

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**A mezotripszinogén proteolízisének és a
hasnyálmirigy lipáz néhány természetes
mutációjának vizsgálata**

Toldi Vanda

Témavezető: Dr. Szabó András



DEBRECENI EGYETEM

Molekuláris Sejt- és Immunbiológiai Doktori Iskola

Debrecen, 2021

A mezotripszinogén proteolízisének és a hasnyálmirigy lipáz néhány természetes mutációjának vizsgálata

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

Írta: Toldi Vanda, okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Sejt- és Immunbiológiai doktori iskolája keretében

Témavezető: Dr. Szabó András, PhD

Az értekezés bírálói: Dr. Kiss Andrea, PhD
Dr. Kereszturi Éva, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szabó Gábor, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Rakonczay Zoltán, az MTA doktora
Dr. Gyémánt Gyöngyi, PhD
Dr. Kiss Andrea, PhD
Dr. Kereszturi Éva, PhD

Az értekezés védésének (online formában) időpontja: 2022. 03. 10. 13:00 óra

A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben a vitán részt kíván venni, úgy jelezze a toldi.vanda@med.unideb.hu email címre küldött üzenetben 2022.03.09. 16:00 óráig. A határidő lejáratát követően technikai okok miatt már nincs lehetőség a védéshez kapcsolódni

1. BEVEZETÉS

A humán hasnyálmirigy emésztésben betöltött szerepe kiemelkedő, mivel számos hormont és emésztőenzimet termel és szekretál. A krónikus hasnyálmirigy-gyulladás a hasnyálmirigy irreverzibilis gyulladással megbetegedése, ami mind az exokrin, mind az endokrin funkciókat érintheti. A krónikus hasnyálmirigy-gyulladás fő rizikófaktorai az alkohol-függőség és a dohányzás, de egyes emésztőenzimekben előforduló mutációk is hozzájárulhatnak a betegség kialakulásához. A genetikai rizikófaktorok tekintetében két fő útvonalat különböztethetünk meg egymástól: a tripszin-függő és a tripszin-független útvonalat.

A humán hasnyálmirigy három tripszin prekursor izoformát szekretál: a kationos, az anionos, illetve a mezotripszinogént. A tripszin-függő patológiás útvonal során a tripszin korai, hasnyálmirigyen belüli aktivációja figyelhető meg, amely a szerv önmérsztéséhez vezethet. A betegség kialakulásáért a tripszin aktiváció elégtelen szabályozása tehető felelőssé. A szabályozásért a szintén a hasnyálmirigyben termelődő egyik kimotripszin izoformának (kimotripszin C, CTRC) és egy kisméretű inhibitor fehérjének (SPINK1) van jelentős szerepe. A CTRC a hasnyálmirigyen belül proteolitikusan emészteni képes a kationos és anionos tripszinogéneket. A kalcium koncentráció növelése védi a tripszint a CTRC bontó aktivitásával szemben. A SPINK1 inhibitorra jellemző, hogy szelektíven nagy affinitással képes gátolni a kationos és anionos tripszint és óvja a hasnyálmirigy a betegség ellen.

A mezotripszin egy minor tripszin izoforma, amely egyedi tulajdonságokkal rendelkezik egy evolúciós mutációnak köszönhetően. Jellemzője, hogy a kationos és anionos tripszintől eltérően nem képes autoaktivációra, illetve nem gátolja hatékonyan a tripszin inhibitorok (SPINK1, SBTI). Ezzel szemben a mezotripszin képes degradálni ezeket a tripszin inhibitor fehérjéket. A mezotripszin CTRC általi szabályozásáról szóló ismereteink hiányosak, éppen ezért, érdeklődésünk a mezotripszin szerepére irányult és arra, hogy a CTRC hogyan befolyásolja az aktivitását, ez pedig milyen hatással van a mezotripszin funkciójára.

Egy másik lehetséges útvonal a tripszin-független útvonal, amely során egyes misszensz mutációk a szekretórikus fehérjék felgombolyodási hibáját és sejten belüli aggregációját okozhatják. Ez a folyamat maga után vonzza a rosszul feltekeredett fehérjék visszatartását az endoplazmás retikulumban (ER), ami hosszabb fennállás esetén ER stresszt indukálhat.

