

**A PACIFASTIN PROTEÁZ-INHIBITOR CSALÁD
SZERKEZET-FUNKCIÓ VIZSGÁLATA
NMR SPEKTROSZKÓPIA ÉS IRÁNYÍTOTT EVOLÚCIÓ
SEGÍTSÉGÉVEL**

Doktori (PhD) értekezés

Szenthe Borbála

Biológia Doktori Iskola

Vezetője: Dr. Erdei Anna
egyetemi tanár, akadémikus

Szerkezeti biokémia doktori program

Vezetője: Dr. Gráf László

Témavezető: Dr. Gráf László
egyetemi tanár, akadémikus



ELTE TTK Biológiai Intézet / Biokémiai tanszék
2008

*„Everything should be made as simple as possible,
but not one bit simpler.”
(Albert Einstein)*

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	3
AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK.....	5
EGYÉB SAJÁT KÖZLEMÉNYEK	5
BEVEZETÉS	6
1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	8
1.1. PROTEÁZOK ÉS INHIBITORAIK – RÖVID ÁTTEKINTÉS	8
1.1.1. <i>Funkció és csoportosítás</i>	8
1.1.2. <i>A szerin proteáz inhibitorok felosztása hatásmechanizmus alapján</i>	12
1.1.3. <i>A szerin proteázok és kanonikus inhibitoraik kölcsönható felszínei.....</i>	15
1.2. A PACIFASTIN CSALÁD	21
1.2.1. <i>A Pacifastin család történetének áttekintése.....</i>	21
1.2.2. <i>A Pacifastin család tagjainak elnevezése.....</i>	21
1.2.3. <i>A Pacifastinok előfordulása és funkciói.....</i>	22
1.2.4. <i>A Pacifastinok térszerkezete és a főlánc dinamikája.....</i>	25
1.2.5. <i>A Pacifastinok in vitro mért inhibíciós aktivitásai</i>	29
1.3. AZ ALKALMAZOTT METODIKÁK RÖVID ISMERTETÉSE	33
1.3.1. <i>A fágbemutató alapjai</i>	33
1.3.2. <i>Az NMR spektroszkópiai adatok rövid magyarázata</i>	35
2. CÉLKITŰZÉSEK	37
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	38
3.1. KOMPETENS SEJTEK KÉSZÍTÉSE	38
3.1.1. <i>PEG-DMSO módszerrel történő kémiai transzformáláshoz</i>	38
3.1.2. <i>CaCl₂-os, hősokkos kémiai transzformáláshoz</i>	38
3.1.3. <i>Elektroporációval történő transzformáláshoz.....</i>	39
3.2. TRANSZFORMÁLÁS	40
3.2.1. <i>Transzformálás kémiai úton - PEG-DMSO módszerrel.....</i>	40
3.2.2. <i>Transzformálás kémiai úton - CaCl₂-os módszerrel, hősokkal</i>	40
3.2.3. <i>Transzformálás elektroporációval</i>	40
3.3. KÜLÖNBÖZŐ PCR-ALAPÚ ELJÁRÁSOK	41
3.3.1. <i>cDNS készítése</i>	41
3.3.2. <i>A cDNS termék PCR-es felszaporítása.....</i>	41
3.3.3. <i>„Megaprimer”-rel történő PCR alapú mutagenézis.....</i>	42
3.3.4. <i>PCR inhibitor könyvtár létrehozásához</i>	42
3.3.5. <i>PCR ligálás ellenőrzéséhez.....</i>	43
3.4. DNS IZOLÁLÁS, TISZTÍTÁS.....	43
3.5. DNS EMÉSZTÉS.....	43
3.6. KUNKEL MUTAGENEZIS	43
3.7. DNS DEFOSZFORILÁLÁS	44
3.8. LIGÁLÁS	44
3.9. DNS KONCENTRÁCIÓ MEGHATÁROZÁS	44
3.10. DNS SZEKVENÁLÁS	44
3.11. M13 FÁG TERMELÉSE ÉS IZOLÁLÁSA	45
3.12. KÖNYVTÁR MÉRET MEGHATÁROZÁSA	45
3.13. KÖNYVTÁR SZELEKCIÓ	45
3.14. FÁG TITRÁLÁS	46
3.15. FÁG ELISA	47
3.16. CITOPLAZMATIKUS FEHÉRJE EXPRESSZIÓ E.COLI SEJTEKBEN	47
3.17. FEHÉRJE IZOLÁLÁSA E.COLI CITOPLAZMÁBÓL	48
3.18. KIMOTRIPSZIN-SEPHAROSE-4B KÉSZÍTÉSE	48

3.19. INHIBITOR IZOLÁLÁS AFFINITÁS KROMATOGRÁFIÁVAL	49
3.20. FEHÉRJE KONCENTRÁCIÓ MEGHATÁROZÁSA	49
3.21. HPLC	49
3.22. A FÚZIÓS FEHÉRJE HASÍTÁSA BRÓMCIÁNNAL	50
3.23. TÖMEGSPEKTROMETRIA	50
3.24. PEPTIDSZINTÉZIS	50
3.25. FEHÉRJESZÉKVENÁLÁS	51
3.26. NMR SPEKTROSKÓPIA	51
3.27. ENZIM AKTÍVHELY TITRÁLÁS	52
3.28. INHIBITOR AKTÍVHELY TITRÁLÁS	52
3.29. K_i MÉRÉSI ELJÁRÁSOK	53
3.29.1. K_i mérés az 1 mM-1 μ M tartományban	53
3.29.2. K_i mérés az 1 μ M-1 nM tartományban fotometriával	53
3.29.3. K_i mérés a 0,1 nM-1 pM tartományban – fluorimetriával-egyensúlyi módszer	54
3.30. FÁGSZELEKTÁLT INHIBITOR SZÉKVENCIAK PÁRONKÉNTI KOVARIANCIA ANALÍZISE	55
3.31. STATISZTIKAI SZIGNIFIKANCIA ANALÍZIS BOOTSTRAP MÓDSZERREL	56
4. EREDMÉNYEK ÉS DISZKUSSZIÓ	57
4.1. AZ SGPI-1 ÉS SGPI-2 INHIBITOROK KLÓNOZÁSA	57
4.2. AZ INHIBITOROK EXPRESSZIÓJA, IZOLÁLÁSA	59
4.3. NMR MÉRÉSEK - TITRÁLÁS	61
4.4. FÁG KONSTRUKCIÓK – A RENDSZER MŰKÖDÉSÉNEK IGAZOLÁSA	66
4.5. FÁG KÖNYVTÁR TERVEZÉSE, ELŐÁLLÍTÁSA	70
4.6. SZELEKCIÓ	73
4.7. STATISZTIKAI ANALÍZISSEL ALÁTÁMASZTOTT KAPCSOLTSÁGOK	79
4.8. INHIBITOROK TERVEZÉSE A SZELEKCIÓ FÉNYÉBEN	83
5. KONKLÚZIÓ	86
KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS	91
RÖVIDÍTÉSEK ÉS MAGYARÁZATOK JEGYZÉKE	92
IRODALOMJEGYZÉK	98
SUMMARY	103
ÖSSZEFOGLALÓ	105

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

Szenthe B, Patthy A, Gáspári Z, Kékesi AK, Gráf L, Pál G. (2007):

„When the surface tells what lies beneath: combinatorial phage-display mutagenesis reveals complex networks of surface-core interactions in the Pacifastin protease inhibitor family”.

J Mol Biol. **370**:63-79.

Gáspári Z, **Szenthe B**, Patthy A, Westler WM, Gráf L, Perczel A. (2006):

„Local binding with globally distributed changes in a small protease inhibitor upon enzyme binding.”

FEBS J. **273**:1831-42.

Szenthe B, Gáspári Z, Nagy A, Perczel A, Gráf L. (2004):

„Same fold with different mobility: backbone dynamics of small protease inhibitors from the desert locust, *Schistocerca gregaria*.”

Biochemistry. **43**:3376-84.

EGYÉB SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

Kondrák M, Kutas J, **Szenthe B**, Patthy A, Bánfalvi Z, Nádasy M, Gráf L, Asbóth B. (2005):

„Inhibition of Colorado potato beetle larvae by a locust proteinase inhibitor peptide expressed in potato.”

Biotechnol Lett. **27**:829-34.

Szenthe B, Frost C, Szilágyi L, Patthy A, Naudé R, Gráf L. (2005):

„Cloning and expression of ostrich trypsinogen: an avian trypsin with a highly sensitive autolysis site.”

Biochim Biophys Acta. **1748**:35-42.

Kutas J, Kondrák M, **Szenthe B**, Patthy A, Bánfalvi Z, Nádasy M, Gráf L, Asbóth B. (2004):

„Colorado potato beetle larvae on potato plants expressing a locust proteinase inhibitor.”

Commun Agric Appl Biol Sci. **69**:281-7.

Gáspári Z., **Szenthe B.**, Gráf L., Perczel A., (2002):

„Internal dynamics of small serine protease inhibitors from the desert locust, *Schistocerca gregaria*.”

Peptides 2002 (Proceedings of the 27th European Peptide Symposium, Sorrento): 754-755.

BEVEZETÉS

Az élő szervezetek felépítésében, az ezekben zajló folyamatok végbevételében és szabályozásában sok ezer különböző fehérje vesz részt. Valószínűleg nincs is olyan életfolyamat, amelynek molekuláris történéseiben ne szerepelnének ezek a makromolekulák. A dinamikusan működő élő rendszerekben ezek a résztvevők folyamatosan cserélődnek. Ehhez a cserélődéshez természetesen egyrészt arra van szükség, hogy az éppen szükséges fehérjék szabályozott módon jöjjenek létre a riboszómákon, másrészt pedig arra, hogy ugyancsak szabályozott módon tűnjenek el, ha már nincs rájuk szükség, vagy esetleg natív állapotukat elvesztették. Ez az eltűnés a peptidkötések hidrolízisén keresztül valósul meg, ami – bár termodinamikai értelemben kedvező, spontán lezajló folyamat-, katalizátor nélkül mégis roppant lassan zajlana a folyamat nagyon magas aktiválási szabadentalpiája miatt. A folyamat katalizátorai a peptidázok, amelyeket (bár a peptidáz a hivatalos elnevezés) az irodalomban legtöbbször proteázokként, vagy proteinázokként említene. Mivel a leggyakoribb elnevezés a proteáz, így a dolgozatban magam is ezt az elnevezést alkalmaztam.

A proteázok tehát nélkülözhetetlen elemei az élő szervezeteknek, de magától értetődik, hogy ezek az enzimek rendkívül veszélyesek is a szervezet számára, hiszen képesek lehetnek lebontani a környezetükben előforduló olyan fehérjéket is, amelyekre az adott pillanatban szükség van. A proteázok működését tehát szabályozni kell. Ennek egyik formája olyan fehérjék jelenléte, amelyek a proteázzal kölcsönhatásba lépve ahelyett, hogy elbomlanának, gátolják a fehérjebontó enzimet. Az ilyen gátlófehérjék legnépesebb csoportja az úgynevezett reverzibilis proteáz inhibitorok. Ezek működésük során a proteázhoz kapcsolódva egyetlen helyen elhasadnak, de továbbra is gátolni képesek. Az ilyen inhibitorok működésének leírására széles körben elterjedt a „Laskowski modell”, amelyet később ismertetek.

Az ELTE Biokémiai Tanszékén Gráf László kutatócsoportjában egy pakisztáni együttműködés kapcsán izoláltak, és bioanalitikai valamint kinetikai vizsgálatokkal jellemeztek két, a Pacifastin családba tartozó reverzibilis proteáz inhibitor. Ezek vizsgálata arra a meglepő felismerésre vezetett, hogy viselkedésüket nem írja le megfelelően a Laskowski modell. Doktori munkám célja az említett jelenség hátterének mind alaposabb kivizsgálása volt. Az okok között felmerült, hogy a molekulák dinamikai

sajátságai lehetnek a felelősek, ezért esett a választás az NMR technológiára, amely kiválóan alkalmas ilyen információk szolgáltatására. Ezzel párhuzamosan egy olyan irányított evolúciós megközelítés, a fág bemutatás alkalmazására is lehetőségem nyílt, amely a szerkezeti és dinamikai ismeretek hiányában is képes lehet megfejtetni, hogy egy-egy funkcionális tulajdonság háttérében a fehérjének melyik részlete játssza a főszerepet.

Disszertációmban e kétféle vizsgálat eredményeit ismertetem, és hasonlítom össze.

1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1. Proteázok és inhibitoraik – rövid áttekintés

1.1.1. Funkció és csoportosítás

Mint a bevezetőben már említettem, a proteázok a fehérjék bontását végző enzimek. Funkciójuk rendkívül változatos. Ez lehet olyan egyszerűbbnek tűnő feladat, mint a tápanyagokban lévő fehérjék peptidekre történő feldarabolása, vagy olyan precízen szabályozott, és a hasított fehérjekötések tekintetében nagy fajlagosságot igénylő feladat, mint a sejtosztódás vagy differenciálódás [Hou és mtsi. 2007], a programozott sejthalál [Thiemmar 2002], a komplementrendszer [Nonaka és mtsi. 2004; Wallis 2007], a véralvadás illetve a véralvadék eltávolítása [Medcalf 2007; Raul és mtsi. 2007], polipeptid hormonok és egyéb fehérjék processzálása [Seidah és mtsi. 1997], és így tovább. Az evolúció során számos módja alakult ki az ilyen folyamatokban szereplő proteázok szabályozásának. Ilyenek például a proteáz inaktív, proenzim formában való termelése, majd proteáz hasításon keresztüli aktiválása, vagy autoaktiválása, a már aktív proteáz egyéb proteázokkal történő hasításon keresztüli inaktiválása, vagy az autoinaktiválás, a proteáz fizikai távoltartása egyéb fehérjéktől vezikulákban való elkülönítés útján, és végül a disszertáció témájául szolgáló mód, az inhibitorokkal történő gátlás.

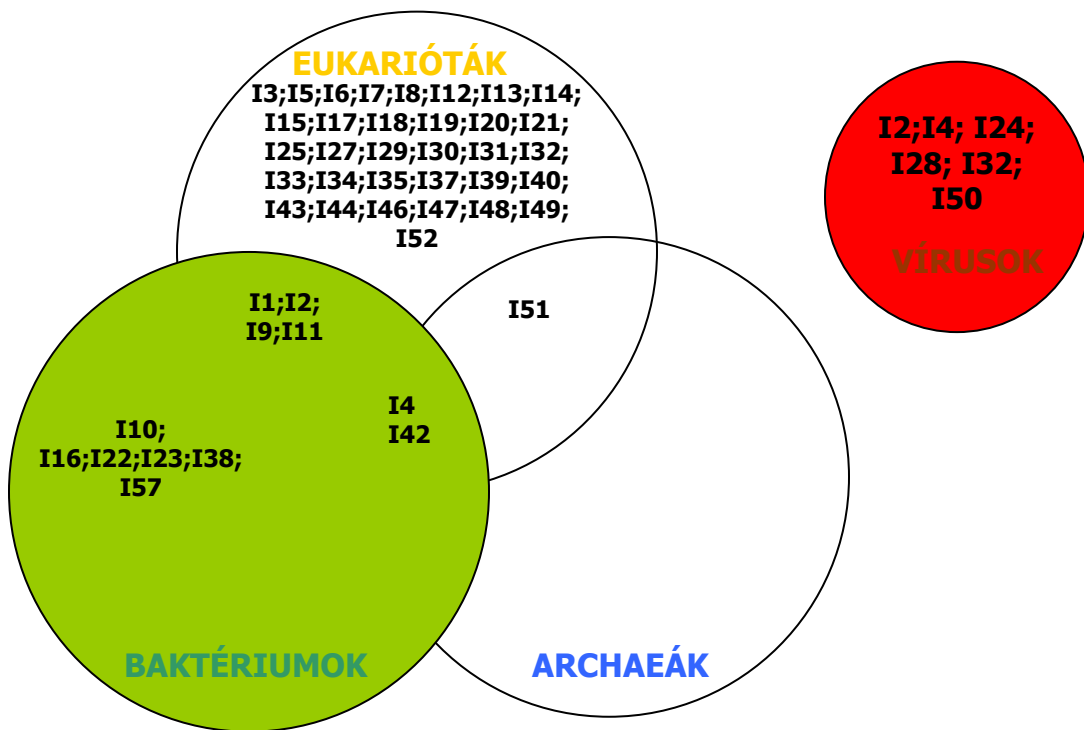
A proteázok szisztematikus csoportosítása a szerint történik, hogy milyen oldallánc, vagy egyéb kémiai csoport játssza a főszerepet a katalízisben. Ez alapján négy csoportot különböztetünk meg: az aszpartil-, a cisztein-, a metallo- és a szerin proteázokat [Berg és mtsi. 2002]. Az egyik legnépesebb, és az ELTE TTK Biokémiai tanszékén régóta kutatott csoport a szerin proteázok. Ezek működési modellje tankönyvi adat, aminek ismertetése túlnyúlna a disszertáció keretein, hiszen az nem a proteázok hatásmechanizmusának eddig fel nem tárt részletével foglalkozik. Az inhibitorok működésének jobb megértése miatt azonban egy vázlatos ismertetés fontos lehet. A szerin proteázok nevüket egy különösen aktív szeril oldallánchról (kimotripszin családban Ser195) kapták, amely képes nukleofil támadást végrehajtani a hasítandó peptidkötés karbonil szénatomján. A különlegesen reaktivitás hátterében egy hisztidin (kimotripszin családban His 57) áll, amely bázisként protont von el a szerintől. A hisztidinen ekkor megjelenő pozitív töltésű

állapotot egy aszparaginsav (kimotripszin családban Asp 102). stabilizálja sókötéssel. Ez a három oldallánc alkotja ezen enzimek aktív helyét, a katalitikus triádot. A reakciósor első felének végén egy acilenzimnek nevezett köztes termék keletkezik, amelyben a katalitikus szerin észter kötést létesít a leendő új C-terminus karboxiljával. Ez a kötés hasad el a reakció második részében egy vízmolekula belépésével. Mind az acilezés, mind a deacilezés során kialakul egy tetraédes átmeneti állapot, amelyet az ún. oxianion üreg stabilizál hidrogénkötésekkel. A legtöbb szerin proteáz esetében van egy jól definiált szubsztrátkötő zseb, ami úgy köti meg a szubsztrátot, hogy annak hasítandó kötése a katalitikus triád számára optimális pozícióba kerül. Az inhibitorok egy része is ezt a szubsztrátkötő zsebet foglalja el (lásd később).

Mind az ismert proteázok, mind az ismert inhibitorok száma óriási. Ez részben annak köszönhető, hogy a proteázok és inhibitoraik klasszikus tárgyai a biokémiai kutatásoknak. A másik ok az, hogy fontos szerepük miatt valóban nagyon sokféle ilyen fehérje alakult ki a természetben, és az utóbbi időszak genomikai és proteomikai adatgyűjtései egyre többet tárnak fel ezekből. A nagy számosság és sokféleség miatt áttekintésük komoly rendszerezést igényelt. A proteázokat és ezek inhibitorait a MEROPS adatbázis rendszerezi [Rawlings és mtsi. 2004; Rawlings és mtsi. 2006]. Az itt megtalálható 4975 (2007. 10. 07-i állapot) proteáz inhibitor szekvencia homológia alapján 56 családba sorolják. Az 56 család közül azokat, amelyeknek van ismert térszerkezettel rendelkező tagja (44 db), a térszerkezet alapján 33 klánba rendezik. Az 56 család közül 22 olyan van, amelyet részben, vagy kizárólag szerin proteáz inhibitorok alkotnak. Az inhibitorok MEROPS adatbázisban található felsorolását, szekvencia homológia, valamint térszerkezeti hasonlóság alapján történő elrendezését az 1.1.1./1 táblázatban mutatom be a következő oldalon. Eredetileg minden klán az „I” (inhibitor) betű és az angol ábécé valamelyik betűjének kombinálásával kapta volna a nevét. Mivel ez nem bizonyult elegendőnek, a soron következő „J” betű is használatra került. Az általam vizsgált Pacifastin inhibitorok térszerkezetük alapján az IW klánba, szekvenciájuk alapján az I19 családba tartoznak, és az S1 klánba tartozó (tehát kimotripszinszerű) szerin proteázokat gátolják

A jelenlegi adatok alapján úgy tűnik, hogy az evolúció során többször is kialakulhattak proteáz inhibitorok. Az inhibitor családok nagy filogenetikai csoportok

szerinti eloszlása alapján a legtöbb inhibitor féleség az eukarióták kialakulása körül jelenhetett meg, hiszen itt van a legtöbb olyan forma, amely kizárólag ebben a csoportban található meg, ahogy azt az 1.1.1./1 ábra Venn diagrammja is mutatja. A diagramm közös területein található klánok esetén sem bizonyos azok közös eredete. Ugyanaz a váz létrejöhetett konvergens evolúcióval is [Rawlings és mtsi.; 2004]. Az eukariótákra jellemző inhibitor családok nagy száma jól korrelál azzal, hogy az eukarióta szervezetekben, - és ez különösen igaz a többsejtű, valódi szövetekkel rendelkező élőlényekre-, sokkal több szabályzás zajlik, mint a prokariótáknál. A sokféle inhibitor család megjelenése részben az ilyen folyamatokban szereplő proteázok regulálása miatt lehetett előnyös az újonnan kialakuló élőlény csoportok számára.



1.1.1./1 ábra Az eddig azonosított, és a MEROPS adatbázis szerint definiált proteáz inhibitor családok előfordulása az élővilágban. [Rawlings és mtsi. 2004]

Klán	Család	Általános név	Cél-proteáz család	Előfordulás	Harmadlagos szerkezeti elemek
IA	I1	Kazal	S1	<i>Meleagris gallopavo</i>	Diszulfidhidas kis fehérjék, α és β szerkezettel
	I5	Ascidian	S1	<i>Holocynthia roretzi</i>	
	I8	Ascaris	S1; M4	<i>Ascaris suum</i>	Diszulfidhidas szerkezet, β elemekkel
	I20	Pot2	S1	<i>Solanum tuberosum</i>	
IB	I2	Kunitz (állati)	S1	<i>Bos taurus</i>	Diszulfidhidas kis fehérjék, α és β szerkezettel
	I52	TAP	S1	<i>Omithodorus moubata</i>	
IC	I3	Kunitz (növényi)	S1; C1; A1	<i>Sagittaria sagittifolia</i>	β -lóhere szerkezet
ID	I4	Serpin	S1;S8;C1;C14	<i>Homo sapiens</i>	Hélix-csokor β -szendvicsel
IE	I7	Squash	S1	<i>Momordica charantia</i>	
	I37	PCI	M14	<i>Solanum tuberosum</i>	„Cisztein-csomó” szerkezet
IF	I12	Bowman-Birk	S1;C1	<i>Glycine max</i>	
	I67	Bromein	C1	<i>Ananas comosus</i>	
IG	I13	Pot1	S1;S8	<i>Hirudo medicinalis</i>	α és β szendvics
IH	I25	Cystatin-1;-2;-3	C1;C13;S8;M12	<i>Homo sapiens; Gallus gallus; Bothrops jararaca</i>	α és β mag, hélix és antiparalel β lemezek
	I47	Latexin	M14	<i>Homo sapiens</i>	
II	I27	Calpastatin	C2	<i>Homo sapiens</i>	
IJ	I6	Cereal	S1	<i>Eleusine coracana</i>	Csak- α szerkezet
IK	I38	Aprin	M10	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	
	I57	StaphostatinA	C47	<i>Staphylococcus aureus</i>	Zárt β -hordó
	I58	StaphostatinB	C47	<i>Staphylococcus aureus</i>	
IL	I39	α_2 M		<i>Homo sapiens</i>	
IM	I14	Hirudin	S1	<i>Hirudo medicinalis</i>	Csomós szerkezet
IN	I11	Ecotin	S1	<i>Escherichia coli</i>	β -szendvics
IO	I15	Antistatin	S1	<i>Haemeneria officinalis</i>	
IP	I17	Elafin	S1	<i>Homo sapiens</i>	„Cisztein-csomó” szerkezet
IQ	I50	P35	C14; C25	<i>Baculovirus; Spodoptera lituranucleopolyhedrovirus</i>	„Görög kulcs” β -szendvics
IR	I33	Ascaris PI3	A1	<i>Ascaris sum</i>	α és β ; „Meander β -lemez” hordószerű szerkezetben
IS	I46	LCI	M14	<i>Hirudo medicinalis</i>	Diszulfidhidas szerkezetű kis fehérjék α és β szerkezettel
IT	I35	Timp	M1; M12	<i>Homo sapiens</i>	Nyitott hordó szerkezet
IU	I36	SMI	M4	<i>Streptomyces nigrescens</i>	„Görög kulcs” β -szendvics
IV	I32	IAP	C14	<i>Homo sapiens</i>	Fémkötő kis fehérjék α β szerkezetekkel
IW	I19	Pacifastin	S1	<i>Locusta migratoria, Schistocerca gregaria</i>	Diszulfidhidas kis fehérjék β elemekkel
IX	I31	Thyropin	C1	<i>Actinia equina</i>	3 egymásba fonódó azonos α hélix
IY	I16	SSI	S8; S1; M4	<i>Streptomyces albobiseolus</i>	α és β szendvics
IZ	I59	Triabin	S1	<i>Triatoma pallidipennis</i>	Nyitott vagy zárt β -hordó
JA	I34	IA3	A1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nem globuláris csak- α szerkezet
JB	I63	-	M43	<i>Homo sapiens</i>	
JC	I9	YIB	S8	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
JD	I18	Mustard	S1	<i>Sinapis alba</i>	
JE	I51	IC	S10	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
JF	I29	CTLA	C1	<i>Homo sapiens</i>	
I-	I10	Marinostatin	S1	<i>Alteromonas sp.</i>	
	I21	7B2	S8	<i>Homo sapiens</i>	
	I24	pinA	S16	<i>T4 bacteriophage</i>	
	I40	Bombyx	S8	<i>Bombyx mori</i>	
	I42	Chagasin	C1	<i>Leishmania major</i>	
	I43	Oprin	M12	<i>Didelphis marsupialis</i>	
	I44	-	M14	<i>Ascaris suum</i>	
	I48	Clitocypin	C1	<i>Lepisat nebularis</i>	
	I49	proSAAS	C1	<i>Homo sapiens</i>	
	I64	Thrombostatin	S1	<i>Haematobia irritans</i>	
	I68	-	C1	<i>Rhipicephalus bursa</i>	
	I71	Falstatin		<i>Plasmodium falciparum</i>	
	I73	Veronica	S1	<i>Veronica herderifolia</i>	
	I74	Variegin		<i>Amblyomma vavatum</i>	

1.1.1./1 táblázat A proteáz inhibitorok csoportosítása és jellemzőik a MEROPS adatbázis szerint (2007. 10. 07.).

A szerin proteáz inhibitorokat tartalmazó családokat halványkékkel emeltem ki.

1.1.2 A szerin proteáz inhibitorok felosztása hatásmechanizmus alapján

Hatásmechanizmus alapján alapvetően három csoport létezik [Bode és Huber 1992; Otlewski és mtsi 2005], amelyek közül részletesen csak a reverzibilis inhibitorokat mutatom majd be, mivel az általam vizsgált inhibitorok ebbe a csoportba tartoznak. A másik két csoportról csak a legjellegzetesebb tulajdonságokat emelem ki az összehasonlítás kedvéért.

1.1.2.1. Nem-kanonikus inhibitorok

Talán elsőre furcsa lehet, hogy egy ilyen negatív módon definiált csoporttal kezdem, de annak érdekében, hogy a felsorolást a legrészletesebben tárgyalta, általam is vizsgált csoporttal fejezzem be, ez tűnik a leglogikusabb sorrendnek. A többi inhibitor típustól eltérően a nem-kanonikus inhibitorok a proteázzal nem úgy lépnek kapcsolatba, mint egy szubsztrát molekula, ugyanis vagy nem kötődnek a katalitikus triádhoz közeli szubsztrátkötő zsebhez, vagy nem úgy kötődnek, hogy eközben egy peptidkötés a katalitikus triádhoz pozícionálódna. Ezért ezek a molekulák nem is hasadnak el a kapcsolódás eredményeképpen. Kérdés tehát, hogy vajon hogyan működnek? A mechanizmus jól szemléltethető a csoport klasszikus tagján, az orvosi pióca hirudin nevű fehérjéjén keresztül. A hirudin nagy hatékonysággal gátolja a véralvadás kulcsenzimét a trombint. Alapvetően két területen kötődik a molekulához. Az egyik a szubsztrátkötő zseb, de ide nem a fehérje egy belső részlete, hanem az N-terminális végcsoportja kerül, tehát a katalitikus triád közelébe nem kerül peptidkötés. A hirudin C-terminálisa felé eső része a trombinnak egy szubsztrátkötő zsebtől távolabb eső, de a nagy fehérje szubsztrátok, és egyéb szabályzó molekulák megkötése szempontjából kiemelkedően fontos, úgynevezett „exosite” részéhez kapcsolódik. A két kötés együttesen igen szoros kölcsönhatást biztosít az enzimmel. Hasonló működésű inhibitor a kullancsban megtalálható ornithodorin is. [Bode és Huber 2000].

1.1.2.2. Irreverzibilis inhibitorok

Ebbe a típusba egyetlen klán,(az ID klán) egyetlen családjának (I4 család) tagjai tartoznak. Jóllehet egyetlen családról van szó, mégis ez az egyik legelterjedtebb inhibitorfajta, hiszen ahogy azt az 1.1.1./1 ábra is mutatja, az élőlények mindhárom nagy filogenetikai csoportjában előfordulnak, és egyes vírusok is használják ezt a típust működésük során. Az irreverzibilis inhibitorok szubsztrátszerű módon lépnek

kapcsolatba a proteázzal egy felszíni, „reaktív hurok” részen keresztül, amin egyetlen konkrét aminosav pozíció (a P1, lásd később) mentén a peptidkötés el is hasad a kölcsönhatás eredményeként. Ami ezután történik, az alighanem az egyik legérdekesebb folyamat, amit proteázok gátlásával kapcsolatban eddig leírtak: a hasítás során keletkező kovalens acilenzim nem hidrolizál el azonnal, tehát stabil kovalens kapcsolat alakul ki az enzim és az inhibitor között. Az inhibitor komoly szerkezeti változáson megy keresztül, ugyanis az elhasadt reaktív hurok proteázt is hordozó részlete mintegy 180 fokot elfordul, és beékelődik az amúgy is β -redős szerkezetű inhibitorba egy új antiparallel β -redőt hozva létre. Ennek eredményeként az inhibitor szerkezete stabilizálódik, miközben az enzim szerkezete torzul, és ezért nem képes egy vízmolekula segítségével a szokásos módon befejezni a katalitikus ciklus második részét, a deacilezést. A szerpinek azért irreverzibilis inhibitorok, mert ez a folyamat nagy negatív szabadentalpia változással jár, tehát gyakorlatilag nem megfordítható. Mivel az ilyen inhibitor „egyszer használatos”, ezeket öngyilkos inhibitoroknak is szokták nevezni. Az ebbe a csoportba tartozó fehérjék egy doméneseek, méretük a három csoport közül a legnagyobb (45-55 kDa). Idetartozik például az α -1-antitripszin és az antitrombin [Huntington 2006, Silverman és mtsi. 2001].

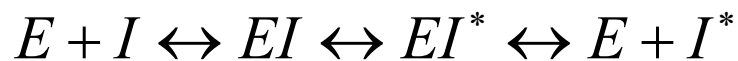
1.1.2.3. Reverzibilis inhibitorok

Habár az irreverzibilis inhibitorok hatásmechanizmusa látványosabb, megkockáztatom, hogy a reverzibilis inhibitorok működése rejtelmesebb. Az ebbe a csoportba tartozó, úgynevezett kanonikus inhibitorok ugyanis szintén egy reaktív hurok régióan keresztül, és szintén szubsztrátszerűen reagálnak az enzimmel, majd el is hasadnak, de ez a reakció nem jár nagy szerkezeti változással, tehát sem az enzim szerkezete, sem az inhibitoré nem változik meg lényegesen. Ennek ellenére a folyamatot nem kíséri egyéb kötések elhasadása, az inhibitor nem bomlik le szubsztrát-fehérjeként, ugyanis az egyetlen kitüntetett helyen való hasadás eredményeként keletkezett inhibitor továbbra is aktív marad, így gátolni képes az enzimet. A reakció tehát egyensúlyra vezet, beáll egy enzim-inhibitor párra jellemző arány a hasítatlan és a hasadt inhibitor formák között (innen ered ennek a proteáz inhibitor csoportnak a neve). Ennek érdekességét talán a következőképpen lehet legjobban megvilágítani: a hasadt inhibitor homogén formában izolálható, és a rá specifikus proteázzal összekeverve újra beáll az egyensúly a hasadt és

hasíthatlan formák között, tehát ekkor a proteáz éppenséggel a peptidkötés helyreállítását katalizálja. Ennek az alapmechanizmusnak az első pontos leírását Laskowski szolgáltatta a hatvanas években [Finkenstadt és Laskowski 1967], és „standard” mechanizmusnak nevezte el ezt a típust [Laskowski és Kato 1980]. Ma már reá való tisztelettel az irodalom ezt az alap mechanizmust Laskowski mechanizmusnak nevezi, és a disszertáció későbbi részében én is így nevezem majd. Már most megjegyzem, hogy a megfigyeléseink nem ezzel az alapmechanizmussal vannak ellentmondásban, hanem az erre az inhibitor csoportra vonatkozó, ennél szigorúbb kitételekkel, amelyeket később ismertetek.

