

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Rekombináns fehérje szubsztrátok alkalmazása
HIV-1 és SARS-CoV-2 proteázok vizsgálatára és egy
bioréteg interferometria-alapú mérési módszer
kidolgozására**

Miczi Márió

Témavezető: Dr. Mótyán János András



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIAI DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2022

TARTALOM

1. Rövidítések jegyzéke	4
2. Bevezetés.....	6
3. Irodalmi áttekintés	7
3.1 A proteázok	7
3.2. A HIV-1 vírus.....	9
3.2.1. A HIV-1 proteáz.....	10
3.2.2. A nukleokapszid fehérje, mint HIV-1 proteáz szubsztrát.....	15
3.3. A SARS-CoV-2 vírus	16
3.3.1. A SARS-CoV-2 fő proteáza	19
3.4. Proteázok vizsgálatára alkalmas módszerek	23
3.5. A rekombináns szubsztrát-alapú rendszer alkalmazási lehetőségei a proteázok vizsgálatára	24
3.6. A BLI alapja, felhasználása.....	28
3.6.1. Kvantitatív analízis menete; a kötődési kinetika meghatározásának alapjai BLI rendszer használatakor	30
3.6.2. A BLI felhasználása enzimaktivitás vizsgálatra detektálása	31
4. Célkitűzések	32
5. Anyagok és módszerek.....	33
5.1 A HIV-1 proteáz expressziója és tisztítása	33
5.2. Aktív enzim koncentráció meghatározása.....	34
5.3. Rekombináns fehérje szubsztrátok előállítása, expressziója és tisztítása.....	35
5.3.1. Klónozási lépések.....	35
5.3.2. Plazmid szelekció	35
5.3.3. Fehérje expresszió	37
5.3.4. Sejtek lízise.....	37
5.3.5. Fehérje tisztítás Ni-NTA-alapú mágneses gyöngyök segítségével	37
5.4. Rekombináns fehérje szubsztrát-alapú vizsgálatok.....	39
5.4.1. Rekombináns szubsztrátok oldatban történő hasítása	39
5.4.1.1. Szubsztrátok hasítása HIV-1 proteázzal	39
5.4.1.2. Szubsztrátok hasítása SARS-CoV-2 fő proteázzal.....	39
5.4.2. Enzimkinetikai paraméterek meghatározása mágneses gyöngy-alapú esszével.....	40
5.4.2.1. A HIV-1 proteáz vizsgálata	40
5.4.2.2. A SARS-CoV-2 fő proteáz vizsgálata	40
5.4.3. Mágneses gyöngyök regenerálása	40
5.5. Bio-réteg interferometria-alapú vizsgálatok.....	41
5.5.1. Ni ²⁺ -, Cu ²⁺ -, Zn ²⁺ -, és Co ²⁺ -NTA bioszenzorok előkészítése és vizsgálata.....	41
5.5.2 Mérések tisztított szubsztrátokkal	41
5.5.3. Mérések sejtlyázátumból.....	42

5.6. Mintaelőkészítés, PAGE analízis és denzitometria	43
6. Eredmények	44
6.1. A HIV-1 proteáz specificitásának vizsgálata nukleokapszid hasítóhelyet reprezentáló szubsztrátokkal	44
6.1.1. Relatív hasítási hatékonyság megállapítása.....	44
6.2. A SARS-CoV-2 fő proteáz vizsgálata.....	49
6.2.1. A SARS-CoV-2 fő proteáz hasítóhelyek <i>in silico</i> azonosítása.....	49
6.2.2. Rekombináns CTBP1 fehérje hasítása, valamint a CTBP1 fehérje hasítóhelyét tartalmazó rekombináns szubsztrátok előállítása és hasítása	50
6.2.3. A SARS-CoV-2 fő proteáz hasítóhelyek azonosítása	51
6.2.4. Enzimkinetikai mérések	53
6.3. Bioréteg interferometria-alapú mérési eljárás kidolgozása és alkalmazása	55
6.3.1. Mutáns HIV-1 PR tisztítása.....	55
6.3.2. Aktív centrum titrálás	57
6.3.3. Rekombináns fehérje szubsztrátok előállítása.....	58
6.3.4. A bioréteg interferometria-alapú mérés beállítása.....	60
6.3.4.1. A hasítási jel validálása	60
6.3.4.1.1. Hasítás katalitikusan aktív és inaktív HIV-1 proteázzal.....	60
6.3.4.1.2. Hasítási reakció tripszinnel.....	63
6.3.5. Különböző fémionok hatása a szubsztrát immobilizációra	64
6.3.6. Enzimkoncentráció hatása az immobilizált szubsztrát processzáására	67
6.3.7. Gátlószer hatása az enzimaktivitásra.....	69
6.3.8. Mérések teljes sejtlizátumból	70
6.4. A bioréteg interferometria-alapú mérés alkalmazása	72
6.4.1. A HIV-1 proteáz S2 szubsztrátkötő zsebének vizsgálata	72
6.4.2. A HIV-1 proteáz szubsztrátkötő árkanak vizsgálata	73
7. Megbeszélés.....	77
8. Összefoglalás	86
9. Summary	87
10. Irodalomjegyzék	88
11. Tárgyszavak / Keywords.....	98
12. Köszönetnyilvánítás.....	99
13. Függelék	101

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

BLI	bioréteg interferometria (<i>bio-layer interferometry</i>)
CA	kapszid fehérje
DMSO	dimetil-szulfoxid
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
FDA	Élelmiszerbiztonsági és Gyógyszerészeti Hivatal (<i>Food and Drug Administration</i>)
FP	fluoreszcens fehérje
gag	csoporth-specifikus antigén (<i>group-specific antigen</i>)
His ₆	hat-tagú hisztidin címke (<i>hexahistidine tag</i>)
HIV	humán immunodeficiencia vírus (<i>human immunodeficiency virus</i>)
HPLC	nagynyomású folyadékkromatográfia
IPTG	izopropil- β -tiogalaktopiranozid
ka	asszociációs állandó
k _{cat}	katalitikus sebességi állandó
k _{cat} /K _M	specifitási állandó
kd	disszociációs állandó
KD	egyensúlyi disszociációs állandó
K _M	Michaelis-Menten állandó
MA	mátrix fehérje
MBP	maltóz-kötő fehérje
mEYFP	monomer sárga fluoreszcens fehérje (<i>monomeric enhanced yellow fluorescent protein</i>)
Mpro	fő proteáz (<i>main protease</i>)

NC	nukleokapszid fehérje
nsp	nem-strukturális fehérje
NTA	nitrotriacetsav
PAGE	poliakrilamid gélelektroforézis
PDB	fehérje adatbank (<i>Protein Data Bank</i>)
PMSF	fenil-metil-szulfonil-fluorid
pol	polimeráz
PR	proteáz
SARS-CoV	súlyos akut légzőszervi szindróma koronavírus (<i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus</i>)
SARS-CoV-2	súlyos akut légzőszervi szindróma koronavírus 2 (<i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i>)
SDS	nátrium-dodecilszulfát
TEV	dohány karcolatos vírus (<i>tobacco etch virus</i>)
Tween-20	polioxietilén(20)-szorbitán-laurát
WHO	Egészségügyi Világszervezet (<i>World Health Organization</i>)

2. BEVEZETÉS

A proteolitikus enzimek tanulmányozásának története egészen a XVIII. század végéig vezethető vissza. Az utóbbi évtizedekben a kutatásuk nagymértékben felgyorsult annak köszönhetően, hogy a gyakorlatban is hatékonyan alkalmazhatóak a biotechnológia és orvostudomány területén egyaránt. A proteolitikus enzimek sokféleképpen befolyásolják az emberiség mindennapi életét, hiszen az élő szervezetben esszenciális folyamatok lebonyolításában vesznek részt a homeosztázis fenntartása érdekében, mindezek mellett fontos terápiás célpontokként szolgálnak fertőző betegségek kezelésében is. A proteázok működését befolyásoló kismolekulájú gyógyszerek vizsgálata évtizedek óta intenzív kutatás tárgyát képezi mind az akadémiai, mind az ipari szférában. Az első jelentős sikerek közé tartozik az 1-es típusú humán immundeficiencia vírus (HIV-1) proteáza elleni gátlók kifejlesztése, melyek alkalmazása a szerzett immunhiányos tünetegyüttes (AIDS) kezelésében egyértelműen igazolta a proteázgátlók potenciális gyógyszermolekulaként való alkalmazhatóságát. A proteolitikus enzimek gyors vizsgálata érdekében nélkülözhetetlen a hatékony és nagy áteresztőképességű módszerek alkalmazása, melyek jelentős mértékben felgyorsítják a molekuláris kölcsönhatások tanulmányozását. A rekombináns fehérje-technológia térhódítása új lehetőségeket nyitott meg a proteáz-vizsgálatok területén, többek között a rekombináns fehérjék szubsztrátként történő alkalmazása révén. A proteolitikus enzimek vizsgálatára több különböző típusú szubsztrát rendszer is elérhető (pl. peptid-alapú, kémiaiilag módosított), melyek közül a rekombináns fehérje szubsztrátok felhasználási lehetőségei rendkívül sokrétűek, és sok előnyös tulajdonsággal rendelkeznek más technológiákkal szemben (pl. nagyobb költséghatékonyság, gyorsabb és egyszerűbb előállítás). A közelmúltban kutatócsoportunk is kidolgozott egy olyan, rekombináns fehérje szubsztrát-alapú rendszert, amely alkalmas proteolitikus enzimek vizsgálatára. Ez lehetővé tette számunkra különböző retrovirális és retrovírus-szerű proteázok, továbbá más vírusok (pl. alfavírus és potivírus) proteázának karakterizálását is, de további proteolitikus enzimek, így a 2019. év végén azonosított súlyos akut légzőszervi szindróma koronavírus 2 (SARS-CoV-2) fő proteázának vizsgálatához is felhasználtuk az általunk korábban kifejlesztett technológiát. Mindezek mellett a rekombináns fehérje szubsztrátok felhasználási lehetőségeit tovább bővítettük egy új mérés-technikai módszer kidolgozásával.

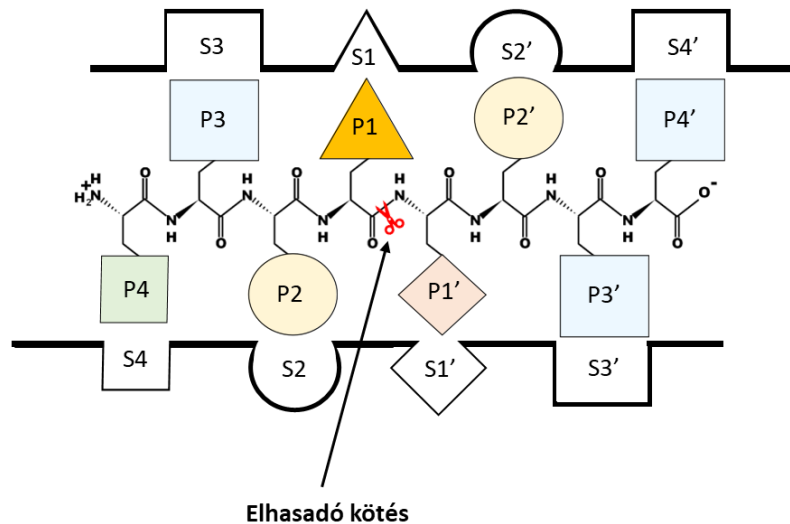
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1 A proteázok

A proteolitikus aktivitással bíró enzimek (peptidázok, proteínázok, proteázok) közös tulajdonsága, hogy képesek megszüntetni az aminosavmaradékok közti kapcsolatot, a peptidkötések hidrolízise révén. A proteolitikus aktivitás következménye lehet a fehérjemolekulák degradációja, melynek fontos szerepe van például a fehérjék emésztésében és eliminációjában. A proteázok emellett képesek lehetnek a célfehérjék meghatározott helye(ke)n történő hasítására, úgynevezett limitált proteolízis révén, melynek során a fehérjék egy vagy csupán néhány specifikus helyen hasadnak, melynek a fehérjefunkció szabályozásában van fontos szerepe. Ez a folyamat gyakran a célfehérje aktivációjával jár (pl. véralvadási kaszkád) (**Goldberg, 2003**).

Az evolúció során a proteázok az eltérő felépítésű élőlényekben tapasztalható körülmények széles skálájához alkalmazkodtak (pl. pH-változások, redukív környezet, ionerősség), és különböző katalitikus mechanizmusokat alkalmaznak a célmolekula (szubsztrát) hidrolíziséhez (**Turk, 2006**). A proteázok katalitikus mechanizmusuk alapján csoportosíthatóak, ez alapján szerin-, cisztein- vagy treonin-proteázok (amino-terminális nukleofil-hidrolázok) vagy aszpartil-, metallo- és glutaminsav-proteázok közé soroljuk őket, a glutaminsav-proteázok az egyetlen olyan altípus, amelyet emlősökben eddig nem azonosítottak (**Puente és mtsai, 2003**). A katalitikus mechanizmus szerinti csoportosítás mellett a proteázok csoportosíthatóak a hasított kötés pozíciója alapján is. Bizonyos proteázok a szubsztrátok N- vagy C-terminálisáról távolítják el a terminális aminosavakat (aminopeptidázok és karboxipeptidázok), de ismerünk a terminális di- vagy tripeptidek lehasítására képes enzimeket is (pl. di- és tripeptidil peptidázok), míg más proteázok a polipeptid lánc belsejében lévő intramolekuláris kötéseket hidrolizálják (endopeptidázok).

A legtöbb proteáz specifikus aminosav szekvenciát ismer fel, a fehérje- vagy peptid-természetű szubsztrátok az enzim aktív helyére illeszkednek, és a szubsztrát egyes aminosavmaradékai az enzim egy-egy szubsztrátkötő zsebével alakítanak ki kölcsönhatást. A Schechter és Berger által bevezetett nevezéktan szerint (**Schechter és Berger, 1967**) a szubsztrát aminosav pozíciókat az elhasadó peptidkötéstől indulva növekvő számozással jelöljük, a N-terminális irányba P₁-P_n, míg C-terminális irányba P₁'-P_n' számozás szerint. Az enzim szubsztrátkötő zsebeit N-terminális irányba S₁-S_n, valamint ellenkező irányba S₁'-S_n'-ként jelöljük (**1. ábra**).



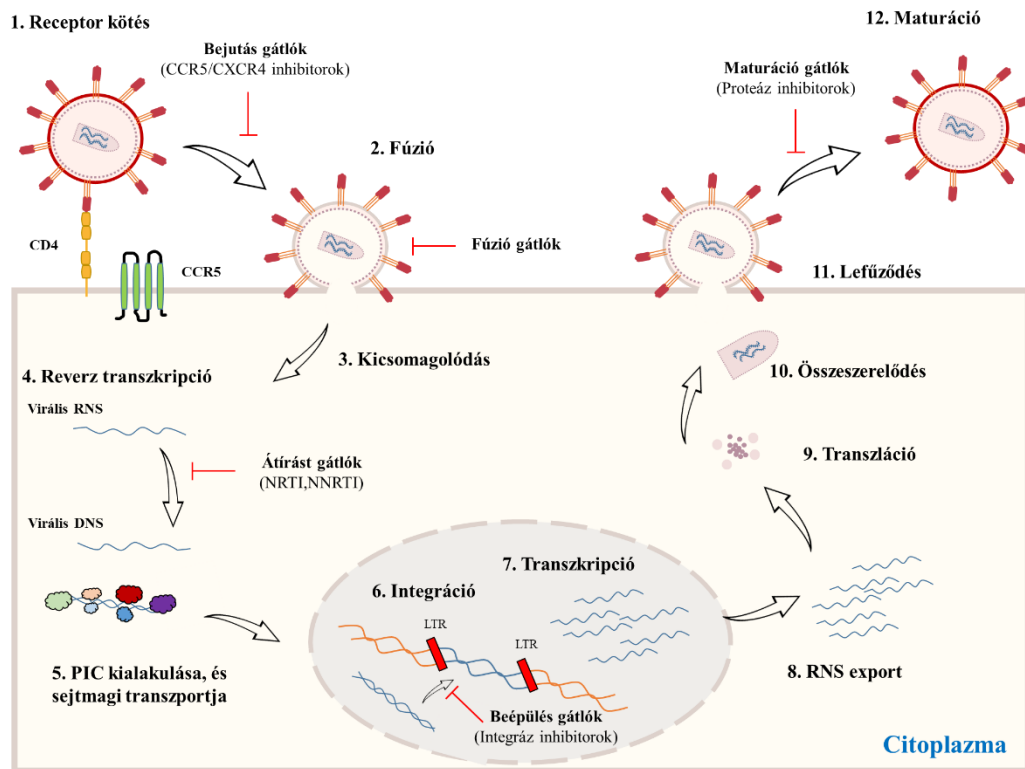
1. ábra. A proteáz-szubsztrát kapcsolat Schechter és Berger-féle általános nomenklatúrája. A hasítási pozíciót piros színű olló jelöli.

A proteolízis az egyik leggyakoribb irreverzibilis poszttranszlációs módosítás, és alapvető szerepet játszik számos sejt és szövet funkciójában, a fehérje lebomlásától a specifikus fehérje-aktivációig (Goldberg, 2003; Baeuerle és Henkel, 1994). A fehérjék hasításával a proteázok olyan kulcsfontosságú élettani folyamatok szabályozásában vesznek részt, mint például a sejtciklus szabályozása, a sejtproliferáció és a sejtpusztulás, a DNS-replikáció, a szövetek átalakulása, a vérzéscsillapítás (koaguláció), a sebgyógyulás és az immunválasz (Turk, 2006). A nagyjából 600 emberi proteáz – a genom körülbelül 2%-a – dolgozik együtt a szervezet sejtjei és szövetei fiziológiás működésének és homeosztázisának fenntartásában (Chang és mtsai, 2019; Zhou és mtsai, 2020). A proteáz aktivitás és annak szabályozási zavara daganatos megbetegedések és gyulladásos folyamatok kialakulását segíthetik elő (Mason és Joyce, 2011; Reed és Kita, 2004). Mindezek mellett a proteázoknak jelentős szerepe van különböző fertőző megbetegedések kialakulásában is (Urban, 2009). Példaként említhető a különböző vírusok replikációs ciklusának végbemenetelét elősegítő proteázok ún. maturációt (vírus érés) elősegítő funkciója (Vogt, 1996). A továbbiakban az 1-es típusú humán immundeficiencia vírus (HIV-1) és a súlyos akut légzőszervi szindróma koronavírus 2 (SARS-CoV-2) általános bemutatását követően részletesebben taglalom az adott családra jellemző proteázok szerkezeti felépítését és funkcióját.

3.2. A HIV-1 vírus

Az Egészségügyi Világszervezet (*World Health Organization*, WHO) legfrissebb adatai alapján napjainkig (2021.12.27) több mint 37,7 millió fő fertőződött meg a HIV-1 vírussal világszerte (**World Health Organization, HIV**). A vírussal kapcsolatos legfőbb egészségügyi problémát az infekciót követő kései szerzett immunhiányos tünetegyüttes (*acquired immunodeficiency syndrome*, AIDS) okozza, mely sok esetben halálos kimenetelű (**Weiss, 1993**). A HIV a retrovírusok családján belül a lentivírus nemzetséghez tartozó, pozitív szálú kettős RNS genommal rendelkező vírus. A HIV vírusok felépítésüket tekintve burokkal, kapsziddal, illetve nukleokapsziddal rendelkeznek, melyek a vírus védelméül szolgálnak, illetve a gazdasejtbe történő bejutását és propagációt segítik elő. Fertőzést követően a virális genomot a reverz transzkriptáz írja át DNS molekulává, amely egy másik fontos virális enzim, az integráz segítségével képes beépülni a gazdasejt genomjába. A virális replikációs ciklus további fontos lépései közé tartozik a provírusról történő transzkripció (mRNS átírás), a virális fehérjék transzlációja (fehérjeszintézis), a vírust alkotó fehérjék összeszerelődése, és a gazdasejtből való kilépés. Az így keletkezett virionokban történik meg a maturáció a virális poliproteinek funkcionális egységekké történő hasítása révén, melyet a HIV genomról átíródott aszpartil proteáz végez (**Engelman és Cherepanov, 2012; Barré-Sinoussi és mtsai, 2013**).

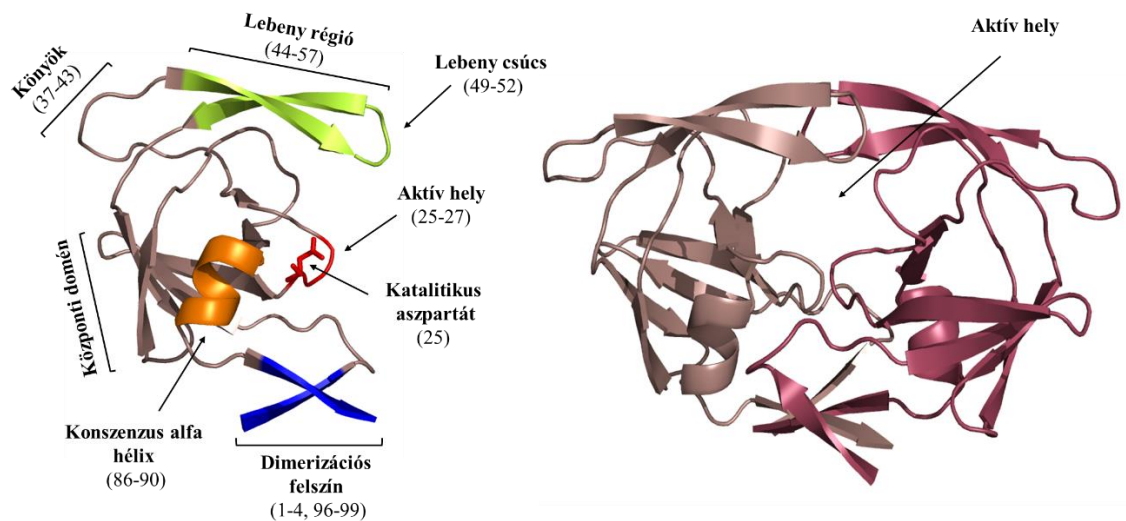
A vírus replikációs ciklusának minden egyes lépése fontos terápiás célpontként szolgálhat. A napjainkban elérhető antivirális szerek a vírus sejtbe történő bejutás és fúzió, a reverz transzkripció, az integráció és a maturáció gátlásán keresztül fejtik ki hatásukat (**2. ábra**). A maturációt gátló terápiás hatóanyagok célpontja a virális proteáz. Jelenleg összesen nyolc különböző, az amerikai Élelmiszerbiztonsági és Gyógyszerészeti Hivatal (FDA) által elfogadott HIV proteáz inhibitor érhető el. Az elmúlt évtizedekben jelentős mennyiségű kutatás irányult a HIV-1 proteáz vizsgálatára. Ennek köszönhetően több, a klinikumban is alkalmazott proteáz inhibitor (saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir, atazanavir, lopinavir, darunavir, és fosamprenavir) is a részét szolgálta a nagy hatékonyságú antiretrovirális terápiának (*highly active antiretroviral therapy*, HAART), mely az AIDS kezelésére szolgál.



2. ábra. A HIV-1 replikációs ciklusának főbb lépései és terápiás célpontjai. Főbb lépések: 1) CD4 receptorhoz és koreceptorhoz való kötődés; 2) a gazdasejt membránnal történő egybeolvadása (fúzió); 3) a kapszid kicsomagolódása; 4) a HIV virális RNS reverz transzkripciója; 5) a preintegrációs komplex (PIC) kialakulása és sejtmagi transzportja; 6) a gazdasejt genomjába történő beépülés (integráció); 7) RNS transzkripció; 8) az RNS molekulák exportja; 9) a virális genomról történő transzláció; 10) a vírust alkotó biomolekulák összeszerelődése; 11) a virion lefűződése; valamint 12) a virális poliproteinek maturációja. Rövidítések: CCR5-kemokin receptor 5, LTR- hosszú terminális ismétlődés, NRTI – nukleozid reverz transzkriptáz inhibitor, NNRTI – nem-nukleozid reverz transzkriptáz inhibitor. Az ábrán jelöltük az antivirális szerek fő támadáspontjait.

3.2.1. A HIV-1 proteáz

A retrovirális proteázok, más néven retropepszinek, az aszpartil-proteázok A2 családjába tartozó proteolitikus enzimek (Rawlings és mtsai, 2012). Ennek a családnak az egyik legismertebb és legjobban jellemzett tagja a HIV-1 proteáz. Az enzim homodimerként funkcionál, az aktív proteázt két, szekvenciájában és szerkezetében is azonos, legtöbb esetben 99 aminosavból álló monomer interakciója hozza létre (3. ábra), de a proteáz 100 (I36T↑T) és 101 (L38L↑N↑L) aminosavat tartalmazó, ritkábban előforduló természetes variánsai is ismertek (Lockhat és mtsai, 2016; Maseko és mtsai, 2016; Lawal és mtsai, 2020).

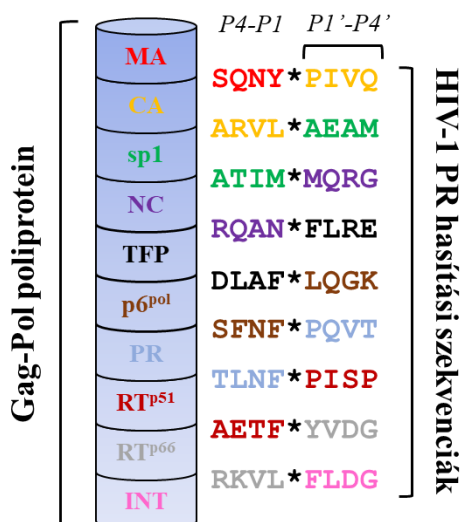


Aminosav sorrend:

PQITLWQRPLVTIKIGGQLKEALLDTGADDTVLEEMNLPGRWKPKMIGGIGGFIKVRQYDQILIEICGHKAIGTVLVGPTVPVNIIGRNLLTQIGCTLNF

3. ábra. A monomer és dimer HIV-1 proteáz szerkezete és aminosav sorrendje. Az ábra elkészítéséhez használt fehérje szerkezete megtalálható a PDB adatbázisban (PDB: 5HVP) (Fitzgerald és mtsai, 1990). A szerkezet és a funkció szempontjából fontos szerkezeti elemeket a monomerben és a szekvenciában azonos színekkel jelöltük (bal oldali ábrarész). A homodimer esetében az egyes láncok eltérő színűek (jobb oldali ábrarész).

A proteáz jelentős szerepet játszik a HIV-1 replikációs ciklusban a virális gag és gag-pol poliproteinek irreverzibilis posztranszlációs módosításában. A proteáz öt proteolitikus lépés alatt hat egységgé alakítja a gag fehérjét; ezek a mátrix (MA), kapszid (CA), sp1, nukleokapszid (NC), sp2, és p6^{pl} (Debouck és mtsai, 1987). A gag-pol fehérje limitált proteolízise eredményeként a fehérjeláncból katalitikus aktivitással rendelkező funkcionális egységek keletkeznek, a reverz transzkriptáz (RT), az integráz (IN), az RNáz H és a proteáz (PR) (Darke és mtsai, 1988) (4. ábra). Ezen folyamatok rendkívül fontos szerepet játszanak a virális replikációs ciklusban említett maturációban (Potempa, 2015; Swanstrom és Wills, 1997).



4. ábra. A HIV-1 Gag-Pol poliprotein sematikus ábrázolása. Az egységek határán jelzett aminosavszekevenciák a HIV-1 PR 8-tagú kanonikus felismerőhelyeit (P4-P1 és P1'-P4') jelölik, a szekvencián belül a csillagok a hasítási pozíciókat jelölik. A proteolízis következtében a poliproteinből funkcionális egységek jönnek létre; MA-mátrix, CA-kapszid, sp1-spacer peptid 1, NC-nukleokapszid, TFP-transzkeret peptid, p6^{pol}, RT-reverz transzkriptáz, INT-integráz. A HIV-1 poliprotein szekvenciát a UniProt adatbázisból töltöttük le (UniProt ID: P04585).

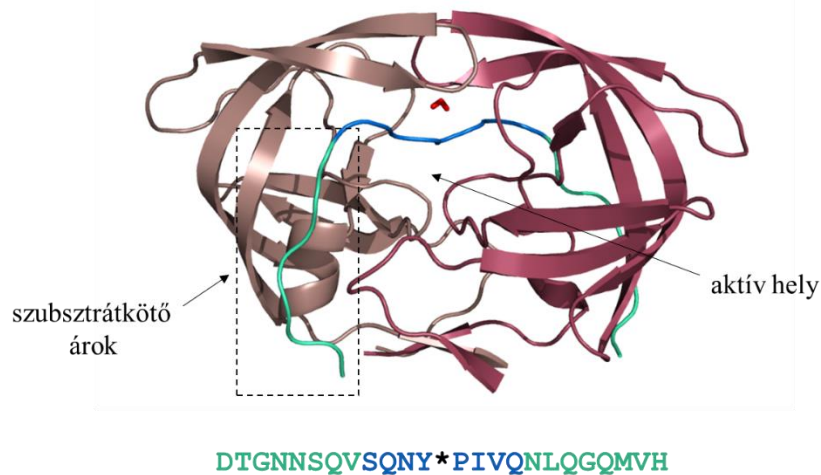
A peptidkötés hidrolíziséért közvetlenül a retrovirális proteázok konszenzus D-T/S-G-A aktív hely motívumában, a HIV-1 PR esetében az egyes monomerekben a 25. és 25'. pozíciókban található aszpartát aminosavmaradékokból álló katalitikus diád felelős. Az aszpartil proteázokra jellemzően a nukleofil támadás egy aktivált vízmolekulán keresztül történik meg (Neil és Guy, 2013). A katalitikus motívumon kívül más szerkezetileg fontos régiók is vannak, amelyek részt vesznek a funkcionális homodimer kialakításában, illetve a szubsztrát megkötésében (3. ábra). Ezen régiók közé tartozik a lebeny régió (*flap*), az aktív helyen (a „tűzoltó-fogás” kölcsönhatások révén; *fireman's grip*) kialakuló hurok, az antiparalell β -redőkből felépülő dimerizációs régió a molekula alján, és a konszenzusos α -hélix az enzim C-terminálisának közelében (Mótyán és mtsai, 2020).

A HIV-1 PR szubsztrátspecificitásának és aminosav preferenciáinak meghatározása a mai napig kihívást jelent annak ellenére, hogy jelentős erőfeszítések történtek a hasítási pozíciók *in vitro* laboratóriumi karakterizálása érdekében (Weber és mtsai, 1989; Griffiths és mtsai, 1992; Piana és mtsai, 2001; Bagossi és mtsai, 2005; Berg és Tholey, 2012; Wagner és mtsai, 2015). A HIV-1 PR-ra vonatkozó szisztematikus specificitási vizsgálatok igazolták,

hogy alapvetően kétféle hasítóhelyet különböztethetünk meg: az 1-es típusú hasítóhely aromás aminosavmaradékot és prolint tartalmaz P1 és P1' pozíciókban, míg a 2-es típusú hasítóhely esetében az enzim hidrofób aminosavmaradékok (prolin kivételével) közötti kötést hasít (Tözsér, 2010; Weber és mtsai, 2021). A retrovirális proteázok esetében az S1 zsebekre elsősorban hidrofób aminosavak iránti preferencia jellemző, azonban a többi (S2-S4) szubsztrátkötő zseb aminosav preferenciája jelentősebb eltéréseket mutathat (Eizert és mtsai, 2008). Például a P2 pozíció kritikus jelentőségű lehet a hasítóhely szempontjából. Az 1-es típusú hasítóhelyen történő hasítás esetében a P2 pozíciót leginkább az aszparagin jelenléte jellemzi, míg a 2-es típusú hasítóhely esetében jellemzően elágazó láncú aminosavmaradékok találhatók ebben a pozícióban (Bagossi és mtsai, 2005). Abban az esetben, ha a P2' pozícióban glutamin vagy glutaminsav található, akkor a P1 pozícióban legvalószínűbben hidrofób aminosav fordul elő (Wlodawer és Erickson, 1993). Az *in vitro* módszereken kívül *in silico* módszereket is kifejlesztettek a HIV-1 PR hasítóhelyeinek becslésére, melyek elsősorban az ismert hasítóhely szekvenciákon alapulva jósolják a hasítás pozícióját és a hasítás valószínűségét (Shen és Chou, 2008).

A proteáz specifikásával kapcsolatos ismereteink nagy része a Gag és Gag-Pol hasítóhelyeket reprezentáló peptideket alkalmazó vizsgálatokból származik (Tözsér és mtsai, 1991; Tözsér és mtsai, 1996; Maschera és mtsai, 1996; Tözsér és mtsai, 2000; Fehér és mtsai, 2002; Bagossi és mtsai, 2005; Eizert és mtsai, 2008; Tözsér, 2010; Liu és mtsai 2011; Lawal és mtsai, 2020), ám ezen vizsgálatok az esetek többségében csupán a P5-P5' és S5-S5' interakciók vizsgálatán alapultak, de nem szolgáltak információval az aktív helytől esetlegesen távolabb eső régiók (pl. S12-S6 és S6'-S12') szubsztrátkötésben betöltött szerepére vonatkozóan. Újabb kutatások alapján a HIV-1 PR és a szubsztrátjai közti kölcsönhatások nem korlátozódnak a proteáz aktív helyére (Lee és mtsai, 2012). Az aktív helytől távolabb eső, a szubsztrát megkötésében szerepet játszó enzimefelszíni régiók létezését elsőként 2015-ben írták le (Laco, 2015). Ezen régiót szubsztrátkötő ároknak (*substrate groove* vagy *S-groove*) nevezték el, meglétét részletesebben a HIV-1 és az 1-es típusú humán T-limfotróp vírus (HTLV-1) proteázok esetében igazolták *in silico* és *in vitro* kísérletek sorozatában (Laco, 2015; Laco, 2017) (5. ábra). Bár kutatócsoportunk eredményei a HTLV-1, HTLV-2 és HTLV-3 proteázok esetében is az S5 és S4 zsebek szubsztrát kötésében betöltött jelentőségére utalnak (Tözsér és mtsai, 2000; Kassay és mtsai, 2021), az aktív helyen kívüli kölcsönható felületeket (S12-S5 és S5'-S12' zsebek) kutatócsoportunk munkatársai nem vizsgálták részletesen a HTLV és a HIV proteázok esetében sem. A kötőhely célzott vizsgálatát csak a Ty1 retrotranszpozon

proteáz esetében végezte el kutatócsoportunk, és bár az eredmények az enzimfelszíni kötőhelyek jelenlétére utaltak, nem szolgáltak egyértelmű bizonyítékkal (Gazda és mtsai, 2020).

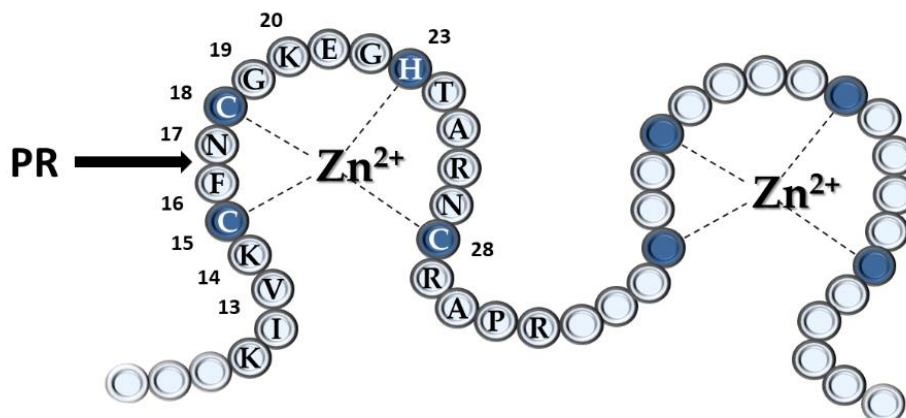


5. ábra. A HIV-1 PR 24-tagú peptiddel alkotott komplexének ábrázolása. A HIV-1 PR két alegységét barna és bordó színekkel jelöltük. A 24-tagú fehérje szubsztrátnak az aktív helyre kötődő szakasza (P4-P4') kék, míg az enzimfelszíni szubsztrátkötő árokkal kölcsönható szakasza (P12-P5 és P5'-P12') zöld színnek van jelölve a szerkezetben és a szubsztrát szekvenciájában egyaránt. Az ábrán, mely a Gary S. Laco által rendelkezésünkre bocsájtott atomi koordináták alapján készült (Laco, 2015), az aktív helyen lévő katalitikus vízmolekulát is feltüntettük.

A szubsztrátkötő árok egy, a homodimer enzim felszínén elhelyezkedő kölcsönható felület, mely lehetővé teszi a szubsztrát P12-P5 és P5'-P12' aminosavainak felismerését és megkötését. A szubsztrátkötő árok növeli az enzim szubsztráthoz való affinitását, ezáltal befolyásolja az enzim proteolitikus hatékonyságát. Laco tanulmányaiban leírja, hogy a multidrog-rezisztens (MDR) HIV-1 PR-ok működésében a szubsztrátkötő árkot kialakító aminosavak jelentős szerepet töltenek be a szubsztrát felismerésében és kötésében (Laco, 2015; Laco, 2017). A Gag és Gag-pol polipeptid szubsztrátként való alkalmazása során a vad típusú és MDR HIV-1 proteázok közel azonos biológiai aktivitással rendelkeztek, míg a MDR HIV-1 PR aktivitása jelentős mértékben csökkent a peptid szubsztrátok alkalmazása esetén. Laco arra a következtetésre jutott, hogy a HIV-1 PR az aktív helyen (S4-S4') és a szubsztrátkötő árkon (S12-S5 és S5'-S12') keresztül is kölcsönhatásba lép a Gag és Gag-pol polipeptid szubsztrátokkal, így összességében akár 24-tagú szekvenciával képes kölcsönhatásba lépni.