A közelmúltban azonosítottunk négy ritka heterozigóta hasnyálmirigy lipáz (PNLIP) mutációt (A174P, G233E, C254R, V454F) krónikus hasnyálmirigy-gyulladással betegekben és egészséges kontrollokban, amelyek nem szekretálódtak transzfektált emlős sejtekből.

Kutatásunk arra irányult, hogy részletesen megvizsgáljuk a rosszul feltekeredő PNLIP variánsok szerepét az ER stressz és a krónikus hasnyálmirigy-gyulladás kiváltásában.

2. CÉLKITŰZÉS

CTRC szerepének vizsgálata a mezotripszinogén inaktiválásában

- A kalcium védi a tripszineket a proteolitikus hasításokkal szemben, így célunk volt, hogy megvizsgáljuk a kalcium hatását a CTRC általi mezotripszin hasítás tekintetében.
- A CTRC által hasított mezotripszin katalitikus tulajdonságainak meghatározása rövid peptid szubsztrátokon, illetve nagyobb fehérje szubsztráton egyaránt.
- A CTRC által hasított mezotripszin inhibitor emésztő sajátosságainak vizsgálata.

Hasnyálmirigy lipáz mutációk szerepének vizsgálata krónikus hasnyálmirigy-gyulladásban

- Vad típusú és mutáns PNLIP expressziós plazmidok és adenovírus vektorok létrehozása.
- A PNLIP variánsok szekréciónak, illetve intracelluláris retenciónak vizsgálata HEK 293T, illetve AR42J patkány hasnyálmirigy sejtekben.
- A sejtben felhalmozódó hasnyálmirigy lipáz variánsok ER-stressz markerek (XBP1 mRNS érés, BiP expresszió) szintjére gyakorolt hatásának vizsgálata HEK 293T és AR42J sejtvonalon.

3. MÓDSZEREK

In vitro mutagenézis

A mezotripszinogén L81A, illetve a PNLIP mutációkat (A174P, G233E, C254R, V454F) szekvencia specifikus mutagenézissel hoztuk létre, majd azokat a pTrapT7 vagy a pcDNA3.1(-) vektorokba klónoztuk.

Adenovírus konstruktok létrehozása

A vad típusú és mutáns lipázt tartalmaz rekombináns adenovírus vektorokat AdenoONE Cloning és Expression kit (Sirion Biotech) segítségével hoztuk létre, majd jetPEI transzfekciós reagenssel jutattuk be HEK 293AD sejtekbe. A sejteket ismételt fagyasztás-olvasztás ciklusokkal tártuk fel és az adenovírusokat AdenoOne Purification kittel (Sirion Biotech) tisztítottuk meg. A fertőzőképes adenovírus koncentrációt AdEasy Viral Titer kit (Agilent) használatával határoztuk meg és IFU/ml egységben fejeztük ki.

Fehérje expresszió

A humán hasnyálmirigy tripszinogéneket *E. coli* BL21 (DE3) sejtekben expresszáltuk, majd feltárást követően *in vitro* refoldoltuk. Számos fehérjét expresszáltunk HEK 293T sejtekben, polietilén-imin transzfekciós reagens alkalmazásával. A patkány hasnyálmirigy sejteket (AR42J) dexametazonnal differenciáltuk, majd 5×10^7 IFU/ml lipázt tartalmazó rekombináns adenovírus vektorral transzduktáltuk.

Rekombináns fehérjék tisztítása

A humán tripszinogén izoformákat ekotin affinitás kromatográfiával tisztítottuk meg Äkta Prime készüléken. A pcDNA3.1(-) plazmidban expresszált fehérjék His-címkét tartalmaznak, így nikkel-affinitás kromatográfiával tisztítottuk Äkta Prime FPLC rendszeren, majd dializáltuk.

Emésztőenzimek aktiválása és titrálása

A tripszinogéneket humán enteropeptidáz, a CTRC-t kationos tripszin hozzáadásával aktiváltuk, majd aktív centrum titrálással határoztuk meg az aktív enzimek koncentrációját. A szabad tripszin, illetve CTRC aktivitását 405 nm-en detektáltuk.