Ezen inhibitorok „kanonikus” elnevezése valójában a felszíni hurok tulajdonságára utal. Ez a hurok ugyanis méretét, konformációját tekintve szinte azonos mindegyik ilyen mechanizmussal működő proteáz család esetén, függetlenül attól, hogy az inhibitor többi része milyen térszerkezetű [Bode és Huber 1992]. Ezért gyakran szinonimként használják a „standard mechanizmusú”, és a „kanonikus” kifejezéseket. Ez azonban félrevezető lehet, ugyanis bár az eddig megismert összes kanonikus inhibitor valóban standard mechanizmussal működik, a feltételezések szerint nem minden standard mechanizmussal működő inhibitor rendelkezik a már említett kanonikus szerkezetű hurokkal. A két fogalom tehát nem szinonim [Laskowski JR és Qasim 2000].

A Laskowski mechanizmus reakciósémája az 1.1.2./1 egyenlet szemlélteti.



1.1.2./1. egyenlet

Ahol E: enzim, I: inhibitor, EI: Enzim-Inhibitor komplex, I*: hasított inhibitor, EI*: az enzim és a hasított inhibitor komplexe.

Az, hogy a hasított inhibitor is aktív arra enged következtetni, hogy az ép és a hasított inhibitor szerkezete nagyon hasonló [Niekamp és mtsi. 1969; Bode és Huber 1992].

A reverzibilis inhibitorok hatékonyságát az enzim-inhibitor komplex disszociációs állandójával jellemzik, amit ebben az esetben az inhibícióra való tekintettel a szokásos K_d helyett K_i -vel jelölnék. Ezt az adatot tipikusan olyan körülmények között mérik, amikor az enzim-inhibitor rendszer termodinamikai egyensúlyban van. Ilyenkor eltekintve attól, hogy egyszerre kétféle (hasíthatlan és hasított) aktív inhibitor van jelen a rendszerben, a K_i értéke az 1.1.2./2. egyenlet szerint alakul. Természetesen minél alacsonyabb értékű a K_i ,

annál szorosabb a komplex, annál alacsonyabb koncentrációk esetén is mérhető a gátlás, tehát annál hatékonyabb az inhibitor.

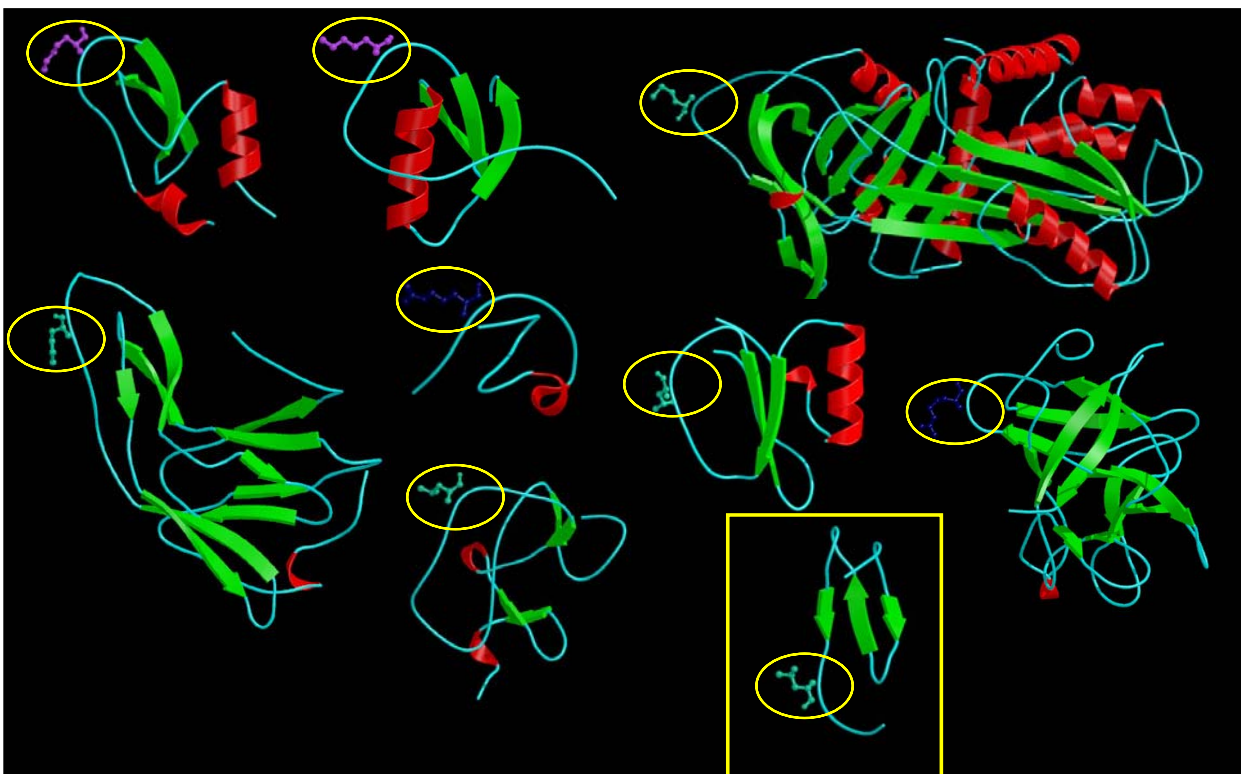
$$K_I = \frac{[E] * [I]}{[EI]}$$

1.1.2./2. egyenlet

Ahol [E]: szabad enzim koncentrációja, [I]: szabad inhibitor koncentrációja, [EI]: az enzim-inhibitor komplex koncentrációja

1.1.3. A szerin proteázok és kanonikus inhibitoraik kölcsönható felszínei

A kanonikus inhibitorok csoportját kis és közepes méretű (3-21 kDa) fehérjék, illetve fehérje modulok alkotják. Ilyenek például a szarvasmarha bázikus pankreatikus inhibitora (BPTI), a szójabab tripszin inhibitor (STI) és az elsőként madártojásokból izolált ovomukoid inhibitorok, amelyek vizsgálatával Laskowski megalapozta a standard hatásmechanizmus leírását. Összesen 18 különböző inhibitor klán ismert, azaz legalább ennyiféle fehérjeszerkezet képes reverzibilis inhibitor funkcióra. Ezek az azonos funkció ellenére meglehetősen eltérő szerkezetek látványosan azonos szerkezetű felszíni proteázköti hurokkal rendelkeznek [Krowarsch és mtsi. 2003], amint azt az 1.1.3./1 ábra PDB adatbázisból származó, önkényesen kiragadott példái mutatják. Az eltérő szerkezeteken megjelenő azonos jellegű hurok a konvergens evolúció egyik szép példája. Az, hogy a gyakorlatilag azonos hurokszerkezeteket nagyon eltérő vázszerkezetek hordozzák önmagában is arra utal, hogy a közös funkció betöltésében a közös szerkezetű, (lásd kanonikus) hurok, döntő szerepet játszik, ami kiindulópontja lett a részletes Laskowski modell kidolgozásának. Ez utóbbit az interakcióban résztvevő csoportok Schechter és Berger által bevezetett nevezéktanának tisztázása után ismertetem.

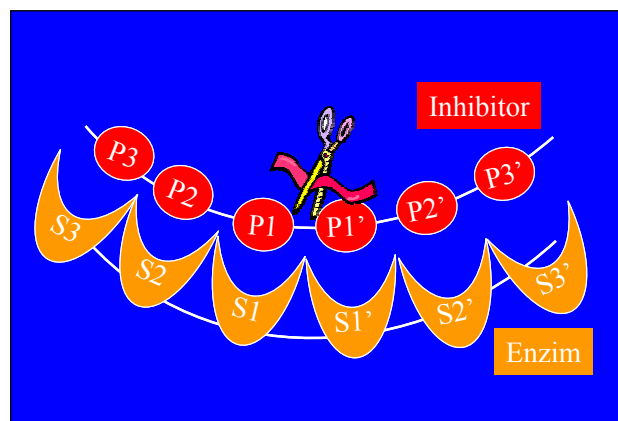


1.1.3./1. ábra Önkényesen kiragadott kanonikus inhibitor szerkezetek a PDB adatbázisból.

A látványosan eltérő vázszerkezetek nagyon hasonló méretű és konformációjú hurok részeket hordoznak, az ellipszissel határolt oldallánc a gátolt enzim szubsztrátkötő zsebébe nyúlik. A bekeretezett molekula az általam is vizsgált Pacifastin család egyik tagja. (Az egyes formák nevét az azonosságok hangsúlyozása miatt nem jelölöm).

1.1.3.1. A Schechter-Berger nevezéktan

A legtöbbet vizsgált, az S1 klánba tartozó kimotripszinszerű szerin proteázok a peptidszubsztrátokkal illetve a szubsztrátszerű inhibitorokkal jellegzetes elrendeződésben kapcsolódnak. A szubsztrát (illetve inhibitor) egyik aminosav csoportjának oldallánca egy kötőzsebbe nyúlik. Schechter és Berger ezt az oldalláncot P1-nek nevezte el, míg az enzim oldaláról ez a stabilizáló kötőzsebb az S1 elnevezést kapta. A P1 oldallánctól N-terminális felé haladva rendre a P2, P3 stb. csoportok következnek, míg a P1-től a C-terminus felé haladva P1', P2' stb. nevet kapják a csoportok. Az ezen csoportokat stabilizáló enzim felszínek a P1-S1 pár példjaként S2, S3, S2', S3' stb. elnevezést kaptak. Ezt a sémát az 1.1.3./2. ábra szemlélteti.



1.1.3./2. ábra A kanonikus inhibitor-proteáz kapcsolat sematikus szemléltetése. A Schechter és Berger nevezéktan szerint.

Az inhibitor részéről a P jelölések egy-egy aminosav csoportot jelentenek, a kötéshasadás a P1 és P1' csoportok között következik be. Az S jelölések a megfelelő P jelű csoportokat stabilizáló funkcionális kötőhelyeket jelzik. A kimotripszin szerű enzimeknél az S1 maga a szubsztrátkötő zseb.

1.1.3.2. A proteáz-inhibitor kapcsolat részletesebb bemutatása

Az S1 klán enzimeit, például a tripszint, a kimotripszint és az elasztázt közismerten módon leginkább a szerint az oldallánc szerint szelektálnak a szubsztrátok között, amelyik oldallánctól C-terminális felé eső peptidkötést hasítják. A Schechter-Berger nevezéktan szerint ezek az enzimek tehát leginkább a P1 aminosav csoport szerint szelektívek. A P1 és az S1 zseb viszonya klasszikus tankönyvi példa: a tripszin zsebe negatív töltésű aszparaginsavat tartalmaz, és ennek megfelelően a pozitív töltésű arginil és lizil P1 oldalláncokat stabilizálja, a kimotripszin zsebe viszonylag nagy és apoláros, és ennek megfelelően a fenilalanin, triptofán, tirozin és leucin P1 oldalláncokat kedveli, míg a hasnyálmirigy elasztáz a szűkebb zsebe miatt leginkább az alanin P1 mellett hasít. Ennek megfelelően jól ismert, hogy a tripszinszerű specifikus enzimek kanonikus inhibitorai arginin vagy lizin P1 hellyel rendelkeznek, míg pl. a kimotripszinszerű enzimek inhibitorainál gyakori a leucin.

A P1-S1 kölcsönhatáson kívül egyéb kapcsolatok is kialakulnak. Röntgen kristallográfiai vizsgálatok alapján tudjuk, hogy a proteáz-inhibitor kapcsolatokban a minimális kötőfelszín a P3-P3' tartomány, ez minden esetben lefedésre kerül. A kötőhely

rendszerint nem mutat túl a P6-P6' tartományon, bár néha más szakaszokon keresztül egyéb kötések is kialakulnak az inhibitor és az enzim között. Bár az S1 klánban a P1 szerepe kimagasló, egyéb oldalláncok is komoly szerepet játszhatnak, a P1' szerepe például gyakran szintén fontos. A szubsztrát illetve inhibitor P3-P1 peptidlánc szakasza az enzimmel kapcsolódva egy antiparallel β -redőt alkot, amit tehát főlánc csoportok között kialakuló hidrogénhidak stabilizálnak. A P1 aminosav karbonil oxigénje az oxianion üreg felé mutat és az enzim Gly193 és Ser195 aminosav csoportok (kimotripszin számozás) amid részével alakít ki hidrogénkötést.

A reaktív peptidkötés a röntgenszerkezetekben rendszerint ép, de egyes esetekben eltér a síkalkattól, tehát a tetraédes átmeneti állapot felé mozdul el [Bode és Huber 1992]. Az egyes inhibitorok szabad és proteázhoz kötött szerkezetének további elemzése azt mutatta, hogy a kanonikus hurkot alkotó aminosavak gerinc konformációját jellemző ϕ ψ diéderes szögek mind a szabad, mind a kötött formában azonos tartományba esnek a Ramachandran diagrammon [Laskowski és Qasim 2000]. Ezen adatok alapján elfogadottá vált erre a kölcsönhatásra is az Emil Fischer által korábban megfogalmazott híres „kulcs-zár” modell, amelyben merev szerkezetű kötőpartnerek előre formált kötőhelyei úgy illeszkednek össze, hogy azt nem kíséri konformációs változás. Ebben az esetben tehát az inhibitor reaktív hurka egy olyan merev és meghatározott konformációval rendelkezik, ami éppen az enzim aktív helyébe illik, akárcsak a kulcs a zárba [Laskowski és Qasim 2000].

Mindezek alapján a specifikásért felelős P1 oldallánc jellege mellett, a kanonikus hurok megfelelő konformációja, és merev szerkezete is kiemelkedően fontos egy erős kölcsönhatás létrejöttében [Bode és Huber 1992; Kelly és mtsi. 2005]. Ezt a feltételezést a szerkezeti adatok mellett a következő eredmények is alátámasztják: az ovomukoid és az eglin C inhibitorok kötő hurkával analóg oktapeptidekkel mérték inhibíciós állandót, és összevetették a kapott értékeket a megfelelő vad típusú inhibitorokon mért adatokkal. Specifikás szempontjából a peptidek és az inhibitor fehérjék analóg eredményeket adtak, de a kötése erősség rendre jóval alacsonyabb volt a peptidekkel. A számítások alapján az inhibitor szerkezete -33 kJ/mol kötési energia hozzájárulást jelentett, amit a feltételezések szerint a hurok stabilizálásán, mereven tartásán keresztül biztosít a fehérjeváz [Bode és Huber 1992].

1.1.3.3. A Laskowski modell

Laskowski és munkatársai számos zseniális ötlet, és mintegy 20 évnyi kitartó munka után a Kazal típusú ovomukoid inhibitorokra (IA klán I1 család) kidolgozott egy olyan szekvencia-reaktivitás algoritmust (SRA), ami alapján elég nagy pontossággal meg lehetett jósolni egy-egy konkrét inhibitor variáns egy-egy adott proteázzal alkotott komplexének stabilitását, tehát a K_I értéket. Az SRA algoritmus elméleti háttérében ugyanaz a gondolat áll, mint a híres Anfinsen kísérletben, tehát az, hogy egy fehérje elsődleges szerkezete egyértelműen meghatározza a térszerkezetet, és ez utóbbi a fizikokémiai tulajdonságokat. A standard mechanizmusú, kanonikus hurokkal rendelkező inhibitorok kulcs-zár jellegű proteáz kötésének, tehát a merev szerkezetek kapcsolódásának alapján Laskowski úgy vélte, hogy ez lehetőséget teremt arra, hogy az inhibitor oldaláról nézve az egyes aminosav csoportok egymástól független módon fejtsék ki a hatásukat, így a proteáz kötés kötési energiájában az ilyen egyedi, pozíciónkénti hozzájárulások egyszerűen összeadhatók, idegen szóval additívak. Egy-egy adott pozícióban szereplő csoport hozzájárulásának mértéke természetesen attól függ, hogy éppen milyen aminosav csoport szerepel az adott helyen, és attól, hogy milyen proteázhoz kötődik az inhibitor. Az algoritmus kifejlesztéséhez szükséges mérési adatokat heroikus munkával gyűjtötték össze, amennyiben első lépésben 92 egyedi ovomukoid inhibitor variánst izoláltak, és ezek K_I értékét megmérték 6 különböző proteázzal szemben. Az így kapott hatalmas adatmennyiségből számolták ki, hogy egy-egy aminosav típus egy-egy pozícióban és egy-egy adott enzim esetében mennyivel járul hozzá a kötési energiához. Ezek után additivitást feltételezve még nem létező variánsok aktivitását jósolták, és a jóslásokat utólag kísérletesen tesztelték. Azt kapták, hogy az algoritmus az esetek túlnyomó részében megbízható volt. Ez természetesen visszamenőlegesen igazolta a hipotézisüket az inhibitor alapmechanizmusával kapcsolatban [Lu és mtsi. 2001].

Jóllehet ez már önmagában hatalmas eredmény volt, felmerült, hogy vajon ez a „Laskowski modellnek” is nevezhető leírás igaz-e bármely más kanonikus inhibitorra is. Ez azért tűnt jogosnak, mert az algoritmusban sem szerepeltek olyan faktorok, amelyek a fehérje kötőhurkon kívüli vázszerkezetére utaltak volna. A Laskowski modell tehát azt javasolja, hogy a vázszerkezet egy fontos, de passzív résztvevő, amely a hurok régiót

tartja mereven, de az egyik vázzal tartott hurok részről szerzett információk átvihetők egy másik vázzal megtartott, azonos hosszúságú hurokrészre. A hipotézist kísérlet követte, és először csak a P1 tekintetében, később pedig más pozíciók esetében is ellenőrizték, hogy azok a hozzájárulás értékek, amiket a Kazal típusú ovomukoidokra kaptak, helytállóak-e az IG klán I13-as családjába tartozó, az orvosi piócából izolálható eglin C nevű inhibitorra, amely az ovomukoidokhoz hasonlóan kedvelt modell fehérjéje a kutatásoknak. Az eredmények azt mutatták, hogy az egyedi kötésienergia hozzájárulások az eltérő vázszerkezetek ellenére közel azonosak voltak [Qasim és mtsi. 1997 és 2006]. A jelenség fontosságának hangsúlyozására egy új elnevezést is bevezettek: „interscaffolding additivity”, vagyis vázszerkezetek közötti additivitás.

A Laskowski modell fő állításai tehát összefoglalva a következők: a standard mechanizmusú kanonikus inhibitorok változatos vázakkal megtámasztott merev szerkezetű kötőhurokkal rendelkeznek, amelyen az egyes oldalláncok egymástól, és a tartóvázról függetlenül fejtik ki hatásukat. Kötési hozzájárulásuk mértéke csak attól függ, hogy éppen milyen proteázzal alakul ki a komplex. A tartóváz csak passzív szereplő.

Az ELTE Biokémiai Tanszékén már régebb óta vizsgált, Pacifastin családba tartozó inhibitorok K_I mérései olyan eredményekre vezettek, amelyek komoly ellentmondásban álltak a Laskowski modell utóbb említett szabályával. A családon belül sem volt igaz, hogy az egyik inhibitor hurokrészén tapasztalt aminosav-hozzájárulások megegyeztek volna a másik inhibitor esetén tapasztaltakkal. A részleteket alább ismertetem, de már most megjegyzem, hogy ennek az ellentmondásnak a feltárását és magyarázatát célozta a doktori munkám.

1.2. A Pacifastin család

1.2.1. A Pacifastin család történetének áttekintése

Az ebbe az inhibitor családba tartozó fehérjét először 1987-ben izolálták a *Pacifastacus leniusculus*, (jelzőrák) faj hemolimfájából és írták le Pacifastin néven az egy nehéz és egy könnyűláncból álló fehérjét [Hergenhalm és mtsi. 1987]. A fehérje szekvenciáját tíz évvel ezután határozták meg. Kiderült, hogy a nehézlánc a transzferrinekkal rokon, míg a könnyű láncon kilenc cisztein-gazdag domén található [Liang és mtsi. 1997]. Időközben ezekkel a doménnel homológiát mutató, proteáz inhibitor aktivitású fehérjéket izoláltak a *Locusta migratoria* (keleti vándorsáska) [Brehelin és mtsi. 1991; Boigegrain és mtsi. 1992; Nakakura és mtsi. 1992; Kellenberger és mtsi. 1995] majd a *Schistocerca gregaria* (afrikai vándorsáska) [Hamdaoui és mtsi. 1997; Hamdaoui és mtsi. 1998; Vanden Broeck és mtsi. 1998; Boigegrain és mtsi. 2000].

Az így feltárt szekvenciák összehasonlításából a ciszteinek szabályos ritmusa alapján egy konzervált motívum bontakozott ki az alábbi mintázat szerint:



Az aminosavak egybetűs kóddal szerepelnek, az X variábilis pozíciót jelöl, a ciszteinek közötti pozíciók számát alsó indexben tüntettem fel. A hat sorszámozott cisztein 3 diszulfidhidat alkot az alábbiak szerint: C¹-C⁴, C²-C⁶ és C³-C⁵, ami a gyakran alkalmazott, idevonatkozó jelölés szerint az *abcacb* mintázatot adja. A szerkezetről kissé később részletesen is írok.

1.2.2. A Pacifastin család tagjainak elnevezése

A párhuzamosan kutatások kellemetlen velejárója lett az, hogy több eltérő néven is megjelent ugyanazon faj ugyanazon inhibitora. Ez zavaros nevezéktanhoz vezetett. Ezért Simonet és munkatársai később bevezetésre javasoltak egy egyezményes nevezéktant a következő logika szerint: a nemzettség és fajnév rövidítése egy-egy betűvel, majd PI

(mint Pacifastin-szerű Inhibitor), és a felfedezés sorrendjében egy sorszám. A már említett *L. migratoria* és *S. gregaria* fajok esetében az inhibitor nevek tehát a következőnek adódnak: LMPI-x illetve SGPI-x, ahol x a sorszámot jelöli. A disszertációmban én is ezt a nevezéktant fogom követni, de az 1.2.1./1. táblázatban megadom a korábbi elnevezéseket is, illetve a szövegben is visszatérek némelyikükre, mivel a régi elnevezések néha jobban tükrözték a (vélt vagy valós) specifikációkat (lásd később).

Egységesített név	Korábbi nevek	<i>In vitro</i> gátolt enzim	Publikáció
SGPI-1	SGTI	szarvasmarha tripszin; rák tripszin	Malik és mtsi. 1999
SGPI-2	SGCI	α -kimotripszin	Boigegrain és mtsi. 2000; Malik és mtsi. 1999
LMPI-1	LMCI-I	α -kimotripszin	Boigegrain 1992; Brehelin 1991
	PMP-C		Nakakura 1992
LMPI-2	LMCI-II	Pankreatikus elasztáz	Boigegrain 1992; Brehelin 1991
	PMP-D2	szarvasmarha tripszin	Nakakura 1992
LMPI-3	HI	α -kimotripszin	Kellenberger 1995

1.2.2./1. táblázat A vándorsáska fajokból eddig izolált és leírt Pacifastin inhibitorok elnevezései

SGPI: *Schistocerca gregaria* Protease Inhibitor; LMPI: *Locusta migratoria* Protease Inhibitor; LMCI: *Locusta migratoria* Chymotrypsin Inhibitor; PMP: Pars Intercerebellaris Major Peptide

1.2.3. A Pacifastinok előfordulása és funkciói

A legtöbbet vizsgált fehérjék az LMPI-1, LMPI-2, SGPI-1, SGPI-2, így a továbbiakban az ezekről ismert adatokat írtam le. Az LMPI-1 és az SGPI-1 egymás ortológjai, csakúgy, mint az LMPI-2 és az SGPI-2. Az egy fajon belüli inhibitorok (LMPI-1 és LMPI-2, illetve SGPI-1 és SGPI-2) egymás paralógjai.

A Pacifastin inhibitorok valószínűleg túl kicsik ahhoz, hogy önálló fehérjeként termelődjenek a riboszómákon. Bár a 30-40 aminosavas peptidek gyakran önálló formában is izolálhatók az élőlényből, valójában – ahogy azt első izolálásuk esetében is láttuk –, mint többdoménos fehérjék moduljai termelődnek. Az önálló egydoménos formák tehát utólagos enzimatiszálás eredményeként jönnek létre. A leggyakoribb

domének közötti, a processzáskor elhasadó szekvencia egy Lys-Arg részletet tartalmaz. A processzást végző enzimet egyelőre nem azonosították, de a szekvencia jellege miatt egy furin-szerű processzázó enzim lehet.

Az inhibitorok expressziós mintázatát mindkét vándorsáska fajban megvizsgálták, főleg mRNS szinten [Kromer és mtsi. 1994; Vanden Broeck és mtsi. 1998; Hamdaoui és mtsi. 1998; Simonet és mtsi. 2002b; Simonet és mtsi. 2002c; Rahman és mtsi. 2002; Simonet és mtsi. 2004; Simonet és mtsi. 2005]. Azt találták, hogy az inhibitorok lárváállapotban a zsírtestben, az agyban, az elő és utóbélben és a hemolimfában fejeződnek ki, míg a kifejlett egyedekben, a fent említett szervek mellett a petefészekben és a herékben is megjelennek. A génexpresszió szintje változik a peteérés során, illetve hormonkezelés hatására, és különbözik a nőstény és a hím egyedekben. Ezek alapján az inhibitoroknak szerepük lehet a peteérést és az egyedfejlődést szabályozó folyamatokban [Boigegrain és mtsi. 2000; Simonet és mtsi. 2002a].

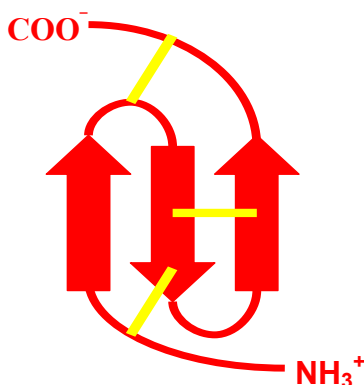
Emellett nagy érdeklődésre tarthat számot, hogy az expressziós szint életciklustól függő szintet mutat olyan értelemben is, hogy az éppen nem-vándorló, kis csoportokban élő egyedekben más, mint az éppen vándorló fázisban lévőknél, tehát a sáskajárásban résztvevő egyedekben. Sáskajárás során az egyik jellemző változás, hogy az egyedek színe sötétebb lesz, melanin termelődik. A melanint a polifenoloxidáz enzim termeli. Ennek az enzimnek fontos szerepet tulajdonítanak a rovarok immunrendszerében is, mivel a működése során keletkező polifenolok antimikrobiális hatásúak. A polifenoloxidáz enzimet egy kaszkádszerűen aktiválódó proteáz rendszer aktiválja.

A feltételezések szerint tehát többek között ezen proteáz kaszkád szabályozásában is részt vehetnek a Pacifastin inhibitorok [Schoofs és mtsi. 1997; Kanost 1999; Simonet és mtsi. 2003].

Gáspári Zoltán, aki az ELTE Szerves Kémia Tanszékén dolgozik, a Pacifastin családra jellemző cisztein mintázat alapján ellenőrizte, hogy az éppen elérhető adatbankokban a már ismert fajokon kívül melyek esetében lehet Pacifastin-családba sorolható szekvenciára lelni. Bioinformatikai analízise eredményeként azt kapta, hogy a Pacifastinok rendre ízeltlábú fajokban voltak detektálhatóak. A szigorú rendszertani specifikusságnak azonban ellentmondani látszik az a meglepő tény, hogy Pacifastin szekvenciák a termesztett rizs genomjában is kimutathatók [Gáspári és mtsi. 2004].

1.2.4. A Pacifastinok térszerkezete és a főlánc dinamikája

A Pacifastin családba tartozó inhibitorok kis molekula méretűek, 35-47 aminosavasak. A család meglehetősen homogén abban az értelemben, hogy az egyes tagok közötti átlagos szekvencia identitás 40 % körüli. Mint már említettem, a diszulfid hidak mintázata az összes Pacifastin inhibitorban azonos (1.2.3./1. ábra) [Simonet és mtsi. 2003; Gáspári és mtsi. 2004]. A proteázokkal kölcsönható reaktív hurok a molekula C-terminálisán helyezkedik el [Nakakura és mtsi. 1992; Boigegrain és mtsi. 1992]. A kis méretnek köszönhetően, az NMR spektroszkópia különlegesen alkalmasnak bizonyult ezek szerkezetének felderítésére [Mer és mtsi. 1994; Mer és mtsi. 1996a; Mer és mtsi. 1996b; Gáspári és mtsi. 2002]. A legelső vizsgálatokban az LMPI-1 és LMPI-2 inhibitorok szerkezetét fejtették meg [Mer és mtsi. 1994; Mer és mtsi. 1996a; Mer és mtsi. 1996b]. A térszerkezetet 3 diszulfid híd által közre fogott 3 β -redő alkotja (1.2.4.1. ábra).



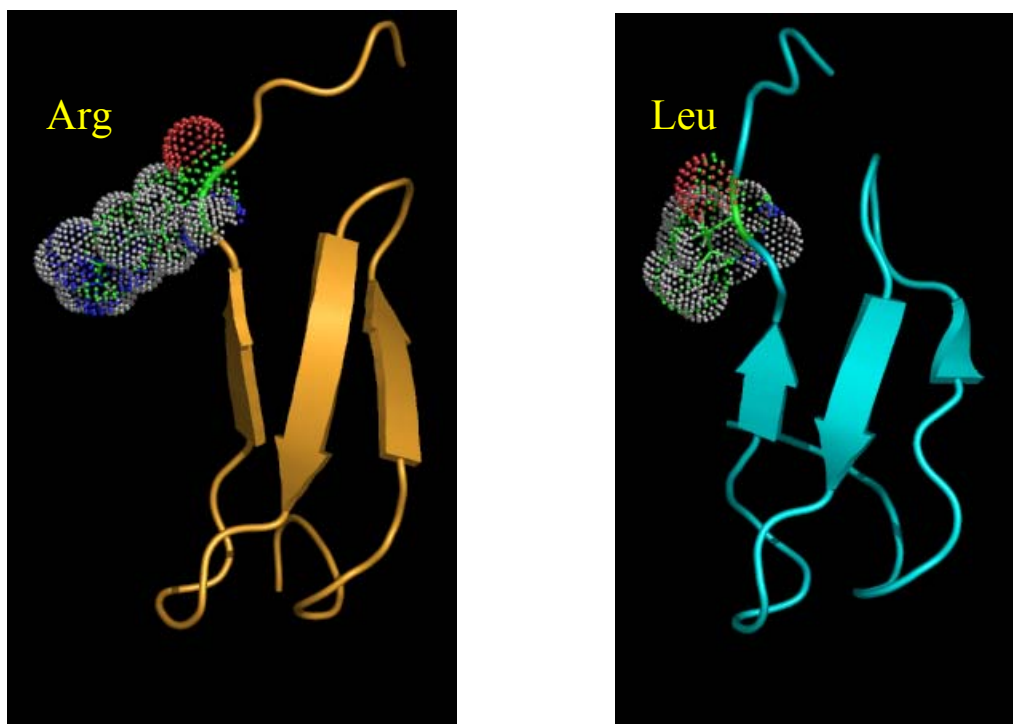
1.2.4./1. ábra. A Pacifastinok szerkezeti felépítésének sematikus modellje.

A szerkezet kompakt, és korábbi tanszéki eredmények szerint nagyon stabil, hiszen a mérések szerint olvadáspontjuk meghaladja a 85°C fokot. Hasonlóan kompakt és stabil, diszulfidhidas β -szerkezeteket korábban különböző toxinok esetén is leírtak már [Norton és mtsi. 1998; Flinn és mtsi. 1999; Craik és mtsi. 2001].

A két vándorsáska fajból izolált LMPI-2, illetve SGPI-2 molekulák a 9-es pozícióban lévő treonin oldalláncon fukóz csoporttal módosítottak. Az ^1H NMR mérések azt mutatták, hogy ennek a poszttranszlációs módosításnak szerepe van az inhibitor szerkezetek merevítésében, azonban szintetikus formákkal összehasonlítva kiderült, hogy

a módosítás jelenléte a szerin proteázokon mért inhibíciós aktivitásokat nem befolyásolta [Mer és mtsi. 1996b].

A kompakt és látszólag egyszerű, 3 β -redő alkotta szerkezetek egymáshoz látványosan hasonlítanak (lásd 1.2.4./2. ábra).



1.2.4./2. ábra Az alapszerkezetek hasonlósága

A Pacifastinok két, általam is vizsgált tagja: balra (világos barnán) az SGPI-1 jobbra (halványkékén) az SGPI-2 látható.