3.2.2. A nukleokapszid fehérje, mint HIV-1 proteáz szubsztrát

A HIV-1 PR poszt-maturációban betöltött egyik fontos szerepe a korábbi feltételezések alapján a kapszid és nukleokapszid fehérjék hasítása (Tözsér és Oroszlán, 2003). A HIV-1 nukleokapszid (NC) fehérje egy kisméretű bázikus fehérje, amely két cink-ujj motívumot tartalmaz (6. ábra). A NC-nak számos funkciója van a vírusreplikációban, mivel részt vesz a genomiális RNS cDNS-sé való átírásában, dimerizációjában és csomagolásában, a vírusösszeszerelődésben és nukleinsav-feltekeredést elősegítő, ún. chaperon-aktivitással is rendelkezik (Rein és mtsai, 1998). A proximális cink-ujj domén hidrolíziséről más retrovírusokban is beszámoltak *in vitro* kísérletekben (Roberts és Oroszlán, 1989). Bizonyított, hogy a proteolízis az első (proximális) cink-ujj motívum 17. pozíciójában lévő fenilalanin (F16) és 17. pozíciójában lévő aszparagin (N17) közt történik meg. A proteolitikus hasítás pontos helye kémialag szintetizált és rekombináns fehérjéken egyaránt bizonyított (Tözsér és mtsai, 1993; Wondrak és mtsai, 1994; Tözsér és mtsai, 2004)



6. ábra. A HIV-1 nukleokapszid fehérje első (proximális) és második (disztális) cink-ujj motívumainak sematikus ábrázolása. A vizsgálataink tárgyát képező proximális cink-ujj esetében feltüntettük az aminosavsorrendet és a számozást is. A cink ion kötésében részt vevő cisztein és hisztidin aminosavak sötétkék színűek. A fekete nyíl a HIV-1 PR természetes hasítóhelyét jelzi.

Korábbi feltételezések alapján a nukleokapszid cink-ujj motívum hidrolízisének szerepe lehet a replikációs ciklus korai szakaszában. A HIV-1 NC cink-ujj szekvencia motívumai erősen konzerváltak (Foley és mtsai, 2018); korábbi feltételezések alapján részben a magas konzerváltság teszi lehetővé azt, hogy a NC fehérje a cink-ujjban lévő hasítóhelyen

elhasadhat (Tözsér és mtsai, 2004). A természetben előforduló vírus variánsok nem tartalmaznak mutációt a proximális cink-ujj 16-17-es aminosav pozíciójában, azonban több kutatócsoport is beszámolt különböző NC variánsokkal történő *in vitro* kísérletekről, mely eredmények kevésbé konzisztensek. Mark Danieli és munkatársai (Mark-Danieli és mtsai, 2005) arról számoltak be, hogy azok a vírusok, melyek az NC fehérjében N17K mutációt tartalmaznak magasabb transzdukciós hatékonysággal rendelkeztek, tehát könnyebben megfertőzték az új gazdasejteket. Ezen eredmények magyarázatául szolgálhat, hogy a mutáció következtében fokozott RNS csomagolódás figyelhető meg, a vad-típusú szekvenciát kódoló vírushoz képest. Ezzel szemben egy 2008-as közleményben ugyanezen vírus mutánsra 10000-szer kisebb fertőzőképességet határoztak meg a vad típusú NC szekvenciát hordozó virionhoz képest (Kafaie és mtsai, 2008). Egy másik közleményben az említett mutáció hatása nem befolyásolta a virális replikációs ciklust, de fokozta az RNS becsomagolódását (Dorfman és mtsai, 1993). Az N17G és N17F mutációk vizsgálatakor Thomas és munkatársai replikációra képtelen virion részecskék létrejöttét tapasztalták (Thomas és Gorelick, 2008). A NC proximális cink-ujj proteolitikus hasításának szerepe a replikáció korai lépéseiben a mai napig nem tisztázott egyértelműen annak ellenére, hogy a vírusok életciklusában betöltött fontosságára utal a hasítóhely rendkívüli konzerváltsága is, valamint azon kutatások, melyek a proteáz korai fázisban betöltött szerepét vizsgálják (Tóth és mtsai, 2016).

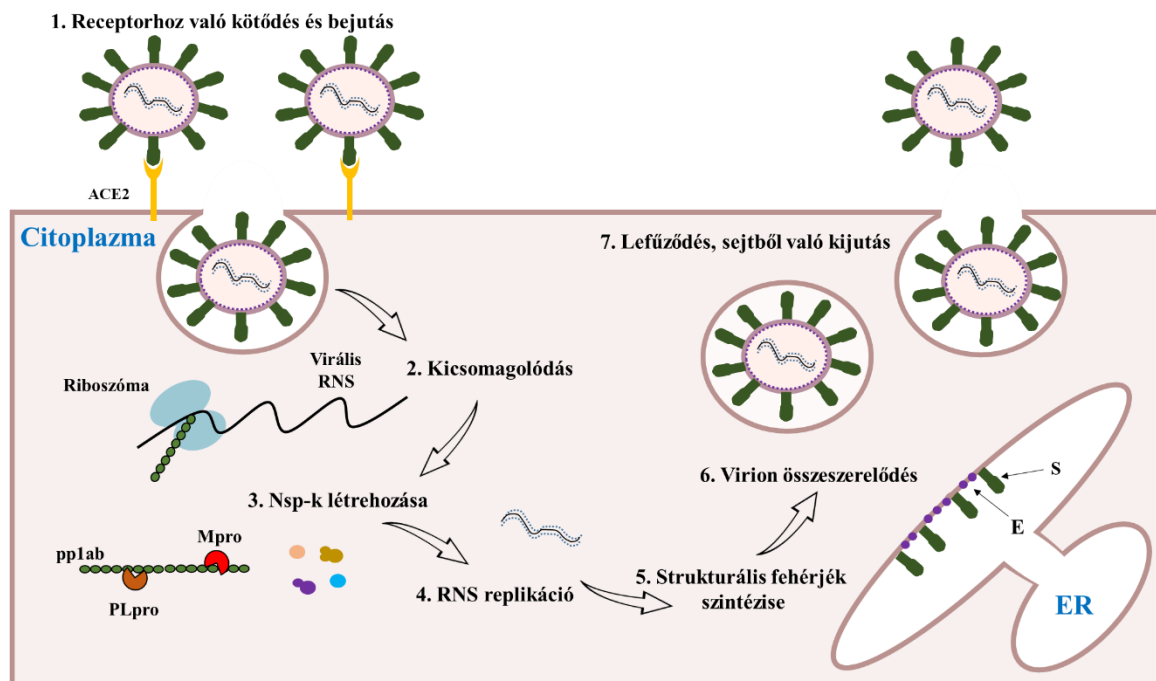
3.3. A SARS-CoV-2 vírus

A koronavírusok a *Coronaviridae* családba, azon belül a Béta-koronavírus nemzetségbe tartozó vírusok. Örökítőanyagukat tekintve a legnagyobb virális genommal rendelkeznek, megközelítőleg 26-32 kilobázispár (kbp) (Woo és mtsai, 2010). A nemzetség tagjainak genomja pozitív egyszálú RNS, mely legalább 6 nyitott olvasási keretet (*open reading frame*, ORF) foglal magába, a SARS-CoV-2 14 ORF-et tartalmaz (Ullrich és Nitsche, 2020). Legismertebb képviselői közé tartoznak a Közel-keleti légzőszervi szindrómát (*Middle East respiratory syndrome*, MERS) okozó koronavírus (MERS *coronavirus*, MERS-CoV), valamint a súlyos akut légzőszervi szindróma koronavírus 1-es (SARS-CoV) és 2-es típusa (SARS-CoV-2) (Drosten, 2013; Kooshkaki és mtsai, 2020). Az utóbbi a 2019-es év végén Kína Wuhan tartományában azonosított, súlyos tüdőgyulladás-szerű tünetekkel jellemezhető kórkép, a koronavírus betegség-19 (COVID-19) okozója (Wu F. és mtsai, 2020), melyet a WHO 2020.03.11.-től világjárványnak (pandémia) nyilvánított. Napjainkig (2022.01.06.) a WHO adatai alapján világszerte több mint 293,7 millió fő fertőződött meg a vírussal, valamint több

mint 5,4 millió esetben halálos kimenetelű volt a betegség (**World Health Organization, COVID-19**). Magyarországon a járvány következtében napjainkig (2022.01.06) elhunytak száma meghaladja a 39 ezret.

A koronavírus fertőzés kezdeti lépése közé tartozik a koronavírus tüske (S) fehérje specifikus kötődése a célsejten lévő receptorokhoz (**7. ábra**) pl. ACE-2 receptorhoz (angiotenzin átalakító enzim-2) (**V'kovski és mtsai, 2021**). A koronavírus génexpressziójának komplex programja akkor indul el, amikor a vírus genom kiszabadul a gazdasejt citoplazmájába. A folyamat térben és időben erősen szabályozott.

A genomi RNS ORF1a és ORF1b translációja két poliproteint eredményez (**V'kovski és mtsai, 2021**). A nem-strukturális fehérjéket (nsp) tartalmazó poliproteinek limitált proteolízis révén darabolódnak fel funkcionális egységekké, melyek hasításáért a virális proteázok felelősek. A vírus genomja két proteázt is kódol, az nsp3 papain-szerű proteázt (PLpro), valamint az nsp5 fő proteázt (Mpro, *main protease*). Utóbbit 3-kimotripszin-szerű proteáznak is nevezik (3CLpro, *3-chymotrypsin-like protease*), mindkét elnevezést elterjedten használják a szakirodalomban. A vírus replikációját a teljes hosszúságú negatív irányultságú genom kópiák szintézise indítja el, amelyek mintaként szolgálnak az új pozitív irányultságú RNS létrehozásához (**V'kovski és mtsai, 2021**). Az újonnan szintetizált örökítőanyagot használják fel, hogy további nsp-eket hozzanak létre, vagy új virionokba csomagolják őket. A szerkezeti fehérjéket, azaz az S fehérjét, a burok (E), a membrán (M) és a nukleokapszid (N) fehérjét is a koronavírus genom ORF-ek kódolják, ezen gének a genom 3' végén található (**V'kovski és mtsai, 2021**). Általánosságban elmondható, hogy a koronavírus szerkezeti fehérjék az endoplazmatikus retikulum (ER) és a Golgi-kompartmentum között veszik fel térszerkezetük és az új virionok a fertőzött sejtből exocitózissal távoznak (**Stertz és mtsai, 2007, Bricker, és mtsai, 2020**). A legújabb bizonyítékok azonban azt mutatják, hogy a béta-koronavírusok, beleértve az egér koronavírus és a SARS-CoV-2-t is, inkább lizoszomális úton keresztül távoznak a fertőzött sejtekből (**Tindle, és mtsai, 2021**). A koronavírus életciklusához nélkülözhetetlenek a gazdasejt fehérjékkel való molekuláris kölcsönhatások. A SARS-CoV-2 fehérjék első szisztematikus expressziós vizsgálata és az azt követő affinitás-tisztítás, majd tömegspektrometriai analízis több mint 300 potenciális koronavírus-gazdafehérje kölcsönhatást azonosított (**Gordon és mtsai, 2020**). A gazdasejt-vírus interakciók felderítése rendkívül fontos a teljes virális replikációs ciklus és a patogenezis megismeréséhez, valamint új potenciális terápiás célpontok meghatározása szempontjából is.



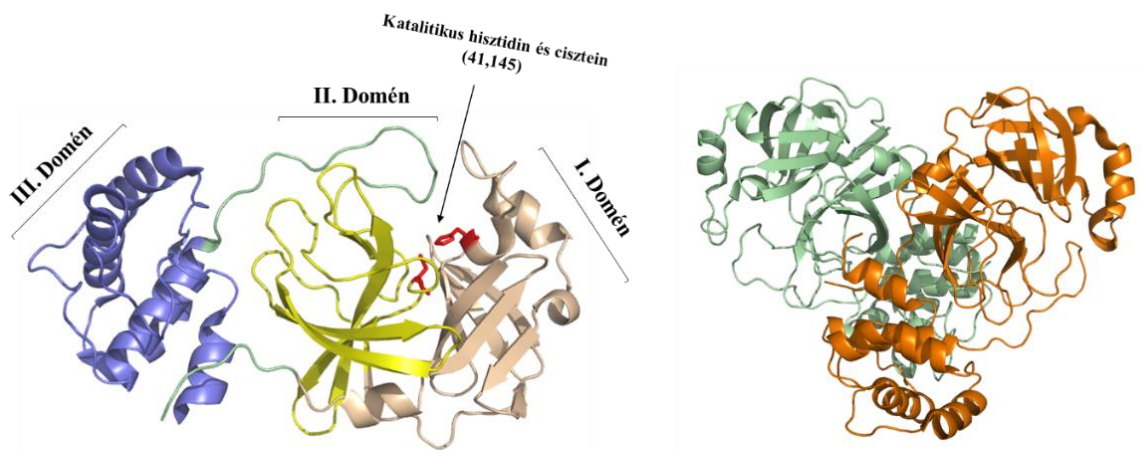
7. ábra. A SARS-CoV-2 replikációs ciklusának főbb lépései és terápiás célpontjai. 1) A virion sejtbe történő bejutása ACE2-mediált endocitózissal; 2) a virion kicsomagolódása; 3) az RNS genomról történő fehérjeszintézis és poszttranszlációs proteolízis; 4) a virális fehérjék által mediált RNS genom replikáció; 5) a strukturális fehérjék szintézise; 6) a virion összeszerelődés és 7) lefűződés. ACE2 - angiotenzin konvertáló enzim-2, pp1ab - poliprotein 1ab, nsp - nem-strukturális fehérje, Mpro - fő proteáz, PLpro - papain szerű proteáz, ER - endoplazmatikus retikulum, S - tüske fehérje, E - burok fehérje.

A vírusokkal szembeni védekezés első nagy áttörését az RNS-alapú vakcinák jelentették, amelyeket elsőként az Egyesült Királyságban, az Egyesült Államokban és az Európai Unióban engedélyeztek. A WHO adatai alapján napjainkig (2022.01.06) közel 9,1 milliárd dózis különböző típusú oltóanyagot használtak fel a járvány megfékezése érdekében. Annak ellenére, hogy a védőoltásokra és a terápiás fejlesztésekre irányuló erőfeszítések jelentős előrehaladást mutatnak, továbbra is rendkívül nagy az igény a hatékony terápiás lehetőségek iránt, hiszen több mint egy évvel a világméretű járvány kezdete után sem áll rendelkezésre standardizált COVID-19 kezelési protokoll és nagy hatékonyságú, specifikus vírusellenes kezelési lehetőségek sem elérhetőek a klinikumban. A gyógyszerek újrahaznosítása (*drug repurposing*) „univerzális stratégia” az újonnan kialakult betegségek kezelésében, mivel a szükséges klinikai vizsgálati lépések számának redukálása csökkentheti a gyógyszer piacra kerülésének idejét és költségeit. A meglévő gyógyszeripari ellátási láncok elősegíthetik a

gyógyszer formulázását és forgalmazását, más gyógyszerekkel való kombináció ismerete lehetővé tenné a hatékonyabb kezelést. A vírussal szembeni védekezés korai szakaszában a - már terápiás felhasználásra engedélyezett gyógyszermolekulák hatékonyságát vizsgáló - kutatások egyik fő célpontja a SARS-CoV-2 fő proteáz volt. Mivel a SARS-CoV-2 fő proteázának alapvető szerepe van a virális replikációs ciklusban, ezért a továbbiakban ezen enzim felépítését, funkcióját és néhány terápiás szer hatékonyságát fogom áttekinteni.

3.3.1. A SARS-CoV-2 fő proteáza

A SARS-CoV-2 fő proteáza a cisztein proteázok családjába tartozó proteolitikus enzim, mely rendkívül fontos szerepet játszik a SARS-CoV-2 replikációs ciklusában (7. ábra). Szerkezetét tekintve homodimer, amely két protomert tartalmaz, ami egyenként három doménből áll (I., II. és III. domén) (8. ábra).



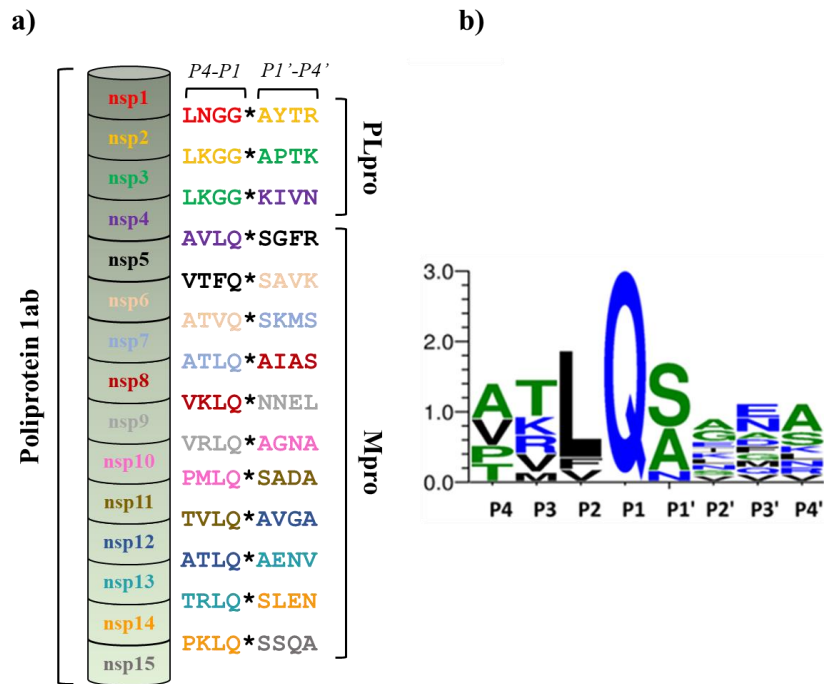
Aminosav sorrend:

SGFRKMAFPSPGKVEGCMVQVTCGTTTLNGLWLDVVCPRHVICTSEDMLNPNYEDLLIRKSNHNFLVQAGNVQLRVIGHSMQNCV
 LKLEKVDTANPKTPKYKRVRIQPGQTFSVLACYNGSPSPGVYQCAMPNFTIKGSFLNGSCGSVGFNIDYDCVSFCYMHMELPTGVH
 AGTDLEGNFYGPFVDRQTAQAAGTDTTITVNVLAWLYAAVINGDRWFLNRFTTTTLNDFNLVAMKYNYEPLTQDHVDILGPLSAQTG
 IAVLDMCASLKELLQNGMNGRTILGSALLEDEFTPFVVRQCSG

8. ábra. A monomer és dimer SARS-CoV-2 fő proteáz szerkezete és aminosav sorrendje. Az ábra elkészítéséhez használt szerkezeti koordináták megtalálhatóak a PDB adatbázisban, a monomer szerkezetet a 6Y2G.pdb (Zhang és mtsai, 2020), míg a dimer formát a 7JQ2.pdb (Yang és mtsai, 2021) alapján készítettük. A szerkezeti elemeket azonos színekkel jelöltük a szekvenciában és a monomer szerkezetben (bal oldal). Az egyes fehérje láncokat zöld és narancssárga színekkel jelöltük a dimer szerkezetben (jobb oldal).

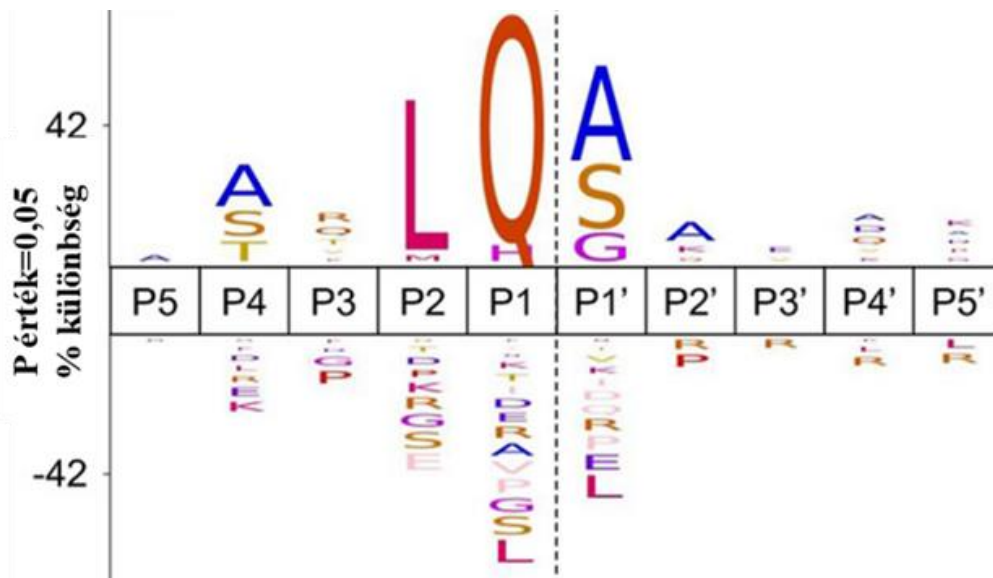
Az I. és II. domént hat antiparalell β -hordó, míg a III. domént egy öt α -hélixből álló antiparalell globuláris klaszter alkotja, amely egy hosszú hurok régióval kapcsolódik a II. doménhez. Az I. és II. domén közötti hasadékban egy ciszteinből és hisztidinből álló katalitikus diád található, amely az N-terminális 1-7. aminosavmaradékokkal együtt feltehetően kulcsfontosságú szerepet játszik a proteolitikus aktivitásban (**Anand és mtsai, 2002; Anand és mtsai, 2003**). A szubsztrátkötő hely az I. és II. domén közötti árokban található. Ezen árokban pozícionálódik az aktív hely, melynek részét képezi a cisztein proteázokra jellemző hisztidin (H41) molekula által aktivált cisztein (C145), mely jelen esetben a katalitikus diádot képezi (**Verma és mtsai, 2016; Jin és mtsai, 2020**). Az 1-7. N-terminális maradékokon keresztül egymáshoz kötődő protomerek pedig a II. és III. domén között helyezkednek el, amelyeknek a szubsztrátkötő hely kialakításában van szerepük (**Chou és mtsai, 2004; Qamar és mtsai, 2020; Zhang és mtsai, 2020**). A katalitikus diádban elhelyezkedő hisztidin imidazol gyűrűje hidrogén donorként szolgál egy szerkezeti víz molekulának. A peptidkötés hasítása egy aciltranszfer reakció révén valósul meg. Első lépésben az aktív hely cisztein szulfhidril csoportja (C145) nukleofil módon megtámadja a peptid karbonil szénatomját. Ennek eredményeként jön létre az S-acil enzim, a szubsztrát karbonil szénatomja és az enzim aktív helyének tiol csoportja között. Ezek után a karbonil szénatom hidrolizálódik a proteáz tiol csoportjáról. Végezetül a proteáz aktív centrumot kialakító aminosavai regenerálódnak. Mint mindegyik koronavírusban, a fő proteáz aktív helyei (S1', S1, S2 és S4) erősen konzerváltak. Az S1' pozícióban a cisztein molekula tiol csoportján keresztül történik meg az inhibitorok megkötése kovalens kötés kialakítása révén (**Yang és mtsai, 2005; Wang és mtsai, 2020**).

A virális proteázok (PLpro és Mpro) legjelentősebb funkciója a virális poliproteinek funkcionális egységekké történő processzálása (**Wu A, 2020**) (**9. ábra**). A proteolitikus enzimek szubsztrátspecifitásának ismerete kulcsfontosságú a természetes szubsztrátok *in vitro* és *in silico* azonosítása, valamint a molekuláris szintű gyógyszertervezés szempontjából is. A SARS-CoV-2 Mpro specifitására vonatkozó ismereteink egyre gyarapodnak, de fontos információkkal szolgálnak a homológ SARS-CoV fő proteázra vonatkozó specifitási adatok is (**Kiemer és mtsai, 2004; Hilgenfeld, 2014**).



9. ábra. A SARS-CoV-2 poliprotein 1ab sematikus ábrázolása és a fő proteáz autokatalitikus helyeit jellemző szekvencia logó. (a) A poliprotein-egységek határán jelzett aminosavszekvenciák a SARS-CoV-2 PLpro, illetve Mpro szubsztrátok nyolctagú kanonikus felismerőhelyeit (P4-P1 és P1'-P4') és hasítási pozícióit (*) jelölik. A proteolízis következtében a poliproteinekből funkcionális egységek jönnek létre; nsp-nem strukturális fehérje. (b) A SARS-CoV-2 Mpro esetében a szekvencia logót a poliproteinben lévő természetes hasítóhely szekvenciák alapján készítettük.

A SARS-CoV és SARS-CoV-2 proteázok jelentős mértékű homológiájából adódóan (Griffin, 2020) kezdetben a virális nsp fehérjék természetes hasítóhelyei szolgálták alap információként a SARS-CoV-2 Mpro szubsztrát preferenciájáról. Ezek alapján elmondható, hogy a virális fő proteáz a „kis aminosav”-X-(L/F/M)-Q*(G/A/S)-X hasítási motívumot preferálja, ahol az X bármely aminosavat, a * pedig a hasítás helyét jelöli. A hasítóhely szekvenciáját tekintve erős preferenciát mutat a P1 pozícióban a glutaminra (Q) (Hilgenfeld, 2014). Egy újabb *in vitro* proteomikai vizsgálatot végző tanulmányban, több száz SARS-CoV-2 Mpro fehérje célpontot és hasítási szekvenciát azonosítottak, ami alapján új információkhoz jutottunk (Koudelka és mtsai, 2021). A P1 pozícióban a glutaminon kívül az azonosított hasítóhelyek ~10%-ában hisztidin volt, a P2 pozícióra leginkább a leucint találták jellemzőnek, azonban metionint is több esetben leírták, míg a P1' pozícióra a glicin/alanin/szerin aminosavak jellemzőek (Koudelka és mtsai, 2021) (10. ábra).

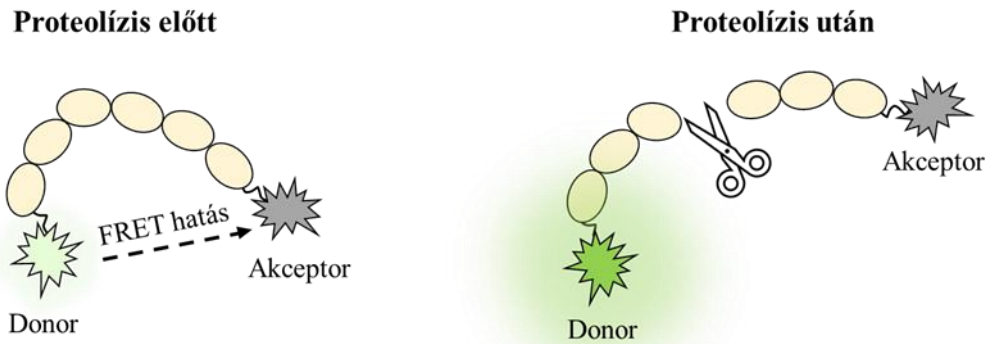


10. ábra. A SARS-CoV-2 Mpro celluláris fehérje szubsztrátjaiban található természetes hasítóhelyek alapján meghatározott aminosav preferenciák. Az ábra az eredeti ábra (Koudelka és mtsai, 2021) módosításával készült.

Figyelembe véve, hogy a humán szervezetben jelenlévő fehérjék közt nem ismert a fő proteázzal homológ fehérje struktúra, valamint a replikációs ciklusban betöltött kritikus szerepét, az Mpro a vírusellenes terápiák kiemelt célpontjának tekinthető. Számos *in silico* vizsgálatot végeztek a SARS-CoV-2 kezelésre szánt új célú gyógyszerek gátló aktivitásának vizsgálatára (Chen és mtsai, 2020; Wu C. és mtsai, 2020; Mahdi és mtsai, 2020; Muratov és mtsai, 2021), azonban a potenciális gátlószerek hatásának *in vitro* ellenőrzése nélkülözhetetlen a releváns hatóanyagok kiszűrése és további tesztelése szempontjából. Kutatócsoportunk korábban több FDA által elfogadott HIV-1 PR inhibitorot alkalmazott különböző retrovirális és retrovírus-szerű proteáz vizsgálatára (Mahdi és mtsai, 2015; Gazda és mtsai, 2020; Golda és mtsai, 2020; Kassay és mtsai, 2021). Ezek közül többet is potenciálisan hatékony SARS-CoV-2 Mpro inhibitoroként azonosítottak számítógépes analízisekben (lásd a Mahdi és mtsai, 2020 közlemény kiegészítő információit), ezért a SARS-CoV-2 fő proteázra gyakorolt hatásukat *in vitro* és sejtkultúras kísérletekben egyaránt megvizsgáltuk. Vizsgálatainkban nem tapasztaltunk a klinikumban is alkalmazható koncentrációkban jelentős gátló hatásokat, így ezen HIV-1 PR gátlószerek az eredményeink alapján nem rendelkeznek terápiás potenciállal a SARS-CoV-2 fertőzés kezelésében (Mahdi és mtsai, 2020).

3.4. Proteázok vizsgálatára alkalmas módszerek

A proteolitikus enzimek számos biológiai folyamatban kulcsszerepet töltenek be, emellett fontos gyógyszer-célpontok és széleskörű a biotechnológiai és ipari alkalmazásuk is. Ezért nagy az igény a proteázok vizsgálatára alkalmas hatékony eljárásokra, melyek alkalmazhatóak például az enzimek aktivitásának, specificitásának és gátolhatóságának vizsgálatára. A proteázok vizsgálatára számos különböző mérési módszer áll rendelkezésre, melyeket több szempont szerint is csoportosíthatunk. Az egyik megközelítés a módszereket az alkalmazott anyagok környezeti (proteáz-szubsztrát) elhelyezkedése alapján rendszerezi. Ilyen módon a különböző esszék két nagy csoportra bonthatók: homogén és heterogén vizsgáló módszerekre (Ong és Yang, 2017). A homogén rendszerekben a szubsztrát és az enzim a reakcióközeg oldatában, azonos közegben található meg. Konvencionális módon a reakcióközegben lévő termékeket nagynyomású folyadék-kromatográfia (HPLC) segítségével választják el és UV-detektorral, fluoriméterrel, spektrofotométerrel vagy tömegspektrométerrel detektálják. A módszer előnye, hogy rendkívüli pontossággal lehet meghatározni a keletkező proteolitikus fragmentumokat, azonban kizárólag végpontos enzimológiai mérések kivitelezhetők, mivel nem alkalmas az enzimreakció folytonos, valós idejű detektálására. Mindezek mellett a mérések kivitelezésének magas az anyag és eszköz-igénye (Ong és Yang, 2017). A közelmúltban a valós idejű proteáz-vizsgálatok használatához nagymértékben hozzájárult a fluoreszcens rezonancia elektron transzfer (FRET)-alapú technikák használata és továbbfejlesztése. A FRET-alapú mérés-technika lényege, hogy egy rövid peptidszakasz N- és C-terminálisa egy FRET donorral és egy FRET akceptorral konjugált (11. ábra). Ha az akceptor és a donor megfelelő távolságon belül helyezkedik el (1-10 nm), akkor a donor fluoreszcens jel emisszióját az akceptor molekula kioltja, így nem detektálható fluoreszcens jel. Proteáz jelenlétében a peptidben található hasítóhely hidrolízisét követően a módosított szubsztrát N- és C-terminálisai eltávolodnak egymástól és a továbbiakban nem áll fenn az akceptor molekula jel-kioltó hatása, így a fluoreszcens szignált fluoriméter segítségével tudjuk detektálni (Ong és Yang, 2017).



11. ábra. FRET-alapú proteáz szubsztrátok működési elve. A csillagok az oligopeptid lánc N- és C-terminális módosításait jelölik. Proteolitikus hasítás következtében jelentős mértékben megnő a donor molekula fluoreszcens jelének emissziója.

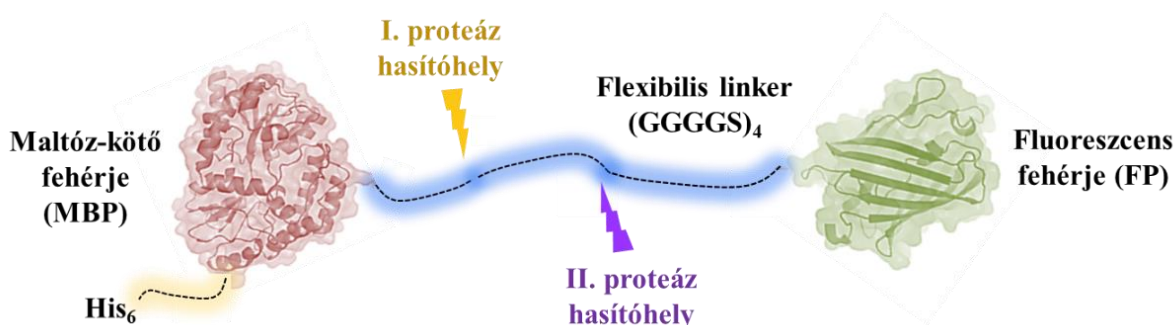
A homogén mérési módszerrel szemben a heterogén módszereknél a szubsztrát molekula szilárd felszínhez rögzített a reakcióközegben. Heterogén esszé típusok fajtái közé tartozik például (1) az elektrokémiai esszé, (2) a felületi plazmarezonancia esszé, (3) a felületi Raman szórás vizsgálatok és (4) a folyadékkromatográfiás esszék (Ong és Yang, 2017).

A rekombináns fehérje technológia új lehetőségeket nyitott a proteáz vizsgálatok területén rekombináns fehérjék szubsztrátként történő felhasználásával. Kutatócsoportunk is részt vett az elmúlt években ezen rendszerek kialakításában, amit a következő fejezetben részletezek.

3.5. A rekombináns szubsztrát-alapú rendszer alkalmazási lehetőségei a proteázok vizsgálatára

A proteolitikus enzimek vizsgálatára több különböző típusú szubsztrát rendszer is elérhető, melyek közül a rekombináns fehérje szubsztrátok felhasználási lehetőségei rendkívül sokrétűek és sok előnyös tulajdonsággal rendelkeznek pl. a szintetikus oligopeptid szubsztrátokkal szemben. Számos fúziós fehérje szubsztrátot ismerhetünk meg a szakirodalomból és különféle módszerek állnak rendelkezésre proteolitikus aktivitás kimutatása (Pehrson és mtsai, 1999; Zhang, 2004; Gammon és mtsai, 2009; Branchini és mtsai 2011). A doktori tanulmányaim során részt vettem egy, a kutatócsoportunk által tervezett rekombináns fluoreszcens fehérje-alapú szubsztrát rendszer kidolgozásában, illetve a használatukon alapuló proteáz-vizsgáló módszer fejlesztésében és alkalmazásában (Bozóki és

mtsai, 2018; Mótyán és mtsai, 2018; Bozóki és mtsai, 2019). Az általunk előállított rekombináns szubsztrátok N-terminális hexahisztidin címkével (His₆) fuzionált maltóz-kötő fehérjét (*maltose-binding protein*, MBP) tartalmaznak, ezt követően a dohány karcolatos vírus (*tobacco etch virus*, TEV) proteáz természetes hasítóhelyét, amit a vizsgálni kívánt proteáz tetszőleges szubsztrátjának aminosav szekvenciája követ. A fehérje szubsztrát C-terminálisán egy tetszőleges fluoreszcens fehérje címke található (12. ábra). A fúziós fehérje szubsztrát minden alkotóeleme fontos funkcióval rendelkezik a felhasználás szempontjából. A His₆ címke lehetővé teszi a fehérje fémion kelát-alapú immobilizálását (*immobilized metal affinity chromatography*, IMAC) és kromatográfiás tisztítását. Az MBP címke fehérje jelenléte növeli a fehérje oldékonyságát, valamint elősegíti a fehérje feltekerődését (Kapust és Waugh, 1999; Fox és Waugh, 2003). A TEV proteáz hasítóhelye kettős szerepet tölt be. Kontroll hasítóhelyként ellenőrizhető a szubsztrátban lévő hasítóhely hozzáférhetősége és a szubsztrát hasíthatósága, valamint a fehérje kettős (pl. a TEV és a vizsgálni kívánt proteáz általi együttes) hasítását követően a hasítási pozíció meghatározható a felszabaduló peptidfragmens molekulatömegének tömegspektrometriás (Gazda és mtsai, 2020).



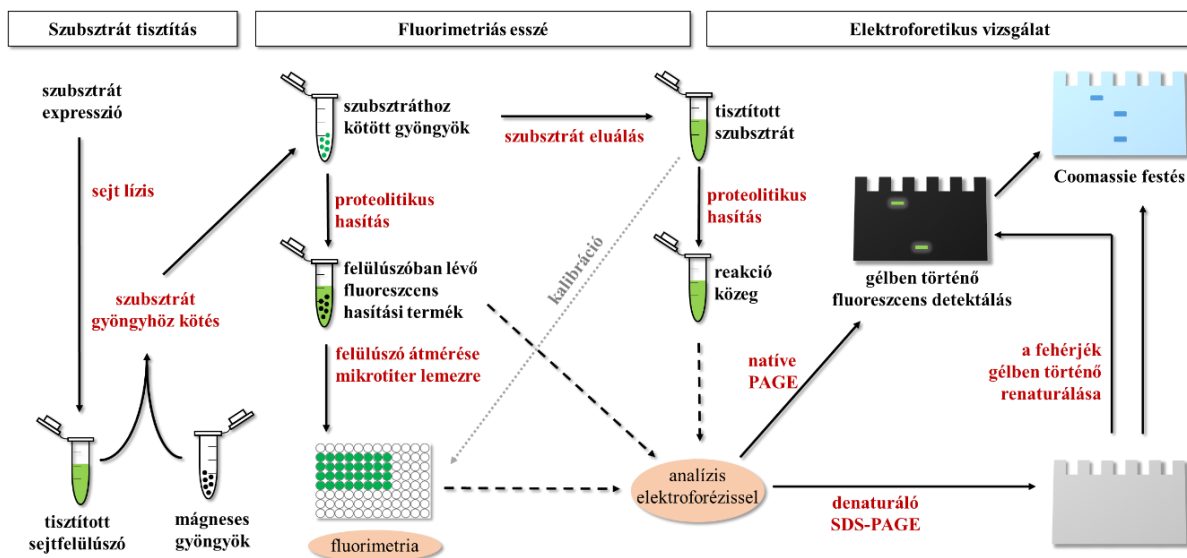
12. ábra. A His₆-MBP-FP fehérje szubsztrát sematikus ábrázolása. A szubsztrátban megtalálható egy His₆ (hexahisztidin) címke, egy MBP (maltóz-kötő fehérje) címke, a TEV (dohány karcolatos vírus) proteáz (I.) valamint a vizsgálni kívánt proteáz hasítóhelye (II.), és egy C-terminális fluoreszcens fehérje (FP). A II. proteáz hasítóhely és az FP között található egy flexibilis (GGGGS)₄ linker, melyet nem tartalmaz mindegyik általunk használt szubsztrát .

