

A humán tripszin biológiai funkciójának felderítése: új stratégia (zárójelentés)

A primata specifikus szerin proteázt, a humán tripszin 4-et munkacsoportunk klónoztta és fejezte ki először heterológ rendszerben. Az aktív enzim kristályszerkezetét is mi határoztuk meg először. A humán tripszin 4 biológiai funkciójának felderítése volt a jelen pályázat célja. Tekintettel a fehérje primátákban való előfordulására a funkciót nem elsősorban az élettan, hanem a modern molekuláris biológia, enzimológia és sejtbiológia eszközeivel kutattuk. Végleges felderítésével ugyan adósak maradtunk, az elmúlt négy év kutatásai számos, a humán proteáz funkciójának tisztázásához támpontot nyújtó felfedezéshez vezettek. Ezek a jövetkezők: 1) Megállapítottuk, hogy a primata-specifikus tripszin 4 egyik, feltehetően biológiai szubsztrátja a mielin bázikus fehérje. 2) *Post mortem* emberi agy mintákból tripszinogén 4 B-izoformát izoláltunk és megállapítottuk, hogy a fehérje translációja egy CUG triplett által kódolt iniciátor leucinnal indul. Feltételeztük, hogy ez a mechanizmus a gén expresszió szabályozásának eszköze. 3) Felderítettük a humán tripszinogén 4 asztrogliá sejten belüli transzportjának útját és aktivációjának lehetséges helyét.

1. Szubsztrátspecifitási vizsgálatok

1.1. A ciklikus szerkezetű peptidszubsztrát története

A humán tripszin 4 szubsztrátspecifitásának kutatásához az egyik ötletet a kígyóméregből származó plazminogén aktivátorral (TSV-PA) kapcsolatos vizsgálatok eredményei adták (Parry et al., 1998, Structure 6:1195-1206). A szerzők a szerin proteáz szűk szubsztrátspecifitását a 193-as pozícióban megjelenő fenilalinnal magyarázták. Értelmezésünk szerint ez a fenilalanin a humán tripszin 4 homológ helyzetű argininjéhez hasonlóan korlátozza a

proteáz nagyméretű szubsztrátokkal és kanonikus inhibitorokkal való kölcsönhatását. A humán plazminogént azonban szelektíven hasítja a kígyóméreg proteáz. A plazminogén hasadása egy 9 aminosavból álló, diszulfidhiddal összehurkolt peptidszakasz, a 577CPGRVVGGC585 szerkezetén belül az Arg-Val aminosavak közt történik. Ez indított bennünket arra, hogy kémiai szintézissel előállítsuk ezt a peptidet és ennek 15 variánsát, lineáris és ciklusos formában is. Ezeknek a peptideket rekombináns humán tripszin 1 és humán tripszin 4 enzimekkel hasítottuk és a hasítási termékek megjelenésének sebességét HPLC-vel határoztuk meg. Próbálkozásaink során azonban nem sikerült egyetlen olyan szubsztrátot sem előállítanunk, melyet a tripszin 1 és 4 számottevően eltérő sebességgel hasította volna. A peptidek proteáz gátló hatását sem tudtuk kimutatni. Az a reményünk szertefoszlott tehát, hogy a humán plazminogen szerkezetéből származtatott, ciklikus peptidszubsztrátok megkülönböztetetten jó szubsztrátjai (vagy inhibitorai) lesznek a humán tripszin 4-nek.

1.2. Proteomikai közelítés

Más elgondolást követve, a humán agyszövet teljes homogenizátumát hidrolizáltuk rekombináns humán tripszin 4-el. *Post mortem* humán cortex mintát homogenizáltunk 20 mM trisz pH 8,0, 10 mM CaCl₂, 150 mM NaCl, 0,2 % Triton X-100 tartalmú pufferben. A homogenátum összfehérje koncentrációját meghatároztuk. 500 mikrogram fehérjét 0,5 mikrogram humán tripszin 4-gyel emésztettünk, 1 óra hosszat, 37 C°-on. Kontrollként a homogenátumot humán tripszin nélkül inkubáltuk. Az inkubálási idő elteltével a minták fehérjetartalmát 10 % TCA-val kicsaptuk, centrifugáltuk majd 8 M ureát tartalmazó IEF pufferben feloldottuk. 18 cm hosszú pH 3-10 IEF (Izoelektromos Fokuszálás) csíkot duzzasztottunk a fehérje oldattal, majd izoelektromos fókuszálást végeztünk. Csíkokat 20x20 cm méretű 12,5