A szerkezeti homológia egyértelmű. A térkitöltéssel jelzett oldalláncok a P1 csoportot jelölik, amely általában döntő szereppel bír az inhibitor proteáz-specifitása szempontjából.

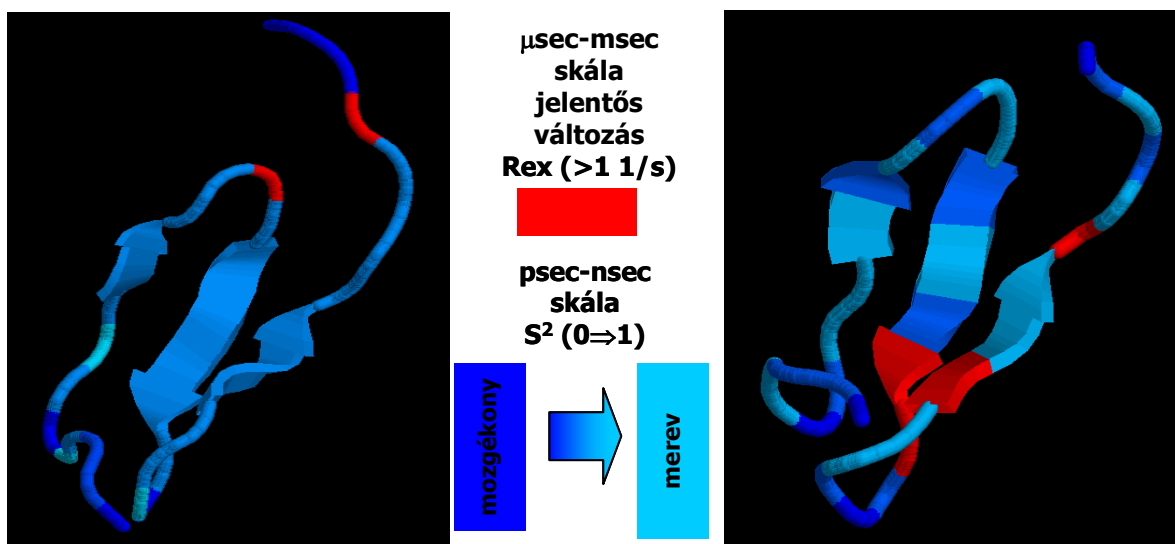
Az SGPI-1 ezek alapján tripszin-inhibitor (innen a régi elnevezés, SGTI), az SGPI-2 pedig kimotripszin inhibitor (lásd régi elnevezés SGCI) aktivitásúnak jósolható. SGPI-1 PDB ID = 1KJO; SGPI-2 PDB ID = 1KGM

A térszerkezeteket alaposabban elemezve azonban kiderült, hogy a Pacifastin család szerkezete legalább két típusra (I. és II. típus) osztható a molekula belső magjának aminosav összetétele alapján. Amíg a globuláris fehérjék natív szerkezetére egy nagyméretű, sűrűn pakolódo hidrofób mag jellemző, addig ezek a kisméretű inhibitorok geometriai okok miatt csak egy „minimalista”, pár aminosav csoportból álló hidrofób magot találunk, a nagy stabilitást tehát nyilvánvalóan az optimális elrendeződésű, és

viszonylag nagyszámú diszulfidhíd biztosítja. A két legbehatóbban vizsgált inhibitor forma az LMPI-1/SGPI-1 (a két vándorsáska fajban előforduló ortológok) az I., míg az LMPI-2/SGPI-2 ortológ pár a II. típusba sorolódik. Az I. típusban a hidrofób magot a Lys10-Trp26 aminosav pár dominálja, ahol a lizil oldallánc alifás része van kapcsolatban a triptofánnal. A II. típusban ezzel szemben Phe10-Ala26 párt találunk, tehát a 10-es pozícióban lévő fenilalanint a 26-os pozícióban lévő alaninnal van hidrofób kölcsönhatásban [Mer és mtsi. 1996a; Gáspári és mtsi. 2002]. Az egy-egy fajban előforduló paralógok (pl. SGPI-1 és SGPI-2) tehát igencsak eltérő belső pakolódást mutatnak.

Az NMR spektroszkópiai mérések segítségével nemcsak az inhibitorok szerkezetét, hanem azok dinamikáját is fel lehet térképezni. Ehhez ^{15}N -jelölt fehérjére van szükség, amit leginkább rekombináns úton lehet előállítani, ugyanis az izotópjelölt aminosavak nagyon magas ára rendkívül költségessé tennék a jelölt inhibitorok peptidszintézissel történő előállítását. Az SGPI-1 és SGPI-2 fehérjék rekombináns DNS technikákon keresztül megoldott, bakteriális expresszióval történő előállítását én dolgoztam ki, és mivel ez tette lehetővé az NMR-es vizsgálatok elvégzését, ezért az idevonatkozó eredményeket is ismertetem. A rekombináns anyagok felhasználásával az első NMR spektroszkópiai vizsgálatokat Gáspári Zoltán végezte el.

A főlánc dinamikai viselkedésének felderítését célzó vizsgálatok röviden összefoglalva a következő eredményeket adták: a 10^{-12} - 10^{-9} másodperces (psec-nsec) skálán a reaktív hurkot tekintve az SGPI-1 molekula dinamikája a nagyobb, de a molekula egészét tekintve az SGPI-2 a mozgékonyabb (1.2.4./3. ábra). Egy hosszabb időtartamokra vonatkozó tartományban, a 10^{-6} - 10^{-3} másodperces (μsec -msec) időskálán az SGPI-1-ben csak az Asp13, Cys14 és Cys32 gerinc amidok mozgása figyelhető meg, míg az SGPI-2-ben a Cys4, Cys19, Gly20, Ala26, Ala27 és Thr29 amidok mozognak.



1.2.4./3. ábra Az SGPI-1 és SGPI-2 dinamikai sajátosságai

A két inhibitor gerincének dinamikája. A $\mu\text{sec-msec}$ időskálán jelentős mértékű mozgékonyossággal rendelkező részek pirossal vannak feltüntetve a peptid gerincen. A psec-nsec időskálán mért eltérő mértékű mozgékonyságok területi eloszlását háromtónusú kék skála jelzi.

A képeket RasMol programot használva Gáspári Zoltán készítette a következő PDB fájlok alapján: SGPI-1 PDB ID = 1KJO; SGPI-2 PDB ID = 1KGM

Az inhibitorok proteázzal alkotott komplexben mutatott szerkezetéről több röntgen kristallográfiával megoldott modell is létezik. Az első ilyen szerkezetek kimotripsinnel készültek. Az egyik komplexben az LMPI-2 kimotripszin inhibitor, a másikban az LMPI-1 tripszin inhibitornak az Arg30Leu/Lys31Met pontmutációkkal kimotripszin inhibitorra alakított variánsa szerepelt [Roussel és mtsi. 2001]. Ezekből a vizsgálatokból kiderült, hogy azonos térszerkezetük, és azonossá tett reaktív hurok részletük ellenére az LMPI-2 és az LMPI-1 mutáns némileg eltérő komplexet alkotnak az enzimmel. Az LMPI-2 csak a szokásos kötő hurkon (P3-P3') keresztül kapcsolódik az enzimhez, míg az LMPI-1 mutáns formája az előbbi területen kívül a P6-P10 régió is keresztül is kapcsolódik. A tanszékünkön Fodor Krisztián által létrehozott SGPI-1 - kecskerák tripszin komplexben a röntgen kristallográfiás vizsgálatok szintén kiterjedt kölcsönhatási felületet mutattak ki [Fodor és mtsi. 2005]. Ebben a szerkezetben a P3-P3' kapcsolaton felül kontaktfelszín alakult ki a P4'-P5' és a P12-P4 szakaszon is, ami egy szokatlanul nagy felületet jelent, különös tekintettel az inhibitor kis méretére. Az NMR-es szerkezettel összevetve az is megfigyelhető volt, hogy a komplex kialakulása során az SGPI-1 szerkezete a P10-P4-es régióban kismértékben elmozdul, vélhetőleg idomul a gátolt tripszin szerkezetéhez.

1.2.5. A Pacifastinok *in vitro* mért inhibíciós aktivitásai

A Pacifastinok esetében még egyetlen proteázzal kapcsolatban sem igazolták, hogy az lenne a valódi biológiai célpont enzim. Ugyanakkor az inhibitorok potenciális funkcionális hatásait feltárandó számos mérést végeztek olyan klasszikusnak számító (és nem utolsó sorban tisztított formában vásárolható) modell enzimekkel, mint a szarvasmarha tripszin és kimotripszin. Amikor az első Pacifastinok izolálása után kiderült, hogy ezek proteáz inhibícióra képesek, azonosították az inhibíciós aktivitásért felelős reaktív hurok régiót és az ezen lévő P1 pozíciót a már említett P1-P1' csoportok közötti reverzibilis hasíthatóság alapján [Kellenberger és mtsi. 1995]. A P1 ismeretében ezek után jósolhatóvá vált az inhibitor specifitása.

Az ezek után Gráf László csoportjában elvégzett kísérleteket és következtetéseket szövegesen ismertetem, de a szöveg jobb követhetősége érdekében az 1.2.5./1 ábrán bemutatom a szövegben szereplő inhibitorok egymás alá rendezett szekvenciáit, valamint az 1.2.5./1 táblázatban összefoglalom a doktori munkám elkezdésekor ismertté vált inhibíciós aktivitási adatokat.

Az SGPI-1 molekula P1 helyén arginint, az SGPI-2 esetében leucint találunk. Mivel a két molekula amúgy rendkívül hasonló szerkezetű, a Laskowski szabály értelmében jósolható volt, hogy az SGPI-1 hatékony tripszin inhibitor, míg az SGPI-2 jó kimotripszin inhibitor. Amikor Gráf László csoportja tanulmányozni kezdte ezen molekulákat, kiderült, hogy ezek a várakozások csak részben teljesülnek. Az SGPI-2 ugyan valóban rendkívül stabil komplexet képes szarvasmarha kimotripszinnel, hiszen a K_i értéke $6 \times 10^{-12}M$, az SGPI-1 a szarvasmarha tripszinen meglehetősen gyenge inhibitornak bizonyult, a K_i értéke a mikromoláris tartományba esett. Még nagyobb meglepetést okozott az, hogy az SGPI-1 az arginin P1 csoport ellenére a kimotripszint csak alig gátolta rosszabbul, mint a tripszint. Az SGPI-1 viselkedése tehát eltért attól, amit korábban a kanonikus inhibitoroknál tapasztaltak. Az SGPI-2 ugyanakkor tökéletesen úgy viselkedett, ahogy az egy kanonikus inhibitortól „elvárható”. A P1 leucin arginire történő cseréjével ez az inhibitor $10^{-9}M$ tartományba eső K_i -vel gátolta a szarvasmarha tripszint. Mind az SGPI-1, mind az SGPI-2 lizil csoportot tartalmaz a P1' pozícióban. Mivel korábbi irodalmi adatokból ismert volt, hogy a szarvasmarha tripszin egy felszíni pozitív töltésű oldallánca miatt nem kedveli a bázikus P1' csoportokat [Kurth és mtsi

1997]. Az SGPI-2 Leu30Arg mutánsban a lizint metioninra cserélték. A P1' csere a korábbi várakozásoknál is jóval nagyobb pozitív hatással járt: az SGPI-2 (Leu30Arg; Lys31Met) duplamutáns pikomoláris tartományba eső K_i -vel gátolja a marha tripszint. Ennek a felismerésnek a nyomán felmerült, hogy az analóg aminosav csere az SGPI-1 formán is nagy javulást okoz majd a szarvasmarha tripszinen. Csakhogy kiderült, hogy az SGPI-1 (Lys31Met) gyakorlatilag ugyanolyan gyenge inhibitor, mint maga az SGPI-1, az SGPI-2 variánsnál kapott ezerszeres javulás helyett itt egy szerény hétszeres javulás történt. Ez definíciószerűen igazolta, hogy az SGPI-1 – SGPI-2 inhibitor pár nem követi a korábban ismertetett Laskowski modellt, hiszen annak alapján a Lys31Met mutáció a két inhibitor molekulában azonos proteázzal szemben azonos mértékű hatást kellett volna, hogy kifejtсен. Az „interscaffolding additivity” tehát nem érvényesül, ami azért rendkívül meglepő, mert itt két azonos családba tartozó inhibitorról van szó.

Mivel a térszerkezet ekkor még ismeretlen volt, az első logikus magyarázat a jelenségre az volt, hogy a „renitens módon viselkedő” SGPI-1 molekula talán hibás szerkezetű, talán nem is aktív proteáz inhibitor. Ezt a hipotézist a tanszéki csoport rögvest cáfolta is azzal, hogy elkészítette az SGPI-1 (Arg30Leu) P1 mutánst, ami a szarvasmarha kimotripszint 10^{-10} M-os K_i értékkel gátolta. Mivel egyetlen felszíni csoport cseréje bizonyára nem okoz nagy térszerkezeti változást, a hibás feltekeredés hipotézisét elvetették [Malik és mtsi. 1999].

Mivel kiderült, hogy az SGPI-1 inhibícióra alkalmas térszerkezetű, figyelembe véve, hogy arginil P1 csoporttal rendelkezik, a következő hipotézist állították fel: az SGPI-1 valódi biológiai célpontja valószínűleg egy olyan tripszinszerű enzim, ami valamilyen szempontból eltér a szarvasmarha tripszintől. Ezért lehetséges, hogy bár az SGPI-1 ezt a még nem azonosított enzimet hatékonyan gátolja, az emlős tripszinen csaknem inaktív.

Bár ez a bizonyos célpont enzim ismeretlen volt (és ma sem ismert), valószínűnek tűnt, hogy a célpont enzim a sáska valamely saját enzime. Ezért célszerűnek látszott valamilyen ízeltlábú fajból származó tripszinen ellenőrizni az SGPI-1 aktivitását. Bár faj-azonos tripszint nem sikerült izolálni, kétféle rákfajból is sikerült enzimet preparálni, és kiderült, hogy az SGPI-1 mindkettőt 10^{-12} M-os K_i értékkel gátolja [Patthy és mtsi 2002].. Az SGPI-1 tehát egy korábban soha nem tapasztalt mértékű, öt nagyságrendes specifitással képes megkülönböztetni az emlős tripszint az ízeltlábú tripszinektől. (Ez

azonnal felvetette annak a lehetőségét, hogy a molekula kiinduló pontja lehet szelektív inszekticidek előállításának, például transzgenikus növények rovarkártevők elleni védelmére. Bár egy ilyen munkában is részt vettem [Kutas és mtsi. 2004; Kondrák és mtsi. 2005] ebben a dolgozatban kizárólag a jelenség elméleti hátterével foglalkozom).

Mivel az SGPI-2 (Leu30Arg), illetve SGPI-2 (Leu30Arg; Lys31Met) mutánsok is rendelkezésre álltak, ezeket is tesztelték az ízeltlábú tripszineken. Kiderült, hogy ezek az inhibitor variáns mind az emlős, mind az ízeltlábú tripszineket nagy hatékonysággal gátolják. A különleges törzs-specifitás tehát az SGPI-1-re jellemző sajátosság.

	1	5	10	15	20	25	30	35
SGPI-1	EQE	CTPGQTKKQDC	N	NTC	N	TPTG-VWAC	TRKGC	PPH
SGPI-2	EVT	CEPGTTFKDK	N	NTC	CR	GSDGKSAACT	TKAC	CPQ
LMPI-1	EEK	CTPGQVKQDC	N	NTC	CT	TPTG-VWG	TRKGC	QPA
LMPI-2	EIS	CEPGKTFKDK	N	NTC	CR	GADGKSAACT	TKAC	PNQ
SGPI-1 Lys30Met	EQE	CTPGQTKKQDC	N	NTC	N	TPTG-VWAC	TRMGC	PPH
SGPI-1 Arg30Leu	EQE	CTPGQTKKQDC	N	NTC	N	TPTG-VWAC	TRKGC	PPH
SGPI-2 Leu30Arg	EVT	CEPGTTFKDK	N	NTC	CR	GSDGKSAACT	TRKAC	CPQ
SGPI-2 Leu30Arg/Lys31Met	EVT	CEPGTTFKDK	N	NTC	CR	GSDGKSAACT	TRMAC	CPQ

1.2.5./1 ábra Vándorsáska Pacifastin inhibitorok illetve ezekből származtatott mutánsok szekvenciái

A ciszteineket sárgával, a P1 pozíciót pirossal jelzem. A mutációkat *dőlt betűvel* emeltem ki.

Név	Reaktív hurok szekvenciája	K _i érték [M] szarvasmarha kimotripszin	K _i érték [M] tripszinen	
			Szarvasmarha	Kecskerák
SGPI-1	C ₂₇ TRKGC ₃₂	2.0x10 ⁻⁶	2.1x10 ⁻⁷	-
SGPI-2	C ₂₈ TLKAC ₃₃	6.2x10 ⁻¹²	2.0x10 ⁻⁵	-
LMPI-1	C ₂₇ TRKGC ₃₂	1.4x10 ⁻⁶	1.0x10 ⁻⁷	-
LMPI-2	C ₂₈ TLKAC ₃₃	2.5x10 ⁻¹⁰	-	-
SGPI-2 Leu30Arg	C ₂₈ TRKAC ₃₃	5.1x10 ⁻⁸	5.5x10 ⁻⁹	2.0x10 ⁻¹²
SGPI-2 Leu30Arg/Lys31Met	C ₂₈ TRMAC ₃₃	5.5x10 ⁻⁸	5.0x10 ⁻¹²	1.2x10 ⁻¹²
SGPI-1 Lys31Met	C ₂₇ TRMGC ₃₂	7.1x10 ⁻⁶	3.0x10 ⁻⁸	5.0x10 ⁻¹²
SGPI-1 Arg30Leu	C ₂₇ LRKGC ₃₂	3.5x10 ⁻¹⁰	1.0x10 ⁻⁵	-

1.2.5./1. táblázat Vándorsáska Pacifastin inhibitorok illetve ezekből származtatott mutánsok K_i értékei.

Amikor más kutatócsoportok hasonló eredményeket kaptak az SGPI-1-ortológ LMPI-1 és LMPI-3 inhibitorokkal [Kellenberger és mtsi. 2003; Simonet és mtsi. 2005], nyilvánvalóvá vált, hogy a különleges törzs-specifitás a már említett I. típusú hidrofób

maggal bíró Pacifastinokra jellemző, míg a II. csoport tagjai ezt a jelenséget nem mutatják. A Pacifastin családnál tehát sikerült egy olyan tulajdonságra bukkanni, ami újfent ellentmondott a Laskowski modellnek: egy családon belül a hidrofób mag felépítése lényeges befolyással van az inhibitorok működésére. A dolgozatban azokat a vizsgálatokat írom le, amelyek ennek a törzs-specifitásnak az okait tárták fel.

Kétféle ilyen vizsgálatssorozatot végeztem. Az egyik egy NMR spektroszkópiás vizsgálatssorozat volt, míg a másik egy fág-bemutatásnak (phage display) nevezett irányított evolúciós megközelítésen alapult.

Az NMR-es vizsgálatokra azért esett a választásunk, mert a korábbi röntgenkrisztallográfiás adatok, és az ezeken alapuló molekulamodellezés nem adtak választ arra, hogy mi áll az inhibitor maggal korreláló törzs-specifitás hátterében. A röntgen krisztallográfiás adatok a molekulák egy adott konformációját mintegy kimerevített állapotban jelenik meg, így a molekula egyes részeinek dinamikai tulajdonságáról csak nagyon kis információt szolgáltatnak. Erről a krisztallográfia során meghatározott B-faktorok sem adnak elegendő ismeretet, hiszen magas B-faktort nem csak az egyes csoportok mozgékonyasága okozhat, hanem más jelenségek (pl. kristályhibák) is. Emellett a kristályban „befagyott” állapotba kerülhetnek olyan szerkezeti elemek is, amelyek amúgy oldatban mozgékonyak. Mint a bevezetőben már említettem, Gáspári Zoltán már feltérképezte a szabad inhibitorok főláncának dinamikai sajátosságait. Az általam vizsgálandó kérdés az volt, hogy vajon az enzimmel való interakció során hogyan változnak ezek a dinamikák, hiszen elképzelhető, hogy az eltérő törzs-specifitás hátterében az I. illetve II. típusú inhibitorok eltérő dinamikai tulajdonsága, eltérő „idomulási képessége”, illetve plaszticitása állhat.

Ezzel párhuzamosan kezdtem el az irányított evolúciós kísérleteket, amelyek egy rendkívül hatékony megközelítést alkalmaznak. Az egy-egy funkció betöltéséhez szükséges fehérjeszerkezeti tényezők azonosítása itt azon alapul, hogy egy, speciálisan a feladatra tervezett, fágokon megjelenített variáns-könyvtárat készítünk a vizsgálandó fehérjéből. A variánsokat a vizsgált funkciónak megfelelő szelekciónak vetjük alá, és kigyűjtjük azokat, amelyek rendelkeznek az adott funkcióval. Statisztikailag elegendő ilyen kigyűjtött variáns szekvencia-elemzésével megadható, hogy az adott funkció ellátásához az egyes pozíciókban milyen aminosavaknak kell lenniük, vagy éppen

melyek tiltottak. A konkrét esetben az volt a kérdés, hogy az I. csoport tagjaiban mik azok a jelenlévő aminosav csoportok, amik a törzs-specifitást okozzák.

Mivel sem az NMR spektroszkópia, sem a fág-bemutató nem széles körben elterjedt technológia, szükségesnek láttam, hogy egy-egy rövid ismertetőben mindkettő elméleti alapjait röviden ismertessem.

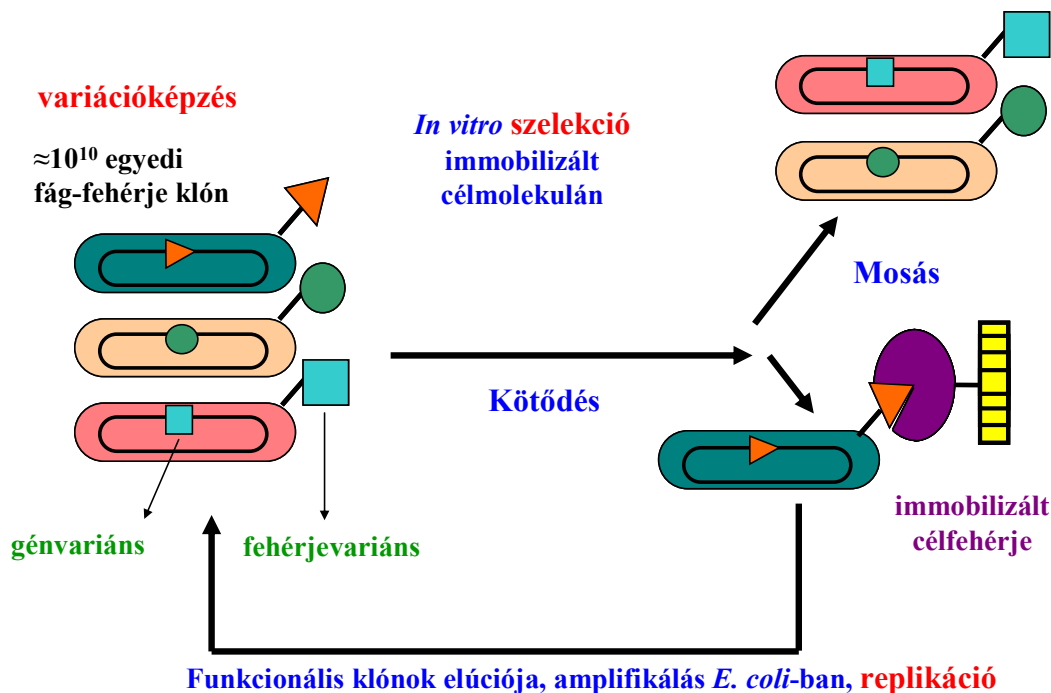
1.3. Az alkalmazott metodikák rövid ismertetése

1.3.1. A fágbemutató alapjai

Mivel a fágbemutató egyelőre nem része a rutin molekuláris biológiai eljárásoknak, szükségesnek gondoltam, hogy röviden ismertessem az eljárás elméleti hátterét. Az eljárást itt csak olyan részletességgel ismertetem, hogy az érthetővé tegye a disszertációban leírt kísérletek logikáját.

A fágbemutató lényege a következő (1.3.1./1. ábra). A fágon megjelenítendő fehérje génjét egy burokfehérje génhez kapcsoljuk úgy, hogy a fehérje a burokfehérjével egyetlen folytonos polipeptid láncot alkotva, tehát fúziós fehérjeként termelődjön. Amikor a fúziós burokfehérje rész beépül fágburokba, a hozzákapcsolt idegen fehérje is megjelenik a fág felszínén. A fág részecskén keresztül a fehérjét kódoló gén, és a felszínen megjelenített fehérje fizikai kapcsolatban marad. Ha egy DNS könyvtár segítségével nem egyetlen fág-fehérjét, hanem egy fág-fehérje variánsokból álló könyvtárt hozunk létre, akkor abban minden egyes tag éppen annak a variánsnak a génjét hordozza majd, aminek a kódoló részét a genomjában hordozza. Genetikusok által használt nevezéktannal élve a genotípus és a fenotípus tehát ilyen módon klonálisan kapcsolódik össze. Tehát minden fág egyetlen fajta fehérjevariánst hordoz, és rendelkezik az adott fehérjevariáns által biztosított funkcióval (például proteáz gátlásra képes). Hatalmas, többmilliárd különböző fehérjevariánst tartalmazó fág-fehérje könyvtárakat lehet létrehozni. Az ilyen könyvtárakból a hordozott fehérje funkcionális tulajdonságai alapján alapvetően affinitáskromatográfiás módszerekkel izolálni lehet az adott funkciót legjobban ellátni képes variánsokat. A módszer egyik rendkívül fontos eleme az, hogy az így szelektált variánsok képesek baktériumokban szaporodni, megsokszorozódni. Ezekkel tehát baktériumokat fertőzünk, és elszaporítjuk a kisselektált variánsokat. Az így

kapott variáns gyűjtemény egy olyan keverék, amelyben vannak funkcionális szempontból nagyon nagy hatékonyságú (pl. nagy affinitással kötődő), és szerény hatékonyságú (pl. kisaffinitású) variánsok. Ezért újabb szelekciós kört alkalmazunk, igyekezve elválasztani a „jobb” klónokat a gyengébbekből. Több ilyen szelekciós ciklus végére a szelektált könyvtár feldúsul funkcionálisan hatékony klónokban. Ezeket a klónokat külön-külön vizsgáljuk meg kötési vizsgálatokban. A valamilyen előre meghatározott kritérium alapján jónak ítélt klónok fehérjeszekvenciáját a fágreszecskekből izolált DNS szekvenálásán keresztül határozzuk meg. Kellően nagyszámú egyedi szelektált klón szekvenálásával kideríthető, hogy a szelekció alapjául szolgáló funkció ellátásáért az egyes aminosav csoportok milyen mértékben felelősek. A módszer nagyon nagy hatékonyságú, és alapvetően kétféle célra használható: annak felderítésére, hogy egy-egy tulajdonság hogyan kódolódik a fehérje aminosavsorrendjében (lásd imént ismertetett gondolatmenet), illetve új, a természetben nem létező fehérje vagy peptidvariánsok kifejlesztésére. Az egyik legismertebb ilyen felhasználás a monoklonális ellenanyagok fágbemutatáson alapuló előállítása.



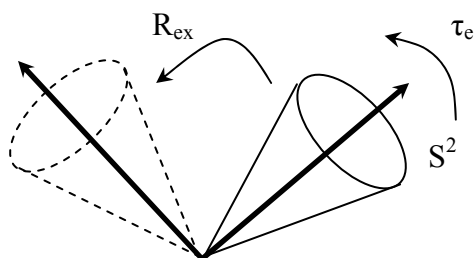
1.3.1./1. ábra A fágbemutatás alapsémája

A módszer rövid leírását lásd a fenti szövegben.

1.3.2. Az NMR spektroszkópiai adatok rövid magyarázata

Ezzel az ismertetővel nagyon röviden vázolni szeretném a dolgozatban felhasznált NMR adatok jelentését annak érdekében, hogy az adott technikában nem járatos olvasó könnyebben értelmezhesse az NMR spektroszkópiával kapott eredményeket.

A dinamikai tulajdonságok meghatározásához homo- illetve heteronukleáris (tehát egyfajta vagy többfajta atommagot gerjesztő) pulzus szekvenciákat (adott erősségű és adott ideig tartó mágneses erőtereket) alkalmaztunk a mérések során. Homonukleáris pulzus szekvenciák a COSY, NOESY és TOCSY, míg heteronukleáris pulzusszekvencia a HSQC. A homonukleáris pulzusszekvenciák esetén a jeleket tehát egyfajta magról, általában ^1H -ről kapjuk, míg a heteronukleáris pulzusszekvenciáknál a ^1H mellett ^{15}N és/vagy ^{13}C magokat is gerjesztünk. Az adott mágneses besugárzások hatására az egyes magok eltérő módon fognak reagálni, és eltérő ideig tart, amíg visszaállnak eredeti állapotukba. Erről a T1 és T2-HSQC mérés sorozatokkal lehet pontos információt szerezni, a heteroatomok longitudinális (spin-mátrix, T1 érték) vagy tranzverzális (spin-spin, T2 érték) relaxációjához tartozó időállandó meghatározásával. A T1 és T2 értékek mellett a kapott spektrumokból kiszámolhatók még az R1 longitudinális (spin-mátrix) illetve R2 tranzverzális (spin-spin) relaxációs sebességi ráták, továbbá a τ_c , vagyis a vizsgált belső mozgás effektív korrelációs ideje, és az erre vonatkozó általános rendezettségi paraméter, az S^2 , ami a mozgás amplitúdóját jellemzi. Az S^2 -et szokták általános rend paraméternek is hívni. A psec - nsec időskálán történő mozgásokat jellemzi, értéke 0 és 1 között lehet. Ha 0, akkor a csoport teljesen függetlenül mozog attól a molekulától, aminek a része. Ha 1, teljesen együtt mozog a teljes molekulával. Az R_{ex} , a kémiai kicserélődési állandó, amit két különböző kémiai környezettel jellemezhető konformációs állapot közti átmenet leírására használhatunk.



1.3.2/1. ábra: A dinamikai paraméterek egy lehetséges fizikai értelmezése

Az ábra az NH vektor (vastag nyíl) mozgását a „diffúzió a kúpban” modellnek megfelelően mutatja. A vektor egy kúppalást mentén mozog. A mozgást egyrészt a kúp nyílásszögével (rendezettségi paraméter $0 \leq S^2 \leq 1$, a kisebb érték szabadabb mozgást, azaz tágabb kúpot jelent), másrészt a mozgás karakterisztikus idejével (τ_e) jellemezzük. A nagyobb amplitúdójú konformációs átrendeződés eredményeként a vektor más pozícióba ugorhat, ahol szintén hasonló mozgást végez (szaggatott vonallal jelölt kúp). Az ilyen átmeneteket a kémiai kicserélődési állandóval (R_{ex}) jellemezzük.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Mint a bevezetőben vázoltam, doktori munkám alapvető célja az volt, hogy feltárjam, vajon milyen szerkezeti okok húzódnak meg a Pacifastin család egyes tagjainak nem-kanonikus viselkedése mögött, tehát mi okozza azt, hogy a II. típusúak „hagyományos módon” működnek, míg az I. típusúak rendkívüli mértékű törzs-specifitást mutatnak. A kérdésekre a válaszokat NMR spektroszkópia és egy irányított evolúciós megközelítés, a fágbemutató módszerével igyekeztem megtalálni. A listaszerűen felsorolható konkrét célkitűzések a következők voltak.

- A *Schistocerca gregaria* sivatagi vándorsáskában kifejeződő SGPI-1 és SGPI-2 inhibitorok klónozása későbbi rekombináns munkákhoz.
- Egy olyan fehérje-expressziós rendszer beállítása, amivel biokémiai és NMR spektroszkópiai vizsgálatokhoz alkalmas fehérjét lehet előállítani.
- ^{15}N és ^{13}C jelölt fehérje előállítása az NMR spektroszkópiai mérésekhez.
- NMR spektroszkópiai mérésekkel adatot gyűjteni arról, hogy az inhibitorok szerkezetének dinamikája miként változik a proteázhoz való kötődés hatására.
- Fágbemutató módszerével kideríteni, hogy az SGPI-1 molekulának mely csoportjai felelősek a példátlan mértékű törzs-specifitás kialakításában. Ehhez előbb be kellett állítani a fágbemutató rendszerét az ELTE Biokémiai Tanszéken.
- Amennyiben a funkcionálisan fontosnak csoportok azonosíthatók, annak kiderítése, hogy ezek egymástól függetlenül fejtik ki a hatásukat, vagy esetleg interakciós hálózatokat alkotnak.

3. ANYAGOK és MÓDSZEREK

3.1. Kompetens sejtek készítése

3.1.1. PEG-DMSO módszerrel történő kémiai transzformáláshoz

A klónozáshoz, DNS manipulációhoz használt *E.coli* XL1Blue (Tet^R) és *E.coli* CJ236 (Cam^R) törzs esetében alkalmaztam ezt a módszert. 10⁸db CFU/μg DNS transzformálási hatékonyságot sikerült ilyen úton elérni.

