke nélküli Ty1 PR frakciók Coomassie festékkel festett SDS-PAGE gélképe. B) A Ty1 PR-His<sub>6</sub> tisztítás frakcióinak Western-blot képe. A tisztítás során a Ty1 Gag-PR-His<sub>6</sub> prekursor poliproteinból (~72 kDa) processzálódik a Ty1 PR-His<sub>6</sub> (~21 kDa) fehérje, amelyeket anti-His antitesttel detektáltunk. A processzált formát az eluátumban, a teljes processzálatlan poliproteint az átfolyóban mutattuk ki. C) A Ty1 PR-His<sub>6</sub> (~21 kDa) tisztított frakciók gélképe. A proteáz esszékhöz azokat a frakciókat használtuk fel, amelyek kizárólag processzált formát tartalmaztak.

### 5.1.2 Ty1 proteáz aktivitás esszé szintetikus oligopeptid szubsztrátokkal

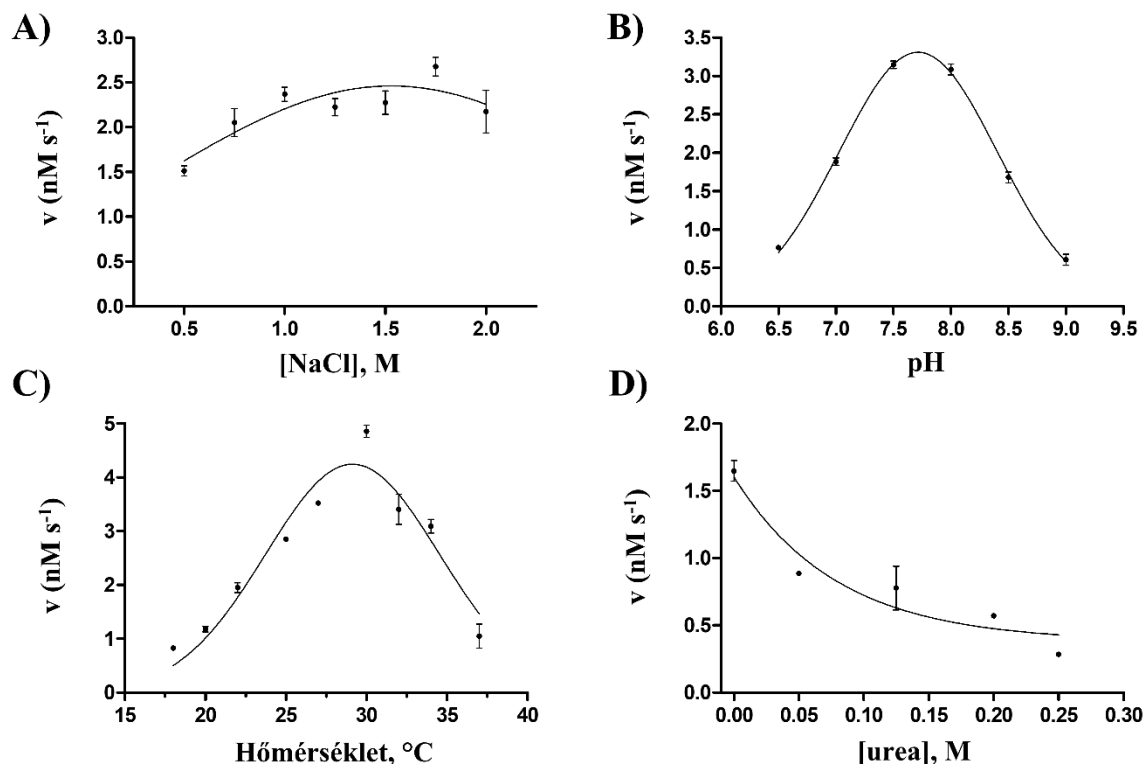
Az optimális feltekeredés elérése érdekében a Ty1 proteázt számos különböző puffer ellen dializáltuk és az aktivitást számos pufferben vizsgáltuk, amiben a retrovirális proteázok korábbi enzmatikus vizsgálatok során aktivitást mutattak (Louis és mtsai, 1999). A reakciókban a proteázt és a szintetikus oligopeptid szubsztrátokat a pufferhez adtuk, 30°C-on inkubáltuk, végül TFA hozzáadásával állítottuk le, majd az aktivitás megállapítása érdekében a keletkezett termékeket a hasítatlan szubsztrátoktól reverz fázisú oszlopon választottuk el, és meghatároztuk a szubsztrátok konverziójának mértékét.

A Ty1 proteáz több különböző pufferben sem mutatott aktivitást, a következő pufferek egyikében sem, amelyek a reakcióban kétszeresre hígulnak: 1) 20 mM PIPES, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 10% glicerol, 0,5% NP-40 (Igepal CA-630), pH7,0; 2) 20 mM PIPES, 2 mM DTT, 100 mM NaCl, 10% glicerol, 0,5% Nonidet P-40, pH 7,0; 3) 50 mM Na-acetát, 100 mM NaCl, pH 5,0. Ennek oka feltételezésünk szerint az EDTA jelenléte, vagy az alacsony NaCl koncentráció lehetett. Kizárólag az „élesztő *in vivo*-szerű” puffer ellen dializált (Eunenn és Bakker, 2014) fehérje esetében tapasztaltunk enzimaktivitást, a reakciókat PIPES- („A” peptid puffer) vagy MES-alapú („B” peptid puffer) pufferekben végezve. A pufferek aránya a reakciókban is fontos tényezőnek bizonyult az aktivitás szempontjából. Az optimális arány  $\frac{1}{4}$  víz,  $\frac{1}{4}$  „élesztő *in vivo*-szerű” puffer,  $\frac{2}{4}$  PIPES vagy MES alapú puffer. A puffer összetétel meghatározása mellett vizsgáltuk a különböző reakció körülmények hatását az aktivitásra, így karakterizáltuk a proteáz biokémiai tulajdonságait (**16 ábra**).

A NaCl koncentráció hatását vizsgáltuk az enzim aktivitásra, a legoptimálisabbnak a 1,5-2 M tartomány bizonyult (**16A. ábra**). A HIV-1, HTLV-1, -2, -3 és HFV proteázokhoz hasonlóan (Fenyőfalvi és mtsai, 1999; Boross és mtsai, 1999) a NaCl koncentráció növelte a Ty1 proteáz aktivitását >1 M NaCl koncentrációban. A *D. melanogaster* Copia transzpozon proteáz szintén magas, 2 M NaCl koncentráció mellett érte el az aktivitás maximumát, ezalatt és felett csökkent az aktivitása (Athauda és mtsai, 2006).

A Ty1 proteáz pH optimuma enyhén lúgosnak adódott (pH 7,7) (**16B. ábra**), ami magasabb, mint általában a retrovirális vagy retrovírus-szerű proteázoké. Például a HFV proteáz pH optimuma 6,6–6,8 (Fenyőfalvi és mtsai, 1999), míg a HIV-1 proteázé 4-6 közötti tartományba esik (Boross és mtsai, 1999). A humán ASPRV1 proteáz (Golda és mtsai, 2020b) optimuma pedig az enyhén savas tartományba esik (6,0-6,5). A pH optimum a humán *peg10* gén által kódolt apai allélról expresszáldó gén 10 (*paternally expressed gene 10*, PEG10) proteáz enzim esetében is lúgos tartományba esik pH 6,9-7,4 közé a Ty1 proteázhoz hasonlóan. Érdekeség, hogy a *D. melanogaster* Copia transzpozon proteáz pH optimuma a HIV-1 proteázhoz hasonló, a legmagasabb aktivitást 4-es pH értéken mérték szintetikus szubsztráton (Athauda és mtsai, 2006).

A Ty1 proteáz hőmérsékleti optimuma 30°C körülnek adódott, magasabb hőmérsékleten alacsonyabb aktivitás értékeket mértünk (**16C. ábra**). Ezt a tulajdonságot megfigyelték sok nem retrovírus-eredetű proteáz tanulmányozása során is, például a dohány érfoltosság vírus (*tobacco vein mottling vírus*, TVMV) és a TEV PR esetén is alacsonyabb aktivitást mérték 34°C felett (Nallamsetty és mtsai, 2004).



**16. ábra.** A Ty1 proteáz biokémiai karakterizálása, az aktivitás mérése különböző körülmények mellett. A reakció körülmények hatása a Ty1 proteáz aktivitására. Minden méréshez VPTIN\*NVHTS szintetikus peptid szubsztrátot használtunk és meghatároztuk a reakció sebességét (nM x s<sup>-1</sup>). A hibasávok szórást jelölnek (n=2). A) A NaCl koncentráció hatását a Ty1 PR-His<sub>6</sub> aktivitására, növekvő NaCl koncentráció mellett. B) A Ty1 proteáz pH optimumának meghatározása a 6,5–9,0 pH tartományban. C) A proteáz hőmérséklet optimum görbéje. D) Az urea koncentráció hatása (0–0,25M) a proteáz aktivitására.

Ezzel ellentétben a HFV proteáz (Fenyőfalvi és mtsai, 1999) és a HIV-1 proteáz (Boross és mtsai, 1999) legmagasabb aktivitás értékeit 37 °C-on mérték. Az általunk megállapított hőmérséklet optimum a Ty1 proteáz esetén egyezést mutat a Lawler és munkatársai által megfigyelt alacsonyabb retrotranszpozíciós képességgel magasabb hőmérséklet tartományban (32–36 °C), ami a Ty1 proteáz hőmérséklet szenzitálásának az eredménye (Lawler és mtsai, 2002). A *D. melanogaster* Copia transzpozon proteáz aktivitásának maximumát 70 °C-n írták le, valamint a relatív aktivitás nem csökkent 50% alá a 20–70 °C-os hőmérséklet tartományban (Athauda és mtsai, 2006).

A Ty1 proteáz érzékenynek bizonyult egy kaotropikus ágenssel, az ureával szemben, ami jelentősen csökkentette az aktivitást (16D. ábra). Az általunk megállapított urea koncentráció, ami 50%-os aktivitás-vesztést okoz, az úgynevezett urea disszociációs állandó

( $UC_{50}$ ) 0,05 M értéknek adódott a Ty1 proteáz esetében. Ez egy nagyságrenddel alacsonyabb az ASPRV1 ( $UC_{50} = 0,54$  M), míg két nagyságrenddel kisebb a HIV-1 proteáz esetében meghatározott értékhez képest ( $UC_{50} = 1,47$  M), viszont hasonló a munkacsoportunk által az XMRV proteáz esetében meghatározott  $UC_{50} = 0,2$  M értéknél (**Matúz és mtsai, 2012**).

Az alacsonyabb  $UC_{50}$  érték alacsonyabb dimer stabilitást sejtet a Ty1 proteáz esetén, amelynek a lehetséges szerkezeti okára a későbbiekben *in silico* analízis részben térünk ki. A retrovirális proteázok, úgy mint, HIV-1, HTLV-1, BLV és MMLV proteázok általában magas aktivitást mutatnak a természetes hasítóhelyeikkel megegyező szekvenciájú mesterséges oligopeptid szubsztrátokon (**Tózsér, 2010**), ellenben a Ty1 proteáz és a Ty1 PR-His<sub>6</sub> is alacsony aktivitást mutatott a Ty1 természetes hasítóhellyel azonos mesterséges oligopeptid szubsztrátokon. Hasonlóképp alacsony aktivitást figyeltek meg laborunk munkatársai a HFV proteáz és a Gag-encoded Avian myeloblastosis vírus (AMV) proteáz esetén (**Fenyőfalvi és mtsai, 1999**). A Ty1 proteáz és a Ty1 PR-His<sub>6</sub> is hasította a VPTIN\*NVHTS szekvenciájú szintetikus oligopeptid szubsztrátot, ami a PR/IN hasítóhelyet reprezentálja a Ty1 retrotranszpozon prekursor fehérjében. A kinetikai paramétereket ezen szubsztrát segítségével mértük (**6. táblázat**). A katalitikus állandó ( $k_{cat}$ ) a His címkével ellátott és a His címke nélküli natív fehérje esetén nem mutatott szignifikáns eltérést, ami arra utalt, hogy a C-terminális hexahisztidin címke nem befolyásolja a fehérje foldingját és aktivitását.

A mért alacsony specificitási állandót a PR/IN szubsztrátra munkacsoportunk már a HFV proteáz esetén is meghatározta (**6. táblázat**), a proteázra optimalizált körülmények mellett  $0,007 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  értéket állapított meg. Teszteltük a Ty1 retrotranszpozon többi hasítóhelyét, így az IN/RT (IHLIA\*AVKAV) és a Gag/PR (TARAH\*NVSTS) hasítóhelyet reprezentáló szintetikus szubsztrátot is, ezeken a szubsztrátokon azonban nem figyeltünk meg aktivitást (**6. táblázat**).

**6. táblázat. A Ty1 proteáz kinetikai paramétereit.** (A) A Ty1 retrotranszpozon proteáz oligopeptid szubsztrátokon meghatározott kinetikai paramétereit. A PR/IN (VPTIN\*NVHTS), IN/RT (IHLIA\*AVKAV) és a Gag/PR (TARAH\*NVSTS) természetes hasítóhelyeket reprezentáló oligopeptid szubsztrátokat Ty1 PR és Ty1 PR-His<sub>6</sub> enzimekkel inkubáltuk. (B) A HFV proteáz oligopeptid szubsztrátokon meghatározott kinetikai paramétereit a kutatócsoport korábbi munkája alapján (Fenyőfalvi és mtsai, 1999). (C-D) A Ty1 retrotranszpozon proteáz His<sub>6</sub>-MBP-mTurquoise2 rekombináns fluoreszcens fehérje szubsztrátokon meghatározott kinetikai paramétereit. A szubsztrátokban lévő hasítóhely-szekvenciák megfelelnek a Ty1 retrotranszpozon PR/IN, IN/RT és Gag/PR természetes hasítóhelyeinek. A szubsztrátokat Ty1 proteázzal „A” (C) vagy „B” (D) reakció pufferben hasítottuk. Szórás (n≥2).

A	Oligopeptid	Enzim	K <sub>m</sub> (mM)	k <sub>cat</sub> (s <sup>-1</sup> )	k <sub>cat</sub> /K <sub>m</sub> (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
		VPTIN*NVHTS	Ty1 PR	0,21 ± 0,07	0,006 ± 0,001
	VPTIN*NVHTS	Ty1 PR-His <sub>6</sub>	0,25 ± 0,09	0,009 ± 0,001	0,036 ± 0,0132
	IHLIA*AVKAV	Ty1 PR, Ty1 PR-His <sub>6</sub>	nem mutattunk ki hasítást		
	TARAH*NVSTS	Ty1 PR, Ty1 PR-His <sub>6</sub>	nem mutattunk ki hasítást		
B	Oligopeptid	Enzim	K <sub>m</sub> (mM)	k <sub>cat</sub> (s <sup>-1</sup> )	k <sub>cat</sub> /K <sub>m</sub> (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
	VPTIN*NVHTS	HFV PR	0,03 ± 0,01	0,0002 ± 0,00003	0,007 ± 0,0024
	IHLIA*AVKAV	HFV PR	1,00 ± 0,16	0,0020 ± 0,00020	0,002 ± 0,0004
	TARAH*NVSTS	HFV PR	nem mutattunk ki hasítást		
C	Fluoreszcens szubsztrát	Hasítóhely szekvencia	K <sub>m</sub> (μM)	k <sub>cat</sub> (s <sup>-1</sup> ) (*10 <sup>-4</sup> )	k <sub>cat</sub> /K <sub>m</sub> (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
	PR/IN_10aa_wt	VPTIN*NVHTS	4,64 ± 1,52	2,16 ± 0,22	0,047 ± 0,016
	PR/IN_20aa_wt	PSNISVPTIN*NVHTSESTRK	1,90 ± 0,52	2,45 ± 0,19	0,129 ± 0,037
	PR/IN_20aa_mut	GGGGVPTIN*NVHTSGGGGG	1,90 ± 0,61	2,52 ± 0,17	0,133 ± 0,044
	IN/RT_10aa_wt	IHLIA*AVKAV	1,60 ± 0,78	0,58 ± 0,05	0,036 ± 0,018
	IN/RT_20aa_wt	RSKKRIHLIA*AVKAVKSIKP	3,31 ± 0,65	0,75 ± 0,04	0,023 ± 0,005
	Gag/PR_10aa_wt	TARAH*NVSTS	4,55 ± 1,43	3,20 ± 0,17	0,070 ± 0,022
	Gag/PR_20aa_wt	NSKSKTARAH*NVSTSNNSPS	2,27 ± 0,90	0,66 ± 0,05	0,029 ± 0,012
D	Fluoreszcens szubsztrát	Hasítóhely szekvencia	K <sub>m</sub> (μM)	k <sub>cat</sub> (s <sup>-1</sup> ) (*10 <sup>-4</sup> )	k <sub>cat</sub> /K <sub>m</sub> (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
	PR/IN_10aa_wt	VPTIN*NVHTS	4,50 ± 1,76	19,15 ± 2,5	0,426 ± 0,176
	PR/IN_20aa_wt	PSNISVPTIN*NVHTSESTRK	10,00 ± 1,59	55,80 ± 4,0	0,558 ± 0,097
	PR/IN_20aa_mut	GGGGVPTIN*NVHTSGGGGG	6,12 ± 1,33	38,00 ± 2,8	0,621 ± 0,142
	IN/RT_10aa_wt	IHLIA*AVKAV	6,96 ± 2,21	20,00 ± 2,0	0,287 ± 0,096
	IN/RT_20aa_wt	RSKKRIHLIA*AVKAVKSIKP	10,81 ± 3,79	30,30 ± 4,7	0,280 ± 0,108
	Gag/PR_10aa_wt	TARAH*NVSTS	18,21 ± 4,58	46,60 ± 6,1	0,256 ± 0,072
	Gag/PR_20aa_wt	NSKSKTARAH*NVSTSNNSPS	7,92 ± 9,11	34,96 ± 11,9	0,441 ± 0,530

### 5.1.3 Kinetikai mérések fluoreszcens fehérje szubsztrátokon

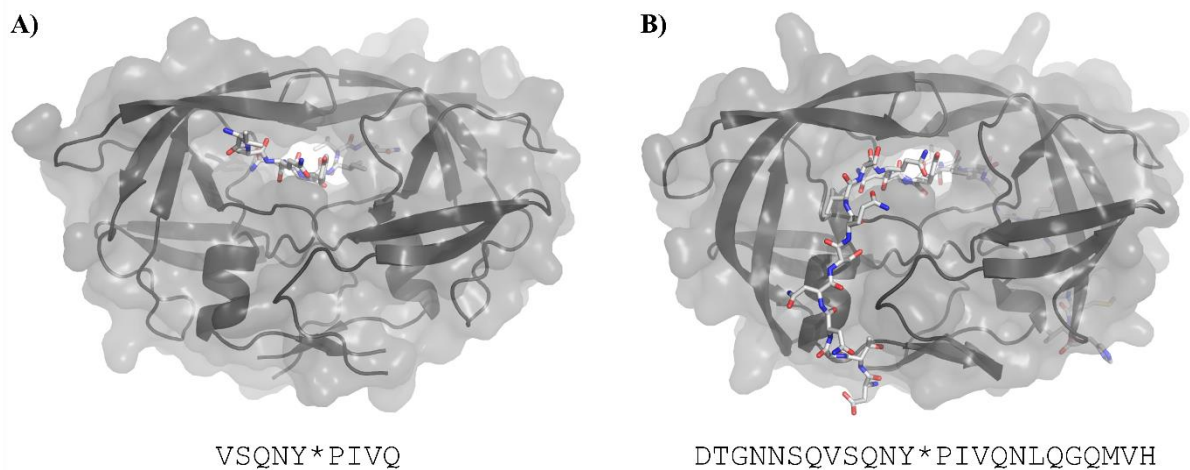
A kinetikai mérésekhez az előzőekben publikált rekombináns fúziós fehérje szubsztrátokat használtuk (Bozóki és mtsai, 2018; Bozóki és mtsai, 2019). A szubsztrátok tartalmaztak egy N-terminális His<sub>6</sub> címkét, ami elősegítette az immobilizációt, valamint egy maltóz-kötő fehérje címkét (MBP) ami segítette a foldingot, illetve egy C-terminális fluoreszcens fehérjét (mTurquoise2), ami a fluoreszcens detektálást tette lehetővé. A szubsztrátok továbbá tartalmaztak egy TEV proteáz kontroll hasítóhelyet is, amelyet a Ty1 proteáz hasítási pozíciójának azonosítása során alkalmaztunk, valamint tartalmazták a Ty1 retrotranszpozon hasítóhelyet (6C. és 6D. táblázat). Az előzőekben leírt szubsztrátokat

(Bozóki és mtsai, 2018; Bozóki és mtsai, 2019) annyiban módosítottuk, hogy a fluoreszcens fehérje rész elé egy (GGGS)<sub>4</sub> flexibilis linkert (Chen és mtsai, 2013) klónoztunk, ezzel megnövelve a távolságot az MBP és mTurquoise2 fúziós címkék között, ami a hasítóhely jobb hozzáférhetőségét biztosította a proteáz számára. Hét különböző, a természetes hasítóhelyeket reprezentáló fluoreszcens szubsztráton vizsgáltuk a Ty1 proteáz aktivitását, különböző pufferekben (6C. és 6D. táblázat). Számos komponens megegyezett a pufferekben, kivétel ezek közül a PIPES tartalmú „A” reakció puffer, amely alacsonyabb pH-jú volt (7,0), glicerolt és Nonidet P-40-t tartalmazott. A MES-alapú „B” reakció puffer pH-ja magasabb, pH 8,0 volt, illetve a NaCl koncentráció is eltért a puffer A-tól, a magasabb Ty1 proteáz aktivitás eléréséhez optimalizáltuk (16. ábra). A katalikus állandók jelentősen magasabbak voltak „A” reakció pufferben (6C. táblázat) mint „B” reakció pufferben (6D. táblázat).