% SDS-poliakrilamid gélen futtattuk, majd Coomassie festékekkel festettük. Az emésztett és a kontrol gélek vizuális összehasonlítása alapján a kontrol és az emésztett minták tartalmazó gélekből 8-8 olyan foltot vágunk ki, melyek csak az egyik gélen voltak megfigyelhetők, vagyis megváltoztak az emésztés hatására. A kivágott fehérjéket a gélben tripszinnel emésztettük majd a tripszines peptideket MALDI-TOF segítségével analizáltuk. A peptidtömegek alapján a Mascot program segítségével 9 fehérjét sikerült azonosítanunk. Az azonosított fehérjék a következők voltak: kollapszin, tubulin alfa-2, kreatin kináz B, szeptin 5, NAD⁺-izocitrát dehidrogenáz alegység, tejsav dehidrogenáz, „capping” alfa protein, alfa B-krisztallin és kofilin-1. Érdemes megjegyezni, hogy az azonosított 9 fehérje közül 5, az alfa-tubulin, szeptin 5, kofilin 1, kollapszin és „capping” alfa protein a citoskeletális rendszer alkotórésze, vagy szabályozó fehérjeje.

1.3. A Mielin Bázikus Protein (MBP), mint a humán tripszin 4 lehetséges biológiai szubsztrátja

A fentiekől független gondolatmenet vezetett arra a felismerésre, hogy az emberi mielin bázikus fehérjét sajátos, a pankreatikus tripszinekétől eltérő specifitással hasítja az agyi tripszin (Medveczky és mtsai, 2006). Korábbi immunohisztokémiai vizsgálataink derítették fényt arra, hogy a proteáz az idegsejtek mellett a gliában is előfordul (Tóth és mtsai, 2007). Ez a felismerés, továbbá az oligodendroglia mielin hüvely processzáálásában ismert szerepe adta az ötletet ahhoz, hogy megvizsgáljuk az MBP humán tripszin 4-el, kalpainnal és pankreatikus tripszin 1-el való hasíthatóságát. A kalpainnal való összevetést az indokolja, hogy a kalpainnak az idegsejt patológiás demielinizációjában való részvétele már korábban felvetődött. A pankreatikus tripszint referens enzimként használtuk. Kiderült, hogy míg a pankreatikus tripszinnel való hasítás, azonos mértékű szubsztrátfogyás

esetén, nagyszámú fragmens felszabadulásához vezet, addig az agyi tripszinnel kapott fragmensek száma korlátozott. Megállapítottuk továbbá, hogy a lipiddel asszociált MBP (szubsztrát fogyasztás alapján becsült) azonos mértékű hasításához a kalpainnál 200-szor kevesebb rekombináns humán tripszin 4-et kell felhasználni. A két proteáznak egyetlen közös hasítóhelye van, az Arg98-Thr99 peptidkötés, mely a többi hasadó kötéshez képest kiemelkedő sebességgel hasad el mind a kalpainnal, mind a humán tripszin 4-el. A tripszin 4 a lipidhez kötődő MBP Arg79-Thr80 peptidkötését is jól hidrolizálja. Az Arg97-Thr98 hasítási helyet magában foglaló IVTPRTPPPSQ szekvenciájú peptidet kémiai szintézissel állítottuk elő. A humán tripszin 4 ezt a peptidet is az Arg97-Thr98 aminosavak között hasította. Az a hipotézisünk, hogy ennek a proteolízisnek szerepe lehet a *sclerosis multiplexet* kísérő, vagy kiváltó autoimmunitás kialakulásában. Ismert ugyanis, hogy a betegek agyfolyadékából izolált IgG domináns frakciója az MBP Arg98-Thr99 hasítóhelyétől N-terminális irányban elhelyezkedő peptidszakaszt ismeri fel.

