

2004. évi OTKA zárójelentés:
OTKA nyilvántartási szám: T037568

Vezető kutató: Szilágyi László

Részletes szakmai beszámoló

Bevezetés

Jelen pályázat megírásának idejében, 2001-ben, nagyon keveset tudtunk a humán tripszinogén 4-ről. Ismert volt, hogy génje (jelenlegi elnevezése PRSS3), a 9. kromoszómán található, ellentétben a többi tripszin génnel, melyek a 7. kromoszómán vannak (Rowen és *mtsi.*, 1996). Alternatív RNS splicing következtében kétféle mRNS szintetizálódik a génről, egyik a pankréaszban expresszálódik és fehérje terméke a mezotripszinogén, a másikat az agyban találták meg, ennek feltételezett fehérje termékét nevezték tripszinogén 4-nek. A mezotripszinogén aktivált formáját már a nyolcvanas években izolálták hasnyálból, és megállapították, hogy eltérően a többi tripszintől, nem gátolható a kanonikus proteáz inhibitorokkal (Rinderknecht és *mtsi.*, 1984). Az „agyi” fehérjét akkor még nem izolálták, erre a pályázatunk keretén belül került sor. Az azonban már 2001-ben is ismert volt az mRNS szekvenciák alapján, hogy a mezotripszinogén és a tripszinogén 4 aktív formája azonos, a két fehérje csak a különböző első exon által kódolt prepro-szekvenciában tér el egymástól. Az aktív formát mezotripszinnek és tripszin 4-nek is nevezhetjük, a továbbiakban a tripszin 4 elnevezést használom.

A tripszin 4 aminosav szekvenciáját összevetve ismert tripszinekével, feltűnő egy jellegzetes különbség, a tripszin 4 a 193-as pozícióban arginint tartalmaz, míg ezen a helyen a tripszinekben abszolút konzervált glicin található. Mivel a 193-as glicin amido hidrogénje a tripszin katalitikus mechanizmusában esszenciális szerepet játszik, része a hidrolízis során átmenetileg kialakuló tetraédes intermediert stabilizáló u.n. oxianion üregnek, érdekesnek látszott a glicin→arginin mutáció hatásainak vizsgálata. Ez a feladat a rekombináns fehérje előállításával is megoldható. Ugyanakkor érdekes kérdéseket vet fel a mRNS jelenléte az agyszövetben. Expresszálódik-e és ha igen milyen formában a fehérje az agyban, stb. Ezért a pályázat alapvető célkitűzései a következők voltak:

A tervezett munka során, az eddigi biokémiai tapasztalataink és előkísérleteink alapján, tervezzük a humán tripszin 4 kristályszerkezetének meghatározását, valamint a speciális agyi első exonnal rendelkező gén klónozását és a fehérje heterológ expresszióját és enzimátikus jellemzését. Megkíséreljük a humán tripszin 4 aktív, illetve zimogén formájának az izolálását humán agyszövetből.

Az újonnan kifejlesztett proteomikai módszerek segítségével azonosítani kívánjuk az agyszövetben a humán tripszin 4 potenciális szubsztrátjait. Vizsgálni fogjuk azt is, hogy a e szubsztrátok között vannak-e más proteázok zimogén formái, vagyis részt vesz-e a humán tripszin 4 proteáz aktivációs kaszkádokban. Ugyanakkor a természetes inhibitorok jelenlétét is ellenőrizni kívánjuk. A szubsztrátok és inhibitorok azonosítása 2D elektroforézis és tömegspektroszkópia segítségével történik. Tervezzük, hogy néhány agyi proteáz (kallikrein 6, kallikrein 11, memapszin) génjét klónozzuk, és közvetlenül meghatározzuk, képes-e a humán tripszin 4 ezeket aktiválni. A természetes szubsztrát és inhibitor kutatást el fogjuk végezni normál és kóros agyszöveti mintákban.

A pályázat megírása óta néhány fontos eredmény publikálására került sor. A genomi szekvenciák alapos elemzése rávilágított a PRSS3 gén kialakulásának mechanizmusára. Ma már tudjuk, hogy a tripszin 4 kódoló szekvenciájának a 7.-ről a 9. kromoszómára történő áthelyeződésével egyidejűleg a 11. kromoszómáról egy eddig ismeretlen funkciójú, valószínűleg membrán fehérje nem-kódoló első exonja is átkerült a 9. kromoszómára. Ebből a szakaszból lett a PRSS3 gén első exonja. Ez a párhuzamos duplikáció kizárólag a főemlősökben történt meg (Rowen és *mtsi.*, 2005). Ez az analízis azonban továbbra sem

tisztázta a keletkező fehérje aminoterminális szerkezetét, ezért kutatásainkban erre a kérdésre nagy súlyt fektettünk.

Egy másik, a kutatásaink irányát jelentősen befolyásoló felismerés 2004-ből származik. (Cottrell és *mtsi.*, 2004) beszámoltak arról, hogy a tripszinogén 4 mRNS és a fehérje maga is megtalálható számos, epiteliális eredetű humán sejtvonalban. Jóllehet ennek a közleménynek a legfontosabb következtetését – a tripszin 4 a proteáz aktivált receptorok aktivátora – egy újabban megjelent közlemény kétségbe vonja, az mRNS és a fehérje jelenlétét *caco 2* sejtvonalban laboratóriumunkban is megerősítettük. Ez a felismerés alapvetően befolyásolta kutatásaink irányát. A pályázat megtervezésekor nagy nehézséget jelentett, hogy akkoriban egyedüli természetes forrásként csak az emberi agy jöhetett számba. Azt hiszem, ennek a következményeit nem érdemes részletezni.

További fontos eredményeket hoztak a gén microarray technikák. Kiderült, hogy számos tumorban (hólyag rák, nem kis-sejtes tüdő karcinóma) a PRSS3 gén expressziója drasztikusan csökken. A csökkenést a promóter régió hipermetilálásával magyarázzák. Az eredmények alapján a tripszinogén 4-et a tumor szuppresszor fehérjék közé sorolták (Marsit és *mtsi.*, 2005; Marsit és *mtsi.*, 2006). Egy másik közlemény azonban nem kis-sejtes tüdő karcinómában a tripszinogén 4 expresszió fokozódását írja le. Megfigyeléseik szerint a tumor metasztatizáló képessége korrelál a tripszinogén 4 expresszió szintjével (Diederichs és *mtsi.*, 2004).

A fentiek alapján olyan területre is kiterjesztettük vizsgálatainkat, amely nem szerepelt a pályázat célkitűzései között, nevezetesen az inhibitor tervezésre. Ameddig csak az emberi agy az egyedül kísérleti objektum, és semmit nem tudunk a fehérje funkciójáról, nem érdemes az inhibícióon gondolkodni. Az ismertett új eredmények, jóllehet nem mentesek az ellentmondásoktól sem, már elegendő indokot adtak az inhibitorok vizsgálatára.