Gélelektroforézis és denzitometria

A fehérjéket redukáló SDS poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) megfuttattuk 12 vagy 15 %-os SDS-poliakrilamid gélen. A fehérjesávokat a gélen Coomassie Brilliant Blue festés segítségével tettük láthatóvá. A fehérjesávok mennyiségi értékelését szemikvantitatív denzitometriás analízissel végeztük.

Mezotripszinogén hasítás és aktiválás

Az autolízis hurok hasításának vizsgálatához az L81A-mezotripszinogént CTRC-vel inkubáltunk 37 °C-on. Adott időpontokban kivettünk a reakcióelegyből, majd TCA-s kicsapást követően a fehérjesávokat 15 %-os redukáló SDS-PAGE-t követő Coomassie festéssel detektáltuk. Hasított mezotripszin előállításához az L81A-mezotripszinogént CTRC-vel inkubáltunk 37 °C-on, majd humán enteropeptidázzal aktiváltuk.

Mezotripszin aktivitásmérés

A mezotripszin aktivitásmérését 0,3 mM kromogén peptid tripszin szubsztráttal mértük, spektrofotometriával, 405 nm-en.

Kazein degradáció vizsgálata

A marha β -kazeint nem szulfatált és szulfatált, CTRC-vel hasított és intakt L81A-mezotripszinnel inkubáltuk, 37 °C-on. A feltüntetett időpontokban alikvotokat csaptunk ki TCA-val és 15 %-os redukáló SDS-PAGE-vel vizsgáltuk a kazein bomlását.

SBTI emésztés vizsgálata

Az SBTI-t L81A mezotripszinnel (nem szulfatált, szulfatált, illetve CTRC-vel hasított nem szulfatált és szulfatált forma) inkubáltuk, 37 °C-on. A jelzett időpontokban alikvotokat vettünk ki a reakcióelegyből, majd kicsaptuk TCA-val és 15 %-os redukáló SDS-PAGE-vel vizsgáltuk a szójabab tripszin inhibitor (SBTI) hasítását.

SPINK1 degradáció vizsgálata

SPINK1-t inkubáltunk L81A mezotripszinnel (nem szulfatált; szulfatált; CTRC hasított szulfatált és nem szulfatált forma), 37 °C-on. A SPINK1 degradációját kationos tripszin gátlási kísérletekkel követtük. A tripszin aktivitását kromogén peptid szubsztráttal detektáltuk spektrofotometriával 405 nm-en.

Enzim kinetikai mérések

A mezotripszin variánsok Michaelis-Menten kinetikai paramétereit kromogén rövid peptid szubsztrátok segítségével határoztuk meg. A K_m és k_{cat} értékeket szubsztrát koncentráció függvényében meghatározott reakciósebességből számítottuk ki hiperbolikus illesztéssel. Megmértük az intakt és CTRC-vel hasított szulfatált L81A-mezotripszin Michaelis-Menten paramétereit növekvő SBTI koncentrációknál, majd meghatároztuk az SBTI-re vonatkoztatott inhibitoros állandó (K_i) értéket.

Lipáz aktivitásmérés

A PNLIP aktivitásmérését a transzfektált HEK 293T sejtek médiumából végeztük, 3 mg/ml p-nitrofenil palmitát szubsztrátból képződött szabad p-nitrofenol mennyiségének spektrofotometriás meghatározásával 405 nm-en.

Sejtlizátumok készítése

Fehérje sejtlizátumok készítéséhez a HEK 293T és AR42J sejteket lizáltuk, majd a minták összfehérje koncentrációját BCA Protein Assay kit segítségével határoztuk meg.

Ultracentrifugálás

Az ultracentrifugálást a transzfektált HEK 293T sejtek lizátumából végeztük el 48 órával a transzfekció után. A célfehérje megoszlását a felülúszóban és a pellet frakcióban SDS-PAGE és western blot analízissel vizsgáltuk.