1.4. Szerpinek, mint a humán agyi tripszin potenciális inhibitorai

Kutatási munkatervünkben a szerpinekkel tervezett kutatásokat a 3. munkatervi pontba soroltuk. Az elvégzett munka eredményei azonban inkább a **Szubsztrátspecifitási vizsgálatok** körébe tartoznak. Heterogén humán agyszövetből nyert teljes RNS preparátumból reverz transzkripció PCR technikával klónoztunk három szerpin típusú szerin proteáz inhibitor, a neuroszerpint, a gliából származó nexint (PN-1) és az alfa-1-antitripszint (AAT-1). A cDNS-eket pET17c expressziós vektorba helyeztük és a fehérjéket BL21(DE3) gazdasejtekben expresszálttuk. Valamennyi fehérje jelentős mennyiségben, de zárványtest formájában termelődött. Az alfa-1 antitripszin esetében sikerült kidolgoznunk a renaturáció körülményeit, míg

a neuroszerpin és a PN-1 esetében nem sikerült megtalálnunk az optimális körülményeket. A natív AAT-1 teljesen inaktívnak bizonyult a humán tripszin 4 gátlási kísérletekben. Ez a szerpin az. u.n. „reakatív hely hurokban” az ideálisan Arg-Ser tripszinhasító hely helyett, Met-Ser szekvenciát tartalmaz.. Minthogy az agyból izolált másik két szerpinnek optimális Arg-Ser tripszinhasító helye van, irányított mutagenézis segítségével elkészítettük az AAT-1 Met358Arg mutánsát, amelynek aminosav szekvenciája megegyezik az ismert természetes variáns, az úgynevezett Pittsburg mutáns szerkezetével. Ez a mutáns 1:1 sztöchiometrikus arányban gátolja a humán tripszin 4-et. A gátolt komplexben kimutattuk a szerpinekre jellemző stabil acil-enzimet. Hasonló eredményeket kaptunk az agyban eddig még ki nem mutatott, de kereskedelmi forgalomban beszerezhető alfa-1-antiplazminal is. Ez az inhibitor nem Arg-Ser, hanem a tripszin számára szintén elfogadható Arg-Met tripszinhasító hellyel rendelkezik. Eredményeink alapján joggal feltételezzük, hogy az agyban két szerpin is előfordul, melyek gátolják a humán tripszin 4-t.

1.5 Tripeptid aldehid inhibitorok.

Vizsgáltuk annak lehetőségét is, hogy a Bajusz Sándor és munkacsoportja által eredetileg antitrombolitikumként szintetizált tripeptid aldehidek körében találunk olyat, amelyik a humán tripszin 4-et más szerin proteázoknál jobban gátolja. Jelentősebb szelektivitásra utaló jelet ugyan nem találtunk, a két legaktívabb tripszin inhibitor, a D-Phe-Pro-Arg-H és CH₃-D-Phe-Pro-Arg-H inhibitorokat tripszin 4-el komplexáltuk, kristályosítottuk és a komplexek szerkezetét meghatároztuk. A kristályszerkezetből jól látszik, hogy az inhibitorok aldehid csoportja kovalens kötést alkot az enzim katalitikus szerinjével. A keletkező

hemiacetál szerkezet a katalízis során kialakuló átmeneti állapot szerkezeti modelljének tekinthető. A kristályszerkezetből az is kitűnik, hogy a tripeptidaldehid és a tripszin között kialakuló hemiacetál csoport oxigénje két különböző pozíciót foglal el az enzim szerkezetében: vagy az oxianion lyukban helyezkedik el, vagy a His 57-tel alkot H-hídat. További vizsgálatok dönthetnék el, hogy a hemiacetál oxigénnek ez viselkedése összefügg-e az Arg193 jelenlétével a humán tripszin 4 szerkezetében? Az inhibitor P3-P1 régiója és az enzim S-hatóhelyei között antiparallel β -redő struktúra jön létre, melynek kialakulására nincs torzító hatással a humán tripszin 4-ben előforduló Arg193 oldallánca.