A -80°C-on tárolt XL1Blue (Stratagen) törzsből 2ml LB; 10μg/ml Tet oldatba steril kaccsal leoltottam. A sejteket 4 órát rázattam 37°C-on 200 RPM-mel, majd steril kaccsal a kultúrából kihúztam LB; 10μg/ml Tet agar lemezre. Másnap 3ml LB; 10μg/ml Tet oldatba éjszakán át inkubált kultúrát indítottam el 1 telepről. Az éjszakán át inkubált sejt kultúrából 50μl-nyit átoltva 50ml LB; 10μg/ml Tet oldatba ezt OD_{600nm} = 0,3 - 0,6-ig inkubáltam 37°C-on 200 RPM-mel rázatva. A sejteket centrifugálással ülepittem (3000g, 5 perc). A csapadékot 1/20-ad térfogatnyi (2,5ml) jéghideg TSB (LB; 10% PEG 3350; 5% DMS; 10mM MgCl₂; 10mM MgSO₄; pH 6,1) oldatban óvatosan felfuszpendáltam, majd 10 percet állni hagytam jégen. Ezután 270μl-nyi 99%-os jéghideg glicerinnel kiegészítve az oldatot (hogy 10%-os legyen az oldat glicerinné nézve) 100μl-es részletekben folyékony nitrogénnel lefagyasztottam. A centrifugálás után minden hidegszobában, 4°C-on történt.

3.1.2. CaCl₂-os, hősokkos kémiai transzformáláshoz

Fehérje expresszióhoz használt *E.coli* BL21 (DE3) pLysS (Cam^R) sejteket tettem ilyen úton kompetenssé, mivel a fenti módszer ennél a törzsnél nem volt hatékony. Az itt elért kompetencia 10⁵cfu/μg DNS volt.

A sejtek növesztése a fenti módszerrel megegyező módon történt, azzal a különbséggel, hogy a sejteket 200 ml LB; 20μg/ml kanamicint tartalmazó táptalajban inkubáltam OD_{600nm} = 0,4-ig. Ezután 10 percig jégen hagytam állni a kultúrát, majd

centrifugálással ülepittem (3200 RPM, 7 perc). Az összegyűjtött sejteket 40 ml jéghideg 60 mM CaCl₂; 15% glicerin; 10mM HEPES pH 7.0 oldatban szuszpendáltam fel. A sejteket centrifugálással ülepittem (3200 RPM, 5 perc), majd 10 ml jéghideg 60 mM CaCl₂; 15% glicerin; 10 mM HEPES pH 7,0 oldatba vettem fel, és 30 percet hagytam jégen állni. Ezt követően a sejteket újra centrifugálással ülepittem (3200 RPM, 5 perc), majd 2 ml jéghideg 60 mM CaCl₂; 15% glicerin; 10 mM HEPES pH 7,0 oldatban szuszpendáltam fel és 100 µl-es részletekben folyékony nitrogénnel fagyasztottam le.

3.1.3 Elektroporációval történő transzformáláshoz

A fág-bemutató speciális követelményei miatt Genentech cég az MC1061 coli törzsbe konjugációval bevitte az XL1-Blue törzsből az F-episzómát, így módon létrehozva az *E.coli* SS320-as (Str^R; Tet^R) törzset (Shidu és mtsi. 2000b). Ezt a törzset kezeltem ilyen módon. Ez a baktérium törzs egyszerre nagy hatékonysággal elektroporálható (*E.coli* MC1061 tulajdonság, BioRad) és fertőzhető M13 fággal (*E.coli* XL1Blue tulajdonság, Stratagen). Ez a leghatékonyabb transzformálási módszer, itt akár a 10¹² CFU/µg DNS hatékonyságot is el lehet érni, ami a hatalmas diverzitású könyvtárak készítésének egyik fontos feltétele.

Leoltottam 1 telepről 1 ml 2YT, 10 µg/ml tetraciklint és 30 µg/ml streptomocint tartalmazó táptalajba, majd 6 órát inkubáltam 37°C-n 200 RPM-mel rázatva a kultúrát. Ezt az 1ml sejtkultúrát átoltottam 50 ml 2YT, 10 µg/ml tetraciklint (Tet) tartalmazó táptalajba és folytattam a növesztést éjszakán át. Másnap 5-5 ml éjszakán át inkubált kultúrát átoltottam 900 ml Superbroth; 100 ml KHPO₄; 10 µg/ml Tet oldatba, majd OD_{600nm} = 0,6-ig inkubáltam 37°C-on 200 RPM-mel rázatva. Ezután 10 percig kevertem a sejteket jégen a hidegszobában. A sejteket centrifugálással ülepittem (5500 RPM, 5 perc). Az ülepitett sejteket 450 ml 1mM HEPES pH 7,0 oldatban szuszpendáltam fel mágneses keverő segítségével. Ettől a lépéstől kezdve minden felhasznált oldat a lehető legnagyobb tisztaságú vízzel készült. A sejteket centrifugálással ülepittem (5500 RPM, 10 perc), majd megismételtem az előző két lépést. A második 1 mM HEPES pH 7,0-es mosást követően 150ml 10% glicerin oldatba vettem fel a sejteket, majd 10 percet

centrifugáltam 5000 RPM-mel. Ezután 1ml 10% glicerinben vettem fel az összes sejtet, majd 350 µl-es részletekben, folyékony nitrogénben fagyasztottam.

3.2. Transzformálás

3.2.1. Transzformálás kémiai úton - PEG-DMSO módszerrel

PEG-DMSO módszerrel kezelt kompetens sejteket -80°C -ről jégre tettem. A sejtszuszpenzióval megegyező térfogatnyi (40 µl) transzformáló elegyet készítettem elő, amibe az ötszörös töménységű KCM (0,5 M KCl; 0,15 M CaCl_2 ; 0,25 M MgCl_2) puffert kihígítottam (8 µl), megfelelő mennyiségű DNS-t mértem be (1 µl), majd kiegészítettem desztillált vízzel (31 µl). Miután a kompetens sejtekhez hozzáadtam a transzformáló elegyet 20 percet jégen, majd 10 percet szobahőmérsékleten inkubáltam a mintát. Ezután 10x térfogatnyi (800 µl) LB-t mértem a sejtekre és 30 percet rázattam 37°C -on 200 RPM-mel. Megfelelő antibiotikumot tartalmazó LB-agar lemezre kentem ki a sejteket (általában 300 µl-t) és éjszakán át inkubáltam 37°C -on.

3.2.2. Transzformálás kémiai úton - CaCl_2 -os módszerrel, hősokkal

A CaCl_2 -dal kezelt sejteket kivettem -80°C -ről jégre, majd amikor felolvadtak óvatosan hozzáadtam a DNS-t (1 µl). 45 percet inkubáltam az oldatot jégen, majd 1 percet 42°C -s termosztátban. A sejteket visszatettem 2-5 percre jégre, majd 300 µl LB hozzáadása után 30 percet rázattam 37°C -on 200 RPM-mel. Ezután a megfelelő antibiotikumot tartalmazó LB-agar lemezen szélesztettem a sejteket és éjszakán át inkubáltam 37°C -on.

3.2.3. Transzformálás elektroporációval

A sejteket jégen felolvasztottam. A transzformálandó DNS-t teljesen ion-mentesítettem (PCR CleanUp oszlopon, Sigma). A kompetens SS320-as sejtekhez 60 µl térfogatban adtam DNS-t, óvatosan összekevertem és az előre behűtött, 0,2cm-es, 400 µl-es, elektroporációs küvetába pipettáztam a keveréket. BioRad elektroporátorral, 2,5 kV, 200 Ω, 25 µF paramétereket beállítva sokkoltam a sejteket. Az elektroporált sejteket ezután

25 ml SOC táptalajba vittem át Pasteur pipettával, és 30 percig 37°C-on 100 RPM-mel rázattam.

3.3. Különböző PCR-alapú eljárások

3.3.1. cDNS készítése

Az inhibitorok intron-mentesített génjét klónoztam ezen a módon. Hím sivatagi vándorsáska zsírtestéből teljes RNS készletet izoláltam RNeasy (QIAGEN) kittel. Az izolált RNS állomány mRNS-éről cDNS-t szintetizáltam a First Strand cDNA Synthesis kitben (Fermentas) leírtak szerint. Mivel az SGPI-1 és SGPI-2 inhibitorokat kódoló DNS szakasz ismert volt, primerként egy specifikus oligonukleotidot használtam, amelynek a szekvenciája a következő: 5'-GAATTCTCACTGGGGGCAGGCCTTGAG-3').

3.3.2. A cDNS termék PCR-es felszaporítása

A cDNS terméket a már említett 3' primerrel, és egy specifikus 5' primerrel szaporítottam fel, melynek szekvenciája: 5'-TATATACATATGGAACAGGAATGTACACCTGGC-3'.

A két primer egyben a vektorba történő beépítéshez szükséges hasítóhelyeket (NdeI illetve EcoRI) is tartalmazta, amelyeket aláhúzással jelöltem.

PCR elegy 100µl	
10xpuffer	10 µl
25 mM MgCl ₂	6 µl
10 mM dNTP	2 µl
10 µM 5' primer	2 µl
10 µM 3' primer	2 µl
5 U/µl Taq polimeráz	1 µl
cDNS	1 µl
DV	76 µl

Hőprofil			
1. Denaturáció		95 °C	140sec
2. 30 ciklus, ciklusonként 1 mp-vel nyújtva	1. Denaturáció	94 °C	40sec
	2. Anellálás	52 °C	40 sec
	3. Polimerizáció	72 °C	80 sec
3. Polimerizáció		72 °C	180 sec

3.3.3. „Megaprimer”-rel történő PCR alapú mutagenézis

Aminosavak cseréjéhez a primerbe vittem be a lecserélni kívánt kodont. Az első PCR reakcióban a mutációt tartalmazó primerrel és egy, a gén végére specifikus primerrel készítettem terméket (a megaprimeret), majd gélből való izolálást követően (QIAgen Gel purification Kit) a terméket primerként használtam a párban egy, a gén másik végére illeszkedő primerrel. Az ehhez használt elegyek és körülmények a következők voltak:

100µl PCR elegy megaprimer-készítéshez	
10 x puffer	10 µl
25 mM MgCl ₂	6 µl
10 mM dNTP	2 µl
10 µM T7 reverse oligo (3')	2 µl
*10 µM SGPI-1-Met-SGPI-2 primer (3')	2 µl
5 U/µl Taq polimeráz	1 µl
cDNS	1 µl
0,1 x SGPI-1-Lys-Arg-SGPI-2-pET17b vektor	1 µl
DV	76 µl

Hőprofil			
1. Denaturáció		95 °C	180sec
2. 30 ciklus, ciklusonként 1 mp-vel nyújtva	1. Denaturáció	94 °C	45sec
	2. Anellálás	55 °C	45 sec
	3. Polimerizáció	72 °C	45 sec
3. Polimerizáció		72 °C	300 sec

* Az SGPI-1-Met-SGPI-2 primer az eredeti Lys-Arg linkert Met-re cseréli a brómcíános hasításhoz. Szekvenciája:
5'GGCTGCCCCGCCCATATGGAGGTCACCTGCGAG3'

3.3.4. PCR inhibitor könyvtár létrehozásához

Az SGIL (*Schistocerca gregaria* Inhibitor Library) könyvtárat az SGPI-1, SGPI-2 inhibitorok közepén található rövid konzervált régióknak köszönhetően 2 nagy méretű (76-80mer), a konzervált részeknek megfelelő területen egymással 3' végeikkel átfedő primerrel PCR reakcióban szintetizáltam. Ez a reakció eltért a hagyományos PCR-től, mivel itt egyetlen ciklust használtam. A cél nem a felszaporítás, hanem duplaszálú egyedi könyvtártagok előállítása volt.

PCR elegy 60µl	
10xpuffer	6 µl
25 mM MgCl ₂	3,6 µl
25 mM dNTP	0,5 µl
10 µM Chimera forw-1;-2	12 µl
10 µM Chimera rev-1; -2; -3; -4	12 µl
5 U/µl Taq polimeráz	1 µl
DV	23 µl

3.3.5. PCR ligálás ellenőrzéséhez

A ligátum transzformálása után LB-agar lemezen kinőtt telepekből vett mintát vizsgáltam egy olyan primer párral, ahol az egyik primer a vektorra, a másik a beépített DNS-re volt specifikus. A telepekről steril pipetta hegygel vettem mintát, majd desztillált vízben áztattam a hegyet. A PCR reakcióba a templátot ebből a mintából mértem bele.

3.4. DNS izolálás, tisztítás

Az *E.coli* sejtekben felszaporított plazmidokat QIAgen Plasmid Purification Kit-tel, az agaróz gélből, illetve PCR reakcióból származó DNS-t pedig a QIAgen Gel Purification Kit segítségével izoláltam a gyártó utasításai szerint.

3.5. DNS emésztés

Az itt használt enzimek (Acc65I, BglII, EcoRI, KpnI, Mph13, NdeI, NsiI, XhoI,) a Fermentas cégtől származtak. Minden esetben a cég által megadott körülményeket használtam. Az emésztések általában 3 - 16 óráig tartottak 37°C-on.

3.6. Kunkel mutagenézis

Ezt az eljárást alkalmaztam a fágbemutatásnál használt vektor-konstrukciók létrehozásához. Az uracil tartalmú egyszálú DNS-t *E.coli* K12 CJ236 (NEB) sejtekben hoztam létre M13KO Helper Fág (NEB) segítségével. Az izolált egyszálú, uracil tartalmú fágmidhoz (Kunkel templáthoz) T4 Polinukleotid Kinázzal (Fermentas) foszforilált mutációs oligonukleotidokat adtam. A hibridizálást követően T7 DNS polimeráz (Fermentas) enzimmal szintetizáltattam a kétszálú DNS-t. A frissen polimerizált DNS szál két végét a szintén az elegyben lévő T4 DNS ligáz (Fermentas, vagy NEB) segítségével kapcsoltam össze. Az így létrejött „uracilos” vad típusú, és a mutációkat tartalmazó normális (timines) heteroduplex DNS-t XL1-Blue (Stratagen) sejtekbe transzformáltam. Ezekben a sejtekben a vad típusú, uracil tartalmú DNS szál lebomlik, és a szintetizált mutáns szál szaporodik fel, amit ezek után izolálni lehet. Amennyiben a

mutáció során restrikciós helyet építettem be, vagy szüntettem meg, a mutáció jelenlétét első lépésben restrikciós endonukleázos emésztéssel ellenőriztem. A végső ellenőrzést minden esetben DNS szekvenálással hajtottam végre.

3.7. DNS defoszforilálás

Ezt a reakciót akkor használtam, mikor egyetlenféle restrikciós endonukleázzal felnyitott vektorba kellett ligálással DNS szakaszt bejuttatnom. A hasított vektor 5' OH csoportjáról a foszfátcsoporthoz eltávolítva a ligáz nem képes összekapcsolni a vektor két végét. A beépítendő DNS ugyanakkor hordozza az 5' OH csoportján a ligáláshoz szükséges foszfátcsoporthoz, így az összekapcsolható a vektor 3'OH végeivel. A reakcióhoz mindkét enzimet 1 restrikciós endonukleázzal hasított DNS ligálása, illetve PCR termék szekvenálása esetén alkalmaztam. Fermentas cégtől szereztem be és az általuk javasolt körülmények közt használtam. SAP, vagy CIP enzimet használtam, amelyeket a Fermentas cégtől szerezünk be.

3.8. Ligálás

Ligáláshoz T4 DNS ligáz enzimet használtam (Fermentas). A ligálás rendszerint szobahőmérsékleten egy, másfél órán keresztül zajlott.

3.9. DNS koncentráció meghatározás

Fotometriás úton történt 260 nm-en mérve. Kétszálú DNS esetén $1,0 \text{ OD}_{260\text{nm}} = 50 \text{ } \mu\text{g/ml}$; oligonukleotidokra és egyszálú cirkuláris DNS-re $1,0 \text{ OD}_{260\text{nm}} = 33 \text{ } \mu\text{g/ml}$. A hasítással nyert, kismennyiségű DNS fragmentumok koncentrációját denzitometrálassal határoztam meg a GeneTools szoftver és kontrol DNS-ek segítségével.

3.10. DNS szekvenálás

A DNS szekvenálási reakciókat „ABI PRISM®BigDye™ Terminator v3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit”-tel végeztem a gyári leírás szerint. A reakciókat a Biomi Kft futtatta meg kapilláris gélelektroforézissel ABI 3700-as gépen.

3.11. M13 Fág termelése és izolálása

A 37°C-on $OD_{600nm}=0,5$ -ig inkubált *E.coli* (XL1Blue, CJ236) kultúrát az általunk a sejtbe juttatandó fággal fertőztem, majd megfelelő antibiotikumokat tartalmazó 2YT táptalajon inkubáltam 16 órán át 37°C-on. A sejteket ezután centrifugálással ülepítettem (10 000 RPM, 10 perc). A kapott felülúszóhoz 1/5 térfogatnyi 20 % PEG 8000 (Sigma); 2,5 M NaCl (Sigma) oldatot adtam, amivel kicsaptam a jelenlévő fágokat. Szobahőmérsékleten való 15 perces inkubálást követően a kicsapott fágokat centrifugálással ülepítettem (12 000 RPM, 10 perc), majd lepipettáztam a felülúszót, és a kapott csapadékot az eredeti tenyészet térfogatának 1/50 részének megfelelő PBS pH 7,2 oldatban vettem fel. A fágkoncentrációt fotometriásan határoztam meg 268 nm-en ($1 OD = 5 \times 10^{12}$ fág / ml).

3.12. Könyvtár méret meghatározása

A fágkönyvtár két lépésben készült. Először elektroporálással juttattam a fágmid-DNS könyvtárat a sejtekbe (lásd fent leírtakat), majd az így transzformált sejtekhez adott helperfággal fágmidot hordozó fág részecskéket, tehát fág könyvtárat hoztam létre. A könyvtár diverzitására információt szolgáltató könyvtárméret valójában az elektroporálással transzformált sejtek száma. Ezt a következő módon határoztam meg. Az elektroporált sejtek szuszpenziójából 20 μ l-t vettem ki, és ezt hígítottam 10-szeres hígításokat végrehajtva 8 lépésben. A hígított mintákban lévő sejteket LB/Amp agarlemezre szétvettem. A másnapra megjelenő telepek számából lehetett következtetni arra, hogy hány egyedi transzformált sejt keletkezett az elektroporálás során.

3.13. Könyvtár szelekció

Az SGIL könyvtárral elektroporált SS320-as sejteket M13KO7 helper fággal fertőztem, majd a termelt fág könyvtárat izoláltam a fent leírtak szerint. A célfehérjéket (szarvasmarha kimotripszin (Sigma); szarvasmarha tripszin (Sigma); kecskerák tripszin (izolált; Fodor és mtsi. 2005)), valamint az anti-FlagTag-IgG ellenanyagot (AffinityBioReagents) MaxiSorp (Nunc) ELISA lemezre kötöttem ki. Az enzimekből mintahelyenként 2 μ g-ot, az ellenanyagból 0,5 μ g-ot kötöttem ki 100 μ l térfogatban.

Kikötéshez 50 mM Na_2CO_3 pH 9,6 puffert használtam. A kikötés 2 órán át szobahőmérsékleten zajlott. A szabadon maradt felszíneket 200 μl /mintahely PBS-ben oldott, 5mg/ml koncentrációjú BSA (Sigma) oldattal blokkoltam 1 órán keresztül szobahőmérsékleten. A lemezeket négyszer PBS; 0,05% Tween20 oldattal mostam. Az izolált fág könnytárból 100- μl térfogatot vittem fel PBS; 5 mg/ml BSA; 0,05 % Tween 20 (Sigma) oldatban mindegyik célfehérje esetén. Háromórás inkubálást alkalmaztam, majd a nem kötődött fágokat tizenkétszeres mosással távolítottam el PBS; 0,05% Tween20 oldattal. A kötődött fágokat 100 μl /mintahely 100 mM sósavval eluáltam. Az azonos célmolekulákról származó eluátumokat azonos csőbe gyűjtöttem össze, 15 μl -nyi 1 M Tris-Bázis oldattal semlegesítve minden 100 μl eluátumot. Az első körben szelektált fágokat külön-külön célenzim szerint felszaporítottam a további szelekciós ciklusokhoz a következő módon. Az eluált fággal és M13KO7 Helper Fággal tízszeres térfogatnyi XL1 Blue $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,4$ sejtet fertőztem, amit 200 ml 2YT; 100 $\mu\text{g/ml}$ Amp; 25 $\mu\text{g/ml}$ Kan táptalajba oltottam át és inkubáltam 16 órán keresztül 37°C-on rázatva. A felszaporított kultúrából a fent leírtak szerint izoláltam a fágokat. Az izolált fágokat ismét szelektáltam az adott célenzimeken ugyanúgy, mint az első körben annyi különbséggel, hogy itt már kontroll mintahelyeket is használtam, olyanokat, ahol nem volt kikötve célfehérje, de BSA-val burkolva volt a felszín. Ezek a helyek összehasonlítás céljára szolgálnak. A célfehérjét is tartalmazó mintahelyekről eluált oldat fág-koncentrációját összehasonlítva a csak BSA-t tartalmazó mintahelyről származó fág oldat koncentrációjával meg tudhatjuk, hogy az oldat milyen mértékben dúsult fel olyan klónokban, amelyek valóban specifikusan a célfehérjéhez kötődnek. Négy szelekciós ciklust hajtottam végre, minden ciklusban fokozatosan csökkentve az alkalmazott mintahelyek számát.

3.14. Fág titrálás

Ezt a módszert azért alkalmaztam, hogy megtudjuk pontosan mennyi fertőzőképes fág van az eluált fág oldatban. A célmolekulákról eluált fág oldatból 30 μl -t vettem ki, és ezzel 0,27 ml $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,4$ XL1 Blue sejt kultúrát fertőztem 30 perig 37°C-on, 100 RPM-mel rázatva. Ebből 20 μl -nyit vettem ki és hígítottam tovább 2YT-ben tízszeres hígításokkal, nyolcszor. Az így kapott hígítási sorból 10 μl -t szélesztettem LB/Amp

agarlemezre. A másnapra megjelenő telepek számából vissza lehetett számolni a fertőzőképes fágok mennyiségét.

3.15. Fág ELISA

A fág ELISA mérések egyedi fág klónok kötési képességét ellenőrzik. A MaxiSorp (NUNC) lemezek mintahelyeibe 1µg-nyi célenzimet (szarvasmarha tripszin (Sigma), szarvasmarha kimotripszin (Sigma), kecskerák tripszin (izolált)) illetve 0,1 µg-nyi ellenanyagot (anti-FlagTag-IgG, AffinityBioReagents) kötöttem ki 50 mM Na₂CO₃ pH 9,6 pufferben oldva 2 órán. Az oldat kiöntése után blokkoltam a még szabadon maradt aktív felszínt mintahelyenként 200 µl, PBS pH 7,2 pufferben oldott 5mg/ml BSA oldattal. A blokkolást követően négyszer mostam a lemezeket PBS pH 7,2; 0,05 % Tween 20 (Sigma) oldattal. Ezután az ellenőrizni kívánt, klonálisan tiszta fágokat vittem fel, mintahelyenként 50 µl-t. A kikötés 1 órán át tartott szobahőmérsékleten, rázatva. A nem kötődő fágoktól hatszoros mosással (PBS pH 7,2; 0,05 % Tween 20) szabadultam meg. A kikötődött fágok megjelenítésére anti-M13KO7-HRP konjugált IgG-t használtam 5000-szeres hígításban PBS pH 7,2; 5mg/ml; 0,05 % Tween20 oldatban, 50 µl-t alkalmazva mintahelyenként. Az lemezeket 30 percig inkubáltam szobahőmérsékleten. A nem kötődött ellenanyagokat hatszoros mosással távolítottam el a fenti puffert használva, majd kétszer PBS pH 7,2 oldattal történő mosást alkalmaztam. A kötődött fágokat az ellenanyaghoz konjugált HRP segítségével jelenítettem meg 50 µl-nyi TMB (Sigma) szubsztráttal. A reakciót 50 µl-nyi 1 M sósavval állítottam le. A fotometriás jelet ELISA leolvasóval 450 nm-en detektáltam.

3.16. Citoplazmatikus fehérje expresszió *E.coli* sejtekben

Bakteriális, citoplazmatikus fehérje expresszióhoz az *E.coli* BL21 (DE3) pLysS (Cam^R) (Novagen) törzset használtam. Az általunk termeltetni kívánt fehérje génjét tartalmazó, azt T7 RNS polimeráz promóterrel ellátó pET17b (Novagen) vektorral transzformáltam a sejteket. A megfelelő antibiotikumra (ampicillin) kisselektált sejtek közül másnap 1 telepről telített kultúrát hoztam létre 5ml LB/Amp tápoldatban. Ebből a kultúrából egy ezred térfogatnyit oltottam át 2x500 ml tápoldatba, ami nem jelölt fehérje expressziója

esetén 2YT/Amp, jelölt fehérje expressziója esetén pedig egy szintetikus, minimál tápoldat volt. Ennek összetétele: 0,6 % Na_2HPO_4 ; 0,3% KH_2PO_4 ; 0,05 % NaCl ; 100 $\mu\text{g/ml}$ Amp; 0,4 % ^{13}C -glükóz; 0,1 % $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (Cambridge Isotope Labs). Amikor a sejt kultúra turbiditása elérte az $\text{OD}_{600\text{nm}}=0,8$ értéket, a T7 RNS polimeráz expresszióját 100 $\mu\text{g/ml}$ végkoncentrációban alkalmazott IPTG-vel indukálva elindítottam a rekombináns gén átírását. A sejteket további négy órán át inkubáltam, majd centrifugálással üleptettem (10 000 RPM, 30 perc). A sejtek inkubálása minden esetben 37 °C fokon történt.

3.17. Fehérje izolálása *E.coli* citoplazmából

A legtöbb fehérje citoplazmatikus expressziójától eltérően ez a két inhibitor nem zárványtestben, denaturált formában aggregálódva jelent meg a sejtekben. Ezek az inhibitorok oldott formában termelődtek. Ezért a hagyományos feltárási módtól eltérően izoláltam a fehérjéket. A lecentrifugált sejteket 1/10 térfogatnyi 50mM Tris, 1mM EDTA pH 8,0, 0,01% TritonX-100 (Sigma) oldatban vettem fel, majd újra lefagyasztottam. A felolvasztást követően 30 percet szonikáltam az oldatot, hogy a feltárt genomiális DNS széttöredezzon. Ezt követően dialízissel puffert váltottam (15mM Tris pH 7,6; 15mM NaCl). A dialízist 16 órán át, 4°C-on, 10 liter pufferrel végeztem. Az átdializált oldatból 30 percig 15 000 RPM-mel centrifugáltam ki a kicsapódott komponenseket. Az így kapott felülúszóból szilárd fázisra kötött proteáz segítségével, affinitás kromatográfiával tisztítottam ki a fehérjénket.

3.18. Kimotripszin-Sepharose-4B készítése

7 g brómcian aktivált oszloptöltetet (Sigma) 15 ml 1 mM sósavban szuszpendáltam fel. A töltetről G3 üvegszűrőn szűrtem, majd a szűrőn 1,8 liter 1 mM sósavval mostam. A töltetet ezután 25 ml 0,1 M NaHCO_3 ; 0,5 M NaCl pH 8,3 oldatban vettem fel és üvegedénybe töltöttem. A töltethez 10 ml 20 mg/ml szarvasmarha kimotripszin, 0,1 M NaHCO_3 ; 0,5 M NaCl pH 8,3 oldatot adtam. Az így kapott elegyet 4 °C-on 16 órán át kevertettem, majd G3 szűrőn leszűrtem. A nem kötődött kimotripszin mennyiségét OD = 280 nm-en mérve kiszámoltam, hogy mennyi kimotripszin kötődött a töltetre. A töltetet

30 ml 0,1 M NaHCO₃; 0,5 M NaCl 0,2 M Tris pH 8,3 oldatban vettem fel, és 4°C-on, 16 órán át kevertettem lengőasztalon. Ismét leszűrtem G3 szűrőn, majd 1 liter 0,1 M NaCH₃COOH; 0,5 M NaCl pH 4,0 oldattal mostam. Ezután további mosás következett 1 liter 0,1 M Tris; 0,5 M NaCl pH 8,3 oldattal. A töltetet ezt követően 15 mM Tris; 15 mM NaCl; 0,1% Na-azid pH 7,6 oldatban tároltam 4 °C-on.

3.19. Inhibitor izolálás affinitás kromatográfiával

A 15mM Tris pH 7,6; 15mM NaCl pufferben lévő sejt lizátumból egyszerre 1x-2x oszloptérfogatnyi mintát vittem fel olyan Sepharose4B oszlopra, amelyre előzőleg kovalens módon szarvasmarha kimotripsint kötöttem ki. A mintafelvétel után az oszlopot kétszer mostam oszloptérfogatnyi desztillált vízzel, majd 20 mM sósavval eluáltam az inhibitor (SGPI-1 vagy SGPI-2) molekulákat. Az oszlopot 50 mM sósavval mostam le, majd 15mM Tris pH 7,6; 15mM NaCl pufferrel regeneráltam.

3.20. Fehérje koncentráció meghatározása

A homogenitásig tisztított fehérjék moláris koncentrációját fotometriásan OD = 280 nm-en mért fényelnyelés értékek és a www.expasy.ch honlapon található ProtParam program segítségével meghatározott moláris extinkciós együttható (ϵ) értékekkel számoltam ki. (Egyes esetekben az izolátumban található aktív komponensek koncentrációját aktívhely titrálással határoztam meg, lásd később). Mind az SGPI-1-Lys-Arg-SGPI-2 fúziós fehérje, mind pedig az SGPI-1-Met-SGPI-2 fúziós fehérje $\epsilon_{280\text{nm}}=6410 \text{ l/M*cm}$ együtthatóval rendelkezik. Az SGPI-1 értéke $\epsilon_{280\text{nm}}=6050 \text{ l/M*cm}$, míg az SGPI-1-Met-SGPI-1 fúziós fehérje értéke $\epsilon_{280\text{nm}}=12100 \text{ l/M*cm}$.

3.21. HPLC

Az inhibitorokat egymástól és egyéb szennyeződésektől RP-HPLC segítségével választottam el. A kromatográfia Phenomenex 10.0 C-18 oszlopon történt, HP Agilent Series 1100 HPLC berendezéssel. Az elválasztás lineáris gradienssel történt, a B puffer

80 % acetonitril/0,1% TFA 20 perc alatt 10%-ról 14 %-ra nőtt 3ml/perc átfolyási sebességgel. Az A puffer 0,1 % TFA volt. A detektálás 280 nm, és 220nm-en történt.

3.22. A fúziós fehérje hasítása brómcíánnal

Az affinitáskromatográfiát követően homogénre tisztult inhibitorokat liofilizáltam. 200 µg fehérjét 100 µl átnitrogéneztetett, 10 % brómcíán; 70% hangyasav oldatban vettem fel. A csövet a fehérje feloldása után nitrogénnel telítettem. A hasítási folyamat szobahőmérsékleten, 18-24 órán keresztül történt, sötétben. A reakciót tízszeres mennyiségű desztillált víz hozzáadásával állítottam le. Ezt követően a mérgező brómcíántól liofilizálással szabadultam meg.

3.23. Tömegspektrometria

Ezeket a méréseket Kékesi Katalin végezte HP1100 Series HPLC-ESI-MS rendszeren. Az injektálás 10 mM NH₄COOH; 10 % CH₃OH pH 3,5 oldatban 0,2 ml/perc sebességgel történt. A vivőgáz 300°C-os 10 l/perc sebességű, 30 PSI nyomású nitrogén volt. A kapilláris feszültség 3500 V volt. A kapott adatok AgilentChem szoftver segítségével lettek kiértékelve.

3.24. Peptidszintézis

A peptideket Patthy András szintetizálta szilárd fázisú standard Fmoc módszerrel. A felszínről való hasítás és védőcsoportok eltávolítása TFA-val történt. Az oldatot liofilizálta, majd a kapott csapadékot desztillált vízben vette fel, majd ismét liofilizálta. A peptidek diszulfidhidas térszerkezetének elnyerését levegő számára nyitott oldatban történő kevertetéssel érte el. Az oldatban az inhibitor 0,1 mg/ml-es koncentrációban volt jelen, az oxidálást elősegítő magas (8-9 közötti) pH értéket N,N-diisopropil-etilaminnal állította be. Az oxidációs folyamatot HPLC követte. A szintetizált peptidek ellenőrzése tömegspektrometriával történt.