Ezen His₆-MBP-FP szubsztrátok felhasználása rendkívül sokféle lehet felépítésüknek köszönhetően. Használhatjuk őket elválasztás alapuló rendszerben, ahol a szubsztrátokkal a His₆-címkén keresztül nikkell ionokkal bevont nitrilotriacetát (Ni-NTA) mágneses gyöngyöket telítünk. A proteolitikus hasítást követően az intakt szubsztrát és az N-terminális (His₆-MBP-

részt is tartalmazó) hasítási termék a mágneses gyöngyök felületéhez kötve marad, ezek az immobilizált molekulák elválaszthatóak a szolubilis molekuláktól, így az enzimtől és a fluoreszcens fehérjét tartalmazó C-terminális hasítási terméktől. A fluoreszcens fehérje jelenléte az egyes mintákban enzimatis aktivításra utal, melynek intenzitása fluoriméter segítségével meghatározható. A jel intenzitása lineárisan arányos a keletkező C-terminális fehérje mennyiségével, azaz az enzimatis aktivítással. Ezen felül a termékképződés elektroforézissel is vizsgálható (**Bozóki és mtsai, 2018**). A módszer ezen alkalmazása lehetővé teszi a proteolitikus enzimek karakterizálását, alkalmazható az optimális reakciókörülmények meghatározására, inhibitor molekulák vizsgálatára (IC_{50} és K_i meghatározás) és szubsztrátspecificitás vizsgálatára, például a kinetikai paraméterek meghatározására (K_M , V_{max} , k_{cat} , k_{cat}/K_M). Kutatócsoportunk munkatársai többek között a Ty1 retrotranszpozon proteáz karakterizálására alkalmazták a rendszert, a kísérletekben hét különböző szekvenciájú és hosszúságú hasítóhelyet reprezentáló szubsztrát összehasonlító vizsgálatát végezték el (**Gazda és mtsai, 2020**). A vizsgálatok részét képezte a Ty1 proteáz szubsztrátkötő árok jelenlétének tanulmányozása, módosított 20-tagú hasítóhelyet tartalmazó, illetve flexibilis összekötő szakasszal ellátott szubsztrátokon. Kutatócsoportunk sikeresen adaptálta a módszert szubsztrátok mikrolemez-alapú szűréséhez, mely során 20 különböző P1' pozícióban módosított szubsztrátot tartalmazó sorozatot vizsgáltak csökkentett térfogatokban a venezuelai ló-encephalitis vírus (VEEV) proteázának specificitásának vizsgálata során (**Bozóki és mtsai, 2020**).

A fluoreszcens szubsztrátok homogén esszében is alkalmazhatóak, oldatban történő hasításhoz. A bakteriális expressziót követő feltárási folyamat után a fehérjéket Ni-NTA-alapú mágneses gyöngyök felhasználásával, affinitás kromatográfiával megtisztítjuk (**Bozóki és mtsai, 2018; Bozóki és mtsai, 2019; Mótyán és mtsai, 2019**). Az így előállított szubsztrátokat nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) segítségével vizsgálhatjuk olyan esetekben, amikor az enzim számára optimális reakciókörülmények nem vagy nem megfelelő mértékben kompatibilisek a szubsztrátok immobilizálásával vagy a mágneses gyöngyök számára kedvezőtlenek (pl. figyelembe kell venni a pH-t, a kelátorok, detergensok vagy szerves oldószerek jelenlétét, stb). A molekula méretének és a hasítóhely pozíciójának köszönhetően jó felbontással lehet elkülöníteni az intakt szubsztrátokat a hasítási termékektől elektroforézissel. A gélben lévő fehérjék detektálása történhet a fehérjék nem-specifikus kimutatásával (pl. Coomassie- vagy ezüst-festés), de végezhetünk gélben történő fehérje renaturálást is, mely során az SDS-t tartalmazó poliakrilamid gélből több cikluson

keresztül történő desztillált vizes mosás segítségével távolítható el az SDS (Bozóki és mtsai, 2018; Bozóki és mtsai, 2019). Az SDS eltávolítását követően a fluoreszcens címke újra felveszi a megfelelő térbeli konformációját (részleges renaturáció) és UV-fény hatására láthatóvá válik. A fluoreszcens címkék ezen tulajdonságait kihasználva lehetőségünk van komplex biológiai elegyből (pl. teljes sejt-lizátumból) is kimutatni a fluoreszcens fehérje jelenlétét és állapotát (intakt/processzált) (13. ábra). Ismeretlen szubsztrát szekvenciák alkalmazásakor meghatározhatók a szubsztrátok pontos hasítási helyei, célzott proteomikai analízissel (Gazda és mtsai, 2020). Jelenlegi tudásunk szerint a rendszer alkalmazhatóságát nem korlátozza a peptidfragmens mérete, így akár teljes hosszúságú, potenciális hasítóhely(eke)t tartalmazó fehérjék is beépíthetők. A humán apai kromoszómáról expresszáldó gén 10 (*paternally expressed gene 10*, PEG10) fehérje esetében kutatócsoportunk munkatársai >350 aminosav hosszúságú fehérjedomént építettek a His₆-MBP-mTurquoise2 szubsztrátba (Golda és mtsai, 2020). Bár a tervezett His₆-MBP-FP szubsztrátok alkalmazhatók több kísérleti beállítással, az eddig tesztelt alkalmazások egyike sem teszi lehetővé a termékézés való idejű detektálását.



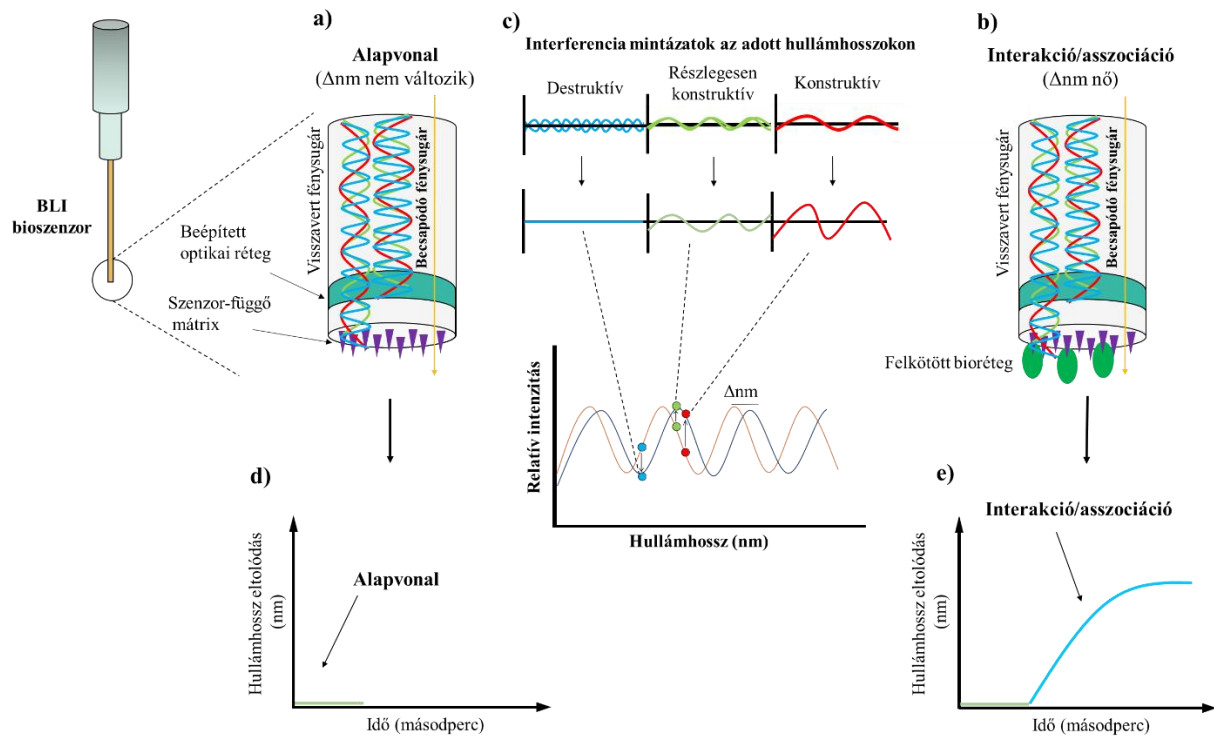
13. ábra. A His₆-MBP-FP rekombináns fehérje szubsztrátok felhasználási lehetőségei.

Készült az eredeti ábra (Mótyán és mtsai, 2018) módosításával. Az ábra a kutatócsoportunk által eddig is alkalmazott felhasználási lehetőségeket mutatja.

3.6. A BLI alapja, felhasználása

A bioréteg interferometria (*bio-layer interferometry*, BLI) egy optikai elven működő analitikai módszer, mely a fény kölcsönhatásán és interferenciáján alapszik (**Concepcion és mtsai, 2009; Wilson és mtsai, 2010**). Az úgynevezett jelölésmentes (*label-free*) technikák közé tartozik, mely lehetővé teszi a biomolekulák módosítatlan formában történő analizését (**Schasfoort, 2017**). A rendszer fényforrásként volfrám lámpából származó fehér fényt alkalmaz, amely magában foglalja az összes látható hullámhosszt. A fénysugár végigvándorol a készülék optikai tengelyén és egy cserélhető optikai szálat (bioszenzor) sugároz át. A becsapódó fénysugár fényvisszaverődése a bioszenzor hegyén lévő két rétegről visszaverődik a műszer detektorába. A visszavert fénysugár a szenzorba beépített optikai rétegről és a szenzor felszínről (mátrix), valamint a felkötött analit molekulák által alkotott rétegről különböző interferencia mintázatot ad, ezt a mintázatot detektáljuk (**14. ábra**). Az első reflexió az optikai szál és a biokompatibilis mátrix között, míg a második reflexió a biokompatibilis mátrix és az oldat között történik. Ha az első és a második visszavert fényhullámot lebontjuk, háromféle interferenciaprofil figyelhetünk meg: konstruktív, szemi-konstruktív és destruktív. Ennek az interferenciának az összes hullámhosszra vonatkozó ábrázolása egy referencia mérési sorozatot eredményez a szenzorhoz kötődött analizálandó mintával való összehasonlításhoz. A bioszenzor és a kölcsönható partner (analit) kötődésekor az "optikai vastagság" a bioszenzor csúcán megnő. Ez a felület és az oldat közötti visszaverődés úthosszána növekedését eredményezi, azonban nem a referencia mintázatát, ami a biokompatibilis mátrix és az optikai szál között jön létre. A keletkező jelből információt nyerhetünk különböző molekuláris interakciók mennyiségéről és minőségéről. Ily módon közvetlenül mérhető a biológiai rétegvastagságok közti különbség.

A BLI egyik legfontosabb tulajdonsága a folyamatos detektálás, amely lehetővé teszi a fényvisszaverődés interferencia-változásának valós idejű nyomon követését, amelynek változása közvetlenül korrelál a felületi vastagság változásával. Csak a bioszenzorhoz kötődő vagy arról disszociáló molekulák változtathatják meg az interferencia mintázatot. A nem kötődő molekulák, illetve az oldat törésmutatója adott körülmények között nem befolyásolják az interferencia mintázatot. Ebből következik, hogy megfelelő kondíciók alkalmazásával lehetőségünk van komplex biológiai közegekből történő mérések kivitelezésére is (**Schasfoort, 2017**).

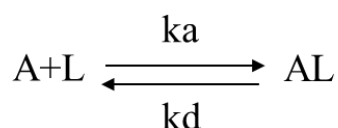


14. ábra. A BLI bioszenzor felülete és a mérés technika elméleti háttere. A beépített optikai réteg és a mátrixhoz kikötődő bioréteg fényvisszaverődésének **(a, b)** relatív intenzitása hullámhossz eltolódásként detektálható **(c)**, amely kötődési görbeként analizálható **(d, e)**.

A módszer legfőbb felhasználásai közé tartozik a mennyiségi analízis, mely az enzimhez kötött immunsorbens vizsgálat (*enzyme linked immunosorbent assay*, ELISA) mérésekhez hasonlóan ismert koncentrációjú elegyből történő kalibrációs egyenes alkalmazását veszi alapul ismeretlen koncentrációjú oldatok meghatározására. A molekuláris interakciók minőségi analízise a legtöbb esetben három fontos paramétert vizsgál: i) a molekulák asszociációs képességét (k_a), azaz, hogy milyen gyorsan képes két molekula közt kialakulni a kölcsönhatás; ii) a molekulák disszociációs képességét (k_d), azaz, hogy milyen gyorsan szűnik meg két molekula közt az interakció; valamint iii) ezen információkból meghatározható az egyensúlyi disszociációs konstans (K_D), mely a molekulák közti interakció „erősségét” jellemző biológiai mérőszám (Schasfoort, 2017).

3.6.1. Kvantitatív analízis menete; a kötődési kinetika meghatározásának alapjai BLI rendszer használatakor

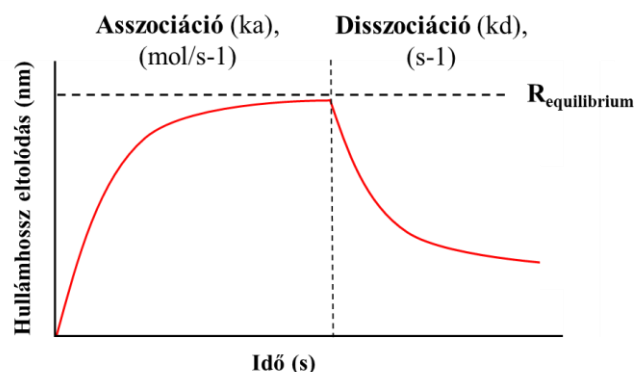
A BLI-alapú kinetikai kísérletek során első lépésben egy ligand molekulát kötünk a bioszenzor felszínéhez. A ligandumhoz kötött bioszenzort olyan oldatba mártjuk, amely tartalmazza a vizsgálni kívánt analitot, ezt a mérési szakaszt nevezzük asszociációs fázisnak. A következő lépésben a bioszenzort az analit molekulától mentes pufferközegbe helyezük, ahol megvizsgálhatjuk az interakciót jellemző úgynevezett disszociációs fázist. A mérések valós időben történnek, asszociációs és disszociációs görbék generálva, amelyekből meghatározhatók a biomolekuláris interakciókat jellemző kinetikai paraméterek, így az asszociációs állandó (k_a), a disszociációs állandó (k_d) és az egyensúlyi disszociációs állandó (KD). A k_a , k_d és KD értékek kiszámításához a mérés során rögzített szenzogramok esetében az asszociációs és disszociációs görbékre matematikai egyenlet segítségével történő illesztés után kapunk értékelhető eredményt. Két molekula közti interakció legegyszerűbb modellje szerint,



az analit (A) és ligand (L) kölcsönhatását (AL) az asszociáció (k_a) és a disszociáció sebessége (k_d) határozza meg. Ez a modell 1:1 kötődést (Langmuir model) feltételez a molekulák között (**Schasfoort, 2017**). Az asszociáció sebessége a molekula mennyiségétől függ ($\text{mol}^{-1} \text{s}^{-1}$), míg a disszociáció független a jelenlévő molekulák mennyiségétől (s^{-1}). A molekuláris kölcsönhatást jellemző egyensúlyi disszociációs konstans, az asszociációs konstans és a disszociációs konstans hányadosával számolható ki. A KD definíció szerint egyensúlyi állapotban azt az analit koncentrációt mutatja meg, amelynél a ligand molekulák 50%-a foglalt.

$$KD (M) = \frac{k_a(\text{mol}^{-1} \text{s}^{-1})}{k_d(\text{s}^{-1})}$$

A BLI analízis során további fontos mérőszámokat kapunk, melyek elengedhetetlenek a vizsgálatok kivitelezéséhez, pontos analíziséhez. Az $R_{\text{equilibrium}}$ (R_{eq}) a mérés során az a pont, ahol az újonnan felkötődő és ledisszociálódó molekulák mennyisége megegyezik, tehát egyensúlyi állapot alakul ki (**15. ábra**). Végezetül az R_{max} érték mutatja meg a bioszenzor maximum kötőkapacitását. Az R_{max} érték jelentős információkkal szolgál a bioszenzorok kötőfelszínének állapotáról.



15. ábra. A kölcsönhatást jellemző értékek meghatározása a BLI mérésben. A k_a érték az asszociációs állandót mutatja be mol/s^{-1} , míg a k_d érték a disszociációs értéket s^{-1} dimenzióban.

3.6.2. A BLI felhasználása enzimaktivitás vizsgálatra detektálása

Bár a BLI segítségével sokféle intermolekuláris kölcsönhatás vizsgálható, ezt a módszert nem alkalmazzák széles körben enzimaktivitás mérésére. Legfontosabb felhasználási területe a makromolekulák közötti (pl. fehérje-fehérje) interakciók analízise. A mai napig csak kevés tanulmányról számoltak be, amikor a BLI módszert enzimaktivitás vizsgálatára használták. Példaként említhető Kojima és munkatársai munkája, akik a torma peroxidáz (*horseradish peroxidase*, HRP) aktivitását vizsgálták valós idejű BLI-alapú mérésekben, immobilizált enzim alkalmazásával (Kojima és mtsai, 2019). Egyetlen általunk ismert munkáról tudunk, amelyben proteázokat alkalmaztak BLI módszerben, azonban a kísérletek célja nem a proteáz vizsgálata volt, hanem a proteolitikus enzimet a szenzorfelszínen maradó molekulák enzimatiszta eltávolítására használták (Sharma és Wilkens, 2017). Tudomásunk szerint napjainkig nem publikáltak olyan tanulmányt, amelyben BLI-t alkalmaztak a proteázok vizsgálatára.

4. CÉLKITŰZÉSEK

Az általunk korábban kidolgozott His₆-MBP-FP rekombináns fluoreszcens fehérje szubsztrát rendszer alkalmazását alapul véve a következő vizsgálatokat tűztük ki célul.

I.) A HIV-1 és SARS-CoV-2 fő proteáz vizsgálata.

I/A Célul tűztük ki a HIV-1 PR szubsztrátspecifititásának vizsgálatát a nukleokapszid proximális cink-ujj motívumában lévő hasítóhelyet reprezentáló szubsztrátokkal, a vad típusú és módosított szubsztrátok hasítási reakcióival, valamint a cink-ujj konformációs állapotainak vizsgálatával.

I/B Célunk volt a SARS-CoV-2 fő proteáz ismert és *in silico* módszerekkel jóslott hasítási szekvenciáit tartalmazó szubsztrátok létrehozása és a proteolitikus hasítás vizsgálata a hasítási pozíció azonosításával, valamint az enzimkinetikai paramétereinek meghatározásával.

II.) A rekombináns fehérje szubsztrátok használatán alapuló új, a proteolitikus hasítás valós idejű detektálására alkalmas mérési módszer kidolgozása.

Célul tűztük ki a rekombináns fluoreszcens fehérjék felhasználását egy bioréteg interferometria (BLI)-alapú mérési módszer kidolgozásához, majd a mérési körülmények optimalizálását követően a módszer alkalmazását a HIV-1 PR szubsztrátspecifititásának és a szubsztrátkötő árok nevű enzimek felületi kötőhelyének vizsgálatában.

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5.1 A HIV-1 proteáz expressziója és tisztítása

A stabilizáló mutációkkal ellátott (Q7K, L33I, L63I, C67A és C95A) teljes hosszúságú és az 1-4 N- és 96-99 C-terminális aminosavak delécióját tartalmazó mutáns HIV-1 PR szekvenciáját kódoló pET11a expressziós plazmidokat Dr. John M. Louis (Laboratory of Chemical Physics, NIDDK, NIH) bocsájtotta rendelkezésünkre (**Mahalingam és mtsai, 1999**) és kutatócsoportunk korábbi munkájából rendelkezésünkre állt (**Miklóssy és mtsai, 2008**). A munkánk során ezen enzimekre, mint vad-típusú (HIV-1 PR_{vad}) és mutáns (HIV-1 PR_{ΔNΔC}) enzimre hivatkoztunk. A tisztított HIV-1 PR_{vad} enzim rendelkezésre állt a kutatócsoport korábbi munkáiból (**Bozóki és mtsai, 2018**), a vizsgálatainkhoz szükséges HIV-1 PR_{ΔNΔC} enzimet az alább leírtak szerint állítottuk elő.

A fehérje termeltetése *Escherichia coli* BL21(DE3) sejtekben történt. Az expresszió során a sejteket 100 µg/ml ampicillint tartalmazó Luria-Bertani (LB) tápoldatban növesztettük 37°C-on a megfelelő optikai denzitás eléréséig (600 nm-en megközelítőleg 0,6-0,8 közötti értékig). A fehérje expressziót 1 mM izopropil-β-D-tiogalakto-piranozid (IPTG) hozzáadásával indukáltuk, majd a szuszpenziót további 3 órán át inkubáltuk 37°C-on. A sejteket centrifugálással gyűjtöttük be (6000 g, 20 perc, 4°C) a korábban leírt eljárás alapján (**Mahalingam és mtsai, 2001; Miklóssy és mtsai, 2008**). Ezt követően a centrifugálásból visszamaradt pelletet felvettük 20 térfogat sejteltáró pufferben (50 mM Tris, 10 mM etiléndiamin-tetraecetsav (EDTA), 0,1 mg/ml lizozim, pH 8) és a sejteket szonikálással tártuk fel. Ezt követően a lizátumot 20 percig 20000 g sebességgel centrifugáltuk, melyet az enzimek stabilitásának megőrzése érdekében 4°C-on végeztünk. A pelletet mosó pufferrel (50 mM Tris, 10 mM EDTA, 1 M urea, 1% Triton X-100, pH 8) kezeltük és újbóli centrifugálást követően, a többségében HIV-1 PR inklúziós testeket tartalmazó pelletet denaturáló pufferben (50 mM Tris, 5 mM EDTA, 7,5 M guanidin-HCl, pH 8) vettük fel. A fennmaradó sejttermelékektől egy újabb centrifugálási lépés során szabadultunk meg. A denaturált HIV-1 PR_{ΔNΔC}-t tartalmazó felülúszót 0,22 µm pórus-átmérőjű fecskendőszűrővel (Merck-Millipore) szűrtük át és desztillált vízzel 1:1 arányban hígítottuk, melyet közvetlenül egy reverz fázisú fehérje tisztítás követett. A reverz fázisú kromatográfiás tisztítást HPLC készüléken (ÄKTA Purifier, Amersham Pharmacia biotech), C18-as oszlopon (Nova-Pak C18, 3,9 x 150 mm, Waters Associates, Inc.) végeztük, 1 ml/perc áramlási sebesség mellett növekvő gradiens elúció (0-40%) alkalmazásával, 0,05% trifluoecetsavat (TFA) tartalmazó víz, valamint 0,05% TFA-t

tartalmazó acetonitril eluensekkel. A frakciók tisztaságát 14%-os SDS-PAGE segítségével ellenőriztük. Denzitometrálassal megállapítottuk, hogy melyek azok a frakciók, amelyek legalább 90%-os tisztaságú HIV-1 PR_{ΔNΔC}-t tartalmaznak. Ezen frakciókat kétlépéses dialízissel renaturáltuk. A dialízist első lépésben 50 mM-os (pH 2,5) hangyasav ellen, második lépésben 50 mM nátrium acetát puffer (pH 5) ellen végeztük. A fehérje koncentrációkat NanoDrop 2000 készülék (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével, az abszorbancia 280 nm-es hullámhosszon történő mérésével, valamint Pierce BCA assay kit (Thermo Scientific) felhasználásával határoztuk meg, a méréseket a gyártó utasításai szerint végeztük.

5.2. Aktív enzim koncentráció meghatározása

Az aktív centrum titrálás során HIV-1 PR_{vad} enzimet használtunk. Szubsztrátként 0,47 mM végkoncentrációban a HIV-1 MA/CA hasítóhelyét reprezentáló 9-tagú oligopeptidet (VSQNY*PIVQ) alkalmaztuk. A titráláshoz használt inhibitor (amprenavir) a reakciókban 0,1-40 nM-os koncentráció tartományban alkalmaztuk. Reakció pufferként esszé puffert használtunk, amely az esszé „A” (50 mM nátrium acetát, pH 5) és az esszé „B” (0,275 M Na₂HPO₄, 0,2 M NaH₂PO₄, 4 M NaCl, pH 5,6) pufferek 1:1 arányú elegyítésével készült.

A reakcióelegyek 10 μl esszé puffert, 4,8 μl enzimet, 5 μl szubsztrátot és 0,2 μl inhibitor tartalmaztak. Mivel az inhibitor dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldottuk be, a kontroll reakcióhoz inhibitor helyett DMSO-t adtunk azonos térfogatban. A reakcióközegeket 37°C-on 1 órán át inkubáltuk, majd 180 μl 1%-os TFA hozzáadásával állítottuk le. A szubsztrátok és termékek elválasztását HPLC készüléken (Hitachi Merck), Nova-Pak C18 reverz fázisú kromatográfiás oszlop segítségével végeztük el. Az elválasztás során 0-100% növekvő víz/acetonitril gradiens elúciót alkalmaztunk 0,05 v/v% TFA jelenlétében. A kiértékeléshez GraphPad Prism 5.01 programot használtunk (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA; www.graphpad.com).

5.3. Rekombináns fehérje szubsztrátok előállítása, expressziója és tisztítása

5.3.1. Klónozási lépések

A cirkuláris pDest-His₆-MBP-mApple (mApple, monomer vörös fluoreszcens fehérje) és pDest-His₆-MBP-mEYFP (mEYFP, monomer sárga fluoreszcens fehérje) expressziós vektorokat PacI és NheI restriktions endonukleázokkal hasítottuk, míg a pDest-His₆-MBP-(GGGGS)₄-mApple vektor esetében PacI és BamHI enzimeket használtunk. A reakció során az enzimek gyártója által ajánlott reakciókörülményeket alkalmaztuk (New England Biolabs). A klónozáshoz használt pDest-His₆-MBP-mApple (**Bozóki és mtsai, 2018**), pDest-His₆-MBP-mEYFP (**Bozóki és mtsai, 2019**) és pDest-His₆-MBP-(GGGGS)₄-mApple (**Gazda és mtsai, 2020**) expressziós vektorok a kutatócsoport korábbi munkáiból álltak rendelkezésünkre. A hasítási termékeket 1%-os agaróz gélen választottuk el, majd a lineáris plazmidokat Qiagen DNS extrakciós kit (Qiagen) segítségével preparáltuk ki a gélből. A proteázok hasítóhelyeit kódoló *forward* és *reverz* komplementer primereket (**1. táblázat**) 200-200 ng mennyiségben adtuk 150 ng tisztított linearizált expressziós plazmidhoz, majd az elegyet 1 órán keresztül inkubáltuk szobahőmérsékleten T4 DNS-ligáz reakciópuffer és T4 DNS-ligáz (New England Biolabs) jelenlétében.

5.3.2. Plazmid szelekció

A klónozási lépések folytatásaként 1 µl ligálási közeget transzformáltunk 50 µl BL21(DE3) bakteriális expressziós sejtekbe, hősokk alkalmazásával (42°C). A hősokk után LB tápoldatot adtunk a transzformáns sejtekhez, majd a szuszpenziót 37°C-on, 1 órán át rázattuk 280 rpm fordulatszámom. A transzformáns sejteket 100 µg/µl ampicillint tartalmazó LB-agar lemezekre szélesztettük és legalább 16 órán át 37°C-on inkubáltuk. Néhány nap elteltével az UV fény hatására világító (ez a ligáció sikerességére utalt), különálló baktériumtelepekből, folyadék kultúrába történő átvétel és növesztés után plazmidot izoláltunk High Speed Plazmid Mini Prep (Geneaid) segítségével. A klónozás sikerességét szekvenálással ellenőriztük az Eurofins genomics mix2seq kit felhasználásával a megfelelő szekvenáló primert alkalmazva (**1. táblázat**). A megfelelő szekvenciát tartalmazó klónokat fagyasztó oldatban (80 v/v% glicerin és 10 mM MgCl₂ 2:1 arányú elegye) vettük fel és -70°C-on tároltuk (glicerol stock).

1. táblázat. A rekombináns szubsztrátokak kódoló expressziós plazmidok előállításához használt oligonukleotid primerek. A *forward* és *reverz* a primerek irányultságát jelölik. A csillagok (*) az aminosav szekvenciákban jelenlévő a hasítási pozíciókat jelölik.

Hasítóhely neve, és primer típusa	A hasítóhelyek aminosavszekvenciái és az előállításukhoz szükséges primerek DNS szekvenciái
HIV-1 NC_17N	KIVKCF*<i>N</i>CGKEGHTARNCRAPR
FWD	5'-TAAAAAAATTGTGAAATGCTTTAACTGCGGCAAAGAAGGCCATACCGCGGTAAGTCCGTGCGCCGCGTG-3'
REV	5'-GATCCACGCGGCGCACGGCAGTTACGCGCGGTATGGCCTCTTTGCCGAGTTAAAGCATTTCACAATTTTTTAAT-3'
HIV-1 NC_N17F	KIVKCF*<i>F</i>CGKEGHTARNCRAPR
FWD	5'-TAAAAAAATTGTGAAATGCTTTTTTGGCGCAAAGAAGGCCATACCGCGGTAAGTCCGTGCGCCGCGTG-3'
REV	5'-GATCCACGCGGCGCACGGCAGTTACGCGCGGTATGGCCTCTTTGCCGCAAAAAAGCATTTCACAATTTTTTAAT-3'
HIV-1 NC_N17L	KIVKCF*<i>L</i>CGKEGHTARNCRAPR
FWD	5'-TAAAAAAATTGTGAAATGCTTTCTGTGCGGCAAAGAAGGCCATACCGCGGTAAGTCCGTGCGCCGCGTG-3'
REV	5'-GATCCACGCGGCGCACGGCAGTTACGCGCGGTATGGCCTCTTTGCCGCACAGAAAGCATTTCACAATTTTTTAAT-3'
HIV-1 NC_N17T	KIVKCF*<i>T</i>CGKEGHTARNCRAPR
FWD	5'-TAAAAAAATTGTGAAATGCTTTAACTGCGGCAAAGAAGGCCATACCGCGGTAAGTCCGTGCGCCGCGTG-3'
REV	5'-GATCCACGCGGCGCACGGCAGTTACGCGCGGTATGGCCTCTTTGCCGAGTTAAAGCATTTCACAATTTTTTAAT-3'
HIV-1 NC_K14I-N17G	KIVICFGCGKEGHTARNCRAPR
FWD	5'-TAAAAAAATTGTGATTTGCTTTGGCTGCGGCAAAGAAGGCCATACCGCGGTAAGTCCGTGCGCCGCGTG-3'
REV	5'-GATCCACGCGGCGCACGGCAGTTACGCGCGGTATGGCCTCTTTGCCGACGCAAAAGCAAATTCACAATTTTTTAAT-3'
HIV-1 NC_I14_inz-N17G	KIVKICFGCGKEGHTARNCRAPR
FWD	5'-TAAAAAAATTGTGAAAATTTGCTTTGGCTGCGGCAAAGAAGGCCATACCGCGGTAAGTCCGTGCGCCGCGTG-3'
REV	5'-GATCCACGCGGCGCACGGCAGTTACGCGCGGTATGGCCTCTTTGCCGACGCAAAAGCAAATTTTCACAATTTTTTAAT-3'
SARS-CoV-2 nsp4	TSAVLQ*<i>S</i>GFRKM
FWD	5'- TAAAACCTCTGCGGTGCTGCAGTCTGGCTTTCGTA A AATGG -3'
REV	5'- CTAGCCATTTTACGAAAGCCAGACTGCAGCACCGCAGAGGTTTAAAT -3'
CTBP1/2 (151–164)	REGTRVSVEQIRE
FWD	5'- TAAACGTGAAGGCACCCGTGTGCAGTCTGTGGAACAGATCCGTGAAG -3'
REV	5'- CTAGCTTCACGGATCTGTTCACAGACTGCACACGGGTGCCTTCACGTTTAAAT -3'
HIV-1 MA/CA_vad-9	VSQNY*<i>P</i>IVQ
FWD	5'-TAAAGTGAGCCAGA A CTATCCGATTGTGCAGG-3'
REV	5'-CTAGCCTGCACAATCGGATAGTTCTGGCTACTTTAAAT-3'
HIV-1 MA/CA_mut-9 (P2L)	VSQLY*<i>P</i>IVQ
FWD	5'-TAAAGTGAGCCAGCTGTATCCGATTGTGCAGG-3'
REV	5'-CTAGCCTGCACAATCGGATACAGCTGGCTACTTTAAAT-3'
HIV-1 MA/CA_vad-24	DTGHSNQVSQNY*<i>P</i>IVQNIQGMVH
FWD	5'-TAAAGATACCGCCATAGCAACCAGGTGAGCCAGA A CTATCCGATTGTGCAGAACATTCAGGGCCAGATGGTGCATG-3'
REV	5'-CTAGCATGCACCATCTGGCCCTGAATGTTCTGCACAATCGGATAGTTCTGGCTCACCTGGTTGCTATGGCCGGTATCTTTAAAT-3'
HIV-1 MA/CA_mut-24	GVGPGHVSQNY*<i>P</i>IVQSQTNSAT
FWD	5'-TAAAGCGTGGGCGGCCGGCCATGTGAGCCAGA A CTATCCGATTGTGCAGAACAGGTGACCAACAGCGCAACCG-3'
REV	5'-CTAGCGGTTGCGCTGTTGGTACCTGGTTCTGCACAATCGGATAGTTCTGGCTCACATGGCCCGGGCCGCCCACGCCTTTAAAT-3'
szekvenáló primer	5'-GATGAAGCCCTGAAAGACGCGCAG-3'

5.3.3. Fehérje expresszió

A HIV-1 PR és SARS-CoV-2 Mpro szubsztrátok termeléséhez starter kultúrát indítottunk. 50 ml-es centrifugacsőben 5 ml - ampicillint tartalmazó - LB tápoldathoz 10 µl expressziós plazmidokkal transzformált *E. coli* BL21(DE3) sejtekből készült glicerol stockotadtunk, majd a szuszpenziót egy éjszakán át 37°C-on inkubáltuk. A felnövesztett 5 ml-es starterkultúrát 50 ml - 100 µg/mL ampicillinnel kiegészített - LB tápoldatba oltottuk át. A tenyésztést 500 ml-es Erlenmeyer lombikban végeztük 37°C-on folyamatos rázatás mellett (280 rpm). Amikor a sejt kultúra optikai denzitása elérte a 0,6-0,8-as abszorbanciát 600 nm-en, IPTG-vel (1 mM végkoncentráció) indukáltuk a fehérje expressziót, majd a szuszpenziót további 3 órán keresztül inkubáltuk 37°C-on, folyamatos rázatás mellett (280 rpm). Az inkubálás végeztével a sejt szuszpenziót szétosztottuk 50 ml-es centrifugacsövekbe (25 ml/cső) és centrifugálással gyűjtöttük össze a sejteket (2700 g, 15 perc, 4°C) (Jouan CR 412), majd a felülúszót eltávolítottuk. A bakteriális pelletet tartalmazó centrifugacsöveket a sejtfeltérési procedúra előtt legalább 1 órán keresztül -70°C-on tároltuk, mely tapasztalataink alapján nagymértékben növeli a sejtfeltérési hatékonyságát.

5.3.4. Sejtek lízise

A jégen kiolvadt pelletet felvettük 2 ml lízis pufferben (20 mM Tris HCl, 100 mM NaCl, 5 mM imidazol, pH 7,8), melyet kiegészítettünk 25 µg/ml végkoncentrációjú fenil-metil-szulfonil-fluoriddal (PMSF), 1 mg/ml lizozimmal és 10 U/ml DNáz (New England Biolabs) enzimmel. Az elegyet rázatással és szuszpendálással homogenizáltuk, majd a mintát 20 percig inkubáltuk jégen. Ezt követően a mintákat 1 ml-es Eppendorf csövekbe osztottuk szét és vízfürdőben szonikáltuk 3 percen keresztül (10 másodperc szonikálás + 5 másodperc szünet ciklusokban), majd centrifugálással pelletáltuk a sejt törmelékeket (10000 g, 20 perc, 4°C, Eppendorf 5415D). A továbbiakban a rekombináns szubsztrátot tartalmazó sejt törmelékektől mentes felülúszót (sejtlizátum) használtuk, szükség esetén a lizátumot 4°C-on tároltuk.

5.3.5. Fehérje tisztítás Ni-NTA-alapú mágneses gyöngyök segítségével

A rekombináns szubsztrátok immobilizálásához a sejtlizátumot (legalább 500 µl térfogatban) 100-200 µl 20 v/v%-os - lízis pufferrel ekvibrált - Ni-NTA mágneses agaróz gyöngyhöz (Cube Biotech) adtuk, majd a gyöngy szuszpenziót 20-30 percig szobahőmérsékleten forgattuk. Az inkubálást követően a gyöngyökről DynamagTM-2

mágneses szeparátor (Thermo Fischer Scientific, Invitrogen) felhasználásával eltávolítottuk a sejtlyázátumot. Az aspecifikusan vagy gyengén kötődő fehérjék jelentős részét ismétlődő mosási lépésekben távolítottuk el. Az első mosó puffer 1%-os Tween-20 (pH 7,0) oldatot tartalmazott, a második pedig a lízis puffer módosított változatát (20 mM Tris HCl, 100 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 7,8). A mosási ciklusokat 1-1 ml pufferrel végeztük. A gyöngyökhöz kötődő fehérjék eluálását 300-400 µl 100 mM EDTA-t tartalmazó oldattal végeztük 900 rpm-en rázatva 5 percig. Az eluált fehérjeoldat töményítését és a puffer cseréjét 10K-s Amicon ultraszűrő csövek felhasználásával (Merck-Millipore) végeztük, a puffert 7 centrifugálási cikluson keresztül desztillált vízre cseréltük. A fehérje koncentráció meghatározását NanoDrop 2000 készülék segítségével végeztük, az adott fehérjékre jellemző molekulaméret és extinkciós koefficiens adatok alapján (**2. táblázat**). A molekulatömegeket és az extinkciós koefficienseket az ExPASy web szerver ProtParam moduljával határoztuk meg (**Gasteiger és mtsai, 2003**), a fehérje szubsztrátok szekvenciái alapján. A minták tisztaságát SDS-PAGE segítségével ellenőriztük.

2. táblázat. A rekombináns fluoreszcens szubsztrátok szekvencia alapján számított molekulatömegei (MW), extinkciós koefficiensei és izoelektromos pontjai (pI).