2. Humán agyi tripszinogén izolálása emberi agyból

A pályázat keretében és annak támogatásával végzett kutatásaink minden bizonnyal legjelentősebb eredménye a humán tripszinogén 4 *post mortem* emberi agymintákból történő izolálása és kémiai azonosítása volt. Mindaddig, míg erre nem került sort, az expresszálandó fehérje lehetséges szerkezetére a PRSS3 gén szekvenciájából és a cDNS-sel végzett néhány bizonytalan kísérlet eredményéből lehetett következtetni. Ez az információ nyitva hagyta azt a kérdést, hogy az emberi agyban a tripszinogén 4 nagyméretű, u.n. A-izoformája, vagy egy rövidebb, u.n B-izoforma fejeződik-e ki? Feltételezés szerint ugyanis az A-izoforma N-terminális metioninjat a tripszin régiótól 5' irányba eső első ATG kódolja, míg a B-izoforma átírása egy leucint kódoló, az említett ATG-től 3' irányban elhelyezkedő CUG kodonnál indulna el. A predikció szerint a B-izoforma N-terminális aminosava a CUG kodon dacára metionin. Az irodalomól számos példát ismerünk arra nézve, hogy egy megfelelő szekvenciális környezetbe került és ezért startkodonként funkcionáló CUG metionint

kódol. A két feltételezett izoforma N-terminális szekvenciáit az alábbiakban mutatjuk be:

A-izoforma:

**MCGPDDRCPARVPGPGRAVKCGKGLAAARPGRVERGGAQRGGAG-
LELHPLLGGRTWRAARDADGCEALGTVAVPFDDDDK**

B-izoforma:

MELHPLLGGRTWRAAR DADGCEALGTVAVPFDDDDK

Az vezető (leader) peptidek C-terminális végén található a VPFDDDDK szekvenciájú propeptid régió, amely az enterokináz felismerő helyét tartalmazza. A két feltételezett izoforma, az A és B, vezető (leader) polipeptidjei tehát a propeptid N-terminálisáig számolva 72, ill. 28 aminosavból állnak. A *post mortem* emberi agy különböző régióiból származó (occipitális cortex, frontális cortex), 60-85 gramm súlyú szövetmintákból kísérletenként 2-3 µg humán tripszinogént tudtunk izolálni. Az aminosavszekvencia analízis tanúsága szerint ez a fehérje csak a Leu-N-terminálisú, 28 aminosavból álló B-izoforlát tartalmazta (Németh és mtsai, 2007). Nem tudtuk bizonyítani sem az A-izoforma *post mortem* agymintákban történő előfordulását, sem a rekombináns A-izoforma agyszövet homogenizátum hozzáadására bekövetkező protolitikus átalakulását B-formává. A transzláció iniciáció kérdésének megnyugtató tisztázása érdekében különböző, többek között a teljes hosszúságú A izoforlát kódoló cDNS konstrukcióval (p72^MT4) és ennek egy ATG-t nem tartalmazó variánsával (p28^LT4) is transzfektáltunk HeLa sejteket és U87 globlastoma sejt vonalakat. Mindkét sejt vonalban, mindkét konstrukcióról kifejeződött a CUG-kódolt Leu N-terminálisú B-izoforma. Ez utóbbi

expresszója azonban mindkét sejtvonalban szerényebb volt, mint a Met iniciátor aminosavval működő expresszió mértéke. Felvetettük, hogy ennek a hagyományostól eltérő, Leu-iniciátor aminosavval működő translációs mechanizmusnak szerepe lehet a génexpresszió szabályozásában (Németh és mtsai, 2007, Medveczky és mtsai, 2007).