Fehérje immunoblot

A transzfektált HEK 293T/ transzduktált AR42J sejtek médiumában, illetve a sejtlizátumokban található célfehérjét redukáló SDS-PAGE-t követő immunoblot alkalmazásával detektáltuk. A PNLIP esetében egy HRP konjugált polihisztidin elleni antitestet, a BiP fehérje kimutatásának érdekében nyúl anti-GRP78 antitesttel inkubáltuk a blokkolt membránt. Másodlagos antitestként nyúl IgG elleni HRP-konjugált ellenanyagot használtunk. A GAPDH fehérjét anti-GAPDH elsődleges és HRP-konjugált anti-nyúl IgG másodlagos antitesttel detektáltuk. A fehérjesávokat WesternBright ECL HRP szubsztrát segítségével tettük láthatóvá.

RNS izolálás és reverz transzkripció

A transzfektált HEK 293T, illetve a transzduktált AR42J sejtekből össz-RNS-t izoláltunk, majd reverz transzkripciót alkalmaztunk.

XBP1 splicing vizsgálata

Az X-box-kötő fehérje-1 (XBP1) mRNS processzálas kimutatására szemikvantitatív PCR-t alkalmaztunk. Az éretlen és érett XBP1 mRNS meghatározására a PCR termékeket 2,5 %-os agaróz gélen futtattuk meg. Az éretlen és érett XBP1 DNS sávok arányát denzitometriával határoztuk meg.

BiP expresszió vizsgálata

Az immunglobulin kötő fehérje (BiP) mRNS expresszióját qPCR-rel határoztuk meg TaqMan primereket és TaqMan Universal PCR Mastermixet alkalmazva. A génexpresszió

kvantitálására a komparatív CT ($\Delta\Delta\text{CT}$) módszert alkalmaztuk. A kapott adatokat a $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ formula alapján számítottuk ki.

4. EREDMÉNYEK

4.1. CTRC SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA A MEZOTRIPSZINOGÉN INAKTIVÁLÁSÁBAN

Mezotripszinogén CTRC általi hasítása

Első lépésben megvizsgáltuk, hogy a CTRC milyen hatással van a mezotripszin aktivitására. Azt tapasztaltuk, hogy a CTRC növekvő koncentrációja serkentette az aktiváció sebességét, azonban csökkentette a végső aktivitás mértékét. Annak érdekében, hogy fény derüljön a jelenség molekuláris hátterére, SDS-PAGE segítségével követtük nyomon a hasítási mintázatot, majd Edman degradációval azonosítottuk a hasítási termékeket. Az eredményeink azt mutatták, hogy a mezotripszinogén négy CTRC hasítóhelyet tartalmaz, egyet az aktivációs peptidben (Phe18), egyet a kalciumkötő hurokban (Leu81), illetve kettőt az autolízis hurokban (Leu148, Phe150). A CTRC leghatékonyabban az autolízis hurokban található hasítóhelyeket emésztette. Eredményeink alapján megállapítható, hogy a kezdeti aktivitás növekedéséért az aktivációs peptid processzálása felelős, míg a végső aktivitás csökkenése a kalciumkötő, illetve az autolízis hurok hasításával magyarázható. Annak érdekében, hogy kizárólag a CTRC autolízis hurokra gyakorolt hatását vizsgáljuk, létrehoztunk egy L81A-mezotripszinogén variánst. A humán tripszin izoformák poszttranszlációsan szulfatálódnak a szubsztrátkötő helyen. Kíváncsiak voltunk, milyen hatással van a szulfatálás a mezotripszin működésére. A kísérleteink azt mutatták, hogy a CTRC gyorsabban hasította a szulfatált L81A-mezotripszinogént, mint a nem szulfatált megfelelőjét. Ezen kívül eredményeink azt mutatták, hogy a kalcium kivédi a CTRC hasítását.