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

A Ty1 proteáz kinetikai paramétereit fluoreszcens esszével vizsgáltuk. A 10 aminosav hosszú hasítóhelyet tartalmazó szubsztrátokon mért katalitikus állandó minden esetben azonos nagyságrendű volt, a legmagasabb értéket a PR/IN hasítóhelyet tartalmazó szubsztráton mértük „B” reakció pufferben (6D. táblázat). A mért katalikus állandók magasabbnak adódtak a 20 aminosav hosszú hasítóhelyet tartalmazó szubsztrátokon mint a rövidebb, 10 aminosavat tartalmazó szubsztrátokon (6D. táblázat). Ezzel ellentétben, a  $k_{cat}/K_m$  állandók alacsonyabbak voltak a hosszabb 20 aminosavat tartalmazó szubsztrátok esetén (IN/RT és Gag/PR) amikor a méréseket „A” reakció pufferben végeztük (6C. táblázat). Ennek az eltérésnek az oka a különböző mérési körülmény, különböző puffer lehet, valamint az, hogy egy kiterjedtebb szubsztrát (vagy linker) szekvencia esetén sok alternatív, de nem-produktív bekötődés is történhet, ami befolyásolhatja a mért paramétereket. A felszíni aminosavak szerepét a szubsztrát-kötésben nemrég bizonyították a HIV-1 és HTLV-1 proteázok esetében, ezt a kötőfelszínt szubsztrátkötő ároknak (*substrate groove* vagy *S-groove*) nevezték el (Laco és mtsai, 2015). A HIV-1 mátrix (MA) és kapszid (CA) fehérje közötti régió a HIV-1 poliproteinben nem vesz fel másodlagos szerkezetet és

hozzáférhető a HIV-1 proteáz számára. Amíg a HIV-1 és HTLV-1 proteáz aktív centruma a P5-P5' aminosavakat köti, a felszíni *S-groove* lehetővé teszi, hogy a proteáz kölcsönhatásba lépjen a P12-P6 és P6'-P12' aminosavakkal a domén közötti régiókban, ami kiterjesztett szubsztrát kötő felszínt fog létrehozni. A kötési energia a P12-P12' aminosavak kötése esetén magasabbnak adódott mint amikor csak a P4-P4' aminosavak kötődtek az aktív centrumhoz. (17. ábra).



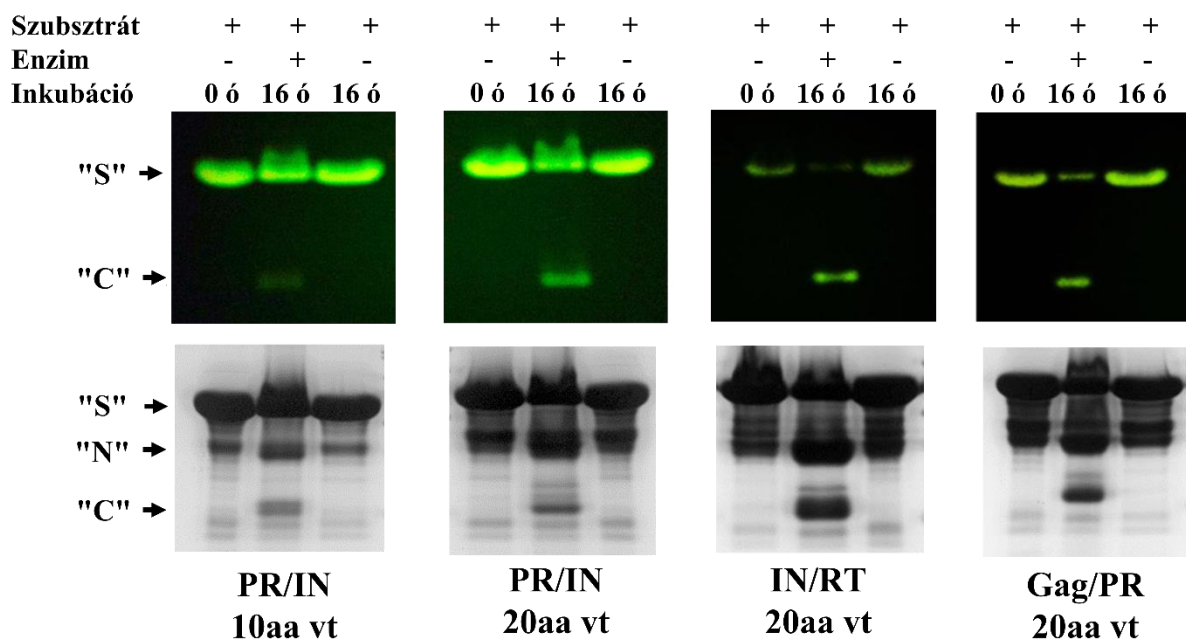
**17. ábra. A HIV-1 proteáz szubsztrátkötő felszínének ábrázolása.** A) A HIV-1 PR modellezése peptid szubsztráttal, mutatva a P5-P4 mátrix/kapszid hasítóhelyeket. Az itt található aminosavak az enzim S5-S4' szubsztrátkötő zsebeibe illeszkednek. A komplex modellezéséhez használt módszert korábban már leírták (Bagossi és mtsai, 2005). B) A HIV-1 PR modellezése szintén a mátrix/kapszid peptid szubsztráttal, mutatva a P12-P12' hasítóhelyeket. A P5-P5' aminosavak az aktív helyhez kötődnek, a P12-P6 és P6'-P12' aminosavak a felszíni szubsztrátkötő helyekkel lépnek kölcsönhatásba. Az enzim-szubsztrát komplex modell szerkezeti koordinátáit Gary S. Laco bocsájtotta rendelkezésünkre (Laco, 2015). A proteáz felszíni megjelenítéssel, a fehérje szubsztrátok pedig pálcikaként vannak megjelenítve. A szubsztrátok aminosav szekvenciái szintén fel vannak tüntetve.

Az extra, az aktív helyen kívüli S12-S6 és S6'-S12' kötőhelyek erősebb kölcsönhatást hoznak létre az enzim és szubsztrát között a rövidebb kötőhelyekhez képest (S4-S4') (Laco, 2015). A katalitikus állandókat összehasonlítva nem figyeltünk meg különbséget a 10 és 20 aminosav hosszúságú kötőhelyek között a Ty1 proteáz esetén, ezért nem feltételezhetjük egyértelműen a szubsztrátkötő árok enzimfelszíni kötőhelyek jelenlétét a Ty1 proteázban. Ezt úgy vizsgáltuk, hogy a rekombináns szubsztrátok nem csak a PR/IN hasítóhely 10 (VPTIN\*NVHTS) és 20 aminosav (PSNISVPTIN\*NVHTSESTRK) hosszúságú részét

tartalmazták, hanem annak egy mutáns verzióját is (GGGGGVPTIN\*NVHTSGGGGG) ahol a P10-P6 és P6'-P10' pozíciókban az aminosavakat glicinre cseréltük. Ezzel azt vizsgáltuk, hogy az oldallánc közvetített enzim szubsztrát interakciót rontja-e a mutáció. A  $k_{cat}/K_m$  katalitikus állandó hasonló értéket mutatott a PR/IN 20 aminosav vad típus és PR/IN 20 aminosav mutáns szubsztrátokon (**6C. és 6D. táblázat**). A glicin szubsztitúció csak minimális eltérést okozott a  $k_{cat}/K_m$  értékekben, amelyek nem adódtak szignifikánsak. Amíg a HIV-1 proteáz esetében igazolták az enzimfelszíni szubsztrátkötő árok kötőhelyek jelentőségét a szubsztrát kötésben (**Laco és mtsai, 2015**), addig az általunk mért *in vitro* eredmények nem szolgálták egyértelmű bizonyítékkal, de arra utalnak, hogy a Ty1 proteáz felszíni aminosavai is hozzájárulhatnak a szubsztrát felismeréséhez. A szubsztrátban a P10-P6 és P6'-P10' pozíciókban található aminosavak megváltoztatása, azaz az oldallánc közvetített interakciók törlése ezekben a pozíciókban, nem okozott szignifikáns eltérést a katalitikus állandóban különféle pufferekben mérve. Ezért azt feltételezzük, hogy a Ty1 proteáz felszíni aminosavai gyenge kölcsönhatásba lépnek a szubsztráttal ezekben a pozíciókban.

#### 5.1.4 Hasítóhelyek azonosítása a rekombináns fluoreszcens szubsztrátokban

Munkacsoportunk az SDS-PAGE alapján nem azonosította a vártnál több hasítási terméket a rekombináns fluoreszcens szubsztrátokban HIV-1 proteáz esetén, tehát nem detektáltunk nem-specifikus hasítóhelyeket ezzel a módszerrel (**Bozóki és mtsai, 2018**). A **18. ábrán** bemutatott SDS-PAGE géleképek a Ty1 PR esetében kapott hasítási mintázatot mutatják.



**18. ábra. A fluoreszcens szubsztrátok hasítása és SDS-PAGE analízise.** A gélképeken a renaturált PR/IN, IN/RT, és Gag/PR hasítóhelyeket tartalmazó fluoreszcens szubsztrátok láthatóak, kék fényrel történő átvilágítás esetén. A bal oldalon a reakció 0. percben majd pedig 16 óra után látható, mellette jobbszélen pedig a 16 órán át inkubált kontroll helyezkedik el. A gélek Coomassie festékkel festve az alsó sávban láthatóak.

A kontrollként használt TEV proteáz hasítóhelyet a His<sub>6</sub>-MBP-mTurquoise2 szubsztrátokban ezen tanulmányban használtuk először a proteáz pontos hasítóhelyének meghatározásában. Célunk az volt, hogy igazoljuk, hogy a Ty1 proteáz nem hasít alternatív, nem-specifikus helyeken a szubsztrátban. Ahhoz, hogy ezt igazoljuk, a szubsztrátokat Ty1 és TEV proteázokkal egyaránt hasítottuk. A keletkező rövid termék fragmenseket MALDI-TOF tömegspektrométerrel azonosítottuk, minden szubsztrát variáns esetében. A kísérleteket „B” reakció pufferben végeztük, majd a Tween20 detergenst - ami a tömegspektrometria eredményét befolyásolhatja - eltávolítottuk úgy, hogy a puffert 50 mM Tris (pH 8,0) oldatra cseréltük. A puffer cseréhez centrikon csöveket használtunk 10 kDa-os pórus mérettel, ami a polietilén glikol származékokat bizonyítottan eltávolította, a fragmensek azonosítását tömegspektrométerrel nem befolyásolta. Miután Ty1 és TEV proteázzal hasítottuk a szubsztrátokat, a hasítási termékeket MALDI-TOF tömegspektrométerrel azonosítottuk és a számolt m/z értékeket ([M+H]<sup>+</sup>) összehasonlítottuk.

A mért értékek megegyeztek az általánunk számoltakkal (7. táblázat). A tömegspektrométerrel mért eredmények tehát összhangban voltak az SDS-PAGE analízis eredményeivel és azt igazolták, hogy a Ty1 proteáz egyetlen specifikus helyen hasít a

szubsztrátban, tehát nem hasít alternatív pozíciókban, sem a (GGGS)<sub>4</sub> flexibilis régióban, sem a felismerő helyet körül vevő egyéb pozíciókban.

Szubsztrát	Hasítóhely szekvencia	Számolt	Mért érték
PR/IN_10aa_vt	GGASTRGLIKVPTIN	1483,86	1483,93
PR/IN_20aa_vt	GGASTRGLIKPSNISVPTIN	1982,10	1982,18
PR/IN_20aa_mut	GGASTRGLIKGGGGVPTIN	1768,97	1769,02
IN/RT_10aa_vt	GGASTRGLIKIHLIA	1506,91	1506,96
IN/RT_20aa_vt	GGASTRGLIKRSKKRIHLIA	2162,34	2162,42
Gag/PR_10aa_vt	GGASTRGLIKTARAH	1495,85	1495,79
Gag/PR_20aa_vt	GGASTRGLIKNSKSKTARAH	2040,14	2040,68

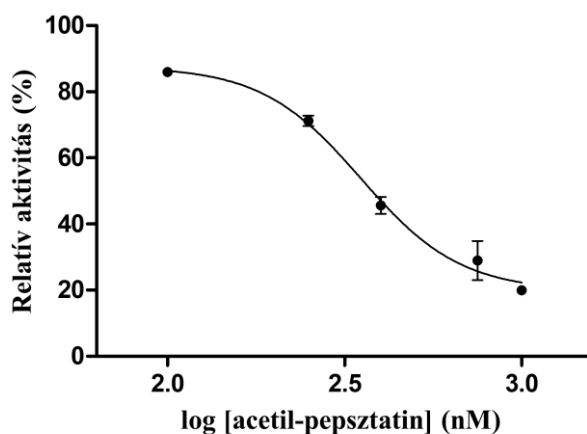
**7. táblázat A MALDI-TOF MS eredményeinek összehasonlítása az általunk számolt molekulatömegekkel.** A molekulatömeg értékek daltonban vannak feltüntetve.

#### 5.1.5 Ty1 proteáz gátolhatóságának vizsgálata

Teszteltük a Ty1 proteáz aktivitására potenciálisan ható azon gátlószereket, amelyek a *Food and Drug Administration* (FDA), az Amerikai Egyesült Államokban működő élelmiszerbiztonsági szervezet által elfogadott és retrovirális terápiában használt HIV-1 proteáz gátlószerek. A gátlószerek a következők voltak: atazanavir, nelfinavir, saquinavir, darunavir, amprenavir, lopinavir és tipranavir. Teszteltük továbbá a DMP-323-t, ami egy a HIV-1 proteázhoz erősen kötődő gátlószer, valamint teszteltük az általános aszpartil proteáz gátlószereket is, az acetyl-pepszatint és pepszatin A-t.

Az említett gátlószerek közül egyedül az acetyl-pepszatin gátolta a Ty1 proteáz aktivitását, a többi gátlószer nem okozott változást az aktivitásban 100 nM-os végkoncentrációban sem. Míg korábbi eredményeink alapján az amprenavir, atazanavir, darunavir, tipranavir, lopinavir és DMP-323 az XMRV proteáz aktivitását gátolták (**Matúz és mtsai, 2012**), a Ty1 proteáz esetében ezen gátlószerek mellett a nelfinavir és a saquinavir sem mutattak gátoló hatást. A HIV proteáz inhibitorok nem mutattak gátlást több retrotranszpozon-eredetű proteázra irányuló tanulmányban sem, valamint a humán ASPRV1 proteázt (**Golda és mtsai, 2020b**) és a humán PEG10 proteázt (**Golda és mtsai, 2020a**) sem gátolták. Az XMRV proteázt az acetyl-pepszatin és pepszatin A csak kis mértékben gátolja (**Matúz és mtsai, 2012**), ám a pepszatin A semmilyen mértékben nem gátolta a Ty1 proteázt. Az acetyl-pepszatinra a következő értékeket állapítottuk meg,  $IC_{50} = 367,5$  nM és a  $K_i = 296$  nM (**19. ábra**). Ezek az értékek a HIV-1 ( $K_i = 13,15$  nM,  $IC_{50} = 1,18$  nM) proteáz

esetén alacsonyabbak, tehát az acetil-pepszatin gátlási képessége a Ty1 proteázra vonatkoztatva alacsonyabb, az XMRV proteázhoz hasonlítható ( $K_i = 712$  nM,  $IC_{50} = 1290,2$  nM) (Matúz és mtsai, 2012). A copia retrotranszpozon proteáz esetén mért érték  $K_i = 15$  nM pedig, a HIV-1 proteázon mért értékhez hasonló (Athauda és mtsai, 2006). Annak ellenére, hogy egyedül az acetil-pepszatin gátolta a Ty1 proteáz aktivitását, a fenti értékek azt igazolják, hogy az acetil-pepszatin A is csak gyenge gátlószere a Ty1 proteáznak. Érdekes, hogy az acetil-pepszatin kivételes módon kötődik az XMRV proteázhoz, egyszerre két molekula kötődik az aktív centrumban fej-fej orientációban (Matúz és mtsai, 2012). A jövőben krisztallográfiai mérések igazolhatják, hogy ez az elmélet a Ty1 proteáz acetil-pepszatin komplexre is megvalósul-e.



**19. ábra.** A Ty1 proteáz gátlása acetil-pepszatinnal. A gátlási állandót a VPTIN\*NVHTS szintetikus oligopeptid szubsztráttal mértük. Az inhibitor nélküli mért aktivitást vettük 100% aktivitásnak. A hibásávok szórást jelölnek (n=3).

#### 5.1.6 *In silico* vizsgálatok

A Ty1 proteáz szerkezetét homológ modellezés segítségével jósoltuk, ugyanis a Ty1 proteáz szerkezetéről 2022 májusáig sem áll rendelkezésre kísérletes adat. Az előzőekben leírtak alapján (Merkulov és mtsai, 1996; Merkulov és mtsai, 2001), a Ty1 proteáz domén a megszokottnál hosszabb, 181 aminosavból áll. Az N és C-terminális régiók jelentősen hosszabbak, mint az a retrovirális és retrovírus-szerű proteázokra általában jellemző (20A. ábra). Ezen régiók szerkezeti vagy funkcionális jelentőségét ez idáig még nem vizsgálták. Hosszabb N- és C-terminális régiókat megfigyeltek néhány retrovirális proteáz esetében, például a MMLV proteáz N és C-terminális régiója néhány aminosavval hosszabb, mint a HIV-1 proteázé (Menéndez-Arias és mtsai, 1994), de még így is jóval rövidebb, mint a Ty1

proteáz N-terminális része. Habár ennek a résznek az MMLV proteáz aktivitásában nincs szerepe, a HIV-1 proteáz N-terminális részének precíz processzálódása - hasítás a dimerizációs régió előtt - növeli az enzim aktivitását (**Louis és mtsai, 1994**). Az MMLV és XMRV proteázok 98% szekvencia azonosságot mutatnak és csak két aminosavban tér el a szekvenciájuk (**Matúz és mtsai, 2012**), így mindkettő összehasonlítható a Ty1 proteázzal, jelen esetben az XMRV proteázt hasonlítottuk a Ty1 proteázhoz (**20. ábra**).

A másodlagos szerkezeti elemek *in silico* jóslat elrendeződése nagyfokú hasonlóságot mutatott a retrovirális és retrovírus-szerű proteázokéval (**20A. ábra**). Továbbá a D-S-G-A szekvencia a Ty1 proteázban megegyezik a retrovirális proteázok konszenzus D-S/T-G-A aktív centrum motívumával, illetve a folding is megegyezett a retrovirális proteázokéval (**20B. ábra**). Az N-terminális (N1-H56) rész jóslat szerkezete nem mutatott rendezett másodlagos szerkezeteket ( $\alpha$ -hélixeket vagy  $\beta$ -redőket). A rendezetlenségi jóslás szintén szerkezet nélküli természetet jóslat az N-terminális részre, hasonlóképp az MMLV proteázhoz, ahol ez a rész flexibilis, konformációja nem ismert (**Menéndez-Arias és mtsai, 1994**). Egy  $\alpha$ -helixet jóslatunk a katalitikus motívumhoz közel (A71-H75), ami megegyezik a Dd1 proteázban (**Sirkis és mtsai, 2006**) és a lovak fertőző kevésvérűségét okozó vírus (*equine infectious anemia virus*, EIAV) proteázban leírt helikális inzerttel (**Gustchina és mtsai, 1996**) (**20A. ábra**). A jóslási eredmények azt sejtetik, hogy a dimerizációs régió a Ty1 proteáz homodimerben csak C-terminális  $\beta$ -redőket tartalmaz, amelyeket rövid hurkok kötnek össze. A HIV-1 és EIAV proteázokkal szemben a Ty1 proteáz dimerizációs régiójában ezek a  $\beta$ -redők nem mutatnak alterációt. Mindkét monomer C-terminális részén négy-négy  $\beta$ -redőt jóslatunk (**20A. ábra**).