3. A humán agyi tripszinogén sejten belüli lokalizációjának és transzportjának felderítése glia sejtekben enzim-zöldfehérje (GFP) konstrukció segítségével

Az MTA-SE munkacsoportjával kollaborációban *post mortem* humán agymintákban elvégzett *in situ* hibridizációs és immunhisztokémiai festések eredménye azt mutatta, hogy a humán tripszinogén 4 a központi idegrendszerben elsősorban asztroglia sejtekben fejeződik ki (Tóth és mtsai, 2007). A humán tripszinogén 4 sejten belüli lokalizációjának, transzportjának és lehetséges aktivációjának felderítésére ezért egér primer asztroglia sejtek tenyészetét használtuk. A C-terminálison GFP fehérjével kapcsolt, az N-terminálison pedig 28 (B izoforma), illetve 72 aminosavból álló (A izoforma) vezető (leader) peptidszakaszt tartalmazó humán tripszinogén 4 izoformákat újszülött egerek előagyából nyert primer asztroglia sejtekben Lipofectamine 2000 transzfekcióval fejeztettük ki. A GFP jel alapján a glia sejtekben mind az A-, mind B izoforma kifejeződött, de a B izoforma expressziója viszonylagosan alacsony szintű volt. A B izoforma megjelenése mindenesetre jelezte, hogy az izoforma leucint kódoló első kodonja egér asztroglia sejtekben is képes start kodonként funkcionálni. Amikor a B izoforma eredeti, Leu start kodonját ATG kodonra cseréltük, az expresszió mértéke jelentősen növekedett. Ezek az eredmények a korábban az U87 humán glióma sejtvonalban tapasztaltakkal megegyeztek, ezért a további vizsgálatokban a rövidebb, 28 aminosavnyi vezető peptiddel

rendelkező B izoforma lokalizációjának vizsgálatakor is az ATG start kodont tartalmazó konstrukciót használtuk. Az izoformák kifejeződését a GFP jel mikroszkópos detektálása mellett a rövid (p28), illetve a hosszú vezető peptid N-terminális szakaszára (p40) specifikus, a Pécsi Tudományegyetem Immunológiai és Biotechnológiai Intézetében kifejlesztett ellenanyagokkal is ellenőriztük. Immuncitokémiai vizsgálataink alapján a transzfektált sejtekben megfigyelhető GFP jel a p28, illetve a p40 vezető peptid ellen termeltetett ellenanyaggal teljes mértékben átfedett. A hibridóma felülűszók közül kettő a Western blot detektálásra is kiválóan alkalmas volt. Asztroglia sejtekben a két izoforma expressziós mintázata hasonló volt: a citoplazmás GFP jel mellett gyakran tapasztaltunk kisebb-nagyobb, fehérjeaggregátumra emlékeztető struktúrákat is, amelyek gyakran irányítottan, sugár-irányban vagy a membrán közelében helyezkedtek el. Fluoreszcensen jelzett falloidinnel végzett immunfestéseink alapján a GFP-vel jelölt humán tripszinogén 4 izoformák a filamentáris aktin citoskeleton mentén rendeződtek el, a mikrotubuláris hálózattal azonban nem estek egybe. A humán tripszin 4 a központi idegrendszer egyes patológias folyamataiban, így pl. a demielinizáció kialakulásában is valószínűsíthető szerepet játszik. Extracelluláris proteázok aktiválódását más központi idegrendszeri patológias folyamatok (pl. ischemia vagy hipoxia) során is leírták.

A humán tripszinogén 4 izoformák patológias folyamatok hatására történő aktivációját egér asztroglia tenyészetekben vizsgáltuk. A primér asztroglia tenyészeteket GFP-vel fuzionáltatott A- és B izoforma, valamint a vezető peptid nélküli tripszinogén 4 konstrukciókkal transzfektáltuk, majd a transzfekciót követő 23. órában a sejteket 1 órán át hipoxiás körülmények között tartottuk. A tenyészetekben a hipoxiát az ún. oxigén-glükóz