Hasított mezotripszin katalitikus tulajdonságainak vizsgálata

Vizsgáltuk a CTRC hasítás hatását a mezotripszinogén aktivitására. A CTRC hasítás lényegesen csökkentette a mezotripszin aktivitását. Ezt követően meghatároztuk a mezotripszinek katalitikus tulajdonságait, rövid kromogén peptid szubsztrátok segítségével. A CTRC általi hasítás egy nagyságrenddel megnövelte a K_m értékeket, míg a k_{cat} érték nem változott. Ezt követően nagy fehérjeszubsztráton is elvégeztük a kísérleteket. A szulfatált mezotripszin gyorsabban hasította a kazeint, mint a nem szulfatált. A CTRC-vel hasított mezotripszin nem tudta hatékonyan hasítani a szubsztrátot. Összességében elmondható, hogy a CTRC általi hasítás lényegesen befolyásolja az enzim katalitikus tulajdonságait.

Hasított mezotripszin inhibitor kötésének vizsgálata

Megvizsgáltuk, hogy milyen hatása van a CTRC általi mezotripszin autolízis hurok hasításának a kisméretű fehérje inhibitor kötődésére, a szulfatált L81A-mezotripszin és az SBTI kötődését tanulmányoztuk. Meghatároztuk a SBTI K_i értékét mind a CTRC-vel hasított, mind a hasítatlan mezotripszinogén esetében. Az előbbi értéke lényegesen nagyobb, mint az utóbbié. A megfigyeléseink azt mutatták, hogy egy nagyságrenddel gyengébben kötődik az inhibitor a mezotripszinhez a CTRC általi hasítást követően.

Hasított mezotripszin inhibitor emésztésének vizsgálata

Az előző eredményeink igazolták, hogy a mezotripszin gyengébben kötődött az inhibitorokhoz, abban az esetben, ha a CTRC hasította az enzim autolízis hurok szakaszát. Így a következő kísérleteink arra irányultak, hogy a gyengébb kötődés csökkent tripszin inhibitor emésztéssel társul-e. A szulfatált L81A-mezotripszin több, mint kétszer olyan gyorsan hasította az SBTI-t, mint a nem szulfatált L81A-mezotripszin. Miután CTRC-vel hasítottuk a mezotripszin autolízis hurok régióját, az SBTI emésztés sebessége jelentősen lecsökkent. Mind a nem szulfatált, mind a szulfatált L81A-mezotripszin szinte teljesen inaktívvá vált.

Végezetül, az intakt és CTRC által hasított L81A-mezotripszin formákat (nem szulfatált és szulfatált) humán SPINK1 inhibitorral inkubáltuk. Eredményül azt kaptuk, hogy az intakt szulfatált és nem szulfatált L81A-mezotripszin degradálta a SPINK1 inhibitorot. A szulfatált mezotripszin aktívabbnak bizonyult a nem szulfatált formánál. Ezzel szemben, a CTRC által hasított L81A-mezotripszin nem volt képes emészteni a SPINK1-et, így ebben az esetben a SPINK1 gátló funkciója csak elhanyagolható mértékben (szulfatált forma), illetve egyáltalán nem (nem szulfatált forma) csökkent.

4.2. HASNYÁLMIRIGY LIPÁZ MUTÁCIÓK SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA KRÓNIKUS HASNYÁLMIRIGY-GYULLADÁSBAN

PNLIP variánsok szekréciójának vizsgálata HEK 293T sejteken

Az A174P, G233E, C254R és V454F lipáz variánsok szekrécióját SDS-PAGE-t követő Coomassie festéssel, illetve western blot analízissel detektáltuk. A vad típusú lipázzal ellentétben, a variánsok nem voltak megtalálhatóak a transzfektált sejtek médiumában. Ezt követően arra kerestük a választ, hogy minek köszönhető a lipáz variánsok hiánya. Ezért western blot analízissel vizsgáltuk a transzfektált sejtek lizátumát. Eredményeink azt mutatták, hogy a variánsok hasonló mennyiségben expresszálódtak, mint a vad típusú lipáz. Miután igazoltuk, hogy a csökkent szekréció nem a fehérjetermelés hibájának tulajdonítható,

megvizsgáltuk, hogy a rosszul feltekeredett fehérjék oldhatatlan aggregátumokat alkotnak-e a sejten belül. Az összezsapzódott fehérjék ultracentrifugálással elkülöníthetőek az oldatban lévő fehérjéktől, így a sejtizátumokat ultracentrifugáltuk, majd SDS-PAGE-t követő western blottal vizsgáltuk a frakciók PNLIP mennyiségét. A várttal megegyezően a vad típusú lipáz főként az oldható frakcióban, míg a PNLIP mutánsok elsősorban az oldhatatlan csapadékban voltak megtalálhatóak.