Plazmid	Hasítóhely neve	Molekulatömeg (Da)	Extinkciós koefficiens	Izoelektromos pont
HIS ₆ -MBP-(GGGS) ₄ -mApple	HIV-1 NC_17N	74992,93	103835	6,33
	HIV-1 NC_N17F	75026,01	103835	6,24
	HIV-1 NC_N17L	74991,99	103835	6,33
	HIV-1 NC_N17T	74979,93	103835	6,33
	HIV-1 NC_K14I-N17G	74920,87	103835	6,33
	HIV-1 NC_I14_inz_N17G	75049,04	103835	6,33
HIS ₆ -MBP-mEYFP	SARS-CoV-2 nsp4	72513,24	92710	5,89
	CTBP1/2 (151-164)	72875,53	92710	5,77
	HIV-1 MA/CA_vad-9	72235,86	94325	5,76
	HIV-1 MA/CA_mut-9 (P2L)	72234,91	94325	5,76
HIS ₆ -MBP-mApple	HIV-1 MA/CA_vad-24	73793,65	105200	5,91
	HIV-1 MA/CA_mut-24	73496,31	105200	5,94

5.4. Rekombináns fehérje szubsztrát-alapú vizsgálatok

5.4.1. Rekombináns szubsztrátok oldatban történő hasítása

5.4.1.1. Szubsztrátok hasítása HIV-1 proteázzal

A reakciókban használt HIV-1 PR végkoncentrációja 250 nM volt, amivel 0,1 mg/ml végkoncentrációjú His₆-MBP-(GGGS)₄-mApple felépítésű nukleokapszid fehérje variánsokat hasítottunk (**1. táblázat**). A hasítási reakciókat 20 µl végtérfogatban végeztük HIV-1 reakciópufferben (150 mM NaCl, 100 mM nátrium-acetát, pH 5,5). A puffer ZnCl₂-ot (1,6 mM) vagy ditiotreitolt (DTT) (10 mM) és EDTA-t (10 mM) tartalmazott. A hasítási közegeket 16 órán át inkubáltuk 37°C-on, majd natív körülmények közt történt a mintaelőkészítés (a mintákhoz SDS-t nem tartalmazó mintapuffert adtunk, és nem denaturáltuk a fehérjéket 95°C-on). A mintákat 14%-os poliakrilamid gélen analizáltuk, 100 V feszültség alkalmazása mellett. A fehérjék gélben történő renaturálása során a denaturáló elektroforézist követően a gél ~500 ml desztillált vízbe helyeztük 30 percre és ezt követően újból megismételtük a mosást. A részlegesen renaturálódott fehérjéket UV fény alatt, illetve kék átvilágító tálca alatt detektáltuk.

5.4.1.2. Szubsztrátok hasítása SARS-CoV-2 fő proteázzal

A hasítási reakcióhoz a SARS-CoV-2 Mpro-t 2 µM végkoncentrációban alkalmaztuk. A proteáz tisztítását Golda Mária végezte. A SARS-CoV-2 Mpro vizsgálatához különböző szubsztrátokat használtunk, így i) a SARS-CoV-2 nsp4 hasítóhelyét reprezentáló His₆-MBP-TSAVLQ*SGFRKM-mEYFP szubsztrátot, ii) a rekombináns humán C-terminális kötő fehérjét (CTBP1) (ab93729, Abcam), továbbá iii) a SARS-CoV-2 Mpro-nak a CTBP1 fehérjében jósoltsági szekvenciáját tartalmazó rekombináns szubsztrátot (His₆-MBP-REGTRVQ*SVEQIRE-mEYFP). A szubsztrátok végkoncentrációja a reakcióban 1,5 µM volt. Reakciópufferként 20 mM Tris, 100 mM NaCl (pH 7,8) oldatot használtunk. A hasítási reakciókat 40 µl végtérfogatban végeztük. A reakcióközegeket 37°C-on 1 órán át inkubáltuk, ezt követően a reakcióközegeket 20 µl-ként kettéosztottuk. A minták egyik felét denaturáló körülmények közt kezeltük, ahol a reakciókat 6X mintapuffer (300 mM Tris, 20 v/v% glicerin, 12% SDS, 0,1%, 100 mM β-merkaptotanol, 0,05% brómfenolkék, pH 6,8) hozzáadásával állítottuk le, majd a mintákat 95°C-on 10 percig inkubáltuk. A minták analízise 14%-os SDS-PAGE segítségével történt 100 V feszültség mellett. A minták másik felét molekulatömeg meghatározás céljából használtuk fel mátrix-asszisztált lézer deszorpció/ionizációs repülési idő tömegspektrometriás (MALDI-TOF-MS) mérések során.

5.4.2. Enzimkinetikai paraméterek meghatározása mágneses gyöngy-alapú esszével

5.4.2.1. A HIV-1 proteáz vizsgálata

Az enzimkinetikai mérésekhez His₆-MBP-mApple szubsztrátokat alkalmaztunk, melyekben a beépített 24-tagú hasítóhely a HIV-1 MA/CA vad típusú (vad-24, DTGHSNQVSQNY*PIVQNIQGQMVH) vagy módosított (mut-24, GVGGPGHVSQNY*PIVQSQVTNSAT) szekvenciáját reprezentálta. Ezen szubsztrátok előállítása és felhasználásuk enzimkinetikai mérésekben Dr. Bozóki Beáta munkája, a szubsztrátok előállítása a korábban leírt módszerek alapján történt (**Bozóki és mtsai, 2018; Bozóki és mtsai, 2019**).

5.4.2.2. A SARS-CoV-2 fő proteáz vizsgálata

A mágneses gyöngyökön alapuló vizsgálatokat a korábban (**Bozóki és mtsai, 2018; Bozóki és mtsai, 2019**) leírtak alapján végeztük el, a protokollok kisebb módosításával. A hasítási reakciókat reakciópufferben (20 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7,8) végeztük, a mintákat 37°C-on 10 percig inkubáltuk. A reakcióközegek végtérfogata 70 µl volt, a közegek 68 µl puffert és 2 µl enzimet tartalmaztak. A His₆-MBP-TSAVLQ*SGFRKM-mEYFP és His₆-MBP-REGTRVQ*SVEQIRE-mEYFP szubsztrátokkal végzett mérésekhez az enzimet 0,074 µM, illetve 0,74 µM végkoncentrációban alkalmaztuk. Szelektív, szoros kötődésű inhibitorok hiányában az aktív enzim koncentrációjának meghatározása nem volt lehetséges, ezért a SARS-CoV-2 Mpro aktivitását 100%-osnak tekintettük. A fluorimetriás méréseket Biotek Synergy H1 készülékkel végeztük, 510 nm-es gerjesztési és 540 nm-es emissziós hullámhosszokon.

5.4.3. Mágneses gyöngyök regenerálása

A Ni-NTA mágneses gyöngyöket kísérleteink során többször alkalmaztuk; a gyöngyöket minden egyes használat előtt regeneráltuk. A gyöngyöket minden lépésben legalább 10 gyöngytérfogat regeneráló pufferrel mostuk. A **3. táblázat** tartalmazza a regenerálási lépések sorrendjét és az alkalmazott pufferek összetételét. A gyöngyöket 4°C-on, etanol-tartalmú pufferben tároltuk.

3. táblázat. A Ni-NTA mágneses gyöngyök regenerálásának lépései.

Lépés	Puffer	Ismétlésszám	Puffer összetétele
1.	Regeneráló 1	5x	0,5 M NaOH, 0,05% Tween-20
2.	Regeneráló 2	2x	0,05% Tween-20
3.	Regeneráló 3	5x	100 mM EDTA, 0,05% Tween-20, pH 8,0
4.	Regeneráló 2	5x	0,05% Tween-20
5.	Regeneráló 4	5x	100 mM NiSO ₄ , 0,05% Tween-20
6.	Regeneráló 2	2x	0,05% Tween-20
7.	Regeneráló 5	5x	30% etanol, 0,5% Tween-20

5.5. Bio-réteg interferometria-alapú vizsgálatok

5.5.1. Ni²⁺-, Cu²⁺-, Zn²⁺-, és Co²⁺-NTA bioszenzorok előkészítése és vizsgálata

A Ni-NTA bioszenzorokat (Forté Bio) hidratáló pufferben (50 mM Tris-HCl, 0,5 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 v/v% glicerin, pH 8) ekvibráltuk 10 percen keresztül. A nikkell ionokat magas koncentrációjú EDTA oldattal (250 mM EDTA, pH 8) távolítottuk el a gyári szenzorokról. Ezt követően 2 cikluson keresztül, 4 üres bioszenzort 4 különböző kétértékű kationt tartalmazó oldatba helyeztünk (10 mM NiSO₄ / 10 mM ZnCl₂ / 10 mM CoCl₂ / 10 mM CuCl₂). A szenzorokat 60 másodpercig inubáltuk a fémion-tartalmú pufferekkel, majd a szenzoron maradt feleslegben lévő fémionokat esszé pufferes mosással távolítottuk el. Az alapvonalat esszé puffer segítségével vettük fel 30 másodpercen keresztül. Az asszociációs fázis 120 másodpercig tartott, 4 µl-es térfogatból, 0,7 µM-os koncentrációban használt His₆-MBP-VSQNY*PIVQ-mEYFP szubsztrátok felkötésével. A disszociációs szakaszt esszé pufferben vizsgáltuk 120 másodpercen keresztül 250 µl-es térfogatban. A bioszenzorok regenerálásához a gyártó utasításainak megfelelően, 0,5 M-os foszforsav oldatot (pH 2,5) használtunk. A 4 µl térfogatban történő analízis esetén (ún. *drop* vagy *csepp* mód) a vizsgálandó mintát a készülék mintatartójára mértük rá, míg a 250 µl térfogatban történő mérés során (ún. *tube* vagy *cső* mód) a bioszenzort a mintát tartalmazó mikrosőbe helyeztük.

Az adatokat a BLItz Pro 1.2 szoftverrel értékeltük ki. Az értékek matematikai illesztéséhez helyi illesztést alkalmaztunk és az 1:1 kötési modellt (Langmuir) használtuk.

5.5.2 Mérések tisztított szubsztrátokkal

Első lépésben felvettük az alapvonalat (30 mp, 250 µl esszé puffer), majd immobilizáltuk a szubsztrátokat a bioszenzorhoz (60 mp, 14 µM-os tisztított szubsztrát oldat) 4 µl térfogatban (*drop* mód). Az immobilizálás után mosási lépések következtek. Az esszé pufferrel eltávolítottuk a többlet szubsztrátot, valamint a nem specifikusan és gyengén kötődő

molekulákat. Az első mosási lépés 60 másodpercig (250 μ l, *drop* mód), míg a második mosási lépés 30 másodpercig (4 μ l, *tube* mód) tartott. Azért alkalmaztuk a második mosási lépést, hogy minimalizáljuk az alapvonal eltolódásból származó aspecifikus jelet. A mérésekhez használt HIV-1 PR-t a proteolízis megkezdése előtt 1:1 arányban hígítottuk az esszé puffer B komponensével, a további hígításokat esszé pufferrel végeztük. Minden egyes enzimatikus mérést 4 μ l térfogatból végeztünk (*drop* mód).

A gátlásvizsgálatok során a gátlószerekben jelen lévő DMSO miatt az esszé puffert 5% DMSO-val egészítettük ki. Méréseink során 9 nM HIV-1 PR_{vad}-t és DMSO-ban oldott atazanavir inhibitor használtunk (2 nM és 2 μ M végkoncentráció). Az atazanavirt a kutatócsoportunk a NIH AIDS Reagent Program (Division of AIDS, NIAID, NIH; Germantown, MD, USA) keretében szerezte be (**Mahdi és mtsai, 2015**). Kontroll kísérleteinkhez 5% DMSO-t tartalmazó esszé pufferben hígított HIV-1 PR_{vad}-t alkalmaztunk. Az enzimet nem tartalmazó „vak” mérések 5%-os DMSO-t tartalmazó esszé puffert tartalmaztak. A tripszinnel végzett mérésekhez szükséges humán kationos tripszint Dr. Szabó András bocsájtotta rendelkezésünkre, melyet a korábban leírt módszerek alapján állítottak elő és tisztítottak (**Sahin-Tóth, 2000; Szabó és mtsai, 2011; Szabó és mtsai, 2014**).

A méréseket BLItz készüléken (Pall Forté Bio, Fremont, CA, USA) végeztük szobahőmérsékleten (25°C-on). Az elsődleges kísérleti adatokat a BLItzPro 1.2. szoftverből exportáltuk és tovább analizáltuk Microsoft Excel felhasználásával.

5.5.3. Mérések sejtlizátumból

A pDest-His₆-MBP-VSQNY*PIVQ-mEYFP plazmiddal transzformált (így a rekombináns fehérjét expresszáló) és az „üres” (nem-transzformált) BL21(DE3) sejteket a korábbiakban leírt módon tártuk fel, majd a centrifugálási lépésből visszamaradó felülúszót használtuk a mérések kivitelezéséhez és az SDS-PAGE analízisekhez.

A BLI mérések alapvonalát lízis pufferben (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5) vettük fel (20 mp). Ezt követően kikötöttük a szubsztrátot a sejtlizátumból (30 mp). A bioszenzort három egymást követő mosási lépéssel tisztítottuk lízis pufferrel (30 mp), esszé pufferrel (30 mp, 250 μ l, *tube* mód), valamint újból esszé pufferrel (30 mp, 4 μ l, *drop* mód). A proteolízis szakasza megegyezik a tisztított szubsztráttal mért reakciók körülményeivel.

5.6. Mintaelőkészítés, PAGE analízis és denzitometria

Az oldatban hasított rekombináns fehérjék elektroforézisét megelőzően a mintákhoz 6X-os töménységű mintafelvívő puffert adtunk (300 mM Tris, 20 v/v% glicerin, 12% SDS, 0,1%, 100 mM β -merkaptoetanol, 0,05% brómfenolkék, pH 6,8), majd a mintákat 95°C-on 10 percig inkubáltuk. Az előbbieken leírt denaturáló körülmények alkalmazásával ellentétben a “natív” PAGE során a mintákat eltérő módon készítettük elő, nem főztük el magas hőmérsékleten (95°C), és a mintafelvívő puffer sem tartalmazott denaturáló és redukáló szereket. Az elválasztást SDS futtató pufferben végeztük (0,025 M Tris, 0,192 M glicin, 0,1% SDS, pH 8,5) 14%-os SDS-PAGE segítségével (120 V, ~ 90 perc). A denaturáló SDS-PAGE kísérletek után a fluoreszcens fehérjéket részlegesen renaturáltuk 2 lépéses ioncserélt vizes mosással. A fehérjéket Coomassie R-250-el történő festéssel tettük láthatóvá, valamint UV fényel és kék átvilágító tálca alatt. A natív PAGE után a gélt 30 percig desztillált vízzel mostuk, majd a fehérjéket kékfényes átvilágítással detektáltuk Cleaver safeVIEW (Cleaver Scientific Ltd, Warwickshire, UK) géldokumentációs rendszer segítségével.

A denzitometráláshoz a GelAnalyzer 19.1 nevű programot használtuk (www.gelanalyzer.com; Ifj. Lázár István, és Lázár István).

6. EREDMÉNYEK

6.1. A HIV-1 proteáz specificitásának vizsgálata nukleokapszid hasítóhelyet reprezentáló szubsztrátokkal

6.1.1. Relatív hasítási hatékonyság megállapítása

Kutatócsoportunk korábban vizsgálta a HIV-1 proteáz S1' kötőhely aminosav preferenciáit olyan dekapeptid szubsztrátokkal (KIVKCF**NCGK*), amelyek különböző mutációkat tartalmaztak a P1' pozícióban. A nukleokapszid proximális cink-ujj hasítóhely vizsgálata során meghatároztuk az adott hasítóhelyet tartalmazó peptidek HIV-1 PR általi hasítás kinetikai paramétereit (**4. táblázat**).

Munkánk során a proximális cink-ujj motívumot reprezentáló szekvencia processzálását vizsgáltuk rekombináns fehérje szubsztrátok alkalmazásával is, melynek során arra kerestük a választ, hogy az általunk kidolgozott fehérje szubsztrát-alapú rendszer alkalmazható-e a fehérje szerkezeti motívumok (jelen esetben cink-ujj) konformációs tulajdonságainak vizsgálatára, továbbá, hogy a rekombináns fehérjék alkalmazásával meghatározhatóak-e a hasítási preferenciák.

A vizsgálatokhoz olyan His₆-MBP-(GGGS)₄-mApple szubsztrátokat hoztunk létre, amelyek a HIV-1 NC proximális cink-ujj szekvenciáját tartalmazták. Az általunk vizsgált felismerési szekvenciák a teljes hosszúságú proximális cink-ujj motívumot reprezentálták. Ez a proteolitikus hasítás vizsgálata mellett a szerkezeti motívum konformációs állapotainak tanulmányozására is lehetőséget nyújtott, melyre az oligopeptid-alapú vizsgálatok esetében korábban nem volt lehetőség.

A vad típusú szekvencia (¹¹KIVKCCF**NCGKEGHTARNCRAPR*³²) mellett az N17T, N17L, N17F, I14_inz-N17G és K14I-N17G mutánsokat is vizsgáltuk. Azért választottuk ezeket a mutánsokat, mert a vad típusú szubsztráthoz képest ezek esetében mértek a vad típusú szubsztráthoz hasonló (N17T) vagy annál magasabb (N17F, N17L, K14I-N17G és I14_inz-N17G) katalitikus hatékonyságot (**4. táblázat**). Utóbbi két esetben az oligopeptid szubsztrátokon mért vizsgálatokban a hasítási pozíció eltolódását tapasztalták.

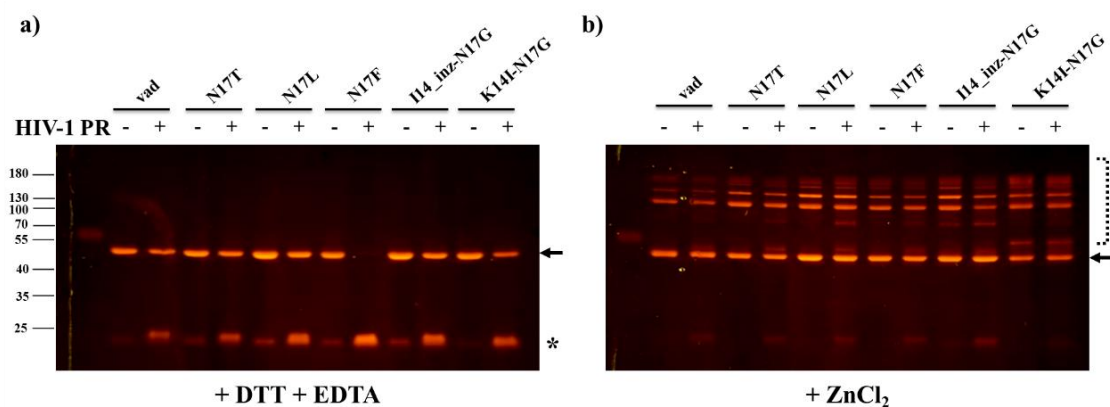
4. táblázat. A HIV-1 NC proximális hasítóhelyének "revertáns" mutánsait képviselő oligopeptidek proteolitikus hasítását jellemző kinetikai paraméterek. A HPLC-alapú méréseket Dr. Tözsér József végezte. ¹A kutatócsoport korábban publikált eredményei (Tözsér és mtsai, 2004; Tözsér és mtsai, 2006). ²A szubsztrátkoncentráció látszólagos K_M érték fölé emelése esetén az aktivitás csökkenését tapasztaltuk. n.d.: nem meghatározott érték.

	Név	Szekvencia	Hasítási pozíció	K_M (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($mM^{-1} s^{-1}$)
1.	vad típus	KIVKCFNCGK	CF*NC	0,43 ¹	0,017 ¹	0,040 ¹
2.	N17F	KIVKCFFCGK	CF*FC	0,02 ¹	0,900 ¹	59,6 ¹
3.	N17L	KIVKCFLCGK	CF*LC	0,17 ¹	0,196 ¹	1,153 ¹
4.	N17V	KIVKCFVCGK	CF*VC	0,45	0,284	0,632
5.	N17A	KIVKCFACGK	CF*AC	0,32 ¹	0,064 ¹	0,200 ¹
6.	N17C	KIVKCFCCGK	CF*CC	1,52	0,247	0,162 ¹
7.	N17T	KIVKCFTCGK	CF*TC	0,31	0,017	0,054
8.	N17Q	KIVKCFQCGK	CF*QC	0,67	0,035	0,052
9.	N17S	KIVKCFSCGK	CF*SC	0,63	0,004	0,006 ¹
10.	N17R	KIVKCFRCGK	CF*RC	1,05	0,020	0,019 ¹
11.	N17K	KIVKCFKCGK	CF*KC	0,86 ¹	0,005 ¹	0,006 ¹
12.	N17E	KIVKCFECGK	CF*EC	1,21	0,013	0,011
13.	N17D	KIVKCFDCGK	nem hasadt	-	-	-
14.	N17G	KIVKCFGCGK	CF*GC	1,34 ¹	0,002 ¹	0,001 ¹
15.	K14T-N17G	KIVTCFGCGK	n.d.	n.d.	<0,010	n.d.
16.	K14I-N17G	RKIVICFGCGKR	IC*FG	0,035	0,034	0,97 ²
17.	I14_inz-N17G	KIVKICFGCGKR	IC*FG	0,070	0,025	0,35
18.	N17G-G19I	RKIVKCFGCIKR	n.d.	n.d.	<0,010	n.d.
19.	K14I-N17G-G19I	RKIVICFGCIKR	IC*FG	<0,010	0,015	n.d.
20.	K14L-N17G	RKIVLCFGCGKR	VL*CF/LC*FG	n.d.	n.d.	n.d.

Annak vizsgálatára, hogy a cink milyen hatással van a rekombináns fluoreszcens fehérjék hasíthatóságára, a hasítási reakciókat DTT és EDTA jelenlétében, valamint $ZnCl_2$ -tartalmú pufferben is elvégeztük. Az EDTA-t kelátorként használtuk, hogy a cink-ujjak fémiontól mentes állapotában biztosítsuk a nyitott konformációjú állapot kialakulását, míg a DTT-t a cisztein oldalláncok redukciója és az intra- és intermonomer diszulfidkötések

kialakulásának megakadályozása érdekében adtuk a rendszerhez. Ezzel szemben a cinket tartalmazó pufferrel biztosítottuk a cink-ujj motívumok kialakulásának lehetőségét, mely „zárt” konformáció várhatóan gátolja az enzim hasítóhelyhez való hozzáférését és így a szubsztrát hasítását.

A szubsztrátok HIV-1 PR_{vad} általi proteolízise csak a DTT-t és EDTA-t tartalmazó pufferben volt megfigyelhető (**16a. ábra**). Ez arra utal, hogy a hasítóhelyek hozzáférhetőek a „nyitott” konformációjú cink-ujjakban, mert a cink-ionok EDTA-val történő kelációja és a cisztein oldalláncok DTT-vel történő redukciója biztosítja a cink-ujjak „nyitott” konformációját. Ezzel ellentétben a szubsztrátok cink jelenlétében ellenálltak a proteolízisnek, ami arra utalt, hogy a cink jelenléte biztosította a szerkezeti motívum „zárt” konformációjának kialakulását. Ez a konformációs állapot megakadályozta a proteáz hozzáférését a proximális NC hasítóhely szekvenciához, így megakadályozva a proteolízist (**16b. ábra**). Eredményeink összhangban vannak Wondrak és munkatársai eredményeivel, akik korábban arról számoltak be, hogy a vad típusú NC-1 hasítóhelyet tartalmazó NC fehérje nem processzálódik cink jelenlétében (**Wondrak és mtsai, 1994**).

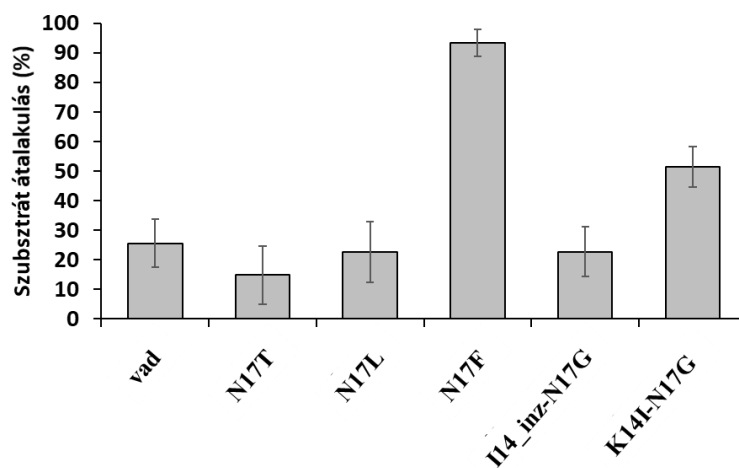


16. ábra. A rekombináns fehérje szubsztrátok HIV-1 PR általi hasítása. A hasítási reakciókat HIV-1 PR_{vad} enzimmel végeztük DTT-vel és EDTA-val (**a**), illetve ZnCl₂-dal (**b**) kiegészített pufferekben. A rekombináns szubsztrátok hasítását követően az intakt szubsztrátok és a hasítási termékek elválasztását nem denaturáló PAGE segítségével végeztük el. A fehérjesávokat kék átvilágító tálcán detektáltuk. Az intakt szubsztrátok sávjait nyilakkal, míg a C-terminális mApple fluoreszcens fehérjét tartalmazó hasítási termékek sávjait csillaggal jelöltük. A szaggatott vonallal jelölt rész a feltételezett oligomereket jelöli, a szubsztráthoz képest nagyobb molekulaméretnél (**b**).

A HIV-1 PR_{vad} ZnCl₂ jelenlétében nem processzálta a szubsztrátokat, viszont a hasítási reakciókban és a szubsztrát kontroll mintákban olyan sávok jelentek meg, amelyek a DTT-t és EDTA-t tartalmazó mintákban nem voltak megfigyelhetők (**16b. ábra**). Feltételezhetően ezek a sávok intermolekuláris kölcsönhatások révén kialakuló oligomereknek felelnek meg, amelyek natív (nem denaturáló) körülmények között alakulnak ki. Ezzel ellentétben a DTT és EDTA tartalmú pufferben az ilyen intermolekuláris diszulfid hidak kialakulása gátolt.

Az elektroforézist követően a sávok intenzitását denzitometriával határoztuk meg a DTT és EDTA jelenlétében végzett reakciók esetében. Eredményeink alapján a vizsgált mutációk egyike sem akadályozta a cink-ujj szerkezeti motívum kialakulását és a proteolitikus hasítást.

Azokban az esetekben (a később bemutatott kísérletes eredmények esetében is), ahol alacsony mintaszámmal dolgoztunk (n=2), a jobb összehasonlíthatóság érdekében az eredmények ábrázolásakor a párhuzamos mérésekben kapott értékek átlagát és az ebből számolt szórás értékét tüntettük fel. A szórások kiszámítására alkalmas egyenletek alkalmazhatóak duplikátumok esetén is és az így számolt szórás értékek jól reprezentálják a két mért érték közti különbséget, azonban a valós szórások és a statisztikai különbségek pontos meghatározásához nagyobb mintaszám szükséges, ezért statisztikai analízist csak n>2 mintaszám esetén végeztünk.



17. ábra. A rekombináns szubsztrátok relatív hasítási hatékonyságának összehasonlítása. A szubsztrátkonverziót a nem hasított szubsztrátok és a fluoreszcens C-terminális termékek sávintenzitása alapján határoztuk meg. A grafikonon két párhuzamos mérésből származó értékek átlagát ábrázoltuk.

A legmagasabb szubsztrátkonverziót az N17F mutáns esetében kaptuk (**17. ábra**). Ez az eredmény összhangban van azzal, hogy ezen mutáns esetében volt a legmagasabb a katalitikus állandó (**4. táblázat**). Az N17F mutáns kivételével a többi mutáns esetében hasonló szubsztrátkonverziókat figyeltünk meg, ami valószínűleg a gél-alapú analízis alacsonyabb érzékenységének köszönhető. Továbbá fontos megjegyezni, hogy a fluoreszcens fehérje-alapú vizsgálatok (**16. ábra**) és a katalitikus állandó meghatározások (**4. táblázat**) során eltérő szubsztrátokat és reakciókörülményeket alkalmaztunk. A kinetikai paraméterek meghatározása a fluoreszcens fehérje-alapú vizsgálattal nem volt lehetséges. A hasítási reakció számára optimális körülmények nem kompatibilisek a Ni-NTA-alapú mérési módszerrel, mivel a DTT és az EDTA negatív hatással van a szubsztrát immobilizációjára, a szubsztrát disszociációját okozzák. Ezen szerek alkalmazása viszont a „zárt” konformációjú motívum kialakulásának kedvez, ami megakadályozza a proteolízist.

A szakirodalomból ismert, hogy cink ion jelenlétében csökken a HIV-1 PR aktivitása. Zhang és munkatársai megállapították, hogy a gátló hatás ~20 mM Zn^{2+} jelenlétében a legjelentősebb és a gátlási konstans (K_i) erősen pH-függő, 7-es vagy attól magasabb pH-n tapasztalták a legnagyobb mértékű gátlást (**Zhang és mtsai, 1991**). A gátlás mechanizmusát illetően a cink nem befolyásolja a HIV-1 proteáz dimerizációs képességét, hanem feltételezhetően az aktív centrumhoz vagy annak közelében kötődik az aminosavak karboxil csoportjához. Fontos megjegyezni, hogy méréseinket alacsonyabb pH értéken végeztük (pH 5,5) és megközelítőleg 20-szor kisebb koncentrációjú cink ion jelenlétében, mint ami a HIV-1 proteáz esetében jelentős mértékű gátlást okozott, ezért feltehetőleg az általunk tapasztalt változásokat nem a cink ionnak a proteázra gyakorolt hatása okozta, bár a cink hatását az enzim aktivitására célzottan nem vizsgáltuk.

Eredményeink alapján az alkalmazott fehérje szubsztrát-alapú rendszer alkalmasnak bizonyult a konformációs állapotok vizsgálatára, sikeresen kimutattuk, hogy a cink-ujj szerkezeti motívum kialakulása megakadályozza a NC hasítását. Igazoltuk, hogy a vad típusú szekvenciához képest jelentősen nagyobb a hasítási hatékonyság az N17F mutáns esetében, ami összhangban van az oligopeptid szubsztrátokon megfigyelt különbségekkel.

6.2. A SARS-CoV-2 fő proteáz vizsgálata

6.2.1. A SARS-CoV-2 fő proteáz hasítóhelyek *in silico* azonosítása

Az *in vitro* kísérletes munkák megkezdése előtt több különböző *in silico* módszert is felhasználtunk annak érdekében, hogy a SARS-CoV-2 Mpro lehetséges humán fehérje szubsztrátjait azonosítsuk. Az első esetben elvégeztük a gazdaszervezet és a patogén rövid homológ fehérje szekvenciáinak (*short stretches of homologous host-pathogen protein sequences*, SSHPS) elemzését BLAST analízis segítségével. Ennek során a humán fehérjékben olyan rövid szekvenciákat kerestünk, melyek azonosak vagy nagymértékben hasonlóak a SARS-CoV-2 Mpro ismert autoproteolitikus hasítóhely szekvenciáihoz. A második lépésben az így azonosított humán fehérjék szekvenciáit a NetCorona 1.0 webszerver segítségével elemeztük (Kiemer és mtsai, 2004), a feltételezett hasítóhelyeken történő hasítás valószínűségének becslésére. Ezen felül az előzetes elemzések során kiválasztott lehetséges gazdasajt szubsztrátok szerkezeteit is elemeztük annak érdekében, hogy meghatározzuk a potenciális hasítóhelyek hozzáférhetőségét a szerkezetekben. Az *in silico* analíziseket Dr. Mótyán János András és Kunkli Balázs végezte.

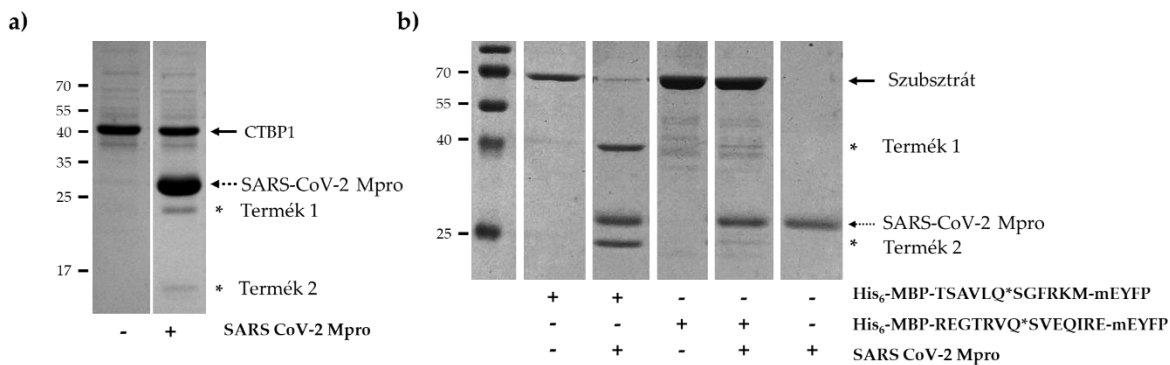
Több potenciális proteolitikus célpont fehérje esetében is vizsgáltuk a hasíthatóságot *in vitro*, azonban részletesebb elemzést csak a humán C-terminális kötő fehérje 1 (CTBP1) esetében végeztünk. Ez a fehérje az *in silico* becslések alapján tartalmazta a SARS-CoV-2 Mpro lehetséges hasítóhelyét ($^{151}\text{REGTRVQ}^*\text{SVEQIRE}^{164}$), melyet az enzim a becslés alapján nagy hatékonysággal képes hasítani. A szekvenciák elemzése alapján megállapítottuk, hogy ez a hasítási szekvencia teljes mértékben azonos a humán CTBP1 és CTBP2 fehérje izoformákban. A CTBP1 egy transzkripciós ko-represszor fehérje, amely olyan gének expressziójának szabályozásában vesz részt, amelyek a fejlődést, az onkogenézist és az apoptózist irányítják (Stankiewicz és mtsai, 2014). Korábban úgy vélték, hogy a CTBP1 és -2 befolyásolja a vírusreplikációt és az adenovirus E1A fokozott replikációját figyelték meg CTBP génkiütés esetén (Subramanian és mtsai, 2013). Vizsgálatainkhoz a teljes hosszúságú rekombináns CTBP1 fehérjét használtunk, továbbá létrehoztunk egy olyan His₆-MBP-mEYFP rekombináns szubsztrátot is, amely a jósolt hasítóhely szekvenciát tartalmazta.

6.2.2. Rekombináns CTBP1 fehérje hasítása, valamint a CTBP1 fehérje hasítóhelyét tartalmazó rekombináns szubsztrátok előállítása és hasítása

Az *in silico* analízisek alapján azonosítottuk a humán CTBP1 fehérjét, mint a SARS-CoV-2 Mpro lehetséges gazdasejt szubsztrátját, a feltételezett hasítást először a rekombináns CTBP1 fehérje *in vitro* emésztésével kívántuk igazolni. A rekombináns fehérje oldatban történő hasítása során megjelenő proteolitikus fragmentek arra utaltak, hogy a SARS-CoV-2 Mpro képes a CTBP1 fehérje hasítására, bár a konverzió relatíve alacsony mértékű volt (**18a. ábra**).

A rekombináns CTBP1 fehérje processzálását követően megterveztünk és létrehoztunk olyan His₆-MBP-mEYFP rekombináns fúziós fehérjéket, amelyeket a SARS-CoV-2 Mpro szubsztrátjaként alkalmaztunk. A His₆-MBP-TSAVLQ*SGFRKM-mEYFP szubsztrát a SARS-CoV-2 poliprotein természetes nsp4 hasítóhelyét tartalmazta, amely megfelel a proteáz N-terminálisán található nsp4 és nsp5 fehérjék közötti természetes autoproteolitikus hasítóhelynek, míg a His₆-MBP-REGTRVQ*SVEQIRE-mEYFP fehérje a CTBP1 fehérjében jóslott hasítási hely szekvenciáját tartalmazta (¹⁵³GTRVQ*SVEQI¹⁶²). Ezeket a His₆-MBP-mEYFP szubsztrátokat hasítási reakciókban kívántuk felhasználni, a hasítási pozíciók azonosítása és enzimkinetikai paraméterek meghatározása érdekében.

Az oldatban történő hasítást követő elektroforézis-alapú vizsgálatok eredménye alapján elmondható, hogy a SARS-CoV-2 Mpro jelentős mértékben hasította a His₆-MBP-TSAVLQ*SGFRKM-mEYFP szubsztrátot, míg a His₆-MBP-REGTRVQ*SVEQIRE-mEYFP fehérje esetében jóval alacsonyabb volt a hasítás hatékonysága (**18b. ábra**). Ez ellentétben állt az *in silico* jóslással kapott hasítási valószínűségekkel, ugyanis a CTBP1 hasítóhely esetében magasabb NetCorona pontszámot kaptunk (0,946), mint az nsp4 autoproteolitikus hasítóhely esetében (0,891). Ez a megfigyelés arra utal, hogy a hasítási hatékonyság nem határozható meg nagy pontossággal kizárólag a fehérje szekvenciája alapján, és fontos az *in silico* előrejelzések eredményeinek *in vitro* validálása, ami segítheti a hatékonyabb *in silico* algoritmusok kifejlesztését vagy a meglévők (pl. NetCorona 1.0) megbízhatóságának növelését.