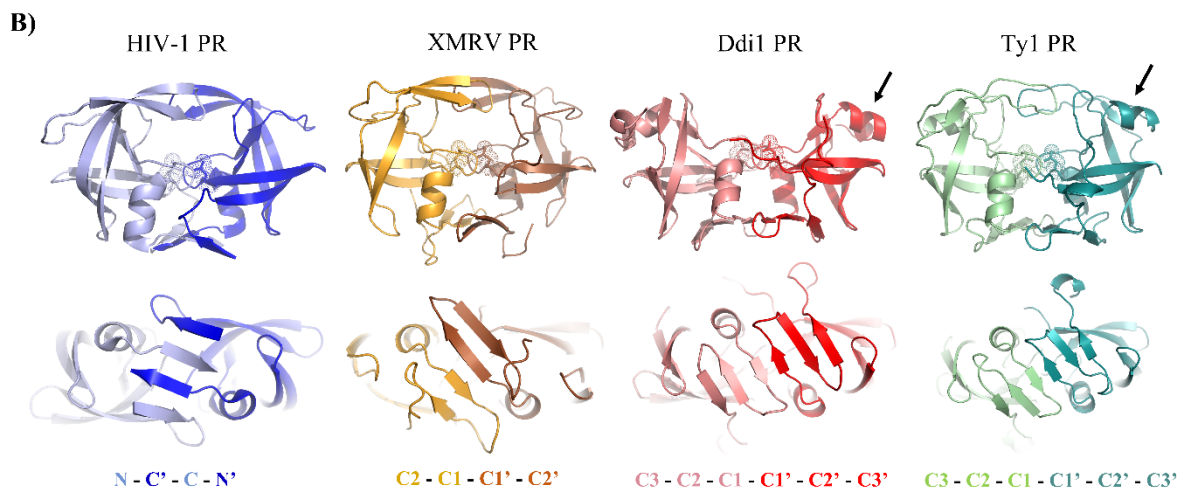
A)

```

.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80.....90...
NVSTSNNSPSTDNDSISKSTTEPIQLNKHDLHLGQKLTSTVNHTNHSDEELFGHLLDSGASRTLIRSAHHHSASSNP--DIN---VVDAQKRNI Ty1 PR
-----QVPLYINIEINNPVKAFVDTGAQTTIMSTRLAKK-TGLSRMIDKRFIGEARGVGTGKI Ddi1 PR
-----VTYNLEKRPTTIVLINDTPLNVLLDDTGADTSVLTTAHYNRLKYRCRKYQCTGIGGVGGNVET-- EIAV PR
TLGDQGGGQEPPPPEPRITLKVGGQPVTFLVDTGAQHSSVLTQNPG---PLSDK--SAW---VQGATGGKR XMRV PR
-----PQITLWQRPLVTIKIGGQLKEALLDTGADDTVLEEMNL---PGRWK--PKM---IGGIGGFIK HIV-1 PR

.....100.....110.....120.....130.....140.....150.....160.....170.....180
PINAIGDLQFHFQDNIKTSIKVLHTPNLAYD-LLSLNELAAVDTACFTRNVLERSDGTVLAPIVKYGDFYWVSKYLLPSNISVPTIN Ty1 PR
-IGRIHQAQVKI-ETQYIPCSFVLDT-DIDVLIGLDMLKRHLACVDLKENVLRI--AEVETSFLSEAEIP-- Ddi1 PR
-FST--PVTIKK-KGRHIKTRMLVA-DIPV-TILGRDILQDLGAKLVL----- EIAV PR
-YRWTDRKVHLA-TGKVTHSFLHVPDCPYP-LLGRDLLTKLKAQIHFEGSSGAQVVGPMGQPLQVL----- XMRV PR
-VRQYDQILIEIC-GHKAIGTVLVG-PTPVN-IIRNLLTQIGCTLNF----- HIV-1 PR

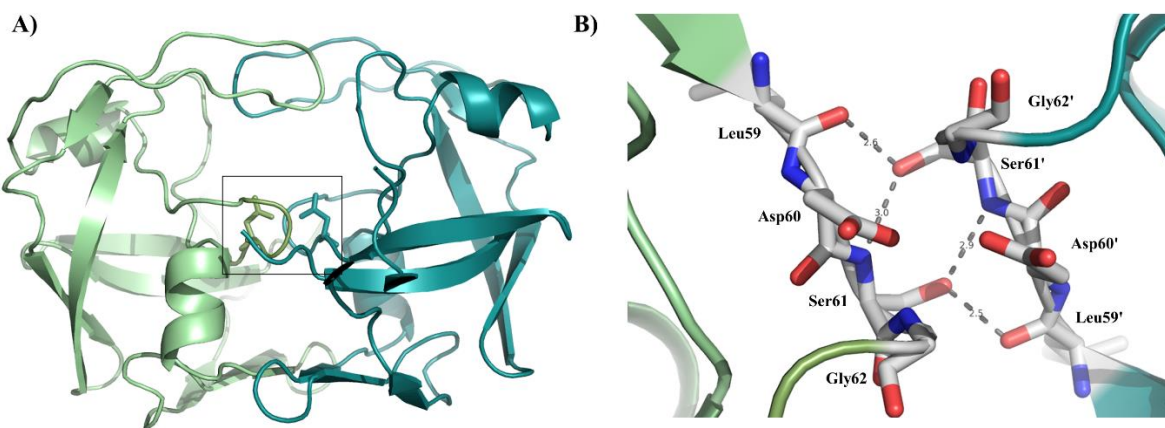
```



**20. ábra. A Ty1 proteáz és egyéb reprezentatív retrovírus és retrovírus-eredetű proteázok szekvenciája és szerkezete.** (A) A Ty1, a Ddi1, az EIAV, az XMRV és a HIV-1 proteázok szekvenciájának illesztése. A Ty1 PR szerkezet jóslása DSSP-vel készült, a Ddi1, EIAV, XMRV és HIV-1 PR kristályszerkezetén alapszik, a Protein Data Bank weboldalán elérhető. A szekvencia aminosav számozása a Ty1 PR-ra vonatkozik. A  $\beta$ -redők narancs, az  $\alpha$ -hélixek piros színnel jelöltek. A D-S/T-G-A katalikus motívum aminosavai félkövér aláhúzással vannak feltüntetve. B) A szerkezeti ábrák a HIV-1, XMRV, és Ddi1 proteázok szerkezetén alapszanak, mellettük pedig a Ty1 PR homológ modellje látható (41–164 aminosavak). A felső panel a proteázok szerkezetét ábrázolja előnézetből, az alsó panel pedig a kinagyított dimerizációs régiókat szemlélteti, az itt található  $\beta$ -redőkkel. A lebeny régiók körüli helikális részek - fekete nyilak mutatják- csak a Ddi és Ty1 proteázokban van jelen. A katalitikus aszpartátokat pálcika és gömb megjelenítés szemlélteti, a monomerek pedig világos és sötét árnyalatokkal vannak megkülönböztetve. Az N- és C-terminális régiók az ábrán nincsenek megjelenítve, a teljes hosszúságú Ty1 proteáz szerkezete a 22. ábrán látható.

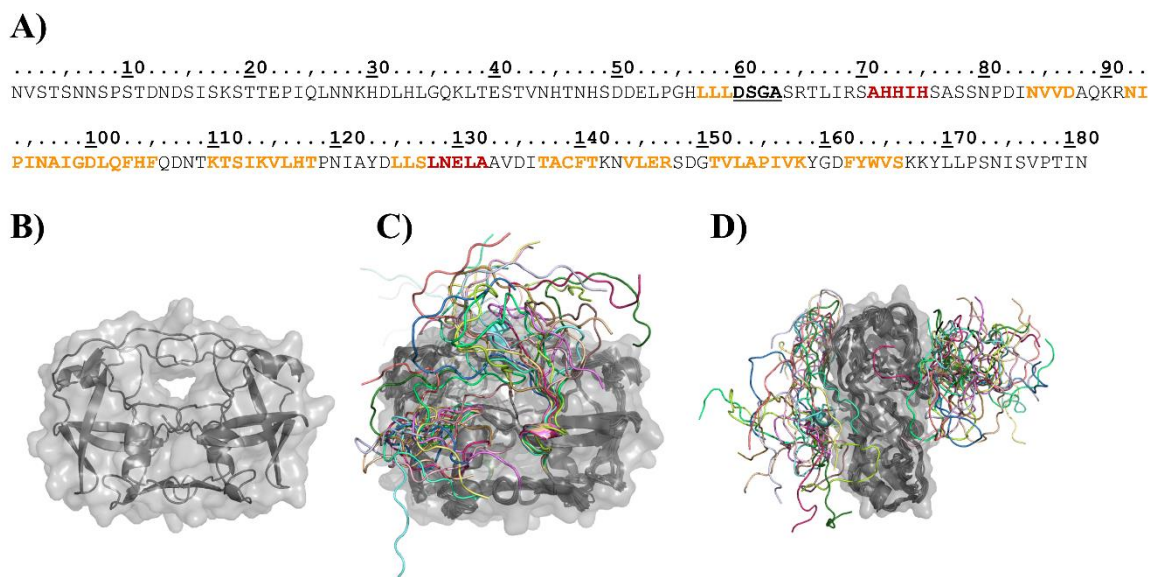
Egyetlen ismert szerkezetű retrovirális vagy retrovírus-szerű proteáz sem rendelkezik nyolc  $\beta$ -redőből álló dimerizációs régióval. Azt feltételezzük, hogy a Ty1 proteáz dimerizációs régiója is csak hat  $\beta$ -redőből áll (**20B. ábra**), hasonlóan a Ddi1 proteázéhoz (**Sirkis és mtsai, 2006**). Ebből kiindulva, a Ddi1 proteázot vettük alapul a Ty1 proteáz dimerizációs régiójának modellezéséhez. Továbbá, mivel nem állt rendelkezésünkre templát nyolc  $\beta$ -redőből álló dimerizációs régióval, nem volt lehetséges egy ilyen modellt építenünk, a negyedik  $\beta$ -redő szerepe csak hozzávetőlegesen lett volna becsülhető. A Ty1 proteáz

érzékenysége az urea koncentrációra - a HIV-1 proteázhoz hasonlítva - magyarázatot szolgáltat a dimerizációs régió elrendeződésére. Amíg a HIV-1 proteáz N és C-terminális régiója alternáló  $\beta$ -redőkből áll (**20B. ábra**), addig az XMRV és Ty1 proteázok csak C-terminális  $\beta$ -redőket tartalmaznak, amelyek nem váltakozva helyezkednek el. Mindkét proteáz (**Matúz és mtsai, 2012**) alacsonyabb dimer stabilitást, tehát nagyobb érzékenységet mutatott a HIV-1 proteázhoz képest. Ez azt jelentheti, hogy a nem váltakozó C-terminális  $\beta$ -redőket tartalmazó dimerizációs régió stabilitása kisebb (Ty1 és XMRV proteázok), mint ahol a homodimeriek között váltakozó  $\beta$ -redők közötti kölcsönhatás alakul ki, mely erősíti a dimerizációt (HIV-1 proteáz). A katalitikus motívum szintén szerepet játszhat a dimer stabilitásban. A retrovirális aszpartil proteázok homodimerjei a monomerek konszenzus aktív centrum (D-S/T-G-A) motívum szerin vagy treonin oldalláncai közötti interakciók, úgynevezett tűzoltófogás révén stabilizálják a dimerizációt. Korábban kimutatták, hogy azok az enzimek dimerjei, amelyek szerint tartalmaznak treonin helyett az aktív centrumban, kevésbé stabilak. Ezt igazolta a T26S HIV-1 proteáz mutáns, amely alacsonyabb specifikus aktivitást mutatott a vad típusához képest (**Strisovsky és mtsai, 2000**), a HFV S25T mutánsa pedig kevésbé volt érzékeny a növekvő urea koncentrációra (**Sperka és mtsai, 2006**). A Ty1 proteázban szintén szerint találunk az aktív centrumban (**21. ábra**), ami szerepet játszhat az alacsonyabb dimer stabilitásban.



**21. ábra.** Tűzoltó fogás és a Ty1 PR aktív centruma pálcika megjelenítésben. A) A homológ modell oldalnézete. A monomereket különböző árnyalatok jelölik, a katalitikus aszpartátokat négyzet jelöli. B) Az aminosavak nevei mellettük vannak feltüntetve. A szürke pontozott vonalak a hidrogén kötéseket jelölik, a távolságok angstrom-ben (Å) vannak feltüntetve.

A N- and C-terminális régiók megvizsgálásának érdekében modelleztük a teljes hosszúságú Ty1 proteáz szerkezetét (**22A. ábra**). Ezekről a kiterjesztett régiókról nem áll rendelkezésre semmilyen szerkezeti adat az aszpartil proteázok körében, ezért templát nélkül a jóslott konformációk csak nagy bizonytalansággal becsülhetőek. A teljes proteáz jóslott szerkezetét az *in vitro* eredmények értelmezéséhez használtuk fel. Abból a célból, hogy megértsük a szubsztrátkötő árok szerepét a szubsztrát kötésben, a kinetikai méréseket fluoreszcens rekombináns fehérje szubsztrátokon végeztük el, de a Ty1 proteáz interakcióját a P10-P6 és P6'-P10' pozíciójú aminosavakkal nem tudtuk bizonyítani egyértelműen (**6D. táblázat**). A lehetséges konformációs variánsok szerkezete (**22B., 22C. és 22D. ábra**) azt sejteti, hogy a Ty1 proteáz felszíni aminosavai nem annyira hozzáférhetőek, mint a HIV-1 proteáz esetében, bár megfelelő templát szerkezet hiányában a hosszabb N- és C-terminális szakaszok pontos konformációja nem volt megbízhatóan modellezhető.



**22. ábra. A Ty1 proteáz szerkezete a rendezetlen N- és C-terminális kiterjesztésekkel.** A) A teljes Ty1 PR szekvencia. A  $\beta$ -redők narancs, az  $\alpha$ -hélixek piros színnel, a katalitikus motívum pedig félkövér betűkkel, illetve aláhúzással jelölt. B) A homodimer (41–164 aminosavak) jóslott szerkezete felülnézetből, a kiterjesztések nélkül. A teljes fehérje szekvencia (1-40 és 156-181 aminosavak) rávetítve a homodimerre C) előnézetből, D) és felülnézetből. Az N- és C-terminális régiókat külön színek jelölik.

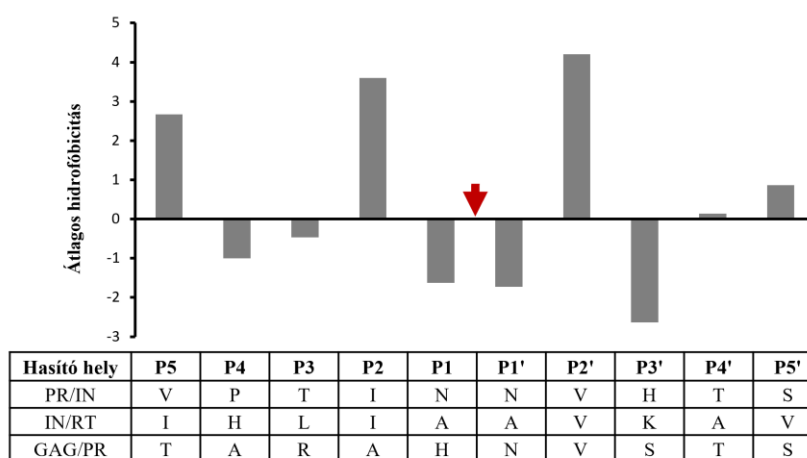
Ennek az lehet az oka, hogy az N- és C-terminális kiterjesztések térben közel vannak az aktív centrumhoz, valamint az enzim felszínéhez. Figyelembe véve ezt a potenciális, szterikus elrejtését a szubsztrátkötő aminosavaknak feltételeztük, hogy a Ty1 proteáz P10-P6 és P6'-P10' pozíciókkal kölcsönhatásba lépő felszíni aminosavai hiányoznak, vagy teljesen

más szerkezetet vesznek fel, mint a HIV-1 proteáz esetében (**Laco, 2015**). Pontosabb szerkezeti modellek, illetve kiterjedt molekuladinamikai számítások nélkül nem tudtuk megállapítani, hogy a Ty1 proteáz felszíni aminosav-maradécai hozzáférhetetlenek vagy esetleg az N- és C-terminális régiók térben gátolják a szubsztrát kötést. A Ty1 és Ty-3 proteázok természetes hasítóhelyeit már vizsgálták korábban (**Merkulov és mtsai, 1996**), a hidrofóbitási indexét a P10-P10' aminosav pozícióknak meghatározták. Összehasonlítva ezeket az értékeket jelentős specificitásbeli eltéréseket állapítottak meg, mint ami általában a retrovirális hasítóhelyekre jellemző, de a proteázok szerkezetét idáig senki sem hasonlította össze. A szubsztrátkötő zsebek tanulmányozásának céljából a jóslott teljes Ty1 proteáz szerkezetet használtuk fel. A P4-P1 pozíciók aminosav összetételét a HIV-1 és Ty1 szerkezet-alapú illesztésével határoztuk meg. A HIV-1 proteáz szubsztrátkötő zsebének kompozícióját már korábban meghatározták (**Bagossi és mtsai, 2005; Eizert és mtsai, 2008**), a Ty1 proteáz szubsztrátkötő zsebeit a megfelelő helyen lévő aminosavak azonosításával térképeztük fel (**23. ábra**).

A)

	S4 kötő zseb		S3 kötő zseb		S2 kötő zseb		S1 kötő zseb	
	HIV-1	Ty1	HIV-1	Ty1	HIV-1	Ty1	HIV-1	Ty1
	D30	R65	L10	H45	A28	A63	R8	V43
	M46	N84	R8	V43	D30	R65	L23	L58
	I47	V85	D29	S64	V32	L67	D25	D60
	G48	V86	G48	V86	I47	V85	G27	G62
	V56	I95	V82	Y123	G48	V86	G49	D87
	Q58	A97			G49	D87	I50	A88
	L76	L116			I50	A88	T80	I121
					L76	L116	P81	A122
					I84	L126	V82	Y123
							I84	I126
hidrofób (%)	60	80	33	40	86	86	72	86
hidrofil (%)	20	0	0	60	0	0	14	14
Töltött (%)	20	20	67	0	14	14	14	0

B)



**23. ábra. A HIV-1 és Ty1 PR S4-S1 szubsztrátkötő zsebek aminosav összetétele.** A) A HIV-1 PR szubsztrátkötő zsebeit korábban már meghatározták (Bagossi és mtsai, 2005; Eizert és mtsai, 2008), a Ty1 proteáz aminosavak pedig a szerkezeti illesztésen alapszanak. A kölcsönhatásban feltételezhetően résztvevő oldalláncok félkövér betűkkel vannak feltüntetve. B) A Ty1 proteáz hasítóhely szekvenciák P5-P5' aminosavai. Az átlag hidrofóbicitási értékek a Kyte and Doolittle által meghatározott (Kyte és Doolittle, 1982) értékeken alapszanak. A vörös nyíl a hasítási pozíciót jelöli.

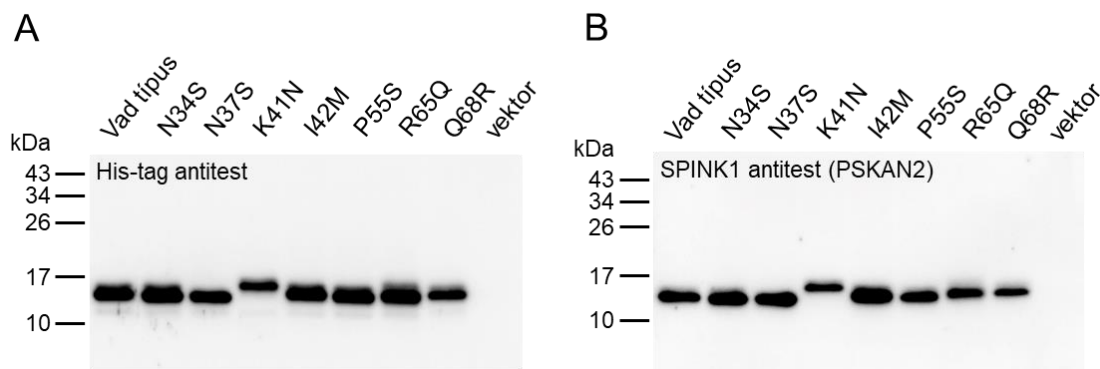
Azt találtuk, hogy a Ty1 proteáz S1 kötő zsebe főként hidrofób aminosavakat tartalmaz, ami hasonlóságot mutat a HIV-1 proteáz S1 kötő zsebéhez. Habár a retrovirális proteázok általában főként hidrofób aminosavakat preferálnak a P1 pozícióban (Eizert és mtsai, 2008), a három ismert Ty1 felismerési és hasítóhelyeken hidrofíl aminosavmaradékokat találunk a P1 és P1' pozíciókban (Merkulov és mtsai, 1996). A modell alapján az S2 szintén hidrofób aminosavakból áll, ami megfelel a P2 és P2' magasabb hidrofóbításának, itt általában valin vagy izoleucin aminosavak találhatóak (23. ábra). Az enzim S3 pozícióban főként hidrofíl aminosavakat azonosítottunk, ami összhangban van a hasítóhelyek P3 és P3' pozícióival, ugyanis ezekben itt is főként hidrofíl aminosavak

jellemzőek a szekvenciára. A P4 és P4' pozícióban elhelyezkedő aminosavak átlagos hidrofóbicitása igen alacsony, a vizsgált hasítóhelyek alapján neutrálshoz közeli. Az enzim S4 helyet hidrofóbként azonosítottuk, habár fontos megjegyezni, hogy ez nehézségekbe ütközött, mert a proteáz ezen része a felszínhez közel helyezkedik el (**Bagossi és mtsai, 2005**). A hidrofób, hidrofil és töltéssel rendelkező aminosavak eloszlása a Ty1 proteázban nem tért el jelentősen a HIV-1 proteáztól, kivéve a Ty1 proteáz S3 zsebet, amely nem tartalmaz töltéssel rendelkező aminosavakat. Habár a kötőhelyek összetételének profilja megegyezik a hasítóhelyek hidrofóbicitási profiljával, a specificitást nem lehet pontosan megbecsülni kizárólag a szubsztrátkötő zsebek összetétele alapján. Az enzim specificitás pontos megállapításához kiterjesztett *in silico* vizsgálatokra és *in vitro* kísérletekre lenne szükség változatos szubsztrát sorozattal.

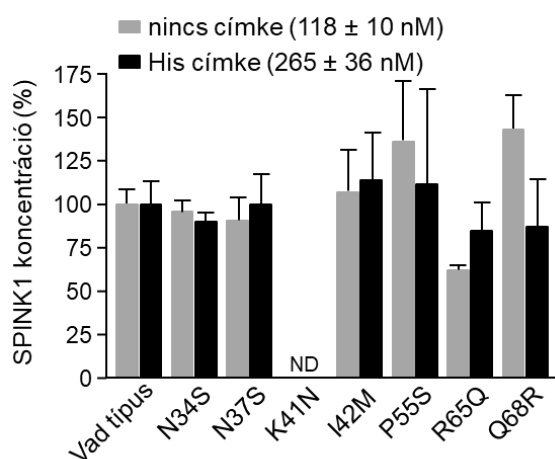
## 5.2 A SPINK1 vizsgálata

### 5.2.1 Szekretálódó misszensz SPINK1 variánsok

A szekréción vizsgálatokat Demcsák Alexandra és Sahin-Tóth Miklós végezték el. Irodalmi adatok és az előzetes kísérleteik azt mutatták, hogy a mutációk többsége az inhibitor szekréción defektusát okozza. Hét SPINK1 mutáció (N34S, N37S, K41N, I42M, P55S, R65Q és Q68R) azonban nem befolyásolta az inhibitor expresszióját és szekréciónját (**24. és 25. ábra**). A kísérleteket elvégeztük C-terminális His<sub>10</sub> címkét tartalmazó és anélküli SPINK1 variánsokkal is, hogy meggyőződjünk arról, hogy a címke nem hat az inhibitor szekréciónra. Eredményül azt kaptuk, hogy a His<sub>10</sub> címke összességében fokozta a SPINK1 szekréciónját. A K41N és Q68R variánsok expressziója kismértékben csökkent a vad típushoz képest. A többi variáns szekréciónja nem változott jelentősen. Egy korábbi publikációban a Q68R variáns fokozott szekréciónját közölték (**Boulling és mtsai, 2012**). A mi eredményeink azonban ezt a jelenséget nem erősítették meg. A R65Q mutáns csökkent szekréciónját már leírták korábban (**Király és mtsai, 2007; Boulling és mtsai, 2007; Beer és mtsai, 2014**), viszont munkacsoportunk ennek az ellenkezőjét figyelte meg. A variánsok tripszin elleni gátlási aktivitását is megvizsgáltuk a transzfektált sejtek médiumában. A K41N SPINK1 gátló aktivitását nem tudtuk kimutatni. További kísérleteink során funkcionális vizsgálatokkal arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a szekretálódó SPINK1 variánsok fokozhatják-e a krónikus hasnyálmirigy-gyulladás rizikóját.



**24. ábra.** A SPINK1 variánsok szekréciója transzfektált humán vese embrionális sejtvonalból (HEK293T). A szekretálódott His<sub>10</sub> címkével ellátott (A) és jelöletlen fehérjéket (B) anti-His vagy SPINK1-ellenes antitesttel, Western-blot módszerrel azonosítottuk a sejt felülűszőben.