3.25. Fehérjeszekvenálás

- A rekombináns fehérjetermékek vizsgálatához a tisztított termékeket SDS-PAGE elektroforézisnek vettem alá. A PVDF membránt 10 percig 100 % metanolba áztattam, majd 15 percre CAPS pufferbe helyeztem. A membránt a géltre helyeztem, majd ezt a „szendvicset” két Whatman papír közé úgy tettem a BioRad blottoló készülékbe, hogy a PVDF membrán a pozitív pólus felé kerüljön. Az elektroforézist CAPS pufferben végeztem másfél órán át 100V feszültséget alkalmazva. A PVDF membránt 0,1 % Coomassie Blue R-250 + 50 % metanol oldatban festettem, majd megszáritottam. A megfelelő csíkokat kivágtam. Ezeket a kivágott membránokat felhasználva a szekvenálást már Patthy András végezte el. A PTH-aminosavak detektálása és azonosítása 269nm-en történt.

3.26. NMR spektroszkópia

Az NMR-es adatgyűjtéseket Perczel András végezte, de a kiértékelésben már én is részt vettem. A titrálási méréseket 10 mM MES pH 6,0; 0,001% Na-azid pufferben végezte 1 mM inhibitor koncentráció mellett. Az asszignációhoz a kiindulási helyzetben homonukleáris TOCSY, NOESY, 3D-TOCSY-HSQC és NOESY-HSQC spektrumokat vett fel. A végpontban, a komplexált állapot asszignációjához a következő tripla-rezonancia spektrumokat vett fel: HNCA, HNCOCA, HNCACB, COCACBNH. Az előbbieket mellett minden egyes titrálási pontban ^1H - ^{15}N HSQC spektrumokat is felvett és ezeket is elemezte. A jeleket 600 MHz Varia Inova NMR spektrométeren gyűjtötte. Az NMR relaxációs paramétereket (T_1 , T_2 , NOE) 500 MHz-en vette fel a Farrow és mtsi. 1994. által leírt pulzusszekvenciákat felhasználva. A felvett NMR spektrumokat az NMRPIPE programmal processzáltuk mindegyik dimenzióban négyzetes, 0 feltöltéssel. A tripla-rezonancia kísérletekben a ^{13}C dimenzióban visszafelé történő jel asszignációt alkalmaztunk. A spektrumok analíziséhez az XEASY (Bartels és mtsi. 1995), a SPARKY (Goddard és Kneller 2005), és a SYBYL program TRIAD modulját (Triops Inc. 2001) használtuk. A szabad és a kimotripsinnel komplexált SGPI-2 molekula kémiai eltolódás értékeit, valamint relaxációs paramétereit a BMRB adatbázisban (www.bmrb.wisc.edu, Seavy és mtsi. 1991) helyeztük el 6880 és 6881-es azonosítóval.

3.27. Enzim aktívhely titrálás

Az aktívhely titrálást fluorimetriás méréssel végeztem Spex FluoroMAX készüléken MUTMAC (kimotripszin) és MUGB (szarvasmarha illetve kecskerák tripszin) szubsztrátszerű inhibitorokkal. Ezek az enzim aktívhelyére kovalensen bekötődnek, és ahány aktívhellyel reagálnak, annyi fluoreszcens jelet produkáló MUB hasad le belőlük. A molekulák másik része stabil acilenzim formában kötve marad az enzimhez gátolva azt. A méréseket 1 ml 50 mM Tris; 10 mM CaCl_2 ; 0,005% Triton-X100 pH 8,0 pufferben végeztem. Egy méréshez 5 μg -nyi enzimet használtam, majd öt egymás utáni bemérésben 5 μl , 50 μM MUGB (vagy MUTMAC) szubsztrátot mértem be. A gerjesztési hullámhossz 380 nm, az emissziós hullámhossz 460 nm volt. A készüléket 50 μM MUB oldattal kalibráltam, hogy a MUGB-os, illetve MUTMAC-os mérésekben felszabaduló fluoreszcens jelről megállapíthassam, hogy ezekben mennyi MUB keletkezett, tehát mennyi aktívhely volt jelen. A MUB oldat pontos moláris koncentrációját 324 nm-en mért fényelnyelés alapján határoztam meg ($\epsilon_{324\text{nm}}=12\ 400\ \text{l/M}\cdot\text{cm}$). Az aktív enzim pontos koncentrációját 5 párhuzamos mérésből számoltam ki.

3.28. Inhibitor aktívhely titrálás

Ez a módszer akkor alkalmazható, amikor a K_i értékét nagyságrendekkel meghaladó koncentrációban tudjuk az enzimet és az inhibitor összekeverni. Mivel a mérésekben alkalmazható legmagasabb enzimkoncentráció a mikromoláris tartományban van, ezért inhibitor aktívhely titrálást a legalább 10^{-8}M K_i értékkel rendelkező inhibitor-enzim pároknál lehet kivitelezni. A magas enzim és inhibitor koncentrációk miatt a másodrendű reakció pillanatok alatt egyensúly közeli állapotra jut, ezért rövid inkubációs idők is elegendőek. Az ilyen párok esetén a következő módon jártam el. μM végkoncentrációjú aktívhely-titrált enzim oldatot használtam 50 mM Tris; 10 mM CaCl_2 ; 0,005% Triton-X100 pH 8,0 pufferben úgy, hogy külön-külön csövekben nullától indulva lineárisan növekvő inhibitor koncentrációt alkalmaztam. A csöveket 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltam. Az oldatokból maradék enzimaktivitást mértem az enzimnek megfelelő szubsztrát segítségével. A maradék enzimaktivitás adatokat a bemérési inhibitor koncentráció függvényében ábrázoltam. Az aktív inhibitor koncentrációt lineáris regresszió analízissel határoztam meg.

3.29. K_I mérési eljárások

3.29.1. K_I mérés az 1 mM-1 μ M tartományban folyamatgörbe (progress curve) módszer

A folyamatgörbe analízis olyan kinetikai módszer, ami alkalmas az ebbe a tartományban eső K_I értékek meghatározására megfelelő nemlineáris illesztő program, (DYNAFIT) segítségével. Ezekben a mérésekben az enzim, a szubsztrát és az inhibitor gyors összekeverése után fotometriás módszerrel folyamatosan mérjük a keletkező színes termék koncentrációját. Ennek értékéből a kiindulási szubsztrát koncentrációt is ismerve az aktuális szubsztrát koncentráció is megkapható. A termékkeletkezés üteme, és az aktuális szubsztrát koncentráció értéke megfelelő elő-kísérletek után megadja, hogy mennyi a pillanatnyi szabad enzim koncentráció, amiből természetesen az inhibitorhoz kötött enzim koncentrációja is adódik. Ez utóbbiból a bemérési inhibitor koncentráció figyelembevételével adódik a szabad inhibitor koncentrációja. Mindezen adatok időbeni változása alapján a K_I értéke kiszámolható. A mérés csak akkor végezhető így el, ha az inhibitor és a szubsztrát között valódi versengés van, ami csak akkor teljesül, ha a K_I a szubsztrátra vonatkozó K_M közelében van. Ez csak gyenge inhibitorokra igaz. Ezeket a méréseket 1 ml 50 mM Tris; 10 mM CaCl_2 ; 0,005% Triton-X100 pH 8,0 pufferben, 10 nM aktívhely-titrált enzim koncentráció, 0,9 nM aktívhely-titrált inhibitor koncentráció és 50 mM CZB-Gly-Pro-Arg-pNA (Sigma) szubsztrát koncentráció mellett végeztem. A kapott görbék alapján a fent említett szoftver segítségével határoztam meg a kérdéses K_I értékeket. A méréseket 405 nm-en Shimadzu Spektrofotométeren végeztem. Minden K_I érték meghatározásához 4 párhuzamos mérést végeztem.

3.29.2. K_I mérés az 1 μ M-1 nM tartományban fotometriával egyensúlyi módszer

Ez egy klasszikus, Laskowski által tökéletesített módszer, ahol állandó bemérési enzimkoncentráció, és több eltérő inhibitor koncentráció mellett mért maradék enzim aktivitás alapján határozzuk meg K_I értéket. Az enzimkoncentrációnak a K_I érték közelében kell lennie, ezért a módszer előzetes iteratív próbálkozást igényel. Adott $[E]$ mellett $[I]=0$ -tól körülbelül $[I]=3[E]$ értékig növeljük az inhibitor koncentrációt külön-külön mintákban. Megvárjuk az egyensúly beálltát, majd egy gyors méréssel megmérjük

a maradék szabad enzim koncentrációját az aktivitáson keresztül. A bemérési inhibitor koncentráció függvényében ábrázoljuk a szabad enzim koncentrációját. Megfelelően alkalmazott koncentrációk esetén az 1:1 arányú enzim-inhibitor keverékben a maradék szabad enzim koncentráció az összes bemérési enzim koncentráció mintegy 5-20 %-át teszi ki.

Az inkubációt 1 ml 50 mM Tris; 10 mM CaCl₂; 0,005% Triton-X100 pH 8,0 pufferben végeztem szobahőmérsékleten 405 nm-en. Szubsztrátként tripszin esetében 0,25 mM Z-Gly-Pro-Arg-pNA, kimotripszin esetében Z-Gly-Pro-Phe-pNA szubsztrátot használtam. Minden egyes mérési ponthoz három párhuzamos mérést végeztem. A kapott értékeket a LabFit szoftverrel (Wilton and Cleide Pereira da Silva; www.labfit.net) értékeltem ki nemlineáris regresszióval az alábbi egyenlet alapján.

$$\frac{[E]}{[E]_0} = 1 - \frac{[E]_0 + [I]_0 + K_I - \sqrt{([E]_0 + [I]_0 + K_I)^2 - 4[E]_0[I]_0}}{2[E]_0}$$

Ahol az indexben nullát hordozó értékek rendre a bemérési (teljes) anyagkoncentrációra, az index nélküliek pedig az aktuális szabad állapotban lévő forma koncentrációjára vonatkoznak

3.29.3. K_I mérés a 0,1 nM-1 pM tartományban – fluorimetriával-egyensúlyi módszer

A mérés elve, és a kiértékelés módja tökéletesen megegyezik az előző pontban említettekével, de az alacsonyabb K_I értékek miatt alacsonyabb enzimkoncentrációkat (és inhibitor koncentrációkat) kell alkalmazni. Ez két módosítást is megkövetel. Az egyik, hogy a nagyon alacsony maradék enzim aktivitásokat a lehető legérzékenyebb mérési technikával, esetünkben fluorimetriával kell meghatározni. A másik eltérés, hogy a másodrendű enzim-inhibitor komplexképzési reakció üteme a koncentrációk csökkenésével drasztikusan csökken, ami az egyensúly eléréséhez hosszú inkubációs időket igényel. Pikomoláris K_I értékek esetében éjszakán át kell inkubálni. Az enzim koncentráció ezekben az esetekben 0,1 nM volt. Az enzim inhibitor keveréket 1 ml 50 mM Tris; 10 mM CaCl₂; 0,005% Triton-X100 pH 8,0 pufferben, 18 órán át inkubáltam.

A maradék enzimaktivitást tripszin esetében 50 μ M szubsztráttal, kimotripszin esetében Succ-Ala-Ala-Pro-Tyr-AMC szubsztráttal mértem 380 nm-es gerjesztési és 460 nm-es emissziós hullámhosszokon Spex FluoroMAX spektrofluoriméteren. Mindegy egyes mérési adatot három párhuzamos méréssel határoztam meg.

3.30. Fágszelektált inhibitor szekvenciák páronkénti kovariancia analízise

A szelektált szekvenciákban található egyes pozíciók közötti esetleges nem-független kapcsolatot Pál Gábor ötlete nyomán páronkénti kovariancia analízissel számoltam ki. Ennek során az OMES (Observed Minus Expected Squared) kovariancia számítási módszert alkalmaztam [Fodor és mtsi. 2004]. A módszerben leírt algoritmusra Gáspári Zoltán írt programot, amellyel a kovariancia értékek meghatározása automatizálható lett. Az algoritmus a szekvenciák egymás alá rendezésével kapott, az aminosav pozíciókat jelentő oszlopokat ($i; j$) párba állítja, majd kigyűjti az összes itt megjelenő aminosav párt (L). (A hiányokat (gap) is beleértve elvileg $21^2=441$ aminosav-pár lehetséges. A könyvtárunk speciális kiméra mutagenézissel készült, amelyben egy-egy variált pozícióban 2, vagy 4-féle pozíciót engedtünk meg, így pozíció páronként 4, illetve 16-féle aminosav párt kellett figyelembe venni). Minden egyes oszlop-párra egy „S (score) értéket számoltam a következő egyenlet segítségével:

$$S = \sum_1^L \frac{(N_{obs} - N_{exp})^2}{N}$$

Ahol N_{obs} a kapott aminosav-párok száma, N_{exp} az elméletileg várható aminosav-párok száma, N pedig az egymás alá rendezett szekvenciák száma. Egy X és Y aminosav-pár együttes előfordulására az i és j pozíciókon az N_{exp} értéke a következő módon számolható:

$$N_{exp} = \frac{C_{X,i} \times C_{Y,j}}{N}$$

Ahol $C_{X,i}$ az i pozícióban található X típusú aminosav előfordulási száma, $C_{Y,j}$ a j pozícióban található Y típusú aminosav előfordulási száma. A négyzetes összefüggés miatt az S értéke vagy nulla, vagy pozitív. Függetlenség esetén nullát, míg egyre nagyobb kapcsoltság esetén egyre nagyobb S értéket kapunk.

3.31. Statisztikai szignifikancia analízis Bootstrap módszerrel

Ahhoz, hogy az S értékéből meg tudjuk becsülni, vajon az „elegendően magas-e” ahhoz, hogy kapcsoltságra utaljon, a kapott S értékeket össze kellett vetni olyanokkal, amelyek független pozíciók kombinálódása esetén adódnak. Tehát statisztikai szignifikancia tesztet kellett használnunk. Egy ilyen összehasonlítás pusztán azért is fontos volt, mert az S numerikus értéke függ attól, hogy az adott pozíció-párokban pozíciónként kettő, vagy négy aminosavféleség megengedett. Mindezek figyelembevételével Pál Gábor a „Bootstrap módszer” nevű kiértékelési módot javasolta. A célmolekulákon szelektált szekvenciákat (célmolekula típusonként szeparálva) egymás alá rendeztük. A kovariancia érték meghatározását követően ezt az összerendezett szekvencia együtttest használtuk fel a véletlenszerűen kombinálódó esetek előállítására. Ezt úgy értük el, hogy az egyes *oszlopokon belül* véletlenszerűen összekevertük az egyes aminosavakat. Így olyan új szekvencia sereget kaptunk, ahol az egyes pozíciókban (oszlopokban) az egyes aminosavak előfordulási gyakorisága megegyezik a valóságban meghatározott gyakorisággal, de az adott szekvencia seregben az összekeverés miatt az egyes aminosav párok véletlenszerűen kerülnek ugyanazon szekvenciára. Egy ilyen szekvencia sereg meghatározott S érték (amit statisztikai S értéknek, S' jelölünk) tehát csak a mintavételezési hiba miatt fog nullától eltérő értéket adni. Minden egyes célfehérje szelekcióból származó szekvencia sereg külön-külön elvégeztük ezt a keverést és kovariancia számolást 100 000-szer egymás után szoftveres eljárással. Az algoritmust és a szoftvert Gáspári Zoltán írta. A valódi szekvenciákból kapott S értékek szignifikancia szintjét az $S1$ értékek eloszlása alapján határoztuk meg a következő módon. Meghatároztuk azoknak az S' értékeknek a számát, amelyek egyenlőek, vagy nagyobbak, mint a kísérlet alapján kapott S érték, és ezt a számot elosztottuk 100 000-rel. Így egy szignifikancia értékre vonatkozó P értéket kaptunk, melynek jelentését a következő példa szemlélteti. Ha $P \leq 0,05$ akkor a véletlenszerű kombinálódás esetére számolt S'

értékeknek nem több mint 5%-a nagyobb, mint a kísérletesen kapott S értékünk. Ez azt jelenti, hogy nem több mint 5% a valószínűsége annak, hogy a kapott S értékünk nem valós függetlenség, hanem mintavételi hiba eredménye. Más szóval 95% a valószínűsége annak, hogy a kapott S érték valóban nem-független, tehát kapcsolt pozíciókra vonatkozik.

4. EREDMÉNYEK ÉS DISZKUSSZIÓ

4.1. Az SGPI-1 és SGPI-2 inhibitorok klónozása

Az inhibitorok klónozása egyszerűnek bizonyult, ugyanis számos ehhez szükséges ismeret a rendelkezésemre állt. Ismert volt, hogy a két inhibitor tandem módon, egyetlen fehérjeként termelődik, ismert volt, hogy mely szövetekben fejeződik ki, és végül ismert volt a cDNS szekvenciája is (Vanden Broek 1998).

Ezek ismeretében egy hím sáska zsírtestéből izoláltam a teljes RNS állományt, cDNS-t készítettem, majd specifikus primerek segítségével, PCR-rel kierősítettem a két inhibitor domént kódoló DNS szakaszt. A primerek az irányított orientációjú vektorba építéshez szükséges klónozóhelyeket is biztosították. A terméket pET17b expressziós vektorba ligáltam, és a beépítés sikerét a ligátummal transzformált *E.coli* telepekből kinyert DNS PCR-es ellenőrzésével, ezután a pozitív klónokból izolált plazmidok emésztéssel ellenőriztem. Az így is jónak talált klónkat DNS szekvenálással ellenőriztem, hogy meggyőződjek arról, szekvenciájuk mindenben megegyezik-e az irodalomban közölttel. Egy tökéletesnek talált klónt SGPI-1-Lys-Arg-SGPI-2 névvel ellátva megőriztem.

A konstrukció a neve jelzi, hogy az egyes inhibitorok milyen sorrendben követik egymást a keletkező fehérjében, és mutatja, hogy egy Arg-Lys pozíció melletti hasítással lehetne elválasztani egymástól az SGPI-1 és SGPI-2 doméneket. A többi konstrukciót, amelyek a fehérje izolálás egyszerűsítését célozták, ebből a konstrukcióból hoztam létre (4.1./1. ábra).

Hím *Schistocerca gregaria* zsírtest
Össz-RNS izolálása QIAGEN RNeasyKittel

össz-RNS

cDNS szintézise Reverz Transzkriptázzal

cDNS

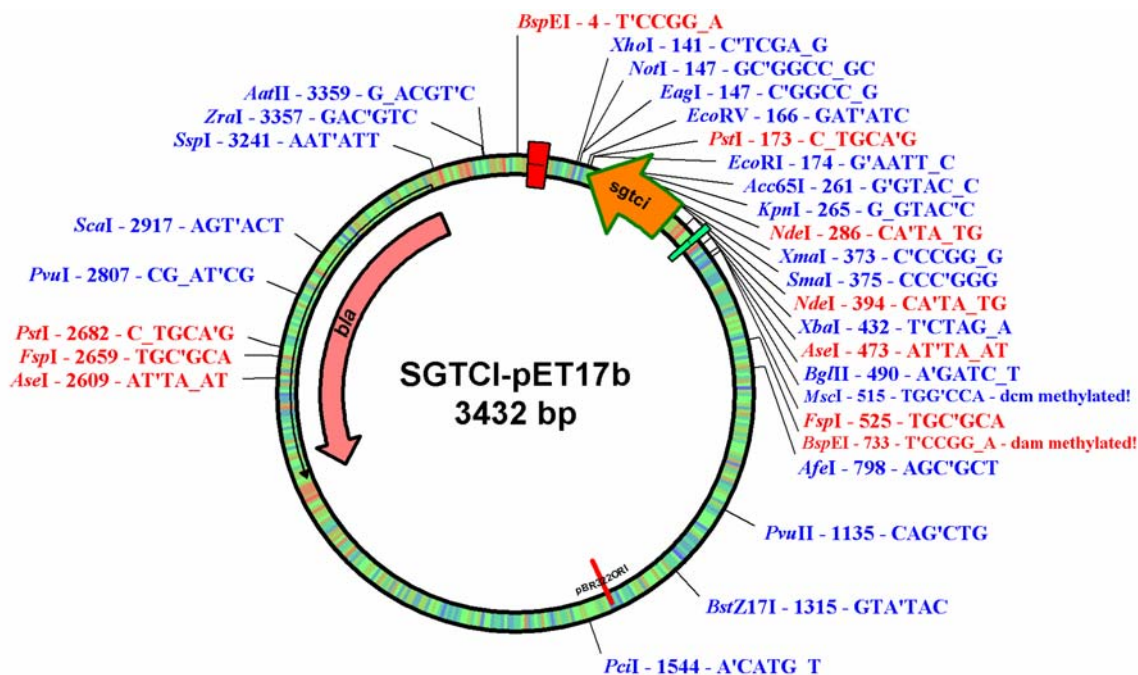
Az SGPI-1-Lys-Arg-SGPI-2 gén PCR-es felszaporítása
5', illetve 3'végre specifikus primerekkel

NdeI
5' TATATACATATGGAACAGGAATGTACACCTGGC3'
5' ATGGAACAGGAATGTACACCTGGCCAGACGAAGAAACAAGACTGCAACACATGCAATTGTACCCCTACTGGAGTTTGGGCCTGTACTCGCAAGGGCTGCCCGCCCAT
M E Q E C T P G Q T K K Q D C N T C N C T P T G V W A C T R K G C P P H
AAGAGA
R R
GAGGTACCTGCGAGCGGGGACAACTTCAAGGACAAATGCAACACGTGTGCTGTGGAAGTGACGAAAAATCGGCAGCGTGCACCCCTCAAGGCCTGCCCGCCAG 3'
E V T C E P G T T F K D K C N T C R C G S D G K S A A C T L K A C P Q STOP
3' GAGTTCGGACGGGGTCACTCTTAAG
STOP

5'

EcoRI

PCR termék és pET17b emésztése NdeI / EcoRI-el, ligálás



4.1./1 ábra Az SGPI-1-Lys-Arg-SGPI-2 gén klónozása, és pET17b vektorba építése

A vektor térképet a pDRAW32 szoftverrel szerkesztettem.

(Az ábrán helyhiány miatt egy rövidített név, SGTCI szerepel, ami az inhibitorok korábbi elnevezését, SGTI és SGCI, tükrözi)

4.2. Az inhibitorok expressziója, izolálása

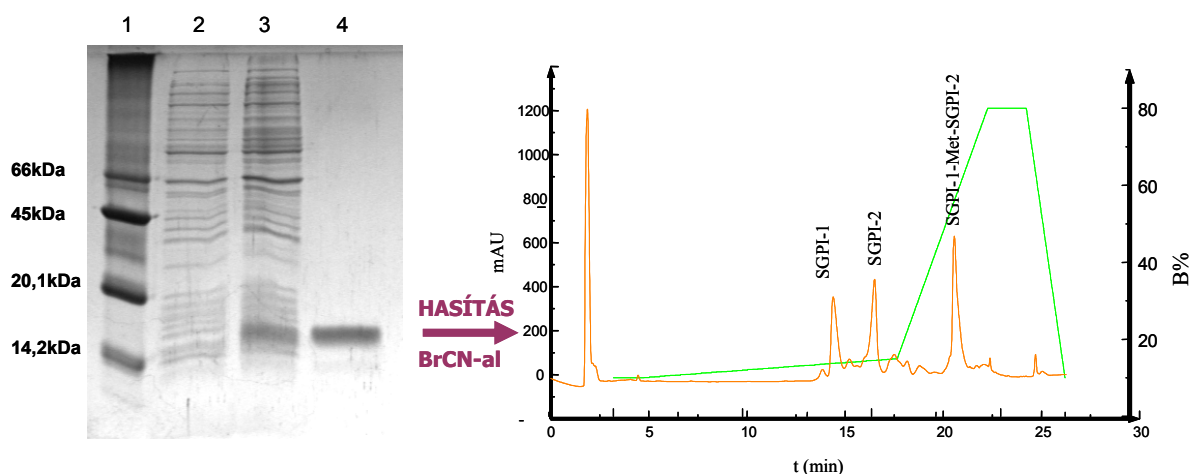
Fehérje termeléshez technikai részleteit az Anyagok és Módszerek fejezet tartalmazza. Mivel egy nagyon magas szintű citoplazmatikus fehérje expresszióra alkalmas pET rendszert használtam, a várakozásunk az volt, hogy a termék zárványtestek formájában jelenik meg, ugyanis ez a leggyakrabban tapasztalt jelenség ezzel a rendszerrel kapcsolatban. Ennek előnye, hogy a zárványtestben lévő fehérjék könnyen tisztíthatók, hátránya ugyanakkor, hogy ki kell dolgozni egy fehérjénként eltérő renaturációs technikát, amellyel natív konformációba lehet segíteni a fehérjét. Ennek fényében meglepő volt, hogy az általam létrehozott konstrukció az inhibitorok oldott formájú termelését eredményezte. Emiatt nem kellett renaturálást alkalmazni (bár ennek technológiája a peptidszintézissel előállított formák miatt már ki volt dolgozva), ellenben nagyobb mennyiségű szennyező fehérjétől kellett eltávolítani a rekombináns terméket. Ezt végül a néhány centrifugálósos frakcionálástól és dialízistől eltekintve egyetlen lépésben, affinitáskromatográfiával tettem meg. A tandem párban szereplő inhibitorok közül az SGPI-2 (régebbi nevén SGCI) nagyon jó kimotripszin inhibitor, így az affinitáskromatográfia során immobilizált kimotripszint alkalmaztam, amivel nagytisztaságú terméket kaptam (4.2./1. ábra). A meglehetősen jó kitermelés mértékét a 4.2./1. táblázat tartalmazza, és itt mutatom be az összes egyéb termelt variáns kitermelését is.

Mint említettem, a Pacifastin inhibitorokat egyesével nem sikerült kifejezni. Ennek pontos molekuláris oka ugyan ismeretlen, de az ismert tény, hogy a riboszómális fehérjetermelés hatékonysága függ a polipeptidlánc méretétől, amennyiben bizonyos méret alatt nem keletkezik termék. A jelek szerint a 35 aminosavas méret még ebbe a nem termelődő tartományba esik. Az inhibitorokat tehát legalább párosával kellett előállítanunk, összhangban azzal, hogy az adott két inhibitor a természetben is így termelődik. Először ugyanazt a terméket izoláltam, ami processzálas előtt a természetes gazdaélőlényben is termelődik. Kiderült azonban, hogy a két inhibítort összekötő Lys-Arg processzálo helyet nem sikerül marha tripszinnel elhasítanunk. Természetesen nem arról volt szó, hogy az inhibitorok gátolták volna az enzimet, hiszen mind az SGPI-1, mind az SGPI-2 nagyon gyenge emlős tripszin inhibitor, másfelől pedig a moláris feleslegben adott tripszin sem volt megoldás. A jelek szerint az adott kötés nem volt hozzáférhető az enzim számára. Részben ezért, részben pedig azért, mert terveink között szerepelt nagy aktivitású tripszin inhibitorok fejlesztése, alternatív utat választottunk. Patthy András javaslatára egy kémiai processzálas választottunk, a brómcíános hasítást, amely meglehetősen szelektíven hasítja a metionint követő peptidkötést. Ez a lehetőség azért adódott, mert sem az SGPI-1, sem az SGPI-2 nem

tartalmaz metionint. Ugyanakkor ez az eljárás természetesen nem lenne alkalmas olyan formák termelésére, amelyekbe metionint akarunk bevinni (amit később egyes P1' mutánsoknál meg is tettünk).

A következő, metionin mentén hasítható konstrukciókat készítettem el:

SGPI-1-Met-SGPI-2-pET17b; SGPI-1-Met-SGPI-1-pET17b és SGPI-2-Met-SGPI-2-pET17b. Tehát az eredeti vegyes tandem elrendezés mellett két olyat is készítettem, amelyekben azonos felépítésű két inhibitor követi egymást. Ez utóbbiakkal egyszerűbbé vált egyik illetve másik inhibitor tiszta formában történő előállítása. A brómcíános hasítást követően az inhibitorokat fordított fázisú HPLC-vel választottam el egymástól (4.2./1. ábra). Az előállított inhibitorokat Patthy András fehérje szekvenálással, Kékesi Katalin pedig tömegspektrometriával ellenőrizte, míg én kinetikai mérésekkel igazoltam az inhibitorok natív állapotát (4.2./1. táblázat). Az így előállított formák tisztasága és mennyisége (4.2./1. táblázat) megfelelő volt ahhoz, hogy a további kinetikai és NMR spektroszkópai vizsgálatokban felhasználjuk őket.



4.2./1. ábra Az SGPI-1-Met-SGPI-2 expressziója, hasítása és a két inhibitor izolálása

SDS-PAGE minták: 1. molekulásúly marker;

2. *E.coli* lizátum indukció előtt, 3. *E.coli* lizátum indukció után;

4. Affinitáskromatográfiával tisztított SGPI-1-Met-SGPI-2.

A brómcíánnal hasított SGPI-1-Met-SGPI-2 mintából az egyes komponenseket fordított fázisú HPLC-n választottam szét. Pirossal a 220 nm-en detektált jelet, zölddel a gradienst jeleztem.

Név	Tömeg (Da)	Literenkénti kitermelés (mg)	K_i (M)		
			Szarvasmarha kimotripszin	Szarvasmarha tripszin	Kecskerák tripszin
SGPI-1-Met-SGPI-2	7721.8	25	5.5×10^{-12}	2.0×10^{-7}	4.3×10^{-12}
SGPI-2-Met-SGPI-2	7552.7		5.5×10^{-12}	2.0×10^{-5}	-
SGPI-1-Met-SGPI-1	7890.9	10	2.0×10^{-6}	2.0×10^{-7}	4.3×10^{-12}
SGPI-1	3823.3	4	2.0×10^{-6}	2.0×10^{-7}	4.3×10^{-12}
SGPI-2	3654.1	6	5.5×10^{-12}	2.0×10^{-5}	-

4.2./1. táblázat A rekombináns SGPI-1 és SGPI-2 variánsok termelhetőségre és aktivitásra vonatkozó jellemzői.

4.3. NMR mérések - titrálás

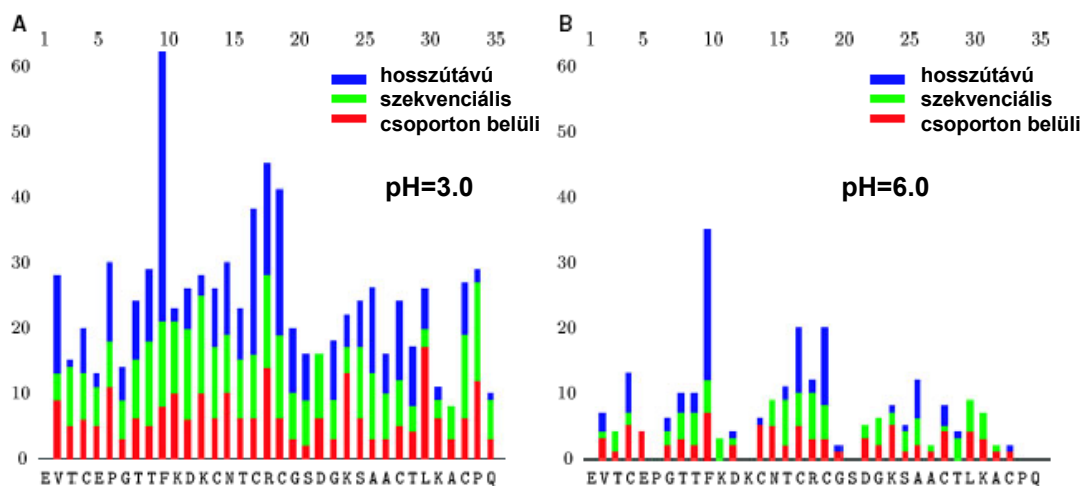
A dinamikai vizsgálatokhoz ^{15}N , illetve ^{13}C jelzett fehérjékre volt szükség. Ezeket izotóp tartalmú minimál táptalajon inkubált *E. coli* baktérium sejtekben termelve állítottam elő a már ismertetett módon. Mindkét inhibítort sikerült egyszeresen (^{15}N) és duplán ($^{15}\text{N}^{13}\text{C}$) jelölt formában is előállítanom az NMR mérésekhez megfelelő, 3-4 mg mennyiségben. Amint a bevezetőben már vázoltam, az általam izolált anyagokat felhasználva Gáspári Zoltán mérte meg a szabad formában lévő inhibitorok peptidgerincének dinamikai tulajdonságait, amit részletesen ismertetett doktori értekezésében. Ezeknek az adatoknak a birtokában és a két inhibitor dinamikájának a komplexképzés során bekövetkező változását vizsgáltam. A duplán jelölt inhibitorhoz SGPI-1 estén kecskerák tripszint, míg SGPI-2 esetén szarvasmarha kimotripsint, adtam három különböző arányban, 30%; 60% és 98%-os titráltság, amelyek közül a legmagasabb tehát közel ekvimoláris volt. A három titrálási pontban Perczel András vette fel a spektrumokat, amelyeket az Ő, valamint Gáspári Zoltán útmutatásai szerint asszignáltam az erre alkalmas programmal.