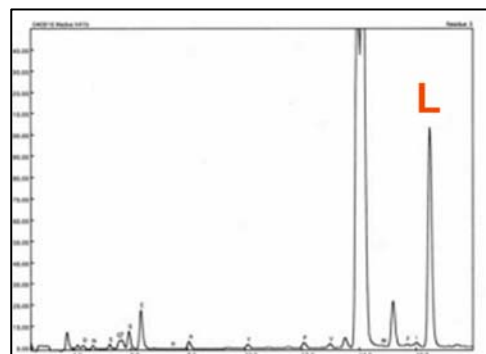
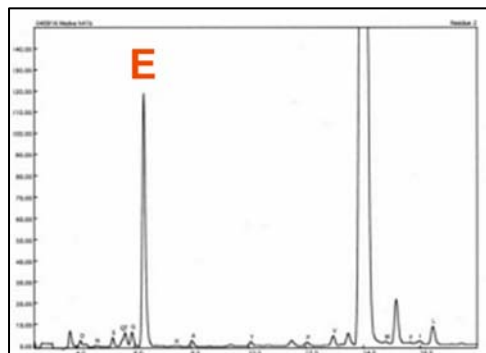
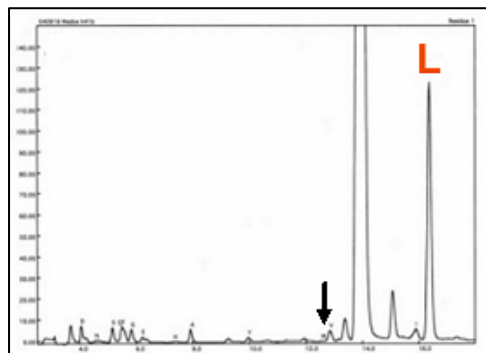
A tripszin(ogén) 4 szerkezetének vizsgálata (Katona és *mtsi* 2002)

Humán pankreatikus könyvtárból klónoztuk a tripszin 4 gént és bakteriális expressziós rendszerben kifejeztük a fehérjét. Megállapítottuk, hogy a tripszin 4 enzimaktivitása szintetikus kromogén szubsztrátokon mérve megegyezik az egyéb tripszinekével, ugyanakkor gyenge enzimnek bizonyult egyes fehérje szubsztrátokon, nem aktiválta például a tripszinogént és a kimotripszinogént.

A munka első fázisában meghatároztuk a tripszinogén 4 benzamidinnel képzett komplexének kristályszerkezetét. A kristályszerkezet alapján magyarázhatóak a tripszin 4 enzimaktivitási tulajdonságai. Az oxianion üreg geometriája a glicin→arginin csere ellenére is csak csekély mértékben torzul, ami egybevág azzal, hogy a tripszinogén 4 szintetikus kromogén szubsztrátokon mért enzimaktivitása nem különbözik jelentősen a többi tripszintől. A kristály szerkezetből ugyanakkor látható, hogy az Arg193 oldallánca jól definiált, nyújtott konformációban beleilleszkedik egy molekulafelszíni hasadékba, melyet két oldalról a Tyr151 és a His40 aromás gyűrűi határolnak. A hasadék alját a Phe41, Trp141 és Gly142 peptidgerinc képezi. A Tyr151 gyűrűje és a guanidino csoport delokalizált elektron rendszere között aromás-pozitív π kölcsönhatás alakul ki. Ezek a kölcsönhatások a molekula felszínéhez rögzítik az oldalláncot, megakadályozzák szabad rotációját. Ugyanakkor a 193-as pozícióban glicint tartalmazó tripszinek esetében a felszíni hasadék az S2' kötőhely része, a peptid láncban a hasadó kötés utáni második aminosav oldallánca itt képes kötődni az enzim felületéhez. Mivel ezt a helyet a tripszin 4-ben az arginin betölti, érthető, hogy gyengébben hasítja a természetes szubsztrátokat és kevésbé gátolható polipeptid típusú proteáz inhibitorokkal.

A tripszinogén 4 aminoterminális szekvenciája (kézirát közlésre beküldve)

Amint azt az előző jelentésben beszámoltunk róla, tripszinogén 4 ellen termelt monoklonális ellenanyag segítségével sikerült agyszövetből tripszinogén 4-et és tripszin 4-et izolálnunk. A tripszin enzimatis aktivitása és tömegspektrometriásan meghatározott molekulatömege alapján azonosítottuk. Ugyanakkor az aminosav szekvencia meghatározások, az akkoriban rendelkezésünkre álló fehérje csekély mennyisége miatt nem adtak egyértelmű eredményt. Azóta, a szövetfeltárási metodikák optimalizálásával sikerült elérni az, hogy ~50 g agyszövetből 40-60 µg fehérjét tudunk előállítani. Ez a mennyiség már elegendő volt kiváló minőségű szekvencia meghatározásra. A mellékelt 3 ábra egy mintegy 25 µg fehérjéből kiinduló szekvenálás első 3 ciklusában kapott kromatogramokat mutatjuk be. Valamennyi ciklusban egyértelmű a felszabaduló aminosav minősége. Az első ciklusban kizárólag leucint kaptunk. Az esetlegesen megjelenő metionint fekete nyíllal jelöltem. Az első hét ciklusban kapott aminosavak minőségét és mennyiségét az 1. Táblázatban foglaltam össze.



1. Táblázat

Immún affinitás kromatográfiával humán agyból izolált tripszinogén 4 amino terminális szekvenciája

ciklus #	aminosav	pikomól
1	leucin	980
2	glutaminsav	950
3	leucin	846
4	hisztidin	636
5	prolin	730
6	leucin	690
7	leucin	720

1. Ábra. 25 µg, humán agyszövetből izolált tripszinogén 4 amino terminális szekvenálásának első 3 ciklusában kapott kromatogramok (felülről lefelé).

Ebben a szekvenciában az 5' véghez legközelebb elhelyezkedő CTG triplet olyan szekvencia környezetben helyezkedik el, amely alkalmassá teheti arra, hogy iniciátor kodonként funkcionáljon. Az irodalomban számos olyan példa ismeretes, amikor nem ATG hanem GTC vagy CTG az iniciátor triplet. Néhány ilyen esetben kísérletesen is igazolták, hogy a nem-konvencionális iniciátor triplet hatására is metionin épül be a polipeptid lánc első aminosavaként (Becerra és *mtsi.*, 1985; Cigan és *mtsi.*, 1988; Peabody, 1989). Meg kell azonban jegyeznünk, hogy az a kezdő aminosav milyenségét egyelten esetben sem aminosav szekvenálással azonosították, hanem indirekt módon, általában a radioaktív metionin beépülésének kimutatásával igazolták. Mindazonáltal ezeknek a kísérleteknek az eredményeként általánossá vált az a gyakorlat, hogy azokban az esetekben, amikor bizonyított volt, hogy az iniciátor triplet nem ATG, a triplet szekvenciájától függetlenül azt a fehérje szekvenciában metioninként azonosították.

A tripszin 4 esetében a genomi szekvenciában az említett CTG-től 132 bázispárral 5' irányban található egy megfelelő leolvasási keretben lévő ATG. Mivel nem volt ismert a fehérje szekvenciája, de még megközelítő mérete sem, logikus volt feltételezni, hogy itt is elkezdődhet a fehérje szintézis.