depriváció (OGD) kezeléssel értük el: a tenyészetek tápfolyadékát 1 órán át 2 mM KCN és 10 mM deoxiglükóz oldatra cseréltük (pH 7,2 és 300 mOsm; 10 mM Hepes, 145 mM NaCl, 3 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂), majd a kezelést követően a sejteket fixáltuk. A GFP-vel jelzett konstrukciók eloszlását a szokásos immuncitokémiai módszerekkel és Olympus FV500 konfokális mikroszkóppal elemeztük. A OGD kezelésre adott válaszreakciókat „live cell imaging” technikával is megvizsgáltuk, így a folyamatok időbeliségéről is információt kaptunk. „Live cell imaging” vizsgálataink alapján az OGD-kezelést követő 15-20. percben a GFP-vel jelzett A- és B izoforma fluoreszcens jele a plazmamembrán közelében erősen megnövekedett, de a vezető peptid nélküli, GFP-vel kapcsolt tripszinogén formánál ilyen mintázatot nem láttunk. Immuncitokémiai vizsgálataink alapján a plazmamembrán közeli GFP fluoreszcencia a kortikális aktinhálózat mellett volt megfigyelhető. Érdekes módon a humán tripszinogén 4 vezető peptidjeire specifikus ellenanyagokkal (p24, p40) végzett immunfestések OGD kezelés esetén csak rendkívül gyenge plazmamembrán közeli kolokalizációt mutattak. Az eredmények alapján feltételezhető, hogy a plazmamembránhoz transzlokálódó, vezető peptidet tartalmazó tripszinogén 4 izoformák vagy aktív tripszinné alakulnak, mely a vezető szekvencia levágódásával jár együtt, vagy az ellenanyagok által detektált epitopok OGD kezelésre elfedődnek. Az utóbbi lehetőség kapcsán elképzelhető, hogy a vezető szekvencia esetleg magába a plazmamembránba ágyazódhat. A kérdés eldöntésére az asztroglia sejteket olyan tripszinogén 4 konstrukcióval transzfektáltuk, amelyben a GFP fehérjét a vezető peptid elé, az N-terminális szakaszhoz fűzionáltuk. Így a tripszinogén aktiválódása, azaz a vezető szekvencia lehasítása a GFP jel lehasításával is együtt jár. Mivel a plazmamembrán közeli GFP jel az OGD kezelést követően is

detektálható volt, valószínűsíthető, hogy a tripszinogén 4 aktivációja a sejten belül nem következik be, de a fehérje valószínűleg a membránhoz kapcsolódik. A tripszinogén 4 izoformák sejten kívüli aktivációját BZiPAR (rhodamine 110 bis-(CBZ-L-isoleucyl-L-prolyl-L-arginine-amide) dihydrochloride fluoreszcens szubsztrátmolekula segítségével elemeztük. A BZiPAR a tripszin mesterséges szubsztrátja, mely elhasítását követően 496 nm-en gerjeszhető és fluoreszcenssé válik, így a tripszin aktivációja és aktivitása élő sejtekben is követhető. Mivel az elhasított BZiPAR fluoreszcencia emissziója 520 nm körül van, a humán tripszinogén izoformák konstrukcióit mCherry-jelöléssel is előállítottuk. Az A izoforma tripszinogén 4-mCherry konstrukcióval transzfektált asztroglia tenyészetekben kontroll körülmények mellett és BZiPAR szubsztrát jelenlétében nem tapasztaltunk fluoreszcens jelet, azaz a BZiPAR nem hasadt el. Az OGD-kezelt tenyészetekben ezzel szemben a hipoxiás kezelés alatt és azt követően is fokozott BZiPAR fluoreszcenciát tapasztaltunk. A BZiPAR hasítását jelző fluoreszcens jelet elsősorban a transzfektált asztroglia sejtek aljzathoz letapadt területén, extracellulárisan detektáltuk, elsősorban ott, ahol a plazmamembránban az mCherry-vel jelzett humán tripszinogén 4 izoforma is felhalmozódott. Eredményeiből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy hipoxiás állapotban a humán tripszinogén A és B izoformák a plazmamembrán közelében lokalizálódnak és aktivációjuk elsősorban a sejtek környezetében, extracellulárisan történik meg.