

# A KIMOTRIPSZIN C SZABÁLYOZÓ SZEREPÉNEK ÉS N-GLIKOZILÁCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA

Doktori értekezés

**Bence Melinda**

Semmelweis Egyetem

Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola

Pathobiokémia Doktori Program



**Témavezető: Dr. Sahin-Tóth Miklós**

Hivatalos Bírálók: Dr. Gál Péter

Dr. Lakatos Péter László

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Kovalszky Ilona

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Tretter László

Dr. Venekei István

Budapest

2012

*Az értekezés kísérleti anyaga a Boston University Department of  
Molecular and Cell Biology tanszékén készült Dr. Sahin-Tóth  
Miklós laboratóriumában*

# 1 TARTALOMJEGYZÉK

1	Tartalomjegyzék .....	3
2	Ábrajegyzék .....	5
3	Táblázatjegyzék .....	6
4	Rövidítések jegyzéke .....	7
5	Irodalmi áttekintés .....	9
5.1	Bevezetés.....	9
5.2	Hasnyálmirigy eredetű proteázok.....	10
5.2.1	Szerin-proteázok.....	11
5.2.2	Metalloproteázok.....	16
5.3	A hasnyálmirigy-gyulladás .....	17
5.3.1	A tripszin szerepe a hasnyálmirigy-gyulladás kialakulásában .....	19
5.3.2	A kimotripszin C szerepe a hasnyálmirigy-gyulladás kialakulásában .....	21
5.4	A fehérjék N-glikozilációja .....	24
5.4.1	Az N-glikoziláció szerepe a fehérjék feltekeredésében és sejten belüli irányításában.....	27
5.4.2	Az N-glikoziláció hatása az érett fehérjékre .....	29
6	Célkitűzések.....	31
7	Felhasznált anyagok és módszerek .....	32
7.1	Plazmidkészítés .....	32
7.2	Írányított mutagenézis .....	32
7.3	Sejttenyésztés és transzfekció .....	34
7.4	ÖsszRNS-izolálás és RT-PCR .....	35
7.5	Valós idejű (real-time) PCR.....	35
7.6	SDS-poliakrilamid-gélelektroforézis (SDS-PAGE).....	36
7.7	CTRC deglikozilációja PNGaseF és EndoH glikozidáz enzimek segítségével.....	36
7.8	Rekombináns CTRC, ProCPA1, ProCPA2 és ProCPB1 termelése .....	37
7.9	A kimotripszinogén C tisztítása .....	38
7.9.1	Ecotin affinitáskromatográfiás oszlop készítése .....	38
7.9.2	Kimotripszinogén C tisztítása .....	38
7.10	A prokarboxipeptidáz tisztítása .....	39
7.11	A kimotripszin C aktivitásának mérése.....	39
7.11.1	Aktivitásmérés kondicionált médiumból.....	39
7.11.2	A CTRC kinetikai paramétereinek meghatározása .....	40
7.11.3	A CTRC aktivitásának vizsgálata $\beta$ -kazein és tripszinogén szubsztrátokkal .....	40
7.12	A CTRC-inhibitor disszociációs állandójának ( $K_i$ ) meghatározása .....	41
7.13	A karboxipeptidáz aktivitásának mérése .....	41
7.13.1	A CPA kinetikai paramétereinek meghatározása .....	42
7.14	N-terminális szekvenálás.....	42
7.15	Tömegspektrometria.....	42
8	Eredmények .....	43
8.1	A kimotripszin C szerepének vizsgálata a prokarboxipeptidáz aktivációjában .....	43
8.1.1	A proCPA1 és proCPA2 termelése és tisztítása.....	43
8.1.2	A proCPA1 és proCPA2 tripszin általi aktivációja.....	43
8.1.3	A CTRC fokozza a CPA1 és CPA2 tripszin általi aktivációját.....	46

8.1.4	A tripszin által hasított propeptid a CPA1/CPA2 szorosan kötő inhibitoraként működik .....	47
8.1.5	A CTRC lebontja a tripszin által hasított propeptidet .....	49
8.1.6	A Leu96-Leu97 peptidkötés hasítása szükséges a CPA1/CPA2 teljes aktivációjához.....	56
8.1.7	A CTRC a proCPA1 és proCPA2 fiziológiás koaktivátora .....	57
8.1.8	A proCPA1 CTB2 általi aktivációja .....	58
8.2	A kimotripszin C N-glikozilációjának vizsgálata .....	59
8.2.1	A humán CTRC N-glikozilált az 52-es aszparaginon .....	59
8.2.2	Az N-glikoziláció hatása a CTRC szekréciójára és enzimatis funkcióira.....	61
8.2.3	Az N52S mutáció hatásának vizsgálata AR42J-sejtekben .....	65
8.2.4	A patkány CTRC N-glikozilációjának vizsgálata .....	68
8.2.5	A patkány Asn90 glikozilációs hely bevitele humán CTRC-be.....	69
8.2.6	A szarvasmarha CTRC N-glikozilációjának vizsgálata .....	72
9	Az eredmények megbeszélése .....	74
9.1	A kimotripszin C szerepe a prokarboxipeptidáz aktivációjában .....	74
9.2	A kimotripszin C N-glikozilációjának vizsgálata .....	78
9.2.1	A humán CTRC N-glikozilációjának vizsgálata .....	78
9.2.2	Az N-glikoziláció hatása a humán CTRC szekréciójára .....	78
9.2.3	Az N-glikoziláció hatása a humán CTRC enzimatis funkcióira .....	79
9.2.4	Összehasonlító vizsgálatok patkány illetve szarvasmarha CTRC-vel .....	80
10	Következtetések .....	84
10.1	A kimotripszin C szerepe a prokarboxipeptidáz aktivációjában .....	84
10.2	A kimotripszin C N-glikozilációjának vizsgálata .....	84
11	Összefoglalás .....	85
12	Summary .....	86
13	Irodalomjegyzék .....	87
14	Saját publikációk jegyzéke .....	99
15	Köszönetnyilvánítás.....	100

## 2 ÁBRAJEGYZÉK

1. ábra: A humán kationos tripszinogén tripszin illetve kimotripszin általi hasítási helyei.....	13
2. ábra: A hasnyálmirigyen belül fellépő tripszin-aktiváció és –inaktiváció egyensúlyát befolyásoló útvonalak.....	19
3. ábra: Az N-glikánok bioszintézise.....	25
4. ábra: A humán kimotripszin C potenciális N-glikozilációs helyeinek elhelyezkedése .....	26
5. ábra: A PNGaseF és EndoH glikozidáz enzimek hasítási helyei .....	37
6. ábra: A vad típusú és az R110Q mutáns proCPA1 illetve vad típusú és az R112Q CPA2 tripszin általi aktivációja.....	44
7. ábra: A sertés proCPA1 (Protein Data Bank code 1PCA) és a humán proCPA2 (Protein Data Bank code 1AYE) szalagdiagramja.....	45
8. ábra: A proCPA1 (A) és a proCPA2 (B) tripszin és CTRC általi aktivációja.....	46
9. ábra: A tripszin által aktivált proCPA1 és proCPA2 aktivitásának koncentrációfüggése .....	47
10. ábra: A tripszin és CTRC által aktivált proCPA1 és proCPA2 aktivitásának koncentrációfüggése .....	48
11. ábra: A vad típusú és az R237A mutáns proCPA1, illetve a vad típusú és az R235A mutáns proCPA2 tripszin (Tr) és CTRC általi aktivációja .....	49
12. ábra: A proCPA1 és a proCPA2 propeptidek $\alpha$ 3-hélixének tripszin, CTRC és CPA általi főbb hasító helyei és a hasítások időbeli sorrendje.....	51
13. ábra: Az L96I,L97I proCPA1 (A) és az L96I,L97I proCPA2 (B) tripszin és CTRC általi aktivációja .....	56
14. ábra: A proCPA1 (A) és proCPA2 (B) tripszinnel és különböző humán pankreatikus proteázokkal való aktivációja.....	57
15. ábra: A proCPA1 CTRB2 általi aktivációja .....	58
16. ábra: A humán CTRC glikoziláltságának vizsgálata .....	60
17. ábra: A HEK 293T-sejtek által termelt vad típusú, illetve az N25S, N52S és N226S mutáns CTRC aktiválása humán kationos tripszinnel.....	61
18. ábra: A $\beta$ -kazein (A) és tripszinogén (B) emésztése vad típusú, illetve N52S mutáns és E. coli által termelt CTRC-vel.....	63
19. ábra: HEK 293T-sejtek transzfekciója növekvő koncentrációjú vad típusú és N52S mutáns CTRC-t kódoló plazmiddal .....	64
20. ábra: A vad típusú illetve N52S mutáns CTRC szekrécója AR42J-sejtekben.....	65
21. ábra: ER-stressz markergének expressziója a vad típusú illetve az N52S mutáns CTRC-t tartalmazó adenovírussal infektált AR42J-sejtekben.....	67
22. ábra: Potenciális N-glikozilációs helyek különböző emlős fajokban .....	68
23. ábra: A vad típusú és az N90S mutáns patkány CTRC szekrécója HEK 293T-sejtekben .....	69
24. ábra: Az N90 patkány glikozilációs hely bevitele a humán N52S mutáns CTRC-be.....	70
25. ábra: Az N90 glikozilációs helyet hordozó humán CTRC $\beta$ -kazein emésztése .....	71
26. ábra: Az N90 patkány illetve az N52S humán glikozilációs hely bevitele szarvasmarha CTRC-be.....	73
27. ábra: A CTRC által szabályozott hasítási helyek összehasonlítása humán kationos tripszinogénben, valamint a prokarboxipeptidáz A1-ben és A2 ben.....	77

### 3 TÁBLÁZATJEGYZÉK

1. táblázat: A mutáns CTRC illetve CPA-konstrukciók készítéséhez használt mutagén primerek.....	33
2. táblázat: A humán CPA1 és CPA2 kinetikai paraméterei.....	43
3. táblázat: A tripszin illetve CTRC által emésztett proCPA1 és proCPA2 propeptidjének tömegspektrometriai analízise.....	52
4. táblázat: A vad típusú, N52S mutáns és az E. coli által termelt CTRC kinetikai paraméterei és inhibitor kötése.....	62
5. táblázat: A vad típusú illetve az N90 patkány glikozilációs helyet hordozó humán CTRC kinetikai paraméterei.....	71

## 4 RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AR42J	patkány eredetű pankreatikus acinus-sejtvonal
ATF	aktiváló transzkripciós faktor
BiP	immunoglobulin binding protein
CHOP	C/EBP homologous protein
CP	karboxipeptidáz
CTR	kimotripszin
CTRL	kimotripszin-szerű enzim
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Minimal Essential Medium
EDTA	etilén-diammin-tetraacetát
eIF	eukarióta iniciációs faktor
ELA	elasztáz
EndoH	endoglikozidáz H
ER	endoplazmatikus retikulum
ERAD	ER-asszociált degradáció
ERGIC	ER–Golgi intermediate compartment
GAPDH	glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz
HEK293T	humán embrionális vese eredetű sejtvonal
HMBS	hidroximetilbilán-szintáz
HPRT	hipoxantin-guanin-foszforibozil-transzferáz
IPTG	izopropil- $\beta$ -D-tio-galaktozid
IRE1	inositol requiring enzyme 1
MDCK	Madin Darby canine kidney (kutya eredetű vese sejtvonal)
OD	optikai denzitás
OS9	osteosarcoma amplified 9
PERK	PKR-like ER kinase
PFU	plaque forming unit
PNGaseF	Peptid: N-glikozidáz F
PRSS1	a humán kationos tripszinogén génje
PRSS2	a humán anionos tripszinogén génje

PVDF	polivinilidén-fluorid
RPII	RNS-polimeráz II
SDS	sodium dodecyl sulphate
SGCI	Schistocerca gregaria kimotripszininhibitor
SPINK1	szerin-proteáz inhibitor kazal-1
SV40	simian vírus 40 (onkogén poliomavírus)
Tris	triszhidroximetil-aminometán
UPR	unfolded protein response
VIP36	vesicular integral membrane protein 36
XPB1	X-box binding protein-1



## 5 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 5.1 Bevezetés

A kimotripszin C (CTRC) a hasnyálmirigyben termelődő szerin-proteáz, amely a táplálékkal bevitt fehérjéket a vékonybélben emésztí (1). Azonban a CTRC az emésztő funkcióján túl fontos szerepet tölt be a kationos tripszin aktivációjának, illetve degradációjának szabályozásában is (2,3). A kationos tripszin szintén hasnyálmirigy eredetű szerin-proteáz, amely kulcsfontosságú szerepet játszik a hasnyálmirigyben termelődő emésztőenzimek aktivációjában. A hasnyálmirigy önemésztődésének elkerülése végett az emésztőenzimek inaktív zimogén formában termelődnek az acinussejtekben és csak a vékonybélben válnak aktívvá. Az aktivációs kaszkád első lépéseként az inaktív tripszinogént a bélhámsejtek által termelt enteropeptidáz a propeptid lehasításával aktív tripszinné alakítja (4,5). Az így keletkező aktív tripszin az autoaktiváció révén szintén képes a tripszinogén felaktiválására, ami egy öngerjesztő kört indít be és felgyorsítja az aktivációs folyamatokat. Számos hasnyálmirigy eredetű enzim, így a CTRC aktiválódásáért is a tripszin felelős (6). Laboratóriumunk megfigyelései szerint a CTRC fokozza a tripszin autoaktivációjának sebességét. Mindez azáltal valósul meg, hogy a CTRC lehasít a tripszinogén aktivációs peptidjéről egy három aminosavnyi szakaszt. Az ily módon létrejött propeptidet a tripszin hatékonyabban képes hasítani, így az autoaktiváció mértéke háromszorosára fokozódik (2). Ugyanakkor a CTRC a tripszinogén illetve a tripszindegradációját is elősegíti. Ennek során a CTRC a tripszinogén/tripszin  $\text{Ca}^{2+}$  kötő hurkában található Leu81-Glu82 peptidkötést hasítja, ami a tripszin Arg122-nél bekövetkező autolitikus hasításával együtt az enzim degradációjához és teljes inaktivációjához vezet (3). A tripszinaktivációja illetve degradációja  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció és pH-függő folyamat.

A CTRC tripszindegradáló szerepe ugyanakkor nemcsak a vékonybélben, hanem a hasnyálmirigyen belül is fontos szerepet játszhat. Patológias esetekben ugyanis a tripszinogén az autoaktiváció során már a hasnyálmirigyen belül is felaktiválódhat, ami az önemésztődési folyamat beindulásához és hasnyálmirigy-gyulladásához (pankreatitisz) vezethet (5,7,8). A CTRC tripszindegradáló funkciója védelmet biztosíthat a túlzott tripszinaktiváció és így a pankreatitisz kialakulása ellen. Ezt az elméletet támasztja alá, hogy krónikus pankreatitiszben szenvedő betegek CTRC-t

kódoló génjében több olyan mutációt azonosítottak, amelyek összefüggésbe hozhatók a betegség kialakulásával. Az eredmények szerint a CTRC mutációi 4-5-szörösére fokozzák a krónikus pankreatitisz kialakulásának esélyét. Ezek a mutációk a legtöbb esetben a CTRC hibás feltekeredéséhez és a fehérje szekréciós defektusához vezetnek, ezáltal csökkentik a CTRC tripszindegradáló funkcióját (9). Ugyanakkor a hibásan feltekeredett CTRC endoplazmatikus retikulum stresszt és ennek következtében az acinussejtek apoptotikus halálát is kiválthatja, ami a hasnyálmirigy funkcióvesztését vonhatja maga után (10).

A CTRC elsődleges aminosavszekvenciájában három potenciális N-glikozilációs hely található. Az N-glikoziláció a szekréciós illetve membránfehérjékre jellemző poszttranszlációs módosulás, amelynek során a glikozilcsoport a fehérjék aszparagin aminosavdallancához kötődik. Az N-glikánok számos funkciót betölthetnek, többek között elősegítik a fehérjék megfelelő feltekeredését és szekrécióját.

Miután fény derült a CTRC tripszin aktivációt szabályozó szerepére, felmerült annak lehetősége, hogy a CTRC esetleg más hasnyálmirigy eredetű enzimek aktivációjára illetve degradációjára is hatást gyakorol. Doktori munkám során a CTRC-nek a prokarboxipeptidáz aktivációjában játszott szerepét tanulmányoztam. Munkám második részében a CTRC feltekeredésének mechanizmusát vizsgáltam és arra kerestem a választ, hogy a CTRC keresztülmegy-e N-glikoziláción és ez a poszttranszlációs módosulás szerepet játszik-e a CTRC megfelelő feltekeredésében és szekréciójában.

## **5.2 Hasnyálmirigy eredetű proteázok**

A hasnyálmirigy állományának jelentősebb részét az exokrin funkcióval rendelkező acinussejtek teszik ki, amelyek emésztőenzimeket termelnek és juttatnak a vékonybélbe. A hasnyálmirigy által termelt enzimek 80%-át proteázok teszik ki (6). A proteázok kivétel nélkül inaktív proenzim formájában termelődnek és zimogén granulumban tárolódnak az acinussejtekben (5). A zimogén granulumban tárolt enzimek exocitózissal először a hasnyálmirigy-vezetékbe, majd a vékonybélbe jut, ahol az addig inaktív enzimek aktiválódnak. A proteázokat az általuk katalizált hasítás biokémiai mechanizmusa szerint csoportosítjuk. A hasnyálmirigy eredetű enzimek két fő csoportba sorolhatók: szerin- (tripszin, kimotripszin, elasztáz) illetve metallo-

(karboxipeptidáz) proteázok. Mindegyikük más-más szubsztrátspecifitással rendelkezik, ami lehetővé teszi a táplálékkal bevitt legkülönbözőbb összetételű fehérjék lebontását.

### 5.2.1 Szerin-proteázok

A szerin-proteázok közös jellemzője, hogy az aktív helyen egy reaktív szerin található, amely két másik aminosavval, egy hisztidinnel és egy aszparaginsavval együtt alkotja az enzim reakcióért felelős katalitikus triádot (11). A hasnyálmirigy eredetű szerin-proteázok csoportjába tartozó tripszin, kimotripszin és elasztáz nagyfokú strukturális hasonlóságot mutatnak. Ennek ellenére azonban eltérő szubsztrátkötő zsebbel rendelkeznek, amely különböző szubsztrátspecifitást eredményez. A szerin-proteázok inaktív proenzimként termelődnek és az aktivációjukhoz a propeptid tripszin általi hasítása szükséges. A propeptid lehasadásának következtében az enzim konformációváltozáson megy keresztül, ami lehetővé teszi az enzimaktivációt és a szubsztrát megkötését (12).

#### 5.2.1.1 *Tripszin*

A hasnyálmirigy által termelt emésztőenzimek nagy részét, közel 19%-át a tripszinek teszik ki (6). A tripszinek endopeptidázok, amelyek a fehérjeláncokat bázikus oldalláncú aminosavak, elsősorban a lizin illetve arginin után hasítják. Az emberi szervezetben három tripszinizofорма fordul elő, a kationos, az anionos illetve a mezotripszin. Nevüket az izoelektromos fókuszálás során mutatott viselkedésük alapján kapták. A katódhoz legközelebb vándorló forma a kationos tripszin, az anód közelében található az anionos tripszin, míg a középső a mezotripszin. Legnagyobb mennyiségben a kationos tripszin termelődik, amely a vékonybélbe ürített össz-tripszin mennyiség kétharmadát teszi ki. A további egy harmadot az anionos tripszin és 2-10% -ot a mezotripszin adja. Mindhárom tripszinogént kódoló gén a 7-es kromoszóma hosszú karján található és szekvenciájuk nagyfokú hasonlóságot mutat. Az elsődleges transzlációs termékük a pre-tripszinogén, amely egy 15 aminosav hosszúságú szignálpeptidből, egy 8 aminosavnyi propeptidből és 174 aminosavnyi enzimből áll. A szignálpeptid a fehérjemolekulának az endoplazmatikus retikulum lumenébe való átjutásakor lehasad. Az így létrejövő proenzim zimogén granuláris csomagolódnak, majd a vékonybélbe szekretálódnak (5).

#### 5.2.1.1.1 A tripszinaktiváció szabályozása

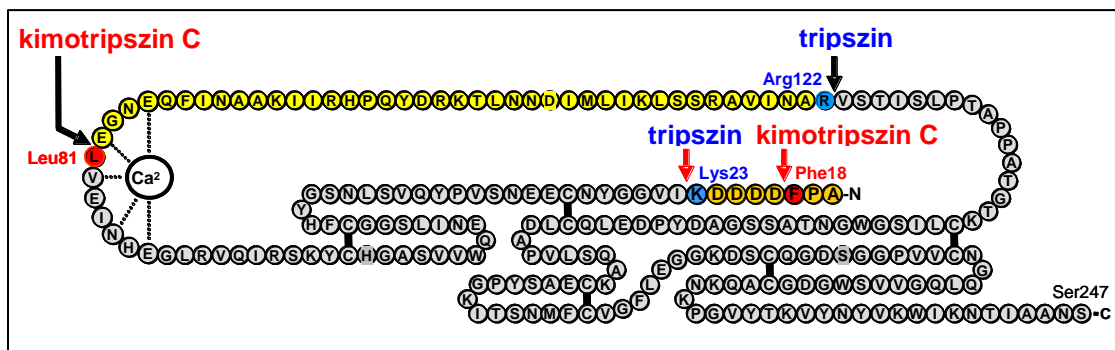
A tripszinogént fiziológias körülmények között a bélhámsejtek által termelt enteropeptidáz aktiválja a vékonybélben. Az aktiváció során az enteropeptidáz a propeptidet a Lys23-Ile24 peptidkötésnél hasítja (4). Azonban a tripszinogént maga a tripszin is képes aktiválni, amely szintén a Lys23 aminosav után hasít. Ezt a folyamatot autoaktivációnak nevezzük, amelynek a fiziológias szerepe valószínűleg a proenzim aktivációjának elősegítése (1. ábra). Ugyanakkor az autoaktiváció révén a tripszinogén már a hasnyálmirigyen belül is felaktiválódhat, ami önmérsztődéshez és hasnyálmirigygyulladásához vezethet, így komoly veszélyforrást jelenthet a szervezetre. Ennek elkerülése érdekében a tripszinaktiváció mechanizmusa több szinten is szabályozott (5).

A hasnyálmirigyben esetlegesen megjelenő tripszinaktivitást az acinussejtek által termelt Kazal-1 típusú szerin-proteáz inhibitor (SPINK1) tripszininhibitor semlegesíti (5,13). Az inhibitor a proenzimeket tartalmazó zimogén granulumbokba kerül és azokkal együtt szekretálódik. Így a SPINK1 már az acinussejtekben, illetve a hasnyálmirigy vezetékben is hatékony védelmet nyújt a korai tripszinaktiválódás ellen. A SPINK1 a tripszin aktív centrumához kötődik, ezáltal gátolja a szubsztrát megkötését. A kationos illetve az anionos tripszinnel ellentétben azonban a mezotripszin rezisztens a SPINK1 gátló hatásával szemben (14,15). A mezotripszin ugyan képes a SPINK1 megkötésére, a kötődést követően azonban gyorsan és irreverzibilisen degradálja az inhibitorot. Ennek a funkciónak valószínűleg a tripszin inhibitor nagy mennyiségben tartalmazó táplálék emésztésének elősegítésében van szerepe.

A humán kationos tripszinogén esetében az autoaktivációt a tripszin valamint a tripszinogén között fellépő taszító elektrosztatikus kölcsönhatások is gátolják (16). Ez a gátló kölcsönhatás a tripszinogén propeptidjében elhelyezkedő negatív töltésű tetraaszpartátmotívum (Asp19-22) illetve az aktív tripszin szintén negatív töltésű Asp218-as aminosava között lép fel. Mindez tehát gyengíti a tripszinogén tripszin általi megkötését és így lassítja az autoaktiváció folyamatát. Ugyanakkor a tetraaszpartátszekvencia az enteropeptidáz általi aktivációra nincsen hatással. Érdekes módon a tetraaszpartátmotívum minden gerinces tripszinogén propeptidjében megtalálható, azonban az Asp218 megléte és ezáltal az autoaktiváció gátlása kizárólag a humán kationos tripszinogénre jellemző (16,17). Az autoaktiváció sebessége pH-függő, mivel a negatív töltésű aszparaginsav-oldalláncok protonálódása a gátló elektrosztatikus

kölcsönhatások megszűnéséhez vezet. Ennek megfelelően tehát a humán kationos tripszinogén savas közegben gyorsabban autoaktiválódik és az elektrosztatikus kölcsönhatás csak pH5 fölött válik jelentőssé. Mindennek az lehet a fiziológias funkciója, hogy a zimogén granulomok 6 körüli pH értéke megakadályozza a tripszinogén acinussejten belüli aktivációját, míg a vékonybélben a beáramló gyomorsav átmenetileg csökkenti a pH-t, ami valószínűleg gyorsítja a tripszinogén teljes felaktiválódását. A  $\text{Ca}^{2+}$  ionok koncentrációja szintén befolyásoló hatással bír a tripszinogén autoaktivációjára. A tetraaszpartátmotívum negatív töltéséből adódóan képes a  $\text{Ca}^{2+}$  megkötésére, ami elősegíti az autoaktivációs folyamatokat.

A tripszin a tripszinogént illetve az aktív tripszint az Arg122-Val123 peptidkötésnél is hasítja (1. ábra). Ez a peptidkötés a fehérjemolekula két globuláris doménjét összekötő hurokban helyezkedik el (6). A hasítás következtében azonban a fehérje nem degradálódik, mivel a két polipeptidlánc diszulfidhidakon keresztül kötve marad. Ráadásul a hasítást követően az Arg122-Val123 peptidkötés képes újra szinjetizálódni (18). Ez valószínűleg annak köszönhető, hogy a hurkot összekötő hidrogénhidak olyan közelségben tartják az elhasított peptidkötést, hogy lehetővé teszik egy dinamikus egyensúly kialakulását az intakt egyláncú illetve a hasított kétláncú forma között. Mindennek következtében a tripszin nem veszít az aktivitásából. Az Arg122-Val123 peptidkötés tripszin általi hasítására a  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció szintén befolyással van. Ebben az esetben azonban a növekvő  $\text{Ca}^{2+}$  ion koncentráció lassítja a hasítás sebességét. A tripszin  $\text{Ca}^{2+}$  kötő hurka közel helyezkedik el az Arg122-Val123 peptidkötéshez és a  $\text{Ca}^{2+}$  megkötése valószínűleg stabilizálja a környező fehérjeszerkezetet és ezáltal lassítja a tripszin általi hasadást.



**1.ábra. A humán kationos tripszinogén tripszin illetve kimotripszin általi hasítási helyei.** Az ábrán a kationos tripszinogén elsődleges szerkezetének sematikus rajza látható. A fekete vonalak a diszulfidhidakat jelzik.

### 5.2.1.2 *Kimotripszin*

A kimotripszin a tripszin után a második legnagyobb mennyiségben termelődő pankreatikus proteáz, amely a hasnyál összfehérje tartalmának 9%-át teszi ki (6). A kimotripszinek endopeptidázok, amelyek a fehérjeláncokat az aromás illetve alifás aminosav-oldalláncok után hasítják. A többi szerin-proteáztól eltérően az aktiválódásuk során a propeptid a tripszin általi hasítás után egy diszulfidhídon keresztül kötve marad az enzimhez. Az ily módon kötve maradt propeptid stabilizálja az aktív enzimet. A humán hasnyálmirigy három fő kimotripszin-izoformát termel: kimotripszin B1, B2 és C (19,20). Ezen kívül a kimotripszin-szerű enzim-1 (CTRL-1) jelenlétét is kimutatták. A CTRL-1 struktúrája nagyon hasonló a CTRB fehérjékhez, azonban a szubsztrátspecifitásuk mind a kimotripszinekkel, mind az elasztázokkal átfedést mutat (21).

#### 5.2.1.2.1 **Kimotripszin C (CTRC)**

A CTRC-t először sertés hasnyálmirigyből izolálták és megfigyelték, hogy ez az enzim kimotripszinekre jellemző szubsztrát-specifitással rendelkezik, azonban nagyobb affinitással bontja a leucil illetve glutaminil peptidkötéseket (1,22,23). Ezzel szemben a CTRC szekvenciája nagyobb homológiát mutat az elasztázokkal, mint a többi kimotripszin izoformával. Ráadásul a humán CTRC-t kódoló gén az 1-es kromoszómán található az elasztáz 2A és a 2B gének közelségében (20,24). A humán CTRC gén elsődleges transzlációs terméke a pre-kimotripszinogén, amely az enzimen kívül egy 16 aminosavnyi szignálpeptidből illetve egy 13 aminosavnyi propeptidből áll. A proenzim aktiválódása során a tripszin a propeptidet az Arg29-Val30 peptidkötésnél hasítja. A CTRC a táplálékkal bevitt fehérjék emésztésén túlmenően fontos szerepet tölt be a tripszinaktiváció szabályozásában.

##### 5.2.1.2.1.1 *A kimotripszin C-nek a humán kationos tripszinogén autoaktivációjára gyakorolt hatása*

Annak első bizonyítéka, hogy a CTRC nem csupán emésztő funkcióval, hanem fontos szabályozó szereppel is rendelkezik, laboratóriumunk azon megfigyelésén alapszik, hogy a CTRC stimulálja a humán kationos tripszinogén autoaktivációját (2). Ez azáltal valósul meg, hogy a CTRC a tripszinogén propeptidjét a Phe18-Asp19 peptidkötésnél bontja, ami egy három aminosavnyi szakasz lehasadását eredményezi (1. ábra). Az ily módon létrejött propeptidet a tripszin hatékonyabban képes hasítani, így az

autoaktiváció mértéke háromszorosára fokozódik. Ez a hatás teljes mértékben a CTRC-re specifikus, mivel a többi kimotripszin (CTRB1, CTRB2, CTRL-1) illetve elasztáz (ELA2A, ELA3A, ELA3B) nem képes a tripszinogén propeptidjének hasítására. A tripeptid lehasadása valószínűleg konformációváltozást idéz elő a tripszinogén propeptidjében, ami gyengíti a tetraaszpartát motívum és az Asp218 közötti elektrosztatikus gátlást, ezáltal a tripszin könnyebben köti a tripszinogént. Mivel az Asp218 jelenléte és ezáltal az elektrosztatikus gátlás jelensége kizárólag a humán kationos tripszinogénre jellemző, ezért a CTRC a többi tripszinogén autoaktiválódására nincsen hatással.

#### 5.2.1.2.1.2 A kimotripszin C hatása a humán kationos tripszinogén / tripszin degradációjára

A CTRC a tripszinaktivitását annak degradációjának fokozásával is szabályozza. Ahogy az előző fejezetben említettem a tripszin Arg122-Val123 peptidkötésének tripszin általi hasítása után keletkező két polipeptidlánc diszulfidhidakon keresztül kötve marad, így az enzim nem degradálódik és a hasítatlan enzimhez hasonló aktivitással rendelkezik. A CTRC a tripszinogént illetve a tripszint a Leu81-Glu82 peptidkötésnél is hasítja (1. ábra) (3). Ez a hasítás önmagában szintén nem jár a tripszin degradációjával illetve inaktiválódásával. Azonban mivel a Glu82 és az Arg122 közötti szakaszt nem rögzítik diszulfidhidak, a CTRC Leu81 illetve a tripszin Arg122 után való együttes hasítása már a peptidszakasz elvesztését és a tripszin inaktivációját okozza. A Leu81-Glu82 peptidkötés hasítása szintén CTRC-re specifikus, mivel a CTRB1, CTRB2, illetve a ELA2A, ELA3A, ELA3B nem volt hatással a tripszin degradációjára. A Leu81-Glu82 peptidkötés a  $Ca^{2+}$  kötő hurokban található. A  $Ca^{2+}$  kötődése stabilizálja a hurkot, ezáltal lassítja a CTRC általi hasítást. Így a  $Ca^{2+}$ -koncentrációja jelentős mértékben befolyásolja a hasítás sebességét. Mindez élettani jelentőséggel bírhat, mivel a vékonybél kezdeti szakaszán a viszonylag magas (>1 mM)  $Ca^{2+}$ -koncentráció a vékonybél alsóbb szakaszaiban már a millimoláris szint alá csökken. A  $Ca^{2+}$ -koncentrációjának csökkenését valószínűleg a vékonybél hosszában kialakuló pH-grádiens okozza, mivel az alsóbb szakaszokban a lúgosabb pH a  $Ca^{2+}$  ionok kicsapódásával jár. Az eddigiek alapján tehát a vékonybél kezdeti szakaszán az alacsony pH, illetve a magas  $Ca^{2+}$ -koncentráció a tripszinogén autoaktivációjának kedvez, míg a degradációs folyamatokat blokkolja. A későbbi bélszakaszokon azonban a csökkent

Ca<sup>2+</sup>-koncentráció elősegíti a tripszindegradációját. Ez az elmélet számos irodalmi adattal egybevág, miszerint a tripszin a vékonybélben való keresztül haladása során inaktiválódik és a végbélben az eredeti tripszinaktivitásnak csupán a 20%-a mutatható ki.

Mindemellett a CTRC tripszint illetve tripszinogént degradáló szerepe védő hatással lehet a hasnyálmirigyen belül megjelenő tripszinaktivitással szemben, mivel a zimogén granulomok alacsony Ca<sup>2+</sup>-koncentrációja (~40 µM) a tripszinogén/tripszindegradációjának kedvez.

### 5.2.1.3 *Elasztáz*

Az elasztázok endopeptidázok, amelyek a fehérjéket az apoláris oldalláncú aminosavak karboxilcsoportjai által alkotott peptidkötéseknél, főként az alanin, glicin és szerin után hasítják (6). Nevüket onnan kapták, hogy képesek az elasztin emésztésére, amely egy oldhatatlan extracelluláris fehérje és sok hibrofób oldalláncú aminosavat tartalmaz. Az aktivációjukhoz szintén a propeptid tripszin általi hasítása szükséges. A humán hasnyálmirigyben az ELA2A, 2B illetve az ELA3A, 3B termelődik. Ezek közül azonban az ELA2B inaktív formában van jelen és nem mutat proteolitikus aktivitást (25). Továbbá az ELA1 gén nem expresszálódik a humán hasnyálmirigyben.

## 5.2.2 **Metalloproteázok**

A hasnyálmirigy eredetű enzimek másik nagyobb csoportja, a karboxipeptidázok a metalloproteázok közé tartoznak. Jellemzőjük, hogy az enzim aktív helyén egy Zn<sup>2+</sup> - ion található, amely aktívan részt vesz a katalitikus mechanizmusban. A humán hasnyálmirigyben három karboxipeptidáz-izofорма található: a CPA1, CPA2 illetve a CPB1 (26-28). A karboxipeptidázok exopeptidázok, amelyek a fehérjék C-terminális végét hasítják (29,30). Az A-típusú karboxipeptidázok az aromás illetve alifás aminosavak, míg a B-típusú karboxipeptidázok az arginin, illetve a lizin előtt hasítanak. Ennek megfelelően tehát a CPA1 illetve CPA2 a kimotripszin, míg a CPB1 a tripszin által hasított fehérjetermékeket emészt.

Néhány emlősfaj esetében megfigyelték, hogy az A-típusú prokarboxipeptidázok egyéb proteázokkal asszociálódva szekretálódnak. A komplexképződés főként a kérődzőkre jellemző (31). A szarvasmarha esetében a CPA a CTRC-vel, illetve az elasztáz aktivitást mutató proproteináz E-vel (a humán Ela3B ortológja) asszociálódik



(32). A humán CPA1 esetén szintén megfigyeltek dimer képződést az Ela2A-val illetve az Ela3B-vel (33,34). Azonban a komplex képződés funkciója jelenleg nem ismert.