A fenti gondolatmenetek alapján, teljesen bioinformatikai alapokon a Genescan program a PRSS3 gén alternatív első exonjának kifejeződésekor kétféle fehérje keletkezését jósolja, az *A izoforma* a 2.A Ábrán -44-es pozícióban lévő metioninnal kezdődik és így a tripszinogén propeptid előtt egy 72 aminosavból álló vezető (leader) szekvencia helyezkedik el. A *B izoforma* vezető szekvenciája csak 28 aminosav, de a predikció szerint itt is a metionin az amino terminális aminosav.

Kísérleteink azt mutatják, hogy az *A izoformának* megfelelő fehérjét nem sikerült izolálnunk agyszövetből. Ugyanakkor viszont az általunk kapott szekvencia megfelel a *B izoformának*, azzal a nem jelentéktelen különbséggel, hogy első aminosava leucin és nem metionin (2.B ábra).

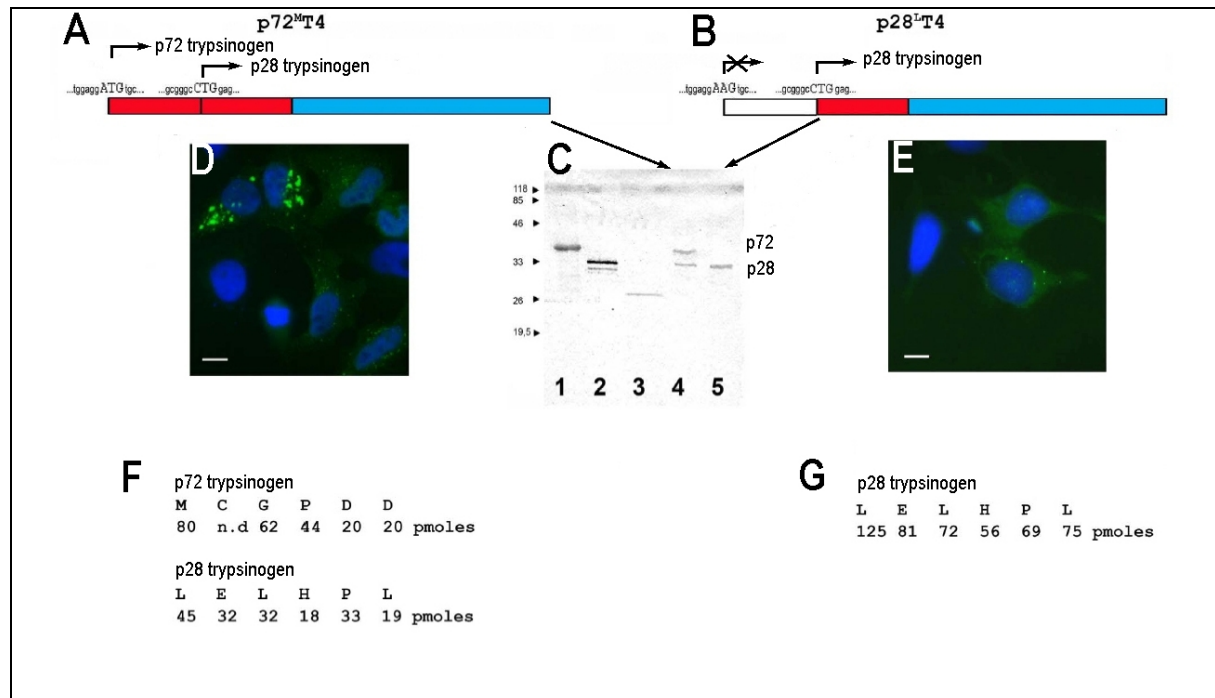
Eredményeink legtriviálisabb magyarázata az lehet, ha azt feltételezzük, hogy a kapott leucin amino terminálisú fehérje proteolitikus processzáls következtében keletkezett. A fehérje szintézis ebben az esetben a -44-es metioninnal kezdődne, de specifikus proteolitikus hasítással átalakul az általunk izolált formává. Ugyanakkor viszont nem sikerült az *A izoformának* megfelelő cDNS-t izolálnunk, de ez könnyen magyarázható azzal, hogy a humán agymintákkal dolgoztunk, ahol az mRNS lebomlása nagy valószínűséggel bekövetkezhet.

Kutatásainknak új irányt jelölt ki egy 2003-ban megjelent közlemény (Schwab és *mtsi.*, 2003), melyben arról számoltak be, hogy az MHC I által prezentált peptidek egy része nem a hagyományos proteolitikus processzáls útján keletkezik, hanem bizonyos gének 3' nem-transzlálódó régiójában található rövid ORF-ek kódolják ezeket az u.n. kriptikus peptideket. A közlemény összefoglalásának számunkra legfontosabb mondata: „*translation of this cryptic peptide occurs by a previously unknown mechanism that decodes the CUG initiation codon as leucine rather than the canonical methionine*”. A munkacsoport további közleményében részletesen tanulmányozzák ennek a nem-konvencionális transzláció iniciációs mechanizmusnak a körülményeit. Megállapították, hogy ez a fehérjeszintézis az eIF2-től független útvonalon történik (Schwab és *mtsi.*, 2004).

A fehérjeszintézis kezdetének tanulmányozására a pcDNA3 eukarióta expressziós vektorban különböző tripszin 4 konstrukciókat állítottunk elő. A konstrukciókkal humán HeLa és U87 glioblasztóma sejt vonalakat transzformáltunk. A pcDNA3 erős promóterrel (citomegalo vírus) rendelkezik, ami magas szintű fehérje expressziót biztosít. Jóllehet a pcDNA3 vektor rendelkezik antibiotikum rezisztencia génnel, kísérleteink jelenlegi fázisában ezt a lehetőséget nem használtuk ki, csak a tranziens expresszió hatásait vizsgáltuk.

A 3. Ábrán látható a vizsgálatainkhoz felhasznált első két konstrukció sémája. A pcDNA-p72^MT4 vektor tartalmazza a feltételezett *A izoforma* teljes kódoló szekvenciáját és

még 12 bázist 5' irányban az iniciátor ATG kodontól. Minthogy ilyen hosszúságú cDNS-t nem sikerült izolálnunk, ezt a szekvenciát a genomi DNS-ből nyertük ki polimeráz lánc reakció segítségével és fuzionáltuk a cDNS formában megkapott tripszinogén 4 kódoló szekvenciával. A pcDNA-p72^LT4 vektor ugyanezt a szekvenciát tartalmazza, azzal a különbséggel, hogy az iniciátor ATG tripletet AAG kodonná mutáltattuk. Ez a kodon lizint kódol, és biztosan nem képes a fehérjeszintézis iniciálására. A transzfektált sejteket 24 óra után fixáltuk, és az tripszinogén 4 vezető szekvencia ellen termelt monoklonális ellenanyaggal (mAB p28) immunfestést végeztünk.