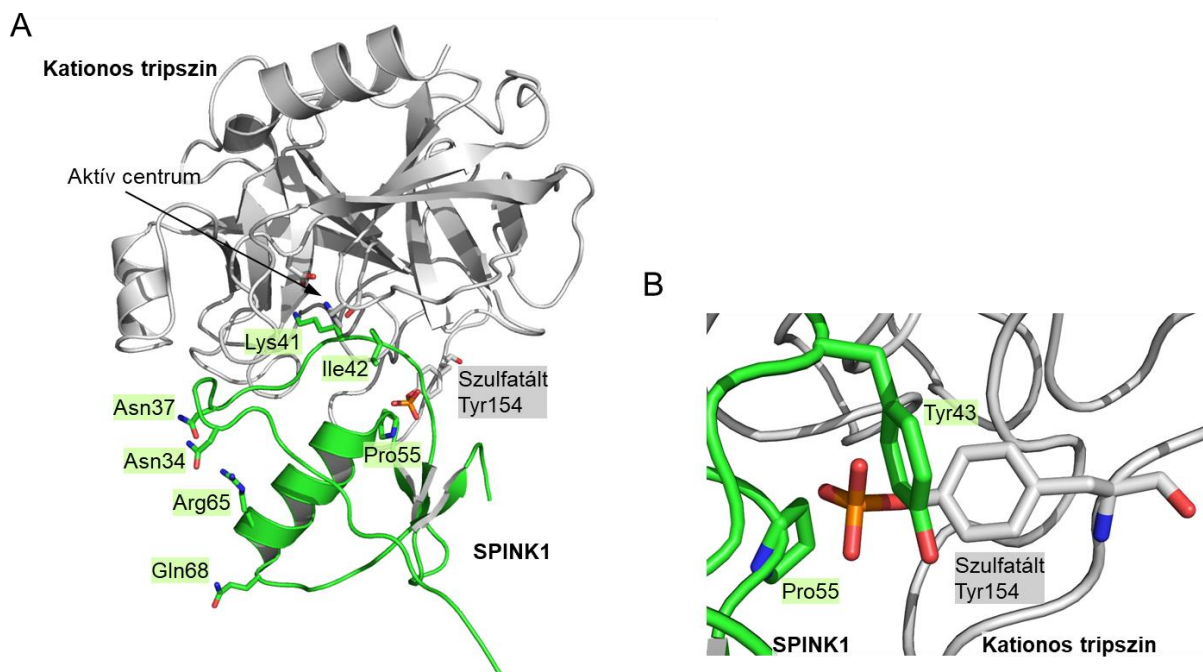


**25. ábra.** A SPINK1 variánsok szekréciójának oszlopdiaagrammja. A sejt felülűszőben a SPINK1 koncentrációját a humán kationos tripszin elleni titrálással mértük meg. A címke nélküli SPINK1 variánsokat a szürke, a SPINK1-His<sub>10</sub> variánsokat pedig a fekete oszlopok jelölik. A relatív SPINK1 koncentrációkat %-ban fejeztük ki, ahol a 100%-nak a vad típusú SPINK1 expresszióját vettük (átlag ± szórás, n = 4). A K41N mutáns esetében nem mutattunk ki szekréciót.

### 5.2.2 A tripszin-SPINK1 komplex modellezése

A következőkben leírt modellezés Szabó András munkája. A SPINK1 fehérje humán tripszinnel alkotott komplexéről napjainkig nincs elérhető röntgenkristallográfiás adat, ezért munkacsoportunk épített egy modellt, ahol a natív, illetve szulfatált kationos humán tripszint a borjú kimotripszinogén A rekombináns SPINK1 K41Y, illetve I42E variánssal alkotott komplexére vetítettük, végül a reaktív hely peptidkötésben résztvevő Lys41-Ile42 aminosavakat helyreállítottuk (Collins és mtsai, 1990; Hecht és mtsai, 1991; Gaboriaud és

mtsai, 1996). A hét szekréciós mutánsban vizsgált aminosav oldalláncok azt mutatják, hogy a K41N és I42M mutációk befolyásolják a Lys41-Ile42 reaktív peptidkötés erősségét (P1 és P1' pozíciók) és valószínűleg rontják az inhibitor-kötés erősségét (26A. ábra). A többi variáns, N34S, N37S, R65Q és Q68R mutáció által érintett aminosav oldalláncok ezzel szemben közvetlen nem állnak kölcsönhatásban a tripszin oldalláncaival, ezért valószínűleg nem befolyásolják az inhibitor kötődését. Érdekesség, hogy a modellben a szulfát csoport a tripszin Tyr154 oldalláncon, a Pro55 aminosav oldallánc közelében helyezkedik el, így feltételezhető, hogy a P55S variáns kötődését befolyásolhatja a tripszin szulfatálása (26B. ábra).



**26. ábra. A SPINK1 inhibitor kölcsönhatása a humán kationos tripszinnel.** A) A SPINK1 inhibitor szulfatált kationos tripszinnel alkotott komplexének szalagmodellje. A mutációk által érintett aminosavak pozíciói a SPINK1 szerkezetben jelölve vannak. A modell szerkezeti illesztéssel és egy SPINK1 variáns kimotripszinogén A-val alkotott komplex (Protein Data Bank ID: 1CGI) és szulfatált humán kationos tripszin (Protein Data Bank ID: 1TRN) egymásra illesztésével készült. Használt szoftver: PyMOL 2.4. A reaktív hurok peptidkötése a Lys41 és Ile42 pozícióban található. B) A SPINK1 interakciója a kationos tripszin szulfatált Tyr154 aminosavával. A szulfát csoport a SPINK1 Tyr43 és Pro55 aminosavaihoz térben közel helyezkedik el.

Továbbá a SPINK1 Tyr43 oldallánca, amely a reaktív hurok P2` pozíciójában található, szintén a tripszin Tyr154 oldallánc szulfát csoportjának közelében helyezkedik el szterikususan.

Ezekből arra következtethetünk, hogy ez a mutáció is a SPINK1 szulfatált tripszin kölcsönhatását gyengítheti. Munkánk során ezeket a feltételezéseket teszteltük kísérletesen.

### 5.2.3 A vad típusú és N34S SPINK1 kötődése a humán tripszinekhez

A kérdés nyitott, hogy az N34S mutáció változtat-e a SPINK1 tripszinhez való kötődésén, ezért ezt a variánst részletesebben vizsgáltuk. A kísérletekhez rekombináns SPINK1-His<sub>10</sub> fehérjét használtunk, mint ahogy az anyagok és módszerek részben leírjuk. Korábbi kutatások kimutatták, hogy a tripszin gátlása vad típusú és N34S SPINK1 variánssal összehasonlítható (Kuwata és mtsai, 2002; Hirota és mtsai, 2003; Király és mtsai, 2007), bár a kísérletek technikai limitációba ütköztek. Elsőként megmértük a gátlás egyensúlyi állandóját *Eschericia coli*-ban termelt rekombináns tripszin ellen, amely posztranszlációs módosításon nem megy keresztül, nem-szulfatált (8. táblázat).

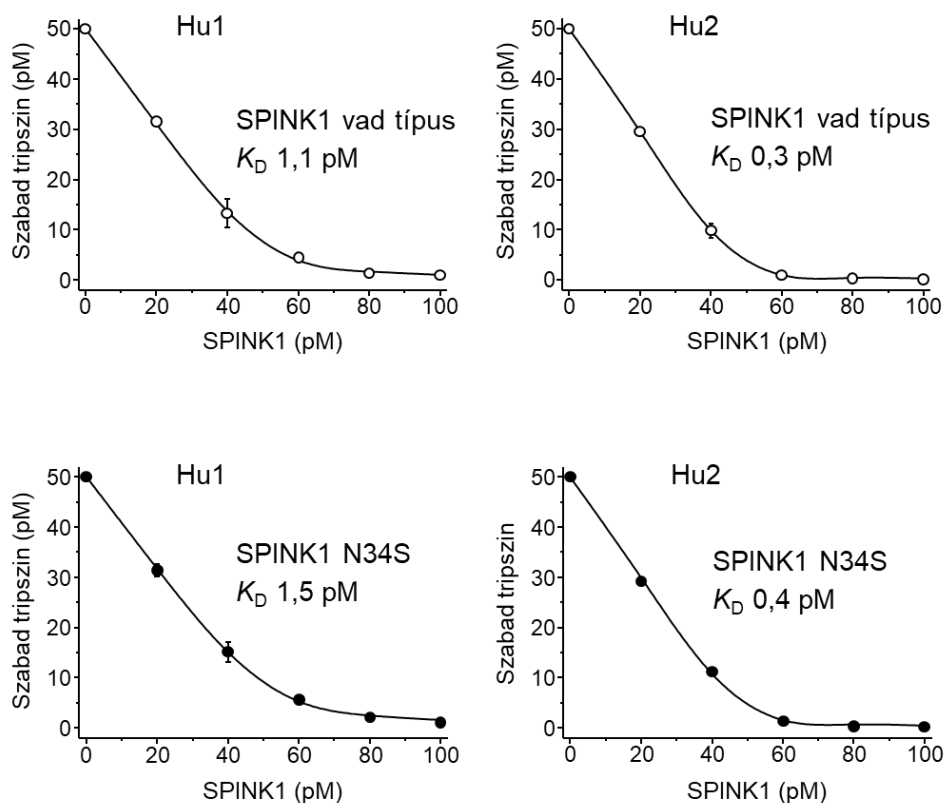
**8. táblázat. A vad típusú és N34S SPINK1 egyensúlyi disszociációs állandói Hu1, Hu1-SO<sub>4</sub>, Hu2, Hu2-SO<sub>4</sub> *E.coli*-ban termelt és humán hasnyálból tisztított tripszinekre.** Az egyensúlyi disszociációs állandót ( $K_{D(eq)}$ ), asszociációs ( $k_{on}$ ) és disszociációs sebességi állandót ( $k_{off}$ ) a vad típusú és N34S mutáns SPINK1 inhibitorokkal határoztuk meg nem-szulfatált (rekombináns, *E. coli*-ban termelt) és natív, szulfatált (hasnyálból tisztított) humán tripszinekre. A kísérleteket az Anyagok és módszerek fejezetben leírtak szerint végeztük el. Hu1, nem-szulfatált kationos tripszin; Hu1-SO<sub>4</sub>, natív, szulfatált humán kationos tripszin; Hu2, nem-szulfatált humán anionos tripszin; Hu2-SO<sub>4</sub>, natív, szulfatált humán kationos tripszin.  $K_{D(calc)}$ , egyensúlyi disszociációs állandó, melyet a sebességi állandókból kaptuk meg. A  $K_{D(eq)}$  értékek legalább három párhuzamos mérés globális illesztéséből származnak. A szórás értékek a táblázatban szintén megtalálhatóak.

<b>SPINK1 vad típus</b>	<b>Hu1 (<i>E. coli</i>)</b>	<b>Hu1-SO<sub>4</sub> (natív)</b>	<b>Hu2 (<i>E. coli</i>)</b>	<b>Hu2-SO<sub>4</sub> (natív)</b>
$k_{on}$ ( $\times 10^6$ M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	3,0 ± 0,3	3,5 ± 0,2	3,8 ± 0,2	2,4 ± 0,1
$k_{off}$ ( $\times 10^{-6}$ s <sup>-1</sup> )	8,2 ± 0,3	54,8 ± 6,2	0,5 ± 0,04	18,1 ± 0,8
$K_{D(calc)}$ (pM)	2,7	15,8	0,1	7,5
$K_{D(eq)}$ (pM)	1,1 ± 0,2	62,2 ± 10,3	0,3 ± 0,02	36,7 ± 2,3
<b>SPINK1 N34S</b>	<b>Hu1 (<i>E. coli</i>)</b>	<b>Hu1-SO<sub>4</sub> (natív)</b>	<b>Hu2 (<i>E. coli</i>)</b>	<b>Hu2-SO<sub>4</sub> (natív)</b>
$k_{on}$ ( $\times 10^6$ M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	5,3 ± 0,2	2,7 ± 0,2	5,1 ± 0,2	3,1 ± 0,3
$k_{off}$ ( $\times 10^{-6}$ s <sup>-1</sup> )	7,0 ± 0,6	45,0 ± 5,1	0,4 ± 0,01	13,6 ± 0,5
$K_{D(calc)}$ (pM)	1,3	16,4	0,1	4,4
$K_{D(eq)}$ (pM)	1,5 ± 0,2	32,3 ± 2,9	0,4 ± 0,1	16,7 ± 0,8

Ahogy az a 8. táblázatban látható a vad típusú SPINK1 esetében erős kötődést figyeltünk meg a kationos ( $K_D$  1,1 pM) és anionos tripszinhez ( $K_D$  0,3 pM) egyaránt. Hasonló

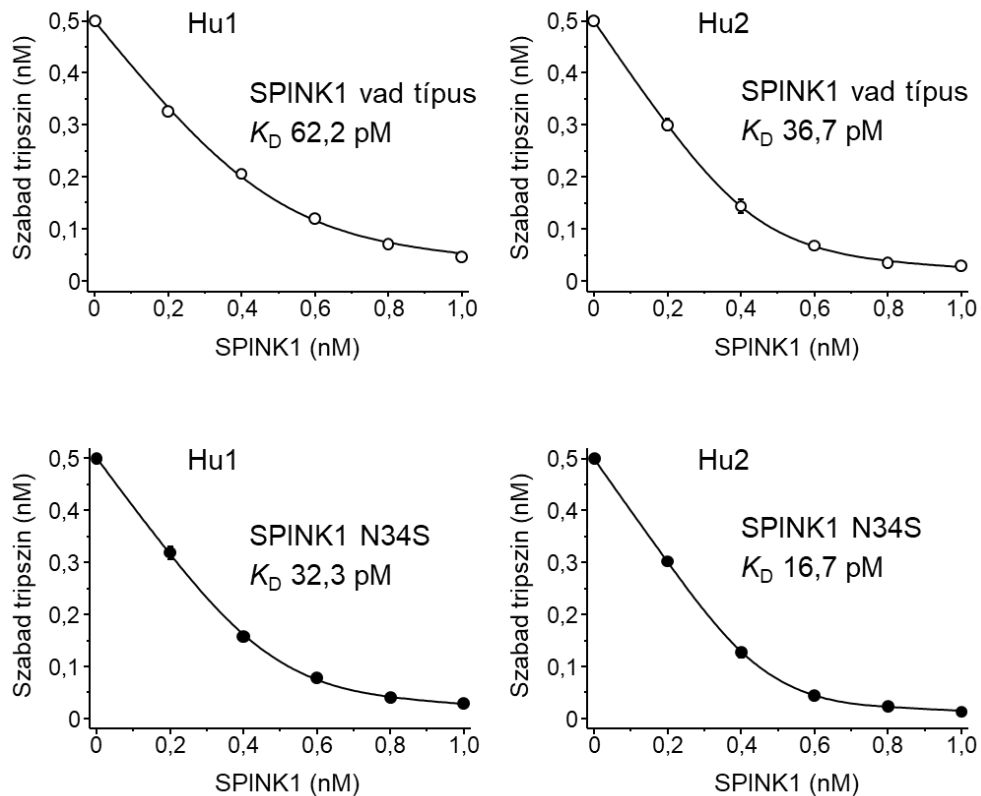
$K_D$  értékeket mértünk az N34S mutáns esetében is  $K_D= 1,5$  pM kationos tripszinre, illetve 0,4 pM anionos tripszinre (8. táblázat). Ahogy a szerkezeti model jóslás is sejteti, az állandók magasabbnak adódtak a hasnyálból tisztított szulfatált tripszinek esetében (8. táblázat). A vad típusú SPINK1 esetében a  $K_D$  érték kationos tripszinre 62,2 pM anionos tripszinre 36,7 pM, az N34S mutáns esetében 32,3 és 16,7 pM volt (27. és 28. ábra).

Nem-szulfatált tripszin (*E. coli*)



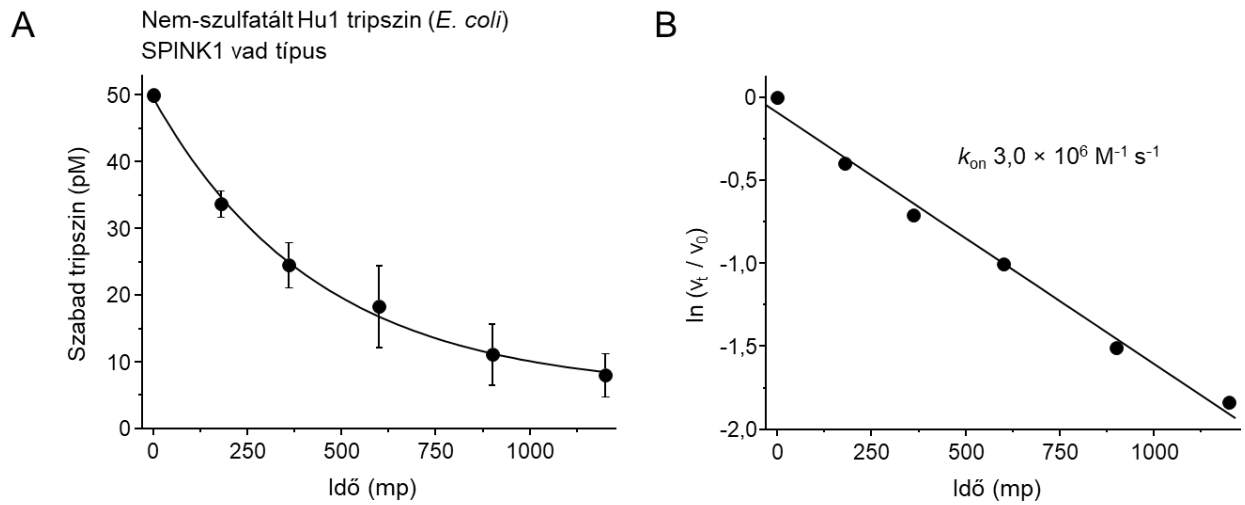
**27. ábra.** A nem-szulfatált humán tripszinek gátlása vad típusú és N34S SPINK1-gyel. A SPINK1 kötődését az *E. coli* bakteriális sejtekből tisztított humán kationos (Hu1) és anionos (Hu2) tripszinekhez a diszociációs konstans ( $K_D$ ) meghatározásával vizsgáltuk. Az értékeket globális illesztéssel ábrázoltuk. A  $K_D$  értékek az ábrákon láthatóak. A hibasávok a szórást jelölik (átlag  $\pm$  szórás,  $n = 3$ ).

Szulfatált tripszin (natív)

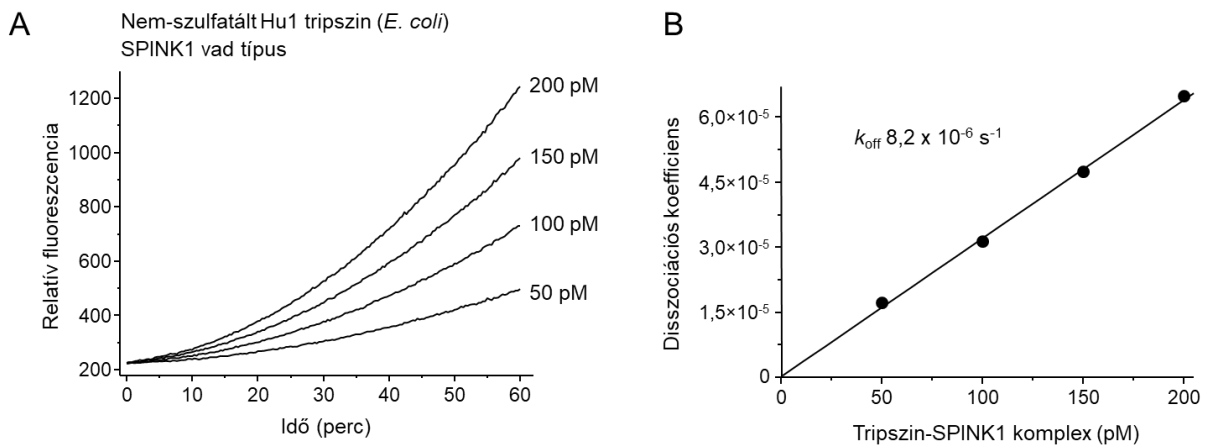


**28. ábra.** A szulfatált humán tripszinek gátlása vad típusú és N34S SPINK1-gyel. A SPINK1 kötődését a hasnyálból tisztított humán kationos (Hu1) és anionos (Hu2) tripszinekhez a diszociációs konstant ( $K_D$ ) meghatározásával vizsgáltuk. Az értékeket globális illesztéssel ábráztuk. A  $K_D$  értékek az ábrákon láthatóak. A szórás hibaszávok jelölik (átlag  $\pm$  szórás,  $n = 3$ ), de mivel ezek az értékek túl alacsonyak a méréspontokban rejtve maradnak.

Ez azt jelenti, hogy a tripszin szulfatálásának jelentős szerepe van a SPINK1 inhibitorral való kölcsönhatásban. A N34S mutáns gátlási értékei azt mutatják, hogy valamivel erősebben gátolja a tripszin izoformákat, de ez a különbség a kísérlet hiba tartományán belül esik. Ebből arra következtethetünk, hogy a N34S mutáns SPINK1 tripszin-gátlási képessége nem gyengébb a vad típusú SPINK1-hez képest. Biológiai rendszerekben az inhibitor asszociációs vagy disszociációs sebessége a funkció szempontjából relevánsabb lehet, mint az egyensúlyi kötés erőssége, ezért a  $k_{on}$  és  $k_{off}$  értékeket is meghatároztuk a vad típusú, illetve N34S SPINK1 mutánsra, kationos és anionos szulfatált, valamint nem-szulfatált rekombináns tripszinekre is ahogy az az anyagok és módszerek, illetve a **29. és 30. ábrán** található.



**29. ábra. Asszociációs konstans mérések nem-szulfatált Hu1 tripszinnel és vad típusú SPINK1-gyel.** A) A tripszin aktivitást közvetlen a SPINK1 inhibitorral történő összekeverés után mértük. B) A pszeudo-elsőrendű sebességi állandó és másodrendű asszociációs sebességi állandó meghatározása ( $k_{on}$ ).