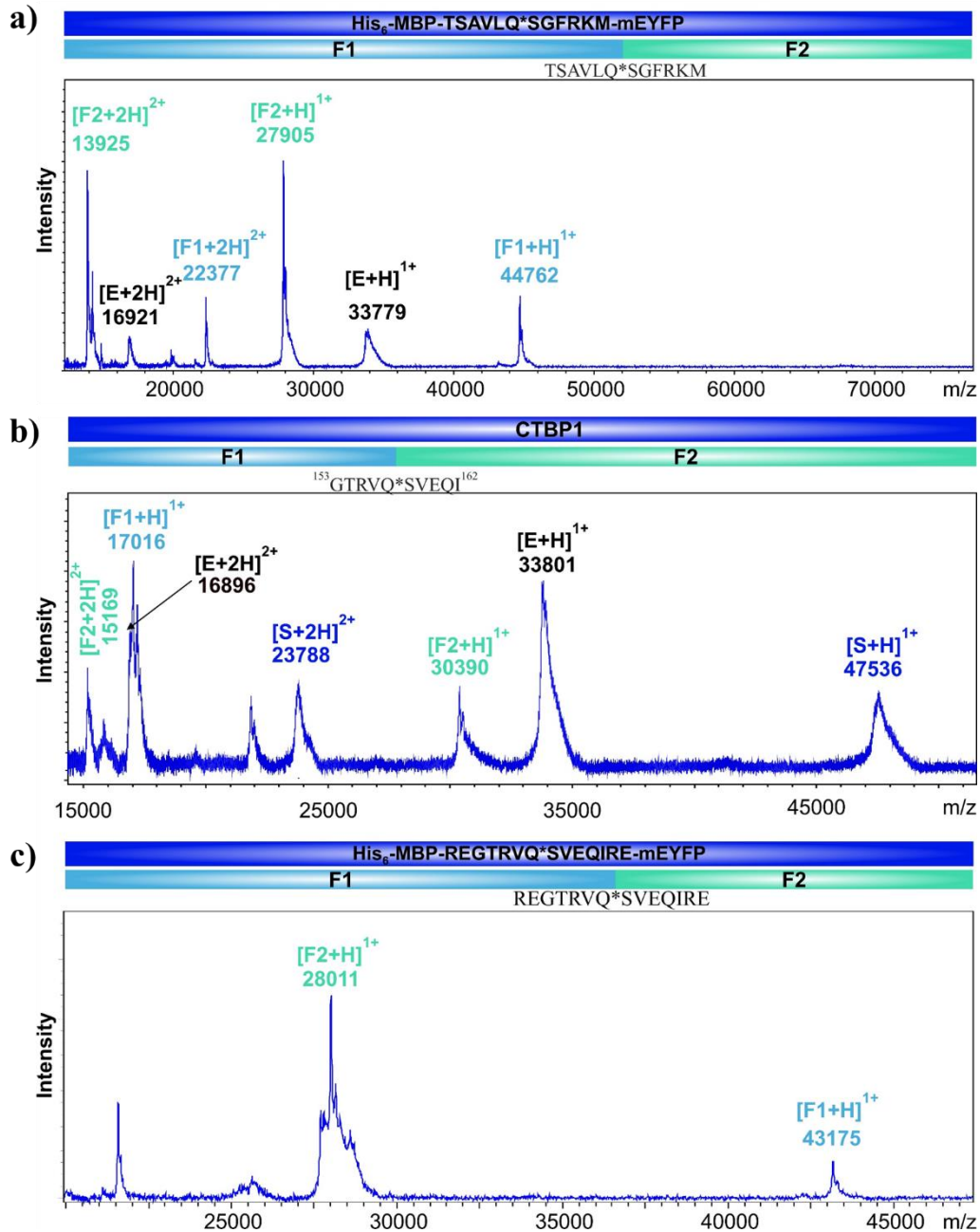
18. ábra. Rekombináns CTBP1 fehérje és fúziós fehérje szubsztrátok hasítása SARS-CoV-2 Mpro enzimmel. (a) A rekombináns CTBP1 fehérje hasítása SARS-CoV-2 Mpro proteázzal. **(b)** A TSAVLQ*SGFRKM (SARS-CoV-2 nsp4) vagy REGTRVQ*SVEQIRE (CTBP1) hasítóhely szekvenciákat tartalmazó His₆-MBP-mEYFP szubsztrátokat SARS CoV-2 Mpro-val emésztettük. SDS-PAGE után a gélt Coomassie festéssel tettük láthatóvá. A gélképeken a hasítatlan intakt szubsztrátot folytonos, míg a SARS-CoV-2 Mpro-t szaggatott vonallal jelöltük. A csillagok a hasítási termékeket jelzik.

6.2.3. A SARS-CoV-2 fő proteáz hasítóhelyek azonosítása

Irodalmi adatok alapján ismert volt a SARS-CoV-2 Mpro nsp4 hasítóhelyen belüli hasítási pozíciója (TSAVLQ*SGFRKM), azonban az általunk azonosított CTBP1 hasítóhelyen belül jóslott hasítási pozíciót csak számítógépes analízis alapján valószínűsítettük. Ezért volt szükség a jóslott pozíció kísérletes megerősítésére.

A vizsgálatokhoz elvégeztük a teljes hosszúságú rekombináns CTBP1 fehérje, valamint a His₆-MBP-TSAVLQ*SGFRKM-mEYFP és His₆-MBP-REGTRVQ*SVEQIRE-mEYFP fehérje szubsztrátok oldatban hasítását egyaránt. Meghatároztuk a hasítatlan szubsztrátok és a hasítási fragmentek molekulatömegeit, a hasítási pozíciókra a kísérletesen meghatározott és a szekvenciák alapján számított molekulatömegek alapján következtettünk. A molekulatömeg meghatározást célzó műszeres analitikai méréseket Dr. Nagy Tibor (Debreceni Egyetem, TTK, Alkalmazott Kémiai Tanszék) végezte.

A reakcióelegyetek mátrix-asszisztált lézer deszorpció/ionizációs repülési idő tömegspektrometriával (MALDI-TOF-MS) elemeztük. A hasítási pozíciókat a hasítási termékek molekulatömegének kiszámításával azonosítottuk. A várakozásoknak megfelelően az nsp4 hasítási hely szekvenciáját (TSAVLQ*SGFRKM) reprezentáló rekombináns His₆-MBP-mEYFP szubsztrát a beépített szekvencián belül a kívánt pozícióban hasadt (**19a. ábra**).



19. ábra. A hasítási pozíciók meghatározása MALDI-TOF-MS segítségével. A hasítási reakciókban (a) a His₆-MBP-TSAVLQ*SGFRKM-mEYFP, (b) a rekombináns CTBP1 és (c) a His₆-MBP-REGTRVQ*SVEQIRE-mEYFP fehérjéket használtuk a SARS-CoV-2 Mpro szubsztrátjaként. A spektrumok felett látható sematikus ábrázolás a teljes hosszúságú fehérjéket (sötétkék), valamint a hasítási termékeket (F1 és F2, világoskék és zöld) mutatja. Az F1 és F2 fragmentek között a hasítóhelyek szekvenciái is láthatóak. A spektrumokon látható molekulatömeg értékek színezése megfelel a szubsztrátok és termékek sematikus ábrázolásához használt színezésének. A SARS-CoV-2 Mpro esetében meghatározott molekulatömeg értékeket (Da) fekete színnel jelöltük.

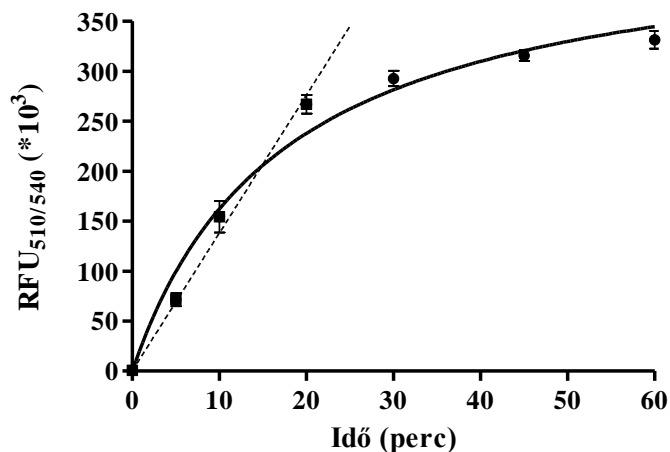
A rekombináns CTBP1 fehérje hasítását követően elemeztük a hasítási fragmentumokat, mely alapján a teljes hosszúságú fehérje az *in silico* módszerekkel jóslott pozícióban hasadt ($^{153}\text{GTRVQ}^*\text{SVEQII}^{62}$) (**19b. ábra**). Az enzim az ugyanezt a hasítóhelyet tartalmazó rekombináns His₆-MBP-mEYFP szubsztrátot is ebben a pozícióban hasította (**19c. ábra**). Eredményeink megerősítették a számítógépes eljárásokkal jóslott hasítóhelyek jelenlétét, és igazolták az alkalmazott számítógépes eljárások alkalmazhatóságát SARS-CoV-2 Mpro hasítóhelyek azonosításában. A fluoreszcens szubsztrátokat a továbbiakban enzimkinetikai paraméterek meghatározására használtuk fel, a szubsztrátpreferencia vizsgálatának érdekében.

6.2.4. Enzimkinetikai mérések

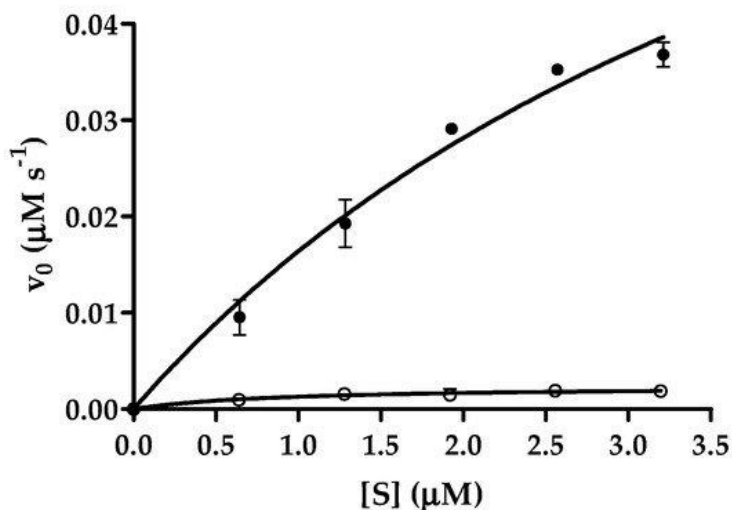
Miután kísérletesen bizonyítottuk, hogy a SARS-CoV-2 Mpro a kívánt pozícióban hasítja a rekombináns szubsztrátokat, hasítási reakciókat végeztünk a His₆-MBP-mEYFP szubsztrátokkal a SARS-CoV-2 és CTBP1 hasítóhelyek hasítási hatékonyságának meghatározására.

A SARS-CoV-2 Mpro aktivitás időfüggését Ni-NTA mágneses gyöngyökhöz kötött His₆-MBP-TSAVLQ*SGFRK-mEYFP szubsztrát alkalmazásával vizsgáltuk. Állandó enzimkoncentráció mellett vizsgáltuk a reakcióidő hatását (0-60 perc időtartamban) a szubsztrátkonverzióra (0-60 perc). Megállapítottuk, hogy az alkalmazott szubsztrát-koncentráció esetén az enzim aktivitása 10 perc után csökken, ezért az enzimaktivitás szubsztrát-koncentráció-függésének vizsgálatához 5 perces inkubációs időt választottunk, ahol a termékképződés sebessége egyenesen arányosan változik az idővel (**20. ábra**).

A mérési körülmények beállítását követően enzimkinetikai méréseket végeztünk a SARS-CoV-2 (TSAVLQ*SGFRKM) és a CTBP1 (REGTRVQ*SVEQIRE) hasítóhelyek iránti preferenciájuk meghatározása érdekében. A kinetikai analízissel kimutattuk, hogy a poliprotein természetes hasítóhelyét tartalmazó His₆-MBP-TSAVLQ*SGFRKM-mEYFP szubsztrát jobb szubsztrátja a SARS-CoV-2 Mpro-nak, mint a CTBP hasítóhelyet tartalmazó szubsztrát (**21. ábra**), utóbbi esetében két nagyságrenddel alacsonyabb k_{cat}/K_M értéket határoztunk meg (**5. táblázat**). Ez összhangban van a gél-alapú vizsgálat eredményeivel (**18b. ábra**), mivel az enzim hatékonyabban processzálta a His₆-MBP-TSAVLQ*SGFRKM-mEYFP szubsztrátot, mint a His₆-MBP-REGTRVQ*SVEQIRE-mEYFP szubsztrátot, viszont ellentétben áll az utóbbi hasítóhely esetében kapott magasabb NetCorona pontszámmal.



20. ábra. A SARS-CoV-2 Mpro enzimaktivitás vizsgálata az idő függvényében. A His₆-MBP-TSAVLQ*SGFRKM-mEYFP szubsztrátnak (0,6 μM) a SARS-CoV-2 Mpro (0,074 μM) általi hasítása esetében a C-terminális hasítási termék felszabadulását fluorimetriás mérésel vizsgáltuk. A relatív fluoreszcencia értékeket (RFU) az inkubációs idő függvényében ábrázoltuk. A grafikonon két párhuzamos mérés eredménye alapján meghatározott átlagértékek szerepelnek. A szaggatott vonal a reakciósebesség linearitását mutatja az első 10 percen a 0-20 időtartamban mért értékekre illesztett regressziós egyenes alapján ($R^2 > 0,98$).



21. ábra. A SARS-CoV-2 Mpro enzim kinetikai analízise rekombináns szubsztrátok felhasználásával. A His₆-MBP-TSAVLQ*SGFRKM-mEYFP szubsztrátra kapott adatokat telített fekete kör, míg a His₆-MBP-REGTRVQ*SVEQIRE-mEYFP szubsztrát adatait üres kör jelzi. A szubsztrátokra meghatározott kinetikai paraméterek az 5. táblázatban található. Az eredmények két mérés átlagértékét mutatják.

5. táblázat. A SARS-CoV-2 Mpro esetében meghatározott kinetikai paraméterek. A méréseket His₆-MBP-TSAVLQ*SGFRKM-mEYFP és His₆-MBP-REGTRVQ*SVEQIRE-mEYFP szubsztrátokkal végeztük. Az adatokat két párhuzamos kísérlet eredményei alapján számoltuk.

Hasítóhely szekvencia	K_M (μM)	kcat (s⁻¹)	kcat/K_M (μM⁻¹s⁻¹)
TSAVLQ*SGFRKM	5,086 ± 2,046	1,349 ± 0,370	0,2652 ± 0,1291
REGTRVQ*SVEQIRE	0,860 ± 0,303	0,0033 ± 0,0004	0,0038 ± 0,0014

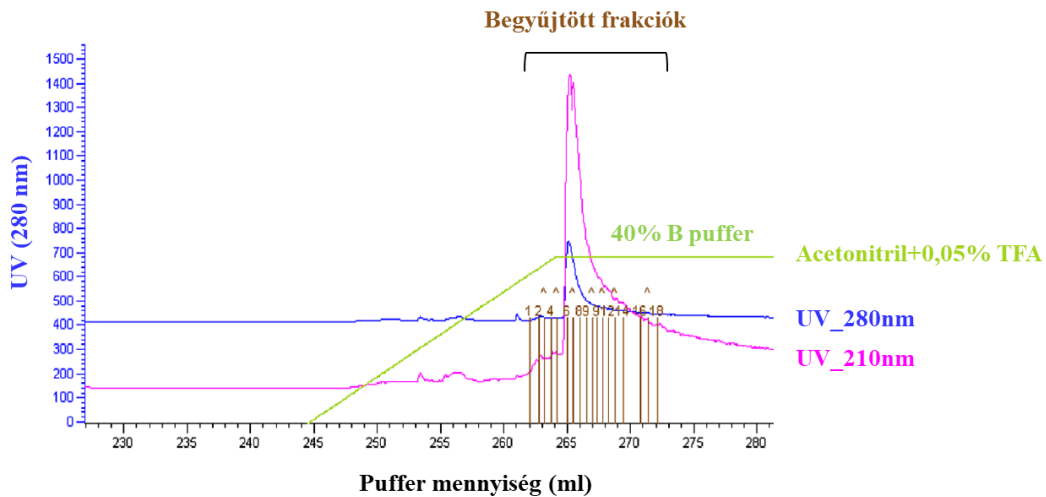
Eredményeink igazolták, hogy az általunk előállított szubsztrátokat fel lehet használni a SARS-CoV-2 Mpro vizsgálatához, beleértve az eddig ismeretlen hasítóhelyek hasíthatóságának vizsgálatát és az ismeretlen hasítási pozíciók azonosítását és kinetikai paraméterek meghatározását is.

6.3. Bioréteg interferometria-alapú mérési eljárás kidolgozása és alkalmazása

6.3.1. Mutáns HIV-1 PR tisztítása

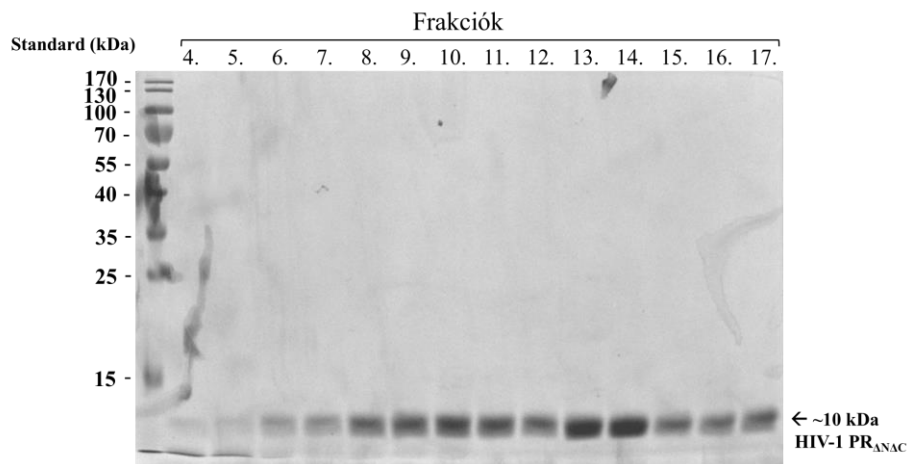
A bioréteg interferometria-alapú mérési eljárás kidolgozásához a HIV-1 proteázt használtunk modell enzimként. A katalitikusan aktív enzim mellett kísérleteinkben egy bizonyítottan inaktív enzimformát alkalmaztunk kontrollként, mely inaktív forma (HIV-1 PR_{ΔNΔC}) az 1-4-es, illetve 96-99-es pozíciókban deléciókat tartalmaz, ezért nem képes funkcionális dimer kialakítására és nem rendelkezik katalitikus aktivitással (**Miklóssy és mtsai, 2008**).

A HIV-1 PR_{ΔNΔC} proteázt BL21(DE3) baktérium sejtekben expresszáltuk. A feltárást szonikálással és lizozimet is tartalmazó pufferben végeztük, majd eltávolítottuk a szennyező fehérjék jelentős részét többlépcsős centrifugálási és mosási lépéseken keresztül. Ezt követően reverz fázisú C18-as oszlop felhasználásával tovább tisztítottuk a mintát (**22. ábra**).



22. ábra. A HIV-1 PR_{ΔNAC} enzimfehérje tisztítása reverz fázisú kromatográfiával. Az enzimet ÄKTAprime készülék segítségével C18-as oszlop használatával tisztítottuk. Az injektált fehérje jelenlétét 280 és 210 nm hullámhosszon követtük (kék és rózsaszín), míg az apoláris eluálószerként használt acetonitril grádienszt zölddel láthatjuk. Minden begyűjtött frakciót függőleges barna oszlop jelez.

A reverz fázisú kromatográfiával történő tisztítás után a begyűjtött frakciók tisztaságát SDS-PAGE segítségével ellenőriztük (**23. ábra**).

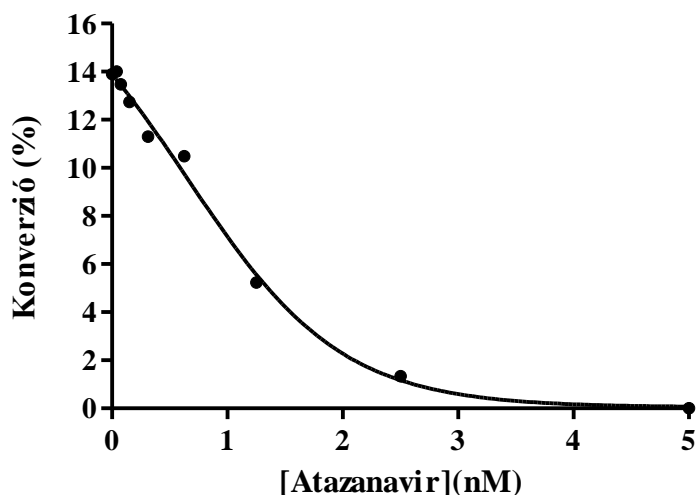


23. ábra. A HIV-1 PR_{ΔNAC} tisztítása során begyűjtött frakciók tisztaságának ellenőrzése. A frakciókat 14%-os poliakrilamid gélen vizsgáltuk, SDS-PAGE analízissel. Az ábrán nyíllal jelöltük a HIV-1 PR_{ΔNAC} fehérjét (~10 kDa). Az ábrán számozással jelöltük a tisztítás során begyűjtött frakciókat.

Az SDS-PAGE analízis alapján a begyűjtött frakciók tisztasága megfelelőnek bizonyult (a denzitometria alapján >95% volt), ezért további tisztítási lépéseket nem alkalmaztunk. A begyűjtött frakciók közül a 13. és 14. frakciókat (**23. ábra**) két lépésben dializáltuk, majd a fehérjekoncentrációt BCA kit és NanoDrop2000 készülék segítségével határoztuk meg.

6.3.2. Aktív centrum titrálás

Az aktív HIV-1 PR_{vad} koncentrációját HPLC-alapú méréssel határoztuk meg HIV-1 MA/CA hasítóhelyet reprezentáló 9-tagú oligopeptid szubsztrát és atazanavir proteáz inhibitor felhasználásával. Az atazanavir egy jól ismert, az amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hatóság (FDA) által antiretrovirális terápiában (HAART) történő alkalmazásra jóváhagyott proteáz inhibitor, mely kompetitív módon képes a HIV-1 PR aktív centrumához kötődni és gátolni az aktivitását (**Wood, 2008**). Az aktív enzim koncentrációjának meghatározásakor (aktív centrum titrálás) a HIV-1 PR_{vad} aktivitását állandó enzim- és szubsztrátkoncentráció alkalmazása és növekvő inhibitor koncentráció mellett határoztuk meg, majd a meghatározott szubsztrátkonverziót az atazanavir koncentráció függvényében ábrázoltuk (**24. ábra**). Az aktív enzim koncentrációt a dózis-hatás görbe kezdeti lineáris szakaszára illesztett egyenes alapján határoztuk meg az x-tengely metszete alapján.



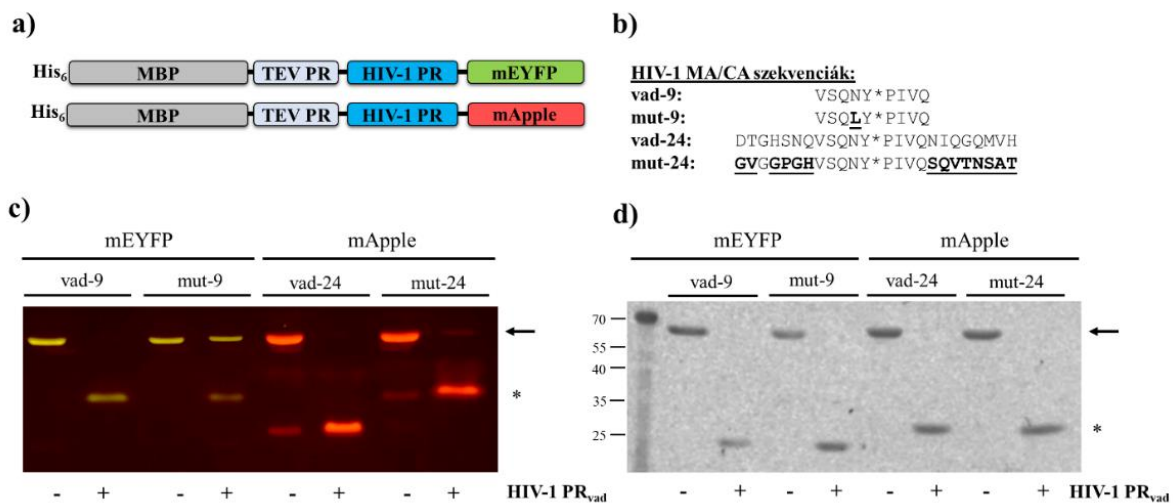
24. ábra. Reprezentatív dózis-hatás görbe a HIV-1 PR_{vad} atazanavir általi gátlásáról.

Az aktív enzim koncentrációjának meghatározása során a HIV-1 MA/CA hasítóhelyét reprezentáló (VSQNY*PIVQ) oligopeptid szubsztrátot használtuk, a kontroll reakciót (inhibitor nélkül) úgy végeztük, hogy a szubsztrát konverziója 20% alatt legyen.

6.3.3. Rekombináns fehérje szubsztrátok előállítása

A His₆-MBP-mEYFP és His₆-MBP-mApple rekombináns fehérjék (25a. ábra) tervezése során olyan szekvenciákat építettünk a szubsztrátba, amely a HIV-1 MA/CA hasítóhely 9- (P5-P4') vagy 24-tagú (P12-P12') szekvenciáját reprezentálja. Mind a 9-tagú, mind pedig a 24-tagú szubsztrátból vad típusú (vad-9 és vad-24) és mutáns (mut-9 és mut-24) szubsztrátokat hoztunk létre. A rövidebb HIV-1 MA/CA hasítóhelyet tartalmazó szekvenciák közül a mutáns szekvencia P2 pozícióban leucint tartalmazott (VSQLY*PIVQ). A kutatócsoport a korábbi munkák során már jellemezte ezt a módosított szubsztrátot (**Boross és mtsai, 1999; Bagossi és mtsai, 1998; Bagossi és mtsai, 2005**), ezért esett a választásunk erre a hasítóhely szekvenciára. A 24-tagú mutáns szekvenciát tartalmazó szubsztrát P5-P4' pozíciókban a HIV-1 MA/CA, míg P12-P6 és P5'-P12' pozíciókban a HIV-1 CA/p2 hasítóhelynek megfelelő aminosavakat tartalmazta (25b. ábra). Ezen szubsztrátok alkalmazásával lehetőségünk nyílt megvizsgálni az irodalmi adatokból ismeretes (**Laco, 2015**) enzimfelszíni ún. szubsztrátkötő árkot (*substrate groove* vagy *S-groove*).

A fluoreszcens fehérjéket BL21 (DE3) sejtekben expresszáltuk és Ni-NTA gyöngy-alapú affinitás kromatográfiával tisztítottuk. Ezt követően oldatban történő emésztéssel ellenőriztük, hogy a tisztított fehérjék felhasználhatóak-e a HIV-1 PR szubsztrátjaként. A reakció során HIV-1 PR_{vad} enzimet használtunk. A hasítási reakciókat, valamint a hasítatlan szubsztrátokat 14%-os SDS poliakrilamid gélen választottuk el, úgy hogy a mintákat nem-denaturáló körülmények között kezeltük. Az eddigi kísérleteinkhez hasonlóan (**Bozóki és mtsai, 2018**) a C-terminális, fluoreszcens címkét tartalmazó fragmenteket, valamint a teljes hosszúságú szubsztrátokat kék átvilágító tálca alatt detektáltuk (25c. ábra). A C-terminális fragmens megjelenése arra utalt, hogy a HIV-1 PR_{vad} enzim elhasította a rekombináns fehérjéket a beépített hasítóhelyen, tehát alkalmazhatóak a további kísérletes munkák elvégzésére. Megjegyzendő, hogy a C-terminális hasítási termék a vad-24 szubsztrát esetén a vártnál alacsonyabb molekulaméretnél jelent meg a gélen, ennek oka valószínűleg a vad-24 és mut-24 szekvenciák közötti töltéskülönbség nem-denaturáló mintaelőkészítés esetén. Abban az esetben, amikor a mintákat denaturáló körülmények között kezeltük és szeparáltuk, nem mutattunk ki méretbeli különbségeket (25d. ábra).



25. ábra. A HIV-1 PR_{vad} szubsztrátjaként alkalmazott, HIV-1 MA/CA hasítóhelyet tartalmazó szubsztrátok. (a) A szubsztrátok sematikus ábrázolása. A szubsztrátok a TEV és a HIV-1 PR hasítóhelyeit tartalmazzák. (b) A szubsztrátokba épített különböző hosszúságú vad típusú és módosított HIV-1 MA/CA hasítóhely szekvenciák. A módosított aminosavakat aláhúzással jelöltük, a csillagok a hasítási pozíciót mutatják. (c) A hasítatlan szubsztrátok és a HIV-1 PR_{vad} általi hasítás következtében keletkező termékek natív PAGE-analízise. A fehérjéket a gélben kék fényel történő átvilágítással vizualizáltuk. (d) A hasítatlan szubsztrátok (~72 kDa) és a C-terminális hasítási termékek (~26 kDa) SDS-PAGE analízise. Az SDS-PAGE analízis után az elválasztott fehérjéket renaturáltuk a gélben, amelyeket UV-fény segítségével tettük láthatóvá. A szubsztrátokat és a fluoreszcens címkét tartalmazó termékeket nyilakkal, illetve csillagokkal jelöltük.

A további kísérletes munkáink során ezen fehérjéket használtuk szubsztrátként a hasítási reakciókban egy új, a proteolitikus aktivitás folyamatos mérésén alapuló mérési módszer kidolgozásához. A hasítási közegek elektroforetikus analízise során azt tapasztaltuk, hogy a vad-9 és vad-24 szubsztrátok esetében a szubsztrátkonverzió 100%-os volt, ezzel szemben a módosított hasítóhelyet tartalmazó szubsztrátok esetében (mut-9 és mut-24) a hasítatlan szubsztrát egyértelműen kimutatható volt (25c. ábra). Ez arra utalt, hogy az eltérő hasítóhely szekvenciát tartalmazó szubsztrátok hasítási hatékonysága különbözik, ezért a későbbiekben leírtak szerint ezeket a szubsztrátokat a szubsztrátspecificitás részletesebb vizsgálatához is felhasználtuk.

6.3.4. A bioréteg interferometria-alapú mérés beállítása

6.3.4.1. A hasítási jel validálása

6.3.4.1.1. Hasítás katalitikusan aktív és inaktív HIV-1 proteázzal

A bioréteg interferometria-alapú proteáz aktivitásmérési módszer kidolgozásának alapját az a feltételezés képezte, hogy a bioszenzor felszínéhez immobilizált és a HIV-1 proteáz hasítóhelyét tartalmazó szubsztrátok érzékenyek a proteolízisre és a hasítás következtében a fragmentek felszabadulása csökkenti a felületen lévő szubsztrátok méretét, így a biomolekuláris réteg vastagságát, ami mérhető. A módszer tesztelésére és fejlesztésére egy már korábban sikeresen alkalmazott HIV-1 PR szubsztrátot használtunk (**Bozóki és mtsai 2017; Bozóki és mtsai 2018**), a His₆-MBP-mEYFP szubsztrátba épített szekvencia a vad típusú HIV-1 MA/CA hasítóhely 9-tagú felismerési szekvenciáját reprezentálta (VSQNY*PIVQ). Modell enzimként a HIV-1 proteázt használtuk. A vizsgálatokhoz a katalitikusan aktív és inaktív enzimeket (HIV-1 PR_{vad} és HIV-1 PR_{ΔNΔC}) egyaránt használtunk annak érdekében, hogy jól elkülöníthetőek legyenek a proteolízis következtében végbemenő változások.

Vizsgálatunk során Ni-NTA-alapú bioszenzorokat alkalmaztunk, mely több szempontból is előnyös választás az esszé szempontjából: i) A Ni-NTA bioszenzorok regenerálása egyszerű, gyors és költséghatékony, ii) Az antitest-alapú szenzorral szemben (anti-His antitest) a Ni-NTA szenzorok használata során nem kell számolni az antitest-réteg enzim(ek) általi nem kívánatos proteolízisével, iii) A Ni-NTA felület alkalmazhatóságát jól jellemeztük a kutatócsoport korábbi kísérletes munkái során (**Bozóki és mtsai, 2018; Bozóki és mtsai, 2019; Mótyán, és mtsai, 2018; Bozóki és mtsai, 2020; Gazda és mtsai, 2020; Golda és mtsai, 2020**).

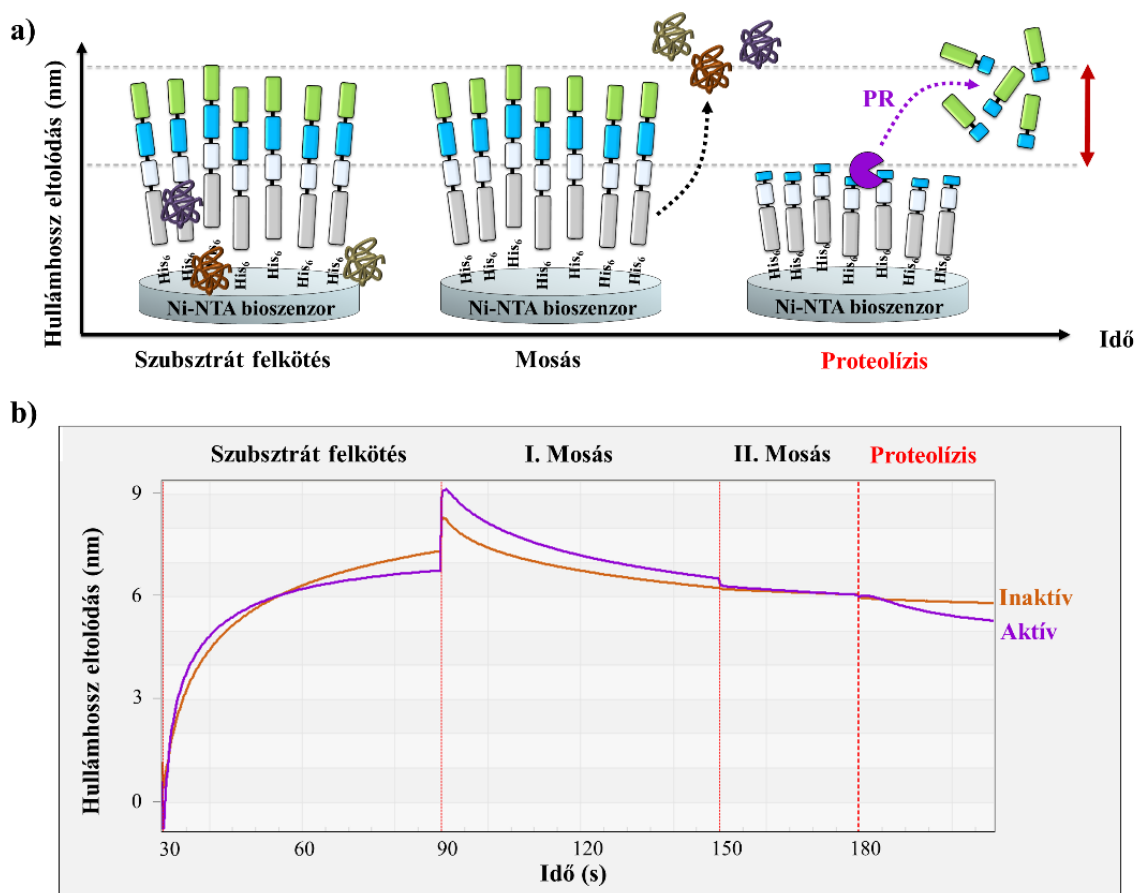
Az általunk fejlesztett BLI-alapú proteáz esszé 3 fő lépésből áll (**26a. ábra**). Az első lépésben történik a szubsztrát immobilizálása a Ni-NTA-alapú szenzorhoz, a szubsztráton lévő His₆ affinitás címke segítségével. A második lépésben történik a bioszenzorhoz gyengén, illetve aspecifikusan kötődő fehérjék eltávolítása a szenzor mosásával. A harmadik lépésben történik a szubsztrát HIV-1 proteáz általi hidrolízise.

Mivel a Michaelis-Menten kinetikai modell szabályai szerint az enzim kezdeti reakciósebessége függ(het) a kiindulási szubsztrát koncentrációtól, kísérleteinket a bioszenzorok szaturációjával kezdtük, mely során a bioszenzorokon található kötőfelszínek túlnyomó része szubsztráttal telítődött. Ezzel kiküszöböltük azokat a különbségeket, melyek az egyes mérésekben a szubsztrát eltérő mennyiségéből adódhatnak.

A bioszenzorokat két lépésben mostuk. Az első lépésben eltávolítottuk a feleslegben lévő szubsztrátot, illetve az aspecifikusan kötődő fehérjéket a bioszenzor felületéről (250 μ l, *tube* mód). A második mosási lépést kisebb térfogatban végeztük (4 μ l, *drop* mód) annak érdekében, hogy minimalizáljuk a *tube* és *drop* módok közötti átmenet során keletkező aspecifikus jelet. Míg az első mosási lépésben a felkötött szubsztrátok egy része disszociált a bioszenzorról, addig a második mosási lépésben a disszociáció elhanyagolható volt, ami a relatíve kis térfogatban végbemenő “újrakötődés” hatásával magyarázható (**26b. ábra**).

A kísérleteinkben tapasztalható spontán szubsztrát disszociáció (az 1. és 2. mosási lépések során) részben a reakciók során használt pufferek összetételével magyarázható. A relatíve magas sókoncentráció és az alacsony pH szuboptimális környezetet biztosítottak a Ni-NTA és a His₆-címke közötti kölcsönhatások számára (**Bozóki, és mtsai, 2017**). Ezen puffer használata azonban az enzim optimális működése szempontjából volt kritikus jelentőségű, ugyanis a HIV-1 proteáz pH optimuma \sim 5,5, továbbá a magas NaCl koncentráció szignifikánsan növeli az enzim aktivitását. A második mosási lépést a proteolízis követte (*drop* mód). Ebben a fázisban a pufferösszetétel és a térfogat megegyezett a második mosási lépésben alkalmazottal, ezzel minimalizáltuk a jel-zaj intenzitását.

A mosásokat követően a mérés proteolízis szakaszában (**26b. ábra**) a szenzort a HIV-1 proteáz oldatába merítettük. A bioszenzorra felkötött szubsztrátok HIV-1 PR_{vad} általi érzékenységének köszönhetően (**25c. ábra**) a beépített hasítóhelyen processzálódtak. Ebből adódoan a szenzor bioréteg vastagsága lecsökkent, amit az idő függvényében detektáltunk. Amint megtörtént az immobilizált His₆-MBP-VSQNY*PIVQ-mEYFP szubsztrát (72,24 kDa) HIV-1 PR általi hasítása, az N-terminális fragmens rajta maradt a szenzoron (His₆-MBP-VSQNY, 44,45 kDa), míg a fluoreszcens fehérjét tartalmazó C-terminális termék (PIVQ-mEYFP, 27,64 kDa) a HIV-1 proteázt is tartalmazó oldatba került (**26a. ábra**). Ennek köszönhetően a bioréteg vastagsága lecsökkent, ezért egy intenzív jelerősség csökkenést tapasztaltunk (**26b. ábra**).



26. ábra. A BLI-alapú proteáz vizsgálat alapelve. (a) A bioszenzorok sematikus ábrázolása a vizsgálat során. **(b)** Az esszé lépéseit bemutató reprezentatív szenzogram. A hasítási reakciókat katalitikusan aktív (HIV-1 PR_{vad}, lila) és inaktív (HIV-1 PR_{ΔNΔC}, narancs) HIV-1 PR alkalmazásával hajtottuk végre. A párhuzamos kísérletekben ugyanazt a Ni-NTA bioszenzort használtuk, a mérések között a szenzorokat alacsony pH-jú oldattal regeneráltuk (a gyártó utasításai alapján).