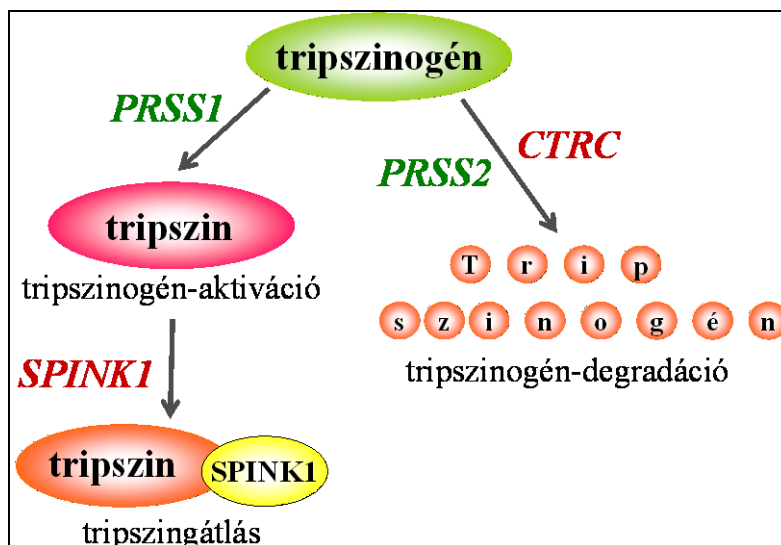
### 5.2.2.1 *A karboxipeptidázok aktivációja*

A karboxipeptidázok a többi hasnyálmirigy eredetű proteázhoz hasonlóan inaktív proenzim formájában szekretálódnak. A karboxipeptidázok egy 94-96 aminosav hosszúságú N-terminális propeptiddel rendelkeznek, amely az enzim inhibitoraként működik (29,30). Így tehát az enzim aktiválódásához az inhibitoros propeptid lehasadása szükséges, ami a szerin-proteázoktól eltérően nem jár további konformációváltozással. Mindemellett a propeptid chaperon funkcióval is rendelkezik, mivel elősegíti az enzim megfelelő feltekeredését. A propeptid egy inhibitoros globuláris doménből áll, amelyet egy  $\alpha$ -hélix szegmens kovalensen kapcsol az enzimhez. Szarvasmarha, sertés, patkány illetve humán karboxipeptidázon végzett vizsgálatok egyöntetűen azt mutatják, hogy a prokarboxipeptidáz aktivációjának első lépése az  $\alpha$ -hélix C-terminálisának tripszin általi hasítása. Ennek eredményeként az  $\alpha$ -hélix destabilizálódik és az inhibitoros globuláris domén disszociálódik az enzimről, amely ezáltal felszabadul a gátlás alól és aktiválódik (29,30,35-43). A proCPA2 illetve a proCPB esetén a tripszin általi aktiváció egyfázisú görbét adott, ami arra enged következtetni, hogy a tripszin önmagában elegendő volt a propeptid disszociációjához és az enzim teljes felaktiválásához. Ezzel szemben a proCPA1 triptikus aktivációja kétfázisú kinetikát mutat, ami arra utal, hogy az enzim felaktiválásához a propeptid több helyen való hasítása szükséges. Ugyanakkor a tripszinen kívül a kimotripszin illetve az elasztáz prokarboxipeptidáz-aktiváló hatását is megfigyelték, azonban ezek a tanulmányok nem tisztázták az aktiváció pontos mechanizmusát és a hasítási helyeket (36,37,42,44).

## 5.3 **A hasnyálmirigy-gyulladás**

A hasnyálmirigy-gyulladás (pankreatitisz) akut és krónikus formában jelentkezhet. Az akut forma hirtelen fellépő gyulladás, amelyet többnyire epekő vagy túlzott alkoholfogyasztás idéz elő (45). A gyulladás többszöri ismétlődése krónikus pankreatitisz kialakulásához vezethet, amelynek során a gyulladással állapot akár folyamatossá is válhat. A többször visszatérő gyulladás következtében a hasnyálmirigy





**2.ábra.** A hasnyálmirigyen belül fellépő tripszin-aktiváció és -inaktiváció egyensúlyát befolyásoló útvonalak. Az egyensúlyt érintő mutációk krónikus pankreatitisz kialakulásához vezethetnek. A kationos tripszinogént kódoló PRSS1 gén mutációi elősegítik a tripszinogén autoaktivációját. A SPINK1 funkcióvesztő mutációi csökkentik az aktív tripszin gátlását. A CTRC funkcióvesztő mutációi csökkentik az enzim tripszinogén/tripszindegradáló hatását. Az anionos tripszinogén génjét kódoló PRSS2 génben azonosított G191R mutáció elősegíti a tripszinogén tripszin általi degradációját, ezáltal ez a mutáció védő hatással lehet a krónikus pankreatitisz kialakulása ellen.

### 5.3.1 A tripszin szerepe a hasnyálmirigy-gyulladás kialakulásában

A három humán tripszinogén-izoenzim génjei közül kizárólag a kationos tripszinogént kódoló PRSS1-génben azonosítottak olyan mutációkat, amelyek összefüggésbe hozhatók a krónikus pankreatitisz kialakulásával (2. ábra). Az első ilyen mutációt David Whitcomb munkacsoportja mutatta ki (55). A mutáció a kationos tripszinogén 122-es helyén található arginin-aminosav hisztidinre való cserélődését okozza (R122H). Az R122H aminosavcsere a PRSS1-mutáció okozta esetek 70%-ában azonosítható. Biokémiai vizsgálatok szerint a mutáció a fehérje csökkent autolíziséhez és ezáltal megnövekedett tripszinogén/tripszin-stabilitáshoz vezet (7,18). Ez minden bizonnyal annak köszönhető, hogy a tripszin nem képes hisztidin után hasítani, így a 122-es arginin hisztidinre való cserélődése megszünteti az Arg122-Val123 autolitikus peptidkötést. A tripszindegradáció pankreatitisz kialakulásával szemben kifejtett védő hatását az anionos tripszinogént kódoló PRSS2 génben azonosított G191R mutáció is bizonyítja (2. ábra). A G191R mutáns anionos tripszinogén a vad típusú fehérjéhez képest gyorsabban degradálódik és az egészséges populációban körülbelül 3-szor gyakrabban fordul elő, mint krónikus pankreatitiszben szenvedő betegek körében (62).

A biokémiai vizsgálatok során arra is fény derült, hogy az R122H mutáció a kationos tripszinogénben fokozott autoaktivációt indukál (7). Továbbá a második leggyakrabban előforduló N29I tripszinogén-mutáció szintén a fehérje megnövekedett autoaktivációját okozta (7,57,63,64). Ez a mutáció a humán kationos tripszinogénben azonosított mutációknak körülbelül a 25%-át teszi ki. A harmadik leggyakrabban előforduló mutáció, amely a tripszinogén mutációinak 4%-át adja, a tripszinogén propeptidjének legelső alanin-aminosavát valinra cseréli (A16V) (61). Az A16V mutáció a propeptidben található Phe18-Asp19 peptidkötés CTRC általi hasításának sebességét négyszeresére növeli (2). Mivel ez hasítás elősegíti a tripszinogén autoaktivációját, az A16V mutáció közvetett módon szintén megnövekedett tripszinaktivációhoz vezet. Az A16V mutáción kívül a propeptidben számos ritka mutációt is azonosítottak (D19A, D22G, K23R, K23\_I24insIDK) (16,17,61,65). Ezeket a mutációkat örökletes pankreatitiszben szenvedő betegekben találták és mindegyik kivétel nélkül a tripszinogén fokozott autoaktivációját okozza. Ráadásul a K23\_I24insIDK inzerciós mutáns (amelyben a K23 és az I24 aminosavak közé egy IDK motívum ékelődik) a propeptid katepszin B általi hasítását is fokozza (65). Számos tanulmány szerint a tripszinogén acinussejten belüli patológiás aktivációját a zimogén granulomok lizoszómákkal való összeolvadása is kiválthatja. A lizoszómákban található katepszin B a tripszinogén propeptidjét szintén a K23 aminosav után hasítja és ezáltal képes a tripszinogén aktiválására (63,66,67). Ennek megfelelően tehát a K23\_I24insIDK inzerció által kiváltott pankreatitisz patomechanizmusában nemcsak a tripszinogén autoaktivációja, hanem a katepszin B általi aktiváció is szerepet játszhat.

Munkacsoportunk a tripszinogén propeptidjében található mutációk hatását humán embrionális vesesejtekben (HEK293T) is megvizsgálta (68). Az eredmények szerint mind a négy mutáció a fehérje elégtelen szekréciónak okozta. Ugyanakkor a mutáns fehérjék szekréciónak defektusát a sejtekbe juttatott tripszin-inhibitorok teljes mértékben helyreállították, ami arra utal, hogy az elégtelen szekréciónak a tripszinogén sejten belüli felaktiválódásának köszönhető. A D22G mutáns tripszinogén patkány eredetű acinussejtvonalban (AR42J) való vizsgálata arra is rámutatott, hogy a mutáns fehérje túltermelődése apoptotikus sejthalálhoz vezet. Az intracelluláris tripszin-aktiváció apoptózist indukáló hatását Craig D. Logsdon munkacsoportja is alátámasztotta (69).

A tripszinaktivitást gátló SPINK1 génjében szintén számos mutációt azonosítottak, amelyek nagyobb gyakorisággal fordultak elő idiopátiás illetve örökletes pankreatitiszben szenvedő betegekben (70-73). Ezek a mutációk nem befolyásolják a SPINK1 gátlóképességét, azonban jelentős mértékben csökkentik a fehérje szekréciónak (74,75). Ennek alapján tehát elképzelhető, hogy a kisebb mennyiségben jelenlévő SPINK1 nem nyújt hatékony védelmet a hasnyálmirigyen belüli tripszin-aktiváció ellen, így a SPINK1 mutációi növelik a pankreatitisz kialakulásának esélyét (2. ábra).

### **5.3.2 A kimotripszin C szerepe a hasnyálmirigy-gyulladás kialakulásában**

#### *5.3.2.1 A hasnyálmirigy-gyulladás kockázatát növelő CTRC mutációk*

A CTRC tripszin/tripszinogén lebontását szabályozó szerepe védelmet biztosíthat a hasnyálmirigyen belül fellépő túlzott tripszinaktivitással és így a pankreatitisz kialakulásával szemben (2. ábra). Mindezt alátámasztja az a vizsgálat, amelynek során krónikus pankreatitiszben szenvedő német betegek CTRC-t kódoló génjében több olyan mutációt azonosítottak, amelyek összefüggésbe hozhatóak a betegség kialakulásával (9). Az eredmények szerint a CTRC mutációi 4-5-szörösére fokozzák a krónikus pankreatitisz kialakulásának esélyét. A leggyakrabban előforduló mutáció az R254W illetve a nyolc aminosavat érintő K247\_R254del deléció volt. Ezek a mutációk idiopátiás, örökletes illetve alkoholos pankreatitiszes betegekben is megtalálhatóak voltak. A két variáns együttesen a betegek 3%-ában volt jelen, míg egészséges egyéneknél csupán 0,7% gyakorisággal fordultak elő. Az R254W illetve a K247\_R254del deléciós CTRC-mutánsokat Masson és munkatársai is azonosították krónikus pankreatitiszben szenvedő francia betegekben (76). Azonban az előző tanulmánnyal szemben ezeket csak idiopátiás esetekben tudták kimutatni, míg örökletes pankreatitiszes betegekben nem volt jelen a két mutáció. Ezen túlmenően mindkét tanulmány talált olyan eseteket, ahol a betegek a pankreatitisszel összefüggésbe hozható CTRC variánsok mellett az N34S SPINK1 mutációt is hordozták. Ezek az eredmények megerősítik a hasnyálmirigy-gyulladás multigénes eredetét. Érdekes módon, trópusi pankreatitiszben szenvedő indiai betegekben a CTRC mutációi még gyakrabban fordulnak elő és akár 10-15-szörösére is fokozhatják a betegség kialakulásának esélyét (9). A trópusi pankreatitiszes betegekben leggyakrabban előforduló mutáció az A73T, amely sem a német sem a francia betegekben nem mutatott szignifikáns gyakoriságot.

### 5.3.2.2 *A CTRC mutációinak funkcionális hatásai*

A betegséggel összefüggésbe hozható CTRC-mutánsok funkcionális vizsgálata szerint a mutációk többsége a fehérjék különböző mértékű szekréciónak defektusát idézi elő HEK293T sejtekben (9). Az eredmények alapján a K247\_R254del deléziós variáns, illetve az A73T mutációt hordozó CTRC szekréciónak mennyisége a vad típusú fehérjének körülbelül 5%-át, míg az R254W mutáns a 30%-át teszi ki. Sok esetben a mutációk az enzimfunkcióra is hatással voltak. A K247\_R254del mutáns például teljesen inaktív, míg az A73T variáns csökkent proteázaktivitással rendelkezik. A ritkábban előforduló CTRC-variánsok között is sok esetben megfigyelhető volt a fehérje szekréciónak defektusa illetve elégtelen enzimfunkciója.

### 5.3.2.3 *Az endoplazmatikus retikulum (ER) stressz*

A mutáns fehérjék szekréciónak defektusa legtöbb esetben a fehérjék hibás feltekeredéséből adódik. Az ER-ben a nem vagy hibásan feltekeredett fehérjék felhalmozódása és aggregációja ER-stresszt okozhat, amely a sejtek károsodásához vezethet. Ennek elkerülése végett a sejtekben számos védekező mechanizmus alakult ki. A hibásan feltekeredett fehérjék stresszválaszt (unfolded protein response, UPR) váltanak ki, ami olyan fehérjék, elsősorban chaperonok transzkripcióját indukálja, amelyek fokozzák az ER folding kapacitását (77). Azok a fehérjék, amelyek továbbra sem képesek megfelelően feltekeredni, retrográd transzporttal a citoplazmába jutnak, ahol proteaszomák segítségével lebomlanak. Ezt a folyamatot ER-asszociált degradációnak (ERAD) nevezzük. Tehát a stresszválasz elősegíti a hibásan feltekeredett fehérjék foldingját illetve degradációját. Azonban ha az ER-stressz huzamosabb ideig fennáll és a hibás térszerkezetű fehérjék eltávolítása valamint a normál ER-funkciók helyreállítása nem teljes, apoptotikus sejthalál következhet be (78,79).

A hibásan feltekeredett fehérjék érzékelése és a stresszválasz beindulása három transzmembrán receptoron keresztül valósul meg, ezek a PERK, IRE1 illetve ATF6 (77,80). Ezek a fehérjék az ER membránjában találhatóak és nyugalmi helyzetben az ER lumene felőli szakaszukhoz kötődött BiP (immunoglobulin binding protein) fehérje tartja őket inaktív állapotban. A BiP fehérje chaperon funkciót tölt be és ER-stressz hatására disszociál a receptorokról, majd a hibásan feltekeredett fehérjékhez kötődik (81,82). A BiP sok másik chaperonhoz hasonlóan a foldolatlan fehérjék hidrofób felszínét ismeri fel. A BiP disszociációját követően a receptorok aktiválódnak. Elsőként

a PERK-receptor aktiválódik és foszforilálja az eIF2 iniciációs faktort. Ennek hatására a transláció gátlódik, így lecsökken az ER-be jutó naszcens fehérjék mennyisége, ami segíti a sejtek túlélését. Néhány fehérje translációja ugyanakkor független az eIF2-től, így az ER-stressz alatt is végbemehet. Az egyik ilyen fehérje az ATF4 transzkripciós faktor, amely a stresszvászért felelős gének expresszióját szabályozza. A PERK aktivációját időben az ATF6 receptor aktiválódása követi. Az aktiválódott ATF6 a sejtmagba transzlokálódik, ahol transzkripciós faktorként működik és többek között az XBP1 mRNS expresszióját indukálja. Az XBP1 szintén egy transzkripciós faktor, amelynek éréséért az utolsóként aktiválódott IRE1 receptor felelős. Az IRE1 receptor egy 26 nukleotid hosszúságú intront távolít el az XBP1 mRNS-éből. Az így keletkezett érett sXBP1 forma bejut a sejtmagba ahol a stresszvászért felelős gének expresszióját indukálja. Az ER-stressz kezdeti szakaszaiban az indukálódott transzkripciós faktorok először a sejt túléléséért felelős gének átírását fokozzák. Azonban ha mindez nem elegendő a sejtek adaptációjához és a normál funkciók helyreállításához, ugyanezen transzkripciós faktorok az apoptotikus sejthalálban résztvevő gének, mint például a CHOP expresszióját indukálják. A CHOP transzkripciós faktor az anti-apoptotikus gének expressziójának gátlásán keresztül fejti ki hatását.

Mindezek alapján felmerült annak lehetősége, hogy a CTRC esetében a mutáció indukálta szekréciós defektus a fehérjék hibás feltekeredésének és sejten belüli lebomlásának a következménye. A kérdés tisztázására laboratóriumunk a leggyakrabban előforduló A73T mutáns CTRC funkcionális hatását AR42J-sejtekben vizsgálta meg nagyobb részletességgel (10). Az eredmények szerint az A73T mutáció a patkány eredetű sejtekben a CTRC csökkent szekrécióját idézte elő. Mindemellett a BiP mRNS és fehérje-mennyiségének emelkedése, valamint az XBP1 splicing-jának aktiválódása is megfigyelhető volt a mutáns CTRC-vel transzfektált sejtekben. Mindez arra utal, hogy az A73T mutáns CTRC ER-stresszt okoz az acinussejtekben, ami minden bizonnyal a fehérje hibás feltekeredésének köszönhető. Két napos transzfekciót követően az acinussejtek apoptotikus sejthalála is megfigyelhető volt. Ez valószínűleg az ER-stresszvász következménye, mivel a CHOP transzkripciós faktor expressziója jelentős mértékben megnövekedett a mutáns plazmida transzfektált sejtekben.

In vivo az acinussejtek fokozott apoptózisa a hasnyálmirigy károsodásához és funkcióvesztéséhez vezethet. Patkányokban argininnel illetve kolecisztochinin-

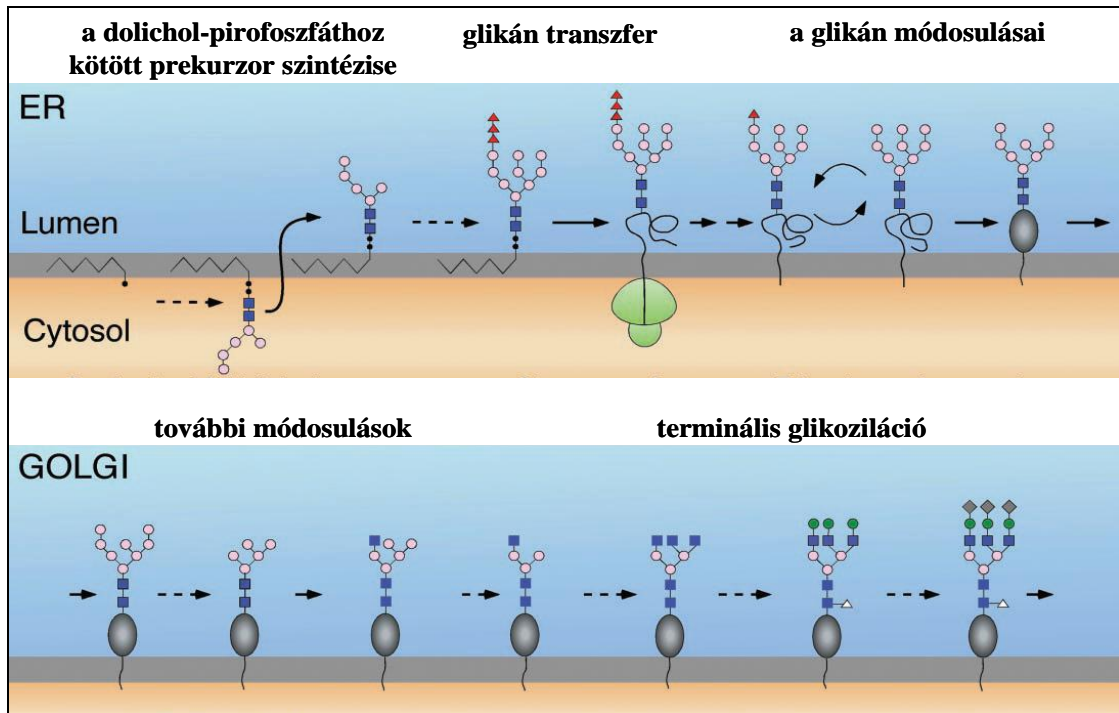
analógokkal kiváltott akut pankreatitisz során szintén megfigyelhető volt az ER-stressz markergének valamint a CHOP és a proapoptotikus kaszpáz-12 és kaszpáz-3 fokozott expressziója. A sejtek apoptotikus pusztulását TUNEL festéssel is igazolták. Mindez azt bizonyítja, hogy az ER-stressz jelentős mértékben közrejátszik az akut pankreatitisz lefolyásában (83,84).

Így feltehetőleg a CTRC mutációi nem csupán a fehérje tripszindegradáló funkciójának csökkenése révén, hanem az ER-stressz okozta apoptózis indukálásával is növelik a pankreatitisz kialakulásának kockázatát.

#### **5.4 A fehérjék N-glikozilációja**

Az N-glikoziláció a fehérjék egy poszt-transzlációs módosulása, amely az endoplazmatikus retikulumban megy végbe, így főként a szekréciós illetve membránfehérjékre jellemző (85). Az N-glikoziláció esetén az oligoszacharid a fehérjék aszparagin-oldalláncához kötődik. Az újonnan szintetizálódott fehérjékhez először egy egységes szerkezetű oligoszacharid-oldallánc rögzül, amely további módosulásokon megy keresztül az ER-ben, majd a Golgiban (3. ábra). Az egységes szerkezetű oligoszacharidlánc 14 cukoralegységből épül fel és az ER membránjában elhelyezkedő dolichol-pirofoszfát-molekulához kötődik. Az N-glikán szintézise az ER membrán citoplazma felőli oldalán kezdődik, majd az oligoszacharidlánc átfordul az ER lumenébe, ahol további cukoralegységek kapcsolódnak az oldallánchoz. Az így keletkezett N-glikánt a dolichol-pirofoszfát-molekuláról az oligoszachariltranszferáz enzim kapcsolja a fehérjelánchoz (3. ábra).





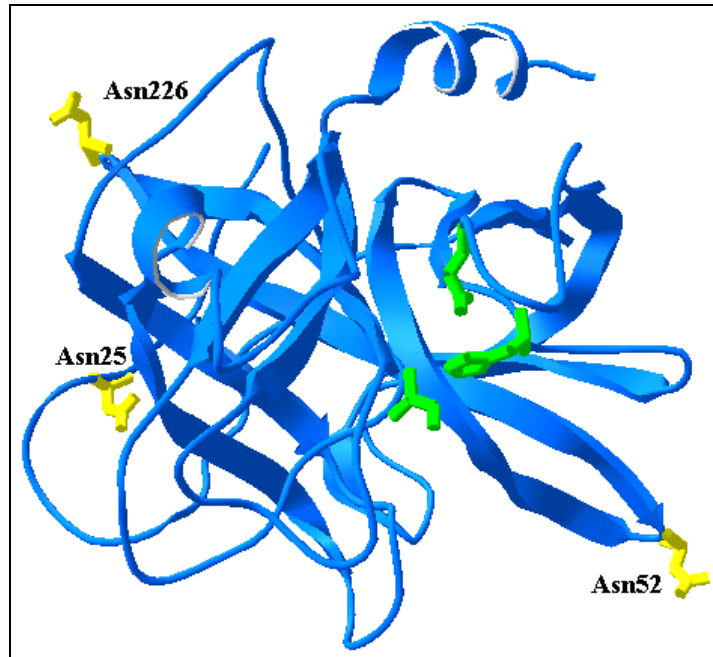
**3. ábra. Az N-glikánok bioszintézise.** Az N-glikán szintézise az ER membrán citoplazma felőli oldalán kezdődik, majd az oligoszacharidlánc átfordul az ER lumenébe, ahol további cukor alegységek kapcsolódnak az oldallánchoz. Az így keletkezett egységes szerkezetű N-glikánt a dolichol-pirofoszfát-molekuláról az oligoszachariltranszferáz enzim kapcsolja a fehérjelánchoz. Az oligoszacharid-oldallánc további módosulásokon megy keresztül az ER-ben, majd a Golgiban (85).



Az oligoszachariltranszferáz specifikusan a fehérjék Asn-X-Ser/Thr konszenzus szekvenciáját ismeri fel, amely egy speciális konformációt vesz fel, miközben a naszcens polipeptidlánc az ER lumenébe transzlokálódik (86-88). A konszenzus szekvenciák aszparagin-oldallánca az esetek 70-90%-ában glikozilálódik. A fehérjékhez kapcsolódó N-glikán számos funkciót tölthet be, többek között elősegíti a fehérjék foldingját, sejten belüli transzportját és szekrécióját (85,89-91). Az N-glikán egyrésről közvetlen hatást gyakorolhat a fehérjeláncre, azonban különböző chaperonok, lektinek kötődését is lehetővé teszi. Továbbá az oligoszacharid-oldallánc befolyással lehet az érett fehérjék stabilitására valamint specifikus funkcióikra (92).

Bár a szekretoros fehérjék jelentős hányada keresztülmegy N-glikoziláción, a pankreatikus enzimek nagy részére, így a tripszinogénekre, a B-típusú kimotripszinogénekre, a karboxipeptidázokra illetve az elasztáz 2A-ra nem jellemző ez

a posztranszlációs módosulás. Ezzel szemben a humán kimotripszinogén C elsődleges aminosavszekvenciájában három N-glikozilációs konszenzus-szekvencia található. Ezek mindegyike a fehérje felszínén helyezkedik el, így nagy valószínűséggel keresztülmegy glikoziláción (4. ábra). A CTRC-n kívül az elasztáz 3A és 3B fehérjék szekvenciájában is találhatóak potenciális N-glikozilációs helyek.



**4. ábra. A humán kimotripszin C potenciális N-glikozilációs helyeinek elhelyezkedése.** A fehérje térszerkezetét mutató szalagdiagramon a potenciális N-glikánokat hordozó aszparagin aminosavak oldalláncát sárga, a katalitikus triádot alkotó aminosavak oldalláncát zöld színnel jelöltük. A diagramot a DeepView/Swiss-PdbViewer (3.7 verzió) segítségével készítettük a szarvasmarha CTRC röntgendiffrakcióval meghatározott kristályszerkezetének felhasználásával (93).

### **5.4.1 Az N-glikoziláció szerepe a fehérjék feltekeredésében és sejten belüli irányításában**

Számos tanulmány támasztja alá, hogy az N-glikánok fontos szerepet játszanak a fehérjék foldingjának elősegítésében. Az oligoszacharid-oldallancok eltávolítása, illetve a glikoziláció gátlása sok esetben a fehérjék hibás feltekeredéséhez, aggregációjához illetve csökkent szekréciójához vezet (85,94-97). Az N-glikán fehérjefoldingra gyakorolt hatását az is bizonyítja, hogy az oligoszacharid már kotranszlációban a fehérje ER-lumenbe való jutásakor hozzákapcsolódik a naszcens polipeptidlánchoz (85,86,88).

In vitro tanulmányok alapján az N-glikoziláció közvetlen hatással lehet a fehérjefoldingra (98-102). Egyrészt a nagy méretű poláris oligoszacharid-oldallanc növeli a naszcens fehérje oldékonyságát és ezáltal csökkenti az aggregáció esélyét. Másrészt egyes elméletek szerint az oligoszacharid-oldallanc a hidrofilitása révén a környező peptidszakaszt a molekula felszínére juttatja, ezáltal aktívan részt vesz a polipeptidlánc feltekeredésének folyamatában. Továbbá az N-glikoziláció a polipeptidlánc flexibilitásának csökkentése révén fokozza a fehérje stabilitását.

Ugyanakkor az N-glikozilációnak közvetett szerepe is lehet a folding folyamatokra, mivel lehetővé teszi a fehérjék calnexin/calretikulin chaperonokhoz való kötődését (85,103). Ez a két lektinmolekula nagyfokú hasonlóságot mutat, azonban a calnexin az ER membránjához kötődik, míg a calretikulin az ER lumenében szolubilis formában van jelen. Mindkét chaperon asszociálódik az ERp57 thiol-oxidoreduktázzal, amely elősegíti a megfelelő diszulfidhidak kialakulását és ezáltal biztosítja a fehérjék helyes feltekeredését (104). A glikoproteinek csak akkor képesek a calnexin/calretikulin chaperonokhoz kötődni, miután a glükozidáz I illetve II enzim eltávolít két glükózcsoportot az oligoszacharid-oldallánról. Abban az esetben, ha a polipeptidlánc megfelelően feltekeredett, a glükozidáz II enzim az utolsó glükózilcsoportot is eltávolítja a fehérjéről, amely ezt követően disszociálódik a chaperonokról, majd a Golgiba jut. Amennyiben viszont a polipeptidlánc feltekeredése nem volt sikeres, a glükoziltranszferáz újra egy glükózilcsoportot kapcsol az oligoszacharid-oldallánhoz, így a fehérje ismét kötődni képes a calnexin/calretikulin chaperonokhoz. Ez a ciklus egészen addig zajlik, amíg a fehérje fel nem veszi a megfelelő struktúráját. Ha ez mégsem következik be, a fehérje a citoszolba transzlokálódik és proteaszomák segítségével lebomlik. Ennek megfelelően tehát a calnexin-calretikulin-rendszer a

fehérjék foldingjának elősegítésén túl minőségellenőrző szerepet is betölt és a hibásan feltekeredett fehérjéket az ER-asszociált degradáció (ERAD) felé irányítja (85,89,91). Mindez azáltal valósul meg, hogy a hibásan feltekeredett fehérjék oldalláncáról az ER-mannozidáz I több mannóz-csoportot eltávolít. Az így keletkezett  $\text{Man}_{5,6}\text{GlcNAc}_2$  struktúra könnyen felismerhetővé válik az OS9 lektin számára, amely elősegíti a fehérjék ubiquitinizációját és proteasomális lebontását. Mivel az ER-mannozidáz I viszonylag lassan működő enzim, ezért az ERAD feltehetőleg időigényes folyamat. Ezt támasztják alá azok a tanulmányok is, amelyek szerint a fehérjék calnexin-calretikulinciklusban való tartózkodásának ideje döntő szerepet játszik a proteasomális lebontásuk szempontjából (89,105,106).

A fentiekben elmondottakkal szemben a megfelelően feltekeredett glikoproteinek oligoszacharid-oldalláncáról legfeljebb egyetlen mannóz-csoport hasad le. A nagy mannóztartalmú glikán struktúrát ( $\text{Man}_{8,9}\text{GlcNAc}_2$ ) az ERGIC-53 mannóz-specifikus lektin ismeri fel, amely a fehérjék ER-ből Golgiba való transzportjáért felelős (85,90,103). A Golgiban az addig egységes szerkezetet mutató oligoszacharid-oldalláncok további módosulásokon mennek keresztül, amelynek során a Golgi-mannozidázok különböző mértékben mannóz-csoportokat távolítanak el az N-glikánról. Ezen kívül újabb cukor-alegységek, mint például N-acetilglükózamin, galaktóz, fukóz illetve szialsav is hozzákapcsolódhat az oligoszacharidlánchoz (3. ábra) (85). Ezek a módosulások az N-glikán nagyfokú diverzitását teszik lehetővé, amely nemcsak az érett fehérjék funkcióra lehet hatással, hanem további információt szolgáltat a fehérjék megfelelő célba juttatásához. A VIP36 lektinmolekula a transz-Golgiban található membránfehérje, amelynek a lumen felőli szakasza specifikusan a nagy mannóztartalmú N-glikánokat ismeri fel. Kutya vesesejteken (MDCK) való vizsgálatok szerint a VIP36 a megkötött glikoproteineket a sejtek apikális felszíne felé irányítja (103). A lizoszómális enzimek lizoszómákba való irányítása szintén lektinekhez kötött folyamat (85,103). Ennek első lépéseként a lizoszómális hidrolázok glikozilcsoportjának terminális mannóz-oldalláncát a cisz-Golgiban található foszfo-transzferáz enzim foszforilálja. A foszfo-transzferáz a lizoszómális enzimek felszínén speciálisan elhelyezkedő lizin-oldalláncokat ismeri fel. Az így létrejött mannóz-6-foszfát struktúra teszi lehetővé a fehérjék mannóz-6-foszfát-receptorokhoz való kötődését. A mannóz-6-foszfát-receptorok a transz-Golgi membránjában elhelyezkedő integráns fehérjék, amelyek a

lizoszómális enzimek megkötése után klatrinburokkal lefűződnek a Golgiról, majd összeolvadnak a lizoszómákkal. A lizoszómák savas pH-jának hatására a hidrolázok disszociálnak a receptorokról. Ezt követően a mannóz-6-foszfát-receptorok visszajutnak a transz-Golgiba, ahol újabb lizoszómális enzimeket kötnek meg.

#### **5.4.2 Az N-glikoziláció hatása az érett fehérjékre**

Az N-glikánok sok esetben a fehérjék feltekeredését követően is számos fontos funkciót tölthetnek be (92). Az oligoszacharid-oldallánc nemcsak a naszcens fehérjék, hanem a már érett fehérjék stabilitását is nagymértékben megnövelheti (100,107,108). Több esetben kimutatták, hogy a glikozilcsoportok eltávolítása csökkenti a fehérjék termostabilitását (102,109). Az N-glikánok stabilizálhatják a fehérje konformációját illetve elfedhetik a fehérjék hidrofób szakaszait, ezáltal megakadályozzák az aggregációjukat (99). Az immunválaszban résztvevő glikoproteinek tanulmányozása során arra is fény derült, hogy az oligoszacharid-oldallancok védelmet biztosítanak a proteolitikus hasításokkal szemben, illetve megakadályozzák a nem specifikus fehérje-fehérje kölcsönhatásokat (110).

Az N-glikán a fehérje funkciójára is befolyással lehet, így számos élettani folyamatban is lényeges szerepet játszik (92). Mára már nagyon sok olyan tanulmány található az irodalomban, amelyek szerint az oligoszacharid-oldallánc jelenléte növeli vagy éppen csökkenti az enzimek aktivitását. Az egyik legtöbbet tanulmányozott enzim az N-acetilglükózamin-transzferáz, amely három glikozilcsoporttal rendelkezik (111). Mindhárom N-glikán növeli az enzimaktivitását. A hatásuk additív jellegű, mivel az eltávolított glikánok mennyiségével az enzimaktivitás arányosan csökken és a teljes deglikoziláció az enzim inaktivitásához vezet. Ugyanakkor a lecitin és az endoteliális lipáz esetében a különböző pozíciókban elhelyezkedő glikozilcsoportok más-más hatással vannak az enzimaktivására (96,112-116). Így egyes glikozilcsoportok eltávolítása csökkenti, míg másoké növeli az enzimaktivitást. Továbbá mindkét enzim esetén megfigyelhető volt, hogy az enzim szubsztrát-specifitása szintén változik egyes glikán csoportok eliminálásával. Sőt a lecitin szubsztrát-specifitását pusztán a neuraminidázzal való kezelés is megváltoztatta (117). A neuraminidáz a terminális szíálsav-csoportot távolítja el az oligoszacharid-oldallánctól, így nagy valószínűséggel nemcsak a glikozilcsoport megléte, hanem a struktúrája is befolyásolja a katalitikus folyamatokat. Bár ezeknek a jelenségeknek a pontos mechanizmusa jelenleg nem ismert,

az enzimaktivitás növekedéséért felelős N-glikánok feltehetőleg az enzim aktív konformációjának stabilizálásán keresztül fejtik ki hatásukat. Ezzel szemben azokban az esetekben, ahol a glikozilcsoport az enzim aktivációját csökkenti vagy a szubsztrát-specifitását befolyásolja, az oligoszacharid-oldallánc többnyire közel helyezkedik el az enzim aktív helyéhez, így valószínűleg közvetlenül részt vesz a katalitikus folyamatokban. Egyes elméletek szerint az N-glikán térbeli gátlással befolyásolhatja a szubsztrát hozzáférhetőségét (92).