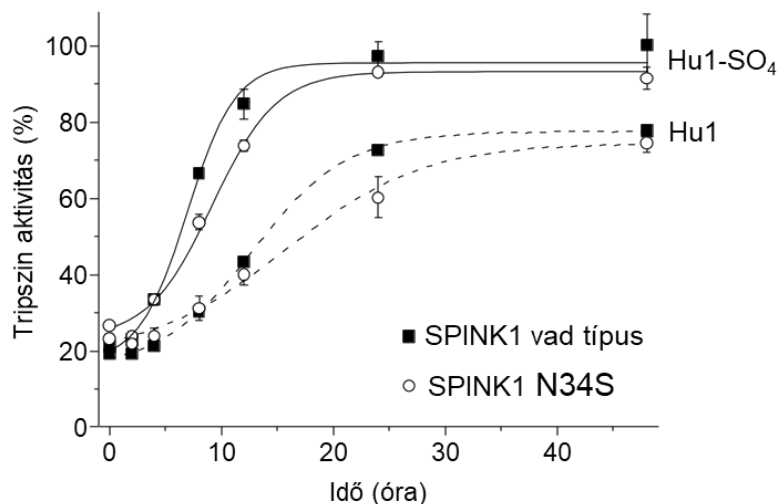
**30. ábra. Disszociációs konstans mérések nem-szulfatált Hu1 tripszinnel és vad típusú SPINK1-gyel.** A) A tripszin aktivitás folyamatos mérése a tripszin-SPINK1 komplex hígítása után. A komplex végső koncentrációját feltüntettük. B) A disszociációs sebességi állandó ( $k_{off}$ ) és a negyedrendű sebességi állandó meghatározása.

Ahogy a **8. táblázatban** látható, hasonló értékeket kaptunk mindkét inhibitor esetében. Ha összehasonlítjuk a szulfatált és nem-szulfatált tripszineket, a SPINK1 inhibitor a

nem-szulfatált formákhoz gyorsabban kötődik, míg a szulfatált formák esetében a disszociáció gyorsabb. Összességében a nagyobb disszociációs érték magyarázatot ad a magasabb  $K_D$  értékre, amelyet az egyensúlyi kötés vizsgálata során állapítottunk meg. A  $K_D$  értékeket a sebességi állandóból számoltuk és hasonlítottuk az egyensúlyi kötés erősségéhez. A kapott értékek itt is a pM-os vagy alacsonyabb tartományba tartoztak a nem-szulfatált tripszinek esetében. Megjegyzendő azonban, hogy a használt kísérletes módszer nem megbízható a subpikomoláris  $K_D$  tartományban. A szulfatált és hasnyálból tisztított natív tripszinek a számolt  $K_D$  értékek két-ötszörös eltérést (alacsonyabb) mutattak a kísérletes eredményekhez képest. Ez az eltérés még elfogadható két eltérő módszer esetében.

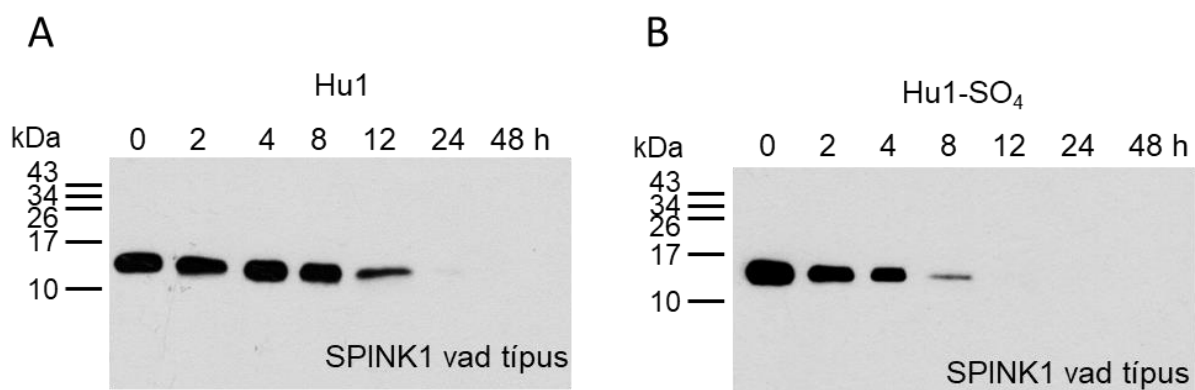
#### 5.2.4 A tripszin átmeneti gátlása SPINK1 inhibitorral

A SPINK1 egy úgynevezett átmeneti inhibitor, idővel inaktiválódik és az aktív proteáz felszabadul a gátlás alól (**Laskowski és mtsai, 1953**). A gátlás alóli felszabadulás első lépéseként a tripszin hasítja a SPINK1 reaktív hurkában található peptidkötést a Lys41-Ile42 aminosavak között, amelyet a véglegesen inaktiváló, főként Arg67-Gln68 közötti peptidkötés, illetve az inhibitoron belül több helyen történő hasítás követ (**Szmola és mtsai, 2003, Schneider és mtsai, 1973; Schneider és mtsai, 1974; Kikuchi és mtsai, 1989**). A szulfatált és nem-szulfatált tripszinek vad típusú SPINK1 gátlás alól való felszabadulását összehasonlítva azt találtuk, hogy a szulfatált tripszin sokkal gyorsabban szabadult fel, mint a nem-szulfatált tripszin (**31. ábra**).



**31. ábra.** A humán kationos tripszin átmeneti gátlása a vad típusú és N34S SPINK1-gyel. 25 nM SPINK1-et 30 nM Hu1 vagy Hu1-SO<sub>4</sub>-el inkubáltuk 30 percig 1 M Tris– HCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,05% Tween20, pH 8,0) 23°C-on ahol a tripszinek 80%-os aktivitás csökkenést mutattak. Az adott időpontokban 100 µl mintát kivettünk és 2,5 µl 6 mM Suc-Ala-Ala-Pro-Lys-p-nitroanilid szubsztrát hozzáadásával mértük a tripszinek aktivitását. A 100% tripszin aktivitásnak a maximum aktivitást vettük SPINK1 jelenléte nélkül. A hibaszávok szórást jelölnek n= 3, a szimbólumok néhol nagyobbak, mint a hibaszávok.

Erre magyarázatot ad, hogy a szulfatált formák esetében az inhibitor disszociáció a tripszincről gyorsabb, ami magasabb  $K_D$  értéket jelent. A SPINK1 lebomlását Western-blottal is igazoltuk, ami megegyezett a mintákban mért növekvő tripszin aktivitással (**32. ábra**). Az átmeneti gátlás kinetikája hasonló volt a vad és N34S mutáns esetében, a felszabadulás valamivel lassabban következett be a mutáns SPINK1 estében.



**32. ábra.** A humán kationos tripszin átmeneti gátlásának vizsgálata a vad típusú és N34S SPINK1-gyel, Western-blot módszerrel. Az adott időpontokban 200 µl mintát kivettünk (25 nM SPINK1-et 30 nM Hu1 vagy Hu1-SO<sub>4</sub>-el inkubáltuk) és 10%-os triklór ecetsavval csaptuk ki, majd a SPINK1 fehérjét 18% SDS-PAGE-gel és Western-blottal anti-His antitesttel azonosítottuk.

### 5.2.5 A tripszin szulfatálás gyengíti a SPINK1 kötést

Ahogy fentebb leírtuk, azt találtuk, hogy a human tripszin szulfatálás a 154-es tirozinon gyengíti a SPINK1 inhibitor kötődését a tripszinhez és elősegíti annak gátlás alóli felszabadulását. A munkánk során humán hasnyálból izolált szulfatált tripszin izoformákat, illetve *E. coliban* termelt nem-szulfatált tripszineket használtunk. A vizsgálatok teljessége érdekében HEK293T sejtekben termelt szulfatált és nem-szulfatált kationos és anionos tripszineket is bevontuk a kísérletekbe, lásd Anyagok és módszerek fejezet. A tripszineket a sejtes felülúszóból tisztítottuk és az egyensúlyi kötés erősségét megmértük a vad típusú és az N34S mutánsra is. Ahogy az a **9. táblázatban** látható a  $K_D$  értékek mindig magasabbnak adódtak szulfatált tripszinre, mint a nem-szulfatált tripszinekre, alátámasztva, hogy a szulfatálás gyengíti az inhibitor kötést. Érdekesség, hogy az *E. coli* és hasnyálból tisztított (**9. táblázat**) tripszinekkal történő összehasonlítás esetén a  $K_D$  értékek a nem-szulfatált HEK293T sejtekben termelt tripszinekre magasabbak voltak, a szulfatált HEK293T sejtekben termelt tripszinekre pedig alacsonyabbak. Ezért a HEK293T sejtekben termelt szulfatált és nem-szulfatált tripszinek kisebb eltérést mutatnak, így a különbség a gátlás csökkenésében kisebb lesz, azonban az előzőekben megfigyelt megállapítás még mindig igaz marad, hogy a szulfatálás gyengíti a SPINK1 kötődését.

**9. táblázat. A vad típusú és N34S SPINK1 egyensúlyi disszociációs állandókat meghatároztuk HEK293T sejtekben termelt, tisztított Hu1, Hu1-SO<sub>4</sub>, Hu2, Hu2-SO<sub>4</sub> tripszinekre.** Az egyensúlyi disszociációs állandót ( $K_D$ ), vad típusú és N34S mutáns SPINK1 inhibitorokkal határoztuk meg nem-szulfatált (rekombináns, HEK293T sejtekben termelt) és szulfatált (szintén HEK293T sejtekben termelt) humán tripszinekre. A kísérleteket az Anyagok és módszerek fejezetben leírtak szerint végeztük el. Hu1, nem-szulfatált kationos tripszin; Hu1-SO<sub>4</sub>, szulfatált humán kationos tripszin; Hu2, nem-szulfatált human anionos tripszin; Hu2-SO<sub>4</sub>, szulfatált humán kationos tripszin. A  $K_D$  értékek legalább három párhuzamos mérés globális illesztéséből származnak. A szórás értékek a táblázatban szintén megtalálhatóak.

$K_D$ (pM)	Hu1 (HEK293T)	Hu1-SO <sub>4</sub> (HEK293T)	Hu2 (HEK293T)	Hu2-SO <sub>4</sub> (HEK293T)
<b>SPINK1 vad típus</b>	4,4 ± 0,4	40,2 ± 7,8	0,5 ± 0,2	9,0 ± 1,1
<b>SPINK1 N34S</b>	4,7 ± 0,3	37,5 ± 4,3	0,8 ± 0,2	6,3 ± 0,7

### 5.2.6 A SPINK1 Y43 szerepe a humán tripszinek kötésében

A molekuláris modellezés azt sejtette, hogy a Y43 térben közeli elhelyezkedése a szulfát csoporthoz csökkent gátlást eredményezhet (**26. ábra**). Ennek igazolására a SPINK1 tirozin 43 aminosavat alaninra, valamint argininra cseréltük és meghatároztuk az egyensúlyi kötési állandót szulfatált és nem-szulfatált kationos tripszinre (**10. táblázat**). A vad típusú SPINK1-el összehasonlítva azt kaptuk, hogy a Y43A mutáns hússzoros, a Y43R mutáns pedig százszoros csökkenést mutat a kötés erősségében nem-szulfatált tripszinre. A kötés erőssége a Y43A mutáns esetében hasonló volt a vad típusúhoz a szulfatált tripszinre, a Y43R pedig háromszor erősebben kötődött a vad típusúhoz képest. Az Y43A mutáns csökkent kötődése a nem-szulfatált tripszinhez cáfolja, hogy a SPINK1 Y43-nak fontos szerepe lenne a tripszin 154 tirozinnal való kölcsönhatásban és így a kötés stabilizálásában. A szulfatált tripszinre ugyanakkor nem mutat elérést a vad típusú SPINK1-hez képest. A Y43R mutáció csökkent inhibitor tripszin kötést eredményez a nem-szulfatált tripszin esetén, azonban a szulfatált tripszinhez erősebben kötődik, valószínűleg elektrosztatikus kötés révén a guanidium és szulfát csoport között. Kísérleteinkkel igazoltuk, hogy a tripszin szulfatálása gyengíti a proteáz-inhibitor komplex kialakulását.

**10. táblázat. A vad típusú, Y43A és Y43R SPINK1 egyensúlyi disszociációs állandókat meghatároztuk Hu1, Hu1-SO<sub>4</sub> *E. coli* és humán hasnyálból tisztított tripszinekre.** Az egyensúlyi disszociációs állandót ( $K_{D(eq)}$ ), vad típusú, Y43A és Y43R mutáns SPINK1 inhibitorokkal határoztuk meg nem-szulfatált (rekombináns, *E. coli*-ban termelt) és natív, szulfatált (hasnyálból tisztított) humán tripszinekre. A kísérleteket az Anyagok és módszerek fejezetben leírtak szerint végeztük el. Hu1, nem-szulfatált kationos tripszin; Hu1-SO<sub>4</sub>, natív, szulfatált humán kationos tripszin. A  $K_{D(eq)}$  értékek legalább három párhuzamos mérés globális illesztéséből származnak. A szórás értékek a táblázatban szintén megtalálhatóak.

$K_{D(eq)}$ (pM)	Hu1 ( <i>E. coli</i> )	Hu1-SO <sub>4</sub> (natív)
<b>SPINK1 vad típus</b>	1,1 ± 0,4	67,4 ± 7,7
<b>SPINK1 Y43A</b>	20,3 ± 2,5	62,2 ± 5,6
<b>SPINK1 Y43R</b>	103,8 ± 13,9	27,1 ± 2,3

### 5.2.7 A misszensz SPINK1 mutánsok kötődése a natív human tripszinekhez

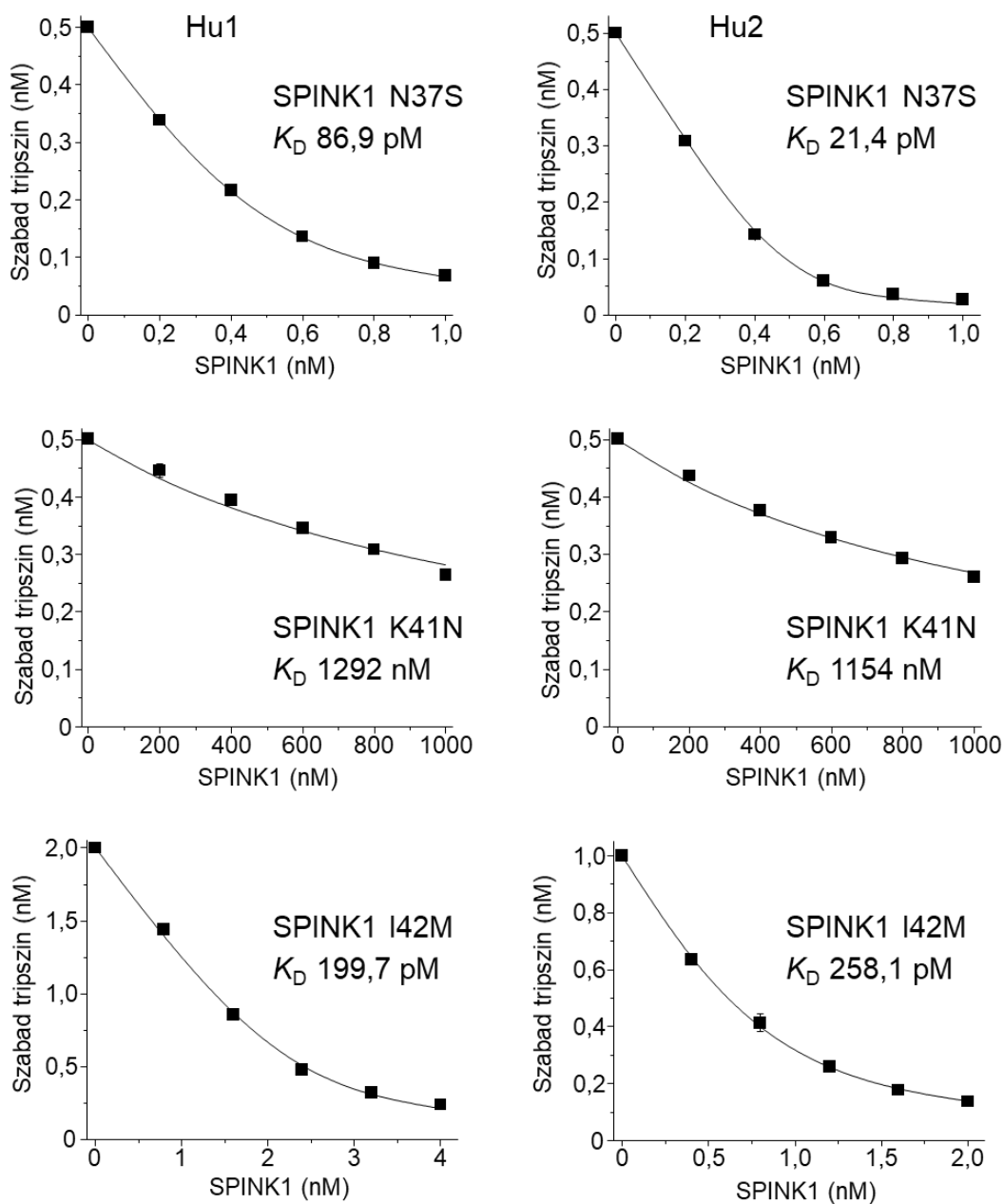
Munkánk során az N34S mutáns mellett további 6 különböző SPINK1 mutánst tisztítottunk, amelyek normál szekréciót mutatnak (**3. táblázat**). A gátlási képességük

karakterizálása céljából meghatároztuk az egyensúlyi állandókat hasnyálból tisztított humán, natív szulfatált anionos és kationos tripszinekre. Klinikai szempontból ezek a mutációk pathobiokémiai jelentőséggel rendelkezhetnek, így fontos, hogy karakterizáljuk őket. A kísérletek görbéi a **33-34. ábrán** láthatóak a  $K_D$  értékek összefoglalva pedig **11. táblázatban** és **35. ábrán** láthatóak. A K41N mutáns a vártan megfelelően gyengén kötődött mindkét tripszin izoformához, az általunk mért  $K_D$  értékek a mikromoláris tartományba estek, ami 20-30 ezerszeres csökkenést jelent. A reaktív hurok mutáns I42M kötődése 3-7-szeresére csökkent. A P55S mutáns csak nagyon kis eltérést mutatott a vad típushoz képest, 1,6-3,4 – szeres csökkenést, ami még a mérési hibának betudható. A többi SPINK1 mutáns, N34S, N37S, R65Q és Q68R  $K_D$  értékei hasonlóak vagy kisebbek voltak, mint a vad típusé. Összességében arra a következtetésre jutottunk, hogy a ritka K41N és I42M mutációk, amelyek a reaktív hurokban találhatóak, okoznak szignifikáns változást a tripszin inhibitor kötésében.

**11. táblázat.** A vad típusú és mutáns SPINK1 egyensúlyi disszociációs állandókat meghatároztuk Hu1-SO<sub>4</sub> és Hu2-SO<sub>4</sub> humán hasnyálból tisztított tripszinekre. Az egyensúlyi disszociációs állandót ( $K_{D(eq)}$ ), vad típusú és hét mutáns SPINK1 inhibitorral határoztuk meg szulfatált (hasnyálból tisztított) humán tripszinekre. A kísérleteket az Anyagok és módszerek fejezetben leírtak szerint végeztük el. Hu1-SO<sub>4</sub>, natív, szulfatált humán kationos tripszin; Hu1-SO<sub>4</sub>, natív, szulfatált humán kationos tripszin. A  $K_{D(eq)}$  értékek legalább három párhuzamos mérés globális illesztéséből származnak, a szórás értékeket is feltüntettük.

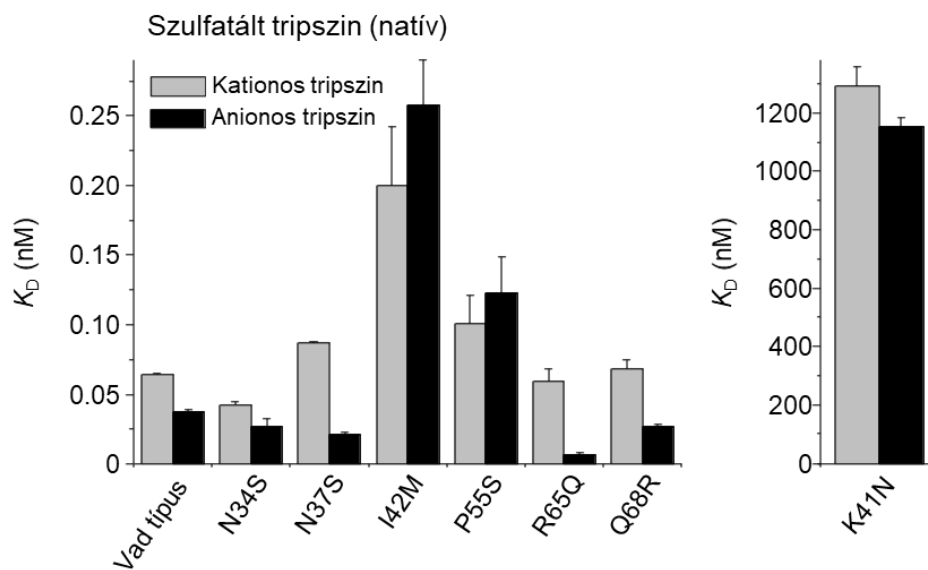
$K_{D(eq)}$ (pM)	Hu1-SO <sub>4</sub>	Hu2-SO <sub>4</sub>
<b>SPINK1 vad típus</b>	62,2 ± 10,3	36,7 ± 2,3
<b>SPINK1 N34S</b>	32,3 ± 2,9	16,7 ± 0,8
<b>SPINK1 N37S</b>	86,9 ± 1,0	21,4 ± 1,9
<b>SPINK1 I42M</b>	200 ± 42	258 ± 32
<b>SPINK1 P55S</b>	101 ± 20	123 ± 26
<b>SPINK1 R65Q</b>	59,2 ± 9,4	6,0 ± 2,5
<b>SPINK1 Q68R</b>	68,0 ± 7,1	27,0 ± 0,6
$K_D$ (μM)		
<b>SPINK1 K41N</b>	1,29 ± 0,07	1,15 ± 0,03

Szulfatált tripszin (natív)



**33. ábra. A humán tripszinek gátlása SPINK1 N37S, K41N, és I42M variánsokkal.** A SPINK1 variánsok kötődését a humán hasnyálból tisztított szulfatált kationos (Hu1) és anionos tripszinekhez (Hu2) a disszociációs állandó ( $K_D$ ) megállapításával mértük. A hibasávok szórását jelölnék  $n = 3$ , a szimbólumok néhol nagyobbak, mint a hibasávok.





**35. ábra. A SPINK1 varánsok egyensúlyi disszociációs állandói humán tripszinre oszlopdiagram ábrázolásban.** A szulfatált tripszineket humán hasnyálból tisztítottuk. A hibasávok szórást jelölnek (n= 3).