3. Ábra. **A** és **B**: a transzekciós kísérletekben alkalmazott pcDNA3 alapú vektorok inzertjeinek sematikus ábrázolása. **C**: SDS-poliakrilamid gélelektroforézis; 1 oszlop: rekombináns p72-tripszinogén 4, 2. oszlop: rekombináns p28-tripszinogén 4, 3. oszlop: rekombináns tripszin 4, 4. oszlop: a pcDNA-p72^MT4 vektorral transzfektált sejtek extraktuma, 5. oszlop: a pcDNA-p72^LT4 vektorral transzfektált sejtek extraktuma. **D** és **E**: immunfluoreszcenciás felvételek, a tripszinogént p28 mAB antitesttel és fluoreszceinnel jelölt másodikkal, a sejtmagokat Draq5-tel festettük.

A 3.D és E Ábrán látható, hogy mind a két konstrukció képes tripszinogén 4 expresszió indukálására. A 3.C Ábrán látjuk, hogy a pcDNA-p72^MT4 vektor hatására (4. oszlop) két fehérje termelődik, melyeket p72-tripszinogénnek és p28-tripszinogénnek nevezünk. A p72-tripszinogén mobilitása megegyezik az *E. coli*-ban termelt rekombináns *A* izoformáéval (1. oszlop), míg a p28 tripszinogén együtt mozog a rekombináns *B* izoformáéval (2. oszlop). A pcDNA-p72^LT4 vektor, melyben elrontottuk a feltételezett *A* izoforma start kodonját, csak a p28-tripszinogén kódolására képes. A keletkezett fehérjék amino terminális szekvenciája a 3. Ábra F és G paneljében látható. A p72-tripszinogén a várható módon a -44-es metioninnal kezdődik, míg p28-tripszinogén amino terminális szekvenciája mind a két vektor esetében megegyezik azzal, amit az agyszövetből izolált tripszinogénél kaptunk.

További GFP-fúziós konstrukciók felhasználásával, melyeknek részletes ismertetésére itt helyhiány miatt nem térek ki, megerősítettük a fenti eredményeket.

Összefoglalva a kísérleteink eredményeit, megállapítottuk, hogy a **humán tripszinogén 4 vezető szekvenciájában +1 pozícióban lévő CTG kodon transzefektált HeLa és glioblasztóma sejtvonalakban alkalmas a fehérjeszintézis iniciálására, és ebben az esetben ez a kodon nem metionin, hanem leucin épül be a polipeptid lánc amino terminálására.** Tudomásunk szerint ez az első olyan munka, amely nem kis peptidek, hanem „normális” fehérje esetén bizonyítja a fehérje szintézisnek ezt az alternatív iniciálási lehetőségét. A közlemény kéziratát 2006 március 24-én elküldtük a PNAS-be.

Alternative translation initiation of trypsinogen 4 at a CUG codon with a leucine N-terminal amino acid: a possible means to regulate the expression of a curious protease in human brain

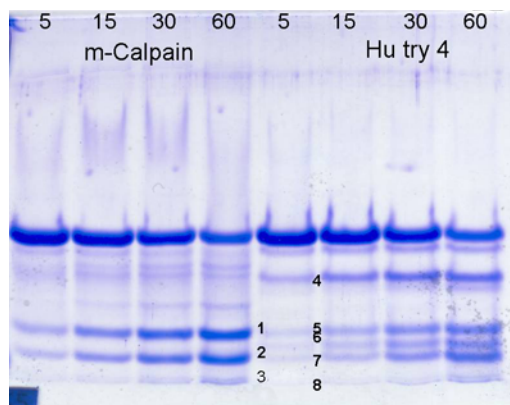
Attila L. Németh^{*1}, Péter Medveczky^{*1}, Júlia Tóth^{*}, Erika Siklódi^{*}, Katalin Schlett[‡], András Patthy[#], Miklós Palkovits^{##}, Judit Ovádi^{xx}, Natália Tőkési^{xx}, Péter Németh^{**}, László Szilágyi^{*}, and László Gráf^{##2}

Természetes szubsztrátok vizsgálata

A mielin bázikus fehérje (MBP), mint a humán tripszin 4 lehetséges természetes szubsztrátja (Medveczky és mtsi, 2006)

A tripszin 4 gliában való előfordulása, valamint az oligodendroglíanak a mielin hüvely processzálásában bizonyított szerepe indított bennünket arra, hogy összevegyük a MBP tripszin -gyel4, kalpainnal és pankreatikus humán tripszinnel való hasíthatóságát. A kalpainnal való hasítást az indokolta, hogy a kalpaint az idegsejt pathológiás demielinizációjával már korábban kapcsolatba hozták.

A 4. Ábrán az MBP3 (az egyik MBP izoforma) kalpainnal és tripszin 4-gyel végzett emésztéseit hasonlíthatjuk össze. A fragmensek és a hasadó kötések azonosítása céljából a 15 perces emésztményeket tömegspektrometriával analizáltuk, s elvégeztük a gélekről blottolt fehérjecsíkok egyenkénti N-terminális szekvencia analízisét is. Ezzel a kombinatív megoldással a MBP valamennyi elhasított kötése azonosítható volt (3. Táblázat, 4. ábra).



3. Táblázat

Tömegspektrometriával és N-terminális aminosav szekvenciaanalízissel azonosított MBP-fragmensek és proteáz hasítóhelyek

Kalpain sáv	Szekvencia	Molekulatömeg [Da]	Fragmens	Tripszin-4 sáv
1	HGFLP	15692	27	4
2	N-terminális	7841	1-71	5
3	(HGFLP)-ND	8010	27-98	5
4	TPPPSQ	7699	98	5
5	SDYKS	(4197)-ND	133	5
6	TPPPSQ	3541	98-132	5
7	SLPQK	3130	72-98	5
8	N-terminális	2979	1-26	5

*: Acetilált N-terminális
**.: Szekvenálással nem detektál
***.: MS-val nem detektál

4. Ábra. A MBP3 hasítása m-kalpainnal és tripszin 4-gyel. Az m-kalpain-MBP mólarány 1:50, a Hu4 tripszin-MBP mólarány 1:10 000 volt.

Vizsgálatainkból kitűnik, hogy a MBP (szubsztrát fogyás alapján becsült) azonos mértékű hasításához a kalpainnál 200-szor kevesebb tripszin 4-et kell használnunk. A két proteáznak egy közös hasítóhelye van, az Arg98-Thr99 peptidkötés, mely a többi hasadó kötéshez képest kiemelkedő sebességgel hasad el mind a kalpainnal, mind a tripszin 4-gyel. Elképzelésünk szerint ennek a mozzanatnak fontos szerepe lehet a *sclerosis multiplex*-et kísérő, vagy kiváltó autoimmunitás kialakulásában. A betegek agyfolyadékából izolált IgG domináns frakciója a mielin bázikus fehérje Arg98-Thr99 hasítóhelyétől N-terminális irányban elhelyezkedő peptidszakaszt ismeri fel.