Annak érdekében, hogy kizárjuk az esetleges fals pozitív eredményt, miszerint a jel erősség csökkenésének oka nem a proteolízis, hanem a His₆ címkét tartalmazó szubsztrátok disszociációja, kontrollként katalitikusan inaktív HIV-1 PR-t alkalmaztunk. A HIV-1 PR_{ΔNΔC} mutáns enzim nem képes funkcionális dimer létrehozására, az 1-4-es, illetve 96-99-es N- és C-terminális rövid szakaszok deléciója miatt. Ezen régiók kritikus jelentőségűek a dimerizáció szempontjából (Ishima és mtsai, 2001) és kulcsszerepet játszanak más retrovirális proteázok dimerizációjában is (Mótyán és mtsai, 2020). A fenti módosítások következtében az enzim proteolitikus aktivitással nem rendelkező monomerekként van jelen. A HIV-1 PR_{ΔNΔC} enzimmel végzett mérésekben elhanyagolható mértékű jelerősség-csökkenést tapasztaltunk,

annak ellenére, hogy a reakció azonos koncentrációban tartalmazta a katalitikusan aktív, illetve az inaktív proteázt. Mindezekből arra következtettünk, hogy a vad típusú HIV-1 PR processzálta a rekombináns szubsztrátba épített MA/CA hasítóhelyet, amelyet jelerősség-csökkenés formájában detektáltunk. Méréseink igazolták, hogy a módszer alkalmazható proteolitikus aktivitás vizsgálatára, ezért további kísérleteink a mérési körülmények optimalizálására irányultak.

6.3.4.1.2. Hasítási reakció tripszinnel

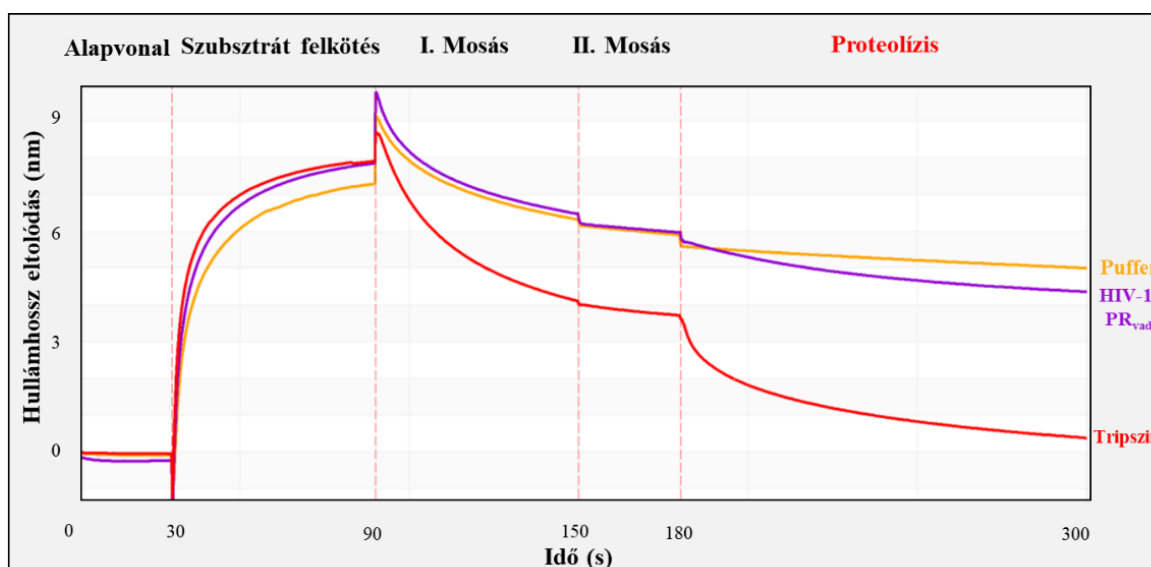
Igazolni kívántuk, hogy a BLI-alapú módszer alkalmazható más proteolitikus enzim(ek) vizsgálatára is, illetve hogy a rendszer érzékenysége növelhető ha olyan enzimet alkalmazunk, ami nagyobb jelintenzitás-csökkenést generál. A vizsgálatunkban tisztított humán kationos tripszint alkalmaztunk.

A tripszinnel történő emésztés esetén várt különbségek ok az volt, hogy az alkalmazni tervezett mérési körülmények több szempontból is eltértek a HIV-1 PR esetében alkalmazottaktól. A tripszin alacsonyabb hőmérsékleten (25°C-on) is megfelelő aktivitással rendelkezik, ami fontos lehet az általunk is használt BLItz készülék használatakor, ugyanis a mérési hőmérséklet nem szabályozható ezen a típusú készüléken. A tripszin aktivitásának vizsgálatokor nem szükséges alacsony pH alkalmazása, ami csökkenti a bioszenzorhoz kikötött szubsztrát spontán disszociációját. A HIV-1 PR az általunk használt rekombináns szubsztrátokat egyetlen meghatározott helyen hasítja, melynek következtében a bioréteg vastagsága ~26 kDa tömegű fehérjével csökken. Ezzel szemben a tripszin több helyen is processzálja a rekombináns szubsztrátot (Mótyán és mtsai, 2018), ami várhatóan nagyobb jelintenzitás-csökkenést generál a nagyobb mértékű molekulatömeg-változás miatt.

Méréseket végeztünk tripszin és HIV-1 PR_{vad} enzimekkel, a reakciók kontrolljaként enzimet nem tartalmazó puffert használtunk(27. ábra). Mind a HIV-1 PR_{vad}, mind a tripszin jól detektálható és jelentős jelintenzitás csökkenést generált a mérés proteolízis szakaszában, azonban a tripszin ~3-szor nagyobb hullámhossz eltolódás csökkenést okozott egységnyi idő alatt a HIV-1 PR-hoz képest. Ezen eredményekből kiderült, hogy a HIV-1 proteázon kívül más proteolitikus enzim aktivitása is detektálható az általunk kidolgozott eljárással, és hogy a jelintenzitás csökkenés növelhető olyan enzim használatával, ami a szubsztrát hasításakor nagyobb molekulatömegű proteolitikus fragmenteket szabadít fel. Bár a tripszines hasítás reakcióközegének pH-ja optimális volt a Ni-NTA kölcsönhatáshoz (pH ~7,4), mégis jelentős

menyiségű szubsztrát disszociációt detektáltunk az 1. mosási lépés közben, amit feltehetően a reakcióközeg relatíve magas Tris koncentrációja (100 mM) okozott. A továbbiakban a méréseinkhez a kontroll kísérletekhez enzimmentes közeget használtunk, mivel azonos mértékű az inaktív (26. ábra) és az enzimet nem tartalmazó (27. ábra) közegekben mért jelintenzitásbeli változás.

Eredményeink igazolták, hogy a módszer potenciálisan alkalmazható lehet különböző proteolitikus enzimek vizsgálatára is, azonban a mérés körülményeit minden esetben szükséges optimalizálni, pl. szenzor, szubsztrát típus (specifikus vagy általános proteáz szubsztrát), reakciókörülmények (pufferkomponensek, pH, hőmérséklet).



27. ábra. Hasítási reakció HIV-1 proteázzal és tripszinnel. A reprezentatív szenzogram az alapvonal felvételétől a proteolízis szakaszáig mutatja be a jelintenzitás változását a HIV-1 PR_{vad} esetében lila, a tripszin esetében piros, míg a puffer esetében sárga színnel jelöltük.

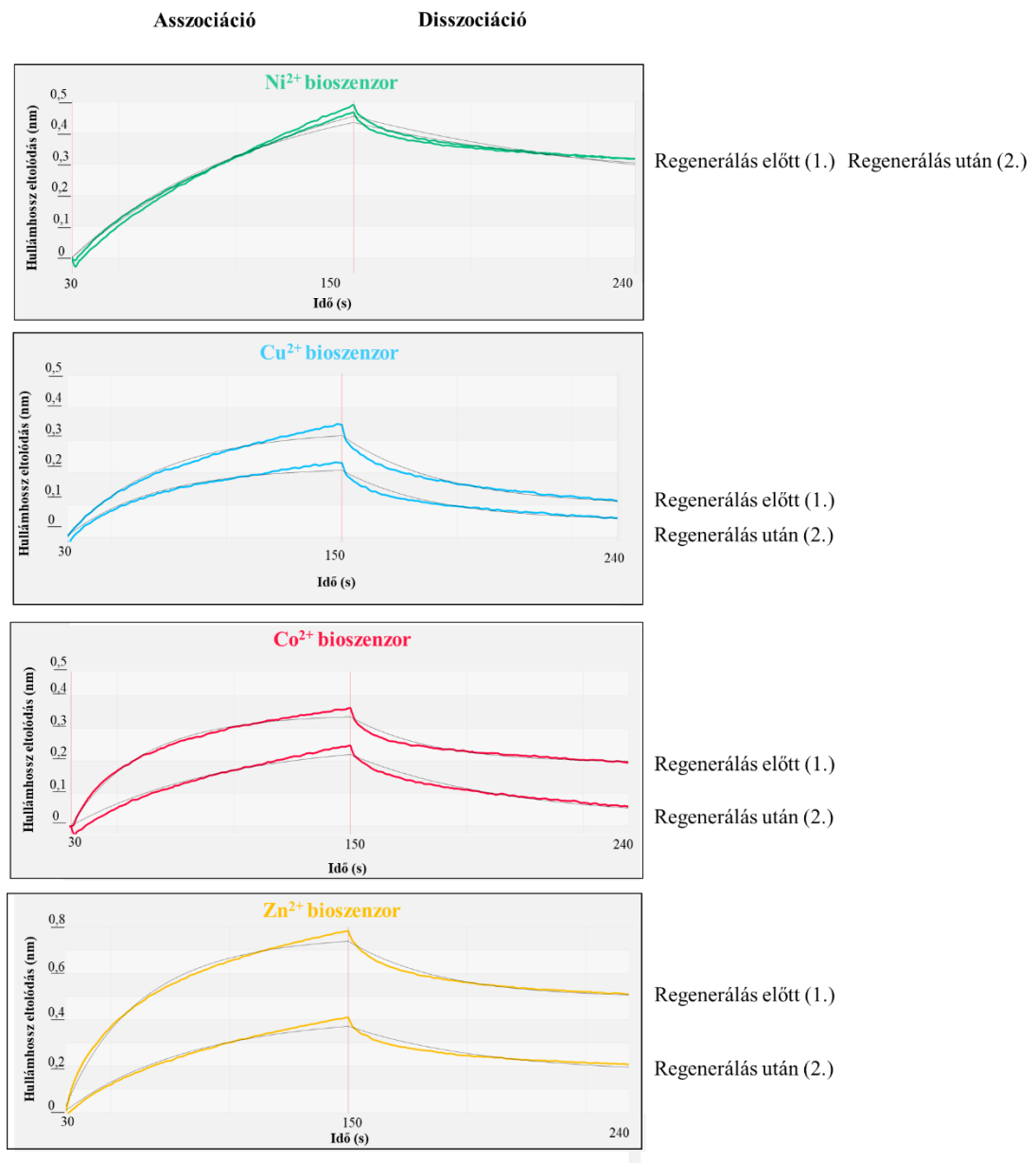
6.3.5. Különböző fémionok hatása a szubsztrát immobilizációra

Léteznek olyan affinitás kromatográfiai eljárások, amelyek kétértékű kationokat használnak a His-címkével ellátott fehérjék immobilizálásához (Ueda és mtsai, 2003; Voráčková és mtsai, 2011). A bioszenzorok alkalmazása során tapasztalható spontán szubsztrát disszociáció csökkenthető a megfelelő kation kiválasztásával, amely a His-címkét tartalmazó fehérje esetében relatíve kisebb disszociációs állandóval bír. Mindezek mellett a kísérlet szempontjából elengedhetetlen, hogy olyan rendszeren dolgozzunk, amely ellenálló az

egymást követő regenerálási lépések szempontjából, tehát több egymást követő enzimreakció és regenerálási lépés után is azonos szenzogramokat kapunk. Ez a költséghatékonyság, az egyszerűség és a reprodukálhatóság miatt is rendkívül fontos.

A mérési körülmények optimalizálása során különböző kétértékű kationokkal (Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+}) töltöttük fel a bioszenzorok felszínét. Ezt követően az asszociáció lépés folyamán kikötöttük a szubsztrátot (His₆-MBP-VSQNY*PIVQ-mEYFP) a bioszenzorokhoz és megvizsgáltuk a disszociációt. Savas regenerálási lépést követően a szenzorokat újból felhasználtuk egy párhuzamos méréshez (**28. ábra, 6. táblázat**).

A legerősebb kölcsönhatást a His-címkével ellátott szubsztrát és a nikkell ionokkal töltött szenzorok között tapasztaltuk. Érdekes megjegyezni, hogy az első mérésnél a cink és kobalt ionnal feltöltött bioszenzorok esetében jóval nagyobb mértékű kötődést tapasztaltunk a nikkell ionnal töltött szenzorokhoz képest (asszociációs állandó, k_a), azonban a regenerálást követően ezen szenzorok kötőkapacitása (R_{max}) nagy mértékben csökkent. Ezzel szemben abban az esetben, amikor a méréseinket nikkell ionokat tartalmazó bioszenzorral végeztük, nem tapasztaltunk jelentősebb mértékű eltérést a kötőkapacitásban és a disszociációs és asszociációs állandók értékében sem.



28. ábra. Kétértékű kationokkal töltött bioszenzorok kötési vizsgálata. A szenzogramok a bioszenzorok szubsztrát-kötési képességét mutatják be regenerálás előtt (1.) és regenerálás után (2.). A kötődés vizsgálatához a His₆-MBP-VSQNY*PIVQ-mEYFP szubsztrátot használtuk. A szenzogramokon a színes görbe a mérés során kapott jelet mutatja, míg szürke színnel a mérési pontokra a kiértékelő szoftver által automatikusan illesztett görbe látható. Az értékek matematikai illesztésénél 1:1 kötési modellt (Langmuir-modell) használtunk. A mérést jellemző kinetikai és technikai paraméterek az **6. táblázatban** találhatóak.

6. táblázat. A különböző kétértékű kationok esetében meghatározott paraméterek. A megfelelő szenzogramok a **28. ábrán** láthatók. Az egyes mintákra kapott értékeket a szenzorok regenerálása előtt (1.) és után (2.) elvégzett mérésekben határoztuk meg.

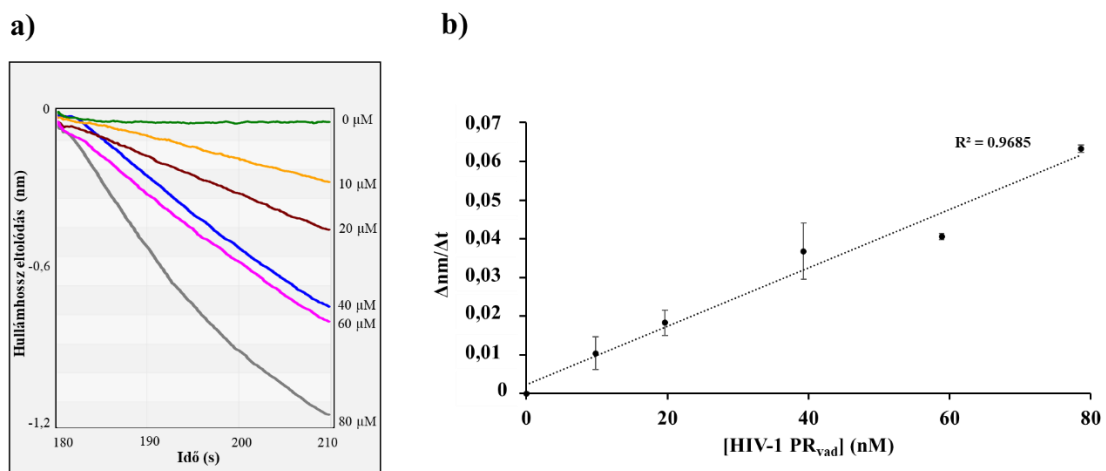
Ion	Minta	ka(1/Ms)*10³	kd(1/s)*10³	R_{equilibrium}	R_{max}	R²
<i>cink</i>	1	1,55 ± 0,12	0,81 ± 0,013	1,34	2,36	0,98
	2	0,32 ± 0,14	0,93 ± 0,021	0,68	3,53	0,97
<i>nikkel</i>	1	0,37 ± 0,12	0,42 ± 0,014	0,93	2,49	0,98
	2	0,47 ± 0,11	0,45 ± 0,012	1,08	2,54	0,98
<i>kobalt</i>	1	1,08 ± 0,15	1,19 ± 0,020	0,61	1,56	0,98
	2	2,59 ± 0,15	0,69 ± 0,012	0,81	1,12	0,98
<i>réz</i>	1	0,29 ± 0,14	1,85 ± 0,033	0,27	2,82	0,97
	2	0,36 ± 0,12	1,55 ± 0,060	0,45	3,26	0,97

Az egyensúlyi állapotban detektált válasz (R_{eq}) nagymértékben függ az analit koncentrációjától (c), az asszociációtól (ka , komplexképződés sebessége), a disszociációtól (kd , komplexképződés stabilitása), és a bioszenzor maximális kötési kapacitástól (R_{max}), amint azt a következő egyenlet mutatja: $R_{equilibrium} = ((ka * c) / (ka * c + kd)) * R_{max}$. A helytelen regeneráció (reziduális fehérje a bioszenzoron, elégtelen ionfeltöltés) vagy az érzékelők károsodása az R_{max} érték csökkenéséhez vezethet, így alacsonyabb R_{eq} -hoz. Azt tapasztaltuk, hogy a Ni-NTA felület kivételével, a többi kationnal bevont bioszenzor kisebb hatékonysággal regenerálható, ezért az eredményeink ilyen szenzorok alkalmazásakor kevésbé reprodukálhatók (**28. ábra**). Mivel a nikkel ionokkal feltöltött szenzorok esetében a regeneráció elhanyagolható hatást gyakorol a szubsztrátok immobilizálhatóságára, a további vizsgálatainkat nikkel ionok használatával végeztük el.

6.3.6. Enzimkoncentráció hatása az immobilizált szubsztrát processzálására

A módszer validálása szempontjából rendkívül fontos szem előtt tartani az általános enzimológiai törvényszerűségeket. Kísérletünk során megvizsgáltuk, hogy az eltérő enzimkoncentrációk hogyan hatnak a reakciósebességre, detektálhatóak-e különbségek, illetve arányosan változik-e a jelintenzitás csökkenése az enzim mennyiségével.

Első lépésben azonos mennyiségű szubsztráttal (His₆-MBP-VSQNY*PIVQ-mEYFP) töltöttük fel a Ni-NTA bioszenzorokat, majd megvizsgáltuk a szubsztrátok processzálasát különböző koncentrációjú HIV-1 PR_{vad} alkalmazásával. A szenzogramok esetében azt tapasztaltuk, hogy a proteolízis szakaszokban a biorétegnek az idő függvényében mért változása ($\Delta\text{nm}/\Delta t$) arányos volt az alkalmazott enzim koncentrációval, míg a nagyobb enzimkoncentrációk esetében nagyobb mértékű jelváltozást detektáltunk (**29a. ábra**). A szenzogramok kiértékelése során a proteolízis szakaszokban (2-10. másodperc tartományban) mért hullámhossz eltolódást (nm) ábrázoltuk az idő függvényében, és a rétegvastagság kezdeti változását ($\Delta\text{nm}/\Delta t$) a pontokra illesztett regressziós egyenes meredeksége alapján határoztuk meg. Eredményeink alapján a rétegvastagság változása egyenesen arányos volt az alkalmazott HIV-1 PR koncentrációval (**29b. ábra**). A jel enzimkoncentrációval arányos változása is alátámasztotta, hogy az általunk detektált változások az enzim proteolitikus aktivitásának köszönhetően jönnek létre, nem pedig pl. a szubsztrát spontán disszociációja vagy más aspecifikus hatás következtében.



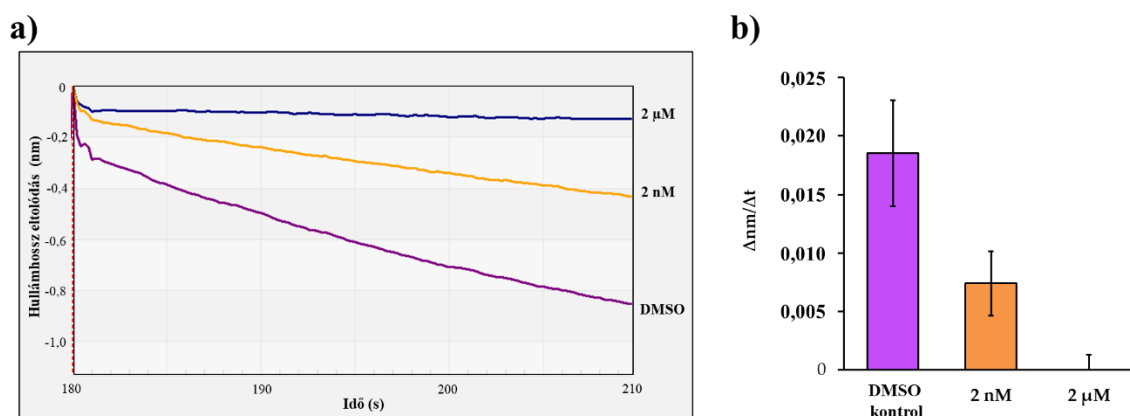
29. ábra. A rétegvastagság kezdeti változása az enzimkoncentráció függvényében. (a)

Az esszé proteolízis szakaszát bemutató reprezentatív szenzogramok különböző HIV-1 PR_{vad} enzimkoncentrációkkal végzett kísérletek során. **(b)** A rétegvastagság változásának ($\Delta\text{nm}/\Delta t$) ábrázolása a mérés során alkalmazott HIV-1 PR_{vad} koncentráció (nM) függvényében. A $\Delta\text{nm}/\Delta t$ értékek a BLI mérés proteolízis szakaszának 2-10 másodperc időtartamában rögzített értékekre illesztett regressziós egyenes meredekségének felelnek meg. Az R^2 értéket lineáris regresszióval határoztuk meg. Az eredmények két mérés átlagértékét mutatják.

6.3.7. Gátlószer hatása az enzimaktivitásra

További kísérletekben kívántuk megerősíteni, hogy az optikai jel megváltozását a proteolízis okozza és nem a szubsztrát bioszenzor felületétől való spontán disszociációja vagy az immobilizált szubsztrátok és az enzim közötti aspecifikus kölcsönhatások. Ennek érdekében hasítási reakciókat végeztünk a HIV-1 PR-t gátolni képes atazanavir inhibitor jelenlétében.

A hasítási reakciókhoz a His₆-MBP-VSQNY*PIVQ-mEYFP szubsztrátot és a HIV-1 PR_{vad} enzimet alkalmaztuk. A reakcióközegek az atazanavirt 2 nM és 2 μM végkoncentrációban tartalmzták. Mivel az atazanavirt DMSO-ban oldottuk be, a kontroll reakciók inhibitor helyett DMSO-t tartalmztak. A legintenzívebb jelváltozást a kontroll reakciónál figyeltük meg, ahol az inhibitor nem gátolta az enzimet (30a. ábra). A kontrollhoz képest a jel meredeksége alacsonyabb volt, ha az atazanavirt 2 nM végkoncentrációban alkalmaztuk, ami csak részleges gátlást jelent. Ezzel szemben a mért jel változása 2 μM inhibitor jelenlétében elhanyagolható volt, ami az enzim teljes gátlására utalt (30b. ábra).



30. ábra. Az atazanavir HIV-1 PR aktivitásra gyakorolt gátló hatásának meghatározása. (a) A HIV-1 PR_{vad} enzimmal inhibitor hiányában, valamint 2 nM és 2 μM végkoncentrációjú atazanavirral végzett enzimreakciók reprezentatív szenzogramja. **(b)** A kapott kezdeti $\Delta\text{nm}/\Delta t$ értékek összehasonlítása. A $\Delta\text{nm}/\Delta t$ értékek a BLI mérés proteolízis szakaszának 2-10 másodperc időtartamában rögzített értékekre illesztett regressziós egyenes meredekségének felelnek meg. Az eredmények két mérés átlagértékét mutatják.

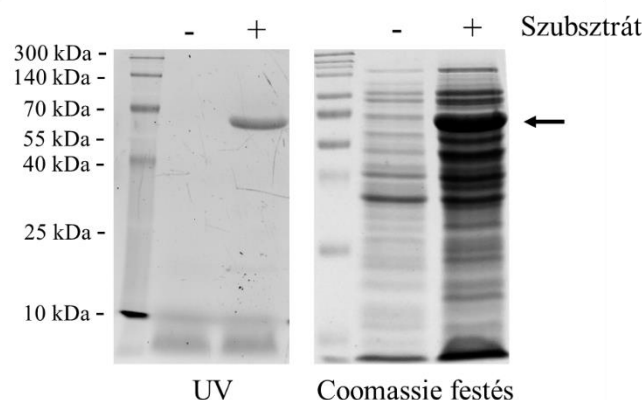
Eredményeink megerősítették, hogy az észlelt jelváltozást nem aspecifikus kölcsönhatások okozták, hanem a szubsztrát HIV-1 PR_{vad} általi proteolízise, mely gátolható volt a specifikus inhibitorral. Vizsgálataink célja elsősorban annak igazolása volt, hogy a detektált jel változásai a proteolitikus aktivitás következtében alakulnak ki, részletes gátlásvizsgálatokat

nem kívántunk végezni, de a BLI-alapú mérés potenciálisan alkalmas lehet gátlószerek vizsgálatára is.

6.3.8. Mérések teljes sejtízátumból

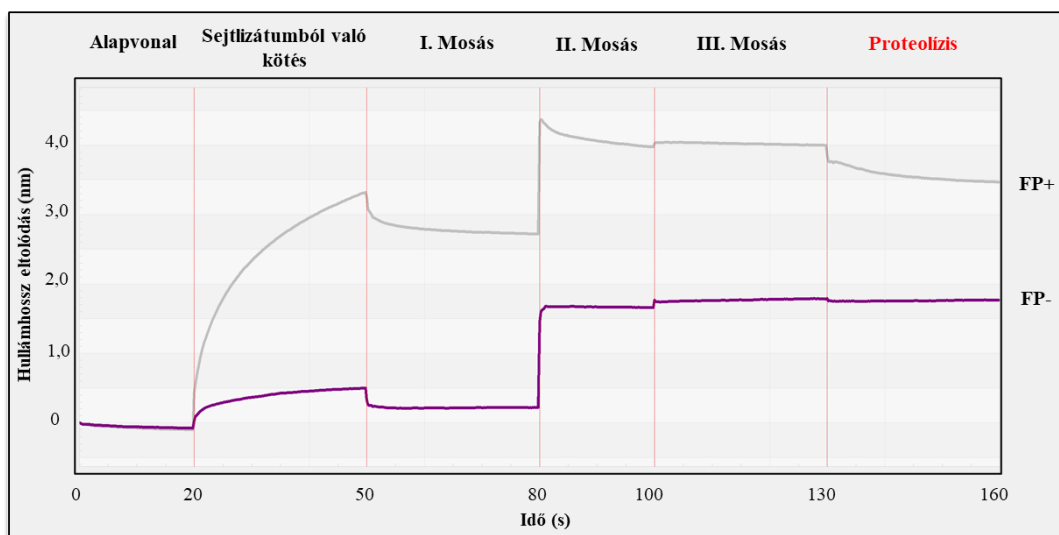
A BLI technológiának köszönhetően a célmolekulák szenzorhoz való kikötéséhez nem feltétlen szükséges tisztított fehérjéket alkalmazni. Komplex biológiai mintából (pl. bakteriális sejtízátumból) direkt módon immobilizálhatóak a hisztidin (pl. His₆ vagy His₈) címkét tartalmazó rekombináns fehérjék. Az ily módon, tisztítatlan fehérjékkel történő mérés tovább csökkentheti a BLI proteáz esszé anyag- és időigényét, mely kritikus jelentőségű lehet egy nagy áteresztőképességű módszer alkalmazása során.

Első lépésben kikötöttük a rekombináns fluoreszcens fehérje szubsztrátot (His₆-MBP-VSQNY*PIVQ-mEYFP) a sejtízátumból. A háttérkötődés mértékének meghatározásához a szubsztrátot nem expresszáló BL21(DE3) sejtek lizátumát alkalmaztunk kontrollként. A sejtízátumokban lévő fehérjéket SDS poliakrilamid gélelektroforézist követő Coomassie festéssel detektáltuk. Mivel a teljes sejtízátumban a fluoreszcens szubsztrát mellett számos bakteriális fehérje is detektálható volt, a szubsztrátokat UV fényben is vizsgáltuk. A fehérjék gélben történő renaturálása után kizárólag a fluoreszcens címke fehérjét detektáltuk a szubsztrátot expresszáló sejtek lizátumában, míg a kontroll mintában (az üres plazmiddal transzformált sejtek lizátumában) nem tapasztaltuk sáv megjelenését azonos molekulaméretnél (**31. ábra**). Ezzel igazoltuk a szubsztrát jelenlétét vagy hiányát a vizsgált mintákban.



31. ábra. Transzformálatlan és transzformált BL21(DE3) sejtízátumok vizsgálata SDS-PAGE segítségével. A His₆-MBP-VSQNY*PIVQ-mEYFP teljes hosszúságú fehérje szubsztrátot (~72 kDa) a Coomassie festéssel festett gélen és renaturálást követően UV átvilágítással is detektáltuk, a szubsztrátot nyíllal jelöltük.

A teljes sejtlizátumokkal végzett mérések körülményei megegyeztek a tisztított szubsztráttal való mérési protokollal, azzal a kivétellel, hogy beiktattunk egy mosási lépést az aspecifikusan kötődő szennyező fehérjék eltávolítása érdekében. A Ni-NTA bioszenzorok különböző sejtlizátumokba merítését követően eltérő jelintenzitásokat kaptunk (32. ábra). A szubsztrátot nem tartalmazó lizátum esetében kisebb kötési szignált kaptunk, mint a fehérje szubsztrátot expresszáló bakteriális sejtek lizátumában. A mérés proteolízis szakaszában a kötési jel csökkent a szubsztrátot tartalmazó minta esetében a katalitikusan aktív HIV-1 PR_{vad}-nak köszönhetően, míg a szubsztrátot nem tartalmazó mintánál változatlan maradt. Az SDS-PAGE analízis eredményéből (31. ábra) és a BLI-vel kapott szenzogramból (32. ábra) is egyértelműen kiderült, hogy a rendszer alkalmas His₆-címkét tartalmazó fehérje sejtlizátumból történő kikötésére, így alkalmazható lehet a HIV-1 proteáz proteolitikus aktivitásának vizsgálatára, a szubsztrát előzetes tisztítása nélkül.



32. ábra. Hasítási reakció BLI-alapú vizsgálata a szubsztrát sejtlizátumból való immobilizálása esetén. A reprezentatív szenzogram a sejtlizátumból történő mérés eredményét mutatja, Ni-NTA bioszenzor alkalmazásával. A mérés során először felvettük az alapvonalat (*tube* mód), majd a szenzort a szubsztrátot nem tartalmazó (FP-) vagy tartalmazó (FP+) sejtek lizátumba merítettük a szaturáció eléréséig (*drop* mód). Az aspecifikusan kötődő fehérjéket három egymást követő mosási lépéssel távolítottuk el. Végezetül HIV-1 PR_{vad} hozzáadásával vizsgáltuk a proteolízist.

6.4. A bioréteg interferometria-alapú mérés alkalmazása

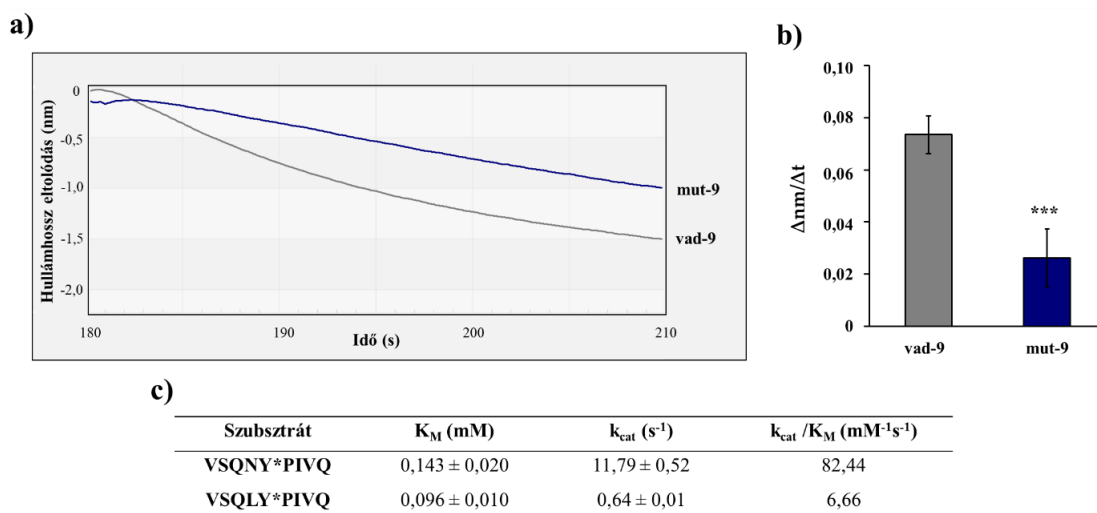
6.4.1. A HIV-1 proteáz S2 szubsztrátkötő zsebének vizsgálata

A szubsztrát immobilizálás és a BLI-alapú mérés körülményeinek beállítását követően a kidolgozott módszert a HIV-1 PR szubsztrátspecifitásának vizsgálatára kívántuk felhasználni.

A kísérleteket His₆-MBP-VSQNY*PIVQ-mEYFP szubsztrát alkalmazásával végeztük, amely a HIV-1 vad típusú MA/CA hasítóhelyét tartalmazta (vad-9) (**Bozóki és mtsai, 2018**). Emellett egy olyan szubsztrátot is terveztünk, amely a hasítóhely szekvencia P2 pozíciójában aszparagin helyett leucint tartalmazott (VSQLY*PIVQ) (mut-9) (**25b. ábra**). Kutatócsoportunk korábbi, oligopeptid szubsztrátokon végzett vizsgálataiból ismert volt, hogy a HIV-1 PR nagyobb hatékonysággal processzálja a vad típusú MA/CA hasítóhelyet, mint a P2-módosított szubsztrátot (**Bagossi és mtsai, 1998; Boross és mtsai, 1999; Bagossi és mtsai, 2005**). Feltételeztük, hogy a szubsztrátok iránti preferenciák közti különbség a BLI-proteáz esszé alkalmazásával is kimutatható.

A HIV-1 PR_{vad} hasítási hatékonyságának összehasonlító analízisét a vad-9 és mut-9 His₆-MBP-mEYFP szubsztrátok kezdeti $\Delta\text{nm}/\Delta\text{t}$ értékeinek meghatározásával végeztük (**33a. ábra**). A jelintenzitás csökkenése a vad-9 szubsztrát esetében jóval intenzívebb volt, mint a mut-9 szubsztrát esetében (**33b. ábra**). A két eltérő hasítóhely közti szignifikáns különbség összhangban van az oligopeptid szubsztrátokon meghatározott aminosav preferenciákkal (**Bagossi és mtsai, 1998; Bagossi és mtsai, 2005**) (**33c. ábra**) és a vad típusú szekvencia iránti nagyobb preferenciára utal.

Eredményeink egyértelműen bizonyították, hogy a valós idejű BLI-alapú proteáz mérési eljárás alkalmas az enzim specificitásának tanulmányozására, ezért további szubsztrátokat is felhasználtunk a HIV-1 PR vizsgálatára. Célul tűztük ki olyan, 24-tagú hasítóhely szekvenciát reprezentáló rekombináns szubsztrátok vizsgálatát (**25b. ábra**), melyekkel igazolható a HIV-1 PR szubsztrátkötő árkának szerepe a szubsztrát kötésében.



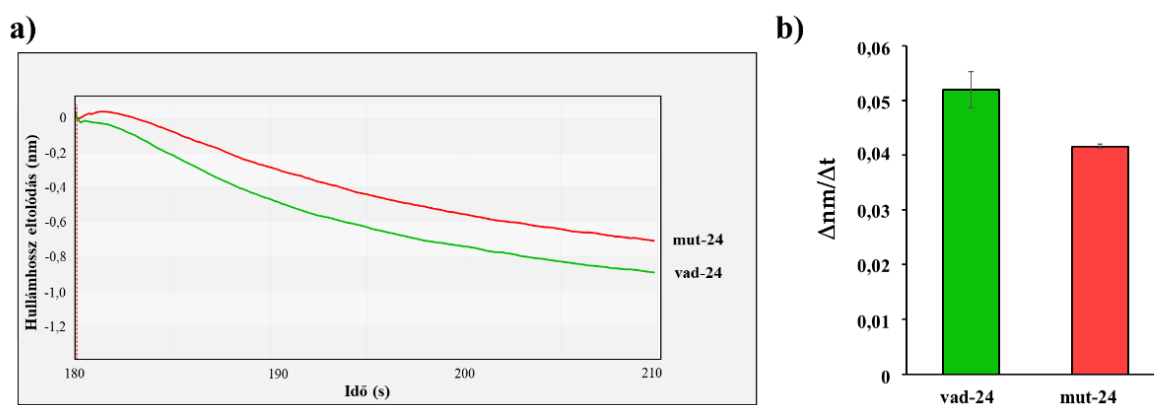
33. ábra. A HIV-1 PR specifitásának vizsgálata P2-módosított hasítóhelyet tartalmazó szubsztrátok használatával. (a) A HIV-1 PR_{vad} enzimmel és vad-9 (VSQNY*PIVQ) és mut-9 (VSQLY*PIVQ) szubsztrátokkal végzett enzimreakciók reprezentatív szenzogramja. **(b)** A vad-9 és mut-9 szubsztrátok esetében meghatározott $\Delta nm/\Delta t$ értékek összehasonlítása. A $\Delta nm/\Delta t$ értékek a BLI mérés proteolízis szakaszának 2-10 másodperc időtartamában rögzített értékekre illesztett regressziós egyenes meredekségének felelnek meg. A szignifikancia meghatározást párosítatlan t-próbával végeztük GraphPad online kalkulátor felhasználásával (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/>). *: $p = 0,0004$. A hibasávok SD-t jelölnek ($n=4$). **(c)** Kinetikai paraméterek, amelyeket korábban a HIV-1 PR esetében határoztak meg oligopeptid szubsztrátok felhasználásával (Bagossi és mtsai, 1998).