Mielőtt az eredményeket ismertetném, szeretném kiemelni az ilyen jellegű mérésekkel kapcsolatos egyik olyan problémát, ami ebben az esetben is gondot okozott. Ez a következő: erős, jól definiált NMR jelek érdekében a méréseket – amikor csak a minta azt megengedi-, alacsony pH-n veszik fel, mert ilyenkor lassú a fő információt szolgáltatató, amid protonok kicserélődése. Ezért az egyedi, szabad formájú inhibitorok mérései hármas pH értéken zajlottak. Sajnos ez a pH nem alkalmas a proteáz-inhibitor kapcsolat vizsgálatára, mert ilyen alacsony pH értéknél a komplex nem alakul ki, vagy nagyon instabil. A méréseket ezért hatos

pH-n végeztük, ami ugyan kedvez az erős, natív jellegű komplex kialakulásának, de nem kedvez magának az NMR mérésnek. Ennek ismeretében eleve számítottunk rá, hogy az NMR jelek viszonylag gyengék lesznek.

Az SGPI-1 – kecskerák tripszin titrálási pontjaiban mért spektrumok jelei sajnos a vártnál is gyengébbek voltak, ezeket csak részlegesen lehetett asszignálni. Ennek oka az említett pH problémán felül esetleg annak is betudható, hogy az SGPI-1 molekula a komplexben nem egy, hanem több eltérő konformációs állapot között (vagy körül) fluktuál. Erről az enzim-inhibitor kapcsolatról ezért csak részleges, és nem egyértelmű információkat kaptam.

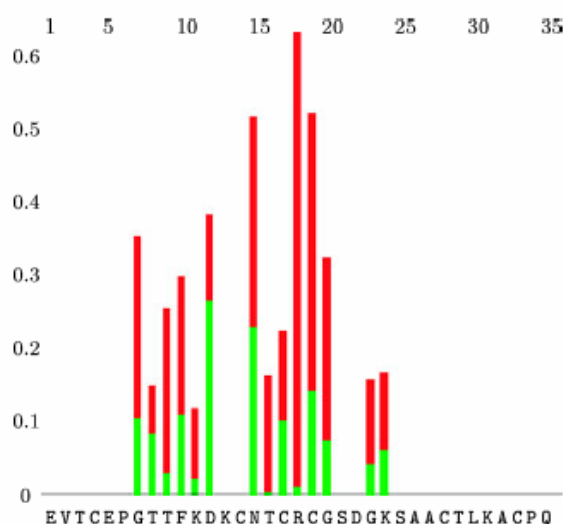
Az SGPI-2 – kimotripszin párról gyűjtött adatok azonban elégségesek voltak a rezonancia asszignáláshoz és az inhibitor molekula főbb dinamikai jellemzőinek meghatározásához, de pontos szerkezet meghatározáshoz ezek az adatok sem voltak elegendőek. Az ehhez szükséges NOE jelek száma túl kevésnek, intenzitása pedig túl alacsonynak bizonyult hatos pH-n zajló intenzívebb kémiai kicserélődés miatt (lásd 4.3./1. ábra).



4.3./1. ábra Az SGPI-2 molekula NOE értékei A: pH 3.0 és B: pH 6.0-on.

Késsel a távoli, zölddel a szekvenciális, míg pirossal az egyes aminosav csoportokon belüli NOE jeleket jelöltem.

Természetesen alapvető kérdés, hogy vajon a hármasról hatosra történő pH növelés nem okoz-e önmagában jelentős dinamikai változásokat az egyes inhibitorok szerkezetében. Ezzel kapcsolatban az eddigi méréseink alapján annyit már tudunk, hogy az említett pH növelés önmagában átlagosan mintegy feleakkora változásokat okoz az NOE jelek és a kémiai eltolódások tekintetében, mint a hatos pH-n zajló komplexképzés (lásd 4.3./2 ábra). Ezért egyelőre úgy véljük, hogy a komplexképzés során kapott jelek értelmezésénél elhanyagolhatjuk a pusztán a pH-váltásból eredő változásokat.

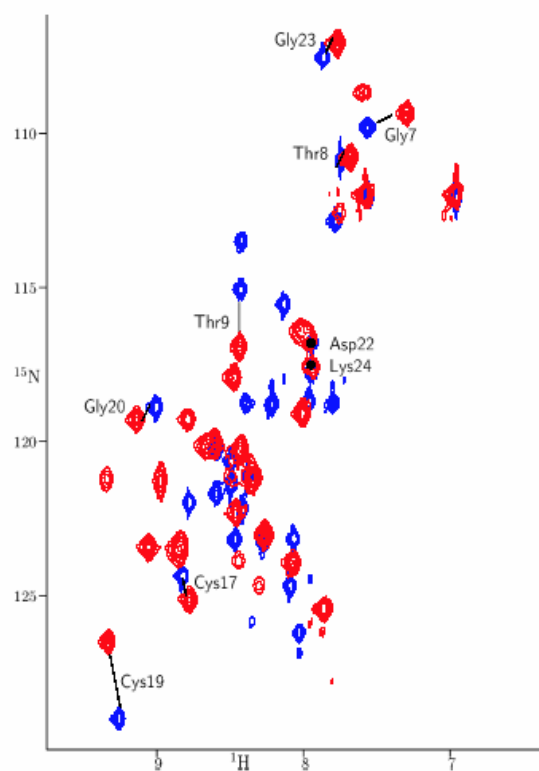


4.3./2. ábra Az SGPI-2 kémiai eltolódás értékeinek változása a pH-val és a komplexszálással.

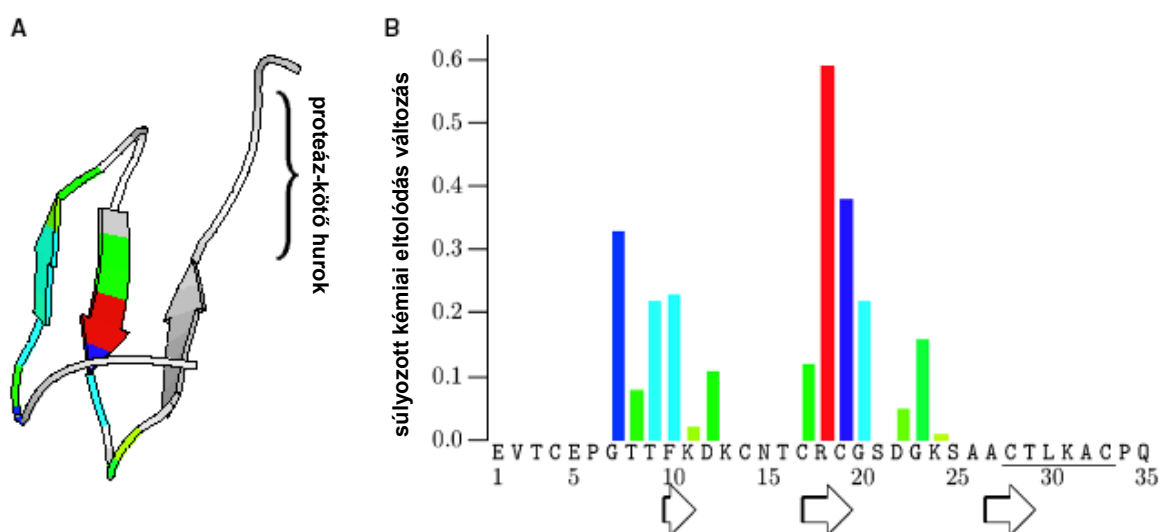
A pH 3,0 és pH 6,0-on mért eltolódás értékek *különbségét* a zöld oszlopok, a szabad és a komplexált inhibitoron mért kémiai eltolódás értékek *különbségét* a piros oszlopok ábrázolják. Csak a mindhárom állapotban, (pH 3,0 és pH 6,0 szabad, valamint a pH 6,0, komplexált) detektálható oldalláncok adatait tüntettem fel.

A titrálás során az SGPI-2 molekula HSQC spektruma jelentőse megváltozott (4.3./3 ábra). A jelek kiszélesedtek (26-19 Hz-ről 25-30 Hz-re nőtt a csúcsok félérték-szélessége) és eltolódtak, ami egyrészt stabil komplex képzésére, másrészt jelentős szerkezeti változásokra utal. Az enzim-kötött formában a Gly7-Lys24 régiót sikerült asszignálni, a molekula többi része — a harmadik β -redő nagy része és a reaktív hurok (!) — a kötődés hatására asszignálhatatlanná vált, azaz a HSQC spektrumban itt eltűntek, illetve kiszélesedtek a jelek (4.3./3. ábra). Szinte az összes jel elmozdult a HSQC spektrumban, ami azt mutatja, hogy az enzimmel való kölcsönhatás az egész molekulára kiterjedő szerkezeti változásokat okoz.

Legkevésbé a második és harmadik β -redőket összekötő hurok (Ser21-Ser25) kémiai eltolódásai változtak meg, míg a legnagyobb változást az Arg18 csoport főlánc-amid csoportja mutatta (4.3./4. ábra).



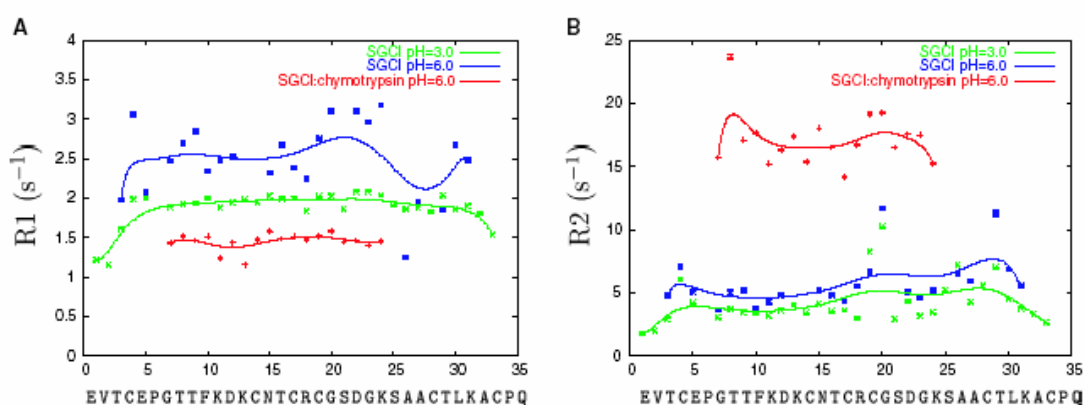
4.3./3. ábra Az SGPI-2 HSQC spektruma pH 6,0-on, szabad és enzimkötött állapotban. Kékkel a szabad, pirossal a komplexált SGPI-2 HSQC spektrumát jelöltem. Az ábra a SYBYL (Tripos Inc. 2001) programmal lett szerkesztve.



4.3./4. ábra Az SGPI-2 kimotripszinhez kötését kísérő kémiai eltolódás értékeinek átlagos változása.

Az egyes oldalláncok kémiai eltolódás változásának mértéke színekkel kódolva jelölöm. A mérték zöld → kék → piros irányba növekszik. Az értékeket a lineáris szekvencián (B), illetve a harmadlagos szerkezeten is jelöltem. A lineáris szerkezet esetében a β -redőket nyilakkal, a reaktív hurkot aláhúzással jelöltem.

Az R1 és R2 relaxációs adatok szintén megváltoztak, a magasabb pH-n megnöttek. A komplexben az R1 értékek csökkentek, míg az R2 értékek növekedtek. Nem tudtam R2 értékeket meghatározni a Cys4, Ser25, Ala26, Ala27, Cys28, Thre29 és Leu30-as oldalláncok esetében (4.3./5. ábra).



4.3./5. ábra Az SGPI-2 relaxációs paraméterei szabad formában hármas és hatos pH-n, illetve szarvasmarha kimotripszinnel komplexben hatos pH-n.

Zölddel és kézzel a hármas pH-n, illetve hatos pH-n szabad inhibitoron mért adatokat, míg pirossal hatos pH-n a komplexben mért adatokat ábrázoltam.

(Az ábrán szereplő SGCI elnevezés az SGPI-2 inhibitor korábbi neve.)

A komplexképzés hatására a látszólagos méretnövekedés miatt az SGPI-2 molekula korrelációs ideje 3 ns-ról 12 ns-ra emelkedett. Ez kisebb, mint az ismert komplex-méret alapján várt érték (16,4 ns). Ennek az egyik oka az is lehet, hogy a komplexben szereplő 280 aminosav helyett – mivel a kimotripszin nem hordozott jelölést-, csak 18 aminosavról volt adatom. Az eltérés tehát egyfajta mintavételi hibának is tulajdonítható. Az adatokat a www.bmrb.wisc.edu adatbázisban helyeztük el, a 6880 és 6881 azonosítót kapták.

A relaxációs paraméterek változásának egyik oka tehát az, hogy az inhibitor molekula látszólagos tömege jelentősen, nyolcszorosára nőtt a kölcsönhatás miatt. Habár az NMR mérések szempontjából előnytelenül magas, hatos pH miatt nem sikerült a teljes inhibitor molekulát asszignálni, azt a következtetést már ezekből az adatokból is levonhatjuk, hogy a Pacifastin inhibitor család esetében az enzim - inhibitor kölcsönhatás nem írható le egyszerű kulcs-zár mechanizmussal. Az eddigi, Laskowski-féle felfogástól eltérően ugyanis ebben az esetben még az inhibitor molekulának a kötőhuroktól távol eső részein is jelentős szerkezeti / dinamikai változások következnek be, lásd az Arg18 csoport jeleit a 4.3./4. ábrán.

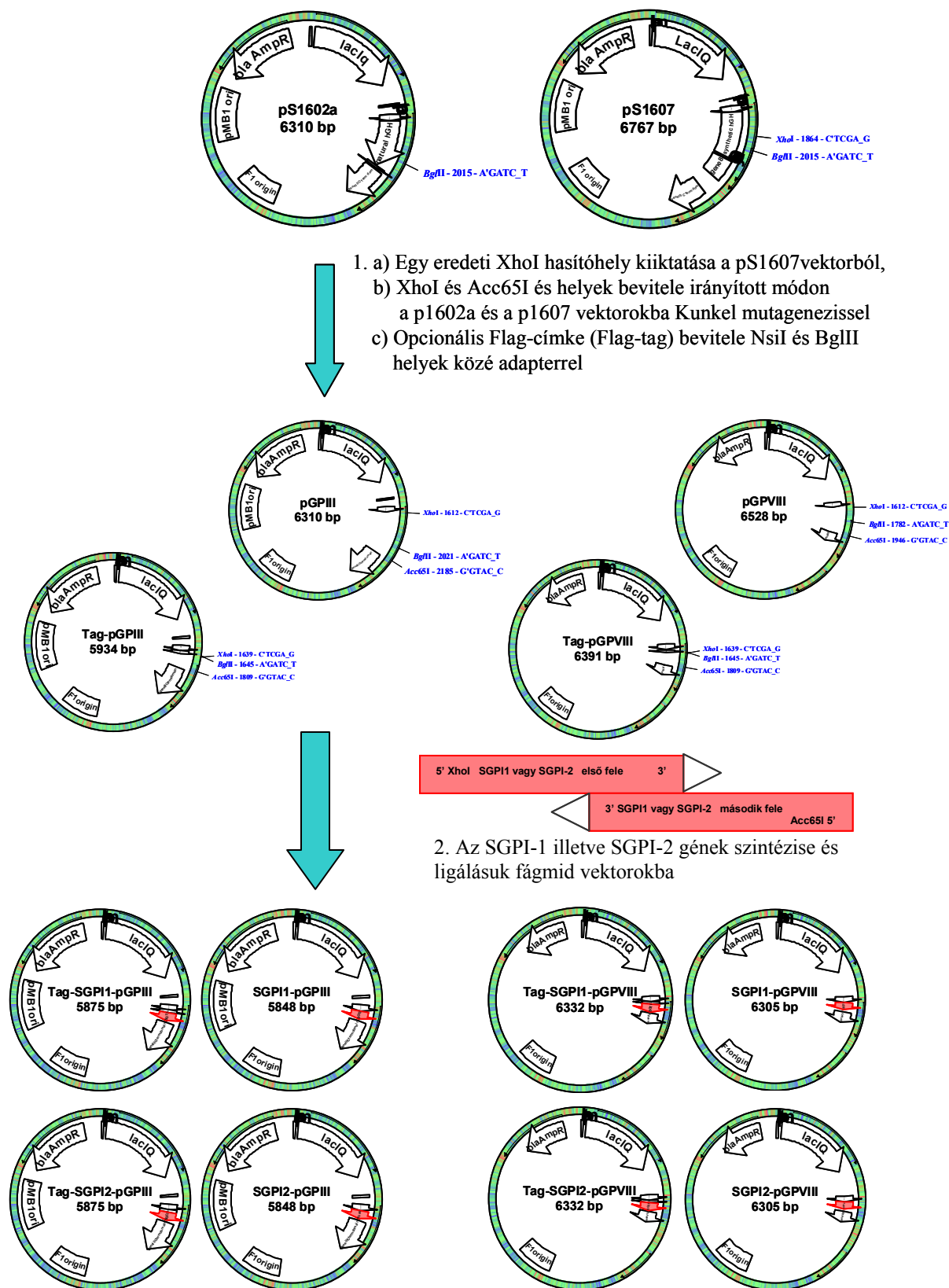
4.4. Fág konstrukciók – a rendszer működésének igazolása

A könyvtárkészítés előtt több fontos kérdést kellett tisztáznom. Az első, hogy vajon az SGPI-1 illetve SGPI-2 inhibitorok kifejezhetők-e M13 fág buroklehéjéhez kötve aktív formában. A másik kérdés az volt, vajon sikerül-e a kérdéses célenzimeinket megfelelő mennyiségben aktív formában kikötnöm úgy, hogy azokhoz hozzáférjen a fágon megjelenített inhibitor. Először tehát a vad típusú SGPI-1 és SGPI-2 inhibitorokat építettem fágmid vektorba. A vad típusú vektorok szintetikus génjének elkészítése egyben tesztelte azt az előállítási módszert, amivel majdan a könyvtárakat is elő kellett állítanom. Két olyan fágmid vektorral dolgoztam, amelyeket Pál Gábor szerzett be szerződés keretében a Genentech cégtől. Az inhibitorok génjének két-primeres előállítását, valamint a később ismerttetett kiméra könyvtárkészítés koncepcióját és kivitelezési módját is Ő dolgozta ki.

Fágmid rendszert használtam, aminél minden buroklehéj vad típusú, nem fúziós formája is jelen van a fertőzött sejtben. Ezeket a helper fág biztosítja. A fúziósan megjelenített fehérjék „potyautasként” kerülnek a fágfelszínre, és nagyban függ az adott fehérjétől, hogy végül átlagosan hány példányban jelenik meg. Az M13 fágok felszínén két fő módon fejeznek ki fehérjéket: a pIII fehérjéhez kötve, ami fágmid rendszert használva átlagosan fágonként kevesebb, mint egy fehérjét jelenít meg, illetve a pVIII buroklehéjén, aminél a kópiaszám nem

jósolható, de akár több példány is lehet. A célunk az volt, hogy fágoként átlagosan egy inhibitor jelenjen meg (monovalens megjelenítés). Ennél kevesebb csökkenti a könyvtár méretét, míg ha egynél jóval több inhibitor van jelen, az „aviditás”-hoz vezethet. Ilyenkor a fág egy időben több inhibitor-proteáz kapcsolaton keresztül is kikötődhet, és egyedileg gyenge kapcsolatok is erős kötést hoznak létre. Mi egyedileg is erős kapcsolatokat akartunk szelektálni. Mivel nem tudtuk, hogy melyik burokkfehérje lesz alkalmasabb, mind a két verziót előállítottam. Emellett egy másik szempont miatt is duplázódott a vektorok számossága. Fágbemutatásnál előnyös, ha a fúziós fehérje tartalmaz egy olyan jelet, címkét is, amin keresztül igazolható, hogy a rekombináns fehérje valóban megjelenik a fágokon. Egy ilyen címkét célszerű az N-terminálison elhelyezni, ugyanis amennyiben a rekombináns fehérjéhez képest C-terminális irányban lenne, egy proteáz hasítás eltávolíthatná a rekombináns fehérjét, míg a címke fent maradhat. Így a címke jelenlétéből nem tudnánk eldönteni, hogy a kívánt fehérje is a fágon van-e. Ugyanakkor egy címke elhelyezése gátolhatja a fehérje funkcióját. Ezért készítettem címkével ellátott, és címke nélküli konstrukciókat is. Tehát az SGPI-1 illetve SGPI-2 géneket 4-féle vektorba építettem, és így összesen 8-féle konstrukciót kaptam (lásd 4.4./1. ábra).

A Genentech-től kapott fágmid vektorok, pS1602a és pS1607 pIII-as illetve pVIII-as megjelenítésre alkalmasak (Sidhu és mtsi. 2000a). Eredetileg a humán növekedési hormont jelenítették meg, ezt cseréltük ki az inhibitorokkal. A megjelenítendő fehérje egy phoA szignál peptidhez van kapcsolva, így a periplazmába kerülne, de a mögé kapcsolt fágfehérje miatt megakad a membránban, és beépülhet a burokkba. A megjelenítendő fehérje és a fág burokkfehérjéje között egy szerin és glicin aminosavakat tartalmazó szakasz van, ami térszerkezeti értelemben függetleníti egymástól a két fehérjét, és hozzáférhetőbbé teszi a fágon megjelenített polipeptidet.



4.4/1. ábra Az SGPI-1 illetve SGPI-2 fágon való kifejezéséhez használt fágmidok létrehozása pS1602a és pS1607 vektorokból. A vektortérképeket a pDRAW3.2 szoftverrel készítettem.

Az inhibitorokat kódoló szintetikus géneket XhoI (5'vég) és Acc65I (3'vég) enzimpárral terveztem betenni a fágmid vektorokba (4.4./1. ábra). Ehhez első lépésben ki kellett iktatni egy, a pS1607 vektorban az 1864-es pozícióban szereplő XhoI helyet. Ehhez a vektort XhoI enzimmel, és az 1625-ös pozícióban hasító SallI enzimmel emésztettem. A két enzim azonos ragadós végeket hoz létre, de ligálás után mindkét palindróm enzimfelismerő hely megszűnik. Ezek után az új XhoI helyet, és egy Acc65I helyet alakítottam ki mindkét vektorban az adott helyekre és adott vektorokra specifikus mutációs oligonukleotidokkal (lásd lent).

Xho-in-1602a 5' GCCTCGGCTTATGCACTCGAGACTATACCACTATCTCG3'
Xho-in-1607 5' GCCTCGGCTTATGCACTCGAGACTATACCACTAAGTCG3'
Acc65I-in-1602a 5' GGCAGCTGTGGCTTCGGTACCGGCGGTGGCTCTGG3';
Acc65I-in-1607 5' GGCAGCTGTGGCTTCGGTACCGGTGGAGGATCCGG3'

A mutációkat Kunkel mutagenezissel vittem be. A már említett Flag-címket (DYKDDDDK aminosav szekvencia) az alábbi adapterrel építettem be:

5' -TCGGATTATAAAGACGATGATGACAACTCGAGA-3'
 3' -ACGTAGCCTAATATTTCTGCTACTACTGTTTGAGCTCTCTAG-5' .

Az adaptert a phoA szignál peptid mögé az NsiI és BglII hasítóhelyek közé irányítottan vittem be olyan vektorokba, amikbe korábban csak az Acc65I helyet vittem be, az XhoI helyet nem. Az adapter ugyanis egy XhoI helyet is beépít, mégpedig úgy, hogy ugyanazokat a szintetikus géneket lehessen beépíteni a címkementes vektorokba, mint a címkével ellátottakba.

A két beépítendő inhibitor génjét szintetikusán állítottam elő két, egymással a 3' végükön átfedő primer „kiegészítő-polimerizációjával” (4.4./1. ábra). A két szintetikus úton előállított inhibitor DNS szekvenciáját (SGPI-1, SGPI-2) a megfelelő restrikciós endonukleázokkal (XhoI, Acc65I) hasítva beépítettem a fent leírt plazmidokba. Így összesen 8 konstrukciót hoztam létre (4.4./1. ábra). Az egyes lépéseket emésztésekkel, a végső konstrukciókat pedig DNS szekvenálással ellenőriztem.

Ezt követően az inhibitorok fágon való kifejeződését vizsgáltam. Ehhez a létrehozott fágmid vektorokat XL1Blue sejtekbe transzformáltam, és fágokat izoláltam. Az izolált fágokat ELISA módszerrel vizsgáltam. A lemezekre Flag-címke elleni ellenanyagot, szarvasmarha tripszin, szarvasmarha kimotripszin, illetve rák tripszint kötöttem ki. Sikertelenül igazolni, hogy a címkét is megjelenítő konstrukciók szelektíven kikötődnek a megfelelő ellenanyaghoz, és az egyes inhibitor formák a nekik megfelelő specifitással kötődnek a célenzimekhez. Az SGPI-1 erős jelet adott rák tripszinen, és nagyon gyengét az emlős enzimeken, míg az SGPI-2 erős jelet adott kimotripszinen, és nem adott jelet a tripszineken. A címkével ellátott és a címkementes konstrukciók csaknem azonos ELISA jelet produkáltak, vagyis a címke nem gátolta az expressziót, illetve az inhibitor aktivitását, és az is kiderült, hogy a pVIII fehérjéhez való fuzionálás mintegy háromszoros ELISA jelet ad a megfelelő

pIII-fúziós konstrukcióhoz képest. Ezen adatok alapján célszerűnek látszott a címkével ellátott, pVIII-fúziós rendszert használnom, de a döntés előtt ellenőrizni kellett, hogy fágonként átlagosan hány inhibitor jelenik meg. Ezt fluorimetriás aktivitás-gátlás mérésel határoztam meg. Aktívhely-titrált, pontosan meghatározott koncentrációjú kimotripsint gátoltam ismert, növekvő koncentrációjú SGPI-2-fág oldattal. A teljes gátlásnál meghatározható enzim-fág arányból kiderült, hogy átlagosan egy inhibitor szerepel fágonként, ami ideális volt a soron következő könyvtár szelekciókhoz. A rendszer optimalizálásával kapcsolatos adatokat helyszűke miatt nem mutatom be.

4.5. Fág könyvtár tervezése, előállítása

Egy olyan könyvtárat akartunk létrehozni, amelynél minden olyan aminosav pozícióban, ahol az SGP-1 és SGPI-2 inhibitorok szekvenciája eltér, pontosan azt a két aminosavat engedjük megjelenni, amelyik a két inhibitorban együttesen szerepel. Ilyen könyvtár csak akkor hozható létre, ha a szintetikus oligonukleotidokat triplet prekursorokból szintetizálnák, így bináris keverés esetén a szintézis adott lépésénél kétféle kodon keverékét használnák [Fellouse és Pál 2006]. Bár ilyen szintézis ma már elérhető, csillagászati ára miatt a hagyományos, nukleotid monomerenkénti szintézist választottuk. Ez azzal jár, hogy amennyiben két aminosav kodonját akarjuk csak megengedni, akkor ezt csak akkor tehetjük meg, ha a két kodon csak egyetlen pozícióban tér el. Például a glicin (GGN) és az alanin (GCN) esetén ez teljesül, egy G(G/C)T kevert triplet fele-fele arányban reprezentál majd glicin és alanin kodonokat. Amennyiben a két kodon 2 pozícióban tér el, úgy négy, ha pedig 3-ban, akkor akár nyolc eltérő aminosavat, sőt, esetleg stop jelet is reprezentálhatna egy-egy kevert kodon. Egy ilyen 8-aminosavas illetve stop kodonos probléma a mi esetünkben is felmerült. Ezt mindenképpen el akartuk kerülni, hiszen kifejezetten az SGPI-1 és SGPI-2 szekvenciákban szereplő aminosavak felcserélhetőségére voltunk kíváncsiak. Márpedig ha 8-féle aminosavat engedünk meg, akkor olyan alacsony reprezentáltsággal jelenhet meg a két SGPI-re jellemző aminosav, hogy ezek arányának megállapításához rendkívül sok klónt kellene szekvenálni.

A másik fejtörést az okozta, hogy a két SGPI szekvenciát egymás alá rendezve jól látható, hogy bár mindkettő összesen 35 aminosavas, az SGPI-1 a harmadik és negyedik cisztein közötti hurokban egy aminosavval rövidebb, míg a C-terminuson egy aminosavval hosszabb. A kérdés tehát az volt, hogy a bináris keverésnél mi legyen a 24. pozícióban, illetve a C-terminuson megjelenő hiánnyal. Nem lehet ugyanis úgy oligonukleotidot rendelni, hogy az adott pozícióban a növekvő nukleotid láncoknak pontosan a felén kialakítsák a csak az egyik

molekulában szereplő kodont, míg a másik felén szüneteltessék a szintézist. Ezt oszloptöltet-megosztásos módszerrel lehetne elérni, de ez a hagyományos forrásokból szintén nem elérhető. Ugyanez az ábra mutatja be azt is, hogy a lehetőleg minél inkább bináris könyvtár előállításához azt is figyelembe kellett vennünk, hogy a két inhibitornál az egymástól eltérő aminosavak esetében az egyes aminosavakra vonatkozó szinonim kodonok közül melyek azok, amelyek a másik aminosav kodonjától a legkevésbé térnek el. Ennek optimalizálása során még arra is ügyelni kellett, hogy lehetőleg ne használjunk olyan kodonokat, amelyek coliban ritkák, tehát esetleg rontanák az expressziót. Ezt a problémakört, és annak megoldását a 4.5./1. ábra illusztrálja. Két primerrel nem lehetett volna a feladatot megoldani, de az ábra alján látható 8 primerrel egy-egy pozícióban maximálisan 4-féle aminosavat megengedő, a hiányokat (gap) is megengedő, és stop kódon-mentes megoldást sikerült kidolgozni.

A 10. pozícióban lévő Lys/Phe eltérés miatt kellett volna ebben a pozícióban stop jelet, és 7-féle aminosavat megengednünk, amennyiben csak egyetlen degenerált 5' (forward) és 3' (reverse) primer párral dolgoztunk volna. A problémát úgy küszöböltük ki, hogy egyetlen 5' primer helyett kettőt használtunk. A két primer minden randomizálandó pozícióban azonos degeneráltságot hordozott, kivéve a 10. pozíciót, ahol az egyik a Phe (TTT), a másik a Lys (AAA) kodont hordozta. A két primer keverék együtt tehát azt az eredményt adta, mintha a 10-es pozícióban binárisan tudtuk volna szintetizáltatni a TTT/AAA kodonok keverékét.

A két „gap” (24. és 36. pozíció) esetén hasonlóan módon jártunk el, de ezek a pozíciók a 3' primereket érintették. A két opcionális „gap” 4-féle 3' primerrel volt lefedhető, melyek a többi randomizált pozícióban egymással azonos degeneráltságot hordoztak. Ezek használata tehát azzal az eredménnyel járt, mintha bináris módon szintetizáltattunk volna egy-egy „gap”-et és normális kodont tartalmazó nukleotidot.

A két 5', és a négy 3' primer összesen nyolc PCR reakciót jelentett, amellyel létrehoztam a kiméra könyvtárat. A 7 bináris és 11 tetranomiális randomizálás miatt a lehetséges variánsok száma $2^7 \times 4^{11} = 5,3 \times 10^8$, aminek még a tízszerese is rutinszerűen létrehozható.

SGPI-1 EQECTPGQTKKQDCNTCNCPTPTG-VWACTRKGCPPH
 SGPI-2 EVTCEPGTTFKDKCNTCRCGSDGKSAACTLKACPQ-

A két inhibitor egymás alá rendezett aminosav-sorrendje. A 18 variábilis pozíciót kiemelés jelzi.

GAA CAG GAA TGT ACA CCT GGC CAG ACG AAG AAA CAA GAC TGC AAC ACA TGC AAT TGT ACC CCT ACT GGA GTT TGG GCC TGT ACT CGC AAG GGC TGC CCG CCC CAT
 GAG GTC ACC TGC GAG CCG GGC ACA ACG TTC AAG GAC AAA TGC AAC ACG TGT CGC TGT GGA AGT GAC GGA AAA TCG GCA GCG TGC ACC CTC AAG GCC TGC CCC CAG

1. A vad típusú DNS szekvenciák közti különbség minimalizálása és optimalizálása *E.coli* kodon preferencia szerint az alábbi szekvenciákat eredményezi.

GAA CAG GAG TGC ACG CCG GGT CAG ACC AAA AAA CAG GAT TGC AAC ACC TGC AAT TGC ACC CCG ACC GGC --- GTC TGG GCG TGC ACC CGT AAA GGC TGC CCG CCG CAT
 GAA GTG ACG TGC GAG CCG GGT ACG ACC TTT AAA GAT AAA TGC AAC ACC TGC CGT TGC GGC TCG GAC GGC AAA AGC GCG GCG TGC ACC CTT AAA GGC TGC CCG CAG ---

2. Az eltérés-minimalizált és kodonhasználatra optimalizált szekvenciák keverése az alábbi aminosav könyvtárat eredményezné.

SGPI-1 EQECTPGQTKKQDCNTCNCPTPTG-VWACTRKGCPPH
 SGPI-2 EVTCEPGTTFKDKCNTCRCGSDGKSAACTLKACPQ

EA A K I EE H A A GG
 LK K P I HN S S N IS

E
N
Y
X

3. A világoskék háttér jelzi a kívánt bináris keverést, a többi „felesleges”. Átgondolt stratégiával sikerült elérni, hogy a piros háttérű rész ne kerüljön be a könyvtárba. A valóságban létrehozott könyvtár tehát csak a világos, és sötétkék részek randomizálását tartalmazza.