Inhibitor tervezés és szintézis

Amint már a bevezetésben említettem, jóllehet az eredeti kutatási munkatervben nem szerepelt, a munkánk során erőfeszítéseket tettünk olyan inhibitorok kifejlesztésére, melyek specifikusan gátolják a tripszin-4-et. Az inhibitor keresés alapvető stratégiája az volt, hogy kiindulásként oligopeptid könyvtárakon meghatároztuk a tripszin 4 P12' és P2' specificitását.

A humán tripszin 4 specificitásának feltérképezésére irányuló vizsgálataink eredményei alapján mutációs kísérleteket végeztünk kisméretű, standard mechanizmusú, kanonikus inhibitorokkal. A választott inhibitorok a fenti inhibitor család „grasshopper” klánjába tartozó SGTI és SGTI (*Schistocerca Gregaria* Trypsin ill Chymotrypsin Inhibitor), melyeket néhány évvel ezelőtt izolált tanszéki munkacsoportunk sivatagi sáskából. Abból a feltevésből indultunk ki, hogy nagyspecificitású kanonikus proteáz inhibitorok tervezésénél felhasználható lesz a kompetitív oligopeptid szubsztrát könyvtárak analízisével kapott információ. Megfelelő módon tervezett oligopeptid keverék hasítását végeztük humán tripszin 4 tripszin 1, tripszin 2 és szarvasmarha tripszinnel. A P₁' kompetitív rendszerben valamennyi enzim a tripszinre jellemző, az irodalomból is ismert Met preferenciát mutatta. A humán 4 tripszin aktivitása nem különbözik nagyságrendileg a másik három enzimétől. Ebben az oligopeptid könyvtárban valamennyi enzim az amidált C-terminálisú peptideket részesítette előnyben.

A P₂' kompetitív rendszerben a humán tripszin 4 nem különbözteti meg számottevő mértékben az egyes komponenseket. A kisméretű P₂' Gly specificitást találtunk, ami arra utalhat, hogy az Arg193 oldallánc az enzim S₂' felszínét teljesen elfoglalva megakadályozza az aminosav oldalláncok dokkolódását. A humán tripszin 4 nem részesíti előnyben az amidált peptideket sem, míg a másik három enzim erőteljes preferenciát mutat az amidált C-terminálisú szubsztrátok irányába. Érdekes, hogy a miközben a humán tripszin 1 és 2, valamint a szarvasmarha tripszin előnyben részesítik a P₂' helyen előforduló hidrofób és a pozitív töltésű oldalláncokat, teljességgel elutasítják a P₂' Glu oldalláncot. Mivel a humán tripszin 4 ezt ugyanolyan mértékben tolerálja, mint az egyéb, a másik három enzim által elfogadott P₂' aminosavat, a humán tripszin 4-re specifikus peptidinhibitorok konstruálásakor szóba jöhet az Arg/Lys-Met-Glu, vagy egy ezzel analóg szerkezeti elem felhasználása.”

A savas oldallánc beépítésének finom tesztelését DAIPKMD és DAIPKME peptideken elvégezve, arra az eredményre jutottunk, hogy a P₂' Asp beépítése a szelektivitás szempontjából még kedvezőbb, mint a glutaminsavé. Ennek megfelelően az inhibitor molekulák mutációinak tervezésekor elsősorban a P₂' hatóhely változtatásától vártuk a szelektivitás megjelenését. A mindössze 35 aminosavból álló SGTI-t és SGCI-t, illetve ezek variánsait szilárd fázisú peptidszintézissel állítottuk elő. A molekulák alapszekvenciájából

kiindulva a P₂' pozíciójú aminosav változtatását mindkét molekula esetében a P₁', illetve az SGCI molekula esetében a P₁ aminosav cseréje kísérte. Eszerint mindkét molekula P₁' Lys aminosavát (ízeltlábú tripszin preferencia) metioninra (emlős tripszin preferencia, lásd fent) cseréltük, továbbá az SGCI P₁ Leu aminosava helyére arginint építettünk be. A P₂' oldallánc kiiktatásának (Gly beépítés), az oldallánc pozíció változásának (D-Ala beépítés), illetve a savas csoport (Asp beépítés) bevitelének a hatását vizsgáltuk. Az SGTI-SGCI molekulapár elkészített variánsait az 5. Ábrán mutatjuk be.

	P ₁ P ₁ ' P ₂ '
SGCI	EVTCEPGTTFKDKCNTCRCGSDGKSAACTLKACPQ
SGCI (RMD)	EVTCEPGTTFKDKCNTCRCGSDGKSAACTRMDCPQ
SGCI (RMA)	EVTCEPGTTFKDKCNTCRCGSDGKSAACTRMACPQ
SGCI (RMa)	EVTCEPGTTFKDKCNTCRCGSDGKSAACTRMaCPQ
SGCI (RMG)	EVTCEPGTTFKDKCNTCRCGSDGKSAACTRMGCPQ
SGTI (RMG)	EQECTPGQTKKQDCNTCNCTPTGVW_ACTRMGCPPH
SGTI	EQECTPGQTKKQDCNTCNCTPTGVW_ACTRKGCPPH

5. Ábra SGTI-SGCI variánsok. Az első és az utolsó sorban a vad típusú szekvenciák láthatók, a mutánsokban kiemeltük a végrehajtott változtatásokat.

A fenti „mutánsok” humán 4, humán 1 és szarvasmarha tripszinre gyakorolt gátló hatását „progressz-görbe” analízissel vizsgálva, meghatároztuk az inhibíciós konstansok (K_I) értékét. Az eredményeket az 4. Táblázatban foglaltuk össze.

4. Táblázat SGCI és SGTI mutánsok K_I inhibíciós állandói.

	humán tripszin 4 M	humán tripszin 1 M	sz.marha tripszin M
SGTI(RMG)	2,04x10 ⁻⁵	3,94x10 ⁻⁶	6,57x10 ⁻⁸
SGCI(RMA)	1,57x10 ⁻⁵	1,27x10 ⁻⁹	3,38x10 ⁻¹¹
SGCI(RMG)	5,04x10 ⁻⁵	2,62x10 ⁻⁹	3,87x10 ⁻⁸
SGCI(RMD)	2,76x10 ⁻⁵	1,70x10 ⁻⁴	9,49x10 ⁻⁷

Amint az eredményekből kitűnik, tripszin 4 esetében az aminosavcserék nem vezettek az inhibíciós hatás jelentős mértékű változásához, bár az SGCI(RMA) és az SGCI(RMG) jó inhibitorai a humán tripszin 1-nek és a szarvasmarha tripszinnek, gyakorlatilag hatástalanok a humán tripszin 4-en.

Hasonlóan eredménytelenek voltak azok a próbálkozásaink, amikor a tripszin 4 preferált természetes szubsztrátjában, a mielin bázikus fehérjében elhasadó peptid szekvencia alapján terveztünk inhibitorokat. Kémiai szintézissel előállítottuk a tripszin 4 hasadóhelyet magában foglaló, IVTPRTPPPSQ szerkezetű peptidet és annak különböző módon ciklizált származékait abból a célból, hogy ezek szubsztrát és inhibitor tulajdonságait tanulmányozzuk tripszin 4-en. Ezek a peptidek általában szubsztrátként viselkedtek, jelentős inhibíciót nem sikerül megfigyelniük.