Endoplazmás retikulum (ER) stressz válasz HEK 293T sejtekben

Irodalmi adatok azt mutatják, hogy a PNLIP szekréciónak defektusa ER stresszt indukálhat emlős sejtekben. Ennek tesztelésére a transzfektált HEK 293T sejtekből össz-RNS-t izoláltunk, és cDNS-t szintetizáltunk. Kimutattuk, hogy az ER stressz marker XBP1 mRNS érése és a BiP ER dajkafehérje expressziója szignifikánsan fokozódott a mutáns PNLIP-et termelő sejtekben.

PNLIP variánsok szekréciónak AR42J sejtekben

Az acinus irányba differenciált AR42J patkány hasnyálmirigy sejtek alkalmasabbak a humán acinus sejtek által termelt fehérjék szekréciónak és sejt hatásainak vizsgálatára. Adenovírus vektorokat használtunk arra, hogy a vad típusú és mutáns PNLIP kódoló DNS-ét a sejtekbe juttassuk. A PNLIP szekréciónak a transzduktált sejtek médiumának vizsgálatával követtük. Eredményül azt kaptuk, hogy a vad típusú lipáz jól szekretálódott AR42J sejtekből, míg a PNLIP variánsok a sejtben rekedtek. Az eredményeink azt mutatták, hogy a sejt belüli G233E, C254R és V454F PNLIP variánsok fehérjeszintje közel azonos a vad típusú lipáz mennyiségével. Ezzel ellentétben az A174P variáns mennyisége lényegesen csökkent, valószínűleg a sejt belüli degradációnak köszönhetően.

ER stressz markerek vizsgálatára AR42J sejtekben

A PNLIP variánsok szekréciónak defektusa azt sejteti, hogy kialakulhat ER stressz a patkány hasnyálmirigy sejtekben is. Ezért, a HEK 293T sejt vonalon végzett kísérletekkel megegyezően, két ER stressz indikátor szintjét vizsgáltunk: az XBP1 mRNS érést és a BiP mRNS expressziót. A rosszul feltekeredett PNLIP variánsok megközelítőleg kétszeresére növelték a patkány hasnyálmirigy sejtekben az XBP1 mRNS érést. Ezen felül a BiP mRNS expressziós szintje is megemelkedett a PNLIP variánsokkal transzduktált sejtek esetében. Leginkább a V454F variáns fokozta a BiP mRNS expressziót. Annak érdekében, hogy megerősítsük, hogy a mutációt hordozó lipázok nemcsak mRNS szinten, hanem fehérje

expressziós szinten is okoznak különbségeket, megvizsgáltuk a BiP fehérje mennyiségét az AR42J sejtek esetében, western blot analízissel. Meglepő módon a BiP fehérje mennyisége közel azonos volt a vad típusú lipázzal, illetve az A174P, G233E és C254R variánsokkal transzduktált sejtek esetében is, kizárólag a V454F esetében volt megfigyelhető kétszeres fehérje mennyiség növekedés

5. ÖSSZEGZÉS

Kutatásaink a mezotripszinogén CTRC általi proteolitikus szabályozására irányultak. A mezotripszinogénben a korábbról ismert Phe18 és Leu81 hely mellett két további hasítóhelyet is azonosítottunk az autolízis hurokban a Leu148 és a Phe150 aminosavak után. Kimutattuk, hogy az autolízis hurok hasítása gyorsabb volt a Leu81 hasításánál. Eredményeink azt mutatták, hogy az autolízis hurok emésztése hatására a mezotripszin katalitikus aktivitása jelentősen csökkent, amelyet rövid peptid és fehérje szubsztrátokon is kimutattunk. Kísérleteink rávilágítottak, hogy az autolízis hurok hasítása CTRC-vel jelentősen növelte a proteáz K_m értékét, míg a k_{cat} érték nem változott. Ezen felül a CTRC által hasított mezotripszin gyengébben kötötte az SBTI tripszin inhibitorot, illetve kevésbé hatékonyan degradálta az SBTI és a SPINK1 tripszin inhibitorokat, mint a hasítatlan mezotripszin. Összegzésként elmondható, hogy a CTRC megóvja a hasnyálmirigy-gyulladás ellen védő SPINK1 tripszin inhibitorot a lebontástól azáltal, hogy proteolitikus hasítással inaktíválja a mezotripszint.