Forward-1: 5'GAA SWG RMG TGC RMG CCG GGT MMG ACC AAA AAA SAK RAW TGC AAC ACC TGC3'
 Forward-2: 5'GAA SWG RMG TGC RMG CCG GGT MMG ACC TTT AAA SAK RAW TGC AAC ACC TGC3'
 Reverse-1: K24; H35: 5'ATG CKG CGG GCA GSC TTT AMG GGT GCA CGC CSM GMY TTT GCC GKY CGR GSY GCA AYK GCA GGT GTT GCA3'
 Reverse-2: K24; H35del: 5'CKG CGG GCA GSC TTT AMG GGT GCA CGC CSM GMY TTT GCC GKY CGR GSY GCA AYK GCA GGT GTT GCA3'
 Reverse-3: K24del; H35: 5'ATG CKG CGG GCA GSC TTT AMG GGT GCA CGC CSM GMY GCC GKY CGR GSY GCA AYK GCA GGT GTT GCA3'
 Reverse-4: K24del; H35del: 5'CKG CGG GCA GSC TTT AMG GGT GCA CGC CSM GMY GCC GKY CGR GSY GCA AYK GCA GGT GTT GCA3'

A fenti 2x4 primerrel előállítható a 3. pontban jelzett kiméra könyvtár. Az aláhúzott részek a nukleotid keverést jelölik az IUPAC kód szerint.

4.5./1 ábra A könyvtártervezés logikai sémája, és az ez alapján tervezett szintetikus könyvtár oligonukleotidok.

A DNS könyvtár szintézisét tehát a két 5' és a négy 3' primerrel külön-külön, azaz összesen nyolc reakcióban végeztem el. Ezek mindegyikét külön-külön emésztettem XhoI és Acc65I enzimekkel, és ligáltam a megfelelő enzimekkel emésztett Tag-pGP-VIII-as fágmid vektorba. Az így kapott ligátumokat elektroporációval vittem be az erre alkalmas SS320-as *E.coli* sejtvonalba (Sidhu és mtsi. 2000b.) Az így létrehozott nyolc alkönyvtárnak megfelelő fágokat izoláltam. Az alkönyvtár méreteket (4.5./1. táblázat) titrálással (lásd anyagok és módszerek) ellenőriztem.

ALKÖNYVTÁR	FÁG KÖNYVTÁRMÉRET (db)
SGIL-11	1.2×10^9
SGIL-12	1.5×10^9
SGIL-13	2.8×10^8
SGIL-14	5.8×10^8
SGIL-21	7.5×10^8
SGIL-22	1.0×10^9
SGIL-23	2.5×10^8
SGIL-24	2.5×10^8

4.5./1. táblázat Alkönyvtár méretek

SGIL= *S*chistocerca *g*regaria *I*nhibitor *L*ibrary, az alkönyvtárak számozása a felhasznált primerek szerint történt, így az első számjegy (1,2) az egyes illetve kettes 5' primerre, a második számjegy (1, 2, 3, 4) a 3' primer sorszáma utal

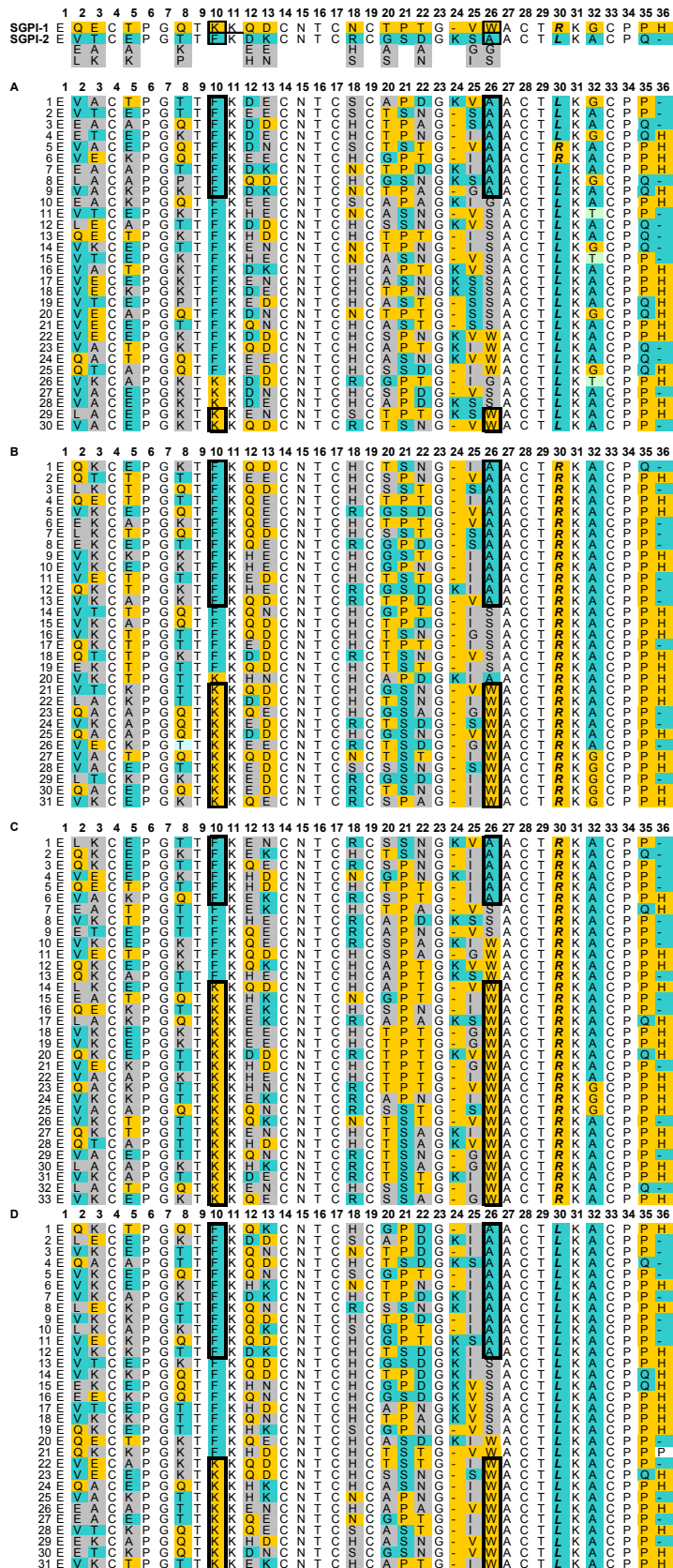
Az alkönyvtárméretek, illetve az egyesített könyvtár mérete bőven meghaladta az elméleti diverzitást, így biztosak lehettünk abban, hogy minden egyes lehetséges könyvtár variáns DNS-e elkészült a valóságban.

4.6. Szelekció

Amikor fágbemutató során szelektálunk, egyszerre, egymással összefonódva kétféle szelekció is zajlik. Az egyik az, amely miatt a kísérleteket végezzük, tehát az *in vitro* szelekció a kikötött célpont molekulákon. Emellett azonban egy másik szelekció is zajlik, mégpedig a coli sejtben. A sejt a rosszul feltekeredő variánsokat proteázaival eliminálja, tehát a sejtet elhagyó, a fágon valóban megjelenő variánsok már eleve feldúsulnak feltekeredésre alkalmasabb formákban anélkül, hogy mi magunk erre külön szelektálnánk. Emiatt vigyázni kell, hogy a valódi célpont fehérjéken történő szelekció hatását ne mossuk össze a fenti

hatással. Az elkülönítés lehetőségét az epitóp címke biztosítja. Amikor az inhibitorokat nem proteázon, hanem a címkét felismerő ellenanyagon szelektáljuk, akkor valójában olyan klónokat izolálunk, amik nem méretődnek meg enzimgátlási képesség szempontjából, de a sejtben már megmérették a feltekeredés képessége alapján. Az ilyen szelektált klónok szekvenciáinak kigyűjtése megmutatja, hogy az egyes randomizált pozíciók milyen mértékben képesek hozzájárulni a fehérje stabilitásához, és ehhez az adott pozíciókban milyen aminosavakra van szükség. Ezt az információt kell majd összevetni a célpont proteázokon szelektált klónok adataival, ugyanis az azoknál kapott trendekből „le kell majd vonni” a címke-szelektált csoport trendjeit ahhoz, hogy megtudjuk mik az adott célpont proteáz által speciális kisselektált jellemzők.

A szelekcióhoz koncentráció arányosan kevertem össze a nyolc alkönyvtárt, majd az egyesített könyvtárat külön-külön szelektáltam Flag-címke elleni ellenanyagon, kimotripsinen, valamint szarvasmarha és rák tripszineken. A második szelekciós körtől kezdve követtem, hogy mekkora a célpont fehérjéről eluált fágok mennyisége egy indifferens fehérjén, a szérumalbuminon kikötődő fágok számához képest. Ez a dúsulási érték jól jelzi, hogy a célpont fehérjéken valóban szelektálódnak-e ahhoz specifikusan kötődni képes variánsok. A dúsulás már az első tesztelésnél, tehát a második kör végén is magas volt, az ellenanyag esetén elérte az ezerszeres szintet, míg a proteázokon százszoros szint körül volt. A harmadik körben a proteázokon is ezerszeres volt ez az érték. Ezért az ellenanyagon szelektált alkönyvtárból a második ciklus után, a proteázon szelektált alkönyvtárakból pedig a harmadik szelekciós ciklus után izoláltam egyedi fág klónokat fág-ELISA tesztelésre (lásd Anyagok és módszerek). Végül célpontonként 33 magas ELISA jelet produkáló klónt gyűjtöttem össze, amelyek identitását DNS szekvenálással határoztam meg. Az ellenanyagnál 30, szarvasmarha tripszinnél 31, rák tripszinnél 33, a kimotripszinnél pedig 31 szekvencia volt olvasható. (4.6./1. ábra).



4.6/1. ábra. Szelektált szekvenciák.

A) ellenanyagon, B) és C) marha és rák tripszinin, D) marha kimotripszinin. Sárgával az SGPI-1-re, zölddel az SGPI-2-re jellemző, szürkével, pedig az egyéb megengedett aminosavakat jelöltem. A fehér háttér a nem-randomizált pozíciókat jelöli, zöld háttér, pedig azokat, ahol a könyvtárba be nem tervezett mutáció következett be. A szekvenciák rendezésére vonatkozó részleteket lásd a szövegben.

Ez a mintaszám már megfelelő volt a későbbi statisztikai elemzésekhez is. A kapott szekvenciákban kizárólag az ellenanyagon szelektált klónok között voltak olyan variánsok is, amelyeket nem terveztünk bele a könyvtárba, tehát valóban véletlenszerű mutációt hordoztak. Egyetlen helyen, a 32-es aminosav pozícióban jelent meg treonin, holott itt csak glicin és alanin volt megengedve. A DNS szekvencia szintjén azt találtuk, hogy ezt - a leolvasott kodonok tekintetében - egy guanin→adenin csere okozta. Mivel a gén elkészítéséhez a *másik* szálat vettük meg szintetikus oligonukleotid formájában, a valóságban a mutáció egy citozin→timin cserét jelent, ami minden bizonnyal egy oxidatív dezamináció eredménye volt. Figyelemreméltó, hogy egyik proteáz szelekció sem tolerálta a 32. pozícióban az így bekerült treonint.

A szekvenciákat a négy célpont fehérje alapján csoportokba gyűjtöttem. Az egymás alá rendezésnél úgy jártam el, hogy láthatóvá tegyem az esetleg megfigyelhető, a 10-26 mag pozíciókra vonatkozó nem-véletlen eloszlást, tehát kapcsoltságot. Egy egyszerű, az aminosavak egybetűs jelölését használó, ábécé szerinti elrendezést alkalmaztam. A 10-es pozícióban csak fenilalanin (F) és lizin (K) volt megengedve, így először az F10, majd a K10 tartalmú szekvenciákat listáztam. Ezután az F10-et tartalmazó alkönyvtárban az egyes klónok szekvenciákat úgy rendeztem, hogy a 26-os pozícióban szintén ábécé sorrend alakuljon ki, és ugyanezt tettem a K10 alkönyvtár esetében. A szekvenciák felsorolása így az F10-A26 párral indul, ami az SGPI-2 magra jellemző, és a K10-W26 párral végződik, ami az SGPI-1 magra jellemző. A két blokk között a nem vad típusú párok, amelyek vagy keverték (pl. F10-W26), vagy nem vad típusú aminosavat is tartalmaznak (a 26-os pozícióban 4-féle aminosavat engedünk meg). A vad típusú magokat vastag keretezéssel emeltem ki. Mivel a P1 pozíció vélhetően kitüntetett fontosságúnak bizonyul, vastag és dőltbetűs írásmóddal emeltem ki az itt szereplő aminosavakat.

A négy célponton és 18 pozícióban randomizált pozíciók olyan nagy adathalmazt, annyi számszerűsíthető összefüggést jelentenek, amit szövegesen nehéz, és talán felesleges is lenne mind felsorolni. Ezek meglehetősen részletesen leírásra kerültek a munkával kapcsolatos publikációinkban (Szenthe et al, 2007), ezért a disszertációban csak az esszenciáját kívánom leírni a megfigyeléseinknek, és ezekből levont következtetéseinknek. Először a kvalitatív következtetéseinket írom le, amelyeket később kvantitatív statisztikai adatokkal is alátámasztok.

Az ellenanyagon szelektált szekvenciák elemzése

Mint említettem, ez a szelekció arra szolgált, hogy az inhibitor szerkezetének stabilitására vonatkozó trendeket tárjunk fel. Az első fontos megfigyelés az volt, hogy meglehetősen nagy arányban vannak nem-vadtípusú maggal rendelkező klónok ebben a csoportban (4.6./1. ábra A szekció). Ezzel együtt az összetétel nem tűnt randomnak, ugyanis a 26-os pozícióban a 30 klón közül csak egyetlen tartalmazott glicint miközben véletlen mintavétel esetén 7-8 ilyennek kellett volna lennie. A maradék három aminosav típus (A, S, W) egyenletesebb, de nem random eloszlású. (9 A, 13 S, 6 W). Ha a hidrofób magokat tekintjük, 9 F10-A26 (vadtípusú SGPI-2-re jellemző), 11 F10-S26, csak 4 F10-W26, és csak egyetlen F10-G26 mag jelenik meg. Ez arra utal, hogy a feltekeredésre vonatkozó szelekció az SGPI-2 magnak kedvez, és megengedi az ahhoz vélhetőleg hasonló F10-S26 magot is. Az F10-W26 magok jelzik, hogy a Pacifastin vázszerkezet elviseli a belső mag méretének növelését.

Meglehetősen látványos, hogy a P1 pozícióban leucin dominál. Elképzelhető, hogy az ilyen klónok könnyebben vihetők át a membránon, mint a pozitív töltésű argininesek. Talán erre utalhatna egy további rendkívül erős trend: a 18-as pozícióból szinte eltűnnek az SGPI formákra jellemző csoportok (különösen az arginin), és helyettük egy „jövevény” aminosav, a hisztidin dominál. Az ellenanyagokon kapott trendek további analízise helyett áttérek az enzimes szelekciók elemzésére azzal a megjegyzéssel, hogy az azoknál kapott aminosav preferenciák értelmezésénél érdemes lesz megnézni, hogy az ellenanyag szelekció az adott pozíciókra mit eredményezett.

A szarvasmarha tripszinen szelektált szekvenciák elemzése

Az emlős tripszinen szelektált szekvenciák (4.6./1. ábra B szekció) vizsgálata rendkívül érdekes eredményekre vezetett. Az első, rendkívül fontos megfigyelés, hogy a P1 pozícióban kizárólag arginin fordul elő, míg az ellenanyag szelekcióban a leucin dominált. Ez tökéletesen egyezik a tripszin P1-specifitásával kapcsolatos ismeretekkel. Az enzimes szelekció tehát kétségtelenül működött. Szintén az ellenanyag szelekcióval összevetve látványosan felszaporodtak a vadtípusú magok (F10-A26, és K10-W26). Gyakorlatilag (egy híján) csak egyetlen alternatív megoldás szelektálódott ki, az F10-S26 mag, ami hasonló lehet az SGPI-2 maghoz. Igaz, ennek az aránya is alacsony.

Ezután megnéztem, hogy kvalitatív alapon vannak-e az eltérő típusú magokkal korreláló egyéb jelenségek. Két ilyen jelenség egyszerű szemléléssel is észrevehető. Az egyik az, hogy míg az SGPI-2 típusú F10-A26, és az ehhez hasonló F10-S26 magok nagyjából egyforma arányban engedik meg az SGPI-1 és SGPI-2 jellegű csoportok előfordulását a 21. és 22.

pozícióban, addig az SGPI-1 jellegű K10-W26 mag láthatóan nem tolerálja az SGPI-1-re jellemző P21 és T22 aminosavakat. A K10-W26 mag tehát kapcsoltnak tűnik ezen pozíciókkal.

Szintén egyértelműnek tűnik, hogy csak az SGPI-1 típusú K10-W26 mag tolerálja a 32. pozícióban a szintén SGPI-1-re jellemző glicint.

A rák tripszinen szelektált szekvenciák elemzése

A rák tripszines szelekció (4.6./1. ábra C szekció) is egyértelműen működött, hiszen a P1 pozícióban itt is kizárólag arginint találunk. Az egyik érdekes eltérés az emlős tripszinen kapott eredményektől az, hogy itt jól megfigyelhető módon felszaporodtak az SGPI-1-re jellemző magok az SGPI-2-re jellemző magok rovására. Az ízeltlábúból származó enzim tehát valami miatt előnyben részesíti ezt a mag típust. Különösen erős ez a trend, ha az ellenanyag szelekcióhoz hasonlítjuk, ahol szinte alig jelent meg ilyen mag! További érdekesség, hogy ez a tripszin megengedi a nem vad típusú, de az ellenanyag szelekcióban már detektált F10-W26 mag jelenlétét, ami talán arra utal, hogy a rák tripszin képes alkalmazkodni a bizonyára kissé eltérő konformációjú inhibitorhoz. Az F10-W26 magok aránya megegyezik az ellenanyag szelekcióban előfordulóéval, ezért azt mondhatjuk, hogy a rák tripszin sem nem preferálja, sem nem kerüli ezt a variánst. További megjegyzésre érdemes megfigyelés, hogy a rák tripszin esetében nyoma sincs az emlős tripszinnél látott, maghoz kapcsolt 21-22. pozíciókra vonatkozó trendnek. Tehát mind a K10-W26, mind pedig a (jóval ritkább) F10-A26 mag megengedi mindkét fajta inhibitor jellemző aminosavait a 20-21. pozíciókban. Azt azonban ennél az enzimmél is megfigyelhetjük, hogy az SGPI-1 jellegű G32 aminosav itt is csak a K10-W26 maggal párban jelenik meg. További érdekesség, hogy mind az ellenanyag szelekcióhoz, mind pedig az emlős tripszin szelekcióhoz képest felszaporodik (magtípustól függetlenül) az arginin a 18. pozícióban.

A szarvasmarha kimotripszinen szelektált szekvenciák elemzése

Az emlős kimotripszinen szelektált klónoknál látható trendek (4.6./1. ábra D szekció) mintegy kombinálják a kétféle tripszinnél látottakat. Ez természetesen nem vonatkozik a P1 pozícióra, ahol itt kizárólag leucin szelektálódott ki, ami (bár maga az ellenanyag-szelekció is ezt az aminosavat preferálta) egyértelműen arra utalt, hogy a szelekció itt is sikeres volt. A vad típusú magok tekintetében az emlős kimotripszin szelekció ugyanolyan eloszlást adott, mint az emlős tripszin szelekció. Ugyanakkor azt látjuk, hogy megjelenik az F10-W26 mag is, ami a rák tripszinnél, és az ellenanyagnál volt tapasztalható. Érdekes jelenség, hogy a 32.

pozícióban most egyáltalán nem jelenik meg glicin. A 18-as pozícióra vonatkozóan hasonló eloszlást kapunk, mint az ellenanyag esetében, a nem vad típusú hisztidin dominál. A korábban már érdekesnek talált 21-es pozíció környékét megvizsgálva látható, hogy itt is felismerhető egyfajta kapcsolat, még ha ez részleteiben el is tér attól, amit az emlős tripszinnél láttunk. Az F10-A26 és F10-S26, tehát SGPI-2 típusú magok ugyanis itt is „érzéketlennek” tűnnek a 21-22. pozíció összetételére, míg a K10-W26 mag itt is válogatni látszik, de az emlős tripszintől eltérő preferenciával. A K10-26W mag a 20-as és 22-es pozícióban nem tűri meg az SGPI-2 jellegű csoportokat (az emlős tripszin a 22-es pozícióban éppen az SGPI-1 típust nem tűrte meg), de a 21. pozícióban nem mutat preferenciát (míg itt az emlős tripszin ismét az SGPI-1 típust nem engedte meg).

4.7. Statisztikai analízissel alátámasztott kapcsoltságok

Jóllehet a fenti kvalitatív megfigyelésekből levont következtetéseket később a kísérleteink is igazolták, természetesen fontosnak tartottuk, hogy azokat valamilyen szigorú statisztikai próbával is alátámasszuk. Az „Anyagok és módszerek” fejezetben részletesen ismertettem az idevonatkozó kovariancia analízis, és az ehhez kapcsolódó szignifikancia teszt leírását, így ezek technikai részleteire itt már nem térek ki. Amit fontosnak tartok kiemelni az az, hogy a két analízis együttesen képes azonosítani a *páronkénti* nem-független szelekciókat, amelyek tehát valamilyen funkcionális kapcsoltságra utalnak. A kapcsoltság jellegét természetesen önmagukban nem tárják fel, ehhez mindenképpen egyedileg kell megnézni az egyes pozíciókban megjelenő kapcsolt trendeket (ahogy ezt a fenti kvalitatív elemzésben egyes esetekben megtettem), és végül kísérletesen kell igazolni, vagy cáfolni a megfigyelésekből levont hipotéziseket. Egy további fontos szempont, hogy a kovariancia analízis logikájából adódóan *kizárólag* olyan pozíciók kapcsoltságát képes kimutatni, amelyekben van variabilitás. Tehát sem a nem-randomizált, sem a tökéletesen egyneműre szelektált pozíciókról nem lehet eldönteni, hogy azok akár egymással, akár más, variábilis pozíciókkal kapcsoltak-e.

A statisztikai vizsgálatok eredményeként táblázatos elrendezésben kaptuk meg (lásd 4.7./1. táblázat), jelezve az egyes kapcsoltságok szignifikanciaszintjét, tehát annak valószínűségét, hogy a kapcsoltságra vonatkozó hipotézis igaz-e.

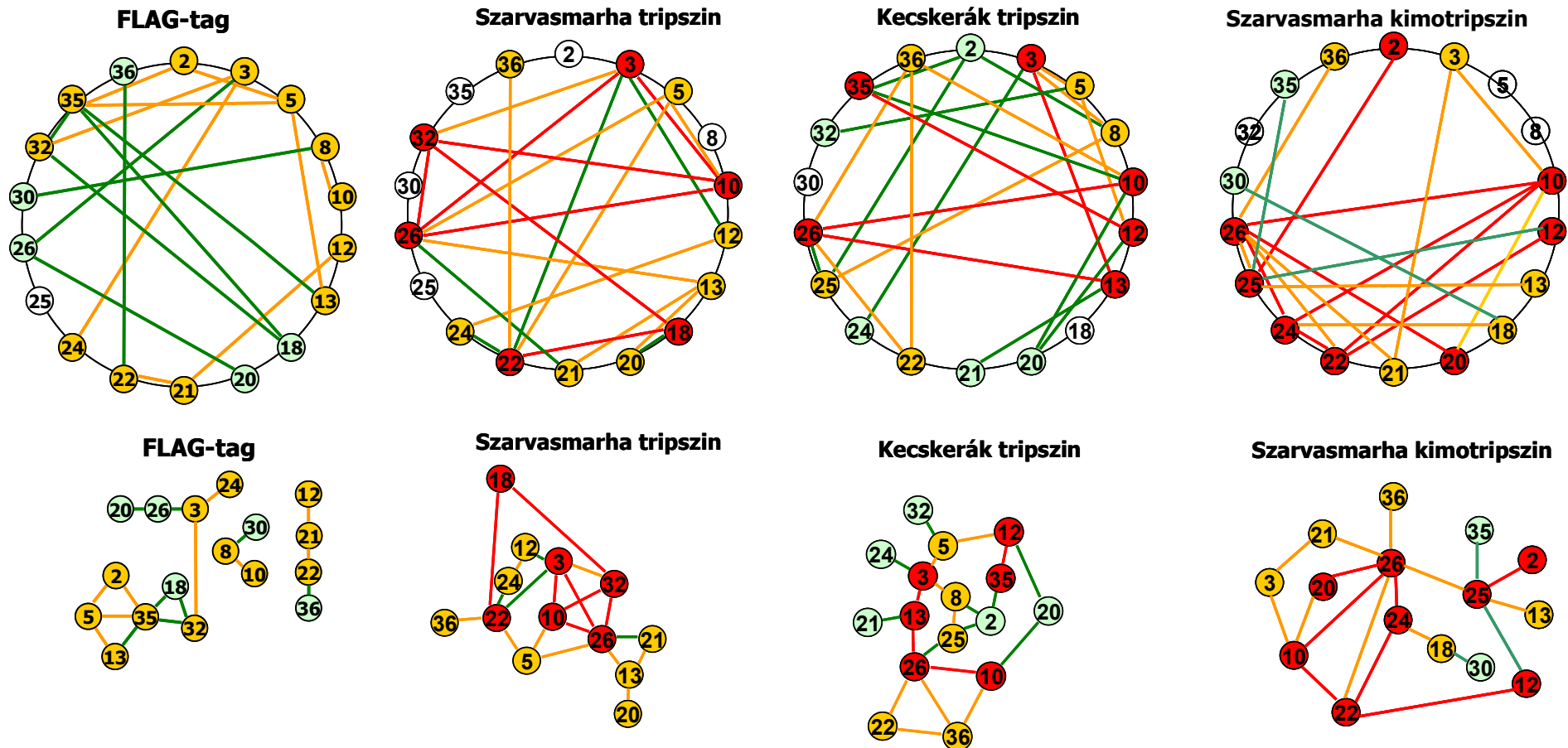
A	2	3	5	8	10	12	13	18	20	21	22	24	25	26	30	32	35	36
2		0.78	0.03	0.26	0.60	0.65	0.50	0.68	0.53	0.38	0.58	0.21	0.21	0.11	1.00	0.91	0.03	0.71
3	0.21		0.44	0.99	0.11	0.37	0.51	0.24	0.90	0.13	0.15	0.03	0.69	0.09	1.00	0.06	0.94	0.62
5	0.79	0.46		0.17	0.30	0.68	0.03	0.88	0.20	0.15	0.34	0.21	0.22	0.55	0.62	0.39	0.06	0.30
8	0.43	0.09	0.67		0.04	0.26	0.93	0.61	0.99	0.34	0.67	0.85	0.86	0.21	0.09	0.43	0.22	0.62
10	0.09	0.40	0.26	0.58		0.83	0.77	0.18	0.82	0.62	0.46	1.00	1.00	0.32	1.00	0.58	0.13	1.00
12	0.26	0.49	0.33	0.55	0.07		0.49	0.70	0.57	0.02	0.77	0.64	0.46	0.33	1.00	0.65	0.10	0.12
13	0.34	0.44	1.10	0.19	0.10	0.45		0.12	0.25	0.70	0.37	0.80	0.83	0.36	0.77	0.90	0.07	0.36
18	0.22	0.54	0.21	0.31	0.30	0.28	0.72		0.19	1.00	0.97	0.23	0.89	0.17	0.77	0.10	0.10	1.00
20	0.32	0.20	0.66	0.11	0.07	0.38	0.63	0.60		0.32	0.86	0.14	0.34	0.09	0.59	0.66	0.61	1.00
21	0.26	0.67	0.62	0.39	0.13	1.17	0.17	0.02	0.40		0.06	0.47	0.10	0.77	1.00	0.71	1.00	0.27
22	0.30	0.72	0.55	0.33	0.18	0.29	0.55	0.13	0.24	0.91		0.55	0.52	0.82	0.14	0.58	0.91	0.07
24	0.39	1.09	0.51	0.10	0.00	0.18	0.14	0.45	0.67	0.19	0.21		0.72	0.57	0.49	0.24	0.46	0.73
25	0.51	0.31	0.66	0.21	0.03	0.45	0.27	0.18	0.54	0.80	0.42	0.13		0.46	0.77	0.56	0.32	0.16
26	0.61	0.83	0.41	0.62	0.25	0.52	0.54	0.62	0.84	0.13	0.26	0.21	0.45		0.13	0.76	0.90	0.89
30	0.04	0.03	0.06	0.24	0.02	0.02	0.06	0.04	0.09	0.01	0.17	0.10	0.05	0.19		1.00	0.50	0.49
32	0.09	0.69	0.34	0.30	0.10	0.21	0.14	0.55	0.22	0.06	0.26	0.38	0.24	0.17	0.04		0.07	0.61
35	0.87	0.05	0.86	0.47	0.53	0.05	0.91	0.66	0.24	0.01	0.11	0.19	0.42	0.08	0.09	0.68		0.26
36	0.13	0.21	0.43	0.22	0.00	0.64	0.40	0.02	0.02	0.43	0.89	0.05	0.66	0.07	0.10	0.12	0.43	
B	2	3	5	8	10	12	13	18	20	21	22	24	25	26	30	32	35	36
2		0.59	0.72	0.98	0.63	0.54	0.49	0.96	0.92	0.54	0.41	1.00	0.82	0.95	1.00	0.85	0.52	0.21
3	0.34		0.42	0.17	0.00	0.07	0.55	0.87	0.70	0.14	0.10	0.49	0.68	0.00	1.00	0.04	1.00	0.21
5	0.32	0.46		0.18	0.05	0.92	0.60	0.16	0.40	0.48	0.04	0.27	0.55	0.04	1.00	0.14	0.58	0.66
8	0.10	0.65	0.72		0.53	0.29	0.50	0.26	0.66	0.58	0.89	0.74	0.61	0.52	1.00	0.71	0.30	0.60
10	0.21	1.70	0.90	0.23		0.11	0.48	0.14	0.93	0.13	0.11	1.00	0.89	0.00	1.00	0.01	1.00	0.49
12	0.37	0.78	0.20	0.53	0.61		0.25	0.43	0.39	0.47	0.28	0.02	0.58	0.12	1.00	0.31	1.00	0.40
13	0.29	0.26	0.27	0.30	0.17	0.46		0.62	0.03	0.02	0.33	0.17	0.77	0.04	1.00	0.53	1.00	0.72
18	0.09	0.13	0.61	0.46	0.49	0.32	0.16		0.96	0.56	0.00	1.00	0.70	0.20	1.00	0.01	1.00	0.34
20	0.15	0.26	0.48	0.27	0.07	0.43	1.05	0.09		0.93	0.71	0.16	0.42	0.50	1.00	0.56	1.00	0.95
21	0.22	0.55	0.28	0.23	0.66	0.25	1.13	0.14	0.06		0.64	1.00	0.52	0.08	1.00	0.63	1.00	0.72
22	0.48	0.77	1.06	0.18	0.73	0.56	0.43	1.66	0.29	0.22		0.09	0.54	0.27	1.00	0.74	1.00	0.04
24	0.02	0.07	0.12	0.04	0.01	0.28	0.14	0.01	0.13	0.01	0.19		0.48	0.35	1.00	1.00	1.00	1.00
25	0.24	0.30	0.41	0.33	0.08	0.35	0.17	0.20	0.42	0.24	0.40	0.08		0.78	1.00	0.31	1.00	0.19
26	0.13	1.77	1.03	0.35	1.54	0.71	0.97	0.51	0.35	0.86	0.59	0.12	0.22		1.00	0.00	1.00	0.26
30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		1.00	1.00	1.00
32	0.06	0.48	0.37	0.09	1.21	0.25	0.12	0.82	0.13	0.08	0.08	0.01	0.23	1.06	0.00		1.00	0.38
35	0.05	0.02	0.05	0.05	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02	0.04	0.00	0.02	0.03	0.00	0.00		0.43
36	0.49	0.49	0.21	0.17	0.14	0.31	0.07	0.29	0.05	0.05	1.02	0.00	0.51	0.47	0.00	0.16	0.04	
C	2	3	5	8	10	12	13	18	20	21	22	24	25	26	30	32	35	36
2		0.38	1.00	0.10	0.55	0.83	0.45	0.29	0.72	0.69	0.98	0.41	0.09	0.45	1.00	0.86	0.07	0.87
3	0.46		0.03	0.05	0.38	0.33	0.01	0.37	0.78	0.59	0.80	0.06	0.79	0.81	1.00	0.47	0.44	0.37
5	0.10	1.06		0.15	0.26	0.03	0.30	0.38	0.96	0.24	0.23	0.73	0.73	0.32	1.00	0.10	0.91	0.38
8	0.74	0.92	0.69		0.64	0.84	0.28	0.55	0.20	1.00	0.40	0.78	0.04	0.69	1.00	0.56	0.53	0.31
10	0.22	0.32	0.48	0.13		0.83	0.66	1.00	0.10	0.13	0.17	0.27	0.53	0.00	1.00	0.26	1.00	0.04
12	0.25	0.53	1.10	0.19	0.11		0.21	0.30	0.10	0.74	0.65	0.49	0.70	0.94	1.00	1.00	0.01	0.52
13	0.50	1.32	0.64	0.55	0.19	0.72		0.40	0.83	0.09	0.99	0.76	0.84	0.94	1.00	0.15	0.23	1.00
18	0.48	0.42	0.47	0.24	0.00	0.50	0.48		0.20	0.86	0.34	0.86	0.88	0.79	1.00	0.18	0.86	0.43
20	0.30	0.25	0.17	0.59	0.74	0.83	0.27	0.60		0.11	0.60	0.43	0.13	0.47	1.00	1.00	0.84	0.41
21	0.18	0.23	0.50	0.01	0.66	0.15	0.77	0.12	0.66		0.58	1.00	1.00	0.83	1.00	1.00	1.00	1.00
22	0.11	0.22	0.64	0.39	0.55	0.33	0.12	0.44	0.34	0.23		0.43	0.74	0.02	1.00	0.81	0.85	0.02
24	0.30	0.80	0.18	0.09	0.34	0.27	0.16	0.12	0.30	0.01	0.27		0.17	1.00	1.00	0.53	1.00	1.00
25	0.86	0.27	0.36	0.99	0.26	0.36	0.30	0.15	0.78	0.04	0.29	0.57		0.10	1.00	0.85	0.64	0.33
26	0.28	0.13	0.37	0.15	2.31	0.12	0.11	0.11	0.27	0.12	0.85	0.00	0.58		1.00	0.54	0.74	0.04
30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		1.00	1.00	1.00
32	0.04	0.10	0.26	0.08	0.17	0.00	0.20	0.28	0.02	0.00	0.06	0.12	0.05	0.06	0.00		1.00	0.24
35	0.44	0.19	0.09	0.14	0.00	0.64	0.27	0.05	0.05	0.01	0.05	0.01	0.10	0.04	0.00	0.03		1.00
36	0.08	0.33	0.40	0.35	1.16	0.25	0.04	0.24	0.33	0.00	1.22	0.00	0.42	0.85	0.00	0.23	0.01	
D	2	3	5	8	10	12	13	18	20	21	22	24	25	26	30	32	35	36
2		0.69	0.71	0.41	0.21	0.68	0.24	0.17	0.12	0.37	0.99	0.73	0.02	0.37	0.14	1.00	1.00	0.96
3	0.33		0.96	0.44	0.02	0.31	0.21	0.82	0.15	0.05	0.91	0.34	0.60	0.19	1.00	1.00	1.00	0.45
5	0.34	0.16		0.48	0.89	0.63	0.94	0.54	0.56	0.43	0.78	0.79	0.93	0.66	0.32	1.00	1.00	0.37
8	0.47	0.44	0.46		0.72	0.92	0.71	0.64	0.26	0.29	0.95	1.00	0.45	0.84	0.63	1.00	0.82	0.56
10	0.43	0.97	0.07	0.13		0.48	0.82	0.93	0.05	0.27	0.01	0.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	1.00
12	0.29	0.49	0.34	0.13	0.23		0.34	0.88	0.11	0.89	0.02	0.53	0.08	0.17	0.47	1.00	0.80	0.28
13	0.64	0.65	0.21	0.32	0.13	0.51		0.12	0.78	0.44	0.57	0.36	0.05	0.63	0.66	1.00	0.26	0.24
18	0.55	0.21	0.35	0.26	0.06	0.15	0.66		0.30	0.26	0.24	0.06	0.19	0.71	0.08	1.00	0.31	0.54
20	0.79	0.73	0.46	0.63	0.89	0.78	0.32	0.48		0.66	0.24	1.00	0.72	0.02	1.00	1.00	0.57	0.71
21	0.38	0.90	0.35	0.51	0.33	0.07	0.35	0.39	0.23		0.88	0.72	0.87	0.03	0.45	1.00	1.00	0.35
22	0.13	0.21	0.32	0.14	1.32	1.20	0.44	0.53	0.66	0.10		0.01	0.34	0.04	0.11	1.00	0.34	0.14
24	0.15	0.39	0.14	0.04	2.39	0.22	0.40	0.75	0.04	0.10	1.53		0.87	0.01	0.45	1.00	0.30	0.61
25	1.06	0.25	0.12	0.31	0.01	0.68	0.86	0.45	0.21	0.07	0.43	0.07		0.03	1.00	1.00	0.08	0.11
26	0.48	0.64	0.32	0.15	3.38	0.64	0.35	0.23	1.30	1.07	1.09	1.42	1.06		1.00	1.00	0.51	0.04
30	0.07	0.02	0.05	0.04	0.01	0.05	0.05	0.08	0.04	0.04	0.07	0.04	0.01	0.03		1.00	1.00	1.00
32	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		1.00	1.00
35																		