Ugyanakkor több tanulmány beszámol arról is, hogy az N-glikánok a sejtfelszíni receptorok ligandkötésére illetve a sejtadhéziós molekulák funkcióira is hatással lehetnek, ezáltal a szignáltranszdukciós folyamatokat is befolyásolhatják (92,118-120).

## 6 CÉLKITŰZÉSEK

A kimotripszin C (CTRC) tripszinaktivitást szabályozó funkciója kritikus szerepet tölthet be a hasnyálmirigy-gyulladás elleni védelemben, mivel a CTRC funkcióvesztő mutációi növelik a krónikus pankreatitisz kialakulásának esélyét. Ebből kifolyólag érdemesnek tűnt megvizsgálni, hogy a CTRC milyen más hasnyálmirigy eredetű enzim aktivációjának, esetleg degradációjának szabályozásában vesz részt. Ugyanakkor a CTRC mutációinak következtében hibásan feltekeredett fehérjék ER-stresszt váltanak ki, ami az acinussejtek apoptotikus sejthalálához vezethet. Így szintén fontos lehet a CTRC feltekeredésében szerepet játszó mechanizmusok megismerése.

A jelen dolgozatban bemutatásra kerülő munka célkitűzései a következők voltak:

### 1. A CTRC prokarboxipeptidáz aktivációjában betöltött szerepének vizsgálata

1.1. A CTRC hatásának vizsgálata a proCPA1, proCPA2 és proCPB1 aktivációjára

1.2. A CTRC hatásának vizsgálata a proCPA1, proCPA2 és proCPB1 tripszin általi aktivációjára

1.3. A prokarboxipeptidáz aktivációs mechanizmusának pontos feltárása és a propeptid tripszin illetve CTRC általi hasítási helyeinek meghatározása

### 2. A CTRC N-glikozilációjának vizsgálata

2.1. A humán CTRC N-glikoziláltságának vizsgálata: annak meghatározása, hogy a három potenciális N-glikozilációs hely közül melyek hordoznak ténylegesen glikozilcsoportot

2.2. Az N-glikoziláció hatásának vizsgálata a CTRC feltekeredésére, szekréciójára illetve az enzim aktivitására és inhibitor kötésére

2.3. Annak meghatározása, hogy a glikozilcsoport pozíciójának van-e jelentősége a CTRC szekréciójára és aktivitására

2.4. Különböző fajokban található CTRC-fehérje N-glikozilációjának összehasonlító vizsgálata

## 7 FELHASZNÁLT ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 7.1 Plazmidkészítés

A humán CTRC, proCPA1 és proCPA2 cDNS-ét kódoló pcDNA3.1(-) eukarióta expressziós plazmidok a laboratóriumban rendelkezésre álltak.

A patkány CTRC-gén cDNS-ét az AR42J patkány eredetű acinussejtvonalból izolált cDNS-ből klónoztuk. A PCR-reakcióhoz a patkány CTRC XhoI sense 5'-AAATTTCTCGAGGAACACCTGAACCATGTTGGGAATTAC-3' és a patkány CTRC HindIII antisense 5'-TGGAAGAAGCTTTATTGCTGTTGGGAG-3' primereket használtuk. A PCR-terméket az XhoI és HindIII restrikciós enzimekkel emésztettük és az ugyanezen enzimekkel emésztett pcDNA3.1(-) vektorba ligáltuk.

A szarvasmarha CTRC GenScript cég által szintetikusán előállított cDNS-ét XhoI és EcoRI restrikciós enzimekkel emésztettük és az ugyanezen enzimekkel emésztett pcDNA3.1(-) vektorba ligáltuk.

Az AR42J-sejteket adenovírus segítségével infektáltuk. Az adenovírus előállításához a vad típusú és az N52S mutáns CTRC cDNS-ét a pcDNA3.1(-) plazmidból XhoI és EcoRI restrikciós enzimek segítségével kivágtuk és a VQ Ad5CMV shuttle vektorba klónoztuk. A rekombináns adenovírusokat a Viraquest, Inc. (North Liberty, Iowa) készítette el. A fertőzőképes vírusok koncentrációját Adeno-X Rapid Titer Kit (Clontech) segítségével határoztuk meg. Ennek alapján a törzsoldatban a vad típusú CTRC-adenovírus koncentrációja  $2 \times 10^{10}$ , míg az N52S mutáns CTRC-adenovírus koncentrációja  $10^{10}$  pfu/ml volt.

### 7.2 Irányított mutagenezis

A mutánsokat overlap extension PCR mutagenezissel készítettük el. Ennek során két mutagén primert és két külső primert használtunk. A mutagén primerek szekvenciáit az 1. táblázat tartalmazza. Külső primerként a pcDNA3.1(-) vektorra illeszkedő sense (T7 promotor primer, Invitrogen) illetve antisense (pcDNA3.1/BGH reverse primer, Invitrogen) primert használtuk. Az első lépésben templátként a vad típusú CTRC/CPA



cDNS-ét tartalmazó pcDNA3.1(-) vektort alkalmaztuk. PCR segítségével felszorzottuk a sense külső primer és az antisense mutagén primer, valamint a sense mutagén primer és az antisense külső primer által határolt szakaszokat. A két PCR-terméket megtisztítottuk és ezek szolgálták a következő PCR-reakció templátjaként, amelynek során a külső primerekkel felszorzottuk a teljes DNS-szakaszt, amely már a mutációt is hordozta. A mutáns PCR-terméket pcDNA3.1(-) vektorba ligáltuk. A HEK 239T sejtek transzfektálására használt plazmid-preparátumokat a QIAGEN HiSpeed Plasmid Midi kitjével készítettük. Az elkészült preparátumok koncentrációját 260 nm-en mért abszorbanciájuk alapján határoztuk meg, majd agaróz-gélelektroforézissel ellenőriztük. A mutagenézis sikerességéről minden esetben szekvenálással is meggyőződünk. A szekvenálás a Boston University Medical Center szekvenáló laboratóriumában történt.

**1. táblázat. A mutáns CTRC- (A) illetve CPA- (B) konstrukciók készítéséhez használt mutagén primerek.** Minden egyes mutáció beviteléhez egy sense (S) és egy antisense (A) mutagén primert használtunk. A mutagenézis leírását lásd a szövegben. A vastag betűvel szedett nukleotidok a mutációk helyét jelzik.

**A)**

Primer neve		Szekvencia
Humán	N25S S	5' -TTCCCGCCC <b>TC</b> CCTATCCGCCC-3'
Humán	N25S A	5' -GGCGGATAGG <b>GA</b> GGGCGGGAA-3'
Humán	N52S S	5' -TACCTCAAG <b>TC</b> CGACACGTGG-3'
Humán	N52S A	5' -CCACGTGTCG <b>GA</b> CTTGAGGTA-3'
Humán	N226S S	5' -CAGTTGGAG <b>TC</b> CGGTTCTTGG-3'
Humán	N226S A	5' -CCAGGAACCG <b>GA</b> CTCCAAGT-3'
Humán	E92T S	5' -AACAACTG <b>AC</b> GGTGGAAGAC-3'
Humán	E92T A	5' -GTCTTCCACC <b>GT</b> CAGGTTGTT-3'
Patkány	N90S S	5' -GGGAAGTATAG <b>T</b> CTGACAGTG-3'
Patkány	N90S A	5' -CACTGTCAGAC <b>T</b> TATACTTCCC-3'
Sz.marha	E92T S	5' -AACAACTG <b>AC</b> GGTGGAAGAC-3'
Sz.marha	E92T A	5' -GTCTTCCACC <b>GT</b> CAGGTTGTT-3'
Sz.marha	D52N, N53D S	5' -TACCTCAGG <b>ATG</b> ACACGTGGAGG-3'
Sz.marha	D52N, N53D A	5' -CCTCCACGTG <b>TCA</b> TTCTTGGAGGTA-3'

## B)

Primer neve			Szekvencia
CPA1	R110Q	S	5'-TTCCGGTCCC <b>A</b> GGCGCGCTCC-3'
CPA1	R110Q	A	5'-GGAGCGCGCC <b>T</b> GGGACCGGAA-3'
CPA1	L96I, L97I	S	5'-GACGTGCAGTCC <b>ATAATT</b> GACGAGGAGCAG-3'
CPA1	L96I, L97I	A	5'-CTGCTCCTCGTCA <b>AATAAT</b> CGACTGCACGTC-3'
CPA1	R237A	S	5'-CGCATGTGG <b>GC</b> CAAGACTCGG-3'
CPA1	R237A	A	5'-CCGAGTCTT <b>GC</b> CCACATGCG-3'
CPA2	R112Q	S	5'-AGAAGAGAAC <b>A</b> GAGTGGTAAC-3'
CPA2	R112Q	A	5'-GTTACCACTC <b>T</b> GTTCTCTTCT-3'
CPA2	L96I, L97I	S	5'-GACGTGCAGGTC <b>ATAATT</b> GACAAAGAGAATGAA-3'
CPA2	L96I, L97I	A	5'-ATTCTCTTTGTC <b>AATAAT</b> GACCTGCACGTC-3'
CPA2	R235A	S	5'-CGTATGTGG <b>GC</b> GAAGACCCGG-3'
CPA2	R235A	A	5'-CCGGGTCTT <b>GC</b> CCACATACG-3'

### 7.3 Sejtenyésztés és transzfekció

A HEK 293T-sejtvonal a humán embrionális veséből származó HEK-sejtvonal származéka (121), amely az SV40-vírus nagyméretű T-antigénjét stabilan hordozza. Az SV40 replikációs origóját tartalmazó plazmidok a HEK 293T-sejtekben igen magas kópiaszámot érhetnek el, így erős expressziót eredményeznek (122). A sejtek tenyésztéséhez DMEM-médiumot használtunk, amelyet 10% borjúsérummal, 4 mM L-glutaminnal és 1% penicillin/streptomycin oldattal egészítettünk ki. A sejteket 37 °C-on, 5% CO<sub>2</sub>-tartalom mellett, telített páratartalmú inkubátorban tenyésztettük.

A transzfekciós kísérletek mindegyike két-két párhuzamos transzfekciót jelentett a vad típusú illetve a mutáns CTRC-t tartalmazó plazmiddal. A transzfekció előtti napon 10<sup>6</sup> sejtet 6 lyukú sejtenyésztő edénybe ültettünk. A transzfekciót 4 µg plazmiddal és 10 µl Lipofectamine 2000 reagenssel (Invitrogen) végeztük 2 ml DMEM-ben. 16-20 óra múlva a sejteket OptiMEM-el mostuk és a transzfekciós médiumot 2 ml OptiMEM-re cseréltük le. Ettől a tápcserétől számítva a sejteket 48 órán keresztül inkubáltuk.

Az AR42J patkány acinussejteket 20% borjúsérumot, 4 mM L-glutamint és 1% penicillin/streptomycin-oldatot tartalmazó DMEM-ben tenyésztettük 37 °C-on, 5% CO<sub>2</sub>-tartalom mellett. A transzfekció előtt a sejteket 6 lyukú sejtenyésztő edénybe ültettük és 48 órán keresztül 100 nM dexamethasonnal kezeltük, hogy differenciálódásukat elősegítsük (123). A virális infekciót 10<sup>7</sup>, 5x10<sup>7</sup>, 2x10<sup>8</sup> pfu/ml adenovírus

koncentrációkkal végeztük 1 ml 100 nM dexamethasont tartalmazó OptiMEM-ben. A médiumot 1 napos inkubáció után gyűjtöttük be.

#### 7.4 ÖsszRNS-izolálás és RT-PCR

Az összRNS-izolálást az RNAqueous kittel (Ambion) végeztük. A sejteket a transzfektálás után 24 órával gyűjtöttük be a kithoz tartozó lízispuffer segítségével. Az elkészült RNS-preparátumok koncentrációját 260 nm-en mért abszorbanciájukból számítottuk, minőségüket pedig agaróz-gélelektroforézissel ellenőriztük. A reverz transzkripcióhoz 1 µg RNS-t használtunk templákként, a reakciót az M-MLV reverz transzkriptázzal (Ambion) végeztük 25 µl végtérfogatban. A PCR-reakcióhoz 1 µg cDNS-t használtunk, amelyet HotStar DNA Polymerase (Qiagen) segítségével sokszoroztunk fel. A PCR-terméket 1-2%-os agarózgélen megfutattuk és etídium-bromiddal festettük.

A PCR-reakcióhoz használt (patkány-specifikus) primerek szekvenciái:

XBP1 sense: 5' –GCTTGTGATTGAGAACCAGG– 3'

XBP1 antisense: 5' –AGGCTTGGTGTATACATGG–3'

GAPDH sense: 5' –GTCTACTGGCGTCTTCACCA–3'

GAPDH antisense: 5' –GTGGCAGTGATGGCATGGAC– 3'

#### 7.5 Valós idejű (real-time) PCR

A reakcióhoz 0,2 µg cDNS-t, 1x ABI PCR Master Mix-et, gén specifikus TaqMan® primereket és gén specifikus FAM-mal jelölt próbát használtunk. A PCR-reakció 25 µl végtérfogatban zajlott. Minden gén esetén három párhuzamos mérést végeztünk. Az amplifikáció és szignál-detektálás az ABI 7500 Real Time PCR-készülék segítségével történt. A kezdeti 95 °C 10 perces denaturálást 40 kétlépcsős ciklus követte (95 °C, 15 s és 60 °C, 1 perc). A detektálás minden ciklusban a 60 °C-os szakaszok alatt történt. A  $C_T$ -értékeket az amplifikációs görbe exponenciális szakaszán határoztuk meg a 7500 System Sequence Detection Software 1.3 segítségével. A  $\Delta\Delta C_T$ -értékeket a vizsgált gének illetve a belső kontroll gének  $C_T$ -értékeinek a különbségeként definiáltuk. A relatív génexpressziót a  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  képlet alapján határoztuk meg. A

kísérleteket három „housekeeping” kontroll gén felhasználásával végeztük, amelyek a következők voltak: RNS-polimeráz II (RPII); hipoxantin-guanin-foszforibozil-transzferáz (HPRT); hidroximetilbilán-szintáz (HMBS). Mivel mindhárom kontrollgénre viszonyítva hasonló értékeket kaptunk, ezért a dolgozatban csak az RPII-re viszonyított adatok kerülnek bemutatásra.

A PCR-reakcióhoz használt (patkány-specifikus) TaqMan primerek (Applied-Biosystems) rendre:

RPII: Rn00580118\_m1

HPRT: Rn01527840\_m1

HMBS: Rn00565886\_m1

BIP: Rn00565250\_m1

Calnexin: Rn00596877\_m1

Calreticulin: Rn00574451\_m1

## **7.6 SDS-poliakrilamid-gélelektroforézis (SDS-PAGE)**

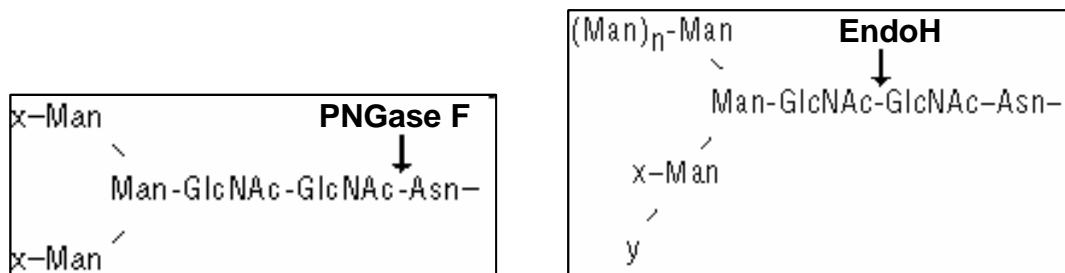
A fehérjéket 10% végkoncentrációjú triklórecetsav segítségével csaptuk ki, majd 15 µl 100 mM ditiotreitolt ill. 150 mM nátrium-hidroxidot tartalmazó Laemmlé pufferben oldottuk vissza. Ezt követően a mintákat 95 °C-on 5 percig hő-denaturáltuk. A CTRC glikozilációjának vizsgálatához 12%-os, míg a CPA aktivációjának nyomon követéséhez 18%-os SDS-poliakrilamid géleket használtunk. A fehérjéket Coomassie Blue festéssel tettük láthatóvá. Molekulatömeg markerként Page Ruler létrát használtunk (Fermentas).

## **7.7 CTRC deglikozilációja PNGaseF és EndoH glikozidáz enzimek segítségével**

A HEK 293T-sejtek által termelt vad típusú és mutáns CTRC glikoziláltsági állapotát PNGaseF és EndoH glikozidáz enzimek (BioLabs) segítségével ellenőriztük. Amint az 5. ábrán látható, a PNGaseF az aszparagin és az első N-acetil-glükózamin között hasít és ezáltal a teljes glikozilcsoportot eltávolítja a fehérjéről (124,125). A PNGaseF specificitását a glikozilcsoport szerkezete nem befolyásolja. A PNGaseF emésztéshez 200 µl kondicionált médiumot használtunk, amelynek fehérjetartalmát előzőleg 10%-os végkoncentrációjú triklórecetsav segítségével kicsaptunk. A

csapadékot 20  $\mu$ l 10% G7-puffert (50 mM nátrium-foszfát, pH 7,5) és 0,5  $\mu$ l (250 unit) PNGaseF enzimet tartalmazó reakcióeleggyel oldottuk vissza, majd 37 °C-on 3 órán keresztül inkubáltuk. Ezt követően a mintákat 12%-os SDS-poliakrilamid-gélen megfutattuk és Coomassie Blue-val festettük.

Az EndoH a glikozilcsoportot a két N-acetil-glükózamin között hasítja (5. ábra). Az EndoH kizárólag olyan oligoszacharid-láncokat hasít, amelyek nagy mennyiségben tartalmaznak mannóz-csoportot. Mivel a CTRC rezisztensnek bizonyult az EndoH elleni hasítással szemben, ezért a sejteket a transzfekció alatt, illetve az OptiMEM-es tápcserét követően 5  $\mu$ M végkoncentrációjú kifunensine-nel kezeltük, amely legátolja a Golgiban található mannozidáz I enzimet (125,126). Az így nyert kondicionált médiumból 200  $\mu$ l-t 10% G5 pufferrel (50 mM nátrium-citrát, pH5,5) és 1  $\mu$ l EndoH (500 unit) enzimmel egészítettük ki és 37 °C-on 3 órán keresztül inkubáltuk. Ezt követően 10% végkoncentrációjú triklórecetsav segítségével kicsaptunk és 12%-os SDS-poliakrilamid-gélen megfutattuk, majd Coomassie Blue-val festettük.



5. ábra. A PNGaseF és EndoH glikozidáz enzimek hasítási helyei

## 7.8 Rekombináns CTRC, ProCPA1, ProCPA2 és ProCPB1 termelése

A proteázokat HEK 293T-sejtek segítségével termeltettük. A transzfekció előtti napon  $7,5 \times 10^6$  sejtet ültettünk 75 cm<sup>2</sup>-es sejtenyésző edénybe. A transzfekciókat 30  $\mu$ g plazmid és 75  $\mu$ l Lipofectamine 2000 transzfekciós reagens felhasználásával végeztük a „Sejtenyésztes és transzfekció” című fejezetben leírtak szerint. A transzfekció után két nappal a sejteken levő OptiMEM médiumot begyűjtöttük és friss médiummal helyettesítettük. A sejteket újabb két napig inkubáltunk, majd a médiumot ismét begyűjtöttük. A 2-3 párhuzamos transzfekció alkalmával nyert médiumot lecentrifugáltuk és összeöntöttük, majd a fehérjéket megtisztítottuk.

## 7.9 A kimotripszinogén C tisztítása

A kimotripszinogén C-t ecotin affinitás-kromatográfiával tisztítottuk. Az ecotin *Escherichia coli*-ból izolált pán-proteáz-inhibitor, amely a kimotripszinogénnel stabil komplexet képez és annak kromatográfiás tisztítására használható (127,128).

### 7.9.1 Ecotin affinitáskromatográfiás oszlop készítése

A rekombináns ecotint (129) *E. coli* BL21 (DE3) sejtekben fejeztük ki. 1 liter kultúrát 0,7-es OD<sub>600</sub>-érték eléréséig növesztettük ampicillintartalmú LB-táppoldatban, majd az ecotin kifejeződését 0,5 mM IPTG hozzáadásával indukáltuk. Újabb 8 óra növesztés után a sejteket centrifugálással begyűjtöttük és mostuk. A periplazmatikus térbe kiválasztott ecotint ozmotikus sokk kiváltásával nyertük ki (130). A sejt pelletet tömény cukoroldattal (0,8 M szacharóz, 20 mM Tris-HCl (pH 8), 5 mM EDTA) kezeltük, majd centrifugálással összegyűjtöttük és jég hideg vízben feloldottuk. A periplazmatikus frakciónak megfelelő felülúszót használtuk tovább. A pH beállítása után a felülúszóból az ecotint gyantagyöngyökhöz rögzített tripszin-affinitásoszloppal tisztítottuk. A felülúszó felvitele után az oszlopot 20 mM Tris (pH 8), 0,2 M NaCl pufferrel mostuk, majd az ecotint 50 mM-os HCl-oldattal eluáltuk. Az eluátumot dialízis után liofilizáltuk. Az oszlop készítéséhez a termelt ecotint ACTIGEL ALD (Sterogene Bioseparations) gyantához immobilizáltuk redukzív aminálással. Az aldehid-aktivált agarózgyantát a liofilizált ecotinnal keverve 7-es pH-n, 0,1 M N-cianoborohidrid jelenlétében egy éjszakán át szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd 2 ml térfogatú oszlopba töltöttük.

### 7.9.2 Kimotripszinogén C tisztítása

A kimotripszinogén C-t tartalmazó médiumot közvetlenül az ecotin oszlopra vittük fel, amelyet előzőleg 20 mM Tris-HCl (pH 8) és 0,2 M NaCl-ot tartalmazó oldattal ekvilibráltunk, majd a minta felvitele után ugyanezzel az oldattal mostuk. A CTRC-t 50 mM HCl-oldattal eluáltuk. Az elúciót követően a preparátum pH-ját 0,1 M végkoncentrációjú Tris-HCl (pH 8) oldattal semlegesítettük.

A tisztított CTRC koncentrációját ecotinnal szembeni titrálással határoztuk meg (131). A titrálási reakcióban a kimotripszin koncentrációja 40 nM volt, ami két nagyságrenddel nagyobb, mint az ecotin gátlására jellemző  $K_i$ . Ilyen körülmények között az inhibitor disszociációja elhanyagolható.

## 7.10 A prokarboxipeptidáz tisztítása

A prokarboxipeptidázt tartalmazó kondicionált médiumot 20 mM Tris-HCl (pH 8) oldattal szemben dializáltuk, majd ioncserés kromatográfiával tisztítottuk. A médiumot MonoQ anioncserélő oszlopra vittük fel Pharmacia FPLC pumpa segítségével. Az oszlopot 20 mM Tris-HCl (pH 8) oldattal mostuk, majd a fehérjét NaCl-grádienssel (0-0,5 M) eluáltuk. Az 1 ml-es frakciókat SDS-poliakrilamid-gél segítségével analizáltuk és a legtisztábbnak bizonyuló mintát (90%-os tisztaságú) használtuk a további kísérletekhez.

A prokarboxipeptidáz koncentrációját 280 nm-en mért abszorbanciájából számítottuk a fehérje moláris extinkciós koefficiensének (CPA1:  $72435 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; CPA2:  $66600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; CPB1:  $85635 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) felhasználásával.

## 7.11 A kimotripszin C aktivitásának mérése

A kimotripszin C aktivitását egy kromogén szubsztrát, a Szukcinil-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilid hidrolízisének sebességével mértük. A szubsztrátot a CTRC a Phe után hasítja és ennek következtében sárga színű para-nitroanilin szabadul fel. Az utóbbi termék felhalmozódása a 405 nm-en mért abszorbancia időegység alatti változásának mérésével követhető. Méréseinkben a kimotripszinaktivitás egysége a  $\text{mOD}_{405}$  egy perc alatti növekedése volt, amelyet Spectramax Plus 384 microplate reader (Molecular Devices) segítségével mértünk.

### 7.11.1 Aktivitásmérés kondicionált médiumból

A kondicionált médiumból történő mérés előtt a HEK 293T-sejtek (37  $\mu\text{l}$ ) illetve az AR42J-sejtek (20  $\mu\text{l}$ ) médiumát 100 nM humán kationos tripszint, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ -ot és 100 mM Tris-HCl-ot (pH 8) tartalmazó 50  $\mu\text{l}$  végtérfogatú oldatban felaktiváltuk. A reakciót 37 °C-on 1 órán keresztül inkubáltuk. Ezt követően 150  $\mu\text{l}$  szubsztrátot (150  $\mu\text{M}$  végkoncentráció) adtunk az elegyhez és meghatároztuk a kimotripszin aktivitását.

### 7.11.2 A CTRC kinetikai paramétereinek meghatározása

A mérésekhez 1  $\mu\text{M}$  végkoncentrációjú tisztított kimotripszinogént 100 nM humán kationos tripszint, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ -ot és 100 mM Tris-HCl-ot (pH 8) tartalmazó, 500  $\mu\text{l}$  végtérfogatú oldatban felaktiváltunk. A reakciót 37 °C-on 1 órán keresztül inkubáltuk.

Az enzimkinetikai mérések során 20 nM CTRC-t (végkoncentráció) reagáltattunk növekvő koncentrációjú 1 mM  $\text{CaCl}_2$ -ot és 100 mM Tris-HCl-ot (pH 8) tartalmazó szubsztátoldattal (0-180  $\mu\text{M}$  Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilid). Az aktivitásadatokat (mOD/perc) a szubsztát-koncentráció függvényében ábrázoltuk, majd az így kapott pontokra hiperbolát illesztettünk. A hiperbola egyenlete alapján meghatároztuk a  $V_{\text{max}}$  - és  $K_M$ -értékeket és kiszámítottuk a  $k_{\text{cat}}$  sebességi állandót, továbbá a  $k_{\text{cat}}/K_M$  specificitás konstansát.

### 7.11.3 A CTRC aktivitásának vizsgálata $\beta$ -kazein és tripszinogén szubsztátokkal

A CTRC aktivitását természetes szubsztátjai, a  $\beta$ -kazein és humán kationos tripszinogén felhasználásával is nyomon követtük. A CTRC hasítási termékeit 15%-os, Coomassie Blue-val festett SDS-poliakrilamid-gélen tanulmányoztuk. A reakció során 0,2 mg/ml végkoncentrációjú  $\beta$ -kazeint 5 nM CTRC-vel inkubáltuk 37 °C-on 1 mM  $\text{CaCl}_2$ -ot és 100 mM Tris-HCl-ot (pH 8), illetve 20 nM SPINKI-et tartalmazó 500  $\mu\text{l}$  végtérfogatú oldatban. A reakcióelegyből 0, 2, 5 és 10 perc után 100  $\mu\text{l}$ -t 10% végkoncentrációjú triklórecetsavval kicsaptunk.

A kísérletekhez a tripszinogénnek egy inaktív mutáns formáját (K23Q) használtuk, hogy elkerüljük az autoaktiváció illetve a degradáció lehetőségét. A 2  $\mu\text{M}$  végkoncentrációjú tripszinogént 20 nM CTRC-vel inkubáltuk 37 °C-on 1 mM  $\text{CaCl}_2$ -ot, 100 mM Tris-HCl-ot (pH 8) és 20 nM SPINKI-et tartalmazó 500  $\mu\text{l}$  végtérfogatú oldatban. A reakcióelegyből 0, 10, 30 és 60 perc után 100  $\mu\text{l}$ -t 10% végkoncentrációjú triklórecetsavval kicsaptunk. A SPINKI szerepe a CTRC felaktiválásához használt tripszint gátlása volt.



## 7.12 A CTRC-inhibitor disszociációs állandójának ( $K_i$ ) meghatározása

A CTRC-inhibitor disszociációs állandóját a *Schistocerca gregaria* kimotripszininhibitor (SGCI) segítségével határoztuk meg a Laskowski-laboratóriumban kidolgozott módszer alapján. A reakció során 5 nM CTRC-t növekvő koncentrációjú inhibitoroldattal (0-40 nM) inkubáltunk 1 órán keresztül 0,1 M Tris-HCl-ot (pH 8), 1 mM  $\text{CaCl}_2$ -ot és 0,05% Tween-20-at (végkoncentráció) tartalmazó oldatban 22 °C-on, 200  $\mu\text{l}$  végtérfogatban. Az egyensúly beállta után szabadon maradó proteáz koncentrációját AMC fluoreszcens szubsztrát segítségével határoztuk meg. A szubsztrátból 5  $\mu\text{l}$ -t adtunk az elegyhez, ami elhanyagolható térfogatváltozást okozott, így nem befolyásolta az egyensúlyi állapotot. A szabad CTRC-koncentrációt az össz-inhibitor koncentrációjának függvényében ábrázoltuk. Az így kapott pontokra a következő függvényt illesztettük:  $y = E - (E + x + K - \sqrt{(E + x + K)^2 - 4Ex}) / 2$ , ahol az  $x$  jelenti az össz-inhibitor koncentrációt, az  $y$  a szabad proteáz koncentrációja,  $K = K_D$  és  $E$  az össz-proteáz koncentrációja. Az egyenletből meghatároztuk a  $K_D$  értékét.

## 7.13 A karboxipeptidáz aktivitásának mérése

A CPA1 és CPA2 aktivitását *N*-[4-metoxifenilazofornil]-L-fenilalanin kromogén szubsztrát segítségével határoztuk meg. Ebben az esetben a sárga színű szubsztrát a Phe lehasadása után színtelenné válik. A reakció során bekövetkező abszorbancia-csökkenést 350 nm-en 2 percig követtük Spectramax Plus 384 microplate reader (Molecular Devices) segítségével.

A prokarboxipeptidáz aktiválása 100  $\mu\text{l}$  végtérfogatban zajlott. A reakció során 2  $\mu\text{M}$  végkoncentrációjú proCPA-t aktiváltunk 100 nM kationos tripszinnel és 50 nM CTRC-vel, 50 mM NaCl-ot, 20 mM Tris-HCl-ot (pH 8) és 0,05% Tween 20-at tartalmazó oldatban. A Tween 20 szerepe a reakcióban az volt, hogy az inkubálás alatt megakadályozza a fehérjék kitapadását a műanyag felszínhez. A reakciót 37 °C-on inkubáltuk, majd a mérésekhez 4  $\mu\text{l}$  oldatot (80 nM végkoncentráció) használtunk fel, amelyet 86  $\mu\text{l}$  1 mM  $\text{CaCl}_2$ -ot, 100 mM Tris-HCl-ot (pH 8) és 0,05% Tween 20-at

tartalmazó pufferrel hígítottunk. Az aktivitást 10  $\mu$ l 60 nM végkoncentrációjú szubsztrát hozzáadásával mértük.

A CPB1 aktivitását hasonló körülmények között *N*-[4-metoxifenilazoformil]-L-arginin felhasználásával mértük.

### 7.13.1 A CPA kinetikai paramétereinek meghatározása

A mérésekhez a 2  $\mu$ M végkoncentrációjú proCPA-t a fentiekkel megegyező körülmények között 37 °C-on 30 percen keresztül aktiváltuk.

Az enzimkinetikai mérések során 20 nM aktív CPA-t (végkoncentráció) reagáltattunk növekvő koncentrációjú, 1 mM CaCl<sub>2</sub>-ot, 100 mM Tris-HCl-ot (pH 8) és 0,05% Tween 20-at tartalmazó szubsztrátoldattal (0-140 nM *N*-[4-metoxifenilazoformil]-L-fenilalanin). Az aktivitásadatokat (mOD/perc) a szubsztrátkoncentráció függvényében ábrázoltuk, majd az így kapott pontokra hiperbolát illesztettünk. A hiperbola képletének alapján meghatároztuk a  $V_{\max}$ - és  $K_M$ -értékeket.

### 7.14 N-terminális szekvenálás

A CPA N-terminális szekvenálásához a fehérjéket 18%-os SDS-poliakrilamid-gélen megfuttattuk és PVDF (Immobilion-P, Millipore) membránra blottoltuk 300 mA áramerősség mellett 2 órán át. A membránt Coomassie Blue-val festettük. A festékfelesleg kimosásához 50%-os metanolt használtunk, majd a membránt szobahőmérsékleten szárítottuk egy éjszakán át. A szekvenálást David McCourt végezte a Midwest Analytical, Inc. (St. Louis, MO) laboratóriumában. Az eljárás során az N-terminális aminosavakat Edman-degradáció segítségével távolították el, majd az aminosavakat reverz fázisú HPLC-vel azonosították.

### 7.15 Tömegspektrometria

A CPA propeptid tripszin illetve kimotripszin általi hasítási helyeit tömegspektrometriai módszerrel határoztuk meg. Az emésztési reakciókat 0,17% trifluor-ecetsavval állítottuk le. A mintákat felhasználásig -20 °C-on tároltuk. A tömegspektrometriai méréseket Andrea Carpentieri és Catherine E. Costello végezte LTQ-Orbitrap<sup>TM</sup> hybrid tömegspektrométer (Thermo Fisher Scientific) segítségével a Boston University Medical Center laboratóriumában.

## 8 EREDMÉNYEK

### 8.1 A kimotripszin C szerepének vizsgálata a prokarboxipeptidáz aktivációjában

#### 8.1.1 A proCPA1 és proCPA2 termelése és tisztítása

A kísérletekhez használt prokarboxipeptidázt tranziens transzfelekcióval HEK 293T-sejtekben termeltettük, majd a fehérjét a kondicionált médiumból ioncserés kromatográfia segítségével megtisztítottuk a „Felhasznált anyagok és Módszerek” című fejezetben leírtak szerint. A tisztított zimogének N-terminális szekvenálása során a proCPA1 esetén a Lys-Glu-Asp-Phe-Val, míg a proCPA2 esetén a Leu-Glu-Thr-Phe-Val homogén szekvenciákat kaptunk, amelyek megfelelnek a fehérjék szekréción szignálpeptid lehasadása után várt N-terminális aminosav-szekvenciájának. A felaktivált CPA1 illetve CPA2 kinetikai paramétereit is ellenőriztük, amelyek hasonlóan bizonyultak az irodalomban leírtakhoz (2. táblázat) (132-134).