Az elmúlt évek során mintegy 25 különböző peptidet készítettünk el, egyik sem bizonyult hatékony inhibitornak. Ez a sikertelenség feltehetően a kanonikus mechanizmus alapján működő inhibitorok kötődési módjára és a gátolt szerkezet stabilitását biztosító alapvető mechanizmusok természetéből következik.

Az inhibitor tervezés kudarcai megkövetelték, hogy alaposabban tanulmányozzuk a tripszin 4 kanonikus inhibitorokkal kialakított kölcsönhatásait. Sajnos nem sikerül a tripszin 4-et protein inhibitorokkal együtt kristályosítani, ezért elsősorban enzim kinetikai vizsgálatokat végeztünk.

Ami viszont a tripszin 4 kanonikus inhibitorokkal szembeni rezisztenciáját illeti, legújabb eredményeink erre magyarázatot adnak. Azt már régóta tudjuk, hogy az tripszin 4 speciális enzimatis tulajdonságaiért a 193-as pozícióban történt glicin→arginin csere felelős, mivel az R193G mutáció gyakorlatilag visszaállítja az inhibitorokkal szembeni érzékenységet (5. Táblázat)

5. Táblázat. A kanonikus inhibitorok K_i értékei

	APPI	STI
tripszin 4	$3,0 \times 10^{-8}$	$4,2 \times 10^{-7}$
tripszin 4 R193G	$4,7 \times 10^{-10}$	$5,8 \times 10^{-10}$
tripszin 4 R193A	$1,1 \times 10^{-11}$	$8,2 \times 10^{-11}$

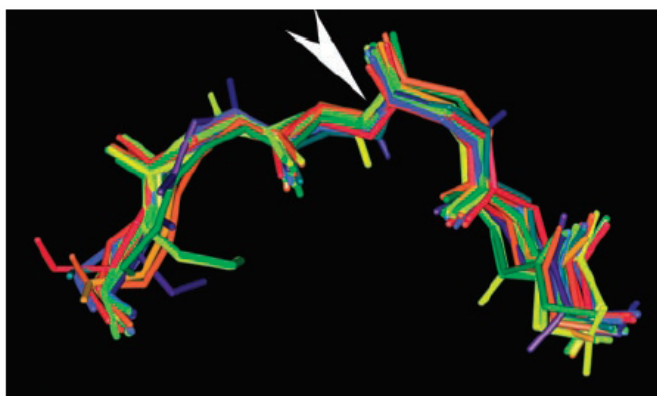
A glicin→arginin csere azonban több mechanizmussal destabilizálhatja az enzim - inhibitor kölcsönhatást. Egy, a közelmúltban megjelent közlemény, mely a trombinon és patkány anionos tripszinen a 193-as pozícióban glicin→alanin és glicin→prolin mutációk hatásait vizsgálta, arra a következtetésre jutott, hogy a nem-glicin aminosav a 193-as pozícióban olyan nagy mértékben destabilizálja az enzimet, az oxianion üreget, hogy az még a Michaelis komplex kialakulását is gátolja (Bobofchak és mtsi, 2004). Egy másik lehetőség, az, hogy nem annyira az oxianion üreg torzulása, hanem az arginin oldallánc szterikus hatása az S2' kötőhelyen okozza az inhibitor rezisztenciát.

Enzim kinetikai vizsgálatok (Tóth és mtsi, 2006)

A glicin→arginin cserének a katalitikus mechanizmusra gyakorolt hatását gyorskinetikai vizsgálatokkal tanulmányoztuk. A metilumbelliril-guanidino benzoát szubsztrát analóg rendkívül alkalmas stopped-flow mérésekkel, mivel a felszabaduló fluoreszcens termék mennyisége az időben jól követhető, és nagyon jellemző úgy nevezett burst kinetikát mutat, ami lehetővé teszi valamennyi elemi sebességi állandó meghatározását. Összehasonlítva a vad típusú tripszin 4 (Arg193) és a glicin mutáns (Arg193Gly) kinetikai paramétereit, azt kaptuk, hogy a szubsztrát kötés egyensúlyi állandója gyakorlatilag azonos. A vad típusú enzimben lassabban alakul ki de gyorsabban bomlik el az acil enzim, mint a glicin mutánsban. Eredményeink azt mutatják, hogy a guanidino benzoil acil enzim kialakulása a glicin mutánsban entrópia hajtott folyamat, a tripszin 4 esetében nagy mértékű entrópia-entalpia kompenzáció figyelhető meg. Ezek az eredmények azonban valószínűtlenné teszik azt, hogy a tripszin 4 inhibitor rezisztenciájának oka a katalitikus mechanizmus lenne.

Az acil-enzim és az inhibitor komplexek szerkezetének összehasonlítása (Fodor és mtsi, 2006)

A szerin proteázok kanonikus inhibitoraira általánosan jellemző, hogy egyrészt rendkívül stabil szerkezetű, kompakt fehérjék, másrészt a proteázok aktív centrumát lefedő u.n. reaktív hurok geometriája gyakorlatilag azonos. A 6. Ábrán 23 különféle szerin proteáz gátlására képes kanonikus inhibitor reaktív peptid szakaszának szuperpozícióját mutatjuk be. Az ábrán látható hurok valamennyi esetben rendkívül merev, hidrogén hidak és hidrofób kölcsönhatások rögzítik.



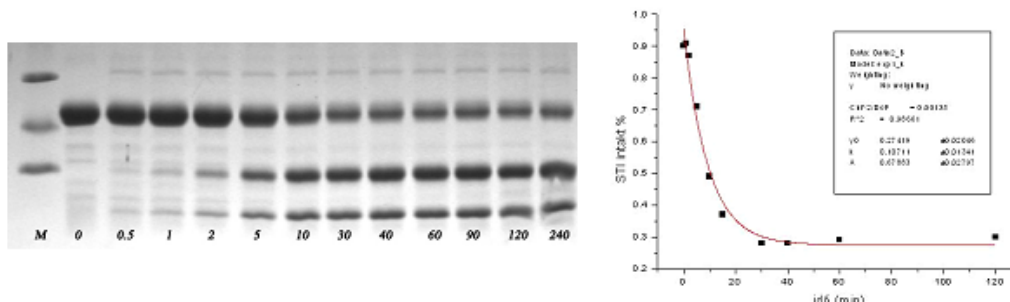
6. Ábra. 23 kanonikus szerin proteáz inhibitor reaktív hurkának szuperpozíciója. A fehér nyíl az elhasadó peptid kötést mutatja. (Radisky és Koshland, 2002)