6.4.2. A HIV-1 proteáz szubsztrátkötő árkának vizsgálata

A szakirodalmi adatokból ismert volt, hogy a HIV-1 PR aktív helye egy 8-tagú aminosavszekvenciát (P4-P4') ismer fel a szubsztrát megkötése során. Azonban újabb tanulmányokból kiderült, hogy a HIV-1 PR-nak az aktív helytől távolabb eső szakaszai is szerepet játszhatnak a szubsztrát megkötésében. A proteáz ezen interakcióra képes régióját szubsztrátkötő ároknak (*substrate groove* vagy *S-groove*) nevezik, mely a szubsztrát P12-P5 és P5'-P12' aminosavaival képes kialakítani kölcsönhatásokat, így az enzim nem csak a korábban ismert 8-10, hanem akár 24 aminosavból álló szakaszokat is képes megkötni (5. ábra). Ez fontos szerepet játszhat a HIV-1 PR *in vivo* működésében, hiszen a proteáz a poliproteinben lévő funkcionális domének közti összekötő szakaszokban hasítja a peptidkötéseket, a szubsztrátkötő árok meglétét Laco *in vitro* és *in silico* kísérletekben is igazolta (Laco, 2015; Laco, 2017).

A BLI-alapú proteáz esszét felhasználtuk a HIV-1 PR szubsztrátkötő árkának tanulmányozására, melynek során szubsztrátként olyan rekombináns fehérjéket alkalmaztunk, amelyek a 24-tagú vad típusú (vad-24, DTGHSNQVSQNY*PIVQNIQGQMVH) vagy módosított (mut-24, GVGPGHVSQNY*PIVQSQVTNSAT) felismerési szekvenciát tartalmazták (25b. ábra). Ezen enzimfelszíni kötőhely szerepét a szubsztrát kötésben még nem igazolták HIV-1 PR esetén független vizsgálatokban. Feltételeztük, hogy a felismerési szekvencia módosítása miatt megváltoznak a szubsztrát és az enzimfelszíni kötőhelyek közötti kölcsönhatások, ugyanis elsősorban a P12-P6 helyeken a poláris aminosavakat a legtöbb esetben apolárisra módosítottuk. A hasítóhely szekvencia megváltoztatásától a hasítási hatékonyságok közötti különbségek megjelenését vártuk.

A vad típusú és mutáns szubsztrátok proteolízise közötti különbséget BLI módszer segítségével határoztuk meg. A vad-24 és mut-24 szubsztrátok proteolízise egyaránt detektálható volt a rendszer felhasználásával (34a. ábra), a mutáns szekvenciát tartalmazó szubsztrát lassabb proteolízist mutatott a vad típusú szubsztráthoz képest (34b. ábra). A különbség oka feltehetően az volt, hogy a szubsztrát módosítása miatt megváltoztak az enzim és a szubsztrát közötti kölcsönhatások a szubsztrátkötő árok kötőhelyeken. A megváltozott kölcsönhatások következtében pedig a szubsztrátok eltérő hatékonysággal processzálódtak.



34. ábra. A HIV-1 PR szubsztrátkötő árkának vizsgálata. (a) A HIV-1 PR_{vad} enzimmel és vad-24 és mut-24 szubsztrátokkal végzett enzimreakciók reprezentatív szenzogramja. **(b)** A $\Delta nm/\Delta t$ értékek összehasonlítása. A $\Delta nm/\Delta t$ értékek a BLI mérés proteolízis szakaszának 2-10 másodperc időtartamában rögzített értékekre illesztett regressziós egyenes meredekségének felelnek meg. Az eredmények két mérés átlagértékét mutatják.

A szubsztrátok közti különbségeket tovább vizsgáltuk és kinetikai méréseket végeztünk mágneses gyöngy-alapú mérési módszer felhasználásával a BLI-alapú mérés eredményeinek validálására. A His₆-MBP-mApple vad-24 és mut-24 szekvenciát tartalmazó fehérje szubsztrátokon végzett kinetikai mérések eredménye alapján a természetes hasítóhelyet tartalmazó szubsztrát (vad-9) esetében magasabb k_{cat}/K_m értéket határoztunk meg. A mutáns szubsztrát esetében kapott K_m érték jelentős mértékben nagyobb volt, míg a k_{cat}/K_m érték jelentős csökkenését tapasztaltuk (7. táblázat).

7. táblázat. A HIV-1 PR esetében meghatározott kinetikai paraméterek vad-9, vad-24 és mut-24 MA/CA hasítóhelyet tartalmazó His₆-MBP-mApple fluoreszcens szubsztrátokkal. Aláhúzással jelöltük a szubsztrát szekvenciában a módosított aminosavakat. ¹ Korábban publikált értékek (Bozóki és mtsai, 2018).

	Szubsztrát	K_M (mM)*10 ⁻³	k_{cat} (s ⁻¹)*10 ⁻³	k_{cat}/K_M (mM ⁻¹ s ⁻¹)
vad-9 ¹	VSQNY*PIVQ	2,7 ± 0,2	50 ± 0,8	18,52 ± 1,40
vad-24	DTGHSNQVSQNY*PIVQNIQGQMVH	1,68 ± 0,928	26,3 ± 1,464	15,67 ± 8,71
mut-24	<u>GVGGPGHVSQNY</u> *PIVQ <u>SQVTNSAT</u>	7,68 ± 0,003	40,4 ± 0,005	5,26 ± 0,02

A kinetikai mérések eredményei összhangban vannak a gélelektroforézis-alapú vizsgálatok eredményével is, melynek során magasabb (teljes mértékű) konverziót tapasztaltunk a vad típusú szubsztrát esetében, míg a mutáns esetében nem volt teljes a szubsztrát átalakulása (25c. ábra). A mágneses gyöngy-alapú vizsgálatok eredményei jó egyezést mutattak a szubsztrátok között a BLI-alapú esszével meghatározott különbségekkel is (34. ábra). Mindegyik módszerrel végzett mérésünk igazolta, hogy a HIV-1 PR a vad típusú hasítóhelyet preferálja a módosított szubsztráttal szemben. Eredményeink alátámasztják a BLI-alapú mérési módszer alkalmazhatóságát, továbbá igazolják, hogy a HIV-1 PR enzimfelszíni szubsztrátkötő árka fontos szerepet tölt be a szubsztrát megkötésében. A szubsztrátkötő árok további részletes vizsgálata jövőbeli terveink közé tartozik, a jelen dolgozat alapjául szolgáló munkáknak nem volt célja ezen kölcsönható felület részletes vizsgálata.

Fontos megjegyezni, hogy a vad típusú és a mutáns hasítóhelyet tartalmazó szubsztrátok nem csak a hasítóhely szekvenciájában, de konformációs jellemzőikben is eltérhetnek egymástól. A rekombináns szubsztrátokban a hasítóhely szekvenciák távol helyezkednek el a

His₆ címkétől így a hasítóhely módosítása várhatóan nem befolyásolja a szubsztrát immobilizációját, inkább az MBP és a fluoreszcens címkék közötti linker szerkezetére lehetnek hatással. Ilyen különbséget már megfigyeltünk olyan szubsztrátok esetében, amelyek ugyanazt a vad-9 HIV-1 MA/CA hasítási hely szekvenciát tartalmazták (a P12-P12' szekvenciák azonosak voltak), de különböző fluoreszcens fehérjékkel fuzionáltattuk. Ebben az esetben a k_{cat}/K_m értékek közel azonosak voltak, míg az egyedi k_{cat} és K_m értékek az mApple- és mTurquoise2-fuzionált szubsztrátok esetében különbségeket mutattak (**Bozóki és mtsai, 2018**). A kinetikai paraméterek (k_{cat} és K_m) változásai az enzim-szubsztrát kölcsönhatások változásával magyarázhatók, legalábbis az enzim felszínén (P12-P6 és P6'-P12'), de még tisztázásra vár, hogy a szubsztrátok szekvencia és szerkezeti jellemzői hogyan befolyásolják az enzimhez való kötődést és a termékek felszabadulását.

7. MEGBESZÉLÉS

A proteolitikus enzimek számos biológiai folyamatban, ipari alkalmazásban (pl. gyógyszer- és élelmiszeripar) és gyógyszerfejlesztésben is fontos szerepet töltenek be, ezért nagy szükség van hatékony és érzékeny proteázvizsgáló módszerekre. A proteázok hasítóhelyeit tartalmazó rekombináns fehérjék sokoldalúan alkalmazhatók a proteázok vizsgálatában, ezért a leggyakrabban alkalmazott szubsztrátok közé tartoznak. Munkám során részt vettem egy His₆-MBP-FP rekombináns fehérje szubsztrát rendszer létrehozásában és a használatán alapuló mérési módszer kidolgozásában. Ezek a szubsztrátok sokoldalúan felhasználhatóak különféle mérési módokban, így oldatban emésztést követően vizsgálhatóak tömegspektrometriával, elektroforézissel, de felhasználhatóak mikrogyöngy-alapú vizsgálatokban is, a reakciókban a termékképződés elektroforézissel vagy fluorimetriával is követhető. Kutatócsoportunk az elmúlt években sikeresen alkalmazta ezt a szubsztrát rendszert több különböző (retro)virális és retrovírus-szerű proteáz vizsgálata során, doktori munkám során célunk volt ezen rekombináns szubsztrát rendszer alkalmazásával a HIV-1 és a SARS-CoV-2 proteázok biokémiai vizsgálata, valamint egy új proteáz aktivitásmérési módszer kidolgozása.

A HIV-1 proteáz vizsgálata során célul tűztük ki a HIV-1 NC fehérje proximális cink-ujj hasítóhely proteolízisének vizsgálatát. A HIV-1 NC fehérje egy kis bázikus fehérje, amely két cink-ujjat tartalmaz (**6. ábra**). Számos funkciója van a vírus replikációs ciklusában, például részt vesz a cDNS szintézisében, a genomi RNS dimerizációjában, érésében és csomagolásában, a vírus összeállításában és chaperon aktivitással rendelkezik. Korábbi vizsgálatok eredménye alapján a HIV-1 PR képes hasítani a NC fehérjét a proximális cink-ujj motívumon belül, ez a hasítás a korábbi feltételezések alapján jelentős szerepet tölt be a vírusfertőzés korai fázisában. Bár a hasítóhely jelenlétét igazolták kísérletes vizsgálatokban, a módosított szekvenciát tartalmazó vírusokkal végzett kísérletek eredményei ellentmondásosak voltak és nem szolgáltak egyértelmű bizonyítékkal arra vonatkozóan, hogy a NC processzálas valóban szerepet játszik a fertőzés korai fázisában.

Munkánk során vizsgáltuk a NC proximális cink-ujj motívum konformációs állapottól függő processzálasát, valamint a hasítóhely módosításának hatását, melyhez vad típusú és módosított hasítóhelyeket tartalmazó rekombináns szubsztrátokat egyaránt létrehoztunk (**1. és 2. táblázat**). A cink-ujj szerkezeti motívum kialakulását cink-tartalmú puffer alkalmazásával segítettük elő, míg EDTA és DTT szereket használtunk annak érdekében, hogy a cink-ujjat

stabilizáló kötések kialakulását megakadályozzuk a fémionok kelációja és a ciszteinek redukálása révén. A hasítási reakciókban azt tapasztaltuk, hogy a szerkezetileg “intakt” cink-ujj motívumok kialakulása megakadályozza a proteolízist, míg a cink-ujjak kialakulásának gátlása érzékennyé teszi a proximális cink-ujjban lévő szekvenciát a hasításra (**16. ábra**).

Azok a körülmények, melyek optimálisak lettek volna a HIV-1 PR számára és biztosították volna a szubsztrát hozzáférhetőségét is a redukáló és kelációs ágensek jelenlétében, nem lettek volna teljes mértékben kompatibilisek a His₆ fúziós címkével jelölt szubsztrátok immobilizálásával és az Ni-NTA-alapú vizsgálatokkal, ezért nem volt lehetséges az egyes szubsztrátok enzimkinetikai mérésekben való felhasználása. Az egyes szubsztrátok hasítási hatékonyságát ezért csak oldatban történő hasítással tudtuk vizsgálni, mely reakciókat nem zavart az EDTA és a DTT jelenléte. Méréseink alapján a HIV-1 PR a legnagyobb - a vad típushoz képest jelentősen nagyobb - hatékonysággal az N17F-módosított szubsztrátot hasította (**17. ábra**), ami összhangban volt az oligopeptid-alapú kinetikai mérések eredményével (**3. táblázat**). Eredményeink értelmezéséhez elvégeztük az enzim-szubsztrát kölcsönhatások szerkezetalapú vizsgálatát is, ez alapján az N17F mutáns szubsztrát hatékonyabb hasítása részben magyarázható a HIV-1 retrovirális proteáz S1 zsebének nagyobb méretével és hidrofób oldalláncú aminosavak iránti preferenciájával (**Bagossi és mtsai, 2005; Eizert és mtsai, 2008**). Ez a hatás azonban önmagában nem értelmezhető, figyelembe kell venni a retrovirális proteázok specificitásának erős szekvencia kontextus-függését is (**Eizert és mtsai, 2008**). Feltehetően a gélelektroforézis-alapú mérés alacsonyabb érzékenysége miatt a többi szubsztrát esetében meghatározott kinetikai különbségeket nem tudtuk megfelelő pontossággal kimutatni, de a rekombináns szubsztrátok egyértelműen alkalmasnak bizonyultak a NC hasítóhely konformációs állapotának és hasíthatóságának vizsgálatára. Eredményeink hozzájárulnak a HIV-1 proteáz specificitásának jobb megértéséhez. Annak ellenére, hogy a NC processzálas jelentősége kérdéses a jelenleg rendelkezésre álló információk alapján, a NC mutációk hatásának vizsgálata - a HIV-1 PR specificitásának jobb megértése mellett - fontos lehet azon rekombináns vírusok jellemzéséhez, melyeket a vírusreplikáció eseményeinek vizsgálatára is használnak. Az általunk is vizsgált mutációk fertőző vírusklónokba is bevezethetőek, az ilyen mutánsok felhasználásával tanulmányozható lehet a NC processzálasnak a vírus életciklus korai fázisában esetlegesen betöltött szerepe.

A SARS-CoV-2 Mpro vizsgálata során elvégeztük a virális poliproteinben lévő hasítóhely szekvenciák és a humán fehérjék közötti szekvencia homológia alapján a virális proteáz által potenciálisan hasítható fehérjék azonosítását *in silico* (SSHPS analízis), a

lehetséges hasítóhelyek további vizsgálatához szekvencia- és szerkezet-alapú módszereket egyaránt felhasználtunk. Számos lehetséges szubsztrátot azonosítottunk, melyek közül néhány fehérje hasítását *in vitro* is vizsgáltuk, a kiválasztott molekulák közül a humán CTBP1 fehérje vizsgálatát végeztük el részletesen, melyről korábban nem volt ismert, hogy a SARS-CoV-2 Mpro szubsztrátja lenne a fertőzött sejtekben. A fehérje hasítását a rekombináns teljes hosszúságú fehérje vizsgálatával igazoltuk, de a biokémiai vizsgálatokat fluoreszcens fehérje szubsztrát-alapú rendszerben is elvégeztük. Ehhez létrehoztunk egy olyan His₆-MBP-mEYFP rekombináns szubsztrátot, amely tartalmazta a SARS-CoV-2 poliprotein egyik ismert autoproteolitikus hasítóhelyét, valamint egy olyan szubsztrátot, amely a CTBP1 fehérjében *in silico* módszerekkel jóslott hasítóhelyet tartalmazta (**1. és 2. táblázat**). Vizsgálataink során a SARS-CoV-2 Mpro mindkét rekombináns szubsztrátot hasította (**18. ábra**), ezért a hasítatlan fehérjék és a hasítási termékek méretét egyaránt meghatároztuk MALDI-TOF-MS analízis segítségével, a hasítási pozíciók azonosítása érdekében. Az ismert autoproteolitikus hasítóhely esetében megerősítettük, hogy a rekombináns szubsztrát az irodalmi adatoknak is megfelelő pozícióban hasad (TSAVLQ*SGFRKM). A CTBP1 fehérjében lévő felismerési szekvencia esetében azonosítottuk a hasítási pozíciót (¹⁵³GTRVQ*SVEQI¹⁶²), ami megfelelt a szekvencia-analízisek által jóslott hasítási pozíciónak (**19. ábra**) és a SARS-CoV-2 Mpro eddig nem ismert hasítóhelye volt. Az enzimkinetikai mérések során a CTBP1 hasítóhelyet reprezentáló fluoreszcens szubsztrát esetében meghatározott katalitikus állandó jelentősen kisebb volt, mint a poliproteinben lévő hasítóhelyet tartalmazó szubsztrát esetében (**5. táblázat**), ami arra utal, hogy a SARS-CoV-2 Mpro a vizsgált autoproteolitikus hasítóhelyhez képest a CTBP1 fehérjét kisebb hatékonysággal hasítja az általunk azonosított hasítóhelyen. A CTBP1 fehérjében azonosított hasítóhely teljesen azonos a CTBP1 és CTBP2 humán fehérjékben (CTBP2: ¹⁵⁹GTRVQ*SVEQI¹⁶⁸), ezért feltételeztük, hogy a CTBP2 is a SARS-CoV-2 Mpro proteáz célpontja lehet. A CTBP2 fehérjét független vizsgálatok is azonosították, mint hCoV-NL63 koronavírus Mpro (**Koudelka és mtsai, 2021**) vagy a SARS-CoV-2 Mpro proteolitikus célpontját (**Scott és mtsai, 2021**), ami alátámasztja a GTRVQ*SVEQI hasítóhely jelenlétét a CTBP fehérjékben, melyek közül a CTBP1-ről igazoltuk elsőként kísérletesen, hogy a SARS-CoV-2 Mpro gazdasejt szubsztrátja. Proteolitikus hasításának pontos szerepe a vírus életciklusában vagy a patogenezisben még nem ismert, ezért további célzott vizsgálatok fedhetik fel a hasítás jelentőségét és a sejtekre gyakorolt hatását. A SARS-CoV és a SARS-CoV-2 Mpro enzimek igen hasonló szubsztrát-preferenciái következtében a CTBP fehérjék a SARS-CoV Mpro szubsztrátjai is lehetnek, a CTBP fehérjék processzálásának jelentőségét azonban különböző sejttípusok és/vagy fajok kontextusában is meg kell vizsgálni. Az általunk

alkalmazott módszerek alkalmasnak bizonyultak a SARS-CoV-2 Mpro szubsztrátjainak azonosítására, a hasítóhelyek azonosítására és vizsgálatára, valamint alkalmazható lehet további celluláris szubsztrátok azonosítására és az Mpro enzimkinetikai vizsgálataiban vagy gátlószerek hatékonyságának tesztelésében.

A His₆-MBP-FP rekombináns szubsztrát-alapú rendszer - mellyel kutatócsoportunk már több különböző proteolitikus enzimet is vizsgált sikeresen - előnye, hogy változatos mérési eljárásokban alkalmazható, így homogén és heterogén esszékben egyaránt. A hasítatlan szubsztrátok és a hasítási termékek vizsgálhatóak gélelektroforézisen, fluorimetriás mérésen vagy tömegspektrometriás analízisen alapuló módszerekkel is (**Bozóki, és mtsai, 2018; Bozóki és mtsai, 2019; Mótyán és mtsai, 2018; Gazda és mtsai, 2020; Golda és mtsai, 2020; Bozóki és mtsai, 2020**). A rendszer sokoldalúsága mellett egyik jellemző tulajdonsága, hogy az enzimaktivitás vizsgálatára csak végpontos mérésekben alkalmazható. Eddig nem dolgoztunk ki olyan metodikát, amely lehetővé tenné a proteáz aktivitás valós idejű vizsgálatát, ezért munkánk során célunk volt egy olyan új kísérletes megközelítés kidolgozása, ami lehetővé teszi a proteáz aktivitás valós idejű nyomon követését.

Az új proteáz aktivitásmérési módszer kidolgozásához olyan kísérletes rendszert választottunk, melyben a rekombináns fehérje szubsztrátok hatékonyan alkalmazhatóak és kihasználhatóak az affinitás címké(k) által nyújtott előnyös tulajdonságok (pl. immobilizáláshoz). Választásunk a bioréteg interferometriára esett, mely mérési módszer egy bioszenzor felületén kialakított biomolekuláris réteg vastagságának optikai mérésén alapul (**14. ábra**). Ezt a módszert leginkább intermolekuláris (pl. fehérje-fehérje) kölcsönhatások vizsgálatára használják, enzimaktivitás mérésekben való felhasználása azonban nem elterjedt, csupán néhány példát ismerünk ilyen típusú alkalmazására. Azt feltételeztük, hogy a BLI technika alkalmazható proteolitikus enzimek aktivitásának valós idejű mérésére, hiszen míg a fehérjék közötti kölcsönhatások vizsgálatának alapját az képezi, hogy a kölcsönhatások kialakulása következtében a biomolekuláris réteg vastagsága megnő, addig a proteolízis várhatóan csökkenti a szubsztrát molekulaméretét, amely a biomolekuláris réteg vastagságának csökkenését eredményezi.

A BLI-alapú módszer kidolgozásához és alkalmazásához His₆-MBP-FP szubsztrátokat terveztünk, amelyek a HIV-1 PR természetes és módosított hasítóhelyeit tartalmazták (**1. és 2. táblázat**). A mérésekhez katalitikusan aktív (HIV-1 PR_{vad}) és inaktív (HIV-1 PR_{ΔNΔC}) enzimeket használtunk (**23. és 24. ábra**). A HIV-1 PR_{vad} képes volt a „szabad” (oldatban történő hasítás esetén) és a Ni-NTA bioszenzor felületére immobilizált szubsztrátok hasítására

egyaránt, ami igazolta, hogy a szubsztrátok alkalmazhatóak a módszer kidolgozásához (26. ábra). Az inaktív enzimmel való méréssel (26. ábra), az enzimaktivitás proteáz inhibitorral (atazanavir) történő gátlásával (30. ábra), valamint a detektálható jel enzimkoncentrációtól való függése vizsgálatával (29. ábra) is alátámasztottuk, hogy a mérés proteolízis-szakaszában megfigyelt változásokat nem a szubsztrát spontán disszociációja (vagy más aspecifikus hatás) okozta, hanem az szubsztrátok proteolitikus hasítása. Eredményeink összhangban vannak a Sharma és Wilkens által leírt információkkal, akik PreScission proteázt használtak a szenzor felületén maradt molekulák eltávolítására (Sharma és Wilkens, 2017). Méréseikben a proteolitikus emésztés következtében a biomolekuláris réteg vastagsága csökkent, ami a kötődési jel intenzív csökkenésével volt észlelhető, de a mérést nem alkalmazták a proteáz aktivitás mérésére. A BLI-alapú méréseket korábban alkalmazták már retrovírus-szerű proteáz vizsgálatában is, a *Leishmania major* DNS károsodás indukálható fehérje 1 (*DNA damage-inducible protein 1*, Ddi1) kölcsönhatását vizsgálták HIV-1 PR inhibitorokkal szemben (Kumar és Suguna, 2018), azonban a vizsgálatok célja ebben az esetben sem az enzimaktivitás mérése volt, hanem gátlószerek kötési affinitásának meghatározása.

Annak érdekében, hogy optimalizáljuk a szubsztrát immobilizáció körülményeit, különböző kétértékű ionokat teszteltünk. Eredményeink alapján a Ni^{2+} töltésű bioszenzorok voltak a leghatékonyabban használhatók az alkalmazott kísérleti rendszerben, de a nikkellal töltött szenzorok használatakor értük el a legnagyobb reprodukálhatóságot is (28. ábra). A regenerált szenzorok alkalmazása a költséghatékonyság szempontjából előnyös lehet. A nem-specifikus kötődés minimalizálása érdekében blokkolószerek (pl. szarvasmarha szérum albumin, BSA) vagy nem-ionos detergenssek is (pl. Tween-20) alkalmazhatók, valamint a pufferkörnyezet is tovább optimalizálható. A szubsztrát felkötése szükség szerint tovább stabilizálható lehet például kémiai térhálósító-szerek alkalmazásával, mely a Ni-NTA felület és a His-címkét tartalmazó fehérje közötti kölcsönhatásokat stabilizálja kovalens keresztkötés révén. Figyelembe kell azonban venni, hogy a szabadon maradó kötőfelszín blokkoló fehérjéket (pl. BSA) a vizsgálni kívánt proteáz potenciálisan elhasíthatja, ezáltal “fals” jelet generálva a mérés proteolízis szakaszában. Különböző bioszenzorok állnak rendelkezésre pl. biotinizált, His- vagy GST-fúzionált fehérjék immobilizálásához, ezért számos különböző fehérje szubsztrát is használható lehet a BLI-alapú proteáz mérésekben. Antitesttel bevont bioszenzorok szintén rendelkezésre állnak a His címkével ellátott fehérjék immobilizálására, de figyelembe kell venni, hogy ezeket az antitesteket is potenciálisan hasíthatja a vizsgálni

kívánt proteáz. Ezért olyan szenzorok használata ajánlott, amelyek nem érzékenyek az adott enzim általi proteolitikus hasításra.

Annak meghatározására, hogy a kidolgozott eljárás alkalmas-e aminosavpreferenciák meghatározására, 9 aminosavból álló hasítóhelyeket vizsgáltunk, melyhez a vad típusú MA/CA hasítóhelyet reprezentáló szubsztrátot használtuk (**Bozóki, és mtsai 2018**), valamint a P2 pozícióban módosított szekvenciát tartalmazó szubsztrátot is készítettünk (His₆-MBP-VSQLY*PIVQ-mEYFP). Azért esett a választásunk ezen szekvenciák vizsgálatára, mert kutatócsoportunk oligopeptid szubsztrátokon alapuló mérésekben korábban kimutatta, hogy P2-Leu mutáns szubsztráton mért katalitikus hatékonyság szignifikánsan alacsonyabb a vad típusú szubsztráton mérthez képest (**Boross és mtsai, 1999; Bagossi és mtsai, 1998; Bagossi és mtsai, 2005**). A relatív hasítási hatékonyságok BLI-alapú vizsgálatában is a vad típusú hasítóhely iránti magasabb preferenciát mutattuk ki (**33. ábra**), ami összhangban volt a rekombináns szubsztrátok gélelektroforetikus analízisében tapasztalt különbségekkel is (**25. ábra**). Eredményeink azt mutatták, hogy a BLI-alapú módszer a His₆-MBP-FP szubsztrát rendszerrel kombinálva használható a relatív hasítási hatékonyságok meghatározására valós idejű vizsgálatokban.

A módszert ezért a HIV-1 PR enzimfelszíni kötőhelye, az ún. szubsztrátkötő árok vizsgálatára is alkalmaztuk. Ez a kölcsönható felszín a szubsztrát P12-P5 és P5'-P12' aminosavmaradékok felismeréséért felelős, így a szubsztrátkötő árok révén a HIV-1 PR az aktív helyen (S4-S1 és S1'-S4') kívüli felszíneken is képes a szubsztrát kötésére (**Laco, 2015**). Az S5 szubsztrátkötő hely az oldószert felé nyitott, az S4-S1 zsebekhez kevésbé jól definiált, de szubsztrát felismeréshez való hozzájárulását kísérletileg már igazolták az 1-es típusú humán T-sejtes leukémia vírus (HTLV-1) (**Tózsér és mtsai, 2000**), valamint a HTLV-2 és HTLV-3 vírus PR-ok esetében egyaránt (**Kassay és mtsai, 2021**). Kutatócsoportunk már végzett az élesztő Ty1 retrotranszpozon proteáz szubsztrátkötő árkának (S12-S5 és S5'-S12) vizsgálatára irányuló kísérleteket is (**Gazda, és mtsai 2020**), de az eredmények nem szolgáltak egyértelmű bizonyítékokkal a kölcsönható felület létezésére vonatkozóan. A HIV-1 PR esetében leírt (**Laco, 2005**) szubsztrátkötő árok szerepét a szubsztráttal való kölcsönhatások kialakításában független kísérletes vizsgálatokkal mindeddig nem erősítették meg, ezért olyan His₆-MBP-mEYFP szubsztrátokat terveztünk, amelyek a 24 aminosav hosszúságú vad típusú és módosított HIV-1 MA/CA hasítóhelyet tartalmazták. A módosított hasítóhely esetében P12-P6 és P5'-P12' pozíciókban változtattuk meg a szekvenciát annak érdekében, hogy megváltoztassuk az enzim felszínén kialakuló kölcsönhatások mintázatát úgy, hogy az aktív helyen (P5-P4') a kölcsönható

aminosavmaradékokat nem módosítjuk. A BLI-alapú módszerrel mért relatív kezdeti sebességek magasabbak voltak a vad típusú hasítóhelyet tartalmazó szubsztrát esetében (**34. ábra**), ami arra utalt, hogy - a mutációk hatására megváltozott enzim-szubsztrát kölcsönhatások miatt - a mutáns szubsztrát hasítási hatékonysága csökkent. Eredményeink megerősítésére ugyanezen szubsztrátokkal mikroyöngy-alapú fluorimetriás méréseket is végeztünk az enzimkinetikai paraméterek meghatározására, ami alátámasztotta megfigyeléseinket és a vad típusú szubsztrát iránti magasabb preferenciát igazolta (**6. táblázat**). Eredményeink elsőként szolgáltatott kísérletes bizonyítékot független kísérletekben a HIV-1 PR szubsztrátkötő árkának létezésére, valamint megerősítették, hogy a BLI-alapú eljárás alkalmazható az aminosav preferenciák és a szubsztrátspecificitás valós idejű vizsgálatára.

A tisztított rekombináns szubsztrátok mellett méréseket végeztünk a rekombináns szubsztrátot tartalmazó teljes sejtlizátummal is annak vizsgálatára, hogy előzetesen nem tisztított fehérjék is immobilizálhatóak-e a bioszenzorok felszínére. Méréseinket His₆-MBP-VSQNY*PIVQ-mEYFP-t expresszáló sejtek lizátumával végeztük (**31. ábra**). Tapasztalataink alapján a szubsztrát immobilizálható teljes sejtlizátumból megfelelő mosási lépéseket követően és a tisztított fehérjéhez hasonlóan hasítható HIV-1 PR-zal. A teljes sejtlizátumban lévő egyéb fehérjék nincsenek negatív hatással az immobilizációra és nem okozzák a szubsztrátok nem kívánatos disszociációját vagy degradációját (**32. ábra**). A nem-tisztított szubsztrátok alkalmazása csökkentheti a kísérlet idő- és költségigényét, de fontos megjegyezni, hogy a szubsztrátok előzetes tisztítása előnyös lehet, mivel a szennyeződések kiküszöbölése növelheti a szenzor-feltöltés hatékonyságát és segíthet elkerülni az aspecifikusan kötődő fehérjékkel való interferenciát. A BLI-alapú proteáz vizsgálat legfőbb előnyeit és korlátait a következőkben ismertetem.

Tapasztalataink alapján a BLI-alapú proteázaktivitás mérések során figyelembe kell venni a mérések során alkalmazott hőmérsékletet. A HIV-1 PR hőmérsékleti optimuma közel 37°C, de méréseinket az enzim számára relatíve szuboptimális hőmérsékleten (~25°C) végeztük, mivel az alkalmazott BLItz műszer nem rendelkezik hőmérséklet-szabályzó egységgel. Az alkalmazott enzim hőmérsékleti optimumánál végzett mérések során a jelváltozás kezdeti sebessége magasabb lehet, mint szuboptimális hőmérsékleten. Az OctetRed96e műszer (Pall Forté Bio, Fremont, CA, USA) használata ilyen szempontból előnyös lehet, mivel ez a műszer 15°C és 40°C közötti tartományban képes a hőmérséklet szabályozására. Eredményeink azonban azt mutatják, hogy a HIV-1 PR esetében az enzimátikus vizsgálatok szuboptimális hőmérsékleten is elvégezhetőek, a mérési módszer

nagyfokú érzékenysége miatt. Az OctetRed96e másik előnye a BLItz-hez képest, hogy a többcsatornás rendszer használata lehetővé teszi több minta egyidejű mérését, automatizált rendszerként 96 lyukú mikrotiter lemezekhez is használható. Az automatizált mérések alkalmassá teszik ezt a módszert a nagy átteresztőképességű elemzésekre és csökkenthetik az elemzések idejét is.

Az alkalmazott bioszenzor típusától függően figyelembe kell venni az immobilizáció és az enzimkatalízis számára egyaránt optimális reakciókörülményeket, például az alkalmazott puffer összetételét. Kísérleteinkben a proteolízis lépést alacsonyabb pH-n (~5,5) végeztük. Az alacsonyabb pH negatív hatással lehet a szubsztrát immobilizációjára, de kisebb térfogatban (*drop* módban történő) mérés esetén a spontán disszociáció mértéke csökkenthető. A spontán disszociáció mértéke magasabb pH (>6,0) alkalmazásával tovább csökkenthető.

Az enzimkinetikai paraméterek meghatározásához a mikrogyöngy-alapú vizsgálat alkalmazása lenne előnyös (**Bozóki és mtsai, 2018**), mivel a reakcióelegyek mikrocentrifugacsövekben vagy mikrotiter lemezben történő elkészítése biztosíthatja a megfelelő szubsztrát-koncentrációk beállítását. A BLI-alapú vizsgálatban a szubsztrát-koncentráció gradienseinek beállítása körülményes lehet, mert a szenzorokhoz kötődő szubsztrát mennyisége nem határozható meg pontosan. Részleges megoldásként egy, a vizsgált proteáz által nem hasított fehérjét lehetne használni a szubsztrátoldat hígítására, de feltételezéseink szerint a szenzor felületére kötődő hasadó szubsztrát és nem-hasadó fehérjék (pl. His₆-MBP-FP és His₆-MBP) arányát nem lehet megbízhatóan szabályozni és számszerűsíteni. Annak ellenére, hogy a BLI-alapú eljárás nem alkalmas enzimkinetikai mérésekre, hatékonyan alkalmazható például specificitás-vizsgálatokban vagy inhibitor molekulák hatásának vizsgálatában.

A BLI előnye, hogy jelölésmentes módszerként a jel változását közvetlenül a szubsztrát proteolízise okozza és a termékképződés optikai méréssel detektálható. Ennek megfelelően nincs szükség a fluoreszcens jel leolvasására és a fluoreszcens fehérje stabilitása nem befolyásolja az eredményeket. Az itt leírt munkában His₆-MBP-FP szubsztrátokat alkalmaztunk, és bár a BLI mérésekben a termékképződést optikai méréssel detektáltuk, a vizsgálatok kiegészíthetők a szubsztrátok és termékek fluorimetria- és PAGE-alapú mérésével, valamint tömegspektrometriás mérésével is, azaz ugyanazok a His₆-MBP-FP rekombináns szubsztrátok több különböző típusú mérésben is alkalmazhatók és különböző módon detektálhatóak.

A rekombináns szubsztrátok BLI-alapú vizsgálatban való használatának további előnye, hogy a fehérjék könnyen és költséghatékonyan előállíthatók bakteriális expressziós rendszerek segítségével (**Bozóki és mtsai, 2018**). Ezzel szemben a HPLC- és FRET-alapú technikákban használt jelölt vagy nem-jelölt oligopeptidek szintézise jelentősen drágább és időigényesebb. A módszer további előnye, hogy nincs szükség szerves oldószerek használatára úgy, mint az oligopeptidek HPLC-alapú elválasztása esetén, ugyanis a kromatográfiás készülékek használata jelentős mennyiségű oldószer használatát igényli (**Bagossi és mtsai, 2005**).

Összefoglalva, az általunk kidolgozott BLI-alapú proteáz esszé egy olyan módszer, amelynek segítségével folyamatos optikai méréssel, valós időben követhető nyomon a proteolitikus reakció. Bár a valós idejű homogén (pl. FRET-alapú) és heterogén (pl. felületi plazmon rezonancia) proteáz próbák száma korlátozott (**Ong és Yang, 2017**), a BLI-alapú megközelítés jó alternatíva lehet a termékképződés folyamatos mérésére. Ez a technika egy új megközelítés mind a laboratóriumunkban kifejlesztett His₆-MBP-FP rekombináns fehérje szubsztrát rendszer, mind pedig a BLI felhasználásához. A szubsztrátok sokoldalú felhasználhatóságának köszönhetően a BLI-alapú vizsgálat számos különböző szubsztráthoz és proteázhoz adaptálható.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

A doktori értekezésem alapjául egy korábban kidolgozott rekombináns fluoreszcens fehérje szubsztrát rendszer szolgált, melynek kidolgozásában munkám során részt vettem. Ezt a meglévő technológiát alkalmaztuk a HIV-1 és SARS-CoV-2 proteázok szubsztrát-specifitásának vizsgálatára és egy új proteáz aktivitásmérési módszer kidolgozására.

A HIV-1 PR vizsgálata céljából olyan szubsztrátokat hoztunk létre, melyek a HIV-1 nukleokapszid proximális cink-ujj motívumában lévő vad típusú (N17) és mutáns (N17T, N17L, N17F, I14-ins-N17G és K14I-N17G) proteolitikus hasítóhelyeket tartalmazták. Vizsgáltuk a szubsztrátok konformációs állapotait. A HIV-1 PR nem hasította a cink-ujj motívumot cink ion jelenlétében, míg a szupermásodlagos szerkezet kialakulását megakadályozó EDTA és DDT jelenlétében processzálást tapasztaltuk. Elvégeztük a hasítási hatékonyságok összehasonlító vizsgálatát, a legnagyobb mértékű szubsztrát-konverziót az N17F mutáns esetében tapasztaltuk, eredményeink összhangban vannak a korábban oligopeptid szubsztrátokon meghatározott aminosav preferenciákkal.

A SARS-CoV-2 Mpro vizsgálatát olyan szubsztrátok *in vitro* vizsgálatával végeztük el, melyek a proteáz ismert vagy *in silico* módszerek felhasználásával jóslott hasítási szekvenciát tartalmazták. Igazoltuk, hogy a SARS-CoV-2 Mpro az ismert és a jóslott hasítóhely szekvenciákon belül egyaránt képes hasítani a szubsztrátokat. Sikeresen azonosítottuk a hasítási pozíciókat a szekvenciákon belül, majd enzimkinetikai méréseket végeztünk a szubsztrát-specifitás vizsgálata érdekében. Munkánk eredményeként azonosítottuk a SARS-CoV-2 Mpro egy eddig ismeretlen szubsztrátját, a humán CTBP1 fehérjét, valamint a fehérjében lévő új hasítóhelyet, melyet az enzim kisebb hatékonysággal hasított a SARS-CoV-2 poliprotein autoproteolitikus szekvenciához képest.

A rekombináns fluoreszcens fehérje szubsztrátokat felhasználtuk egy új, a proteolitikus aktivitás mérésére alkalmas, bioréteg interferometria-alapú módszer kidolgozására, a HIV-1 proteázt alkalmazva modell enzimként. A mérés körülményeinek optimalizálását követően a módszert sikeresen alkalmaztuk a HIV-1 PR specifitásának tanulmányozása során, vizsgáltuk az enzim P2 aminosav preferenciáját, valamint igazoltuk az enzimfelszíni szubsztrátkötő árok szerepét a szubsztráttal való kölcsönhatások kialakításában. Módszerünk segítheti a BLI ezen új felhasználási lehetőségének elterjedését, mert lehetővé teszi a proteáz aktivitás valós idejű mérését kis térfogatban és nagy áteresztőképességű rendszerekkel is kompatibilis.