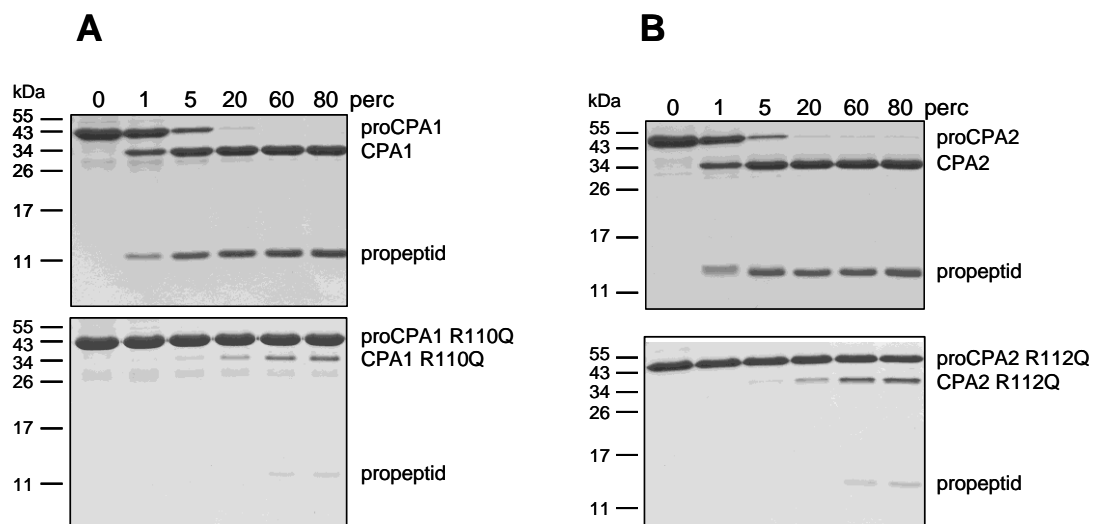
**2. táblázat. A humán CPA1 és CPA2 kinetikai paramétereit.** A CPA-aktivitást *N*-[4-metoxifenilazofornil]-*L*-fenilalanin szubsztát felhasználásával mértük 0,1 M Tris-HCl-ot (pH 8), 1 mM CaCl<sub>2</sub>-ot és 0,05% Tween 20-at tartalmazó, 100 µl végtérfogatú oldatban.

	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_M$ (µM)	$k_{cat}/K_M$ (M <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup> )
CPA1	13 ± 0,1	27,8 ± 0,9	4,7 × 10 <sup>5</sup>
CPA2	9,3 ± 0,5	65,4 ± 8,2	1,4 × 10 <sup>5</sup>

#### 8.1.2 A proCPA1 és proCPA2 tripszin általi aktivációja

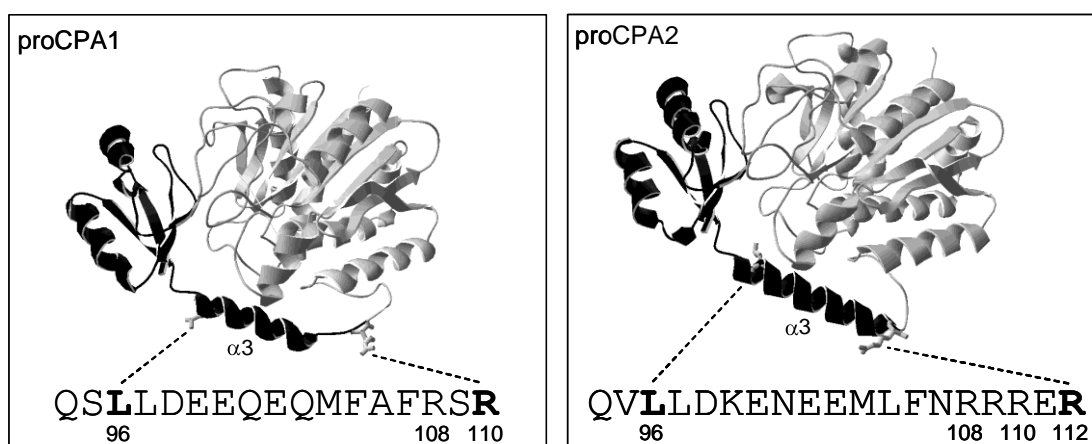
Elsőként a prokarboxipeptidáz tripszin általi aktivációját vizsgáltuk meg. Ehhez a zimogéneket humán kationos tripszinnel inkubáltuk, majd bizonyos időközönként a reakcióelegyből mintát vettünk és az emésztési termékeket SDS-poliakrilamid-gélen tanulmányoztuk. Amint a 6. ábrán látható, a proCPA1-et illetve a proCPA2-t a tripszin aktív karboxipeptidázzá és az N-terminális propeptiddé hasítja. A reakció már 5 perc

alatt majdnem teljesen lezajlik és mind a karboxipeptidáz, mind a propeptid stabil marad még 80 perc után is, mivel további degradációs termékeket nem figyelhettünk meg és az emésztési termékek mennyisége sem változott. Az emésztési termékeket N-terminális szekvenálással is megvizsgáltuk. A propeptid szekvenálása során ugyanazt az aminosav-szekvenciát kaptuk, mint a proenzim esetében, ami arra utal, hogy a tripszin csak a propeptid C-terminális végét hasítja. A CPA1 és a CPA2 N-terminális szekvenálása során homogén szekvenciákat kaptunk (CPA1: Ala-Arg-Ser-Thr-Asp, CPA2: Ser-Gly-Asn-Phe-Asn) és az eredmények alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a tripszin a proCPA1-et az Arg110-Ala111, míg a proCPA2-t az Arg112-Ser113 peptidkötéseknél hasítja, ami megfelel az irodalomban leírtaknak (40,43). Eredményeink megerősítésére a proCPA1 Arg110-es, míg a proCPA2 Arg112-es aminosavát mutagenézissel glutaminra cseréltük (R110Q CPA1; R112Q CPA2). A kísérlet során azt tapasztaltuk, hogy a mutáció mindkét proenzim esetében drámaian lecsökkentette a tripszin általi aktiváció sebességét, bizonyítva, hogy az Arg110/Arg112 aminosavak kritikus szerepet játszanak az aktivációs folyamatokban (6. ábra).



**6. ábra. A vad típusú és az R110Q mutáns proCPA1 (A), illetve vad típusú és az R112Q CPA2 (B) tripszin általi aktivációja.** 2  $\mu$ M prokarboxipeptidázt 100 nM humán kationos tripszinnel aktiváltunk 37 °C-on, 20 mM Tris-HCl-ot (pH 8) és 50 mM NaCl-ot (végkoncentráció) tartalmazó 100  $\mu$ l végtérfogatú oldatban. Az ábrán jelölt időpontokban a mintákat 10% végkoncentrációjú triklórecetsavval kicsaptuk és 18%-os SDS-poliakrilamid-gélen megfutattuk, majd Coomassie Blue-val festettük.

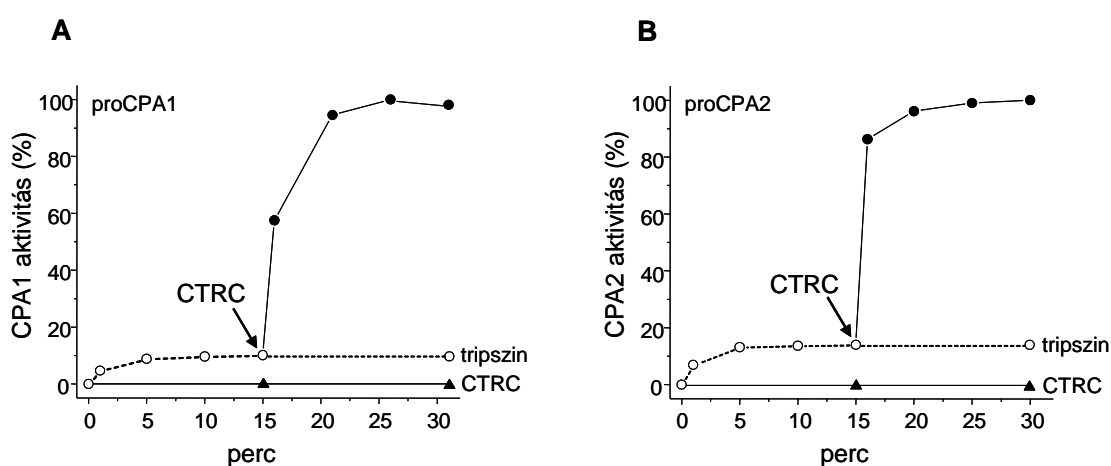
Ugyanakkor a propeptid tömegspektrometriai analízise azt mutatta, hogy 5 perces tripszinnel való inkubációt követően mind a CPA1, mind a CPA2 esetében a reakcióelegy főként olyan peptideket tartalmazott, amelyek C-terminális aminosava az Arg108 volt. Kisebb mennyiségben az Arg110 (CPA1, CPA2) és az Arg112 (CPA2) C-terminális aminosavat hordozó peptidek is kimutathatóak voltak (3. táblázat). Eredményeink tehát összességében arra utalnak, hogy a tripszin szekvenciális módon hasítja a propeptidet. Mivel az R110Q (proCPA1) illetve az R112Q mutációk (proCPA2) jelentős mértékben lecsökkentették az aktiváció sebességét, feltételezhető, hogy a proCPA1 esetén az Arg110, míg a proCPA2 esetén az Arg112 az első hasítási hely. A proCPA1-ben a következő hasítás az Arg108 után következik be. A proCPA2 esetén az Arg112 utáni hasítást az Arg110, majd az Arg108 utáni hasítás követi. Mindez összhangban van az irodalmi adatokkal (43). Így tehát a tripszin a proCPA1 propeptidjéről kettő (Ser109-Arg110), míg a proCPA2 propeptidjéről négy (Arg109-Arg110-Glu111-Arg112) aminosavat távolít el, ami mindkét esetben egy 92 aminosav hosszúságú peptidet eredményez (7. ábra).



**7. ábra. A sertés proCPA1 (Protein Data Bank code 1PCA) és a humán proCPA2 (Protein Data Bank code 1AYE) szalagdiagramja.** A diagramon a propeptidet feketével jelöltük. Az  $\alpha$ -hélix aminosavsorrendjét és azon belül a Leu<sup>96</sup>-ot illetve a triptikus hasítási helyeket is feltüntettük. A diagramot a DeepView/Swiss-PdbViewer (version 3.7) segítségével készítettük.

### 8.1.3 A CTRC fokozza a CPA1 és CPA2 tripszin általi aktivációját

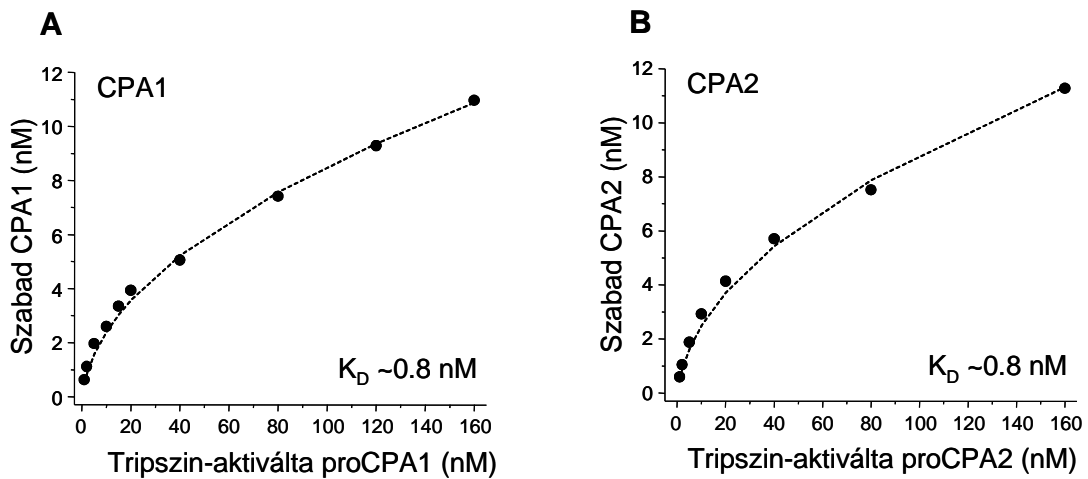
A proCPA1 illetve a proCPA2 humán kationos tripszin általi aktivációjának időbeli változását a karboxipeptidáz aktivitásának mérésével is nyomon követtük. Eredményeink szerint a tripszinnel való inkubáció a proCPA1/proCPA2 gyors aktivációját okozta, amely mindkét enzim esetén 10 perc után elérte maximumát és további növekedést nem tapasztaltunk. 15 perc elteltével kis koncentrációban (50 nM) CTRC-t adtunk a reakcióelegyhez, ami hirtelen és drámai módon, 8-10 szeresére növelte a karboxipeptidáz aktivitását (8. ábra). Ugyanakkor a CTRC önmagában nem aktiválta sem a proCPA1-et, sem a proCPA2-t, ami arra utal, hogy a tripszinnel való inkubáció előfeltétele a CTRC általi aktivációnak. Eredményeink alapján tehát a tripszin általi hasítás nem elegendő az inhibitoros propeptid teljes disszociációjához, és a karboxipeptidáz teljes felaktiválása további CTRC általi emésztést igényel. A CPB1 esetén nem figyelhetünk meg hasonló jelenséget, mivel a CTRC nem volt hatással a tripszin-által emésztett karboxipeptidáz aktivitására.



**8. ábra. A proCPA1 (A) és a proCPA2 (B) tripszin és CTRC általi aktivációja.** 2  $\mu\text{M}$  prokarboxipeptidázt 100 nM humán kationos tripszinnel (fehér körök), 50 nM CTRC-vel (fekete háromszög) illetve 15 perc 100 nM humán kationos tripszinnel való előinkubációt követően 50 nM CTRC hozzáadásával (fekete körök) aktiváltunk. A reakcióelegyet 37 °C-on inkubáltuk 20 mM Tris-HCl-ot (pH 8), 50 mM NaCl-ot és 0,05% Tween 20-at (végkoncentráció) tartalmazó, 100  $\mu\text{l}$  végtérfogatú oldatban. Az ábrán jelölt időpontokban 4  $\mu\text{l}$  reakcióelegy aktivitását 60 nM *N*-[4-metoxifenilazofornil]-L-fenilalanin szubsztrát felhasználásával határoztuk meg. A 100% -os aktivitás a 450  $\text{nM}\cdot\text{s}^{-1}$  (CPA1) és a 340  $\text{nM}\cdot\text{s}^{-1}$  (CPA2) szubsztrát hasítási sebességnek felel meg.

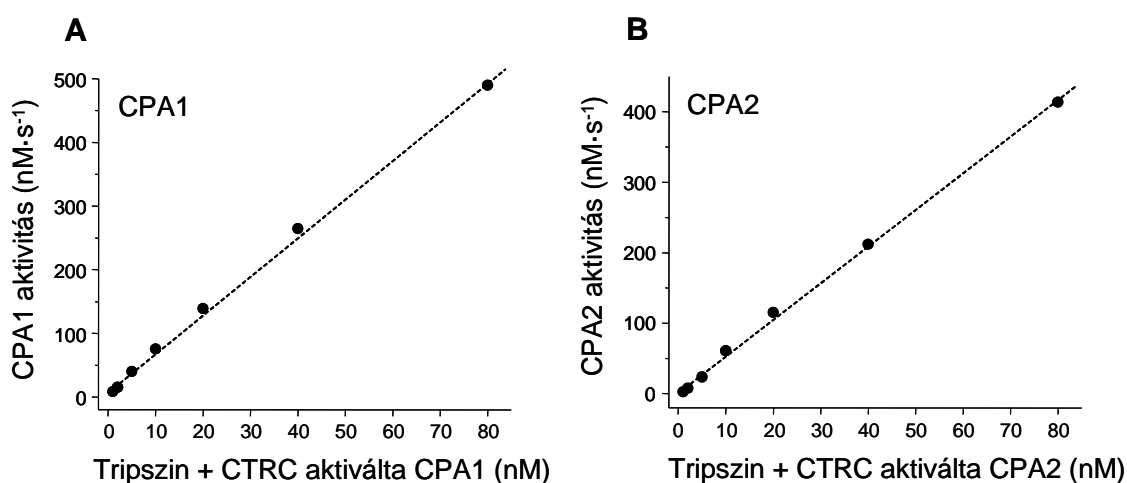
### 8.1.4 A tripszin által hasított propeptid a CPA1/CPA2 szorosán kötő inhibitoraként működik

Eredményeink szerint a tripszin által emésztett proCPA1/proCPA2 aktivitása csupán 10%-a a teljes karboxipeptidáz-aktivitásnak, ami arra utal, hogy az inhibitoros propeptid továbbra is kötve marad az enzimhez. Azonban ez a kötés a triptikus hasítást követően valószínűleg gyengül, ami a propeptid részleges disszociációjához és így az enzim kismértékű aktiválódásához vezet. Ugyanakkor a részleges aktivitás megjelenését a propeptid triptikus hasítást követő konformáció-változása is kiválthatja, aminek hatására az aktív hely a szubsztrát számára jobban elérhetővé válik.



**9. ábra. A tripszin által aktivált proCPA1 (A) és proCPA2 (B) aktivitásának koncentrációfüggése.** 2  $\mu\text{M}$  prokarboxipeptidázt 100 nM humán kationos tripszinnel aktiváltunk 37 °C-on 0,1 M Tris-HCl-ot (pH 8), 50 mM NaCl-ot, 1 mM CaCl<sub>2</sub>-ot és 0,05% Tween 20-at (végkoncentrációk) tartalmazó, 100  $\mu\text{l}$  végtérfogatú oldatban. 30 perc inkubáció után a felaktivált karboxipeptidáz-oldatból assay-pufferrel (0,1 M Tris-HCl (pH 8), 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,05% Tween 20) hígítási sort készítettünk. Az ábrán feltüntetett koncentrációjú oldatokat 10 percig 22 °C-on inkubáltuk, majd az aktivitást 10  $\mu\text{L}$  60 nM végkoncentrációjú *N*-[4-metoxifenilazofornil]-L-fenilalanin szubsztrát felhasználásával mértük. Az aktivitásadatokból a szabad karboxipeptidáz koncentrációját a 10. ábrán bemutatott, tripszinnel és CTRC-vel felaktivált karboxipeptidáz koncentrációjának és aktivitásának lineáris függvényéből számoltuk ki. A szabad karboxipeptidáz-koncentrációt az oldat össz-CPA koncentrációjának függvényében ábrázoltuk. Az így kapott pontokra a következő függvényt illesztettük:  $y = (-K + \sqrt{K^2 + 4Kx})/2$ , amelyet a  $K = y^2/x - y$  egyenletből számítottunk. Ez az egyenlet megfelel a karboxipeptidáz és a lehasadt propeptid tömeghatás törvényén alapuló disszociációjának. Az egyenletben a *K* az egyensúlyi disszociációs állandó, *x* az oldat össz-CPA koncentrációja, és *y* az egyensúlyi szabad CPA koncentráció. Az *x*-*y* megfelel a propeptid által gátolt egyensúlyi CPA-koncentrációnak.

Annak eldöntésére, hogy a két lehetséges elmélet közül melyik érvényesül, meghatároztuk a tripszin által aktivált proCPA1/proCPA2 enzimek aktivitásának koncentrációfüggését. Amennyiben a 10%-os aktivitást a propeptid konformációváltozása okozná, az enzimaktivitása a koncentrációval egyenes arányban lineárisan növekedne. Ha azonban a propeptid részleges disszociációjáról lenne szó, az enzim aktivitása és koncentrációja a tömeghatás törvényének megfelelően négyzetgyökös összefüggést mutatna. Amint az a 9. ábrán látható, eredményeink az utóbbi elméletet támasztották alá. A kapott függvényből a CPA1 és a CPA2 propeptidjének egyensúlyi disszociációs állandóját ( $K_D$ ) mindkét enzim esetén 0,8 nM-ra becsültük meg, ami arra utal, hogy a propeptid a triptikus hasítást követően szorosan kötődő inhibitoroként működik. Ezzel szemben a tripszin és CTRC által teljesen felaktivált CPA1/CPA2 aktivitása és koncentrációja között lineáris összefüggést tapasztaltunk (10. ábra).

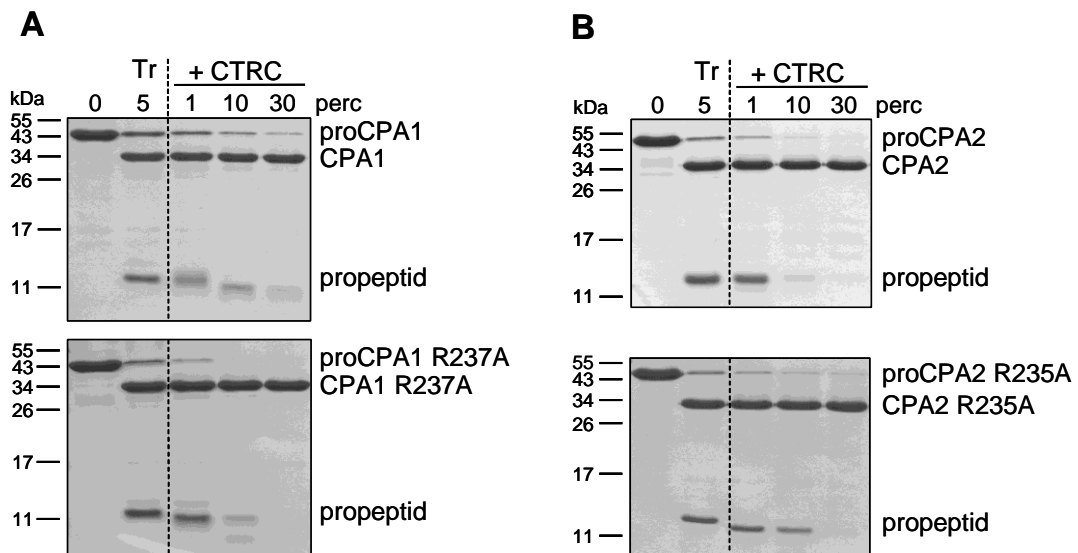


**10. ábra. A tripszin és CTRC által aktivált proCPA1 (A) és proCPA2 (B) aktivitásának koncentrációfüggése.** 2  $\mu$ M prokarboxipeptidázt 100 nM humán kationos tripszinnel és 50 nM CTRC-vel aktiváltunk 37 °C-on 0,1 M Tris-HCl-ot (pH 8), 50 mM NaCl-ot, 1 mM CaCl<sub>2</sub>-ot és 0,05% Tween 20-at (végkoncentrációk) tartalmazó, 100  $\mu$ l végtérfogatú oldatban. 30 perc inkubáció után a felaktivált karboxipeptidáz oldatból assay-pufferrel (0,1 M Tris-HCl (pH 8), 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,05% Tween 20) hígítási sort készítettünk és az ábrán feltüntetett koncentrációjú oldatok aktivitását 10  $\mu$ L 60 nM végkoncentrációjú *N*-[4-metoxifenilazofornil]-L-fenilalanin szubsztrát felhasználásával mértük. Az aktivitást (nM·s<sup>-1</sup>) a karboxipeptidáz koncentrációjának függvényében ábrázoltuk.



### 8.1.5 A CTRC lebontja a tripszin által hasított propeptidet

A proCPA1/proCPA2 tripszin és CTRC általi emésztésének folyamatát SDS-poliakrilamid-gélen időben követtük. A kísérlet során a proenzimeket 5 percig tripszinnel inkubáltuk, majd CTRC-t adtunk a reakcióelegyhez. 1, 10 illetve 30 perc múlva mintát vettünk és az emésztési termékeket SDS-poliakrilamid-gélen megfutattuk (11. ábra). Eredményeink szerint a CTRC hozzáadását követően a propeptid mindkét enzim esetén 30 perc elteltével teljesen degradálódott. Annak vizsgálatára, hogy az aktív CPA milyen mértékben vesz részt a propeptid lebontásában, a kísérleteket csökkent katalitikus aktivitással rendelkező mutáns proCPA1/proCPA2-vel is megismételtük. Ehhez a CPA1 Arg237-es, míg a CPA2 Arg235-ös aminosavát alaninra cseréltük (R237A; R235A). Irodalmi adatok alapján a patkány CPA1 homológ argininjének mutáltatása az enzimaktivitást négy nagyságrenddel csökkentette. Amint a 11. ábrán látható az R237A proCPA1 illetve az R235A proCPA2 mutáns propeptidje a vad típushoz hasonló sebességgel degradálódott, ami arra utal, hogy a CPA1/CPA2 aktivitás nem játszik jelenős szerepet a propeptid lebontásában.

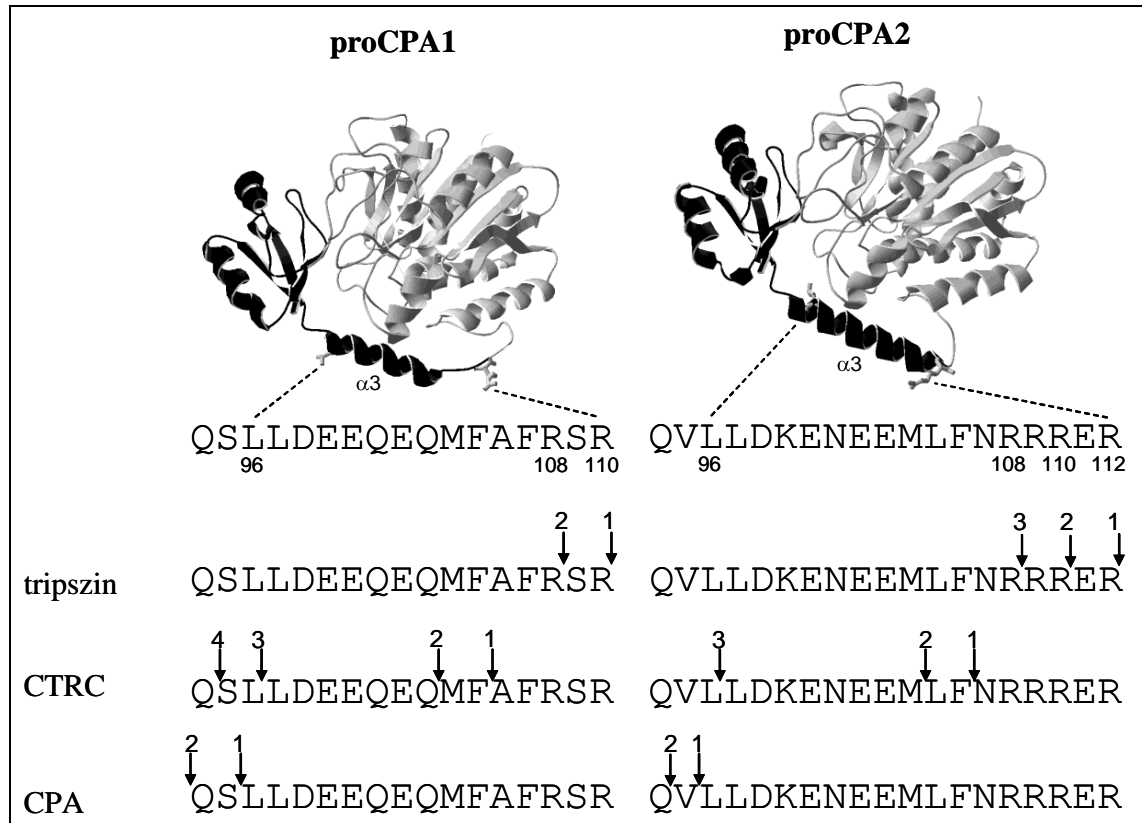


**11. ábra.** A vad típusú és az R237A mutáns proCPA1 (A), illetve a vad típusú és az R235A mutáns proCPA2 (B) tripszin (Tr) és CTRC általi aktivációja. 2  $\mu$ M prokarboxipeptidázt 100 nM humán kationos tripszinnel aktiváltunk 37 °C-on, 20 mM Tris-HCl-ot (pH 8) és 50 mM NaCl-ot (végkoncentráció) tartalmazó, 100  $\mu$ l végtérfogatú oldatban. Az 5 perces tripszinnel való inkubációt követően 50 nM CTRC-t adtunk a reakcióelegyhez. Az ábrán jelölt időpontokban a mintákat 10% végkoncentrációjú triklórecetsavval kicsaptuk és 18%-os SDS-poliakrilamid-gélen megfutattuk, majd Coomassie Blue-val festettük.

Annak érdekében, hogy a propeptid CTRC által hasított helyeit meghatározzuk, az emésztési termékeket tömegspektrométerrel is analizáltuk. Mivel a CPA1 illetve CPA2 képes a CTRC által hasított peptidek C-terminális aminosavait eltávolítani, ami módosíthatja az eredményeket, a kísérleteket vad típusú (3. táblázat A), illetve R237A proCPA1 és R235A proCPA2 mutánsokkal (3. táblázat B) is elvégeztük. Továbbá annak érdekében, hogy az  $\alpha$ 3-hélix C-terminálisán történő hasítási helyeket nagyobb részletességgel tudjuk tanulmányozni, a proCPA1 illetve proCPA2 Leu96-Leu97 aminosavait izoleucinra cseréltük (3. táblázat C). Mivel a CTRC nem képes izoleucin után hasítani, ezzel az aminosavcserével megakadályoztuk a CTRC  $\alpha$ 3-hélix N-terminálisán való hasítását. A mutációt az R237A/R235A inaktív mutánsokban hoztuk létre (L96I, L97I, R237A proCPA1; L96I, L97I, R235A proCPA2). A három kísérlet eredményének összevetése alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a tripszinemésztést követően a CTRC először az  $\alpha$ 3-hélix C-terminális végén hasítja a proCPA1/CPA2 propeptidjét (3. táblázat). A reakció első percében a proCPA1 esetén főként a Phe105-Ala106 és a Gln103-Met104, míg a proCPA2 esetén Phe106-Asn107 és a Met104-Leu105 peptidkötéseknél hasított termékeket figyelhettünk meg. A proCPA1 mintákban kisebb mennyiségben kimutathatóak voltak még a Met104-Phe105, míg a proCPA2 mintákban a Leu105-Phe106 peptidkötésnél emésztett propeptidek is. Ezeket a hasításokat az  $\alpha$ 3-hélix N-terminálisának emésztése követte (1 perc, 10 perc). Az első hasítás a proCPA1 illetve a proCPA2 esetében is a konzervált Leu96-Leu97 peptidkötésnél következett be. A proCPA1 propeptidjét a CTRC a Gln94-Ser95 peptidkötésnél tovább hasította. Az aktív CPA1/CPA2 szintén részt vett az  $\alpha$ 3-hélix degradálásában. Eredményeink szerint a CPA1 a CTRC által hasított Leu96-ot, majd a Gln94-et és a Val93-at, míg a CPA2 a Leu96 és a Val95-öt távolította el a propeptidről. 10 perc után tehát a propeptid  $\alpha$ 3-hélice teljesen lebomlott. Hosszabb inkubációt követően (10-30 perc) már csak kisebb peptidfragmentumokat tudtunk detektálni, amelyek az inhibitoros globuláris domén tripszinnel illetve kimotripszinnel történő együttes emésztéséből származtak.

Eredményeink alapján tehát a CTRC szekvenciális módon hasítja a proCPA1/CPA2 tripszin által emésztett propeptidjét (12. ábra). Elsőként a propeptid  $\alpha$ 3-hélixének C-terminális végét hasítja (1 perc), majd ezt követi az  $\alpha$ 3-hélix N-terminális végének hasítása (1 perc, 10 perc). Ezek a hasítások destabilizálják az

inhibitoros globuláris domént, ami lehetővé teszi annak tripszin, illetve CTRC általi teljes lebomlását. A tömegspektrometriai eredményeket az aktivitás adatokkal összehasonlítva, nyilvánvalóvá vált, hogy az  $\alpha 3$ -hélix degradációja elegendő volt az inhibitoros propeptid teljes disszociációjához.



12. ábra. A proCPA1 és a proCPA2 propeptidek  $\alpha 3$ -hélixének tripszin, CTRC és CPA általi főbb hasító helyei és a hasítások időbeli sorrendje.

**3. táblázat. A tripszin illetve CTRC által emésztett proCPA1 és proCPA2 propeptidjének tömegspektrometriai analízise.** A vad típusú és a mutáns proCPA-t 5 percig 100 nM tripszinnel, majd 1, 10 és 30 percig 50 nM CTRC-vel emésztettük. Az emésztési reakciókat 0,17% trifluor-ecetsavval állítottuk le. Az alábbi táblázat a tömegspektrum alapján azonosított peptideket tartalmazza. A peptidek relatív mennyiségét az adott spektrumon legerősebb jelet adó peptid mennyiségének százalékában fejeztük ki.

**A.** A vad típusú proCPA1 és proCPA2 propeptidjének tripszin és CTRC általi hasításából származó peptidfragmentumok.

Azonosított peptidek	Számított tömeg	Mért tömeg	Relatív mennyiség
<b>proCPA1, tripszin, 5 perc</b>			
Lys17-Arg110	10855,4910	10855,5641	5%
Lys17-Arg108	10612,3578	10612,5036	100%
<b>proCPA1, CTRC, 1 perc</b>			
Lys17-Arg110	10855,4910	10855,5420	5%
Lys17-Arg108	10612,3578	10612,4379	85%
Lys17-Met104	10091,0828	10091,0946	10%
Lys17-Gln103	9960,0423	9960,0235	100%
Lys17-Ser95	8975,6023	8975,6342	30%
Lys17-Val93	8760,5117	8760,5517	60%
<b>proCPA1, CTRC, 10 perc</b>			
Lys17-Glu102	9831,9837	9832,0749	5%
Lys17-Val93	8760,5117	8759,6040	7%
Lys17-Asp92	8661,4433	8661,7397	100%
Gln49-Lys76	3113,6562	3113,6676	45%
Asp51-Lys76	2872,5136	2872,5159	50%
<b>proCPA2, tripszin, 5 perc</b>			
Leu17-Arg112	11158,7643	11158,9270	5%
Leu17-Arg110	10873,6206	10873,5662	35%
Leu17-Arg108	10561,4184	10561,4288	100%
<b>proCPA2, CTRC, 1 perc</b>			
Leu17-Arg110	10873,6206	10873,6706	100%
Leu17-Arg108	10561,4184	10561,4774	90%
Leu17-Met104	10031,1219	10030,0599	95%
Leu17-Gln94	8830,5523	8830,6527	60%
<b>proCPA2, CTRC, 10 perc</b>			
Leu17-Arg110	10873,6206	10873,5859	100%
Leu17-Met104	10031,1219	10030,2498	30%

**B.** Az R237A proCPA1 és az R235A proCPA2 mutánsok propeptidjének tripszin és CTRC általi hasításából származó peptidfragmentumok.