## 6. MEGBESZÉLÉS

### 6.1 A Ty1 proteáz biokémiai karakterizálása

Munkánk során biokémiai szempontból karakterizáltuk az *E. coli* sejtekben termeltetett rekombináns *S. cerevisiae* Ty1 retrotranszpozon proteázt. Az enzim His<sub>6</sub> fúziós címkével ellátott és His<sub>6</sub> címke nélküli változatát is expresszáltuk. Előbbit Ni- kelát affinitás kromatográfiával a processzált Ty1 Gag-PR-His<sub>6</sub> fehérjéből, utóbbit pedig géliszűréssel tisztítottuk. Ahogy azt korábbi kísérletekben is kimutatták, a tisztítás során a proteáz a Ty1 Gag-PR-His<sub>6</sub> prekursor fehérjéből autoproteolízissel kihalásodik (**Merkulov és mtsai, 1996**). Ezt a processzált formát (Ty1 PR-His<sub>6</sub>) használtuk kísérleteink során. A proteáz karakterizálásához és biokémiai tulajdonságainak vizsgálatához az aktivitásbeli eltéréseket mértük. Magas NaCl koncentráció mellett (>1M NaCl), gyengén alkalikus körülmények között mértünk a legmagasabb aktivitás értékeket. A proteáz hőmérséklet optimuma méréseink alapján 30 °C-nak adódott, ami a sarjadó élesztő intracelluláris élelciklusának alacsonyabb hőmérsékletéhez történő adaptálódást jelzi. Az általunk megfigyelt hőmérsékletváltozásra adott aktivitásbeli eltérések a Ty1 retrotranszpozon transzpozíció hatékonyságára is hatással lehetnek. Habár a proteáz hőmérséklet optimuma 30 °C körüli értéknek bizonyult, ez a hőmérséklet a legtöbb élesztő esetén szuboptimális a transzpozíció hatékonyságára nézve, amelynek optimuma 24 °C körül adódik (**Lawler és mtsai, 2002**). A reverz transzkriptáz szintén a transzpozíció hőmérséklet függésének meghatározó eleme, a vírus-szerű fehérjék 37 °C-on processzálódnak, de ezen a hőmérsékleten a reverz transzkriptáz aktivitása is jelentősen csökken a Ty1 retrotranszpozon esetében (**Lawler és mtsai, 2002**). A templát-primer komplex és Gag-Pol poliprotein hőmérséklet-indukálta konformációs változásai szintén hozzájárulnak a Ty1 élelciklus hőmérséklet függéséhez. Mindent összegezve tehát a transzpozíció hiánya magasabb hőmérsékleten (**Lawler és mtsai, 2002**) a Ty1 proteáz és reverz transzkriptáz aktivitás csökkenésének is köszönhető, a transzpozíció hatékonyságára egyértelműen közvetlen hatással van a két enzim aktivitása.

Az urea koncentráció, amely az aktivitás 50%-os csökkenését okozza, jelentősen alacsonyabb a HIV-1 proteázhoz hasonlóan, és hasonló az XMRV proteázhoz (**Matúz és mtsai, 2012**). A proteolitikus esszék során a Ty1 proteáz esetében csak nagyon alacsony specifikus aktivitást mértünk a retrovirális proteázokhoz viszonyítva. A HFV és AMV proteázokhoz viszonyítva viszont hasonló értékeket kaptunk. Közleményünk előtt a Ty1

retrotranszpozon eredetű proteáz gátlási profilját nem vizsgálták. Munkacsoportunk ezért a HIV-1 proteáz ellen kifejlesztett, antiretrovirális terápiában használt gátlószerek hatását vizsgálta a Ty1 proteáz aktivitására. A HIV-1 proteáz gátlószerek mind hatástalannak bizonyultak a Ty1 proteáz esetében. Gátlást csak egy általános aszpartil proteáz gátlószer esetén, az acetil-pepszatinnal tudtunk kimutatni. Az acetil-pepszatin a pepszatin A származéka, mely szintén nem gátolta az enzimaktivitást.

A Ty1 proteáz szerkezeti jellemzőit sem vizsgálták korábbi tanulmányokban kutatócsoportunk előtt, sem kísérletes, sem pedig *in silico* módszerekkel. Munkánk során a proteáz másodlagos és negyedleges szerkezetét is vizsgáltuk, homológ modellezéssel. A szerkezet a HIV-1 proteáz aktív centrum motívumához és szerkezetéhez nagyon hasonló, de néhány eltérés a retrovirális proteázokhoz képest megfigyelhető. Egy extra helikális szakasz és a kiterjedt N- és C-terminális régiók jelenléte miatt a Ty1 proteáz nagyobb szerkezeti hasonlóságot mutat a retrovírus-szerű Ddi1 proteázhoz mint a HIV-1 proteázhoz. Továbbá, a Ty1 PR dimerizációs régió felépítése is a Ddi1 és az XMRV proteázhoz volt hasonló. Az *in vitro* stabilitás teszttel is összhangban, a dimerizációs régióban található váltakozó  $\beta$ -redők hiánya alacsony dimer stabilitást és nagyobb érzékenységet okoz az urea koncentrációra. Ezt nem csak a Ty1 proteáz, de az XMRV proteáz esetében is alátámasztotta munkacsoportunk (**Matúz és mtsai, 2012**). A D-S/T-G-A aktív hely motívum szintén szerepet játszhat az alacsony dimer stabilitásban, mivel a szerin a katalitikus motívumban csökkenti az úgynevezett tűzoltó fogás (*fireman's grip*) erősségét a treoninhoz képest (**Strisovsky és mtsai, 2000**). A proteáz esszékhez szintetikus oligopeptideket és fluoreszcens rekombináns fehérje szubsztrátokat használtunk. Az általunk alkalmazott fluorometriás proteáz esszét előzetesen már HIV-1 és TEV proteázok vizsgálata során használták (**Bozóki és mtsai, 2018; Mótyán és tsai, 2018; Bozóki és mtsai, 2019**). Az ezekben a kísérletekben használt pDest-His<sub>6</sub>-MBPmTurquoise2 expressziós vektort használtunk egy extra (GGGS)<sub>4</sub> linker hozzáadása után. Ennek oka a szubsztrát és fluoreszcens fehérje rész közötti rész flexibilitásának növelése, ezáltal az enzim hasítóhely könnyebb hozzáférhetősége. A rekombinánsan termelt fluoreszcens szubsztrátok a Ty1 proteáz előző tanulmányokban megállapított (**Merkulov és mtsai, 1996**) különböző hasítóhelyeit tartalmazták. Annak bizonyítására, hogy a szubsztrátot egyetlen specifikus helyen hasítja a proteáz SDS-PAGE és MALDI-TOF MS módszereket használtunk. A szubsztrátok vad típusú és módosított hasítóhelyeket is tartalmaztak. Ennek oka pedig az volt, hogy a szubsztrát kölcsönhatását vizsgáljuk a proteáz feltételezett felszíni szubsztrátkötő képességét. Nemrég bonyították a

HIV-1 proteáz esetében a felszíni szubsztrátkötő helyek fontosságát a proteáz gátlószerek elleni rezisztencia kialakulásában (**Laco, 2015**). Eredményeink azt igazolják, hogy a Ty1 proteáz esetében a felszíni szubsztrátkötő helyek nincsenek jelen. A modellezés eredményei alapján, az S4-S1 szubsztrátkötő zsebek kialakításában résztvevő aminosavakat azonosítottuk és feltételezzük, hogy a P10-P6 és P6'-P10' kötőhelyek a Ty1 proteázban különböznek a HIV-1 proteáztól. A kiterjedt N- és C-terminális régiók szerepe a Ty1 proteáz szubsztrátkötésében, illetve az esetleges felszíni kötőhelyek hozzáférhetőségében, továbbra is tisztázatlan.

## 6.2 Szekretálódó SPINK1 variánsok vizsgálata

Elvégeztük a szekretált SPINK1 variánsok átfogó és funkcionális vizsgálatát a humán tripszin izoformákkal való kölcsönhatására. A kérdés az volt, hogy a SPINK1 mutációk gyengítik-e a SPINK1 tripszin inhibitor kötés erősségét a humán tripszin izoformákhoz és így szerepet játszanak-e a krónikus hasnyálmirigy-gyulladás pathológiájában már egy ideje megválaszolatlanul áll.

Előzetesen már vizsgálták az N34S, P55S és R65Q variánsokat, azonban a használt módszer ezekben a kísérletekben félkvantitatívnak tekinthető (**Kuwata és mtsai, 2002; Hirota és mtsai, 2003; Király és mtsai, 2007**), valamint nem-szulfatált rekombináns humán kationos tripszint, marha tripszint vagy ismeretlen eredetű humán tripszint használtak a mérésekhez. A marha vagy más emlős tripszinekkal ellentétben a humán tripszinek a 154-es tirozinon egy szulfát csoportot tartalmaznak, amely hatással van a szubsztrát, illetve inhibitor kötésre (**Scheele és mtsai, 1981; Sahin-Tóth és mtsai, 2006; Rónai és mtsai, 2009**). Munkánk során a natív, hasnyálból tisztított humán kationos és anionos tripszint használtunk, amelyek a hasnyál össztripszin tartalmának 95%-át teszik ki. A harmadik izoformát a mezotripszint a SPINK1 csak nagyon gyengén gátolja (**Szmola és mtsai, 2003; Rinderknecht, 1984**), ezért vizsgálataink erre az izoformára nem terjedtek ki. A szulfatáció hatását is vizsgáltuk a SPINK1 mutációk kötésre gyakorolt hatása mellett, ezért a vad típusú és az N34S változatot is vizsgáltuk nem-szulfatált rekombináns *E. coli*-ban termelt tripszinekkal, natív hasnyálból tisztított szulfatált tripszinnel. A kapott eredményeket összevetettük a nem-szulfatált és szulfatált rekombináns HEK293T emlős sejtvonalban termelt tripszinekkal. Azt találtuk, hogy az *E. coli*-ban termelt és hasnyálból tisztított tripszinek esetében a szulfatáció növelte a vad típusú SPINK1  $K_D$ -t, több mint ötvenszeresére a kationos és százhuszszorosára az anionos nem-szulfatált tripszin esetében, amikor az *E.*

*coliban* termelt nem-szulfatált és a hasnyárból tisztított szulfatált tripszineket hasonlítottuk össze. Ennél kisebb, de szignifikáns kilenc-tizenhatszoros különbséget figyeltünk meg amikor a nem-szulfatált és szulfatált rekombináns HEK293T emlős sejtvonalon termelt tripszinekkal kapott értékeket hasonlítottuk össze. A gyengébb inhibitor kötés magyarázata a SPINK1-tripszin komplex gyorsabb disszociációja. A tripszin model alapján arra következtethetünk, hogy a 154 tirozin szulfát csoportja kölcsönhatásba lép a SPINK1 reaktív hurokkal. A Tyr43 mutációja alátámasztotta ezt a feltételezést, amikor a tirozin aminosavat alaninra vagy argininra cseréltük, a kötés erőssége a tripszinek szulfatációs állapotától függött. Ez a megfigyelés bizonyítja, hogy a SPINK1 mutációk hatásának a vizsgálata során, kiemelt jelentőségű a szulfatált tripszinek használata. A kísérletek konklúzív bizonyítékot szolgáltatnak arra, hogy az N34S mutációnak nincs hatása a tripszinhez való kötés erősségére. Továbbá megfigyeltük, hogy ha a vad típusú és N34S mutációt tartalmazó SPINK1 inhibiort hosszabb ideig inkubáltuk a tripszinekkal, azonos sebességgel degradálódtak és így a tripszin felszabadult a gátlás alól. Ezt a jelenséget átmeneti gátlásnak nevezzük. A mezotripszin esetében korábban kimutatták, hogy degradálja a SPINK1-et (**Szmola és mtsai, 2003**) ami felveti a kérdést, hogy az N34S mutációnak van-e hatása az inhibitor degradációjára, növeli-e a degradáció sebességét és így az inhibitor nem képes ellátni a funkcióját a hasnyálmirigy védelmében. A kísérleteink nem ezt igazolják. Fontos más mechanizmusokat is figyelembe venni, amelyek magyarázhatják az N34S mutáció szerepét a hasnyálmirigy kialakulásában, ugyanis ez a variáns egy kiterjedt haplotípus része, ami 4 intron variánst tartalmaz, amelyeket gyakran karakterizáltak genetikai és funkcionális tanulmányokban. Transzfektált emlős sejtekben, minigénes és teljes génes splicing esszékben egyik intron variáns esetében sem figyelték meg, hogy hatással lenne a SPINK1 expressziójára (**Kereszturi és mtsai, 2009; Boulling és mtsai, 2012**). N34S mutációra heterozigóta hasnyálmirigy rák sejtvonalon azonban az allél csökkent expresszióját azaz csökkent mRNS szintjét mutatták ki, valamint kimutattak egy új upstream variánst a haplotípus részeként (**Kereszturi és Sahin-Tóth, 2017**). Kimutatták (**Boulling és mtsai, 2017**), hogy ez a mutáció egy enhancer elembe található és feltételezik, hogy ez okozhatja a csökkent expressziót és mRNS szintet. Habár ez nem teljesen bizonyítja, de a bizonyítékok száma növekszik tűnik arra, hogy az N34S mutációval asszociált haplotípus csökkenti a védő hatású SPINK1 szintet, ennek okozója pedig az 5 vessző régióban található.

Munkánk során megfigyeltük a K41N, I42M, és P55S variánsok különböző mértékű kötési defektusát a humán tripszinekhez. A K41N és I42M mutációk a Lys41–Ile42 reaktív

hurok peptidkötését érintik, és így azt sejtetik, hogy hatással lehetnek az inhibitor tripszinnel való kölcsönhatására. Mindkét variánst egyszer írták le visszaterő akut pankreatitisben szenvedő gyermekekben (**Terlizzi és mtsai, 2013; Werlin és mtsai, 2015**). A 41-es pozícióban található lizin a SPINK1 fő, specifikus aminosava, amely a tripszin S1 szubsztrátkötő zsebébe illeszkedik, ahol egy aszpartát aminosavval lép kölcsönhatásba. Amikor a lizint a töltés nélküli aszparaginra cseréltük, jelentős 20-30 ezerszeres csökkentést figyeltünk meg a tripszinhez való kötésben, ami nagymértékű csökkenést jelent a SPINK1 hasnyálmirigy védelmében betöltött szerepében. Az I42M mutáció relatív konzervált cseréje a 42-es pozícióban található izoleucinnak, ami alacsony, de említésre méltó 3-szoros csökkenést okoz a kationos tripszin és 7-szeres csökkenést okoz az anionos tripszin kötés affinitásában. A betegben a SPINK1 mutáción kívül kimutattak egyéb genetikai kockázati tényezőket, mutációt a CTRC és CFTR génekben. Ez azt igazolja, hogy az I42M SPINK1 variáns kisebb jelentőséggel bír a hasnyálmirigy kialakulásában, mint a K41N variáns, mert a betegség kialakulásához más gének mutációi is jelen kell legyenek (**Werlin és mtsai, 2015**). A P55S variáns csak nagyon alacsony csökkenést mutatott, 1,6X csökkenést a kationos és 3,4X csökkenést az anionos tripszin esetében. A prolin térbeli közelsége a tripszin szulfát csoportjához igazolja ezt a megfigyelést. Ez a mutáns azonban csak nagyon alacsony, 0,9%-os jelenlétet mutat a populációban, valamint nem mutatható ki szignifikáns szinten hasnyálmirigy-gyulladásban szenvedő betegekből (**3. táblázat**). Néhány tanulmányban azonban a mutáció transz helyzetben kapcsolva jelen van más patogén SPINK1 mutációkkal együtt (**Pfützer és mtsai, 2000; Chandak és mtsai, 2002; Drenth és mtsai, 2002; Le Maréchal és mtsai, 2004; Hamoir és mtsai, 2013**). Az eredményeinkkel összegezve azt feltételezhetjük, hogy a P55S mutáció ugyan nagyon kis mértékben növelheti a hasnyálmirigy-gyulladás kialakulását, de klinikai szempontból önmagában nem jelentős. A N34S variánshoz hasonlóan az R65Q és Q68R variánsok is normál, változatlan erősséggel kötődtek a humán tripszinekhez, mint a vad típusú SPINK1. Előzetesen már leírták, hogy az R65Q variáns csökkent szekréción mutatott a vad típusúhoz képest (**Beer és Sahin-Tóth, 2014; Király és mtsai, 2007; Boulling és mtsai, 2007**), ezt mi is igazoltuk. Előzetes kísérletekben komplementer DNS és minigén konstrukciókat használva azt találták, hogy az R65Q variáns esetében az mRNS stabilitása és splicingja érintett lehet, de később teljes gén expressziós konstrukciókkal ezt nem figyelték meg (**Beer és Sahin-Tóth, 2014; Király és mtsai, 2007; Boulling és mtsai, 2007; Wu és mtsai, 2017**). Összegezve tehát, az R65Q variáns csökkent szekréciónjából valószínűleg a fehérje hibás foldingja és nem pedig az mRNS csökkent stabilitása felelős. Ezt az is alátámasztja, hogy munkánk során a SPINK1-His<sub>10</sub>

R65Q mutáns fehérje emelkedett szekréciós szintjét figyeltük meg a His<sub>10</sub> fúziós címkét nem tartalmazó fehérjéhez képest. A Q68R variáns esetében megnövekedett szekréciót figyeltek meg transzfektált sejtekből (**Boulling és mtsai, 2012**). Ezt azonban munkacsoportunk nem tudta reprodukálni. Végezetül, a SPINK1 gén homozigóta deléciója egerekben és emberekben is súlyos hasnyálmirigy-gyulladás kialakulásához vezet, ahol a hasnyálmirigy tripszin általi önemésztését állapították meg (**Ohmuraya és mtsai, 2005; Ohmuraya és mtsai, 2006; Vnet és mtsai, 2017; Sahin-Tóth és mtsai, 2017**).

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

## 7. ÖSSZEFOGLALÁS

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

Munkánk során a vad típusú, illetve hét betegben azonosított SPINK1 variáns (N34S, N37S, K41N, I42M, P55S R65Q és Q68R) gátlási képességét vizsgáltuk szulfatált és nem-szulfatált humán tripszin izoformákon. A vad típusú és a mutáns SPINK1 fehérje változatok hatását a kötése erősségre az asszociációs és disszociációs állandók megállapításával vizsgáltuk. Amikor a vad típusú SPINK1 kötődését vizsgáltuk *E. coli*-ban termelt (nem-szulfatált) és hasnyálból tisztított tripszin (szulfatált) esetében, a kationos tripszin esetében ötvenszeres, az anionos tripszin esetében több mint százhuszszoros csökkenést mértünk a  $K_D$  értékekben. Megvizsgáltuk a nem-szulfatált és szulfatált humán kationos tripszin átmeneti gátlását a vad típusú és a szakirodalomban hasnyálmirigy-gyulladásal asszociált N34S SPINK1 variánssal. Nem figyeltünk meg jelentős eltérést a kötése erősségben vagy degradációban. Vizsgáltuk továbbá a SPINK1 fehérjében két mesterséges mutáció (Y43A és Y43R) hatását a szulfatált és nem-szulfatált kationos tripszin Tyr154-nel való kölcsönhatásra. A kötés erősségét a tripszinek szulfatációs állapota határozta meg, gyengítve vagy erősítve azt. Mindent összevetve, eredményeink arra engednek következtetni, hogy a SPINK1 inhibitor gyengébb kötődése a tripszin izoformákhoz elhanyagolható, nem kiváltó oka a hasnyálmirigy gyulladásnak, a betegség kialakulásához inkább az inhibitor csökkent expressziója, foldingja járulhat hozzá.

## 7. SUMMARY

During my studies I had the opportunity to study two proteases, their properties and their inhibitions. We expressed and purified the protease from the *S. cerevisiae* Ty1 retrotransposon. We characterized the His-tagged and untagged form of the Ty1 protease using HPLC and fluorometric enzyme activity assay methods. The biochemical properties of the protease are similar to the retroviral and retroviral like proteases. We have measured and calculated the kinetic parameters of the protease ( $K_M$ ,  $k_{cat}$ ,  $k_{cat}/K_M$ ) on artificial oligopeptides and fluorophore fused protein substrates mimicking natural cleavage sites. An extended surface binding site of HIV1 protease has been discovered recently, therefore with modified substrates we were studying the putative surface substrate binding grooves of Ty1 protease. We have not found proof of the presence of surface substrate binding sites. We have studied the effect of ionic strength, temperature, pH and urea concentration on the enzyme activity, the properties of Ty1 protease were comparable to the properties of other retroviral and retroviral-like proteases. Finally we have performed studies with HIV1 and other aspartic protease inhibitors. Based on our results the Ty1 protease is naturally resistant against most of the HIV-1 inhibitors.

We have also studied the inhibitory potential of seven SPINK1 variants (N34S, N37S, K41N, I42M, P55S, R65Q, and Q68R) on sulfated and non-sulfated human trypsin isoforms. We determined the association and dissociation rate constants and calculated the equilibrium dissociation constant for the wild-type and mutant SPINK1 variants. We measured the  $K_D$  of the wild type SPINK1 with the recombinant (non-sulfated), and native (sulfated) human cationic and anionic trypsins. In the case of cationic trypsin we observed a 50X increase, whilst for the anionic trypsin we measured more than 120X increase of the  $K_D$  values. We studied the temporary inhibition of the sulfated and non-sulfated forms of human cationic trypsin by N34S SPINK1, and found no significant difference between the mutant and the wild type of the inhibitor. Moreover, we have studied the effect of two artificial mutations (Y43A and Y43R) and their interaction with the Tyr154 residue of sulfated and non-sulfated cationic trypsin. The inhibitory effect was dependent on the sulfation of the trypsin isoforms. Altogether, we suggest that the SPINK1 mutations do not affect the inhibitory potential significantly, the SPINK1 mutations probably contribute to the development of pancreatitis through the impaired expression of the gene and/or by the reduced folding and secretion of the inhibitor.