A közelmúltban két európai hasnyálmirigy-gyulladásos kohorszban, fiatal betegekben és kontrollokban azonosítottak négy ritka heterozigóta hasnyálmirigy lipáz (PNLIP) mutációt (A174P, C254R, G233E, V454F), amelyek csökkent PNLIP szekréciót mutattak. Célunk volt annak meghatározása, hogy ezek a mutációk patogének vagy ártalmatlanok. Ehhez megvizsgáltuk a fehérjék szekrécióját, sejten belüli aggregációját, illetve ER stressz markerek szintjét HEK 293T és AR42J sejt vonalon. Eredményeink azt mutatták, hogy a mutációk a PNLIP fehérje szekrécióját blokkolják hibás felgombolyodásnak köszönhetően. Igazoltuk, hogy a PNLIP variánsok felhalmozódnak a sejtekben oldhatatlan aggregátumokat alkotva. A PNLIP mutánsok expressziója ER stressz indukciót eredményezett, amelyet a fokozott XBP1 mRNS érés és az emelkedett ER chaperon, BiP szint jelzett HEK 293T és AR42J sejtekben. A genetikai adatok és eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy a szekréciós defektust okozó PNLIP mutációk heterozigóta formában nem alkalmasak a krónikus hasnyálmirigy-gyulladás kialakulásához, de más rizikófaktorokkal együtt növelhetik a betegség kialakulásának kockázatát.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Szabó Andrásnak, hogy szakmai tapasztalatával és tanácsaival segítette munkámat.

Köszönöm Prof. Dr. Tózsér József intézetvezető úrnak, hogy lehetőséget biztosított a Retrovirális Biokémiai Kutatólaboratóriumban PhD. tanulmányaim folytatására.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Sahin-Tóth Miklósnak, hogy szakmai tanácsaival támogatta munkámat.

Külön köszönöm Miczi Máriónak és Nataly Morales Granda-nak a barátságukat, támogatásukat, szakmai tanácsaikat és a jó hangulatot.

Köszönöm a Retrovirális Biokémiai Kutatólaboratórium korábbi és mostani munkatársainak, külön kiemelve Kassay Norbertet, Dr. Szojka Zsófiát, Dr. Golda Máriát, Joóné Dr. Matúz Krisztinát, Janics-Pető Szilviát és Dr. Mótyán Jánost, szakmai tanácsaikat és a baráti hangulatot.

Szeretném megköszönni a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet dolgozóinak.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni családomnak, páromnak és barátaimnak a támogatásukat, nélkülük nem sikerülhetett volna.



Nyilvántartási szám: DEENK/449/2021.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Toldi Vanda

Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Toldi, V.**, Kassay, N., Szabó, A.: Missense PNLIP mutations impeding pancreatic lipase secretion cause protein misfolding and endoplasmic reticulum stress.
Pancreatology. [Epub ahead of print], 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pan.2021.07.008>
IF: 3.996 (2020)
2. **Toldi, V.**, Szabó, A., Sahin-Tóth, M.: Inactivation of mesotrypsin by chymotrypsin C prevents trypsin inhibitor degradation.
J. Biol. Chem. 295 (11), 3447-3455, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.RA120.012526>
IF: 5.157





További közlemények

3. Szabó, A., **Toldi, V.**, Gazda, L., Demcsák, A., Tózsér, J., Sahin-Tóth, M.: Defective binding of SPINK1 variants is an uncommon mechanism for impaired trypsin inhibition in chronic pancreatitis.

J. Biol. Chem. 296, 1-13, 2021.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100343>

IF: 5.157 (2020)

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 14,31

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
9,153**

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.