Azonosított peptidek	Számított tömeg	Mért tömeg	Relatív mennyiség
<b>proCPA1 R237A, tripszin 5 perc</b>			
Lys17-Arg108	10612,3578	10612,3434	100%
<b>proCPA1 R237A, CTRC, 1 perc</b>			
Lys17-Leu96	9088,6864	9088,6884	100%
Lys17-Gln94	8888,5703	8888,5656	15%
<b>proCPA1 R237A, CTRC, 10 perc</b>			
Lys17-Gln94	8888,5703	8888,5581	100%
Gln49-Phe78	3373,8087	3373,8083	14%
Asp51-Phe78	3132,6661	3132,6681	18%
Gln49-Lys76	3113,6562	3113,6557	25%
Asp51-Lys76	2872,5136	2872,5132	31%
Gly55-Phe78	2528,3903	2528,3915	6%
Gly55-Lys76	2268,2378	2268,2379	35%
Lys38-Leu48	1351,7347	1351,7341	94%
Arg27-Gln37	1214,6255	1214,6249	38%
<b>proCPA1 R237A, CTRC, 30 perc</b>			
Lys17-Gln94	8888,5703	8888,5516	25%
Gln49-Phe78	3373,8087	3373,8086	30%
Asp51-Phe78	3132,6661	3132,6657	35%
Gln49-Lys76	3113,6562	3113,6561	40%
Asp51-Lys76	2872,5136	2872,5124	62%
Asp51-Gln73	2574,3131	2574,3134	48%
Gly55-Lys76	2268,2378	2268,2373	100%
Gly55-Gln73	1970,0373	1970,0369	45%
Lys38- Leu48	1351,7347	1351,7342	40%
Arg27-Gln37	1214,6255	1214,6248	63%
Ile28- Gln37	1058,5244	1058,5236	37%

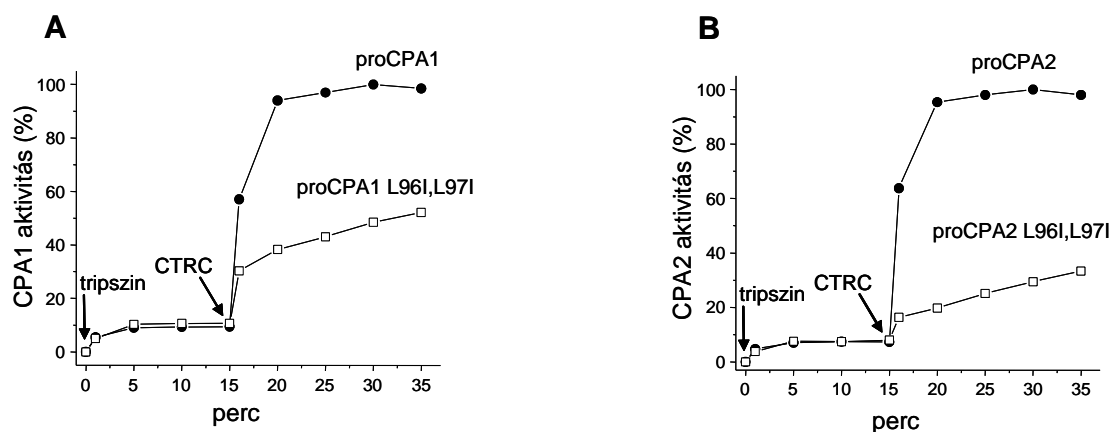
Azonosított peptidek	Számított tömeg	Mért tömeg	Relatív mennyiség
<b>proCPA2 R235A, tripszin 5 perc</b>			
Leu17-Arg108	10561,4184	10561,3650	100%
<b>proCPA2 R235A, CTRC, 1 perc</b>			
Leu17-Leu96	9042,7047	9042,6244	100%
<b>proCPA2 R235A, CTRC, 10 perc</b>			
Leu17-Leu96	9042,7047	9042,6410	30%
Leu17-Val95	8929,6207	8929,6997	100%
Leu17-Gln94	8830,5523	8830,4956	10%
Leu17-Leu40	2726,4378	2726,4206	35%
<b>proCPA2 R235A, CTRC, 30 perc</b>			
Gln49-Phe78	3396,7982	3396,7804	27%
Gln49-Lys76	3150,6614	3150,6441	20%
Asp51-Lys76	2909,5187	2909,4993	7%
Ser55-Phe78	2579,3859	2579,3686	27%
Gln49-Phe69	2412,2226	2412,2057	73%
Ser55-Lys76	2333,2491	2333,2236	33%
Asp51-Phe69	2171,0799	2171,0655	43%
Glu27-Leu40	1624,8672	1624,5870	45%
Ser55-Phe69	1594,8103	1594,8003	100%
Glu27-Leu39	1511,7831	1511,7733	37%
Glu27-Lys37	1284,6561	1284,6468	85%

C. Az L96I, L97I, R237A proCPA1 és az L96I, L97I, R235A proCPA2 mutánsok propeptidjének tripszin és CTRC általi hasításából származó peptidfragmentumok.

Azonosított peptidek	Számított tömeg	Mért tömeg	Relatív mennyiség
<b>proCPA1 L96I, L97I, R237A, tripszin 5 perc</b>			
Lys17-Arg108	10612,3578	10612,4045	100%
<b>proCPA1 L96I, L97I, R237A, CTRC, 1 perc</b>			
Lys17-Arg108	10612,3578	10612,3805	100%
Lys17-Phe105	10238,1512	10238,1268	100%
Lys17-Met104	10091,0828	10091,2995	10%
Lys17-Gln103	9960,0423	9960,1491	40%
<b>proCPA1 L96I, L97I, R237A, CTRC, 10 perc</b>			
Lys17-Phe105	10238,1512	10238,4076	5%
Lys17-Met104	10091,0828	10091,0778	25%
Lys17-Gln103	9960,0423	9960,0778	100%
Lys17-Gln94	8888,5703	8888,5748	5%
Gly55-Lys76	2268,2378	2268,2442	15%
<b>proCPA2 L96I, L97I, R235A, tripszin 5 perc</b>			
Leu17-Arg108	10561,4184	10561,5643	100%
<b>proCPA2 L96I, L97I, R235A, CTRC, 1 perc</b>			
Leu17-Phe106	10291,2744	10291,2115	35%
Leu17-Leu105	10144,2060	10144,1777	10%
Leu17-Met104	10031,1219	10031,1386	100%
<b>proCPA2 L96I, L97I, R235A, CTRC, 10 perc</b>			
Leu17-Leu105	10144,2060	10144,3333	12%
Leu17-Met104	10031,1219	10031,1713	100%

### 8.1.6 A Leu96-Leu97 peptidkötés hasítása szükséges a CPA1/CPA2 teljes aktivációjához

Annak vizsgálatára, hogy vajon az  $\alpha$ 3-hélix teljes degradációja szükséges-e a CPA1/CPA2 maximális aktiválódásához, a konzervált L96, L97 aminosavakat izoleucinra cseréltük. Az előző fejezetben leírtak szerint az L96-L97 peptidkötés a CTRC elsődleges hasítási helye az  $\alpha$ 3-hélix N-terminális végén, ezért az L96I,L97I proCPA1/CPA2 mutánsok esetében a CTRC csak az  $\alpha$ 3-hélix C-terminális végét tudja emészteni. A kísérlet során a mutáns zimogéneket 15 percig tripszinnel előemésztettük, majd CTRC-t adtunk a reakcióelegyhez (13. ábra). A CTRC hozzáadását követően mind a CPA1, mind a CPA2 esetében bifázisos aktiválódást figyelhettünk meg, amelynek során a karboxipeptidáz aktivitásának hirtelen megnövekedését egy lassú aktiválódási folyamat követte. Azonban a mutánsok aktivitása nem érte el a vad típusú CPA aktivitására jellemző értéket. Az L96I,L97I proCPA1 maximális aktivitása 50%-a, míg az L96I, L97I proCPA2 mutáns aktivitása 35%-a volt a vad típusú CPA1 aktivitásának. Eredményeink tehát arra utalnak, hogy az  $\alpha$ 3-hélix C-terminálisának hasítása csak részleges CPA1/CPA2 aktivációt vált ki és a teljes aktiválódáshoz a hélix N-terminálisának hasítása is szükséges.

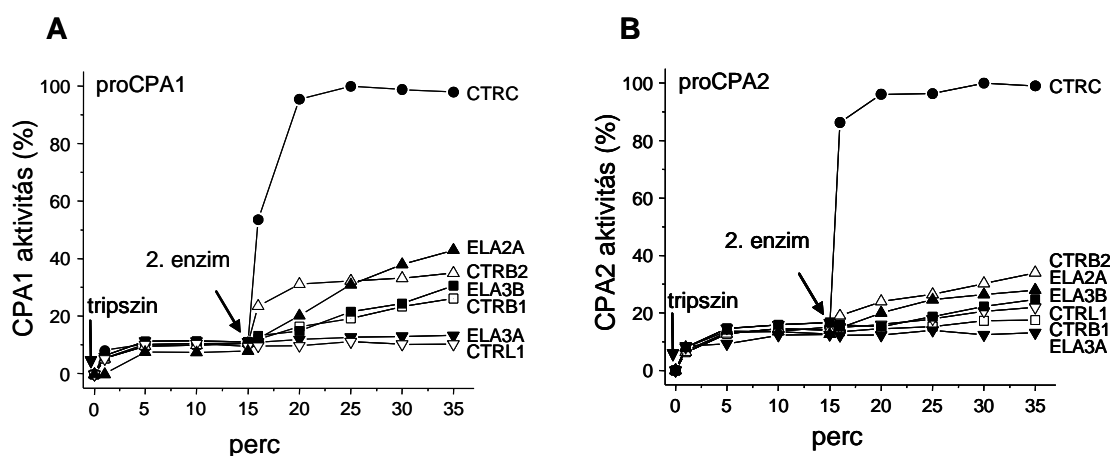


**13. ábra.** Az L96I,L97I proCPA1 (A) és az L96I,L97I proCPA2 (B) tripszin és CTRC általi aktivációja. 2  $\mu$ M vad típusú illetve mutáns prokarboxipeptidázt 15 percig 100 nM humán kationos tripszinnel aktiváltunk, majd 50 nM CTRC-t adtunk a reakcióelegyhez. A reakcióelegyet 37 °C-on inkubáltuk 20 mM Tris-HCl-ot (pH 8) és 50 mM NaCl-ot és 0,05% Tween 20-at (végkoncentráció) tartalmazó, 100  $\mu$ l végtérfogatú oldatban. Az ábrán jelölt időpontokban 4  $\mu$ l reakcióelegy aktivitását 60 nM *N*-[4-metoxifenilazofornil]-L-fenilalanin szubsztrát felhasználásával határoztuk meg. A 100% -os aktivitás a 450  $\text{nM}\cdot\text{s}^{-1}$  (CPA1) és a 340  $\text{nM}\cdot\text{s}^{-1}$  (CPA2) szubsztrát hasítási sebességének felel meg.



### 8.1.7 A CTRC a proCPA1 és proCPA2 fiziológias koaktivátora

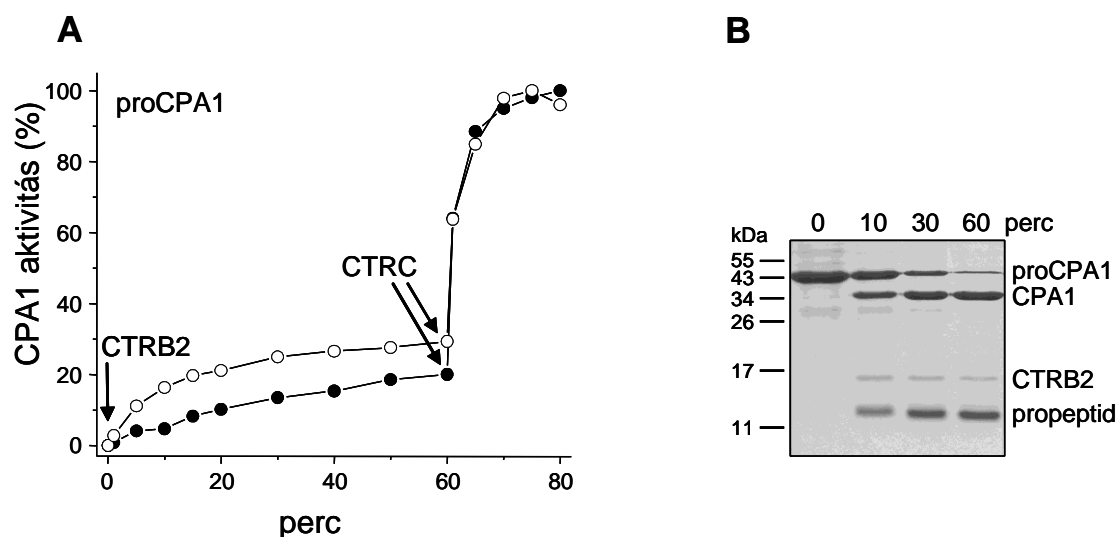
A CTRC-n kívül más hasnyálmirigy eredetű enzimeknek a CPA1 és CPA2 aktivitásra gyakorolt hatását is megvizsgáltuk. A tripszinnel előemésztett CPA1/CPA2 enzimet 50 nM koncentrációjú humán elasztáz 2A (ELA2A), elasztáz 3A (ELA3A), elasztáz 3B (ELA3B), kimotripszin B1 (CTRB1), kimotripszin B2 (CTRB2) és kimotripszinszerű enzim-1 (CTRL1) enzimekkel inkubáltuk (14. ábra). Ezek az enzimek a CTRC-vel ellentétben csak kis mértékben növelték meg a tripszin emésztette CPA1/CPA2 aktivitását. Érdekes módon a CTRB2 a CPA1 hirtelen aktivitásnövekedését váltotta ki, azonban a maximális karboxipeptidáz-aktivitás csak a 30%-a volt a CTRC által kiváltott aktivitásnak. Tömegspektrometriai méréseink szerint a CTRB2 a CPA1 tripszin által emésztett propeptidjét a Phe105-Ala106 peptidkötésnél hasítja. Ezek a megfigyelések megerősítették a korábbi eredményeinket, miszerint az  $\alpha$ 3-hélix C-terminálisának hasítása nem elegendő a CPA1 teljes aktiválódásához. Eredményeink szerint tehát a CTRC CPA1/CPA2-t aktiváló hatása egyedülálló a hasnyálmirigy eredetű enzimek között, ami arra utal, hogy a CTRC a proCPA1 illetve proCPA2 fiziológias koaktivátora.



**14. ábra.** A proCPA1 (A) és proCPA2 (B) tripszinnel és különböző humán pankreatikus proteázokkal való aktivációja. 2  $\mu$ M prokarboxipeptidázt 15 percig 100 nM humán kationos tripszinnel aktiváltunk, majd az ábrán feltüntetett proteázból 50 nM-t adtunk a reakcióelegyhez. A reakcióelegyet 37 °C-on inkubáltuk 20 mM Tris-HCl-ot (pH 8), 50 mM NaCl-ot és 0,05% Tween 20-at (végkoncentráció) tartalmazó, 100  $\mu$ l végtérfogató oldatban. Az ábrán jelölt időpontokban 4  $\mu$ l reakcióelegy aktivitását 60 nM *N*-[4-metoxifenilazofornil]-L-fenilalanin szubsztrát felhasználásával határoztuk meg. A 100% -os aktivitás a 450  $\text{nM}\cdot\text{s}^{-1}$  (CPA1) és a 340  $\text{nM}\cdot\text{s}^{-1}$  (CPA2) szubsztrát hasítási sebességének felel meg.

### 8.1.8 A proCPA1 CTRB2 általi aktivációja

Eredményeink szerint a CTRB2 100-200 nM koncentrációban alkalmazva nemcsak a tripszinnel előemésztett, hanem az intakt proCPA1-et is hasítja (15. ábra). A propeptid tömegspektrometriai analízise illetve a CPA1 N-terminális szekvenálása alapján a CTRB2 a Phe105-Ala106 és a Phe107-Arg108 peptidkötéseket bontja. Ezáltal a CTRB2 részleges CPA1-aktivitást indukál, ami a maximális karboxipeptidáz-aktivitás 30%-át éri el. Azonban az emésztés sebessége 10-szer lassabb volt, mint a tripszin általi emésztés, ezért nem valószínű, hogy fiziológiás jelentősége lenne. Az egyensúly beállta után CTRC-t adtunk a reakcióelegyhez, amely teljes karboxipeptidáz-aktivitást váltott ki.

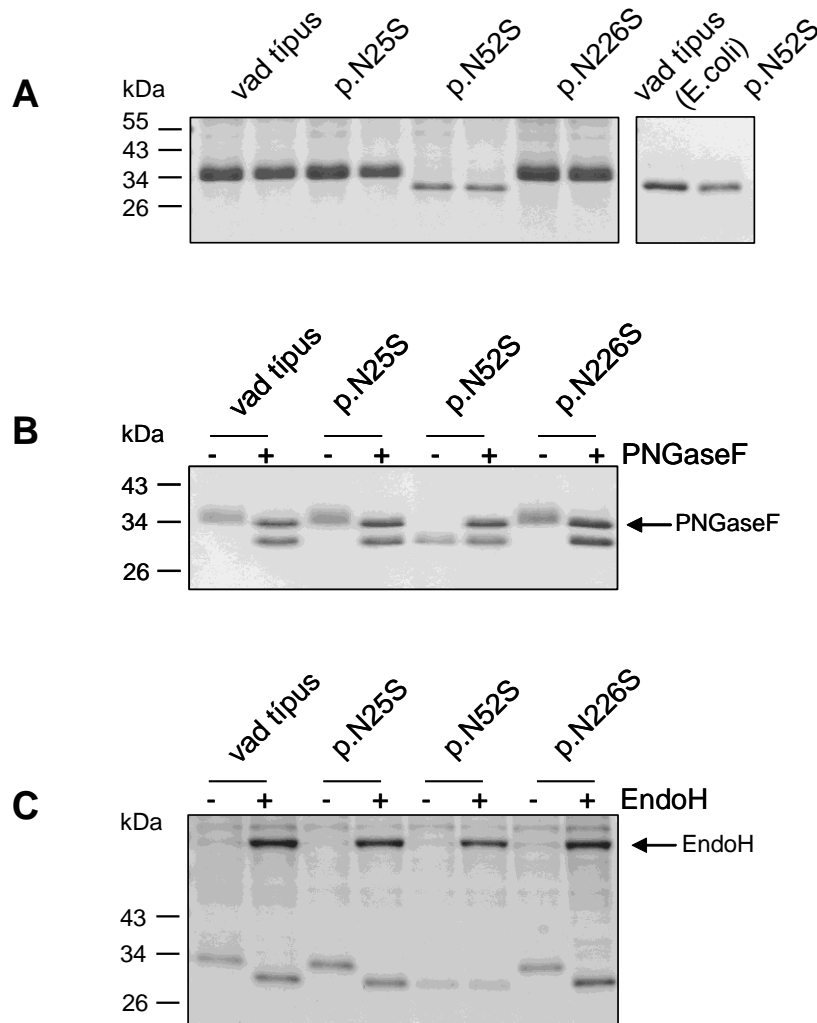


**15. ábra. A proCPA1 CTRB2 általi aktivációja.** (A) 2  $\mu$ M prokarboxipeptidázt 100 nM Tr-el (fekete körök) illetve 200 nM (fehér körök) CTRB2-vel inkubáltunk 60 percen keresztül, majd 50 nM CTRC-t adtunk az elegyhez. A reakcióelegyet 37 °C-on inkubáltuk 20 mM Tris-HCl-ot (pH 8) 50 mM NaCl-ot és 0,05% Tween 20-at és 70 nM SPINK1-et tartalmazó 100  $\mu$ l végtérfogatú oldatban. A SPINK1 szerepe a reakciókban az volt, hogy a CTRB2 felaktiválásához használt tripszint legátoljuk. Az ábrán jelölt időpontokban 4  $\mu$ l reakcióelegy aktivitását 60 nM *N*-[4-metoxifenilazofornil]-L-fenilalanin szubsztát felhasználásával határoztuk meg. A 100% -os aktivitás a 450  $\text{nM}\cdot\text{s}^{-1}$  szubsztát hasítási sebességnek felel meg. (B) A 100 nM CTRB2-vel inkubált reakcióelegyből 100  $\mu$ l-t az ábrán jelölt időpontokban 10% végkoncentrációjú triklórecetsavval kicsaptunk és 18%-os SDS-poliakrilamid-gélen megfutattuk, majd Coomassie Blue-val festettük. A gélen látható 14 kDa illetve 10,4 kDa nagyságú peptid fragmentumok a CTRB2 Tyr164–Asn165 peptidkötésnél bekövetkező fiziológiás autolízisének a termékei.

## 8.2 A kimotripszin C N-glikozilációjának vizsgálata

### 8.2.1 A humán CTRC N-glikozilált az 52-es aszparaginon

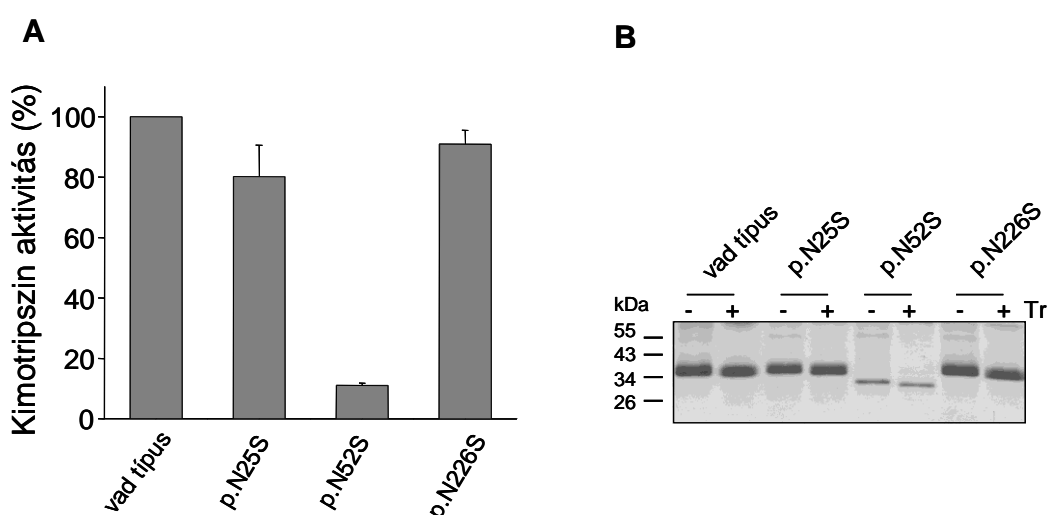
A humán CTRC elsődleges aminosav-szekvenciájában három potenciális N-glikozilációs hely (Asn-Xaa-Ser/Thr) található az Asn25, Asn52 és az Asn226-os pozíciókban (3. ábra). Annak megállapítására, hogy ezek a glikozilációs helyek valóban hordoznak-e glikozilcsoportot, a konszenzus szekvenciákat mutagenézis segítségével egyenként kiütöttük, azáltal, hogy az aszparagin-aminosavakat szerinre cseréltük (N25S, N52S, N226S). A vad típusú illetve a mutáns CTRC cDNS-ét kódoló plazmidokat tranziens transzfekcióval humán embrionális vesesejtekbe (HEK 293T) juttattuk és kétnapos inkubációt követően a kondicionált médiumot begyűjtöttük. Mivel a glikozilcsoport jelentős mértékben megnöveli a fehérje molekulásúlyát, ezért annak kiderítése céljából, hogy az adott mutációk befolyásolják-e a CTRC glikozilációját, a termelt fehérjéket SDS-poliakrilamid-gélen tanulmányoztuk. Glikozilálatlan kontrollként *E. coliban* termeltetett CTRC-t használtunk, mivel a baktériumok nem képesek N-glikozilált fehérjék előállítására (16. ábra A). Eredményeink szerint az N52S mutáns CTRC gyorsabban futott a gélen, mint a vad típusú, az N25S és N226S mutáns fehérje és a molekulatömege megegyezett az *E. coliban* termelt CTRC molekulatömegével. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a mobilitás-változást a glikozilcsoport hiánya okozta. Továbbá az N52S fehérje az *E. coliban* termelt CTRC-hez hasonlóan jóval élesebb csíkot adott a gélen, ami szintén a glikozilálatlan fehérjékre jellemző. A glikozilcsoport meglétét PNGaseF és EndoH glikozidáz enzimek segítségével is ellenőriztük (16. ábra B, C). A PNGaseF az aszparagin oldallánc és az első N-acetil-glükózamin között, míg az EndoH a két N-acetil-glükózamin között hasítja le a fehérjék glikozilcsoportját (5. ábra), és ez az SDS-poliakrilamid-gélen könnyen kimutatható molekulatömeg-változást idéz elő. Eredményeink szerint az enzimekkel való inkubációt követően a vad típusú, illetve mindhárom mutáns CTRC molekulatömege megegyezett és az N52S fehérje esetében nem figyelhettünk meg további mobilitás-változást az SDS-poliakrilamid-gélen. Mindez azt bizonyítja, hogy a humán CTRC egyetlen glikozilcsoporttal rendelkezik, amely az 52-es aszparagin-oldalláncához kötődik.



**16. ábra. A humán CTRC glikoziláltságának vizsgálata. (A)** A vad típusú, illetve az N25S, N52S és N226S mutáns CTRC HEK 293T-sejtek általi szekreciója. A sejteket tranziensen transzfektáltuk a vad típusú, ill. mutáns CTRC-t kódoló plazmiddal. A transzfekció után 48 órával a sejtek médiumát begyűjtöttük. A médiumból 200  $\mu$ l-t 10% végkoncentrációjú triklórecetsavval kicsaptunk és a fehérjéket 12%-os SDS-poliakrilamid-gélen megfuttattuk és Coomassie Blue-val festettük. Kontrollként *E. coli* által termelt glikozilálatlan CTRC-t használtunk. **(B)** A vad típusú és a mutáns CTRC PNGaseF általi emésztése. 200  $\mu$ l kondicionált médiumot 10% végkoncentrációjú triklórecetsavval kicsaptunk, majd 37 °C-on 3 órán keresztül inkubáltuk 20  $\mu$ l 10% G7-puffert és 0,5  $\mu$ l (250 unit) PNGaseF enzimet tartalmazó oldatban. Ezt követően a mintákat 12%-os SDS-poliakrilamid-gélen, Coomassie Blue festést követően analizáltuk. **(C)** A vad típusú és a mutáns CTRC EndoH általi emésztése. 200  $\mu$ l kondicionált médiumot 10% G5-puffert és 1  $\mu$ l EndoH-t (500 unit) tartalmazó oldattal inkubáltunk 37 °C-on 3 órán keresztül. Ezt követően a mintákat 10% végkoncentrációjú triklórecetsav segítségével kicsaptuk és 12%-os SDS-poliakrilamid-gélen megfuttattuk, majd Coomassie Blue-val festettük.

## 8.2.2 Az N-glikoziláció hatása a CTRC szekréciójára és enzimátikus funkciójára

Amint az a 16. ábrán látható, az N52S mutáns CTRC a vad típusú CTRC-hez képest jóval kisebb mennyiségben szekretálódott. Az sejtek kondicionált médiumából végzett aktivitásmérések során szintén azt tapasztaltuk, hogy az N52S mutáns fehérjét tartalmazó médium CTRC aktivitása csupán 10%-a volt a vad típusú fehérjét tartalmazó médiumban mért aktivitásnak (17. ábra A). A kondicionált médiumot a tripszinnel való aktiválást követően SDS-poliakrilamid-gélen is megfuttattuk (17. ábra B). Eredményeink szerint a glikozilcsoport hiánya nem befolyásolta az aktivációs peptid tripszin általi hasítását, mivel az aktivációval együtt járó molekulatömeg-csökkenést az N52S mutáns CTRC esetén is megfigyelhettük. Az aktivációt követően az N52S fehérje mennyisége nem változott és a gélen degradációs termékeket sem tudtunk kimutatni, tehát a glikozilcsoport nem befolyásolja a CTRC érzékenységét a tripszinemésztéssel szemben.



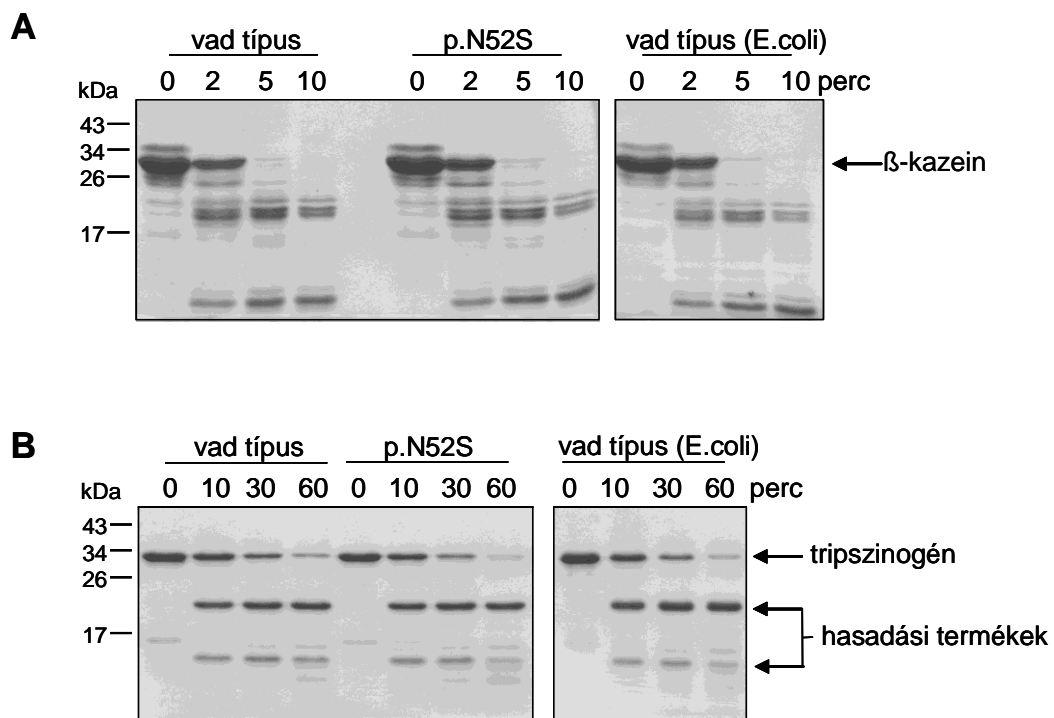
**17. ábra.** A HEK 293T-sejtek által termelt vad típusú, illetve az N25S, N52S és N226S mutáns CTRC aktiválása humán kationos tripszinnel (A) Kétnapos inkubációt követően 37  $\mu$ l kondicionált médiumot 100 nM tripszinnel inkubáltunk 1 órán keresztül 37  $^{\circ}$ C-on 10 mM  $\text{CaCl}_2$ -ot és 100 mM Tris-HCl-et (pH 8) tartalmazó 50  $\mu$ l végtérfogatú oldatban. A CTRC aktivitását Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilid (150 nM végkoncentráció) szubsztráttal mértük. Az ábrázolt értékek két párhuzamos transzfekcióból származó adatok átlagai, amelyeket a vad típusú CTRC aktivitásának százalékában fejeztünk ki. (B) Ugyanezen kísérletről származó kondicionált médiumból 200-200  $\mu$ l-t 100 nM tripszinnel inkubáltunk 37  $^{\circ}$ C-on 10 mM  $\text{CaCl}_2$ -ot és 100 mM Tris-HCl-et (pH 8) tartalmazó, 250  $\mu$ l végtérfogatú oldatban. 1 órás inkubációt követően a médiumot 10% végkoncentrációjú triklórecetsavval kicsaptuk és 12%-os SDS-poliakrilamid-gélen megfuttattuk, majd Coomassie Blue-val festettük.

A glikozilcsoport enzimfunkcióra gyakorolt hatásának részletesebb vizsgálatához a HEK sejtek kondicionált médiumából a vad típusú és az N52S mutáns CTRC-t ecotin affinitás-kromatográfia segítségével megtisztítottuk. Kontrollként szintén ecotin oszlopon tisztított, *E. coli*-ban termelt CTRC-t használtunk. A fehérjék pontos koncentrációjának meghatározása után megmértük az enzimkinetikai paramétereit (4. táblázat). Eredményeink alapján mindhárom fehérje  $K_M$ - és  $k_{cat}$ - értéke nagyon hasonló volt, ami azt bizonyítja, hogy a humán CTRC esetén a glikoziláció sem a szubsztrátkötés erősségét, sem a szubsztráthatás sebességét nem befolyásolja. Azonban a mérésekhez kis méretű szintetikus oligopeptid szubsztrátot használtunk, amelynek megkötésében a glikozilcsoport nem biztos, hogy részt vesz és így nem modellezi pontosan a fiziológiás körülményeket. Így a CTRC aktivitását nagyobb méretű és természetes CTRC-szubsztrátokon is megvizsgáltuk. A kísérletek során a  $\beta$ -kazein és a tripszinogén CTRC általi emésztését SDS-poliakrilamid-gélen követtük. Amint az a 18. ábrán megfigyelhető, a degradációs termékek mérete és időbeli megjelenése mind a vad típusú, mind a glikozilálatlan N52S és az *E. coli* által termelt CTRC esetén hasonló volt. Ezek az eredmények tehát megerősítették, hogy a glikozilcsoport nincsen hatással a CTRC aktivitására illetve szubsztrát-specifitására. A vad típusú és az N52S fehérje *Schistocerca gregaria* kimotripszin-inhibitorral (SGCI) meghatározott  $K_i$ -értéke ugyancsak azonosnak bizonyult, tehát a glikoziláció a CTRC-inhibitor kötését sem befolyásolja.

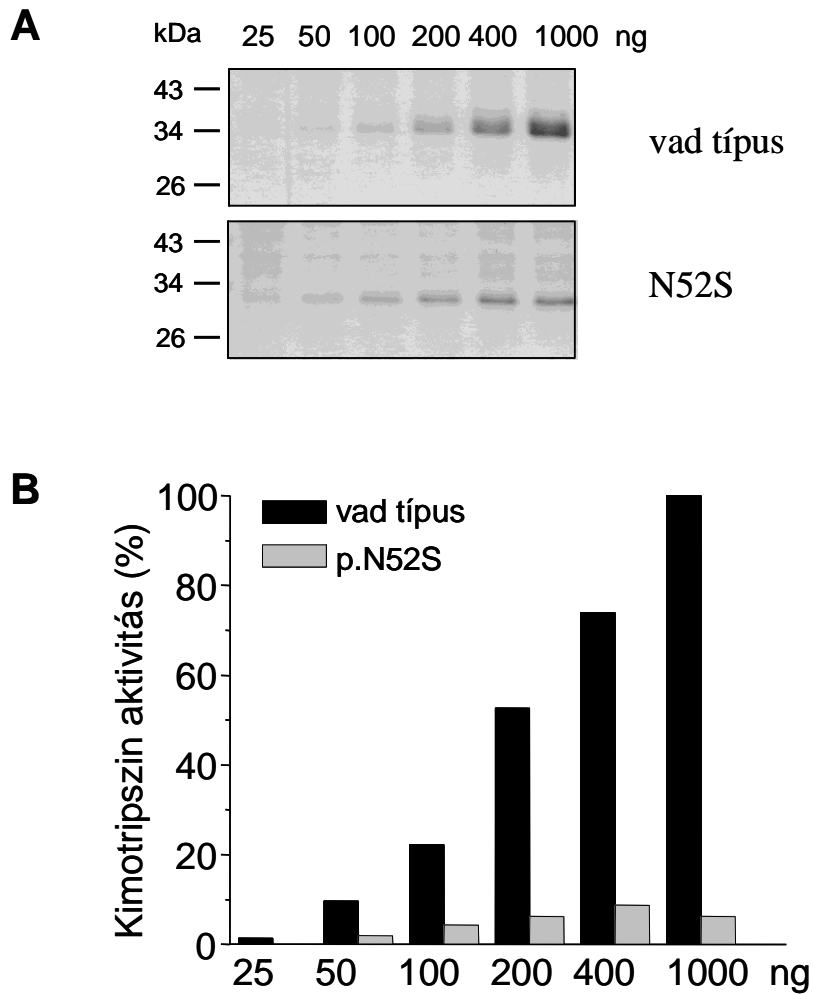
**4. táblázat. A vad típusú, N52S mutáns és az *E. coli* által termelt CTRC kinetikai paramétereit és inhibitor kötése.** A CTRC aktivitást Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilid segítségével mértük 1 mM  $\text{CaCl}_2$  és 0,1 M Tris-HCl (pH 8) jelenlétében 25 °C-on 200  $\mu\text{l}$  végtérfogatban. A  $K_i$  meghatározásához *Schistocerca gregaria* kimotripszin-inhibitor (SGCI) használtunk.