## 8. IRODALOMJEGYZÉK

- A Lipcsei Egyetem adatbázisa a krónikus pancreatitisben leírt genetikai változatokról: <http://www.uni-leipzig.de/pancreasmutation/db.html>
- Adams SE. Mellor J. Gull K. Sim RB. Tuite MF. Kingsman SM. és mtsai. The functions and relationships of Ty-VLP proteins in yeast reflect those of mammalian retroviral proteins. *Cell*. 1987 49, 111–119.
- Aparna L. Euan JR, Aniruddha C. Chhabinath M. Modeling and structural analysis of PA clan serine proteases. *BMC Research Notes*. 2012 5:256
- Applebaum-Shapiro SE. Finch R. Pfitzer RH. Hepp LA. Gates L. Amann S. Martin S. Ulrich CD 2<sup>nd</sup>, Whitcomb DC. Hereditary pancreatitis in North America: the Pittsburgh-Midwest Multi-Center Pancreatic Study Group Study. *Pancreatology*. 2001 1(5):439-43.
- Athauda SB. Yoshioka K. Shiba T. Takahashi K. Isolation and characterization of recombinant Drosophila Copia aspartic proteinase. *Biochem J*. 2006; 399(3):535–42.
- Bagossi P. Sperka T. Fehér A. Kádas J. Zahuczky G. Miklóssy G. és mtsai. Amino acid preferences for acritical substrate binding subsite of retroviral proteases in type 1 cleavage sites. *J Virol*. 2005;79(7):4213–8.
- Bartelt DC. Shapanka R. Greene LJ. The primary structure of the human pancreatic secretory trypsin inhibitor. Amino acid sequence of the reduced S-aminoethylated protein. *Arch Biochem Biophys*. 1977 179(1):189-99.
- Beer S. Sahin-Tóth M. Exonic variants affecting pre-mRNA splicing add to genetic burden in chronic pancreatitis. *Gut*. 2014 63, 860–861
- Bitoun E. Chavanas S. Irvine AD. Lonie L. Bodemer C. Paradisi M. Hamel-Teillac D. Ansai S. és mtsai. Netherton syndrome: disease expression and spectrum of SPINK5 mutations in 21 families. *J Invest Dermatol*. 2002 118(2):352-61.
- Bitoun E. Micheloni A. Lamant L. Bonnart C. Tartaglia-Polcini A. Cobbold C. Al Saati T. Mariotti F. Mazereeuw-Hautier J. és mtsai. LEKTI proteolytic processing in human primary keratinocytes, tissue distribution and defective expression in Netherton syndrome. *Hum Mol Genet*. 2003 12(19):2417-30.
- Bode W. Huber R. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur J Biochem*. 1992 204(2):433-51.
- Bagossi P. Copeland TD. Oroszlan S. Louis JM. Tózsér J. Effect of substrate residues on the P2' preference of retroviral proteinases. *Eur J Biochem*. 1999; 264(3): 921–929.
- Boulling A. Chen JM. Callebaut I. Férec C. Is the SPINK1 p.Asn34Ser missense mutation per se the true culprit within its associated haplotype? *Webmed Central Genetics* 3. 2012 WMC003084
- Boulling A. Keiles S. Masson E. Chen JM. Férec C. Functional analysis of eight missense mutations in the SPINK1 gene. *Pancreas* 2012 41, 329–330

- Boulling A. Le Maréchal C. Trouvé P. Raguénès O. Chen J. M. Férec C. Functional analysis of pancreatitis-associated missense mutations in the pancreatic secretory trypsin inhibitor (SPINK1) gene. *Eur. J. Hum. Genet.* 2007 15, 936–942
- Boulling A. Masson, E. Zou W. B. Paliwal S. Wu, H. Issarapu P. Bhaskar, S. Génin, E. Cooper, D. N. Li, Z. S. Chandak, G. R. Liao, Z. Chen, J. M. and Férec, C. Identification of a functional enhancer variant within the chronic pancreatitis-associated SPINK1 c.101A>G (p.Asn34Ser)-containing haplotype. *Hum. Mutat.* 2017 38, 1014–1024
- Bozóki B. Gazda L. Tóth F. Miczi M. Mótyán JA. Tózsér J. A recombinant fusion protein-based, fluorescent protease assay for high throughput-compatible substrate screening. *Anal Biochem.* 2018; 540–541: 52–63.
- Bozóki B. Mótyán JA. Miczi M. Gazda LD. Tózsér J. Use of Recombinant Fusion Proteins in a Fluorescent Protease Assay Platform and Their In-gel Renaturation. *J Vis Exp.* 2019; 143: e58824.
- Brattsand M. Stefansson K. Hubiche T. Nilsson SK. Egelrud T. SPINK9: A Selective, Skin-Specific Kazal-Type Serine Protease Inhibitor. *Journal of Investigative Dermatology* Volume 129, Issue 7, 2009, Pages 1656-1665
- Brik A. Wang CH. HIV-1 protease: mechanism and drug discovery. *Organic and biomolecular chemistry.* 2003
- Brookman JL. Stott AJ. Cheeseman PJ. Adamson CS. Holmes D. Cole J, és mtsai. Analysis of TYA protein regions necessary for formation of the Ty1 virus-like particle structure. *Virology.* 1995; 212(1): 69–76.
- Camilleri M. Vazquez Roque. Encyclopedia of the Neurological Sciences (Second Edition) *Gastrointestinal Functions* 2014, Pages 411-416
- Chandak GR. Idris MM. Reddy DN. Bhaskar S. Sriram PV. Singh L. Mutations in the pancreatic secretory trypsin inhibitor gene (PSTI/SPINK1) rather than the cationic trypsinogen gene (PRSS1) are significantly associated with tropical calcific pancreatitis. *J. Med. Genet.* 2002 39, 347–351
- Chase T. Jr. and Shaw E. p-Nitrophenyl-p'-guanidinobenzoate HCl: a new active site titrant for trypsin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1967 29, 508–514
- Chen JM. Férec C. Human trypsins. In: Barrett AJ, Rawlings ND és Woessner JF, *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Elsevier, London, 2004: 1489-1493.
- Chen X. Zaro JL. Shen WC. Fusion protein linkers: property, design and functionality. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013; 65(10):1357–69.
- Chen JM. and Férec C. The true culprit within the SPINK1 p.N34S-containing haplotype is still at large. *Gut* 2009 58, 478–480
- Clare JJ. Belcourt M. Farabaugh PJ. Efficient translational frameshifting occurs within a conserved sequence of the overlap between the two genes of a yeast Ty1 transposon. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988 85:6816–6820.

- Coffin JM. Hughes SH. Varmus HE. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring 1997
- Collins J. Szardenings M. Maywald F. Blácker H. Frank R. Hecht, HJ. Vasel B. Schomburg D. Fink E. and Fritz H. Human leukocyte elastase inhibitors: designed variants of human pancreatic secretory trypsin inhibitor (hPSTI). *Biol. Chem.* 1990 Hoppe Seyler 371(Suppl), 29–36
- Craik CS. Rocznik S. Largman C. and Rutter WJ. The catalytic role of the active site aspartic acid in serine proteases. *Science* 1987 237(4817), 909-913.
- Curcio MJ. Derbyshire KM. The outs and ins of transposition: from mu to kangaroo. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003; 4: 865–877.
- Curcio MJ. Garfinkel DJ. Posttranslational control of Ty1 retrotransposition occurs at the level of protein processing. *Mol Cell Biol.* 1992; 12(6): 2813–2825.
- Curcio MJ. Lutz S. Lesage P. The Ty1 LTR retrotransposon of budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Spectr.* 2015; 3(2): MDNA3-0053-2014
- 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.
- Dosztányi Z. Csizmok V. Tompa P. Simon I. IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content. *Bioinformatics.* 2005; 21: 3433–3434.
- Drenth JP. te Morsche R. and Jansen JB. Mutations in serine protease inhibitor Kazal type 1 are strongly associated with chronic pancreatitis. *Gut* 2002 50, 687–692
- Eunenn KV. Bakker BM. The importance and challenges of *in vivo*-like enzyme kinetics. *Perspectives in Science*, 2014; 1: 126–130.
- Eizert H. Bander P. Bagossi P. Sperka T. Miklóssy G. Boross P. és mtsai. 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. Weber IT. Bagossi P. Boross P. Mahalingam B. Louis JM. és mtsai. Effect of sequence polymorphism and drug resistance on two HIV-1 Gag processing sites. *Eur J Biochem.* 2002; 269(16): 4114– 20.
- Fenyőfalvi Gy. Bagossi P. Copeland TD. Oroszlan S. Boross P. Tözsér J. Expression and characterization of human foamy virus proteinase. *FEBS Lett.* 1999; 462: 397–401.
- Fjeld K. Weiss FU. Lasher D. Rosendahl J. Chen JM. Johansson BB. Kirsten H. és mtsai A recombined allele of the lipase gene CEL and its pseudogene CELP confers susceptibility to chronic pancreatitis. *Nat Genet.* 2015 47(5):518-522.
- Foltmann B. Activation of human pepsinogens. *FEBS Lett.* 1988;241(1-2):69-72.

- Freeman TC. Playford RJ. Quinn C. Beardshall K. Poulter L. Young J. Calam J. Pancreatic secretory trypsin inhibitor in gastrointestinal mucosa and gastric juice. *Gut*. 1990 31(11):1318-23.
- Friedl AA. Kiechle M. Maxeiner HG. Schiestl RH. Eckardt-Schupp F. Ty1 integrase overexpression leads to integration of non-Ty1 DNA fragments into the genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics*. 2010; 284(4): 231–242.
- 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.
- Fukayama M. Hayashi Y. Koike M. Ogawa M. Kosaki G. Immunohistochemical localization of pancreatic secretory trypsin inhibitor in fetal and adult pancreatic and extrapancreatic tissues. *J Histochem Cytochem*. 1986 34(2):227-35.
- Gaboriaud C. Serre L. Guy-Crotte O. Forest E. Fontecilla-Camps J. C. Crystal structure of human trypsin 1: unexpected phosphorylation of Tyr151. *J. Mol. Biol.* 1996 259, 995–1010.
- Garfinkel DJ. Hedge AM. Youngren SD. Copeland TD. Proteolytic processing of pol-TYB proteins from the yeast retrotransposon Ty1. *J Virol*. 1991; 65(9): 4573–81.
- Gazda LD. Joóné-Matúz K. Nagy T. Mótyán JA. Tózsér J. Biochemical characterization of Ty1 retrotransposon protease *PLoS One*. 2020 9;15(1):e0227062.
- 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.
- Gorry MC. Ghabbaizadeh D. Furey W. Gates LK Jr. Preston RA. Aston CE. Zhang Y. Ulrich C. Ehrlich GD. Whitcomb DC. Mutations in the cationic trypsinogen gene are associated with recurrent acute and chronic pancreatitis. *Gastroenterology*. 1997 113(4):1063-8.
- Greene LJ. Pubols MH. Bartelt DC. Human pancreatic secretory trypsin inhibitor. *Methods Enzymol*. 1976 45:813-25.
- 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): 1453–1465.
- Hamoir C. Pepermans X. Piessevaux H. Jouret-Mourin A. Weynand B. Habyalimana JB. Leal T. Geubel A. Gigot J. F. Deprez PH. Clinical and morphological characteristics of sporadic genetically determined pancreatitis as compared to idiopathic pancreatitis: higher risk of pancreatic cancer in CFTR variants. *Digestion* 2013 87, 229–239 Harbor, NY; 1997
- Hecht H. J. Szardenings M. Collins J. Schomburg D. Three-dimensional structure of the complexes between bovine chymotrypsinogen A and two recombinant variants of

- human pancreatic secretory trypsin inhibitor (Kazal-type). *J. Mol. Biol.* 1991 220, 711–722.
- Hedstrom L. Serine protease mechanism and specificity. *Chem Rev.* 2002 102 (12): 4501–24.
- Hegy E. and Sahin-Tóth M. Genetic risk in chronic pancreatitis: the trypsin-dependent pathway. *Dig. Dis. Sci.* 2017 62, 1692–1701
- Hegy E, Sahin-Tóth M. Genetic Risk in Chronic Pancreatitis: The Trypsin-Dependent Pathway. *Dig Dis Sci.* 2017 Jul;62(7):1692-1701.
- Hirota, M. Kuwata, K. Ohmuraya, M. and Ogawa, M. From acute to chronic pancreatitis: the role of mutations in the pancreatic secretory trypsin inhibitor gene. *JOP* 2003 4, 83–88
- Howes N. Lerch MM. Greenhalf W. Stocken DD. Ellis I. Simon P. Truninger K. Ammann R. Cavallini G. Charnley RM. Uomo G. Delhaye M. Spicak J. Drumm B. Jansen J. Mountford R. Whitcomb DC. Neoptolemos JP; European Registry of Hereditary Pancreatitis and Pancreatic Cancer (EUROPAC). Clinical and genetic characteristics of hereditary pancreatitis in Europe. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2004 2(3):252-61.
- Huhtala ML. Demonstration of a new acrosin inhibitor in human seminal plasma. Hoppe Seylers *Z. Physiol Chem.* 1984 365(7):819-25.
- Ishida T. and Kato S. Theoretical perspectives on the reaction mechanism of serine proteases: The reaction free energy profiles of the acylation process. *J. Am. Chem. Soc.* 2003 125(39), 12035-12048.
- Katoh I Yasunaga T Ikawa Y Yoshinaka Y. Inhibition of retroviral protease activity by an aspartyl proteinase inhibitor. *Nature.* 1987 329(6140):654-6.1
- Keim V. Witt H. Bauer N. Bodeker H. Rosendahl J. Teich N. Mossner J. The course of genetically determined chronic pancreatitis. *JOP.* 2003 4(4):146-54.
- Kenesi E. Katona G. Szilagyi L. Structural and evolutionary consequences of unpaired cysteines in trypsinogen. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003309(4):749-54
- Kereszturi E. and Sahin-Tóth M. Pancreatic cancer cell lines heterozygous for the SPINK1 p.N34S haplotype exhibit diminished expression of the variant allele. *Pancreas* 2017 46, e54–e55
- Kereszturi E. Király O. and Sahin-Tóth M. Minigene analysis of intronic variants in common SPINK1 haplotypes associated with chronic pancreatitis. *Gut* 2009 58, 545–549
- Kikuchi N Nagata K Shin M Mitsushima K Teraoka H Yoshida N. Site-directed mutagenesis of human pancreatic secretory trypsin inhibitor. *J Biochem (Tokyo).* 1989 106(6):1059-63.
- Kikuchi N. Nagata K. Shin M. Mitsushima K. Teraoka H. and Yoshida N. Site-directed mutagenesis of human pancreatic secretory trypsin inhibitor. *J. Biochem.* 1989 106, 1059–1063
- Király O. Boulling A. Witt H. Le Maréchal C. Chen J. M. Rosendahl J. Battaggia C. Wartmann T. Sahin-Tóth M. and Férec C. Signal peptide variants that impair secretion of pancreatic secretory trypsin inhibitor (SPINK1) cause autosomal dominant hereditary pancreatitis. *Hum. Mutat.* 2007 28, 469–476

- Király O. Guan L. and Sahin-Tóth M. Expression of recombinant proteins with uniform N-termini. *Methods Mol. Biol.* 2011 705, 175–194
- Király O. Wartmann T. and Sahin-Tóth M. Missense mutations in pancreatic secretory trypsin inhibitor (SPINK1) cause intracellular retention and degradation. *Gut* 2007 56, 1433–1438
- Knight CG Barrett AJ. Interaction of human cathepsin D with the inhibitor pepstatin. *Biochem J.* 1976 155(1):117-25.
- Krowarsch D. Cierpicki T. Jelen F. Otlewski J. Canonical protein inhibitors of serine proteases. *Cell Mol Life Sci.* 2003 60(11):2427-44.
- Kukor Z. Tóth M. and Sahin-Tóth M. Human anionic trypsinogen: properties of autocatalytic activation and degradation and implications in pancreatic diseases. *Eur. J. Biochem.* 2003 270, 2047–2058
- Kume K. Masamune A. Kikuta K. and Shimosegawa T. [-215G>A; IVS3+2T>C] mutation in the SPINK1 gene causes exon 3 skipping and loss of the trypsin binding site. *Gut* 2006 55, 1214
- Kuwata K. Hirota M. Shimizu H. Nakae M. Nishihara S. Takimoto A. Mitsushima K. Kikuchi N. Endo K. Inoue M. and Ogawa, M. Functional analysis of recombinant pancreatic secretory trypsin inhibitor protein with amino-acid substitution. *J. Gastroenterol.* 2002 37, 928–934
- Kyte J. Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol.* 1982; 157(1):105–32.
- Laco GS. HIV-1 protease substrate-groove: Role in substrate recognition and inhibitor resistance. *Biochimie.* 2015 118: 90–103.
- 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.
- Lasher D. Szabó A. Masamune A. Chen J. M. Xiao X. Whitcomb D.C. Barmada M. M. Ewers M. Ruffert C. Paliwal S. Issarapu P. Bhaskar S. Mani K. R. Chandak G. R. Laumen H. és mtsai. Protease-sensitive pancreatic lipase variants are associated with early onset chronic pancreatitis. *Am. J. Gastroenterol.* 2019 114, 974–983
- Laskar A. Chaterjee A. Protease-Revisiting the Types and potential, *Online journal of biotechnology research* 2009 ISSN: 0975-1734
- Laskowski M. Jr. Kato I. Protein inhibitors of proteinases. *Annu Rev Biochem.* 1980 49:593-626.
- Laskowski M. Wu FC. Temporary inhibition of trypsin. *J Biol Chem* 1953 204:797-805.
- Laskowski M. és Wu F. C. Temporary inhibition of trypsin. *J. Biol. Chem.* 1953 204, 797–805

- Lasson A. Borgstrom A. Ohlsson K. Elevated pancreatic secretory trypsin inhibitor levels during severe inflammatory disease, renal insufficiency, and after various surgical procedures. *Scand J Gastroenterol.* 1986 21(10):1275-80.
- Lawler JF Jr. Haeusser DP. Dull A. Boeke JD. Keeney JB. Ty1 defect in proteolysis at high temperature. *J Virol.* 2002 76(9):4233-40.
- Lawler JF Jr. Merkulov GV. Boeke JD. Frameshift signal transplantation and the unambiguous analysis of mutations in the yeast retrotransposon Ty1 Gag-Pol overlap region. *J Virol.* 2001; 75(15): 6769-6775.
- Le Maréchal C. Chen J. M. Le Gall C. Plessis G. Chipponi J. Chuzhanova, N. A. Raguénès, O. and Férec, C. Two novel severe mutations in the pancreatic secretory trypsin inhibitor gene (SPINK1) cause familial and/or hereditary pancreatitis. *Hum. Mutat.* 2004 23, 205
- Lengyel Z. Pál G. és Sahin-Tóth M. Affinity purification of recombinant trypsinogen using immobilized ecotin. *Protein Expr. Purif.* 1998 12, 291-294
- Li M. Gustchina A. Matúz K. Tózsér J. Namwong S. Goldfarb NE. és mtsai. Structural and biochemical characterization of the inhibitor complexes of xenotropic murine leukemia virus-related virus protease. *FEBS J.* 2011 278(22):4413-24.
- Louis JM. Nashed NT. Parris KD. Kimmel AR. Jerina DM. Kinetics and mechanism of autoprocessing of human immunodeficiency virus type 1 protease from an analog of the Gag-Pol polyprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91(17): 7970-7974.
- Louis JM. Oroszlan S. Tózsér J. Stabilization from autoproteolysis and kinetic characterization of the human T-cell leukemia virus type 1 proteinase. *J Biol Chem.* 1999; 274: (10) pp. 6660-6666.
- Mager PP. The active site of HIV-1 protease. *Med Res Rev.* 2001;21(4):348-53.
- Magert HJ. Standker L. Kreutzmann P. Zucht HD. Reinecke M. Sommerhoff CP. Fritz H. Forssmann WG. LEKTI, a novel 15-domain type of human serine proteinase inhibitor. *J Biol Chem.* 1999 274(31):21499-502.
- Mahdi M. Szojka Z. Mótyán JA. Tózsér J. Inhibition Profiling of Retroviral Protease Inhibitors Using an HIV-2 Modular System. *Viruses.* 2015; 7(12): 6152-62.
- Malik HS. Eickbush TH. Phylogenetic analysis of ribonuclease H domains suggests a late, chimeric origin of LTR retrotransposable elements and retroviruses. *Genome Res.* 2001 11(7):1187-97.
- Merkulov GV. Swiderek KM. Boeke JD. A critical proteolytic cleavage site near the C terminus of the yeast retrotransposon Ty1 Gag protein. *J Virol.* 1996; 70: 5548-5556.
- Marchbank T. Chinery R. Hanby AM. Poulson R. Elia G. Playford RJ. Distribution and expression of pancreatic secretory trypsin inhibitor and its possible role in epithelial restitution. *Am J Pathol.* 1996 148(3):715-22.
- Marciniszyn J. Hartsuck JA. Tang J. Mode of inhibition of acid proteases by pepstatin *J. Biol. Chem.* 1976 251 (22): 7088-94.