Az enzim felszínéhez kötött inhibitorban megtörténik a peptid kötés kialakulása, létrejön az acil-enzim komplex, azonban ez nem bomlik el. Ennek az az oka, hogy az acil-enzim komplexben felszabaduló új amino terminális nem távozik el, mivel a reaktív hurok rigid struktúrája ezt nem engedi. Szubsztrátként viselkedő peptidek esetében a távozó amino terminális biztosít helyet az acil-enzim elbontását végző „hidrolitikus” víz molekulának. Kanonikus inhibitoroknál a hidrolitikus lépés nem következhet be. Az 1:1 sztöchiometriájú enzim-inhibitor komplexben egyensúly alakul ki az acil-enzim formában kötött és az intakt peptid kötést tartalmazó inhibitor között. Az inhibitortól valamennyire függően az egyensúlyban mintegy 80-90 % az intakt és 10-20 % a hasított forma aránya. A szerin proteázokhoz kötött kanonikus inhibitorokban tehát dinamikus egyensúlyban együtt létezik a Michaelis komplexnek megfelelő intakt inhibitor-enzim komplex és az acil-enzim intermedier. Sajnos azonban a fent említett, eltolt egyensúlyi állapot miatt a jelenlegi röntgen diffrakciós technikákkal csak a nagyobb mennyiségben előforduló forma vizsgálható. Mindazonáltal, az acil-enzim és az inhibitor komplexek összehasonlításából pontosan meghatározható a hidrolitikus víz pozíciója, ami az enzim-inhibitor komplexek stabilitása szempontjából döntő fontosságú.

Az inhibitor rezisztencia oka. Miért nem gátolják a kanonikus inhibitorok a tripszin 4-et? (kézirat előkészületben)

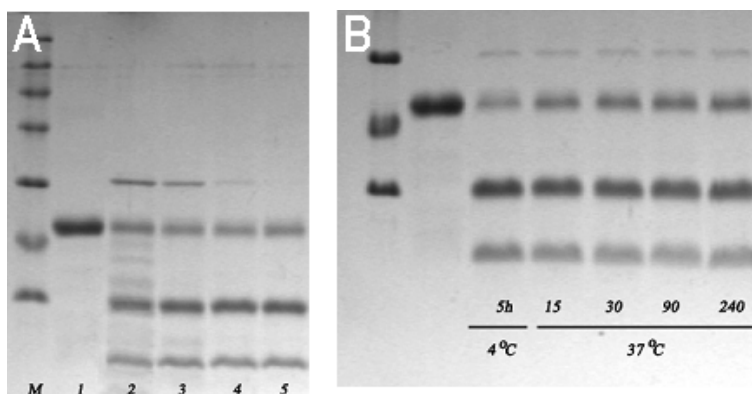
Megfigyeltük, hogy a tripszin 4 a legtöbb kanonikus inhibitorot hasítja. Peptid szekvenálással igazoltuk, hogy ez a hasítás a szója tripszin inhibitorban (STI) és az Alzheimer prekursor protein inhibitorban (APPI) kizárólag a reaktív hurokban történik. Nagyon érdekes viszont az, hogy ez a hasítás egyik inhibitor esetében sem 100 %-os, jól definiált egyensúlyi

állapot áll be. Amennyiben az inkubációt 37 °C-on végezzük, mintegy 30 % intakt és 70 % hasított forma keletkezik (7. Ábra).



7. Ábra. STI hasítása tripszin 4-gyel 37 °C-on az ábrán feltüntetett ideig (perc). Jobboldalt a denzitometriás kiértékelés eredménye látható. Az egyensúly beállításának a kinetikája monofázisú exponenciális függvényvel írható le.

Ez az arány jelentősen különbözik a „hagyományos” tripszinek esetében a kötött inhibitorban kialakult, fent említett aránytól. A különbség oka azonban teljesen nyilvánvaló, a „hagyományos” tripszinek esetében egy aktivált észter (acil-enzim) és a peptid kötés között, míg a tripszin 4 esetében egy karboxilát–amino ionpár és a peptid kötés között alakul ki az egyensúly. Mivel a karboxilát–amino ionpár termodinamikailag stabilabb, mint az acil-enzim, érthető, hogy az egyensúlyi állapotban ez lesz a predomináns forma. Míg a „hagyományos” tripszinek esetében stabil, 1:1 arányú komplexet képez az enzim és az inhibitor, a tripszin 4-nél „turnover” figyelhetünk meg, és az egyensúly a hidrolízis és a visszaszintézis együttes hatásaként alakul ki. Azt, hogy itt valódi egyensúlyról van szó, több módon is igazoltuk. Bemutatjuk, hogy a hasított forma aránya nem függ az enzim:inhibitor aránytól (8. A Ábra).



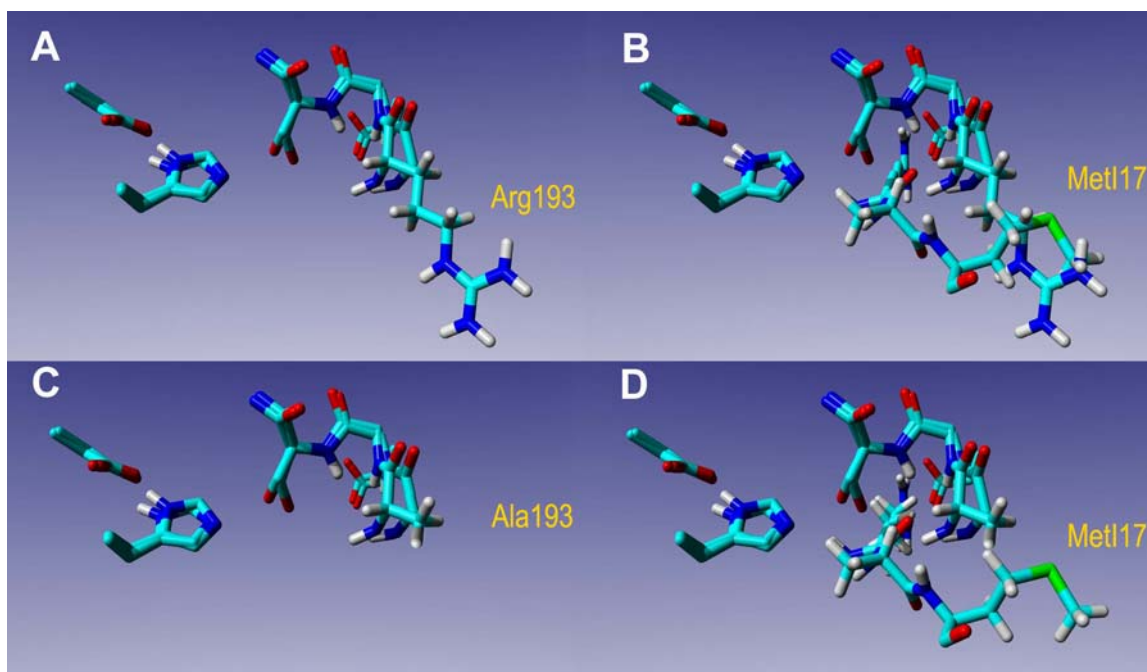
8. Ábra. A: STI hasadása 37 °C-on különböző inhibitor:enzim (I:E) arány esetében . 1. oszlop: intakt STI, 2. oszlop: I:E=4; 3. oszlop: I:E=20, 4. oszlop: I:E=100, 5. oszlop: I:E=500. **B:** 4 °C-on egyensúlyba hozott STI-tripszin elegy (I:E=100) inkubálása 37 °C-on az ábrán feltüntetett időkhöz (perc).