	<b>vad típus</b>	<b>p.N52S</b>	<b>vad típus ( <i>E.coli</i> )</b>
$K_M$ ( $\mu\text{M}$ )	13,8 $\pm$ 1,0	13,6 $\pm$ 1,7	13,8 $\pm$ 2,9
$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	16,1 $\pm$ 0,2	16,8 $\pm$ 0,4	14,1 $\pm$ 0,6
$k_{cat}/K_M$ ( $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	1,2	1,2	1,0
	<b>vad típus</b>	<b>p.N52S</b>	
$K_i$ (nM)	3,9 $\pm$ 0,1	2,7 $\pm$ 0,1	

Mindezek alapján bizonyossá vált, hogy a glikozilcsoport nincsen hatással a CTRC enzymfunkcióira és az N52S mutáns plazmiddal transzfektált HEK 293T-sejtek médiumában kimutatható csökkent CTRC-aktivitás nem az enzym defektusának, hanem a fehérje elégtelen szekréciónak köszönhető. A szekréción defektus mértékét különböző plazmid-koncentrációkkal is megvizsgáltuk (19. ábra). Érdekes módon a vad típusú CTRC-hez képest az N52S mutáns fehérje szekréción mennyisége nem növekedett szignifikánsan a növekvő plazmid-koncentrációkkal transzfektált HEK 293T-sejtek médiumában. Ennek megfelelően jóval nagyobb szekréción különbségeket tudunk megfigyelni a magasabb plazmid-koncentrációkkal transzfektált HEK 293T-sejtek esetén.



**18. ábra.** A  $\beta$ -kazein (A) és tripszinogén (B) emésztése vad típusú, illetve N52S mutáns és *E. coli* által termelt CTRC-vel. (A) 0,2 mg/ml  $\beta$ -kazeint 5 nM CTRC jelenlétében inkubáltuk 37 °C-on 1 mM  $\text{CaCl}_2$ -ot és 100 mM Tris-HCl-ot (pH 8) és 20 nM SPINKI-et tartalmazó 500  $\mu\text{l}$  végtérfogatú oldatban. Az ábrán jelölt időpontokban mintát vettünk (100  $\mu\text{l}$ ), amelyet 10% végkoncentrációjú triklórecetsavval kicsaptunk és 15%-os SDS-poliakrilamid-gélen megfutattunk, majd Coomassie Blue-val festettük. (B) 2  $\mu\text{M}$  inaktív kationos tripszinogént (K23Q mutáns) 20 nM CTRC-vel inkubáltunk 37 °C-on 1 mM  $\text{CaCl}_2$ -ot, 100 mM Tris-HCl-ot (pH 8) és 20 nM SPINKI-et tartalmazó 500  $\mu\text{l}$  végtérfogatú oldatban. Az ábrán jelölt időpontokban mintát vettünk (100  $\mu\text{l}$ ), amelyet 10% végkoncentrációjú triklórecetsavval kicsaptunk és 15%-os SDS-poliakrilamid-gélen megfutattunk, majd Coomassie Blue-val festettünk.

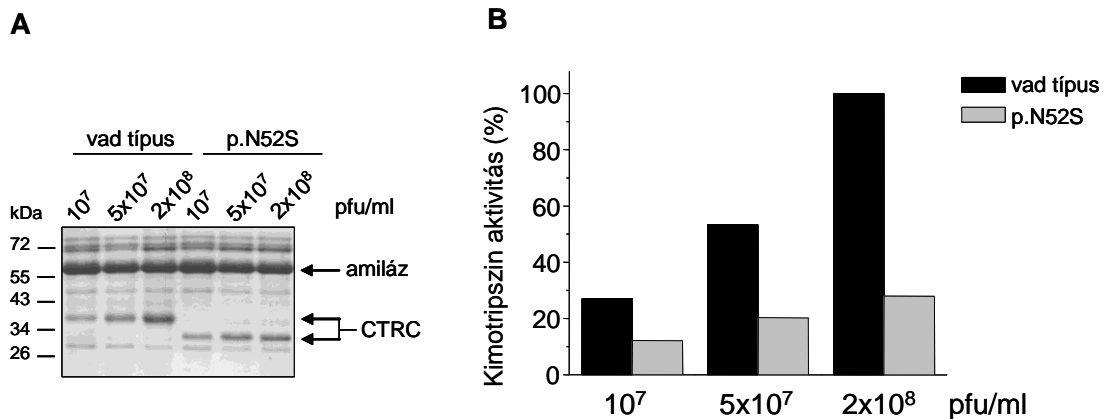


**19. ábra. HEK 293T-sejtek transzfekciója növekvő koncentrációjú vad típusú és N52S mutáns CTRC-t kódoló plazmiddal.** A sejteket 24 lyukú sejtenyésző edényben transzfektáltuk az ábrán jelölt koncentrációjú CTRC-t kódoló plazmiddal. A plazmidvéggkoncentrációt pcDNA3.1(-) üres vektorral minden esetben 1000 ng-ra egészítettük ki. **(A)** Kétnapos inkubációt követően 200  $\mu$ l médiumot 10% végkoncentrációjú triklórecetsavval kicsaptunk és 12%-os SDS-poliakrilamid-gélen megfutattuk, majd Coomassie Blue-val festettük. **(B)** Az aktivitásméréshez ugyanezen transzfekcióból származó médiumból 37  $\mu$ l-t felaktiváltunk 100 nM tripszinnel 37 °C-on 10 mM  $\text{CaCl}_2$ -ot és 100 mM Tris-HCl-ot (pH 8) tartalmazó 50  $\mu$ l végtérfogatú oldatban. A CTRC aktivitását Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilid (150 nM végkoncentráció) szubsztráttal mértük. Az aktivitásértékeket a 1000 ng vad típusú CTRC plazmiddal transzfektált HEK-sejtek médiumából mért aktivitás százalékában fejeztük ki.



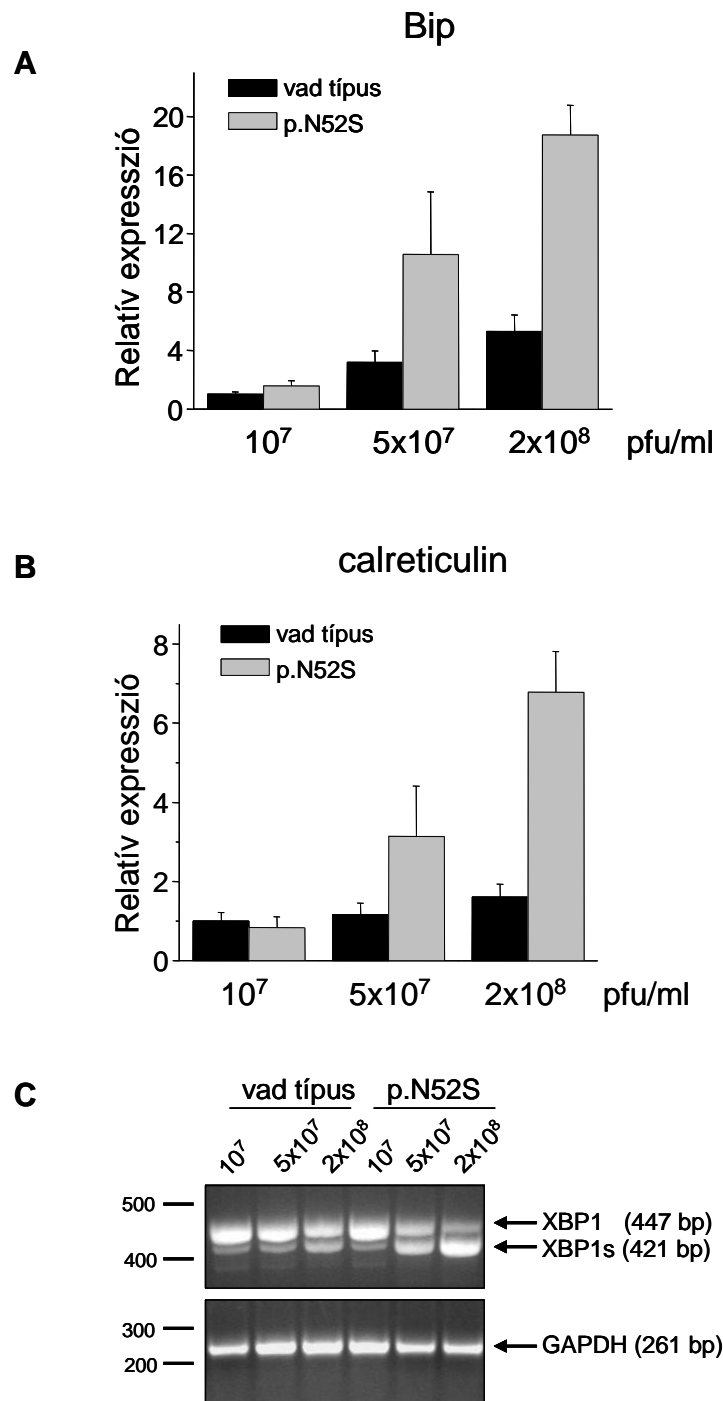
### 8.2.3 Az N52S mutáció hatásának vizsgálata AR42J-sejtekben

A HEK 293T-sejtekben tapasztalt szekréción defektus acinussejtekben való megerősítésére a kísérleteket egy patkány eredetű pankreatikus acinussejtvonalban (AR42J) is megismételtük. A sejtekbe a vad típusú és az N52S CTRC cDNS-ét adenovírus segítségével jutattuk be. Az infekcióhoz növekvő víruskoncentrációt használtunk. A kondicionált médiumot SDS-poliakrilamid-gélen, illetve a CTRC aktivitásának mérésével tanulmányoztuk (20. ábra). Eredményeink szerint az N52S mutáns CTRC kisebb mértékben szekretálódott, mint a vad típusú CTRC. A HEK 293T-sejtekben kapott eredményekhez hasonlóan a szekréción defektus mértéke arányos volt az expresszió szintjével. Ugyanakkor az AR42J-sejtekben tapasztalt szekréciónsökkenés kisebb mértékű volt a HEK 293T-sejtekben tapasztalathoz képest.



**20. ábra. A vad típusú illetve N52S mutáns CTRC szekréciónja AR42J-sejtekben.** A sejteket növekvő CTRC-adenovírus koncentrációval infektáltuk. 24 órás inkubáció elteltével a kondicionált médiumot begyűjtöttük. **(A)** A médiumból 100  $\mu$ l-t 10% végkoncentrációjú triklórecetsavval kicsaptunk és a fehérjéket 12%-os SDS-poliakrilamid-gélen megfuttattuk és Coomassie Blue-val festettük. **(B)** Az aktivitásméréshez 12  $\mu$ l médiumot 100 nM humán kationos tripszinnel felaktiváltunk 37 °C-on 10 mM CaCl<sub>2</sub>-ot és 100 mM Tris-HCl-ot (pH 8) tartalmazó 50  $\mu$ l végtérfogató oldatban. A CTRC aktivitását Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilid (150 nM végkoncentráció) szubsztráttal mértük. Az aktivitásértékeket a 2x10<sup>8</sup> pfu/ml vad típusú CTRC-adenovírussal infektált sejtek médiumából mért aktivitás százalékában fejeztünk ki.

Az N52S mutáns fehérje elégtelen szekréciónya arra utal, hogy a glikozilálatlan CTRC valószínűleg nem tud megfelelően feltekeredni az endoplazmatikus retikulumban, ami a fehérjék sejten belüli visszatartásához és degradációjához vezethet. A hibásan feltekeredett fehérjék endoplazmatikus retikulum (ER) stresszt okozhatnak, ami a fehérjefoldingot elősegítő dajkafehérjék expresszióját indukálja (135). Ennek lehetőségét az ER-stresszben részt vevő BiP (immunoglobulin binding protein) illetve a calnexin és calreticulin chaperonok expressziós szintjének real-time PCR-rel történő meghatározásával tanulmányoztuk. Az utóbbi két chaperon kifejezetten a glikozilált fehérjék foldingjában vesz részt. Eredményeink szerint az N52S mutáns CTRC-t tartalmazó adenovírussal infektált AR42J-sejtekben jelentős mértékben megnövekedett a BiP illetve a calreticulin mRNS-szintje a vad típushoz képest (21. ábra A, B). A génexpresszió növekedésének mértéke arányos volt az infekcióhoz használt adenovírus koncentrációjával. Ugyanakkor a calnexin mRNS-szintje nem változott (a jelen dolgozatban nem került bemutatásra). Kísérleteinkben egy másik ER-stressz markergén, az XBP1 transzkripció faktor expressziós szintjét is megvizsgáltuk. Az XBP1 mRNS-e ER-stressz hatására splicingon megy keresztül, majd az így keletkezett rövidebb, érett mRNS bejut a sejtmagba, ahol az ER-stresszben résztvevő különböző faktorok, chaperonok transzkripcióját indukálja (80). Szemikvantitatív PCR segítségével kimutattuk, hogy az N52S mutáns fehérje overexpressziója jelentős mértékben megnövelte az érett XBP1 splice variáns (XBP1s) mennyiségét (21. ábra C). Eredményeink szerint tehát a glikozilálatlan N52S mutáns CTRC ER-stresszt vált ki az AR42J-sejtekben, ami nagy valószínűséggel a fehérje hibás feltekeredésének köszönhető.

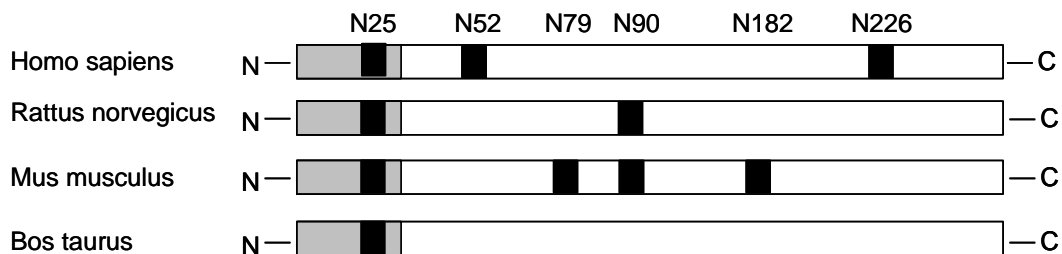


**21. ábra. ER-stressz markergének expressziója a vad típusú illetve az N52S mutáns CTRC-t tartalmazó adenovírustal infektált AR42J-sejtekben. (A,B)** A Bip illetve calreticulin mRNA-szintjének meghatározása kvantitatív real-time PCR-rel. Az expressziós szinteket az RPII belső kontrollgén expressziós szintjéhez viszonyítottuk. Az így kapott értékeket a 10<sup>7</sup> pfu/ml vad típusú CTRC-adenovírustal transzfektált sejtekben mért érték függvényében fejeztük ki. **(C)** Az XBP1 transzkripció faktor splice-variánsainak illetve a GAPDH kontroll gén mRNA-szintjének szemikvantitatív PCR-rel való meghatározása. A PCR-termékeket agaróz-gélelektroforézis után etídium-bromiddal való festéssel tettük láthatóvá.

### 8.2.4 A patkány CTRC N-glikozilációjának vizsgálata

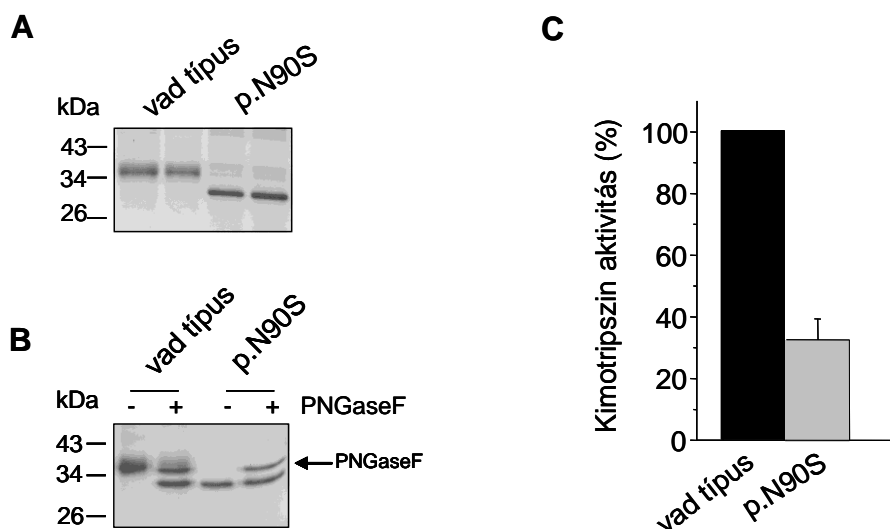
Kritikus funkciója ellenére az Asn52 glikozilációs hely nem konzervált a különböző emlős fajok CTRC aminosav-szekvenciájában, amelyekben az N-glikozilációs konszenzus-szekvencia más-más pozíciókban található (22. ábra). Munkám során a patkány CTRC-t használtam fel annak vizsgálatára, hogy vajon a különböző fajok eltérő pozícióban levő glikozilcsoportjai szintén fontos szerepet játszanak-e a fehérjefoldingjában.

A patkány CTRC-szekvenciájában két potenciális N-glikozilációs hely található az Asn25 és az Asn90-es pozíciókban. Amint az a 23. ábrán látható, a 90-es helyzetű aszparagin szerinre való cserélése (N90S) a HEK 293T-sejtekben termelt CTRC molekulatömegének csökkenését idézte elő. Továbbá a PNGaseF glikozidáz enzimmel való emésztést követően a vad típusú patkány CTRC molekulásúlya megegyezett az N90S mutáns fehérje tömegével, bizonyítva, hogy a mobilitásváltozást a glikozilcsoport hiánya okozta (23. ábra B). Mivel az N90S mutáns fehérje molekulatömege az emésztést követően változatlan maradt, feltehetőleg a patkány CTRC egyetlen glikozilcsoporttal rendelkezik az Asn90 pozícióban és az Asn25, ahogy a humán CTRC-nél is tapasztaltuk, nem megy keresztül glikoziláción. A glikozilcsoport hiánya a patkány CTRC esetén is a fehérje elégtelen szekréciójához vezet, mivel az N90S mutánsal transzfektált HEK 293T-sejtek médiumában mért CTRC-aktivitás csupán 40%-a volt a vad típusnak (23. ábra C). A szekréciós defektus mértéke azonban kisebb volt az N52S humán CTRC-nél tapasztaltnál, ahol a szekréció a tizedére csökkent.



### 22. ábra. Potenciális N-glikozilációs helyek különböző emlős fajokban.

Az aktivációs peptidet szürke, míg a glikozilációs helyeket fekete négyzettel jelöltük.

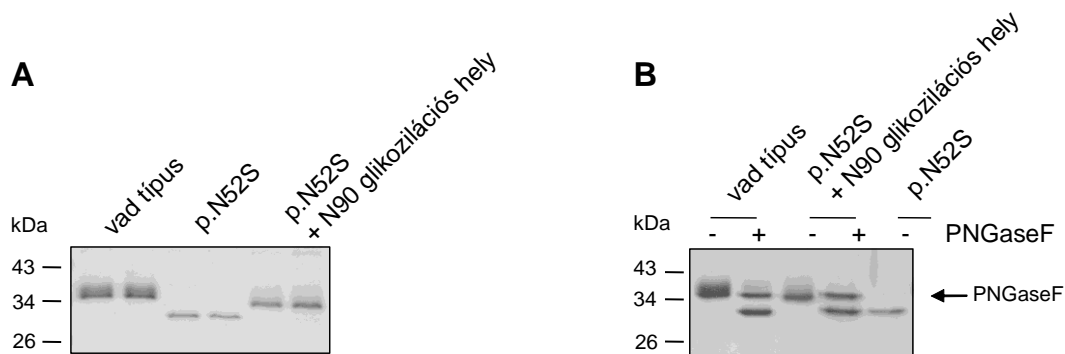


**23. ábra. A vad típusú és az N90S mutáns patkány CTRC szekréciója HEK 293T-sejtekben.** A sejteket tranziensen transzfektáltuk a vad típusú, ill. mutáns CTRC-t kódoló plazmiddal. A transzfekció után 48 órával a sejtek médiumát begyűjtöttük. **(A)** A médiumból 200  $\mu$ l-t 10% végkoncentrációjú triklórecetsavval kicsaptunk és a fehérjéket 12%-os SDS-poliakrilamid-gélen megfuttattuk és Coomassie Blue-val festettük. **(B)** A vad típusú és mutáns CTRC PNGaseF általi emésztése. 200  $\mu$ l kondicionált médiumot 10% végkoncentrációjú triklórecetsavval kicsaptunk, majd 37 °C-on 3 órán keresztül inkubáltuk 20  $\mu$ l 10% G7-puffert és 0,5  $\mu$ l (250 unit) PNGaseF enzimet tartalmazó oldatban. Ezt követően a mintákat 12%-os SDS-poliakrilamid-gélen, Coomassie Blue festést követően analizáltuk. **(C)** Az aktivitásméréséhez ugyanezen transzfekcióból származó médiumból 37  $\mu$ l-t felaktiváltunk 100 nM tripszinnel 37 °C-on 10 mM  $\text{CaCl}_2$ -ot és 100 mM Tris-HCl-et (pH 8) tartalmazó, 50  $\mu$ l végtér fogatú oldatban. A CTRC aktivitását Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilid (150 nM végkoncentráció) szubsztráttal mértük. Az ábrázolt értékek két párhuzamos transzfekcióból származó adatok átlagai, amelyeket a vad típusú CTRC aktivitásának százalékában fejeztünk ki.

### 8.2.5 A patkány Asn90 glikozilációs hely bevitele humán CTRC-be

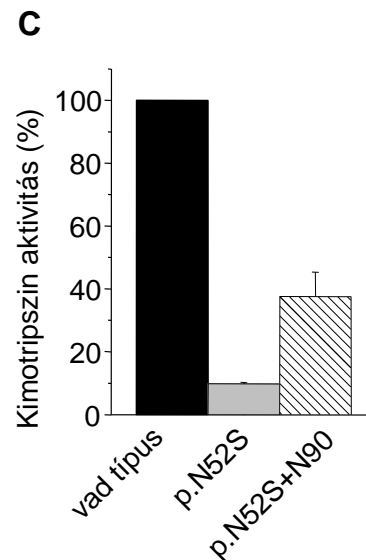
Ezt követően megvizsgáltuk, hogy a glikozilcsoport pozíciójának van-e jelentősége a CTRC optimális feltekeredésében, ezért a humán CTRC Asn52 glikozilációs helyét a patkány CTRC-ben található Asn90 glikozilációs helyre cseréltük. Az Asn90 a humán CTRC aminosav-szekvenciájában is jelen van, azonban a 92-edik pozícióban egy glutaminsav található. Ez utóbbi aminosav treoninra való mutáltatásával (E92T) egy potenciális N-glikozilációs helyet hoztunk létre (Asn90-Leu91-Thr92). A mutagenezist az N52S CTRC cDNS-ét hordozó plazmidon végeztük, így tehát egy kettős mutánst állítottunk elő (N52S, E92T), ahol az eredeti Asn52 glikozilációs helyet elimináltuk, és egy új, potenciális konszenzus szekvenciát hoztunk létre az Asn90-es

pozícióban. A plazmidot HEK 293T-sejtekbe transzfektálva azt tapasztaltuk, hogy az újonnan bevitt konszenzus-szekvencia teljes mértékben glikozilálódik, mivel csak egyetlen csíkot láthattunk az SDS-poliakrilamid-gélen, amely nagyobb molekulatömeggel rendelkezik, mint az N52S mutáns fehérje (24. ábra A). Eredményeinket PNGaseF emésztéssel is megerősítettük (24. ábra B). A kondicionált médiumból való aktivitásmérés szerint az új Asn90-es glikozilcsoport négyszeresére növeli az N52S mutáns fehérje szekréciónak, bár ez a megnövekedett szekréciónak csupán a 40%-a volt a vad típusú CTRC esetén mért értéknek (24. ábra C).



#### 24. ábra. Az N90 patkány glikozilációs hely bevitele a humán N52S mutáns CTRC-be.

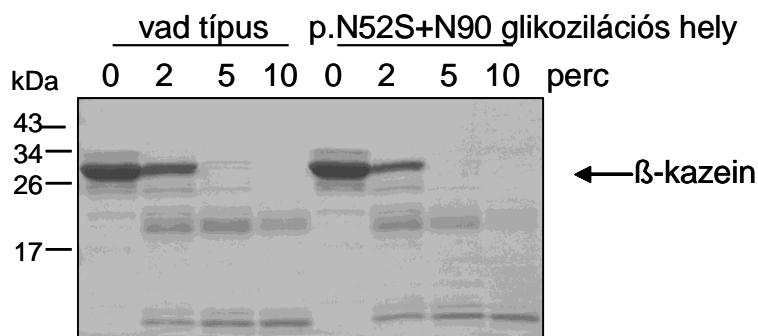
A HEK293T sejteket tranziensen transzfektáltuk a vad típusú, ill. mutáns humán CTRC-t kódoló plazmiddal. A transzekció után 48 órával a sejtek médiumát begyűjtöttük. **(A)** A médiumból 200  $\mu$ l-t 10% végkoncentrációjú triklórecetsavval kicsaptunk és a fehérjéket 12%-os SDS-poliakrilamid-gélen megfuttattuk és Coomassie Blue-val festettük. **(B)** A vad típusú és mutáns CTRC PNGaseF általi emésztése. 200  $\mu$ l kondicionált médiumot 10% végkoncentrációjú triklórecetsavval kicsaptunk, majd 37 °C-on 3 órán keresztül inkubáltuk 20  $\mu$ l 10% G7-puffert és 0,5  $\mu$ l (250 unit) PNGaseF enzimet tartalmazó oldatban. Ezt követően a mintákat 12%-os SDS-poliakrilamid-gélen, Coomassie Blue festést követően analizáltuk. **(C)** Az aktivitásméréshez ugyanezen transzfekcióból származó médiumból 37  $\mu$ l-t felaktiváltunk 100 nM tripszinnel 37 °C-on 10 mM CaCl<sub>2</sub>-ot és 100 mM Tris-HCl-ot (pH 8) tartalmazó 50  $\mu$ l végtérfogatú oldatban. A CTRC aktivitását Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilid (150 nM végkoncentráció) szubsztráttal mértük. Az ábrázolt értékek két párhuzamos transzfekcióból származó adatok átlagai, amelyeket a vad típusú CTRC aktivitásának százalékában fejeztünk ki.



**5. táblázat. A vad típusú illetve az N90 patkány glikozilációs helyet hordozó humán CTRC kinetikai paraméterei.** A CTRC-aktivitást Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilid segítségével mértük 1 mM CaCl<sub>2</sub> és 0,1 M Tris-HCl (pH 8) jelenlétében 25 °C-on 200 µl végtérfogatban.

	<b>vad típus</b>	<b>p.N52S+N90 glikozilációs hely</b>
$K_M$ (µM)	25,5±1,2	19,3±1,5
$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	20,9±0,4	17,8±0,3
$k_{cat}/K_M$ (µM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	0,9	0,9

Eredményeink szerint az ecotin oszlopon megtisztított N52S, E92T kettős mutáns és a vad típusú CTRC  $K_{cat}/K_M$  értéke (5. táblázat), illetve β-kazein emésztési mintázata azonosnak bizonyult (25. ábra). Kísérleteink alapján tehát az Asn90 glikozilcsoportja nem befolyásolja az enzimaktivitást, így a kondicionált médiumban mért aktivitásértékek valóban megfelelnek a fehérjeszekréció mértékének. Mindez arra utal, hogy az Asn90-en történő glikoziláció nem helyettesíti megfelelően a humán CTRC Asn52 glikozilcsoportját, mivel csak részlegesen állítja helyre az N52S mutáns fehérje szekrécióját.

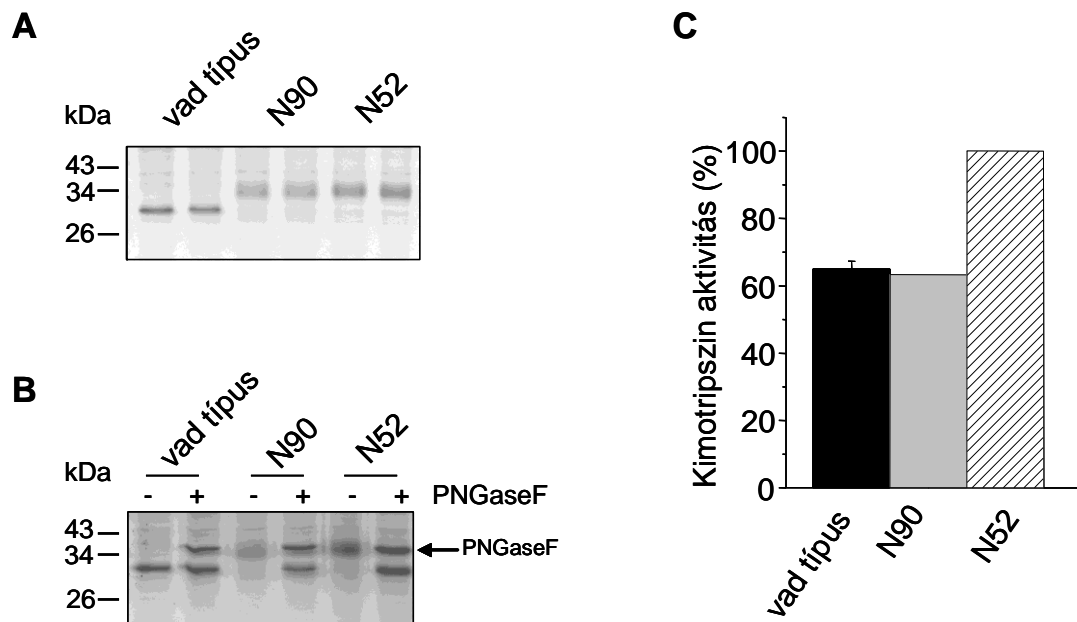


**25. ábra. Az N90 glikozilációs helyet hordozó humán CTRC β-kazein emésztése.** 0,2 mg/ml β-kazeint 5 nM CTRC-vel inkubáltuk 37 °C-on 1 mM CaCl<sub>2</sub>-ot és 100 mM Tris-HCl-ot (pH 8) és 20 nM SPINKI-et tartalmazó 500 µl végtérfogatú oldatban. Az ábrán jelölt időpontokban mintát vettünk (100 µl), amelyet 10% végkoncentrációjú triklórecetsavval kicsaptunk és 15%-os SDS-poliakrilamid-gélen megfutattunk, majd Coomassie Blue-val festettük

### **8.2.6 A szarvasmarha CTRC N-glikozilációjának vizsgálata**

Érdekes módon a szarvasmarha CTRC aminosav-szekvenciája csak egyetlen potenciális N-glikozilációs helyet tartalmaz az aktivációs peptidben található Asn25-ös pozícióban, amely a humán és a patkány CTRC-ben nem glikozilált (22. ábra). Ráadásul a fehérje kristályszerkezete alapján a szarvasmarha CTRC nem rendelkezik glikozilcsoporttal (136). Mindezt a fehérje SDS-poliakrilamid-gél analízise is megerősítette, mivel a gélen tapasztalt molekulatömege megegyezett az aminosav-szekvencia alapján várt molekulatömegegél és a PNGaseF-emésztés nem okozott mobilitás-változást. Megfigyelhettük továbbá azt is, hogy a szarvasmarha CTRC a patkány és humán CTRC-hez képest jóval kisebb mennyiségben szekretálódott a HEK 293T-sejtekben. Annak eldöntésére, hogy a glikoziláció elősegíti-e a szarvasmarha CTRC szekrécióját, annak aminosav-szekvenciájában mutagenezissel a patkány (Asn90) illetve humán (Asn52) CTRC-ben megtalálható glikozilációs helyeket hoztunk létre. A patkány glikozilációs helyet (Asn90-Leu91-Thr92) a 92-es glutaminsav treoninra való cserélésével (E92T), míg a humán glikozilációs helyet (Asn90-Asp91-Thr92) a D52N, N53D kettős mutáció segítségével hoztuk létre. A mutáns plazmidokat HEK 293T-sejtekbe transzfektáltuk, majd a kondicionált médiumot két nap elteltével SDS-poliakrilamid-gélen tanulmányoztuk. Ahogy az a 26/A ábrán megfigyelhető, mindkét mutáns molekulatömege megnövekedett a vad típushoz képest. A molekulatömeg növekedését a glikozilcsoport okozta, mivel a PNGaseF-el való emésztést követően a vad típusú és a mutáns fehérjék azonos mobilitással rendelkeztek (26. ábra B). A kondicionált médiumból való aktivitásmérés szerint egyik glikozilcsoport sem növelte meg jelentős mértékben a szarvasmarha CTRC szekrécióját (26. ábra C).





**26. ábra.** Az N90 patkány illetve az N52 humán glikozilációs hely bevitele szarvasmarha CTRC-be. A HEK 293T-sejteket tranziensen transzfektáltuk a vad típusú, ill. mutáns humán CTRC-t kódoló plazmival. A transzfekció után 48 órával a sejtek médiumát begyűjtöttük. **(A)** A médiumból 200  $\mu$ l-t 10% végkoncentrációjú triklórecetsavval kicsaptunk és a fehérjéket 12%-os SDS-poliakrilamid-gélen megfuttattuk és Coomassie Blue-val festettük. **(B)** A vad típusú és mutáns CTRC PNGaseF általi emésztése. 200  $\mu$ l kondicionált médiumot 10% végkoncentrációjú triklórecetsavval kicsaptunk, majd 37 °C-on 3 órán keresztül inkubáltuk 20  $\mu$ l 10% G7-puffert és 0,5  $\mu$ l (250 unit) PNGaseF enzimet tartalmazó oldatban. Ezt követően a mintákat 12%-os SDS-poliakrilamid-gélen, Coomassie Blue festést követően analizáltuk. **(C)** Az aktivitásméréshez ugyanezen transzfekcióból származó médiumból 37  $\mu$ l-t felaktiváltunk 100 nM tripszinnel 37 °C-on 10 mM  $\text{CaCl}_2$ -ot és 100 mM Tris-HCl-ot (pH 8) tartalmazó 50  $\mu$ l végtérfogatú oldatban. A CTRC aktivitását Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilid (150 nM végkoncentráció) szubsztráttal mértük. Az ábrázolt értékek két párhuzamos transzfekcióból származó adatok átlagai, amelyeket a vad típusú CTRC aktivitásának százalékában fejeztünk ki.

## 9 AZ EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

### 9.1 A kimotripszin C szerepe a prokarboxipeptidáz aktivációjában

A karboxipeptidázok a többi pankreatikus enzimhez hasonlóan inaktív proenzim formájában termelődnek a hasnyálmirigy acinussejtjeiben (29,30). A prokarboxipeptidáz inaktivitásáért az enzim 94-96 aminosav hosszúságú N-terminális propeptidje felelős. A propeptid egy inhibitoros globuláris doménnel rendelkezik, amely egy  $\alpha$ -helikális szegmensén keresztül kötődik az enzimhez. Az irodalmi adatok egyöntetűen azt mutatják, hogy a prokarboxipeptidáz aktivációjának első lépése az  $\alpha$ -hélix C-terminálisának tripszin általi hasítása (29,30,39). Ennek eredményeként az  $\alpha$ -hélix destabilizálódik és az inhibitoros globuláris domén disszociál az enzimről, amely ezáltal felszabadul a gátlás alól és aktiválódik. Az aktivációs folyamatban a tripszinen kívül az elasztáz és a kimotripszin szerepét is kimutatták, azonban ezek a tanulmányok nem tisztázták az aktiváció pontos mechanizmusát illetve a hasítási helyeket (36,37,42,44).