9. SUMMARY

My PhD thesis is based on the use of a previously developed recombinant fluorescent protein substrate system. This system was used to investigate the substrate specificity of HIV-1 and SARS-CoV-2 proteases, furthermore, we used the recombinant substrates to develop a new method for real-time measurement of protease activity.

To study HIV-1 protease, we prepared recombinant substrates representing the wild-type (N17) and mutant (N17T, N17L, N17F, I14_ins-N17G, and K14I-N17G) proteolytic cleavage sites of HIV-1 nucleocapsid's proximal zinc-finger motif. The conformational states of the substrates were investigated. The zinc-finger motif was not cleavable by HIV-1 protease in the presence of zinc ion, whereas processing was observed in the presence of EDTA and DDT which prevented the formation of the supersecondary structure. A comparative analysis of cleavage efficiencies was performed, we observed the highest substrate conversion for the N17F mutant, our results are consistent with the amino acid preferences determined previously on oligopeptide substrates.

We performed the *in vitro* investigation of such substrates which represented a known or an *in silico*-predicted cleavage site sequence of SARS-CoV-2 Mpro. We confirmed that the SARS-CoV-2 Mpro was able for the processing of the substrates containing either the known or the predicted cleavage site sequences, as well. After the identification of the cleavage positions we performed enzyme kinetic measurements to investigate substrate specificity. As a result of our work, we have identified a previously unknown substrate of SARS-CoV-2 Mpro, the human CTBP1 protein, and a novel cleavage site was also identified in this protein, which was processed with lower efficiency than the autoproteolytic cleavage site sequence of SARS-CoV-2 polyprotein.

The recombinant fluorescent protein substrates were used to develop a novel method for the measurement of proteolytic activity by bio-layer interferometry, using HIV-1 protease as a model enzyme. After optimization of the assay conditions, the method was successfully applied to study the specificity of HIV-1 PR by investigating its P2 amino acid preference and to demonstrate that the substrate-groove interaction site at the enzyme surface is involved in the formation of enzyme-substrate interactions. The designed method may help to expand the use of BLI for new applications by allowing real-time measurement of protease activity in small volumes and in a high throughput-compatible manner.

10. IRODALOMJEGYZÉK

- Anand K**, Palm GJ, Mesters JR, Siddell SG, Ziebuhr J, Hilgenfeld R. Structure of coronavirus main proteinase reveals combination of a chymotrypsin fold with an extra alpha-helical domain. *EMBO J*. 2002; 21(13): 3213-24.
- Anand K**, Ziebuhr J, Wadhvani P, Mesters JR, Hilgenfeld R. Coronavirus main proteinase (3CLpro) structure: basis for design of anti-SARS drugs. *Science*. 2003; 300(5626): 1763-7.
- Baeuerle PA**, Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol*. 1994; 12: 141-79.
- Bagossi P**, Cheng YS, Oroszlan S, Tözsér J. Comparison of the specificity of homo- and heterodimeric linked HIV-1 and HIV-2 proteinase dimers. *Protein Eng*. 1998; 11(6): 439-45.
- Bagossi P**, Sperka T, Fehér A, Kádas J, Zahuczky G, Miklóssy G, Boross P, Tözsér J. Amino acid preferences for a critical substrate binding subsite of retroviral proteases in type 1 cleavage sites. *J Virol*. 2005; 79(7): 4213-8.
- Barré-Sinoussi F**, Ross AL, Delfraissy JF. Past, present and future: 30 years of HIV research. *Nat Rev Microbiol*. 2013; 11(12): 877-83.
- Berg BH**, Tholey A. Mass spectrometry-based proteomics strategies for protease cleavage site identification. *Proteomics*. 2012; 12(4-5): 516-29.
- Boross P**, Bagossi P, Copeland TD, Oroszlan S, Louis JM, Tözsér J. Effect of substrate residues on the P2' preference of retroviral proteinases. *Eur J Biochem*. 1999; 264(3): 921-9.
- Bozóki B**, Gazda L, Tóth F, Miczi M, Mótyán JA, Tözsér J. A recombinant fusion protein-based, fluorescent protease assay for high throughput-compatible substrate screening. *Anal Biochem*. 2018; 540-541: 52-63.
- Bozóki B**, Mótyán J, Miczi M, Gazda L, Tözsér J. Use of Recombinant Fusion Proteins in a Fluorescent Protease Assay Platform and Their In-gel Renaturation. *JoVE*. 2018; 143: 115.
- Bozóki B**, Mótyán JA, Hoffka G, Waugh DS, Tözsér J. Specificity Studies of the Venezuelan Equine Encephalitis Virus Non-Structural Protein 2 Protease Using Recombinant Fluorescent Substrates. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(20): 7686.
- Branchini BR**, Rosenberg JC, Ablamsky DM, Taylor KP, Southworth TL, Linder SJ. Sequential bioluminescence resonance energy transfer–fluorescence resonance energy transfer-based ratiometric protease assays with fusion proteins of firefly luciferase and red fluorescent protein. *Anal Biochem*. 2011; 414(2): 239-245.

- Bricker TL**, Darling TL, Hassan AO, Harastani HH, Soung A, Jiang X, Dai YN, Zhao H, Adams LJ, Holtzman MJ, Bailey AL, Case JB, Fremont DH, Klein R, Diamond MS, Boon ACM. A single intranasal or intramuscular immunization with chimpanzee adenovirus-vectored SARS-CoV-2 vaccine protects against pneumonia in hamsters. *Cell Rep.* 2021; 36(3): 109400.
- Chang KO**, Kim Y, Lovell S, Rathnayake AD, Groutas WC. Antiviral Drug Discovery: Norovirus Proteases and Development of Inhibitors. *Viruses.* 2019; 11(2): 197.
- Chen YW**, Yiu CB, Wong KY. Prediction of the SARS-CoV-2 (2019-nCoV) 3C-like protease (3CL^{Pro}) structure: virtual screening reveals velpatasvir, ledipasvir, and other drug repurposing candidates. *F1000Res.* 2020; 9:129.
- Chou CY**, Chang HC, Hsu WC, Lin TZ, Lin CH, Chang GG. Quaternary structure of the severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus main protease. *Biochemistry.* 2004; 43(47): 14958-70.
- Concepcion J**, Witte K, Wartchow C, Choo S, Yao D, Persson H, Wei J, Li P, Heidecker B, Ma W, Varma R, Zhao LS, Perillat D, Carricato G, Recknor M, Du K, Ho H, Ellis T, Gamez J, Howes M, Phi-Wilson J, Lockard S, Zuk R, Tan H. Label-free detection of biomolecular interactions using BioLayer interferometry for kinetic characterization. *Comb Chem High Throughput Screen.* 2009; 12(8): 791-800.
- Darke PL**, Nutt RF, Brady SF, Garsky VM, Ciccarone TM, Leu CT, Lumma PK, Freidinger RM, Veber DF, Sigal IS. HIV-1 protease specificity of peptide cleavage is sufficient for processing of gag and pol polyproteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988; 156(1), 297-303
- Debouck C**, Gorniak JG, Strickler JE, Meek TD, Metcalf BW, Rosenberg M. Human immunodeficiency virus protease expressed in *Escherichia coli* exhibits autoprocessing and specific maturation of the gag precursor. *Proc Natl Acad Sci.* 1987; 84(24), 8903-8906.
- Dorfman T**, Luban J, Goff SP, Haseltine WA, Göttlinger HG. Mapping of functionally important residues of a cysteine-histidine box in the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein. *J Virol.* 1993; 67: 6159–6169.
- Drosten C**. Is MERS another SARS? *Lancet Infect Dis.* 2013; 13(9): 727-8.
- Eizert H**, Bander P, Bagossi P, Sperka T, Miklóssy G, Boross P, Weber IT, Tözsér J. Amino acid preferences of retroviral proteases for amino-terminal positions in a type 1 cleavage site. *J Virol.* 2008; 82(20): 10111-7.
- Engelman A**, Cherepanov P. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nat Rev Microbiol.* 2012; 10(4): 279-290.

- Fehér A**, Weber IT, Bagossi P, Boross P, Mahalingam B, Louis JM, Copeland TD, Torshin IY, Harrison RW, Tózsér J. Effect of sequence polymorphism and drug resistance on two HIV-1 Gag processing sites. *Eur J Biochem.*, 2002; 269(16), 4114-4120.
- Fitzgerald PM**, McKeever BM, VanMiddlesworth JF, Springer JP, Heimbach JC, Leu CT, Herber WK, Dixon RA, Darke PL. Crystallographic analysis of a complex between human immunodeficiency virus type 1 protease and acetyl-pepstatin at 2.0-Å resolution. *J Biol Chem.* 1990; 265(24): 14209-19.
- Foley B**, Korber BTM, Leitner TK, Apetrei C, Hahn B, Mizrahi I, Mullins J, Rambaut A, Wolinsky S. HIV Sequence Compendium 2018.
- Fox JD**, Waugh DS. Maltose-binding protein as a solubility enhancer. *Methods Mol Biol.* 2003; 205: 99-117.
- Gammon ST**, Villalobos VM, Roshal M, Samrakandi M, Piwnica-Worms D. Rational design of novel red-shifted BRET pairs: Platforms for real-time single-chain protease biosensors. *Biotechnol Progress.* 2009; 25(2): 559-569.
- Gasteiger E**, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD, Bairoch A. ExpASY: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31(13): 3784-8.
- Gazda LD**, Joóné Matúz K, Nagy T, Mótyán JA, Tózsér J. Biochemical characterization of Ty1 retrotransposon protease. *PLoS One.* 2020; 15(1): e0227062.
- Golda M**, Mótyán JA, Mahdi M, Tózsér J. Functional Study of the Retrotransposon-Derived Human PEG10 Protease. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(7): 2424.
- Goldberg AL**. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature.* 2003; 426(6968): 895-9.
- Gordon DE**, és munkatársai. A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. *Nature.* 2020; 583(7816): 459-468.
- Griffiths JT**, Phylip LH, Konvalinka J, Strop P, Gustchina A, Wlodawer A, Davenport RJ, Briggs R, Dunn BM, Kay J. Different requirements for productive interaction between the active site of HIV-1 proteinase and substrates containing -hydrophobic*hydrophobic- or -aromatic*pro- cleavage sites. *Biochemistry.* 1992; 31(22): 5193-200.
- Griffin JWD**. SARS-CoV and SARS-CoV-2 main protease residue interaction networks change when bound to inhibitor N3. *J Struct Biol.* 2020; 211(3): 107575.
- Hilgenfeld R**. From SARS to MERS: crystallographic studies on coronaviral proteases enable antiviral drug design. *FEBS J.* 201; 281(18): 4085-96.

- Hu L**, Hu P, Luo X, Yuan X, You ZH. Incorporating the Coevolving Information of Substrates in Predicting HIV-1 Protease Cleavage Sites. *IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform.* 2020; 17(6): 2017-2028.
- Ishima R**, Ghirlando R, Tözsér J, Gronenborn AM, Torchia DA, Louis JM. Folded monomer of HIV-1 protease. *J Biol Chem.* 2001; 276(52): 49110-6.
- Jin Z**, Du X, Xu Y. Structure of M^{pro} from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. *Nature.* 2020; 582: 289–293.
- Kafaie J**, Song R, Abrahamyan L, Mouland AJ, Laughrea M. Mapping of nucleocapsid residues important for HIV-1 genomic RNA dimerization and packaging. *Virology.* 2008; 375: 592–610.
- Kapust RB**, Waugh DS. Escherichia coli maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci.* 1999; 8(8): 1668-1674.
- Kassay N**, Mótóyán JA, Matúz K, Golda M, Tözsér J. Biochemical Characterization, Specificity and Inhibition Studies of HTLV-1, HTLV-2, and HTLV-3 Proteases. *Life (Basel).* 2021; 11(2): 127.
- Kiemer L**, Lund O, Brunak S, Blom N. Coronavirus 3CLpro proteinase cleavage sites: possible relevance to SARS virus pathology. *BMC Bioinformatics.* 2004; 5: 72.
- Kojima T**, Nakane A, Zhu B, Alfi A, Nakano H. A simple, real-time assay of horseradish peroxidase using biolayer interferometry. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2019; 83(10): 1822-1828.
- Kooshkaki O**, Derakhshani A, Conradie AM, Hemmat N, Barreto SG, Baghbanzadeh A, Singh PK, Safarpour H, Asadzadeh Z, Najafi S, Brunetti O, Racanelli V, Silvestris N, Baradaran B. Coronavirus Disease 2019: A Brief Review of the Clinical Manifestations and Pathogenesis to the Novel Management Approaches and Treatments. *Front Oncol.* 2020. 10: 572329.
- Koudelka T**, Boger J, Henkel A, Schönherr R, Krantz S, Fuchs S, Rodríguez E, Redecke L, Tholey A. N-Terminomics for the Identification of In Vitro Substrates and Cleavage Site Specificity of the SARS-CoV-2 Main Protease. *Proteomics.* 2021; 21(2): e2000246.
- Kumar S**, Suguna K. Crystal structure of the retroviral protease-like domain of a protozoal DNA damage-inducible 1 protein. *FEBS Open Bio.* 2018; 8(9): 1379-1394.
- Laco GS**. HIV-1 protease substrate-groove: Role in substrate recognition and inhibitor resistance. *Biochimie.* 2015; 118: 90-103.

- Laco GS.** Retroviral proteases: Correlating substrate recognition with both selected and native inhibitor resistance. *J Mol Biochem.* 2017; 45–63.
- Lawal MM, Sanusi ZK, Govender T, Maguire GEM, Honarparvar B, Kruger HG.** From Recognition to Reaction Mechanism: An Overview on the Interactions between HIV-1 Protease and its Natural Targets. *Curr Med Chem.* 2020; 27(15): 2514-2549.
- Lee SK, Potempa M, Kolli M, Özen A, Schiffer CA, Swanstrom R.** Context surrounding processing sites is crucial in determining cleavage rate of a subset of processing sites in HIV-1 Gag and Gag-Pro-Pol polyprotein precursors by viral protease. *J Biol Chem.* 2012; 287(16): 13279-90.
- Liu Z, Wang Y, Brunzelle J Kovari IA, Kovari LC.** Nine crystal structures determine the substrate envelope of the MDR HIV-1 protease. *Protein J.*, 2011; 30(3): 173-183.
- Lockhat HA, Silva JR, Alves CN, Govender T, Lameira J, Maguire GE, Sayed Y, Kruger HG.** Binding free energy calculations of nine FDA-approved protease inhibitors against HIV-1 subtype C I36T↑T containing 100 amino acids per monomer. *Chem Biol Drug Des.* 2016; 87(4): 487-498.
- Mahalingam B, Louis JM, Reed CC, Adomat JM, Krouse J, Wang YF, Harrison RW, Weber IT.** Structural and kinetic analysis of drug resistant mutants of HIV-1 protease. *Eur J Biochem.* 1999; 263(1): 238-45.
- Mahalingam B, Louis JM, Hung J, Harrison RW, Weber IT.** Structural implications of drug-resistant mutants of HIV-1 protease: high-resolution crystal structures of the mutant protease/substrate analogue complexes. *Proteins.* 2001; 43(4): 455-64.
- Mahdi M, Szojka Z, Mótyán JA, Tőzsér J.** Inhibition Profiling of Retroviral Protease Inhibitors Using an HIV-2 Modular System. *Viruses.* 2015 7(12): 6152-62.
- Mahdi M, Mótyán JA, Szojka ZI, Golda M, Miczi M, Tőzsér J.** Analysis of the efficacy of HIV protease inhibitors against SARS-CoV-2's main protease. *Virol J.* 2020; 17(1): 190.
- Mark-Danieli M, Laham, N Kenan-Eichler, M Castiel, A Melamed D, Landau M Bouvier, NM Evans, MJ Bacharach E.** Single point mutations in the zinc finger motifs of the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid alter RNA binding specificities of the gag protein and enhance packaging and infectivity. *J Virol.* 2005; 79: 7756–7767.
- Maschera B, Darby G, Palú G, Wright LL, Tisdale M, Myers R, Blair ED, Furfine ES.** Human immunodeficiency virus. Mutations in the viral protease that confer resistance to saquinavir increase the dissociation rate constant of the protease-saquinavir complex. *J Biol Chem.* 1996; 271(52): 33231-33235.

- Maseko SB**, Natarajan S, Sharma V, Bhattacharyya N, Govender T, Sayed Y, Maguire GE, Lin J, Kruger HG. Purification and characterization of naturally occurring HIV-1 (South African subtype C) protease mutants from inclusion bodies. *Protein Expr. Purif.* 2016; 122: 90-96.
- Mason SD**, Joyce JA. Proteolytic networks in cancer. *Trends Cell Biol.* 2011; 21(4): 228
- Miklóssy G**, Tózsér J, Kádas J, Ishima R, Louis JM, Bagossi P. Novel macromolecular inhibitors of human immunodeficiency virus-1 protease. *Protein Eng Des Sel.* 2008; 21(7): 453
- Mótyán JA**, Miczi M, Bozóki B, Tózsér J. Data supporting Ni-NTA magnetic bead-based fluorescent protease assay using recombinant fusion protein substrates. *Data in Brief.* 2018; 18: 203-208.
- Mótyán JA**, Miczi M, Tózsér J. Dimer Interface Organization is a Main Determinant of Intermonomeric Interactions and Correlates with Evolutionary Relationships of Retroviral and Retroviral-Like Ddi1 and Ddi2 Proteases. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(4): 1352.
- Muratov EN**, Amaro R, Andrade CH, Brown N, Ekins S, Fourches D, Isayev O, Kozakov D, Medina-Franco J, Merz KM, Oprea TI, Poroikov V, Schneider G, Todd MH, Varnek A, Winkler DA, Zakharov AV, Cherkasov A, Tropsha A. A critical overview of computational approaches employed for COVID-19 drug discovery. *Chem Soc Rev.* 2021; 50(16): 9121-9151.
- Ong ILH**, Yang KL. Recent developments in protease activity assays and sensors. *Analyst.* 2017; 142(11): 1867-1881.
- Pehrson JC**, Weatherman A, Markwell J, Sarath G, Schwartzbach SD. Use of GFP as a Reporter for the Facile Analysis of Sequence-Specific Proteases. *BioTechniques.* 1999; 27(1): 28-32.
- Piana S**, Sebastiani D, Carloni P, Parrinello M. Ab initio molecular dynamics-based assignment of the protonation state of pepstatin A/HIV-1 protease cleavage site. *J Am Chem Soc.* 2001; 123(36): 8730-7.
- Potempa M**. The triple threat of HIV-1 protease inhibitors. In: *The Future of HIV-1 Therapeutics.* Springer. 2015; 203-241.
- Puente XS**, Sánchez LM, Overall CM, López-Otín C. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat Rev Genet.* 2003; 4(7): 544-58.
- Qamar MTU**, Alqahtani SM, Alamri MA, Chen LL. Structural basis of SARS-CoV-2 3CL^{pro} and anti-COVID-19 drug discovery from medicinal plants. *J Pharm Anal.* 2020; 10(4): 313-319.

- Rawlings ND**, Barrett AJ, Bateman A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40(D1): D343-D350.
- Rawlings ND, Salvesen G.** Handbook of Proteolytic Enzymes, *Academic Press*, Vol. 1, 2013
- Reed CE**, Kita H. The role of protease activation of inflammation in allergic respiratory diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 2004; 114(5): 997-1008.
- Rein A**, Henderson LE, Levin JG. Nucleic-acidchaperone activity of retroviral nucleocapsid proteins: Significance for viral replication. *Trends Biochem. Sci.* 1998; 23: 297–301.
- Roberts MM**, Oroszlan S. The preparation and biochemical characterization of intact capsids of equine infectious anemia virus. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989; **160**:486–494.
- Schasfoort RBM.** Handbook of Surface Plasmon Resonance: Edition 2. 2017
- Sahin-Tóth M.** Human cationic trypsinogen. Role of Asn-21 in zymogen activation and implications in hereditary pancreatitis. *J Biol Chem.* 2000; 275(30): 22750-5.
- Schechter I**, Berger A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1967; 27: 157–162.
- Scott BM**, Lacasse V, Blom DG, Tonner PD, Blom NS. Predicted Coronavirus Nsp5 Protease Cleavage Sites in the Human Proteome: A Resource for SARS-CoV-2 Research. *BioRxiv* 2021.06.08.447224.
- Sharma S**, Wilkens S. Bilayer interferometry of lipid nanodisc-reconstituted yeast vacuolar H⁺-ATPase. *Protein Sci.* 2017; 26(5): 1070-1079.
- Shen HB**, Chou KC. HIVcleave: a web-server for predicting human immunodeficiency virus protease cleavage sites in proteins. *Anal Biochem.* 2008; 375(2): 388-90.
- Stankiewicz TR**, Gray JJ, Winter AN, Linseman DA. C-terminal binding proteins: central players in development and disease. *Biomol Concepts.* 2014; 5(6): 489-511.
- Stertz S**, Reichelt M, Spiegel M, Kuri T, Martínez-Sobrido L, García-Sastre A, Weber F, Kochs G. The intracellular sites of early replication and budding of SARS-coronavirus. *Virology.* 2007; 361(2): 304-15.
- Subramanian T**, Zhao LJ, Chinnadurai G. Interaction of CtBP with adenovirus E1A suppresses immortalization of primary epithelial cells and enhances virus replication during productive infection. *Virology.* 2013; 443(2): 313-20.
- Swanstrom R**, Wills J. Synthesis, assembly, and processing of viral proteins; *Cold Spring Harbor Laboratory Press*: 1997.
- Szabó A**, Héja D, Szakács D, Zboray K, Kékesi KA, Radisky ES, Sahin-Tóth M, 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(25): 22535-45.

- Szabó A**, Salameh MA, Ludwig M, Radisky ES, Sahin-Tóth M. Tyrosine sulfation of human trypsin steers S2' subsite selectivity towards basic amino acids. *PLoS One*. 2014; 9(7): e102063.
- Thomas JA**, Gorelick RJ. Nucleocapsid protein function in early infection processes. *Virus Res*. 2008; 134: 39–63.
- Tindle C**, Fuller M, Fonseca A, Taheri S, Ibeawuchi SR, Beutler N, Katkar G, Claire A, Castillo V, Hernandez M, Russo H, Duran J, Crotty Alexander LE, Tipps A, Lin G, Thistlethwaite PA, Chattopadhyay R, Rogers TF, Sahoo D, Ghosh P, Das S. Adult stem cell-derived complete lung organoid models emulate lung disease in COVID-19. *Elife*. 2021; 10: e66417.
- Tóth F**, Kádas J, Mótyán JA, Tözsér J. Effect of internal cleavage site mutations in human immunodeficiency virus type 1 capsid protein on its structure and function. *FEBS Open bio*. 2016; 6(8): 847-859.
- Tözsér J**, Gustchina A, Weber IT, Blaha I, Wondrak EM, Oroszlan S. Studies on the role of the S4 substrate binding site of HIV proteinases. *FEBS Lett*. 1991; 279(2), 356-360.
- Tözsér J**, Friedman D, Weber IT, Blaha I, Oroszlan S. Studies on the substrate specificity of the proteinase of equine infectious anemia virus using oligopeptide substrates. *Biochemistry*. 1993; 32: 3347–3353.
- Tözsér 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(12): 6781-6788.
- Tözsér J**, Zahuczky G, Bagossi P, Louis JM, Copeland TD, Oroszlan S, Harrison RW, Weber IT. Comparison of the substrate specificity of the human T-cell leukemia virus and human immunodeficiency virus proteinases. *Eur J Biochem*. 2000; 267(20): 6287-6295.
- Tözsér J**, Oroszlan S. Proteolytic events of HIV-1 replication as targets for therapeutic intervention. *Curr Pharm Des*. 2003; 9: 1803–1815.
- Tözsér J**, Shulenin S, Louis JM, Copeland TD, Oroszlan S. In Vitro Processing of HIV-1 Nucleocapsid Protein by the Viral Proteinase: Effects of Amino Acid Substitutions at the Scissile Bond in the Proximal Zinc Finger Sequence. *Biochemistry*. 2004; 43: 4304–4312.
- Tözsér J**. Comparative studies on retroviral proteases: substrate specificity. *Viruses*. 2010; 2(1): 147-65.
- Turk, B**. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat Rev Drug Discov*. 2006; 5: 785–799.
- Ueda EKM**, Gout PW, Morganti L. Current and prospective applications of metal ion-protein binding. *J. Chromatogr. A* 2003; 988: 1–23.

- Ullrich S**, Nitsche C. The SARS-CoV-2 main protease as drug target. *Bioorg Med Chem Lett.* 2020; 30(17): 127377.
- Urban S**. Making the cut: central roles of intramembrane proteolysis in pathogenic microorganisms. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7: 411–423.
- V'kovski P**, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol.* 2021; 19(3): 155-170.
- Verma S**, Dixit R, Pandey KC. Cysteine Proteases: Modes of Activation and Future Prospects as Pharmacological Targets. *Front Pharmacol.* 2016; 7: 107.
- Vogt VM**. Proteolytic Processing and Particle Maturation. Morphogenesis and Maturation of Retroviruses. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1996; 214: 95-131.
- Voráčková I**, Suchanová Š, Ulbrich P, Diehl WE, Ruml T. Purification of proteins containing zinc finger domains using immobilized metal ion affinity chromatography. *Protein Expr. Purif.* 2011; 79: 88–95.
- Wagner RN**, Reed JC, Chanda SK. HIV-1 protease cleaves the serine-threonine kinases RIPK1 and RIPK2. *Retrovirology.* 2015; 12:74.
- Wang MY**, Zhao R, Gao LJ, Gao XF, Wang DP, Cao JM. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020; 10: 587269.
- Weiss RA**. How does HIV cause AIDS? *Science.* 1993; 260(5112): 1273-9.
- Weber IT**, Miller M, Jaskólski M, Leis J, Skalka AM, Wlodawer A. Molecular modeling of the HIV-1 protease and its substrate binding site. *Science.* 1989; 243(4893): 928-31.
- Weber IT**, Wang YF, Harrison RW. HIV Protease: Historical Perspective and Current Research. *Viruses.* 2021; 13(5): 839.
- Wilson JL**, Scott IM, McMurry JL. Optical biosensing: Kinetics of protein A-IGG binding using biolayer interferometry. *Biochem Mol Biol Educ.* 2010; 38(6): 400-7.
- Wlodawer A**, Erickson JW. Structure-based inhibitors of HIV-1 protease. *Annu Rev Biochem.* 1993; 62: 543-85.
- Woo PC**, Huang Y, Lau SK, Yuen KY. Coronavirus genomics and bioinformatics analysis. *Viruses.* 2010; 2(8): 1804-20.
- Wood R**. Atazanavir: Its role in HIV treatment. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2008; 785–796.
- Wondrak EM**, Sakaguchi K, Rice WG, Kun E, Kimmel AR, Louis JM. Removal of zinc is required for processing of the mature nucleocapsid protein of human immunodeficiency virus, type 1, by the viral protease. *J Biol Chem.* 1994; 269: 21948–21950.

- World Health Organization, HIV:** <https://www.who.int/teams/global-hiv-hepatitis-and-stis-programmes/hiv/strategic-information/hiv-data-and-statistics> (Utolsó elérés dátuma: 2021.12.27.)
- World Health Organization, COVID-19:** <https://covid19.who.int> (Utolsó elérés dátuma: 2022.01.06.)
- Wu A.** Genome composition and divergence of the novel coronavirus (2019-nCoV) originating in China. *Cell Host Microbe*. 2020; 27: 325–328.
- Wu C,** Liu Y, Yang Y, Zhang P, Zhong W, Wang Y, Wang Q, Xu Y, Li M, Li X, Zheng M, Chen L, Li H. Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods. *Acta Pharm Sin B*. 2020; 10(5): 766-788.
- Wu F,** Zhao S. Yu B. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. 2020; 579: 265–269.
- Yang H,** Xie W, Xue X, Yang K, Ma J, Liang W, Zhao Q, Zhou Z, Pei D, Ziebuhr J, Hilgenfeld R, Yuen KY, Wong L, Gao G, Chen S, Chen Z, Ma D, Bartlam M, Rao Z. Design of wide-spectrum inhibitors targeting coronavirus main proteases. *PLoS Biol*. 2005; 3(10): 324.
- Yang KS,** Ma XR, Ma Y, Alugubelli YR, Scott DA, Vatansever EC, Drelich AK, Sankaran B, Geng ZZ, Blankenship LR, Ward HE, Sheng YJ, Hsu JC, Kratch KC, Zhao B, Hayatshahi HS, Liu J, Li P, Fierke CA, Tseng CK, Xu S, Liu WR. A Quick Route to Multiple Highly Potent SARS-CoV-2 Main Protease Inhibitors. *ChemMedChem*. 2021; 16(6): 942-948.
- Zhang B.** Design of FRET-based GFP probes for detection of protease inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 323(2): 674-678.
- Zhang L,** Lin D, Sun X, Curth U, Drosten C, Sauerhering L, Becker S, Rox K, Hilgenfeld R. Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved α -ketoamide inhibitors. *Science*. 2020; 368(6489): 409-412.
- Zhang ZY,** Reardon IM, Hui JO, O'Connell KL, Poorman RA, Tomasselli AG, Heinrikson RL. Zinc inhibition of renin and the protease from human immunodeficiency virus type 1. *Biochemistry*. 1991; 30(36): 8717-21.
- Zhou J,** Li S, Leung KK, O'Donovan B, Zou JY, DeRisi JL, Wells JA. Deep profiling of protease substrate specificity enabled by dual random and scanned human proteome substrate phage libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020; 117(41): 25464-25475.

11. TÁRGYSZAVAK / KEYWORDS

1-es típusú humán immundeficiencia vírus

human immunodeficiency virus type 1

nukleokapszid cink-ujj

nucleocapsid zinc-finger

szubsztrátkötő árok

substrate groove

súlyos akut légzőszervi szindróma koronavírus 2

severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

rekombináns fluoreszcens fehérje szubsztrát

recombinant fluorescent protein substrate

fő proteáz

main protease

proteáz

protease

proteáz esszé

protease assay

bio-réteg interferometria

bio-layer interferometry

valós idejű enzimaktivitás mérés

real-time enzyme eactivity measurement

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, **Dr. Mótyán János Andrásnak** a PhD tanulmányaim alatt nyújtott szakmai segítségéért, mely lehetővé tette számomra a disszertációm elkészítéséhez szükséges elméleti és gyakorlati tudás elsajátítását.

Köszönettel tartozom **Dr. Tózsér Józsefnek** intézetvezető professzor úrnak, hogy elkezdhettem a PhD tanulmányaimat az intézetben, és szakmai segítségével támogatta a munkánkat.

Köszönettel tartozom **Dr. Golda Máriának, Dr. Matúz Krisztinának, Dr. Mohamed Mahdinak, Dr. Szabó Andrásnak, Dr. Szojka Zsófiának, Janics-Pető Szilviának, Kassay Norbertnek** és **Veres Ágotának**, akikre mindig számíthattam elméleti, gyakorlati és emberi tekintetben is!

Szeretném megköszönni **Dr. Bozóki Beának** és **Gazda Líviának** a rekombináns fluoreszcens szubsztrátokkal való munkavégzéssel kapcsolatos szakmai tapasztalataik átadását!

Köszönettel tartozom **Ambrus Viktor, Kunkli Balázs, Linkner Tamás** és **Miltner Noémi** munkatársaimnak a szakmai segítségükért.

Szeretnék köszönetet mondani a cöeliákia kutatócsoport vezetőjének **Dr. Korponay Szabó Ilmának**, hogy lehetővé tette kutatócsoportunk számára a BLItz készülék használatát, valamint a kutatócsoport tagjainak, különös tekintettel **Elek Ritának, Diós Ádámnak** és **Szabó Ildikónak** a munkám során nyújtott szakmai segítségükért.

Köszönöm **Dr. Nagy Tibornak** a hasítóhelyek meghatározásában végzett munkáját!

Külön köszönet illeti **Nataly Morales Granda** és **Toldi Vanda** barátaimat, hogy mindig számíthattam rájuk a munkámban és magánéleti dolgokban is! Köszönöm a rengeteg együtt töltött időt, a szakmai és baráti beszélgetéseket, a kávézásnak álcázott „brainstormingokat”.

Köszönet **Aranyos Anitának** és **Tóth Juditnak** az egyetemi éveim alatt nyújtott segítségükért, támogatásukért, barátságukért.

Köszönettel tartozom **Balogh Ágnesnek**, aki a középiskolás tanulmányim óta mentorálta utamat.

Köszönettel tartozom a **testvéreimnek**, a folyamatos támogatásért („minek tanulsz úgyis átmész”), a stresszoldó otthoni légkör megteremtéséért, köszönöm a **családom minden tagjának** az egyetemi éveim során és azon kívül nyújtott támogatásukért, szeretetükért. Külön köszönöm **nagynénémnek** és **mamámnak** a szerető támogatást, biztatást, **édesanyámnak**, hogy az első perctől kezdve hitt bennem, és mindig támogatott a döntéseimben.

Cám ơn anh đã luôn bên cạnh em trong những lúc khó khăn nhất. Em tin rằng có thể vượt qua tất cả khi bên anh.

A HIV-1 proteáz specificitásának vizsgálatát, valamint a bioréteg interferometria-alapú mérési módszer kidolgozását leíró közleményeket is az *International Journal of Molecular Sciences* folyóirat „In memory of Stephen Oroszlan” című különszámában publikáltuk, melyet a folyóirat a 2020. májusában elhunyt Dr. Stephen Oroszlanra emlékezve jelentetett meg. Dr. Stephen Oroszlan eredményei kiemelkedő jelentőségűek a retrovirologia területén, munkája jelentős mértékben járult hozzá a HIV proteáz és más retrovirális proteázok működésének megismeréséhez és megértéséhez. Munkája kutatócsoportunk számára is kiemelt jelentőséggel bír, hiszen Dr. Tózsér József azután alapította 1992-ben a Debreceni Egyetemen a Retrovirális Biokémiai Kutató Laboratóriumot, miután Dr. Stephen Oroszlannal együtt dolgozott az Amerikai Egyesült Államokban (Molecular Virology and Carcinogenesis Laboratory, NCI-Frederick Center for Cancer Research). Dr. Oroszlan kutatócsoportunk számos munkájában részt vett, a HIV-1 és más retrovirális proteázok specificitásának és antivirális inhibitorok hatásának vizsgálatát is inspirálta és segítette. A disszertáció alapjául szolgáló, a HIV-1 proteáz vizsgálatát célzó munkánk jelentős mértékben Dr. Stephen Oroszlan és kollégái korábbi eredményein alapulnak, munkánk tisztelgés emléke előtt.

A disszertációban bemutatott munkák az alábbi pályázatok támogatásával valósulhattak meg: Felsőoktatási Intézményi Kiválósági Program (NKFIH-1150-6/2019), Tématerületi Kiválósági Program (TKP2020-IKA-04), A gyógyszerkutatás újabb irányai: peptid-fehérje kölcsönhatások a magasabb rendű fehérjeszerveződések szabályozásában - PHARMPROT teaming (GINOP-2.3.2-15-2016-00044), Az orvos-, egészségtudományi- és gyógyszerész-képzés tudományos műhelyeinek fejlesztése (EFOP-3.6.3- VEKOP-16-2017-00009), Az intercelluláris kommunikáció szerepe a határfelületek (bőr, béltraktus) gyulladássos és immunológiai betegségeiben (GINOP-2.3.2-15-2016-00015), és a Gyógyszertechnológiai K+F fejlesztése a Debreceni Egyetemen (GINOP-2.3.3-15-2016-00021).

13. FÜGGELÉK



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

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

Nyilvántartási szám: DEENK/447/2021.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Miczi Mária
Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10068511

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Miczi, M.**, Diós, Á., Bozóki, B., Tózsér, J., Mótyán, J. A.: Development of a Bio-Layer Interferometry-Based Protease Assay Using HIV-1 Protease as a Model. *Viruses-Basel*. 13 (6), 1-20, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/v13061183>
IF: 5.048 (2020)
2. Mótyán, J. A., **Miczi, M.**, Oroszlan, S., Tózsér, J.: Specificity of the HIV-1 Protease on Substrates Representing the Cleavage Site in the Proximal Zinc-Finger of HIV-1 Nucleocapsid Protein. *Viruses-Basel*. 13 (6), 1-14, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/v13061092>
IF: 5.048 (2020)
3. **Miczi, M.**, Golda, M., Kunkli, B., Nagy, T., Tózsér, J., Mótyán, J. A.: Identification of Host Cellular Protein Substrates of SARS-COV-2 Main Protease. *Int. J. Mol. Sci.* 21 (24), 1-19, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21249523>
IF: 5.923

További közlemények

4. Mahdi, M., Mótyán, J. A., Szojka, Z., Golda, M., **Miczi, M.**, Tózsér, J.: Analysis of the efficacy of HIV protease inhibitors against SARS-CoV-2's main protease. *Virology*. 17 (1), 1-8, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12985-020-01457-0>
IF: 4.099





5. Mótyán, J. A., **Miczi, M.**, Tózsér, J.: Dimer Interface Organization is a Main Determinant of Intermonomeric Interactions and Correlates with Evolutionary Relationships of Retroviral and Retroviral-Like Ddi1 and Ddi2 Proteases.
Int. J. Mol. Sci. 21 (4), 1-24, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21041352>
IF: 5.923
6. Szojka, Z., Mótyán, J. A., **Miczi, M.**, Mahdi, M., Tózsér, J.: Y44A Mutation in the Acidic Domain of HIV-2 Tat Impairs Viral Reverse Transcription and LTR-Transactivation.
Int. J. Mol. Sci. 21 (16), 1-17, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21165907>
IF: 5.923
7. Bozóki, B., Mótyán, J. A., **Miczi, M.**, Gazda, L., Tózsér, J.: Use of Recombinant Fusion Proteins in a Fluorescent Protease Assay Platform and Their In-gel Renaturation.
JoVE. 143, 1-15, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3791/58824>
IF: 1.163
8. Bozóki, B., Gazda, L., 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
9. Mótyán, J. A., **Miczi, M.**, Bozóki, B., Tózsér, J.: Data supporting Ni-NTA magnetic bead-based fluorescent protease assay using recombinant fusion protein substrates.
Data in Brief. 18, 203-208, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dib.2018.03.031>

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 35,634

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):

16,019

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



Debrecen, 2021.10.05.