- Marlor RK. Parkhurst SM. Corces VG. The *Drosophila melanogaster* gypsy transposable element encodes putative gene products homologous to retroviral proteins. *Mol Cell Biol.* 1986 1129–1134.
- Masamune A. Kume K. Takagi Y. Kikuta K. Satoh K. Satoh A. Shimosegawa T. N34S mutation in the SPINK1 gene is not associated with alternative splicing. *Pancreas* 2007 34, 423–428
- Matsuda K. Ogawa M. Shibata T. Nishibe S. Miyauchi K. Matsuda Y. Mori T. Postoperative elevation of serum pancreatic secretory trypsin inhibitor. *Am J Gastroenterol.* 1985 80(9):694-8.
- Matúz K. Mótyán J. Li M. Wlodawer A, Tózsér J. Inhibition of XMRV and HIV-1 proteases by pepstatin A and acetyl-pepstatin. *FEBS J.* 2012;279(17):3276-86.
- Mellanby J. Woolley VJ. The ferments of the pancreas: Part I. The generation of trypsin from trypsinogen by enterokinase. *J Physiol.* 1912 45(5):370-88.
- Mellor J. Alexandra MF. Melanie JD. Nichola AR. Wilson W. Kingsman AJ. és mtsai. The Ty transposon of *Saccharomyces cerevisiae* determines the synthesis of at least three proteins. *Nucl Acids Res.* 1985;13(17): 6249–6263.
- Menéndez-Arias L. Weber IT. Soss J. Harrison RW. Gotte D. Oroszlan S. Kinetic and modeling studies of subsites S4-S3' of Moloney murine leukemia virus protease. *J Biol Chem.* 1994; 269(24):16795–801. PMID: 8207003
- Merkulov GV. Lawler JF Jr. Eby Y. Boeke JD. Ty1 Proteolytic Cleavage Sites Are Required for Transposition: All Sites Are Not Created Equal. *J Virol.* 2001; 75(2): 638–644.
- Metsis M. Cintra A. Solfrini V. Ernfors P. Bortolotti F. Morrasutti DG. Ostenson CG. Efendic S. Agerberth B. Mutt V. Persson H. Fuxe K. Molecular cloning of PEC-60 and expression of its mRNA and peptide in the gastrointestinal tract and immune system. *J Biol Chem.* 1992 267(28):19829-32.
- Moore SP. és Garfinkel DJ. Correct Integration of Model Substrates by Ty1 Integrase. *J Virol.* 2000 74(24): 11522–11530.
- Moore SP. Rinckel LA. Garfinkel DJ. A Ty1 Integrase Nuclear Localization Signal Required for Retrotransposition. *Mol Cell Biol.* 1998 18(2): 1105–1114.
- Moore PC. Cortez JT. Chamberlain CE. Alba D. Berger AC. Quandt Z. Chan A. Cheng MH. Bautista JL. Peng J. German MS. Anderson MS. Oakes SA. Elastase 3B mutation links to familial pancreatitis with diabetes and pancreatic adenocarcinoma. *J Clin Invest.* 2019 1;129(11):4676-4681.
- Mótyán JA. Mahdi M. Hoffka Gy. Tózsér J. Potential Resistance of SARS-CoV-2 Main Protease (Mpro) against Protease Inhibitors: Lessons Learned from HIV-1 Protease. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23(7), 3507

- Mótyán JA. Miczi M. Bozóki B. Tőzsér J. Data supporting Ni-NTA magnetic bead-based fluorescent protease assay using recombinant fusion protein substrates. *Data in brief*. 2018 18: 203–208.
- Müller F. Brühl KH. Freidel K. Kowallik KV. Ciriacy M. Processing of TY1 proteins and formation of Ty1 virus-like particles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet*. 1987 207(2–3): 421–429.
- Nallamsetty S Kapust RB Tőzsér J Cherry S Tropea JE Copeland TD és mtsai. Efficient site-specific processing of fusion proteins by tobacco vein mottling virus protease *in vivo* and *in vitro*. *Protein Expr Purif*. 2004; 38(1): 108–115.
- Nemoda Z. Sahin-Tóth M. Chymotrypsin C (caldecrin) stimulates autoactivation of human cationic trypsinogen. *J. Biol. Chem*. 2006 28;281(17):11879-11886.
- Neurath H. Proteolytic processing and physiological regulation. *Trends Biochem. Sci*. 1989 14(7):268-271.
- Norberg A. Gruber S. Angelucci F. Renlund S. Wadensten H. Efendic S. Ostenson CG. Jornvall H. Sillard R. Mathe AA. Identification of the bioactive peptide PEC-60 in brain. *Cell Mol Life Sci*. 2003 60(2):378-81.
- Nyaruhucha CN. Kito M. Fukuoka SI. Identification and expression of the cDNA-encoding human mesotrypsin(ogen), an isoform of trypsin with inhibitor resistance. *J Biol Chem*. 1997 18;272(16):10573-8
- Odani S. Koide T. Ono T. A possible evolutionary relationship between plant trypsin inhibitor, alpha-amylase inhibitor, and mammalian pancreatic secretory trypsin inhibitor (Kazal). *J Biochem (Tokyo)*. 1983 93(6):1701-4.
- Ogawa M. Matsuda K. Shibata T. Matsuda Y. Ukai T. Ohta M. Mori T. Elevation of serum pancreatic secretory trypsin inhibitor (PSTI) in patients with serious injury. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. 1985 50(2):259-66.
- Ogawa M. Pancreatic secretory trypsin inhibitor as an acute phase reactant. *Clin Biochem*. 1988 21(1):19-25.
- Ohmuraya M. Hirota M. Araki K. Baba H. Yamamura K. Enhanced trypsin activity in pancreatic acinar cells deficient for serine protease inhibitor kazal type 3. *Pancreas*. 2006 33, 104–106
- Ohmuraya M. Hirota M. Araki M. Mizushima N. Matsui M. Mizumoto T. Haruna K. Kume S. Takeya M. Ogawa M. Araki K. and Yamamura K. Autophagic cell death of pancreatic acinar cells in serine protease inhibitor Kazal type 3-deficient mice. *Gastroenterology*. 2005 129, 696–705
- Otsuki M. Nishimori I. Hayakawa T. Hirota M. Ogawa M. Shimosegawa T. Research Committee on Intractable Disease of the Pancreas. Hereditary pancreatitis: clinical characteristics and diagnostic criteria in Japan. *Pancreas*. 2004 28(2):200-6.
- Paju A. Hotakainen K. Cao Y. Laurila T. Gadaleanu V. Hemminki A. Stenman UH. Bjartell A. Increased Expression of Tumor-Associated Trypsin Inhibitor, TATI, in Prostate Cancer and in Androgen-Independent 22Rv1 Cells. *Eur Urol*. 2007 52(6):1670-9.

- Pap Á. A pancreas betegségei. Lonovics J. Tulassay Zs. Varró V. *Klinikai gastroenterologia. Medicina*, Budapest, 2003: 551-634.
- Pap Á. A pancreas. Varró V. *Gastroenterologia. Medicina*, Budapest, 1998 577-651.
- Pfützer R. H. Barmada M. M. Brunskill A. P. Finch R. Hart P. S. Neoptolemos J. Furey W. F. and Whitcomb D. C. SPINK1/PSTI polymorphisms act as disease modifiers in familial and idiopathic chronic pancreatitis. *Gastroenterology*. 2000 119, 615–623
- Pourmotabbed G. · Chou H. J. · Gregerman R. I. Pepstatin Inhibition of Proteinase-Free Human Renin. *Enzyme*. 1982 28:343–347
- Pubols MH. Bartelt DC. Greene LJ. Trypsin inhibitor from human pancreas and pancreatic juice. *J Biol Chem*. 1974 249(7):2235-42.
- 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.
- Rachel B. Kapust RB. Tózsér J. Fox JD. Anderson DE. Cherry S. Copeland TD. Waugh DS. Tobacco etch virus protease: mechanism of autolysis and rational design of stable mutants with wild-type catalytic proficiency. *Protein Eng*. 2001; 14: 993–1000.
- Ravnik-Glavac M. Glavac D. di Sant' Agnese P. Chernick M. Dean M. Cystic fibrosis gene mutations detected in hereditary pancreatitis. *Pflugers Arch*. 1996 431(6 Suppl 2): R191-2.
- Rawlings ND. Barrett AJ. Thomas PD. Huang X. Bateman A. Finn RD. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Res*. 2018 46, D624–D632.
- 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*. 1989a 247(1):113-7.
- Richards AD. Broadhurst AV. Ritchie AJ. Dunn BM. Kay J. Inhibition of the aspartic proteinase from HIV-2. *FEBS Lett*. 1989b; 253(1-2):214-6.
- Rinderknecht H. Geokas M.C. Anionic and cationic trypsinogens (trypsins) in mammalian pancreas. *Enzyme*. 1973 14: 116-130.
- Rinderknecht H. Renner IG. Abramson SB. Carmack C. Mesotrypsin: a new inhibitor-resistant protease from a zymogen in human pancreatic tissue and fluid. *Gastroenterology*. 1984 86(4):681-92
- Rinderknecht H. Activation of pancreatic zymogens. Normal activation, premature intrapancreatic activation, protective mechanisms against inappropriate activation. *Dig Dis Sci*. 1986 31(3):314-21.
- Rinderknecht H. Renner IG. Abramson SB. Carmack C. Mesotrypsin: a new inhibitor-resistant protease from a zymogen in human pancreatic tissue and fluid. *Gastroenterology*. 1984 86: 681-692.

- Rockett JC. Patrizio P. Schmid JE. Hecht NB. Dix DJ. Gene expression patterns associated with infertility in humans and rodent models. *Mutat Res.* 2004 549(1-2):225-40.
- Rónai. Z. Witt. H. Rickards. O. Destro-Bisol. G. Bradbury. A. R. and Sahin-Tóth. M. A common African polymorphism abolishes tyrosine sulfation of human anionic trypsinogen (PRSS2). *Biochem. J.* 2009 418, 155–161
- Rosendahl J. Kirsten H. Hegyi E. Kovacs P. Weiss FU. Laumen H. Lichtner P. Ruffert C. és mtsai. Genome-wide association study identifies inversion in the CTRB1-CTRB2 locus to modify risk for alcoholic and non-alcoholic chronic pancreatitis. *Gut.* 2018 67(10):1855-1863.
- Roth JF. The yeast Ty virus-like particles. *Yeast.* 2000; 16(9): 785–95.
- Sahin-Tóth M. Hegyi P. Tóth M. Genetic risk factors in chronic pancreatitis. *Orv Hetil.* 2008 Sep 7;149(36):1683-1688.
- Sahin-Tóth M. Tóth M. Gain-of-function mutations associated with hereditary pancreatitis enhance autoactivation of human cationic trypsinogen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000 19;278(2):286-289.
- Sahin-Tóth M. Biochemical models of hereditary pancreatitis. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 2006 35(2):303-312, ix.
- Sahin-Tóth M. Human cationic trypsinogen. Role of Asn-21 in zymogen activation and implications in hereditary pancreatitis. *J. Biol. Chem.* 2000 275(30):22750-22755.
- Sahin-Tóth M. The pathobiochemistry of hereditary pancreatitis: studies on recombinant human cationic trypsinogen. *Pancreatology.* 2001 1(5):461-465.
- Sahin-Tóth M. Partial and complete SPINK1 deficiency cause distinct pancreatic phenotypes. *Hum. Mutat.* 2017 38, 1619
- Sahin-Tóth M. and Tóth M. Gain-of-function mutations associated with hereditary pancreatitis enhance autoactivation of human cationic trypsinogen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000 278, 286–289
- Sahin-Tóth M. Kukor Z. and Nemoda Z. Human cationic trypsinogen is sulfated on Tyr154. *FEBS J.* 2006 273, 5044–5050
- Salameh MA, Soares AS, Hockla A, Radisky ES. Structural basis for accelerated cleavage of bovine pancreatic trypsin inhibitor (BPTI) by human mesotrypsin. *J Biol Chem.* 2008 Feb 15;283(7):4115-23.
- Sali A. Blundell TL. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol.* 1993 234: 779–815.
- Satoi S. Murao S. Binding of Pepsin Inhibitor (S-PI) and Pepsin. *Agricultural and Biological Chemistry*, Volume 36, Issue 3, 1972, Pages 515–518.
- Scheele G. Bartelt D. and Bieger, W. Characterization of human exocrine pancreatic proteins by two-dimensional isoelectric focusing/sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis. *Gastroenterology.* 1981 80, 461–473

- Schneider SL. and Laskowski M. Sr. Occurrence of two cleavages preceding inactivation of bovine temporary trypsin iso-inhibitor A. *J. Biol. Chem.* 1974 249, 2009–2015
- Schneider S. L. Stasiuk L. and Laskowski M. Sr. Sequence of tryptic cleavages in porcine pancreatic secretory inhibitor II. *J. Biol Chem.* 1973 248, 7207–7214
- Sharer N Schwarz M Malone G Howarth A Painter J Super M Braganza J. Mutations of the cystic fibrosis gene in patients with chronic pancreatitis. *N Engl J Med.* 1998 339(10):645-52
- Shibata T. Ogawa M. Matsuda K. Miyauchi K. Yamamoto T. Mori T. Purification and characterization of pancreatic secretory trypsin inhibitor in human gastric mucosa. *Clin Chim Acta.* 1986 159(1):27-36.
- Shibata T. Ogawa M. Takata N. Matsuda K. Niinobu T. Uda K. Wakasugi C. Mori T. Distribution of pancreatic secretory trypsin inhibitor in various human tissues and its inactivation in the gastric mucosa. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 1987 55(2):243- 8.
- Shibata T. Ogawa M. Takata N. Niinobu T. Uda K. Ukai T. Ohta M. Mori T. Elevation of serum pancreatic secretory trypsin inhibitor following serious injury. *Resuscitation.* 1988 16(3):163-8.
- Sichler. K. Hopfner. K.P. Kopetzki. E. Huber. R. Bode. W. Brandstetter, H. The influence of residue 190 in the S1 site of trypsin-like serine proteases on substrate selectivity is universally conserved. *FEBS Lett.* 2002 530, 220-224.
- Sirkis R. Gerst JE. Fass D. Ddi1, a eukaryotic protein with the retroviral protease fold. *J Mol Biol.* 2006 364: 376–387.
- Sperka T. Boross P. Eizert H. Tőzsér J. Bagossi P. Effect of mutations on the dimer stability and the pH optimum of the human foamy virus protease. *Protein Eng Des Sel.* 2006; 19(8): 369–75.
- Stanley Maloy and Kelly Hughes, *Brenner's Encyclopedia of Genetics*, Second Edition. 2013
- Stenman UH. Tumor-associated trypsin inhibitor. *Clin Chem.* 2002 48(8):1206-9.
- 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.
- Szabó A. Sahin-Tóth M. Increased activation of hereditary pancreatitis-associated human cationic trypsinogen mutants in presence of chymotrypsin C. *J Biol Chem.* 2012 8;287(24):20701-10.
- Szabó A. Héja D. Szakács D. Zboray K. Kékesi K. A. Radisky E. S. Sahin-Tóth M. and Pál G. High affinity small protein inhibitors of human chymotrypsin C (CTRC) selected by

- phage display reveal unusual preference for P4' acidic residues. *J. Biol. Chem.* 2011 286, 22535–22545
- Szabó A. Salameh M. A. Ludwig M. Radisky E. S. and Sahin-Tóth M. Tyrosine sulfation of human trypsin steers S2' subsite selectivity towards basic amino acids. *PLoS One* 2014 9, e102063
- Szepessy E. and Sahin-Tóth M. Human mesotrypsin exhibits restricted S1' subsite specificity with a strong preference for small polar side chains. *FEBS J.* 273, 2942–2954
- Szmola R. Sahin-Tóth M. Chymotrypsin C (caldecrin) promotes degradation of human cationic trypsin: identity with Rinderknecht's enzyme Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006 3;104(27):11227-11232.
- Szmola R. Kukor Z. and Sahin-Tóth M. Human mesotrypsin is a unique digestive protease specialized for the degradation of trypsin inhibitors. *J. Biol. Chem.* 2003 278, 48580–48589
- Takáts A. Berke G. Szentesi A. Farkas G Jr. Izbéki F. Eróss B. Czakó L. Vincze Á. Hegyi P. Sahin-Tóth M. Hegyi E. Common calcium-sensing receptor (CASR) gene variants do not modify risk for chronic pancreatitis in a Hungarian cohort. *Pancreatology.* 2021 21(7):1305-1310.
- Tanaka H. Ogawa M. Yoshioka T. Sugimoto T. Serum pancreatic secretory trypsin inhibitor (PSTI) in seriously injured and septic patients. *Adv Exp Med Biol.* 1988 240:493- 8.
- Terlizzi V. De Gregorio F. Sepe A. Amato N. Arduino C. Casale A. Majo F. Tomaiuolo R. Castaldo, G. and Raia, V. Brand new SPINK1 and CFTR mutations in a child with acute recurrent pancreatitis: a case report. *Minerva Pediatr.* 2013 65, 669–672
- Toldi V. Szabó A. Sahin-Tóth M. Inactivation of mesotrypsin by chymotrypsin C prevents trypsin inhibitor degradation. *J. Biol. Chem.* 2020 295, 3447–3455
- Toldi V. Kassay N. Szabó A. Missense PNLIP mutations impeding pancreatic lipase secretion cause protein misfolding and endoplasmic reticulum stress. *Pancreatology.* 2021 21(7):1317-1325.
- Tózsér J. Comparative Studies on Retroviral Proteases: Substrate Specificity. *Viruses.* 2010; 2:(1) pp.147–165.
- Tózsér J. Bagossi P. Weber IT. Copeland TD. Oroszlan S. Comparative studies on the substrate specificity of avian myeloblastosis virus proteinase and lentiviral proteinases. *J Biol Chem.* 1996; 271: 6781–6788.
- Tschesche H. Biochemistry of natural proteinase inhibitors. *Angew Chem Int Ed Engl.* 1974 13(1):10-28.
- Tsuzuki S. Kokado Y. Satomi S. Yamasaki Y. Hirayasu H. Iwanaga T. Fushiki T. Purification and identification of a binding protein for pancreatic secretory trypsin inhibitor: a novel role of the inhibitor as an anti-granzyme A. *Biochem J.* 2003 372(Pt 1):227-33.

- Umezawa H. Aoyagi T. Morishima H. Matsuzaki M. Hamada M. "Pepstatin, a new pepsin inhibitor produced by Actinomycetes". *J. Antibiot.* 1970 23 (5): 259–62.
- Venet T. Masson E. Talbotec C. Billiemaz K. Touraine R. Gay C. Destombe S. Cooper D. N. Patural H. Chen J. M. Férec C. Severe infantile isolated exocrine pancreatic insufficiency caused by the complete functional loss of the SPINK1 gene. *Hum. Mutat.* 2017 38, 1660–1665
- Werlin S. Konikoff F. M. Halpern Z. Barkay O. Yerushalmi B. Broide E. Santo E. Shamir R. Shaoul R. Shteyer E. Yaakov Y. Cohen M. Kerem E. Ruzniewski P. Masson E. és mtsai. Genetic and electrophysiological characteristics of recurrent acute pancreatitis. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2015 60, 675–679
- Whitcomb DC. Gorry MC. Preston RA. Furey W. Sossenheimer MJ. Ulrich CD. Martin SP. Gates LK Jr. Amann ST. Toskes PP. Liddle R. McGrath K. Uomo G. Post JC. Ehrlich GD. Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nat Genet.* 1996 14(2):141-5.
- Whitcomb DC, Lowe ME. Human pancreatic digestive enzymes. *Dig. Dis. Sci.* 2007;52(1):1-17.
- Witt H. Luck W. Becker M. A signal peptide cleavage site mutation in the cationic trypsinogen gene is strongly associated with chronic pancreatitis. *Gastroenterology.* 1999 117(1):7-10.
- Witt H. Luck W. Hennies HC. Classen M. Kage A. Lass U. Landt O. Becker M. Mutations in the gene encoding the serine protease inhibitor, Kazal type 1 are associated with chronic pancreatitis. *Nat Genet.* 2000 25(2):213-6.
- Witt H. Beer S. Rosendahl J. Chen JM. Chandak GR. Masamune A. Bence M. Szmola R. Oracz G. Macek M Jr. Bhatia E. Steigenberger S. Lasher D. Bühler F. Delaporte C. Sahin-Tóth M. és mtsai. Variants in CPA1 are strongly associated with early onset chronic pancreatitis. *Nat Genet.* 2013 45(10):1216-20.
- Wlodawer A. Erickson J.W. Structure-based inhibitors of HIV-1 protease. *Annu. Rev. Biochem.* 1993 62, 543-585.
- Wu H. Boulling A. Cooper D. N. Li Z. S. Liao Z. Chen J. M. and Férec C. In vitro and in silico evidence against a significant effect of the SPINK1 c.194G>A variant on pre-mRNA splicing. *Gut.* 2017 66, 2195–2196
- Wu H. Boulling A. Cooper D. N. Li Z. S. Liao Z. Férec C. and Chen J. M. Analysis of the impact of known SPINK1 missense variants on pre-mRNA splicing and/or mRNA stability in a full-length gene assay. *Genes.* (Basel) 2017 8, 263
- Xiong Y. Eickbush TH. Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences. *The EMBO Journal.* 1990 9 (10): 3353–62.
- Yachdav G. Kloppmann E. Kajan L. Hecht M. Goldberg T. Hamp T. és mtsai. PredictProtein—an open resource for online prediction of protein structural and functional features. *Nucleic Acids Res.* 2014 42: W337–343.

- Youngren SD. Boeke JD. Sanders NJ. Garfinkel DJ. Functional organization of the retrotransposon Ty from *Saccharomyces cerevisiae*: Ty protease is required for transposition. *Mol Cell Biol.* 1988 8(4): 1421–1431.
- Zhou J. Sahin-Tóth M. Chymotrypsin C (CTRC) mutations in chronic pancreatitis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2011 26(8):1238-46.
- Zou WB. Boulling A. Masson E. Cooper DN. Liao Z. Li ZS. Férec C. Chen, JM. Clarifying the clinical relevance of SPINK1 intronic variants in chronic pancreatitis. *Gut.* 2016 65, 884–886



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

Jelölt: Gazda Lívía Diána

Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Szabó, A., Toldi, V., **Gazda, L. D.**, Demcsák, A., Tózsér, J., Sahin-Tóth, M.: Defective binding of SPINK1 variants is an uncommon mechanism for impaired trypsin inhibition in chronic pancreatitis.  
*J. Biol. Chem.* 296, 1-13, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100343>  
IF: 5.157 (2020)
2. **Gazda, L. D.**, Matúz, K., Nagy, T., Mótyán, J. A., Tózsér, J.: Biochemical characterization of Ty1 retrotransposon protease.  
*PLoS One.* 15 (1), 1-24, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0227062>  
IF: 3.24





### További közlemények

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

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 12,067**

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

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

Debrecen, 2022.03.23.



## 9. TÁRGYSZAVAK/KEYWORDS

HIV-1 proteáz felszíni szubsztrátkötő helyei

*HIV-1 PR substrate-groove*

hosszú terminális ismétlődés

*long terminal repeat*

proteáz

*protease*

SPINK1

*Serine protease inhibitor Kazal type 1*

retrovirális proteáz

*retroviral protease*

tripszin

*trypsin*

Ty1 retrotranszpozon

*Ty1 retrotransposon*

vírus-szerű részecskék

*virus like particles*

## 10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

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

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

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

Köszönöm a segítséget Dr. Demcsák Alexandrának és Dr. Sahin-Tóth Miklósnak a másodszerzős közleményben nyújtott segítségükért.

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

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

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

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

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

Konferencia poszterek és előadások:

DE-OEC Tudományos Diákköri Tanács - TDK (Debrecen, Magyarország) 2012

Előadás: A Ty1 retrotranszpozon eredetű proteáz vizsgálata

5<sup>th</sup> Molecular Cell and Immune Biology Winter Symposium (Galyatető, Magyarország) 2012,

Poszter: Studies on Ty1 retrotransposon protease

7<sup>th</sup> Molecular Cell and Immune Biology Winter Symposium (Debrecen, Magyarország) 2014

Előadás: Study on Ty1 and Ty3 retrotransposon proteases

8<sup>th</sup> Molecular Cell and Immune Biology Winter Symposium (Debrecen, Magyarország) 2015

Előadás: Studies on Ty1 and Ty3 retrotransposon proteases

9<sup>th</sup> Molecular Cell and Immune Biology Winter Symposium (Debrecen, Magyarország) 2016

Előadás: Characterisation of Ty1 retrotransposon protease

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

11<sup>th</sup> Molecular Cell and Immune Biology Winter Symposium (Debrecen, Magyarország) 2018,

Poszter: Sulfation of human trypsin enhances the release of SPINK1 inhibitor

## 11. FÜGGELÉK