PhD munkám során a kimotripszin C prokarboxipeptidáz aktivációjára gyakorolt hatását tanulmányoztuk. Az aktiváció folyamatát SDS-poliakrilamid-gélen, illetve a karboxipeptidáz aktivitásának mérésével vizsgáltuk. A hasítási helyeket N-terminális szekvenálással, illetve tömegspektroszkópia segítségével határoztuk meg.

Vizsgálataink egybehangzóan azt mutatták, hogy a humán A-típusú prokarboxipeptidáz aktiválásában a tripszin és a CTRC együttesen vesz részt és hatásukat szekvenciális módon fejtik ki. Az aktiváció folyamata a proCPA1 illetve a proCPA2 esetén is négy szakaszra osztható. Az első lépésben a propeptid C-terminális szakaszán történő sorozatos triptikus hasítások következtében a proCPA1 propeptidjéről kettő (Ser109-Arg110), míg a proCPA2 propeptidjéről négy (Arg109-Arg110-Glu111-Arg112) aminosav hasad le, ami mindkét enzim esetén egy stabil 92 aminosav hosszúságú propeptidet eredményez. Az emésztett propeptid továbbra is megőrzi az inhibitoros hatását, azonban a kötési affinitása csökken, s ennek következtében egy körülbelül 10%-os karboxipeptidáz-aktivitást figyelhetünk meg. A második lépésben a propeptid  $\alpha$ 3-hélixének C-terminális szakaszát a CTRC tovább bontja. A CTRC által

emésztett propeptid C-terminális aminosavainak lehasadásában valószínűleg a CPA1/CPA2 is részt vesz. Mindez tovább csökkenti a propeptid inhibitoros hatását, ami a CPA1 esetén 30%-os, míg a CPA2 esetén 15%-os aktivitást eredményez. A harmadik lépésben a CTRC az  $\alpha$ 3-hélix N-terminális szakaszán található konzervált Leu96-Leu97 peptidkötést bontja. A proCPA1 enzim esetén ezt követi a Gln94-Ser95 peptidkötés CTRC általi hasadása. Mindkét enzim esetén a karboxipeptidáz eltávolítja a propeptid C-terminálisáról a Leu96-ot. Emellett a CPA2 a Val95 lehasadásában is szerepet játszik. Ebben a fázisban a propeptid  $\alpha$ 3-hélice teljesen lebomlik, a globuláris domén disszociál, így a CPA1/CPA2 felszabadul a gátlás alól és megjelenik a 100%-os karboxipeptidáz-aktivitás. A negyedik lépésben a tripszin és a CTRC együttesen lebontja a propeptid globuláris doménjét. Fiziológiás körülmények között az utolsó fázisban valószínűleg egyéb proteázok is részt vesznek.

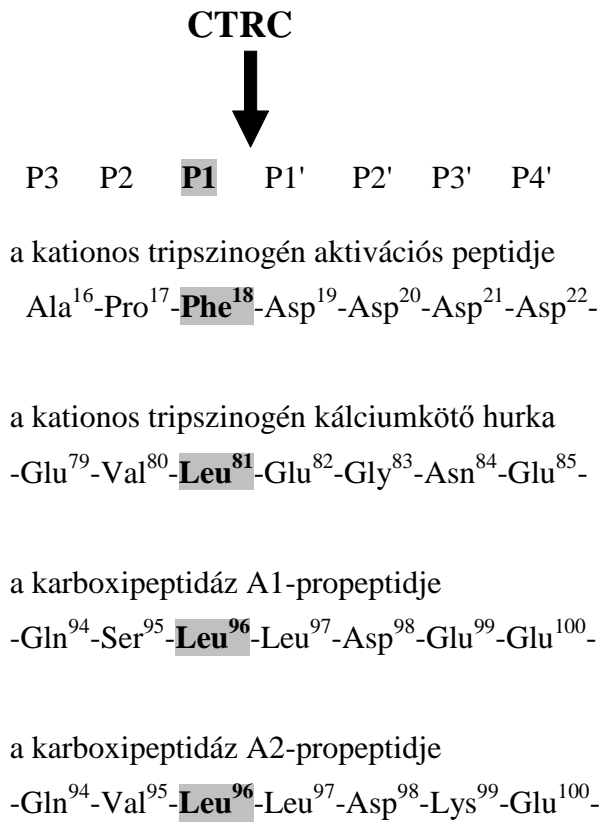
Az általunk megfigyelt aktivációs folyamat összhangban van az irodalomban általánosan elfogadott véleménnyel, ami szerint a proCPA1/proCPA2 aktivációjának előfeltétele a propeptid C-terminális szakaszának tripszin általi hasítása, ami fellazítja az  $\alpha$ 3-hélicet és lehetővé teszi a további proteolitikus hasításokat (29,39-41). Sertés CPA-n végzett tanulmányok alapján a propeptid teljes lebomlásáért lassú és gyakran atipikus triptikus hasítások felelősek (40). Ezzel szemben eredményeink egyértelműen bizonyítják, hogy a tripszin által hasított propeptid megőrzi stabilitását és az  $\alpha$ 3-hélix proteolízisét jelentős mértékben kizárólag a CTRC képes katalizálni. Bár a CPA1 és CPA2 részt vesz a propeptid lebontásában, azonban ez nem szükségszerű, mivel a csökkent katalitikus aktivitású CPA1/CPA2 mutáns propeptidjét a tripszin illetve CTRC szintén teljes mértékben degradálja. Korábbi tanulmányok szerint a proCPA2 teljes felaktiválásához a tripszin önmagában is elegendő (29,38,39,42,43), azonban kísérleteink azt mutatják, hogy a proCPA1 és a proCPA2 aktivációs folyamata hasonlóképpen zajlik, amihez a tripszin és a CTRC együttes emésztése szükséges. Ezzel szemben a proCPB1 aktivációjában nagy valószínűséggel csak a tripszin vesz részt, ahogy ezt számos más tanulmány is alátámasztja (29,38,39,41,137).

A patkány, egér, szarvasmarha, sertés illetve humán CPA1/CPA2 propeptid aminosav-szekvenciájának összehasonlítása alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a Leu96-Leu97 aminosavak konzerváltak, illetve az  $\alpha$ 3-hélix C-terminálisán található CTRC-szenzitív helyek szintén jelen vannak ezekben a fajokban. Mindezek

alapján, az általunk leírt aktivációs mechanizmus nagy valószínűséggel hasonlóképpen zajlik az emlős fajok A-típusú prokarboxipeptidáza esetén. Érdekes módon kérődző állatokban, így a szarvasmarhában, kecskében illetve birkában a CTRC komplexet képez a CPA-val és a proproteináz E-vel (amely megfelel a humán Ela3B-nek) (31,32,138). Így felmerül annak lehetősége, hogy komplexált formában a CTRC térbeli közelsége miatt a CPA gyorsabban aktiválódik. Azonban a jelenlegi irodalom szerint a CPA tripszin általi aktivációja lassabban zajlik a komplexben, mint monomer formában, ugyanakkor a CTRC aktivációja viszonylag gyors. Mindez arra utal, hogy a komplexen belül a CPA propeptidje a CTRC számára nehezen hozzáférhető (35).

Néhány tanulmány szerint a kimotripszin illetve az elasztáz a tripszin jelenléte nélkül is felaktiválja a prokarboxipeptidázt (36,37,42,44). Munkánk során azonban számos humán elasztáz illetve kimotripszin proCPA aktivitására gyakorolt hatását megvizsgáltuk és eredményeink azt mutatják, hogy a CTRC-n kívül a vizsgált hasnyálmirigy eredetű enzimek jelentősebb mértékben még a tripszin által előemésztett proCPA1/proCPA2-t sem aktiválják. Az egyetlen kivétel a CTRB2 volt, amely az intakt CPA1 propeptid C-terminális szakaszának hasítása révén a proCPA1 részleges aktivációját (~30%) indukálta. Ugyanakkor az aktiváció sebessége egy nagyságrenddel alacsonyabb volt, mint a tripszin által katalizált proCPA1 aktiváció, így nem valószínű, hogy a CTRB2 jelentős szerepet játszik a proCPA1/proCPA2 fiziológias aktiválásában.

Munkánk eredményeként tehát laboratóriumunk korábbi megfigyelése további megerősítést nyert, mi szerint a CTRC az emésztő funkcióján túl fontos szerepet játszik egyéb hasnyálmirigy eredetű enzimek, mint a tripszinogén illetve a prokarboxipeptidáz aktivációjának és degradációjának szabályozásában. A CTRC egyedülálló szabályozó szerepe valószínűleg a specificitásában rejlik, mivel semelyik másik pankreatikus emésztőenzim nem képes a CTRC-specifikus szabályozó helyeket jelentősebb mértékben hasítani. A CTRC specificitása részben a leucil-peptidkötéshez való nagyfokú affinitásával magyarázható. Továbbá a tripszinogén szabályozó helyeit, illetve a proCPA1/proCPA2 Leu96-Leu97 peptidkötését határoló szekvenciák összehasonlítása során megfigyelhetjük, hogy a CTRC hasítási helye körül számos savas oldalláncú aminosav található (27. ábra). Ennek alapján elképzelhető, hogy ezek a savas oldalláncok elősegítik a CTRC kötődését és ezáltal szerepet játszanak a CTRC nagyfokú specificitásában.



**27. ábra. A CTRC által szabályozott hasítási helyek összehasonlítása humán kationos tripszinogénben, valamint a prokarboxipeptidáz A1-ben és A2-ben. A nyíl a hasított peptidkötés helyzetét jelöli. A P1 aminosav-oldalláncát kiemeltük.**

## **9.2 A kimotripszin C N-glikozilációjának vizsgálata**

### **9.2.1 A humán CTRC N-glikozilációjának vizsgálata**

A humán CTRC aminosav-szekvenciájában három potenciális N-glikozilációs hely található az Asn25, Asn52 illetve az Asn226 pozícióban. Annak megállapítására, hogy a humán CTRC keresztülmegy-e N-glikoziláción, a potenciális aszparagin-aminosavakat szerinre cseréltük és a mutáns CTRC cDNS-ét kódoló plazmidokat tranziens transzfekcióval HEK 293T-sejtekbe jutattuk. A szekretált fehérjék SDS-poliakrilamid-gélen való vizsgálata kimutatta, hogy az 52-es aszparagin mutáltatása a CTRC molekulásúlyának jelentős mértékű csökkenésével jár. Glikozidáz enzimek segítségével bizonyítottuk, hogy a megfigyelt mobilitásváltozást a glikozilcsoport hiánya okozza. Eredményeink tehát egyértelműen alátámasztják, hogy a három potenciális aszparagin-aminosav közül egyedül az Asn52 hordoz ténylegesen glikozilcsoportot.

### **9.2.2 Az N-glikoziláció hatása a humán CTRC szekrécijára**

A továbbiakban a glikozilcsoport CTRC szekrécijára gyakorolt hatását tanulmányoztuk humán embrionális vesesejtekben (HEK 293T), illetve patkány eredetű pankreatikus acinussejtekben (AR42J). A sejtek kondicionált médiumát SDS-poliakrilamid-gélen megfutattuk, illetve meghatároztuk a médium CTRC-aktivitását. Mindkét sejtípus esetén azt találtuk, hogy az N52S mutáns fehérje a vad típushoz képest kisebb mennyiségben szekretálódik. Továbbá munkánk során kimutattuk azt is, hogy az N52S mutáns overexpressziója endoplazmatikus retikulum-(ER) stresszt idéz elő AR42J-sejtekben, amit az irodalomból jól ismert ER-stressz markergének megnövekedett mRNS-szintje igazol. Mindez arra utal, hogy a glikozilálatlan N52S fehérje elégtelen szekréciját a fehérje hibás feltekeredése okozza. Így arra a következtetésre jutottunk, hogy a glikozilcsoport nagy valószínűséggel elősegíti a CTRC megfelelő foldingját és hatékony szekréciját. Ez felveti annak lehetőségét, hogy a CTRC helyes feltekeredését, mint az a legtöbb glikoprotein esetében megfigyelhető, a calnexin-calretikulín-rendszer irányítja. Ezek a lektin típusú chaperonok az újonnan szintetizált glikoproteinek glikozilcsoportjához kötődnek. Mindkét lektin komplexet

képez az ERp57 tiol-oxidoreduktázzal, amely elősegíti a megfelelő diszulfidhidak kialakulását és ezáltal biztosítja a fehérjék helyes feltekeredését (85,89). Ugyanakkor az is elképzelhető, hogy a glikozilcsoporthoz olyan mannóz-specifikus lektinek (ERGIC-53, VIP36) kötődnek, amelyek a CTRC sejten belüli szállításáért és irányításáért felelősek (90,103,139). Azonban a CTRC foldingjára a glikozilcsoport közvetlenül is hatással lehet. Számos in vitro tanulmány bizonyítja, hogy a glikozilációnak pozitív hatása van a fehérje folding mechanizmusára (98,99,140). Egyrészt a poláris oligoszacharid-oldallánc növeli a naszcens polipeptidlánc víz oldékonyságát és megakadályozza a fehérjék aggregálódását. Másrészt a glikoziláció csökkenti a fehérje flexibilitását és ezáltal növeli annak stabilitását. Ezt az elméletet támasztja alá, hogy a glikozilcsoportok általában a fehérjék flexibilis régiójában helyezkednek el. A CTRC esetén szintén megfigyelhetjük ezt a tendenciát, mivel a glikozilcsoportot hordozó Asn52 egy olyan hurokban található, amely nagyfokú flexibilitással rendelkezik.

Érdekes módon mind a HEK 293T, mind az AR42J-sejtekkel végzett kísérlet során az N52S CTRC szekréciónak defektusa arányos volt az expresszió mértékével. Ennek megfelelően a kisebb plazmid ill. vírus-koncentrációval transzfektált sejtekben az N52S fehérje szekréciónak közel azonos volt a vad típuséval, tehát kisebb mennyiségben a sejtek képesek a glikozilálatlan CTRC megfelelő feltekerésére és szekréciónak. Elképzelhető, hogy a magasabb fehérje-koncentráció növeli a glikozilálatlan CTRC aggregálódásának esélyét, vagy túltelíti a sejt szabályozó mechanizmusait. Azt is megfigyelhettük, hogy a glikozilcsoport hiánya jóval nagyobb mértékű szekréciónak defektust idézett elő a HEK 293T-sejtekben, mint az AR42J-sejtvonalban. Az AR42J-sejtek szekretoros funkciójukból adódóan jóval kiterjedtebb endoplazmatikus retikulum rendszerrel és szekréciónak apparátussal rendelkeznek, amely minden bizonnyal nagyobb mennyiségű glikozilálatlan CTRC megfelelő foldingját és szekréciónak teszi lehetővé.

### **9.2.3 Az N-glikoziláció hatása a humán CTRC enzimikus funkcióra**

A glikozilcsoport enzimikus funkciókra gyakorolt hatását tisztított fehérjepreparátumon tanulmányoztuk. A vad típusú, illetve a N52S mutáns CTRC-t tranziens transzfekciónak HEK293T-sejtekkel termeltettük, majd a kondicionált

médiumból a fehérjéket ecotin oszlopon tisztítottuk. Eredményeink szerint a glikoziláció megléte nem befolyásolta a CTRC enzimaktivitását, szubsztrát-specifitását, illetve inhibitorokötését. Továbbá azt a következtetést is levonhatjuk, hogy a szekretált N52S fehérje normál enzimfunkciójából adódóan megfelelő fehérjestruktúrával rendelkezik. Korábbi tanulmányok szintén azt támasztják alá, hogy a glikozilációnak főként a polipeptidlánc folding mechanizmusában van fontos szerepe, de a fehérje megfelelő feltekeredését követően a glikozilcsoport legtöbb esetben már nem szükséges az érett fehérje struktúrájának fenntartásához (85,98,99). Azonban számos enzim esetén az is bizonyítást nyert, hogy a glikozilcsoport hatást gyakorol az enzim katalitikus aktivitására, a szubsztrátkötés erősségére és az enzim szubsztrátspecifitására is (92,96,141). Ezekben az esetekben az oligoszacharid-oldallánc az enzim aktív centrumához közel helyezkedik el, így szterikusan befolyásolja a szubsztrát elérhetőségét. Ezáltal a glikozilcsoport fokozza vagy éppen gátolja az enzim aktivációs mechanizmusait.

A CTRC esetén a glikozilcsoportot hordozó Asn52 egy felszíni hurokban helyezkedik el, amely részt vesz a szubsztrát megkötésében. A hurokban található Lys51 és Arg56 aminosavak az Arg80-al együtt egy pozitív töltésű csoportot alkotnak, amely a szubsztrát illetve inhibitor P4` helyén elhelyezkedő savas oldalláncú Glu vagy Asp megkötését teszi lehetővé (131). Annak ellenére, hogy az Asn52 a Lys51 és Arg56 aminosavak közelségében helyezkedik el, a glikozilcsoport nem befolyásolja a CTRC szubsztrátkötését illetve szubsztrátspecifitását.

#### **9.2.4 Összehasonlító vizsgálatok patkány illetve szarvasmarha CTRC-vel**

Kritikus funkciója ellenére az Asn52 glikozilációs hely nem konzervált a különböző emlősfajok CTRC enzimeinek aminosav-szekvenciájában, amelyekben az N-glikozilációs konszenzus-szekvencia más pozíciókban található. Összehasonlító vizsgálatunk kimutatták, hogy a patkány CTRC az Asn90 aminosavon hordoz glikozilcsoportot, amelynek jelenléte szintén a fehérje hatékony szekrécióját segíti elő. Annak vizsgálatára, hogy a glikozilcsoport pozíciójának van-e jelentősége a CTRC optimális feltekeredésében, a humán CTRC Asn52 glikozilációs helyét mutagenézis segítségével a patkány CTRC-ben található Asn90 glikozilációs helyre cseréltük. A



mutáns plazmidot HEK 293T-sejtekbe transzfektálva azt tapasztaltuk, hogy az újonnan bevitt konszenzus-szekvencia teljes mértékben glikozilálódott. A kondicionált médiumból való aktivitásmérés szerint az Asn90-es glikozilcsoport négyszeresére növeli az N52S mutáns fehérje szekréciónak, bár ez a megnövekedett szekréciónak csupán a 40%-a volt a vad típusú CTRC esetén mért értéknek. Mindez arra utal, hogy az Asn90-en történő glikoziláció nem helyettesíti megfelelően a humán CTRC Asn52 glikozilcsoportját, mivel csak részlegesen állítja helyre az N52S mutáns fehérje szekréciónak. Eredményeink szerint tehát az oligoszacharid-oldallánc megfelelő pozíciója kritikus a humán CTRC optimális feltekeredéséhez.

Furuhashi és munkatársai hasonló eredményre jutottak a gonadotropin glikozilációjának vizsgálatakor, amelynek során kimutatták, hogy az új pozícióba bevitt glikozilcsoport csak kismértékben állítja helyre a humán gonadotropin  $\alpha$ -alegységének szekréciónak defektusát, amit az eredeti glikozilációs helyek kiütése okozott (142). Szintén a glikoziláció pozíciójának jelentőségére utalnak azok a tanulmányok, amelyek szerint a polipeptidlánc különböző helyein található glikozilcsoportok különböző funkciókkal rendelkeznek (94,95,143).

A glikoziláció fehérjefoldingra gyakorolt lokális hatását számos biofizikai tanulmány alátámasztja (98,99). Az oligoszacharid-oldallánc hidrofilitása révén képes a környező polipeptid-szakaszt a fehérje felszínére juttatni, ezáltal irányítja a fehérje feltekeredésének folyamatát. Továbbá a glikozilcsoport főként a flexibilis régiókban helyezkedik el, ahol stabilizálja a fehérjeszerkezetet. Mindezek alapján elképzelhető, hogy a humán CTRC esetében a glikozilcsoport megfelelő pozíciója fontos lehet, mivel lokális hatást fejt ki a folding folyamatokra illetve a fehérje stabilitására. Ugyanakkor a glikozilcsoport pozíciója a humán CTRC megfelelő chaperonhoz való kötődését is befolyásolhatja. Egy közelmúltban megjelent tanulmány szerint ugyanis, abban az esetben, ha a legelső glikozilcsoport a fehérje N-terminális végéhez közel, körülbelül az első 50 aminosavnyi szakaszon helyezkedik el, akkor a fehérje kizárólag a calnexin/calretikulín chaperonokhoz kötődik, s ez a kötődés megakadályozza a BiP-el való asszociációt. Ha azonban a glikozilcsoport az N-terminálistól távolabb található, a transzlokálódó fehérje először a BiP-hez, majd a calnexin/calretikulín chaperonokhoz kötődik (144). Mivel a humán CTRC Asn52-n található glikozilcsoportja közelebb helyezkedik el az N-terminálishoz, mint a patkány CTRC Asn90-es glikozilcsoportja, a

fentiek alapján valószínűsíthető, hogy a két fehérjefoldingjában más-más chaperonok vesznek részt. Ezt az elméletet támasztja alá, az a megfigyelésünk is, hogy a patkány CTRC glikozilációs helyének kiütése a fehérje szekréciónak csupán a harmadára csökkentette, míg a glikozilálatlan humán CTRC esetén a szekréciónak az eredeti tizedére csökkent. Tehát valószínűleg a patkány CTRC foldingjának mechanizmusa és az érett fehérje szekréciónak kevésbé függ a glikozilációtól és ezáltal a calnexin/calreticulin chaperonok kötődésétől.

Az N-glikozilációs helyet körülvevő aminosav-szekvencia szintén befolyással lehet a chaperonok megkötésére és az is elképzelhető, hogy az Asn52 és Asn90 aminosavakon elhelyezkedő glikozilcsoport hatása csupán a saját eredeti környezetében képes optimálisan érvényesülni.

Érdekes módon a szarvasmarha CTRC nem megy keresztül N-glikoziláción és a humán illetve patkány CTRC-hez képest nagyon gyengén szekretálódik HEK 293T-sejtekben. A mutagenezissel bevitt N52 humán illetve az N90 patkány glikozilációs helyek sikeresen glikozilálódtak, de nem befolyásolták szignifikánsan a szarvasmarha CTRC szekréciónak.

Bár a patkány és szarvasmarha CTRC aminosav-szekvenciája 80%-os homológiát mutat a humán CTRC-vel és feltehetőleg a fehérje harmadlagos struktúrája is nagyon hasonló mindhárom emlős fajban, lehetséges, hogy a primer szekvencia kis különbségei megváltoztatják a folding mechanizmusát. Így tehát elképzelhető, hogy az N-glikoziláció megléte és pozíciónak a különböző emlős fajokban található CTRC optimális feltekeredésének biztosításához adaptálódott.

Eredményeinkhez hasonlóan számos korábbi tanulmány kimutatta, hogy ugyanazon fehérjecsald N-glikozilációnak mértéke és pozíciónak, sőt még a konzervált pozíciónak lévő glikozilcsoportok szerepe is változhat az evolúció során (114,143,145,146). Továbbá az oligoszacharid-oldallánc módosítását végző enzimek előfordulása is különbözhet a fajok között, ami eltérő összetételű glikozilcsoportok kialakulásához vezet.

Azonban ezeknek az enzimeknek az expressziós mintázata gyakran még ugyanazon faj különböző szöveteiben is eltérő lehet (147-149). Néhány tanulmány arra is rámutat, hogy bizonyos fehérjék foldingja és szekréciónak az egyik sejttypusban N-glikoziláció függő, míg egy másik sejttypusban a glikozilációnak nincsen jelentősége

(85,114). A sejttípus fehérjefoldingra gyakorolt hatását egy közelmúltban megjelent közlemény is alátámasztja, amely szerint a transthyretin fehérje mutációinak szekréciós defektust kiváltó hatása sejttípus-függő (150). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy ugyanazon fehérje folding-mechanizmusát és szekrécióját az adott sejttípus is lényegesen befolyásolhatja. Mindezek alapján nem zárhatjuk ki annak lehetőségét, hogy a különböző emlős fajokban található CTRC N-glikozilációjának megléte illetve pozíciója nemcsak a fehérje strukturális különbségeihez, hanem a különböző fajok acinussejtjeinek eltérő környezetéhez is adaptálódik.

A szarvasmarha CTRC a patkány illetve humán CTRC-vel ellentétben komplexet képez a karboxipeptidáz A illetve a proproteináz E fehérjékkel (136). Így az is elképzelhető, hogy a szarvasmarha CTRC foldingját az N-glikoziláció helyett a komplexképződésben résztvevő fehérjék segítik elő.

## 10 KÖVETKEZTETÉSEK

### 10.1 A kimotripszin C szerepe a prokarboxipeptidáz aktivációjában

Munkánk eredményeként bizonyítást nyert, hogy a CTRC a proCPA1 illetve a proCPA2 fiziológias koaktivátora. A CTRC önmagában nincsen hatással a proCPA aktivitására, azonban annak tripszin általi aktivációját tízszeresére növeli. Ugyanakkor a CTRC a proCPB1 tripszin általi aktivitását nem befolyásolja.

A proCPA aktiválódása egy többlépcsős folyamat, amelynek során a propeptid  $\alpha$  -hélixének C-terminális szakaszát először a tripszin hasítja. Ez a hasítás az  $\alpha$  -hélixet fellazítja, ami lehetővé teszi a propeptid CTRC általi hasítását. A CTRC az  $\alpha$  -hélixet először szintén a C-terminális végén hasítja, amelyet az N-terminális vég hasítása követ. Ezek a hasítások destabilizálják az  $\alpha$  -hélixet, aminek következtében a propeptid globuláris doménje lehasad. Ezt követően az inhibitoros globuláris domén degradálódik; ebben a folyamatban a tripszin, CTRC illetve maga a CPA is részt vesz. A globuláris domén lebomlását követően a CPA teljes mértékben felszabadul a gátlás alól.

Eredményeink tehát megerősítették laboratóriumunk korábbi megfigyelését, amely szerint a CTRC a táplálékkal bevitt fehérjék emésztése mellett fontos szabályozó szerepet játszik egyéb hasnyálmirigy eredetű enzimek aktivációjának és degradációjának szabályozásában. A CTRC egyedülálló szabályozó szerepe valószínűleg a specificitásában rejlik, mivel semelyik másik pankreatikus emésztőenzim nem képes a CTRC-specifikus szabályozó helyeket jelentősebb mértékben hasítani.

### 10.2 A kimotripszin C N-glikozilációjának vizsgálata

Vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy a CTRC három potenciális N-glikozilációs helye közül egyedül az Asn52 hordoz ténylegesen glikozilcsoportot.

A glikozilcsoport elősegíti a CTRC megfelelő feltekeredését és szekréciónak, ugyanakkor nincsen hatással a fehérje aktivitására illetve inhibitor-kötésére.

A glikozilcsoport pozíciója kritikus a CTRC megfelelő feltekeredése és szekréciónak szempontjából.

Összehasonlító vizsgálataink szerint a különböző emlős fajokban található CTRC glikozilcsoportjának pozíciója illetve a glikoziláció mértéke és megléte a fehérjék nagyfokú hasonlósága ellenére eltérő.

## 11 ÖSSZEFOGLALÁS

A humán kimotripszin C (CTRC) a hasnyálmirigyben termelődő szerin proteáz, amely a táplálékkal bevitt fehérjék emésztése mellett részt vesz a kationos tripszinogén aktivációjának, illetve degradációjának szabályozásában. A CTRC szabályozó funkciója valószínűleg a hasnyálmirigyen belül is nagy jelentőséggel bír, mivel a fehérje szekréciónak és aktivitásának csökkentő mutációk növelik a krónikus pankreatitisz kialakulásának esélyét. Munkám során a CTRC prokarboxipeptidáz aktivációjára gyakorolt hatását, valamint a CTRC N-glikozilációjának szerepét tanulmányoztam.

A prokarboxipeptidáz tripszin illetve CTRC általi aktivációjának folyamatát SDS-gélen, illetve a karboxipeptidáz aktivitásának mérésével vizsgáltam. Eredményeink szerint a CTRC önmagában nincsen hatással a prokarboxipeptidáz A (proCPA) aktivitására, azonban annak tripszin általi aktivációját tízszeresére növeli. Ugyanakkor a CTRC a prokarboxipeptidáz B1 (proCPB1) tripszin általi aktivitását nem befolyásolja. A CTRC proCPA1 illetve proCPA2 aktivációját elősegítő funkciója egyedülálló, mivel a többi hasnyálmirigy eredetű proteáz esetében nem tudunk hasonló hatást kimutatni. Mindez arra utal, hogy a CTRC a proCPA1 illetve proCPA2 fiziológias ko-aktivátora. Ezek az adatok megerősítették laboratóriumunk korábbi megfigyelését, amely szerint a CTRC kulcsfontosságú szabályozó szerepet játszik a hasnyálmirigy eredetű enzimek aktivitásának szabályozásában.

Maga a CTRC egy szekretált fehérje, így feltételezhető volt, hogy szintézise során N-glikoziláción megy keresztül. A humán CTRC elsődleges aminosav-szekvenciájában három potenciális N-glikozilációs konszenzus-szekvencia található. A konszenzus szekvenciákat mutagenézis segítségével egyenként megváltoztatva azt kaptuk, hogy a három potenciális aszparagin-aminosav közül egyedül az Asn52 hordoz ténylegesen glikozilcsoportot. Megfigyelhettük továbbá azt is, hogy a glikozil-csoport hiánya a CTRC fehérje szekréciónak a tizedére csökkenti, ugyanakkor az enzim aktivitását illetve inhibitor-kötését nem befolyásolja. A glikozilálatlan N52S mutáns CTRC szekréciónak defektusa valószínűleg a fehérje hibás feltekeredésének a következménye. Eredményeink alapján tehát elmondhatjuk, hogy a CTRC N-glikozilációja fontos szerepet játszik a fehérje megfelelő feltekeredésének és szekréciónak elősegítésében, azonban annak enzimikus funkcióira nincsen hatással.

## 12 SUMMARY

Chymotrypsin C (CTRC) is a serine protease secreted by acinar cells of the pancreas. Beyond its digestive function, human CTRC also facilitates activation and degradation of human cationic trypsinogen. This regulatory function probably has a crucial role inside the pancreas, because mutations that abolish the activity or secretion of CTRC increase the risk for chronic pancreatitis. The aim of the present study was to explore the effect of CTRC on procarboxypeptidase activation and examine the role of N-glycosylation of CTRC.

We followed the activation process of procarboxypeptidase by SDS-PAGE and activity measurements. According to our results, CTRC alone has no effect on procarboxypeptidase A (proCPA) activation however it increases the activity of trypsin-activated CPA1 and CPA2 10-fold. In contrast, CTRC has no influence on the activation of trypsin-activated procarboxypeptidase B1 (proCPB1). The proCPA activating function of CTRC is unique, because other human pancreatic proteases were less effective in promoting proCPA1 and proCPA2 activation. On the basis of these observations we propose that CTRC is a physiological co-activator of proCPA1 and proCPA2. Furthermore, the results confirm and extend the notion that CTRC is a key regulator of pancreatic digestive zymogen activation.

CTRC is a secretory protein, therefore we proposed that it might undergo asparagine-linked (N-linked) glycosylation during its synthesis. The primary amino acid sequence of human CTRC contains three potential N-glycosylation sites. We eliminated these potential sites individually by site directed mutagenesis. According to our results the human CTRC contains a single N-linked glycan at Asn52. Furthermore, we found that the lack of glycosylation reduces CTRC secretion about 10-fold but has no effect on CTRC activity or inhibitor binding. The secretion defect of unglycosylated N52S mutant CTRC may be due to misfolding of the protein. Finally, we can conclude that N-glycosylation of human CTRC is required for efficient folding and secretion, but the N-linked glycan is unimportant for enzyme functions.

### 13 IRODALOMJEGYZÉK

1. Folk JE, Schirmer EW. Chymotrypsin C. I. Isolation of the zymogen and the active enzyme: Preliminary structure and specificity studies. *J. Biol. Chem.* 1965 Jan;240:181-192.
2. Nemoda Z, Sahin-Tóth M. Chymotrypsin C (caldecrin) stimulates autoactivation of human cationic trypsinogen. *J. Biol. Chem.* 2006 Apr 28;281(17):11879-11886.
3. Szmola R, Sahin-Tóth M. Chymotrypsin C (caldecrin) promotes degradation of human cationic trypsin: identity with Rinderknecht's enzyme Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007 Jul 3;104(27):11227-11232.
4. Mellanby J, Woolley VJ. The ferments of the pancreas: Part I. The generation of trypsin from trypsinogen by enterokinase. *J. Physiol. (Lond.)*. 1912 Dec 9;45(5):370-388.
5. Rinderknecht H. Activation of pancreatic zymogens. Normal activation, premature intrapancreatic activation, protective mechanisms against inappropriate activation. *Dig. Dis. Sci.* 1986 Mar;31(3):314-321.
6. Whitcomb DC, Lowe ME. Human pancreatic digestive enzymes. *Dig. Dis. Sci.* 2007 Jan;52(1):1-17.
7. Sahin-Tóth M, Tóth M. Gain-of-function mutations associated with hereditary pancreatitis enhance autoactivation of human cationic trypsinogen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000 Nov 19;278(2):286-289.
8. Sahin-Tóth M. The pathobiochemistry of hereditary pancreatitis: studies on recombinant human cationic trypsinogen. *Pancreatology.* 2001;1(5):461-465.
9. Rosendahl J, Witt H, Szmola R, Bhatia E, Ozsvári B, Landt O, Schulz HU, Gress TM, Pfützer R, Löhr M, Kovacs P, Blüher M, Stumvoll M, Choudhuri G, Hegyi P, te Morsche RH, Drenth JP, Truninger K, Macek M Jr, Puhl G, Witt U, Schmidt H, Büning C, Ockenga J, Kage A, Groneberg DA, Nickel R, Berg T, Wiedenmann B, Bödeker H, Keim V, Mössner J, Teich N, Sahin-Tóth M. Chymotrypsin C (CTRC) variants that diminish activity or secretion are associated with chronic pancreatitis. *Nat. Genet.* 2008 Jan;40(1):78-82.
10. Szmola R, Sahin-Tóth M. Pancreatitis-associated chymotrypsinogen C (CTRC) mutant elicits endoplasmic reticulum stress in pancreatic acinar cells. *Gut.* 2010 Mar;59(3):365-372.
11. Kraut J. Serine proteases: structure and mechanism of catalysis. *Annu. Rev. Biochem.* 1977;46:331-358.
12. Neurath H. Proteolytic processing and physiological regulation. *Trends Biochem. Sci.* 1989 Jul;14(7):268-271.
13. Greene LJ, Pubols MH, Bartelt DC. Human pancreatic secretory trypsin inhibitor. *Meth. Enzymol.* 1976;45:813-825.