Mint az várható, az egyensúlyi állandó értéke függ a hőmérséklettől. Ha 4 °C-on vizsgáljuk a rendszert, az egyensúly a hasított forma felé tolódik el, csak mintegy 8-9% intakt inhibitor tartalmaz az egyensúlyi elegy. Ha a 4 °C-on egyensúlyba került mintát 37 °C-ra melegítjük, nettó reszintézist figyelhetünk meg (8.B Ábra).

Az, hogy a szerin proteázok képesek a hasított kanonikus inhibitorokat reszintetizálni, nem új megfigyelés, már a 60-as évek óta ismert, a „hagyományos” tripszinek azonban ezt nem katalitikusan, hanem 1:1 arányú komplex képzés során valósítják meg.

Az inhibitor folyamatos hidrolízise csak abban az esetben játszódhat le, ha a katalitikus víz képes az acil kötéshez hozzá férni. Mivel semmi alapunk nincs azt feltételezni, hogy az inhibitor szerkezete lazább lenne a tripszin 4 acil-enzimben, mint a „hagyományos” tripszinekkel alkotott komplexben, valószínűtlen az, hogy az amino csoport eltávozása nyit utat a hidrolitikus víz belépéséhez.

A 9. Ábrán bemutatom a tripszin 4 – benzamidin komplex és a szarvasmarha tripszin – APPI komplex egymásra helyezett térszerkezetét. Az A panelben csak a két proteáz katalitikus triádja és a 194-es peptidgerinc valamint a 193-as aminosav látható. A B panelen az APPI inhibitor 15-17-es peptidszegmense is látható. Megfigyelhető, hogy az inhibitor 17-es metionin oldallánca ütközik a 193-as arginin guanidino csoportjával.



8. Ábra. A humán tripszin 4 (1h4w) és a szarvasmarha tripszin – APPI komplex (1taw) szuszperpozíciója

Nyilvánvalóan ez az ütközés elképzelhetetlen a kialakuló enzim-inhibitor komplexben, biztosan más geometriával, kissé megemelkedve kötődik az APPI a tripszin 4-hez, mint a szarvasmarha tripszinhez. Ekkor viszont könnyen elképzelhető, hogy az acil-enzim kialakulásakor a felszabaduló aminosóport csekély elmozdulása is elegendő a hidrolitikus víz belépéséhez. A kialakuló lehetséges szerkezetek molekuladinamikai szimulációja folyamatban van.

A 9. ábra alsó két paneljében mutatom azt a helyzetet, ami akkor alakulhat ki, ha a 193-es pozícióban alanin van. Látható, hogy ekkor gyakorlatilag torzulás mentesen kialakulhat a komplex a tripszin és az inhibitor között.

Elkészítettük a tripszin 4 alanin mutánsát. Ez az enzim, amint azt az 5. Táblázatban bemutatjuk, „hagyományos” tripszinként viselkedik, mind az APPI, mind az STI jól gátolja (5. Táblázat). Ez a kísérlet is bizonyítja azt, hogy nem elsősorban az oxianion üreg szerkezete, hanem az arginin oldallánc az oka a tripszin 4 inhibitor rezisztenciájának. Ebből viszont az

következik, hogy lehetetlen előállítani olyan inhibitorot, amely a kanonikus mechanizmus alapján gátolná a tripszin 4-et.

IRODALOM JEGYZÉK

1. Becerra SP, Rose JA, Hardy M, Baroudy BM, and Anderson CW (1985) Direct mapping of adeno-associated virus capsid proteins B and C: a possible ACG initiation codon. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 7919-7923.
2. Cigan AM, Feng L, and Donahue TF (1988) tRNAⁱ(met) functions in directing the scanning ribosome to the start site of translation. *Science*, **242**, 93-97.
3. Cottrell GS, Amadesi S, Grady EF, and Bunnett NW (2004) Trypsin IV, a novel agonist of protease-activated receptors 2 and 4. *J Biol Chem*, **279**, 13532-13539.
4. Diederichs S, Bulk E, Steffen B, Ji P, Tickenbrock L, Lang K, Zanker KS, Metzger R, Schneider PM, Gerke V, Thomas M, Berdel WE, Serve H, and Muller-Tidow C (2004) S100 family members and trypsinogens are predictors of distant metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Cancer Res*, **64**, 5564-5569.
5. Marsit CJ, Karagas MR, Danaee H, Liu M, Andrew A, Schned A, Nelson HH, and Kelsey KT (2006) Carcinogen exposure and gene promoter hypermethylation in bladder cancer. *Carcinogenesis*, **27**, 112-116.
6. Marsit CJ, Okpukpara C, Danaee H, and Kelsey KT (2005) Epigenetic silencing of the PRSS3 putative tumor suppressor gene in non-small cell lung cancer. *Mol Carcinog*, **44**, 146-150.
7. Peabody DS (1989) Translation initiation at non-AUG triplets in mammalian cells. *J Biol Chem*, **264**, 5031-5035.
8. Rinderknecht H, Renner IG, Abramson SB, and Carmack C (1984) Mesotrypsin: a new inhibitor-resistant protease from a zymogen in human pancreatic tissue and fluid. *Gastroenterology*, **86**, 681-692.
9. Rowen L, Koop BF, and Hood L (1996) The complete 685-kilobase DNA sequence of the human beta T cell receptor locus. *Science*, **272**, 1755-1762.
10. Rowen L, Williams E, Glusman G, Linardopoulou E, Friedman C, Ahearn ME, Seto J, Boysen C, Qin S, Wang K, Kaur A, Bloom S, Hood L, and Trask BJ (2005) Interchromosomal segmental duplications explain the unusual structure of PRSS3, the gene for an inhibitor-resistant trypsinogen. *Mol Biol Evol*, **22**, 1712-1720.
11. Schwab SR, Li KC, Kang C, and Shastri N (2003) Constitutive display of cryptic translation products by MHC class I molecules. *Science*, **301**, 1367-1371.
12. Schwab SR, Shugart JA, Horng T, Malarkannan S, and Shastri N (2004) Unanticipated antigens: translation initiation at CUG with leucine. *PLoS Biol*, **2**, e366.

13. Wiegand U, Corbach S, Minn A, Kang J, and Muller-Hill B (1993) Cloning of the cDNA encoding human brain trypsinogen and characterization of its product. *Gene*, **136**, 167-175.
14. Radisky ES, and Koshland, DE Jr. (2002) A clogged gutter mechanism for protease inhibitors. *PNAS*, **99**, 10316-10371.
15. Bobofchak KM, Pineda AO, Mathews FS, and Di Cera E (2005) Energetic and structural consequences of perturbing Gly-193 in the oxyanion hole of serine proteases. *J. Biol Chem*, **280**, 25644-25650.