14. Sahin-Tóth M. Human mesotrypsin defies natural trypsin inhibitors: from passive resistance to active destruction. *Protein Pept. Lett.* 2005 Jul;12(5):457-464.
15. Szmola R, Kukor Z, Sahin-Tóth M. Human mesotrypsin is a unique digestive protease specialized for the degradation of trypsin inhibitors. *J. Biol. Chem.* 2003 Dec 5;278(49):48580-48589.
16. Nemoda Z, Sahin-Tóth M. The tetra-aspartate motif in the activation peptide of human cationic trypsinogen is essential for autoactivation control but not for enteropeptidase recognition. *J. Biol. Chem.* 2005 Aug 19;280(33):29645-29652.
17. Chen JM, Kukor Z, Le Maréchal C, Tóth M, Tsakiris L, Raguénès O, Férec C, Sahin-Tóth M. Evolution of trypsinogen activation peptides. *Mol. Biol. Evol.* 2003 Nov;20(11):1767-1777.
18. Kukor Z, Tóth M, Pál G, Sahin-Tóth M. Human cationic trypsinogen. Arg(117) is the reactive site of an inhibitory surface loop that controls spontaneous zymogen activation. *J. Biol. Chem.* 2002 Feb 22;277(8):6111-6117.
19. De Caro A, Figarella C, Guy O. The two human chymotrypsinogens. Purification and characterization. *Biochim. Biophys. Acta.* 1975 Feb 27;379(2):431-443.
20. Tomomura A, Akiyama M, Itoh H, Yoshino I, Tomomura M, Nishii Y, Noikura T, Saheki T. Molecular cloning and expression of human caldecrin. *FEBS Lett.* 1996 May 13;386(1):26-28.
21. Reseland JE, Larsen F, Solheim J, Eriksen JA, Hanssen LE, Prydz H. A novel human chymotrypsin-like digestive enzyme. *J. Biol. Chem.* 1997 Mar 21;272(12):8099-8104.
22. Folk JE, Cole PW. Chymotrypsin C. II. Enzymatic specificity toward several polypeptides. *J. Biol. Chem.* 1965 Jan;240:193-197.
23. Iio-Akama K, Sasamoto H, Miyazawa K, Miura S, Tobita T. Active forms of chymotrypsin C isolated from autolyzed porcine pancreas glands. *Biochim. Biophys. Acta.* 1985 Oct 4;831(2):249-256.
24. Zhou J, Sahin-Tóth M. Chymotrypsin C (CTRC) mutations in chronic pancreatitis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2011 Aug;26(8):1238-46.
25. Szepessy E, Sahin-Tóth M. Inactivity of recombinant ELA2B provides a new example of evolutionary elastase silencing in humans. *Pancreatology.* 2006;6(1-2):117-122.
26. Catasús L, Villegas V, Pascual R, Avilés FX, Wicker-Planquart C, Puigserver A. cDNA cloning and sequence analysis of human pancreatic procarboxypeptidase A1. *Biochem. J.* 1992 Oct 1;287 ( Pt 1):299-303.
27. Catasús L, Vendrell J, Avilés FX, Carreira S, Puigserver A, Billeter M. The sequence and conformation of human pancreatic procarboxypeptidase A2. cDNA cloning, sequence analysis, and three-dimensional model. *J. Biol. Chem.* 1995 Mar 24;270(12):6651-6657.



28. Aloy P, Catasús L, Villegas V, Reverter D, Vendrell J, Avilés FX. Comparative analysis of the sequences and three-dimensional models of human procarboxypeptidases A1, A2 and B. *Biol. Chem.* 1998 Feb;379(2):149-155.
29. Avilés FX, Vendrell J, Guasch A, Coll M, Huber R. Advances in metallo-procarboxypeptidases. Emerging details on the inhibition mechanism and on the activation process. *Eur. J. Biochem.* 1993 Feb 1;211(3):381-389.
30. Vendrell J, Querol E, Avilés FX. Metalloprocarboxypeptidases and their protein inhibitors. Structure, function and biomedical properties. *Biochim. Biophys. Acta.* 2000 Mar 7;1477(1-2):284-298.
31. Kerfelec B, Chapus C, Puigserver A. Existence of ternary complexes of procarboxypeptidase A in the pancreas of some ruminant species. *Eur. J. Biochem.* 1985 Sep 16;151(3):515-519.
32. Gomis-Rüth FX, Gómez M, Bode W, Huber R, Avilés FX. The three-dimensional structure of the native ternary complex of bovine pancreatic procarboxypeptidase A with proproteinase E and chymotrypsinogen C. *EMBO J.* 1995 Sep 15;14(18):4387-4394.
33. Moulard M, Kerfelec B, Mallet B, Chapus C. Identification of a procarboxypeptidase A-truncated protease E binary complex in human pancreatic juice. *FEBS Lett.* 1989 Jul 3;250(2):166-170.
34. Moulard M, Michon T, Kerfelec B, Chapus C. Further studies on the human pancreatic binary complexes involving procarboxypeptidase A. *FEBS Lett.* 1990 Feb 12;261(1):179-183.
35. KELLER PJ, COHEN E, NEURATH H. Procarboxypeptidase. II. Chromatographic isolation, further characterization, and activation. *J. Biol. Chem.* 1958 Feb;230(2):905-915.
36. Uren JR, Neurath H. Mechanism of activation of bovine procarboxypeptidase A S 5 . Alterations in primary and quaternary structure. *Biochemistry.* 1972 Nov 21;11(24):4483-4492.
37. Chapus C, Kerfelec B, Foglizzo E, Bonicel J. Further studies on the activation of bovine pancreatic procarboxypeptidase A by trypsin. *Eur. J. Biochem.* 1987 Jul 15;166(2):379-385.
38. Pascual R, Burgos FJ, Salva M, Soriano F, Mendez E, Aviles FX. Purification and properties of five different forms of human procarboxypeptidases. *Eur. J. Biochem.* 1989 Feb 15;179(3):609-616.
39. Vendrell J, Guasch A, Coll M, Villegas V, Billeter M, Wider G, Huber R, Wüthrich K, Avilés FX. Pancreatic procarboxypeptidases: their activation processes related to the structural features of the zymogens and activation segments. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* 1992 Jul;373(7):387-392.
40. Vendrell J, Cuchillo CM, Avilés FX. The tryptic activation pathway of monomeric procarboxypeptidase A. *J. Biol. Chem.* 1990 Apr 25;265(12):6949-6953.

41. Guasch A, Coll M, Avilés FX, Huber R. Three-dimensional structure of porcine pancreatic procarboxypeptidase A. A comparison of the A and B zymogens and their determinants for inhibition and activation. *J. Mol. Biol.* 1992 Mar 5;224(1):141-157.
42. Opezzo O, Ventura S, Bergman T, Vendrell J, Jörnvall H, Avilés FX. Procarboxypeptidase in rat pancreas. Overall characterization and comparison of the activation processes. *Eur. J. Biochem.* 1994 May 15;222(1):55-63.
43. Reverter D, Ventura S, Villegas V, Vendrell J, Avilés FX. Overexpression of human procarboxypeptidase A2 in *Pichia pastoris* and detailed characterization of its activation pathway. *J. Biol. Chem.* 1998 Feb 6;273(6):3535-3541.
44. Lacko AG, Neurath H. Studies on procarboxypeptidase A and carboxypeptidase A of the spiny pacific dogfish (*Squalus acanthias*). *Biochemistry.* 1970 Nov 24;9(24):4680-4690.
45. Kingsnorth A, O'Reilly D. Acute pancreatitis. *BMJ.* 2006 May 6;332(7549):1072-1076.
46. Steer ML, Waxman I, Freedman S. Chronic pancreatitis. *N. Engl. J. Med.* 1995 Jun 1;332(22):1482-1490.
47. Etemad B, Whitcomb DC. Chronic pancreatitis: diagnosis, classification, and new genetic developments. *Gastroenterology.* 2001 Feb;120(3):682-707.
48. Witt H, Apte MV, Keim V, Wilson JS. Chronic pancreatitis: challenges and advances in pathogenesis, genetics, diagnosis, and therapy. *Gastroenterology.* 2007 Apr;132(4):1557-1573.
49. Andriulli A, Botteri E, Almasio PL, Vantini I, Uomo G, Maisonneuve P. Smoking as a cofactor for causation of chronic pancreatitis: a meta-analysis. *Pancreas.* 2010 Nov;39(8):1205-1210.
50. Coté GA, Yadav D, Slivka A, Hawes RH, Anderson MA, Burton FR, Brand RE, Banks PA, Lewis MD, Disario JA, Gardner TB, Gelrud A, Amann ST, Baillie J, Money ME, O'Connell M, Whitcomb DC, Sherman S; North American Pancreatitis Study Group. Alcohol and smoking as risk factors in an epidemiology study of patients with chronic pancreatitis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2011 Mar;9(3):266-273.
51. Yadav D, Slivka A, Sherman S, Hawes RH, Anderson MA, Burton FR, Brand RE, Lewis MD, Gardner TB, Gelrud A, Disario J, Amann ST, Baillie J, Lawrence C, O'Connell M, Lowenfels AB, Banks PA, Whitcomb DC. Smoking is underrecognized as a risk factor for chronic pancreatitis. *Pancreatology.* 2010;10(6):713-719.
52. Comfort MW, Steinberg AG. Pedigree of a family with hereditary chronic relapsing pancreatitis. *Gastroenterology.* 1952 May;21(1):54-63.
53. Howes N, Lerch MM, Greenhalf W, Stocken DD, Ellis I, Simon P, Truninger K, Ammann R, Cavallini G, Charnley RM, Uomo G, Delhaye M, Spicak J, Drumm B,

- Jansen J, Mountford R, Whitcomb DC, Neoptolemos JP; European Registry of Hereditary Pancreatitis and Pancreatic Cancer (EUROPAC). Clinical and genetic characteristics of hereditary pancreatitis in Europe. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2004 Mar;2(3):252-261.
54. Keim V, Bauer N, Teich N, Simon P, Lerch MM, Mössner J. Clinical characterization of patients with hereditary pancreatitis and mutations in the cationic trypsinogen gene. *Am. J. Med.* 2001 Dec 1;111(8):622-626.
  55. Whitcomb DC, Gorry MC, Preston RA, Furey W, Sossenheimer MJ, Ulrich CD, Martin SP, Gates LK Jr, Amann ST, Toskes PP, Liddle R, McGrath K, Uomo G, Post JC, Ehrlich GD. Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nat. Genet.* 1996 Oct;14(2):141-145.
  56. Teich N, Rosendahl J, Tóth M, Mössner J, Sahin-Tóth M. Mutations of human cationic trypsinogen (PRSS1) and chronic pancreatitis. *Hum. Mutat.* 2006 Aug;27(8):721-730.
  57. Sahin-Tóth M. Human cationic trypsinogen. Role of Asn-21 in zymogen activation and implications in hereditary pancreatitis. *J. Biol. Chem.* 2000 Jul 28;275(30):22750-22755.
  58. Le Maréchal C, Masson E, Chen JM, Morel F, Ruszniewski P, Levy P, Férec C. Hereditary pancreatitis caused by triplication of the trypsinogen locus. *Nat. Genet.* 2006 Dec;38(12):1372-1374.
  59. Masson E, Le Maréchal C, Chandak GR, Lamoril J, Bezieau S, Mahurkar S, Bhaskar S, Reddy DN, Chen JM, Férec C. Trypsinogen copy number mutations in patients with idiopathic chronic pancreatitis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2008 Jan;6(1):82-88.
  60. Sahin-Tóth M, Hegyi P, Tóth M. [Genetic risk factors in chronic pancreatitis]. *Orv Hetil.* 2008 Sep 7;149(36):1683-1688.
  61. Sahin-Tóth M. Biochemical models of hereditary pancreatitis. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 2006 Jun;35(2):303-312, ix.
  62. Witt H, Sahin-Tóth M, Landt O, Chen JM, Kähne T, Drenth JP, Kukor Z, Szepessy E, Halangk W, Dahm S, Rohde K, Schulz HU, Le Maréchal C, Akar N, Ammann RW, Truninger K, Bargetzi M, Bhatia E, Castellani C, Cavestro GM, Cerny M, Destro-Bisol G, Spedini G, Eiberg H, Jansen JB, Koudova M, Rausova E, Macek M Jr, Malats N, Real FX, Menzel HJ, Moral P, Galavotti R, Pignatti PF, Rickards O, Spicak J, Zarnescu NO, Böck W, Gress TM, Friess H, Ockenga J, Schmidt H, Pfützer R, Löhr M, Simon P, Weiss FU, Lerch MM, Teich N, Keim V, Berg T, Wiedenmann B, Luck W, Groneberg DA, Becker M, Keil T, Kage A, Bernardova J, Braun M, Güldner C, Halangk J, Rosendahl J, Witt U, Treiber M, Nickel R, Férec C. A degradation-sensitive anionic trypsinogen (PRSS2) variant protects against chronic pancreatitis. *Nat. Genet.* 2006 Jun;38(6):668-673.
  63. Szilágyi L, Kénesi E, Katona G, Kaslik G, Juhász G, Gráf L. Comparative in vitro studies on native and recombinant human cationic trypsins. Cathepsin B is a

- possible pathological activator of trypsinogen in pancreatitis. *J. Biol. Chem.* 2001 Jul 6;276(27):24574-24580.
64. Teich N, Nemoda Z, Köhler H, Heinritz W, Mössner J, Keim V, Sahin-Tóth M. Gene conversion between functional trypsinogen genes PRSS1 and PRSS2 associated with chronic pancreatitis in a six-year-old girl. *Hum. Mutat.* 2005 Apr;25(4):343-347.
  65. Joergensen MT, Geisz A, Brusgaard K, Schaffalitzky de Muckadell OB, Hegyi P, Gerdes AM, Sahin-Tóth M. Intragenic duplication: a novel mutational mechanism in hereditary pancreatitis. *Pancreas.* 2011 May;40(4):540-546.
  66. Thrower EC, Diaz de Villalvilla APE, Kolodecik TR, Gorelick FS. Zymogen activation in a reconstituted pancreatic acinar cell system. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2006 May;290(5):G894-902.
  67. Kukor Z, Mayerle J, Krüger B, Tóth M, Steed PM, Halangk W, Lerch MM, Sahin-Tóth M. Presence of cathepsin B in the human pancreatic secretory pathway and its role in trypsinogen activation during hereditary pancreatitis. *J. Biol. Chem.* 2002 Jun 14;277(24):21389-21396.
  68. Kereszturi E, Sahin-Tóth M. Intracellular autoactivation of human cationic trypsinogen mutants causes reduced trypsinogen secretion and acinar cell death. *J. Biol. Chem.* 2009 Nov 27;284(48):33392-33399.
  69. Ji B, Gaiser S, Chen X, Ernst SA, Logsdon CD. Intracellular trypsin induces pancreatic acinar cell death but not NF-kappaB activation. *J. Biol. Chem.* 2009 Jun 26;284(26):17488-17498.
  70. Boulling A, Le Maréchal C, Trouvé P, Raguénès O, Chen J-M, Férec C. Functional analysis of pancreatitis-associated missense mutations in the pancreatic secretory trypsin inhibitor (SPINK1) gene. *Eur. J. Hum. Genet.* 2007 Sep;15(9):936-942.
  71. Chen JM, Mercier B, Audrezet MP, Férec C. Mutational analysis of the human pancreatic secretory trypsin inhibitor (PSTI) gene in hereditary and sporadic chronic pancreatitis. *J. Med. Genet.* 2000 Jan;37(1):67-69.
  72. Pfützer RH, Barmada MM, Brunskill AP, Finch R, Hart PS, Neoptolemos J, Furey WF, Whitcomb DC. SPINK1/PSTI polymorphisms act as disease modifiers in familial and idiopathic chronic pancreatitis. *Gastroenterology.* 2000 Sep;119(3):615-623.
  73. Witt H, Luck W, Hennies HC, Classen M, Kage A, Lass U, Landt O, Becker M. Mutations in the gene encoding the serine protease inhibitor, Kazal type 1 are associated with chronic pancreatitis. *Nat. Genet.* 2000 Jun;25(2):213-216.
  74. Király O, Boulling A, Witt H, Le Maréchal C, Chen JM, Rosendahl J, Battaglia C, Wartmann T, Sahin-Tóth M, Férec C. Signal peptide variants that impair secretion of pancreatic secretory trypsin inhibitor (SPINK1) cause autosomal dominant hereditary pancreatitis. *Hum. Mutat.* 2007 May;28(5):469-476.

75. Király O, Wartmann T, Sahin-Tóth M. Missense mutations in pancreatic secretory trypsin inhibitor (SPINK1) cause intracellular retention and degradation. *Gut*. 2007 Oct;56(10):1433-1438.
76. Masson E, Chen J-M, Scotet V, Le Maréchal C, Férec C. Association of rare chymotrypsinogen C (CTRC) gene variations in patients with idiopathic chronic pancreatitis. *Hum. Genet.* 2008 Feb;123(1):83-91.
77. Chakrabarti A, Chen AW, Varner JD. A review of the mammalian unfolded protein response. *Biotechnol Bioeng.* 2011 Dec;108(12):2777-93.
78. Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep.* 2006 Sep;7(9):880-885.
79. Tabas I, Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat. Cell Biol.* 2011 Mar;13(3):184-190.
80. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007 Jul;8(7):519-529.
81. Dudek J, Benedix J, Cappel S, Greiner M, Jalal C, Müller L, Zimmermann R. Functions and pathologies of BiP and its interaction partners. *Cell. Mol. Life Sci.* 2009 May;66(9):1556-1569.
82. Lee AS. The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. *Methods.* 2005 Apr;35(4):373-381.
83. Kubisch CH, Sans MD, Arumugam T, Ernst SA, Williams JA, Logsdon CD. Early activation of endoplasmic reticulum stress is associated with arginine-induced acute pancreatitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2006 Aug;291(2):G238-245.
84. Kubisch CH, Logsdon CD. Secretagogues differentially activate endoplasmic reticulum stress responses in pancreatic acinar cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2007 Jun;292(6):G1804-1812.
85. Helenius A, Aebi M. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science.* 2001 Mar 23;291(5512):2364-2369.
86. Bause E. Structural requirements of N-glycosylation of proteins. Studies with proline peptides as conformational probes. *Biochem. J.* 1983 Feb 1;209(2):331-336.
87. Imperiali B, Rickert KW. Conformational implications of asparagine-linked glycosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1995 Jan 3;92(1):97-101.
88. Imperiali B, Hendrickson TL. Asparagine-linked glycosylation: specificity and function of oligosaccharyl transferase. *Bioorg. Med. Chem.* 1995 Dec;3(12):1565-1578.
89. Lederkremer GZ. Glycoprotein folding, quality control and ER-associated degradation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2009 Oct;19(5):515-523.

90. Schrag JD, Procopio DO, Cygler M, Thomas DY, Bergeron JJM. Lectin control of protein folding and sorting in the secretory pathway. *Trends Biochem. Sci.* 2003 Jan;28(1):49-57.
91. Helenius A, Aebi M. Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Biochem.* 2004;73:1019-1049.
92. Skropeta D. The effect of individual N-glycans on enzyme activity. *Bioorg. Med. Chem.* 2009 Apr 1;17(7):2645-2653.
93. Gomis-Rüth FX, Gómez-Ortiz M, Vendrell J, Ventura S, Bode W, Huber R, Avilés FX. Crystal structure of an oligomer of proteolytic zymogens: detailed conformational analysis of the bovine ternary complex and implications for their activation. *J. Mol. Biol.* 1997 Jun 27;269(5):861-880.
94. Zhu A, Wang ZK, Beavis R. Structural studies of alpha-N-acetylgalactosaminidase: effect of glycosylation on the level of expression, secretion efficiency, and enzyme activity. *Arch. Biochem. Biophys.* 1998 Apr 1;352(1):1-8.
95. McKinnon TA, Goode EC, Birdsey GM, Nowak AA, Chan AC, Lane DA, Laffan MA. Specific N-linked glycosylation sites modulate synthesis and secretion of von Willebrand factor. *Blood.* 2010 Jul 29;116(4):640-648.
96. Miller GC, Long CJ, Bojilova ED, Marchadier D, Badellino KO, Blanchard N, Fuki IV, Glick JM, Rader DJ. Role of N-linked glycosylation in the secretion and activity of endothelial lipase. *J. Lipid Res.* 2004 Nov;45(11):2080-2087.
97. Wölle J, Jansen H, Smith LC, Chan L. Functional role of N-linked glycosylation in human hepatic lipase: asparagine-56 is important for both enzyme activity and secretion. *J. Lipid Res.* 1993 Dec;34(12):2169-2176.
98. Shental-Bechor D, Levy Y. Folding of glycoproteins: toward understanding the biophysics of the glycosylation code. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2009 Oct;19(5):524-533.
99. Imperiali B, O'Connor SE. Effect of N-linked glycosylation on glycopeptide and glycoprotein structure. *Curr Opin Chem Biol.* 1999 Dec;3(6):643-649.
100. Pagán M, Solá RJ, Griebenow K. On the role of protein structural dynamics in the catalytic activity and thermostability of serine protease subtilisin Carlsberg. *Biotechnol. Bioeng.* 2009 May 1;103(1):77-84.
101. Solá RJ, Rodríguez-Martínez JA, Griebenow K. Modulation of protein biophysical properties by chemical glycosylation: biochemical insights and biomedical implications. *Cell. Mol. Life Sci.* 2007 Aug;64(16):2133-2152.
102. Somera AF, Pereira MG, Souza Guimarães LH, Polizeli Mde L, Terenzi HF, Melo Furriel RP, Jorge JA. Effect of glycosylation on the biochemical properties of beta-xylosidases from *Aspergillus versicolor*. *J. Microbiol.* 2009 Jun;47(3):270-276.
103. Yamashita K, Hara-Kuge S, Ohkura T. Intracellular lectins associated with N-linked glycoprotein traffic. *Biochim. Biophys. Acta.* 1999 Dec 6;1473(1):147-160.

104. Maattanen P, Kozlov G, Gehring K, Thomas DY. ERp57 and PDI: multifunctional protein disulfide isomerases with similar domain architectures but differing substrate-partner associations. *Biochem. Cell Biol.* 2006 Dec;84(6):881-889.
105. Cabral CM, Liu Y, Sifers RN. Dissecting glycoprotein quality control in the secretory pathway. *Trends Biochem. Sci.* 2001 Oct;26(10):619-624.
106. Cameron PH, Chevet E, Pluquet O, Thomas DY, Bergeron JJM. Calnexin phosphorylation attenuates the release of partially misfolded alpha1-antitrypsin to the secretory pathway. *J. Biol. Chem.* 2009 Dec 11;284(50):34570-34579.
107. Pham VT, Ewing E, Kaplan H, Choma C, Hefford MA. Glycation improves the thermostability of trypsin and chymotrypsin. *Biotechnol. Bioeng.* 2008 Oct 15;101(3):452-459.
108. Jaenicke R. Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions. *Eur. J. Biochem.* 1991 Dec 18;202(3):715-728.
109. Wang C, Eufemi M, Turano C, Giartosio A. Influence of the carbohydrate moiety on the stability of glycoproteins. *Biochemistry.* 1996 Jun 11;35(23):7299-7307.
110. Rudd PM, Elliott T, Cresswell P, Wilson IA, Dwek RA. Glycosylation and the immune system. *Science.* 2001 Mar 23;291(5512):2370-2376.
111. Nagai K, Ihara Y, Wada Y, Taniguchi N. N-glycosylation is requisite for the enzyme activity and Golgi retention of N-acetylglucosaminyltransferase III. *Glycobiology.* 1997 Sep;7(6):769-776.
112. O K, Hill JS, Wang X, McLeod R, Pritchard PH. Lecithin:cholesterol acyltransferase: role of N-linked glycosylation in enzyme function. *Biochem. J.* 1993 Sep 15;294 ( Pt 3):879-884.
113. Peelman F, Vinaimont N, Verhee A, Vanloo B, Verschelde JL, Labeur C, Seguret-Mace S, Duverger N, Hutchinson G, Vandekerckhove J, Tavernier J, Rosseneu M. A proposed architecture for lecithin cholesterol acyl transferase (LCAT): identification of the catalytic triad and molecular modeling. *Protein Sci.* 1998 Mar;7(3):587-599.
114. Skropeta D, Settasatian C, McMahon MR, Shearston K, Caiazza D, McGrath KC, Jin W, Rader DJ, Barter PJ, Rye KA. N-Glycosylation regulates endothelial lipase-mediated phospholipid hydrolysis in apoE- and apoA-I-containing high density lipoproteins. *J. Lipid Res.* 2007 Sep;48(9):2047-2057.
115. O K, Hill JS, Pritchard PH. Role of N-linked glycosylation of lecithin:cholesterol acyltransferase in lipoprotein substrate specificity. *Biochim. Biophys. Acta.* 1995 Jan 20;1254(2):193-197.
116. Francone OL, Evangelista L, Fielding CJ. Lecithin-cholesterol acyltransferase: effects of mutagenesis at N-linked oligosaccharide attachment sites on acyl acceptor specificity. *Biochim. Biophys. Acta.* 1993 Feb 24;1166(2-3):301-304.

117. Miller KR, Wang J, Sorci-Thomas M, Anderson RA, Parks JS. Glycosylation structure and enzyme activity of lecithin:cholesterol acyltransferase from human plasma, HepG2 cells, and baculoviral and Chinese hamster ovary cell expression systems. *J. Lipid Res.* 1996 Mar;37(3):551-561.
118. Takacs Z, Wilhelmsen KC, Sorota S. Snake alpha-neurotoxin binding site on the Egyptian cobra (*Naja haje*) nicotinic acetylcholine receptor is conserved. *Mol. Biol. Evol.* 2001 Sep;18(9):1800-1809.
119. Takahashi M, Yokoe S, Asahi M, Lee SH, Li W, Osumi D, Miyoshi E, Taniguchi N. N-glycan of ErbB family plays a crucial role in dimer formation and tumor promotion. *Biochim. Biophys. Acta.* 2008 Mar;1780(3):520-524.
120. Zhao H, Sun L, Wang L, Xu Z, Zhou F, Su J, Jin J, Yang Y, Hu Y, Zha X. N-glycosylation at Asn residues 554 and 566 of E-cadherin affects cell cycle progression through extracellular signal-regulated protein kinase signaling pathway. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai).* 2008 Feb;40(2):140-148.
121. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 1977 Jul;36(1):59-74.
122. Lebkowski JS, Clancy S, Calos MP. Simian virus 40 replication in adenovirus-transformed human cells antagonizes gene expression. *Nature.* 1985 Sep 12;317(6033):169-171.
123. Logsdon CD, Moessner J, Williams JA, Goldfine ID. Glucocorticoids increase amylase mRNA levels, secretory organelles, and secretion in pancreatic acinar AR42J cells. *J. Cell Biol.* 1985 Apr;100(4):1200-1208.
124. Henning S, Peter-Katalinić J, Pohlentz G. Structure analysis of N-glycoproteins. *Methods Mol. Biol.* 2009;492:181-200.
125. Maley F, Trimble RB, Tarentino AL, Plummer TH Jr. Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases. *Anal. Biochem.* 1989 Aug 1;180(2):195-204.
126. Chang VT, Crispin M, Aricescu AR, Harvey DJ, Nettleship JE, Fennelly JA, Yu C, Boles KS, Evans EJ, Stuart DI, Dwek RA, Jones EY, Owens RJ, Davis SJ. Glycoprotein structural genomics: solving the glycosylation problem. *Structure.* 2007 Mar;15(3):267-273.
127. Chung CH, Ives HE, Almeda S, Goldberg AL. Purification from *Escherichia coli* of a periplasmic protein that is a potent inhibitor of pancreatic proteases. *J. Biol. Chem.* 1983 Sep 25;258(18):11032-11038.
128. Lengyel Z, Pál G, Sahin-Tóth M. Affinity purification of recombinant trypsinogen using immobilized ecotin. *Protein Expr. Purif.* 1998 Mar;12(2):291-294.
129. Pál G, Sprengel G, Patthy A, Gráf L. Alteration of the specificity of ecotin, an *E. coli* serine proteinase inhibitor, by site directed mutagenesis. *FEBS Lett.* 1994 Mar 28;342(1):57-60.



130. Neu HC, Heppel LA. The release of enzymes from *Escherichia coli* by osmotic shock and during the formation of spheroplasts. *J. Biol. Chem.* 1965 Sep;240(9):3685-3692.
131. 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 Jun 24;286(25):22535-45.
132. Peterson LM, Sokolovsky M, Vallee BL. Purification and crystallization of human carboxypeptidase A. *Biochemistry.* 1976 Jun 15;15(12):2501-2508.
133. Laethem RM, Blumenkopf TA, Cory M, Elwell L, Moxham CP, Ray PH, Walton LM, Smith GK. Expression and characterization of human pancreatic procarboxypeptidase A1 and procarboxypeptidase A2. *Arch. Biochem. Biophys.* 1996 Aug 1;332(1):8-18.
134. Reverter D, García-Sáez I, Catasús L, Vendrell J, Coll M, Avilés FX. Characterisation and preliminary X-ray diffraction analysis of human pancreatic procarboxypeptidase A2. *FEBS Lett.* 1997 Dec 22;420(1):7-10.
135. Määttänen P, Gehring K, Bergeron JJM, Thomas DY. Protein quality control in the ER: the recognition of misfolded proteins. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2010 Jul;21(5):500-511.
136. Gomis-Rüth FX, Gómez M, Bode W, Huber R, Avilés FX. The three-dimensional structure of the native ternary complex of bovine pancreatic procarboxypeptidase A with proproteinase E and chymotrypsinogen C. *EMBO J.* 1995 Sep 15;14(18):4387-4394.
137. Villegas V, Vendrell J, Avilés X. The activation pathway of procarboxypeptidase B from porcine pancreas: participation of the active enzyme in the proteolytic processing. *Protein Sci.* 1995 Sep;4(9):1792-1800.
138. Brown JR, Cox DJ, Greenshields RN, Walsh KA, Yamasaky M, Neurath H. The chemical structure and enzymatic functions of bovine procarboxypeptidase A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1961 Oct 15;47:1554-1560.
139. Baines AC, Zhang B. Receptor-mediated protein transport in the early secretory pathway. *Trends Biochem. Sci.* 2007 Aug;32(8):381-388.
140. Glozman R, Okiyonedo T, Mulvihill CM, Rini JM, Barriere H, Lukacs GL. N-glycans are direct determinants of CFTR folding and stability in secretory and endocytic membrane traffic. *J. Cell Biol.* 2009 Mar 23;184(6):847-862.
141. Bieberich E, Tencomnao T, Kapitonov D, Yu RK. Effect of N-glycosylation on turnover and subcellular distribution of N-acetylgalactosaminyltransferase I and sialyltransferase II in neuroblastoma cells. *J. Neurochem.* 2000 Jun;74(6):2359-2364.

142. Furuhashi M, Suganuma N. Effect of additional N-glycosylation signal in the N-terminal region on intracellular function of the human gonadotropin alpha-subunit. *Endocr. J.* 2003 Jun;50(3):245-253.
143. Xu Y, Bartido S, Setaluri V, Qin J, Yang G, Houghton AN. Diverse roles of conserved asparagine-linked glycan sites on tyrosinase family glycoproteins. *Exp. Cell Res.* 2001 Jul 1;267(1):115-125.
144. Molinari M, Helenius A. Chaperone selection during glycoprotein translocation into the endoplasmic reticulum. *Science.* 2000 Apr 14;288(5464):331-333.
145. Hide WA, Chan L, Li WH. Structure and evolution of the lipase superfamily. *J. Lipid Res.* 1992 Feb;33(2):167-178.
146. Shimizu M, Suzuki S, Horikoshi M, Hara A, Dickhoff WW. Circulating salmon 41-kDa insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) is not IGFBP-3 but an IGFBP-2 subtype. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2011 May 1;171(3):326-331.
147. Kobata A. A journey to the world of glycobiology. *Glycoconj. J.* 2000 Sep;17(7-9):443-464.
148. Jenkins N, Parekh RB, James DC. Getting the glycosylation right: implications for the biotechnology industry. *Nat. Biotechnol.* 1996 Aug;14(8):975-981.
149. Schwarzer J, Rapp E, Hennig R, Genzel Y, Jordan I, Sandig V, Reichl U. Glycan analysis in cell culture-based influenza vaccine production: influence of host cell line and virus strain on the glycosylation pattern of viral hemagglutinin. *Vaccine.* 2009 Jul 9;27(32):4325-4336.
150. Sekijima Y, Wiseman RL, Matteson J, Hammarström P, Miller SR, Sawkar AR, Balch WE, Kelly JW. The biological and chemical basis for tissue-selective amyloid disease. *Cell.* 2005 Apr 8;121(1):73-85.

## 14 SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### Az értekezés anyagát képező közlemények

**Bence M**, Sahin-Toth M. Asparagine-linked glycosylation of human chymotrypsin C (CTRC) is required for folding and secretion but not for enzyme activity.

FEBS J. 2011 278:(22) pp. 4338-4350. (IF: 3,129)

Szmola R\*, **Bence M\***, Carpentieri A, Szabó A, Costello CE, Samuelson J, Sahin-Tóth M. Chymotrypsin C is a co-activator of human pancreatic procarboxypeptidases A1 and A2. J. Biol. Chem. 2011 Jan 21;286(3):1819-27 (IF: 5,328) \* megosztott elsőszervezők

### Az értekezés témájához nem kapcsolódó közlemények

**Bence M**, Koller J, Sasvari-Szekely M, Keszler G. Modulation of monoaminergic neurotransmission by inhibition of histone deacetylases.

J Neural Transm. 2012;119:17-24. (IF: 2,597)

**Bence M**, Kereszturi E, Mozes V, Sasvari-Szekely M, Keszler G. Hypoxia-induced transcription of dopamine D3 and D4 receptors in human neuroblastoma and astrocytoma cells. BMC Neurosci. 2009 Aug 4;10:92. (IF: 2,744)

Mózes V, **Bence M**, Sasvári-Székely M, Keszler G. Dopamine D4 receptor hypoxia sensitivity and child psychiatric disorders. Neuropsychopharmacol Hung. 2010 Mar 12(1):289-93. (IF:0,0)

## 15 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom Prof. Mandl Józsefnek, Intézetünk igazgatójának, hogy tanulmányaimat a Pathobiokémia doktori programban folytathattam és az általa vezetett intézetben dolgozhattam.

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, Prof. Sahin-Tóth Miklósnak, hogy tézismunkámat laboratóriumában végezhettem és szakmai tanácsaira, ötleteire mindvégig számíthattam.

Köszönöm Prof. Sasvári Máriának, amiért PhD-hallgatóként irányítása alatt kezdhettem meg doktoranduszi munkámat. Laboratóriumában számos új módszerrel készséggel és tapasztalattal gazdagodhattam, amelyek nagy mértékben hozzájárultak további kutatómunkám sikeréhez.

Szeretném megköszönni Dr. Keszler Gergelynek, amiért ötleteivel, tanácsaival segítette a Sasvári-laboratóriumban végzett munkámat. Hálával tartozom önzetlen segítségéért, támogatásáért és barátságáért.

Köszönettel tartozom Dr. Kereszturi Évának és Dr. Rónai Zsoltnak, amiért tapasztalataikkal és gyakorlati tanácsaikkal rengeteg segítséget nyújtottak a kísérletek kivitelezésében a Sasvári-laboratóriumban illetve a Sahin-Tóth-laboratóriumban végzett munkám során egyaránt. Továbbá szeretném megköszönni barátságukat és hogy a bostoni tanulmányút elején számtalan nehézségen segítettek át.

Szeretném megköszönni a Sahin-Tóth-laboratórium volt és jelenlegi tagjainak: Dr. Sebastian Beer-nek, Geisz Andreának, Dr. Németh Balázsnak, Sahin-Tóth Verának, Schnúr Andreának, Dr. Szabó Andrásnak, Dr. Szmola Richárdnak és Dr. Jiayi Zhou-nak szakmai segítségüket és barátságukat.

Köszönettel tartozom a Sasvári-laboratórium valamennyi eddig nem említett tagjának: Abdul Rahman Omarnak, Dr. Barta Csabának, Garai Cintióának, Héjjas Krisztinának, Dr. Nagy Rékának, Dr. Nemoda Zsófiának, Dr. Szántai Eszternek, Dr. Szpaszokukockaja Tatjánának és Virga Sándornének, hogy segítségükre mindig számíthattam és hogy mindvégig kellemes légkörben dolgozhattam.