Egyszerű szemrevételezéssel is levonható az a fontos következtetés, hogy az ellenanyagon történt szelekció esetén is van kapcsoltság számos pozíció között, annak ellenére, hogy itt nem volt inhibitor funkcióra történő szelekció. A randomizált csoportok egy részének tehát már pusztán azért is együtt kell működniük, hogy a molekula fel tudjon tekeredni, és termelhető legyen. A viszonylag alacsony (az enzimikus szelekciókhoz képest, lásd később) szignifikancia szintek, és a kisszámú kapcsolat arra utal, hogy a Pacifastin szerkezet robosztus, sokféle mutációt elvisel.

A másik rögtön szembeötlő jelenség, hogy az enzimikus szelekcióknál talált kapcsoltságok száma, és szignifikancia szintje rendre magasabb, mint az ellenanyag szelekcióra vonatkozó értékek. Ez bizonyára azt jelenti, hogy az enzimekhez való kapcsolódás a feltekeredésen felül további kritériumokat támaszt az inhibitor molekulák szerkezetével szemben, ami még több együttműködést követel meg a pozíciók között.

A harmadik, látványos jelenség, hogy az egyes enzimek más-más pozíciókapcsoltságokat hívnak elő a könyvtárból, tehát az egyes enzimek eltérő „igényeket támasztanak”. A táblázatos elrendezés lehetővé teszi az egyes S (score) értékek, és az ezekhez tartozó P szignifikancia szintek szemrevételezését, de nem jól vizualizálják a kapcsolatok hálózatát. Ezt két eltérő módon is megkísértem. A 4.7./1.A ábrán az egyes pozíciókat egyetlen körön a négyféle szelekció esetében azonos módon rendeztem el, így viszonylag jól láthatóak voltak az azonosságok, és eltérések az egyes szelekciók között. Ugyanakkor a rengetek összekötő vonal egymást keresztezve, mégis kusza képet adott. Ezért a 4.7./1.B ábrán egy olyan ábrázolást is alkalmaztam, ahol minimalizáltam a pozíciókat összekötő vonalak kereszteződését. Ez a módszer jobban kiemelte bizonyos csomópontok meglétét, és azt, ha esetleg szigetek alakultak ki, amik más pozíciókkal nem tartanak kapcsolatot.

Ugyancsak kiemelendő tény, hogy a kvalitatív analízissel felismert 10-26 pozíciók kapcsolatát mindhárom enzimszelektált szekvencia sereg esetén igazolta a statisztikai analízis, mégpedig a legerősebb szignifikancia szint, $P=0.0$ értéken. A magok tehát nem csak térszerkezeti analízisben kimutatható, egymáshoz közeli aminosav csoportok, hanem valódi, alapvető funkcionális szereppel bíró működési egységek. A hálózatok tökéletesen visszaigazolták a magok és a 20-22 pozíciók közötti, valamint az egyéb, a szövegben említett kapcsoltságokat is (lásd 4.7./1.B ábra). A hálózatok a korábban említetteknél jóval több funkcionális kapcsolatot javasolnak, amelyek értelmezéséhez még tetemes mennyiségű kísérletes munkára lenne szükség.



4.7./1.B ábra Az egyes randomizált pozíciók funkcionális függőségi hálózata páros kovariancia analízis alapján.

A 4.7./1. táblázatból származó adatok alapján ábrázoltam a jósolt funkcionális kapcsoltságot minden egyes randomizált pozíció párra.

A felső sorban az elrendezés igyekszik megkönnyíteni az egyes szelekciók között meglévő azonos kapcsoltságok felismerését.

Az alsó sorban alkalmazott séma ezzel szemben jobban vizualizálja a hálózatok egyedi szerkezetét.

A színezési séma a következő: a vonalak színe megegyezik a 4.7./1. táblázatban szereplő, a kapcsoltság szignifikancia szintjére vonatkozó színekkel. A pozíciók színe a legmagasabb szignifikancia szintű kapcsolatukat tükrözi.

Ebben a munkában elsősorban a célkitűzésem szempontjából legfontosabb kapcsoltságokra koncentráltam: annak megválaszolására, hogy mi okozhatja az SGPI-1 jellegű inhibitorok nem-kanonikus viselkedését, illetve törzs-specifitását. Ebből a szempontból két pozíciócsoportra lettem figyelmes. Az egyik, a már említett 20-22 régió, amin belül az SGPI-1 mag nem tűri meg az SGPI-1 jellegű csoportok előfordulását, amennyiben a célenzim az emlős tripszin. Mivel az idevonatkozó SGPI-2 jellegű aminosavakat az ellenanyagok szelekciója nem preferálta, szinte bizonyosak lehettünk abban, hogy ezek asszociációja az SGPI-1 jellegű maggal komoly affinitásnövelő szerepet jelez. A másik csoportba két pozíció, az 5. és a 18. tartozott. Ezek szintén kapcsoltságot mutattak részben a 10-es, részben a 26-os pozíciókkal. Mindkettőre igaz volt, hogy a K10-W26-os SGPI-1 típusú maghoz asszociálódva ezen a két pozíción is SGPI-2 jellegű aminosavak jelentek meg. Ezekben az esetekben azonban az ellenanyagok szelekciója is az SGPI-2 jellegűt preferálta. Ezért nem voltunk bizonyosak abban, hogy a látott asszociáció affinitásnövelő, avagy inkább feltekeredést javító hatású-e, illetve esetleg mindkét funkcióra hatással vannak.

4.8. Inhibitorok tervezése a szelekció fényében

A fenti gondolatmenet alapján a következő variánsokat terveztük:

A) SGPI-1-PO1 (PO1 = Phage-Optimised-1): SGPI-1-(T5E/N18R/T20G/P21S/T22D)

A fenti gondolatmenet alapján ebből a variánsból kihagytuk azokat az SGPI-1 csoportokat, amelyeket a szarvasmarha tripszinen történő szelekció során a K10-W26-os SGPI-1 mag nem tolerált. Ezeken a pozíciókon az SGPI-1 jellegű aminosavakat az SGPI-2-ben szereplő változataikra cseréltük. Érdekes megjegyezni, hogy a 20-22 szakasz a molekulában egy hajtókanyart alkot, amelynek szekvenciája SGPI-1-ben TPT, míg SGPI-2-ben GSD. A szakasz cseréje tehát így is jelölhető: TPT20-22GSD.

B) SGPI-1-PO2: SGPI-1-(T5E/N18R/T20G/P21S/T22D/K31M)

Mivel tudtuk, hogy az emlős tripszin a P1' pozícióban szereplő pozitív csoportokat nem kedveli (lásd „Irodalmi áttekintés”), az SGPI-1-PO1 variánsban lecseréltük az SGPI-1 illetve SGPI-2 molekulákra egyaránt jellemző P1' K31 csoportot metioninra, előállítva az SGPI-1-PO2 variánst..

C) SGPI-1-PO3: SGPI-1(T5E/N18R)

Ezt a mutánst annak kiderítésére terveztük, hogy vajon az SGPI-1-PO1 aktivitásában mekkora szerepet játszanak az amúgy kevésbé fontosnak jósolt T5E és N18R mutációk.

D) SGPI-1-PO4: SGPI-1-(T20G/P21S/T22D)

Ezzel a variánssal azt akartuk megtudni, hogy a felszíni hurokcseré önmagában mekkora hatással jár. A könnyebb áttekinthetőség érdekében a variánsok szekvenciáit is bemutatom a 4.8./1. ábrán.

SGPI-1 EQECTPGQTKKQDCNTCNCTPTG-VWACTRKGCPPH
SGPI-2 EVTCEPGTTFKDKNCTCRGSDGKSAACTLKACPQ-
SGPI-1-PO-1 EQECEPGQTKKQDCNTCRGSDG-VWACTRKGCPPH
SGPI-1-PO-2 EQECEPGQTKKQDCNTCRGSDG-VWACTRMGCPPH
SGPI-1-PO-3 EQECEPGQTKKQDCNCTRCTPTG-VWACTRKGCPPH
SGPI-1-PO-4 EQECTPGQTKKQDCNTCNCSDG-VWACTRKGCPPH

4.8./1. ábra Fág-szelekció, kovariancia analízis, és korábbi ismeret alapján tervezett variánsok

Az SGPI-1 szekvenciájába beemelt SGPI-2 jellegű csoportokat zöld szín jelöli, a korábbi ismeret alapján bevitt metionint kézzel emeltem ki. A P1/P1' pozíciókat aláhúztam.

A mérési eredményeket, és ezek összevetését a tanszéken korábban készített formák adataival a 4.8./1. táblázatban mutatom be.

Inhibitor variáns	P1-P1'	Mag	Szarvasmarha tripszin		Kecskerák tripszin	
			K _i (pM)	K _i SGPI-1/K _i variáns	K _i (pM)	K _i SGPI-1/K _i variáns
SGPI-1-PO-1	R-K	K-W	3500	60	2,6	1,2
SGPI-1-PO-2	R-M	K-W	20	10500	6,4	0,5
SGPI-1-PO-3	R-K	K-W	270000	0,8	0,3	10
SGPI-1-PO-4	R-K	K-W	10100	21	3,5	0,9
SGPI-1	R-K	K-W	210000	1,0	3,0	1,0
SGPI-1-K31M	R-M	K-W	30000	7,0	5,0	0,6
SGPI-2-L30R	R-K	F-A	5500	38	2,0	1,5
SGPI-2-L30R/K31M	R-M	F-A	5	42000	1,2	2,5

4.8./1. táblázat SGPI-1 és SGPI-2 variánsok összehasonlító inhibíciós adatai.

A táblázatban összefoglalt adatokat a következőképpen értelmeztem. Az emlős tripszinen mért adatokat elemezve láthatjuk, hogy a szelekció és kovariancia alapján jószolt mutációk az SGPI-1-PO-1 variánst hatvanszor aktívabbá tették ezen az enzimen, mint az SGPI-1 volt, és annak affinitása így a nanomoláris tartományba került. Ennél is fontosabb azonban, ezekkel a változtatásokkal a molekula gyakorlatilag ugyanolyan jó inhibitorrá vált, mint a II. típusú maggal rendelkező SGPI-2-L30R (P1 pontmutáns) variáns. Sőt, ha megnézzük a rák tripszinen kapott adatokat, azt láthatjuk, hogy az SGPI-1-PO1 és az SGPI-2-L30R ebben a

tekintetben is azonos viselkedésűek, mindkettő pikomoláris affinitással gátolja az ízeltlábú enzimet. Mivel a két forma izofunkcionális, sikerült bizonyítani, hogy pusztán az I. típusú mag önmagában nem lehet felelős a törzs-specifitásért.

Az irodalmi adatok alapján tervezett K31M (P1') mutáció, ami az SGPI-1-PO2 mutánsához vezet további 175-szörös javulást okoz, és a pikomólos tartományba mozdítja a K_i értéket az emlős tripszinen is. Érdeemes kiemelni, hogy ugyanez a P1' mutáció a kiindulási SGPI-1 molekulán csak egy szerény 7-szeres hatással járt. Ez arra utal, hogy az SGPI-1 molekula nem úgy illeszkedik az emlős tripszinhez, hogy kihasználhatná az optimalizált P1' csoport előnyeit. Ugyanez a K31M P1' mutáció az SGPI-2-L30R molekulában ezerszeres affinitásnövekedést okozott, ami arra utal, hogy az SGPI-2 alapú L30R pontmutáns és az SGPI-1 alapú SGPI-1-PO1 továbbra sem tökéletesen azonos módon kötődnek az emlős enzimhez.

A következő kérdés az volt, vajon az egyes mutáció-csoportok (T5E/N18R illetve T20G/P21S/T22D) mekkora szerepet játszanak, ha blokkonként építjük az SGPI-1 molekulába. Mint az, az SGPI-1-PO3 adatból látható, az SGPI-1 molekulában emlős tripszinnel szemben a T5E/N18R blokk nem okoz változást. Az SGPI-1-PO4 adatból ezzel szemben azt láthatjuk, hogy a T20-P21-T22 hurok cseréje főszerepet játszik (21-szeres hatás) az emlős tripszinen történő affinitásnövekedésben. Az eddig említett adatok összevetéséből ugyanakkor az is világos, hogy a hurokcserével kombinálva a T5E/N18R blokknak is van valami szerepe, hiszen ezzel a blokkal együtt már 60-szoros az affinitás növekedése. Ez tehát egy újabb (igaz szerény, 3-szoros) nem-additív jelenség.

Az ízeltlábú tripszines adatokat megnézve azt láthatjuk, hogy ott a P1' pozíciót és a T20-P21-T22 hurkot érintő mutációk gyakorlatilag nem okoznak változást, míg a T5E/N18R blokk tízszeres affinitásnövekedést okoz. Utólag újra ellenőrizve a szelektált szekvenciákat, ez az affinitásnövelő hatás akár jósolható is lett volna, hiszen az R18 csoportra komoly pozitív szelekciót fejt ki a rák tripszin, különösen az ellenanyag-szelekcióhoz viszonyítva (lásd 4.7./1. ábra).

A fenti eredményeket összefoglalva azt a következtetést vontam le, hogy az I. típusú maggal rendelkező molekulák törzs-szelektivitását nem önmagában a hidrofób mag felépítése, hanem az adott típusú mag, és a T20-P21-T22 szekvenciájú hurok *kombinációja* okozza. Ennek funkcionális magyarázatát a „Konklúziók” fejezetben igyekeztem megadni.

5. KONKLÚZIÓ

Amint azt a célkitűzésekben leírtam, doktori munkám során arra igyekeztem magyarázatot találni, hogy a Pacifastin családba tartozó SGPI-1 (és annak ortológjai) miért viselkednek nem-kanonikus módon. Pontosabban: i) miért rendelkeznek korábban soha nem tapasztalt mértékű törzs-specifitással, és ii) a P1-környéki mutációk tekintetében miért nem követik a Laskowski modellből következő additivitási szabályt, tehát azonos mutációk miért fejtenek ki nagyon eltérő mértékű hatást SGPI-1-ben illetve SGPI-2-ben.

A törzs-specifitás kapcsán az irodalomban korábban 3 hipotézist vetettek fel.

Hipotézis 1.: az SGPI-1 (és ortológjai) törzs-specifitásának oka a P1' jellegében rejlik. Ez egy pozitív töltésű lizin, ami komplementer módon megfelel az ízeltlábú tripszinekben S1' helyén lévő negatív töltésű csoportoknak, de kifejezetten előnytelen emlős tripszineken, ahol az S1' helyen pozitív oldalláncot találunk. Ez a hipotézis csak részben bizonyult helyesnek, ugyanis SGPI-1 esetén a K31M P1' csere csak nagyon szerény, 7-szeres hatást fejtett ki (szemben az SGPI-2 L30R molekulában bekövetkező 1000-szeres hatással). A fő meghatározó elem tehát nem a P1' jellege [Malik és mtsi. 1999; Patthy és mtsi. 2002].

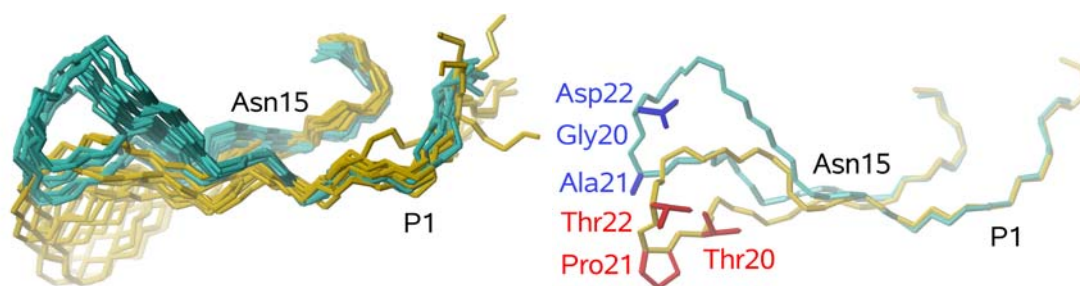
Hipotézis 2.: az eltérő viselkedést az I. és II. típusú formák szerkezeti merevségének eltérései okozzák. Amint azt az irodalmi áttekintésben is bemutattam, Gáspári Zoltán korábbi eredményei azt mutatták (lásd 1.2.4./3. ábra), hogy az SGPI-1 vázszerkezete merevebb, mint az SGPI-2-é. Ez alapozta meg azt a hipotézist, hogy a törzs-specifitás oka az SGPI-1 merevebb szerkezete gátolja az emlős tripszinhez idomulását, míg valami miatt nem gátolja az ízeltlábú eredetű tripszinhez való idomulást. Ennek a hipotézisnek a felállításához fel kellett tételeznünk, hogy a 6-diszulfid hidat tartalmazó emlős enzim merevebb szerkezetű, mint a csak 3 diszulfid hidat tartalmazó rák tripszin. Ennek a hipotézisnek a témakörét komplikálja az az irodalmi áttekintésben ismertetett tény, hogy a természetes forrásból származó SGPI-2 (és LMPI-2) poszttranszlációs módosításként fukóz csoporttal rendelkezik, ami igazoltan merevebbé teszi a molekulát. Tehát az is elképzelhető, hogy a fukozilált SGPI-2 és a természetes formájában sem módosított SGPI-1 dinamikai sajátosságai hasonlóak. Mindenesetre ennek a hipotézisnek az ellenőrzésére terveztük az összehasonlító NMR-titrálós vizsgálatokat.

Hipotézis 3.: az eltérő viselkedést a P6-P10 hurok (20-25 régió) eltérései okozzák. Az SGPI-1-ben és ortológjaiban a 21-es pozícióban prolin van, míg az SGPI-2 típusban itt szerin csoport szerepel. Az LMPI-2 és a szarvasmarha kimotripszin komplexének röntgenkristallográfiai elemzésével és ezt követő modellezéssel azt találták, hogy ha az

LMPI-2 molekulát LMPI-1 molekulával helyettesítik, akkor ez utóbbi P21 csoportja nagyon közel esik a kimotripszinben lévő felszíni G173 csoporthoz. Ebben a pozícióban emlős tripszinekben prolin van (P173). Ezek után molekulahelyettesítő modellezéssel a kimotripsint is lecserélték, mégpedig szarvasmarha tripszinre, és azt kapták, hogy az LMPI-1 P21 csoportja és a szarvasmarha tripszin P173 csoportja ütköznének, és ezzel magyarázták, hogy az LMPI-1 (és az SGPI-1) szinte inaktív emlős tripszin.

A mi irányított evolúciós kísérletünk egyértelműen azonosította a törzs-specifitás hátterében álló okát, már ami az egyes pozíciók funkcionális hozzájárulását jelenti. Az ilyen értelemben vett ok nem más, mint az I. típusú K10-W26 mag és az I. típusú T20-P21-T22 hurok kombinációjának összeférhetetlensége az emlős tripszinhez való nagy affinitású kötéssel. Ezt a fágbemutatáson alapuló felismerést az egyedi variánsokon végzett inhibíciós mérések is tökéletesen igazolták. Az irányított evolúciós megközelítés tehát megvilágította a funkcionálisan legfontosabb főszereplőket, helyesen megjósolta, hogy azok milyen kombinációban fejtik ki a hatásukat, de maga a módszer természetesen nem képes megválaszolni, hogy az adott kombináció *miért* okoz törzs-specifitást.

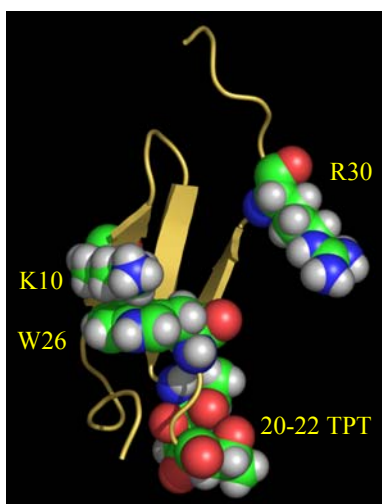
Ha alaposabban összevetjük az I. és II. típusú inhibitorok vázszerkezetét úgy, hogy a P3-P3' szakaszon illesztjük össze ezeket a molekulákat, akkor azt fogjuk tapasztalni, hogy a 20-22-es hajtű radikálisan más pozícióban van az I. típusnál, mint a II. típusnál (lásd 5. /1.-es ábra).



5./1. ábra Az I. és II. típusú Pacifastinok 20-22 hurokrégiójának eltérő térhelyezete NMR (baloldalon) és röntgenkristallográfiás (jobboldalon) szerkezetek azt mutatják, hogy I. típusú (sárga) Pacifastin mag esetén a 20-22 hurok lényegesen kijebb nyomódik, mint II. típusú (kék) mag esetén.

A szerkezetek a P1 környéki hurok, és az abszolút konzervált 13-16 pozíciókban lettek összeillesztve. Felhasznált PDB fájlok: ID2F91, 1GL1, 1KGM és 1 KJ0

Ezek alapján a legegyszerűbb magyarázat a következő: a K10-W26 mag kifelé nyomja a T20-P21-T22 hurkot (5./2. ábra), és így az ütközni fog az emlős tripszin P173-as csoportjával. Ez a következtetés tehát *hasonlít* a harmadik hipotézis okfejtésére, de ugyanakkor lényeges eltérés van a két magyarázat között. A harmadik hipotézis feltette, hogy a P21 *önmagában* képes akadályozni az emlős tripszin kötést. A mi modellünk azonban azt állítja, hogy csak a mag és a P21 tartalmú hurok *kombinációja* okoz problémát.



5./2. ábra A II. típusú mag és a 20-22 hurok fizikai kapcsolata.

A K10-W26 pozíciók funkcionális kapcsoltságának oka, hogy egymással fizikai kapcsolatban léve a molekula magját alakítják ki. A mag és a 20-22 hurok funkcionális kapcsoltságának legvalószínűbb oka, hogy a triptofán mintegy „kidomborítja” a prolin tartalmú hurkot.

Az emlős tripszinen szelektált klónok mintegy harmada tartalmaz P21 csoportot, jelezve, hogy a P21 önmagában nem jelent problémát. Ugyanakkor ezeknek a megengedett P21 csoportoknak szinte mindegyike SGPI-2 típusú maggal párosult. Az irányított evolúciós megközelítés erejét éppen ez mutatja: sokkal eredményesebben tárja fel a *kombinációk* okozta jelenségek hátterét, mint az egyedi mutációkat használó klasszikus fehérjemérnöki megközelítés.

Komoly tanszéki eredmény volt az utóbbi években az SGPI-1 és a rák tripszin komplexének kristályosítása [Fodor és mtsi. 2005]. A különlegesen nagy felbontású röntgenszerkezet alapján kiderült, hogy a szokásos P3-P3'interakciós felszíneken (lásd Schechter és Berger nevezéktan) túl itt a P12-P4, és a P4'-P5' szakaszon is vannak egymáshoz fekvő inhibitor-enzim felszínek. A szerkezeten alapuló *in silico* analízis azt jósolta, hogy ezek a területek – beleértve az N18 oldalláncot, ami a Schechter-Berger nevezéktan szerint a P12 csoport, és a P10-P8 területre eső T20-P21-T22 szakaszt, hozzájárul ahhoz, hogy az SGPI-I erősebben köti a rák tripszint, mint az emlős tripszint. Bár az atomi felbontású térszerkezetek felbecsülhetetlenül nagymértékben járulnak hozzá a molekuláris

mechanizmusok megértéséhez, ebből a vizsgálatból is kiderült, hogy nagy óvatosságot igényelnek a pusztán szerkezeti alapon levont funkcionális következtetések, főleg, ha modellezésen alapulnak. A kísérleti tények ugyanis azt mutatják, hogy mind az N18, mind pedig a T20-P21-T22 szakasz kicserélhető teljesen eltérő típusú csoportokra úgy, hogy a rák tripszinhez kötés affinitása egyáltalán nem csökken, sőt akár még tízszeresére is növekedhet (lásd 4.8./1. táblázat).

Jóllehet a fenti magyarázat a legegyszerűbb, és a disszertációm mottójaként választott, Albert Einsteinnek tulajdonított mondás is a lehető legegyszerűbb modell elfogadására buzdít, ugyanezen idézet arra is figyelmeztet, hogy a túlegyszerűsítés is kerülendő. Bár a konkrét kérdésben nagy valószínűséggel ez az egyszerű mag + hurok kombinációs modell helytálló, ez nem jelenti azt, hogy a Pacifastin család kétféle típusának ne lehetnének olyan eltérései, amiket csak bonyolultabb modell magyarázhatna, például olyan, ami az eltérő dinamikai sajátságokra alapoz.

Ezt a gondolatot erősíti az is, hogy a fágselekció számos olyan funkcionális kapcsolatot tárt fel, amelyek nem közvetlen kontaktusban lévő csoportok között állnak fent. Ezenél valószínű, hogy a dinamikai sajátságoknak is szerepük van. Elképzelhető, hogy éppen ezekre a nehezen értelmezhető kapcsolságokra utal az az „Eredmények és Diskusszió” fejezetben leírt NMR alapú megfigyelés is, miszerint az SGPI-2 kimotripszinhez való kötésekor az inhibitor molekulának a proteázkötő helytől távoli részei is komoly szerkezeti-dinamikai változásokat mutatnak.

Szintén érdekes, és valószínűleg fontos párhuzam az NMR-es és fág-selekciós vizsgálat között a 18-as pozíció jellegzetes viselkedése. A fágselekció során csak néhány pozíció adott drasztikus választ az eltérő szelekciós nyomásokra. A P1, a mag és a 20-22 hurok mellett éppenséggel a 18-as pozíció volt az, amelyik különleges módon viselkedett (lásd 4.7./1. ábra). Az ellenanyag-selekcióban és a kimotripszines szelekcióban szinte eltűnt innen az SGPI-2-re jellemző R18, és helyette az egyik Pacifastinra sem jellemző H18 jelent meg. Ehhez képest az emlős tripszin „visszaengedte” az R18 aminosavat, míg a rák tripszin kifejezetten preferálta azt.

Összefoglalásképpen tehát a dolgozatomban legfontosabb eredményének azt tekintem, hogy a fágbemutatással sikerült megtalálnom az SGPI-I típusú Pacifastinok nem-kanonikus működésének okát. Legjobb tudomásom szerint ez az első olyan reverzibilis inhibitor, amelynél a mag szerkezete kifejezetten nagy hatást gyakorol a molekula felszíni tulajdonságaira, és ezen keresztül az inhibitor specifikására. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy még számos olyan standard mechanizmussal működő proteáz inhibitor család létezhet,

amelynek tagjai nem-kanonikus módon működnek, tehát amelyek leírására nem alkalmas a Laskowski-féle szekvencia-reaktivitás algoritmus.

Még inkább általánosítva az eredményeket, ezek a vizsgálatok azt mutatják, hogy még a rendkívül egyszerű működésűnek ítélt reverzibilis proteáz inhibitorok esetében sem lehet feltétlenül eldönteni pusztán a térszerkezet, és főként a szekvencia alapján, hogy egy-egy adott molekula milyen funkcionális tulajdonságokkal rendelkezik.

Különösen fontos ezt szem előtt tartani a genomprojektek és szerkezeti genomikai programok korában, amikor ilyen jellegű predikciók özönével találkozunk.

Végül szeretném kihangsúlyozni, hogy a munkám során vizsgált Pacifastin motívumok egy jellegzetes mérettartományt reprezentálnak valahol a kisstabilitású peptidek, és a kicsi, de stabil fehérjék egyfajta határmezsgyéjén. Míg a globuláris fehérjék natív szerkezete egy sűrűn pakolt, stabilitást biztosító hidrofób mag köré szerveződik, egy 35-tagú peptid topológiai okok miatt ilyen maggal nem rendelkezhet. Ezeknél csak egy minimalista belső mag alakulhat ki, és a stabilitást optimális elhelyezkedésű, nagyszámú diszulfidhíd biztosítja. Ez természetesen azzal is jár, hogy itt a nagyobb olyan természetesnek tűnő „mag” és „felszín” fogalmak is kissé elmosódnak. Mindenesetre a mi általunk „mag”-ként definiált két pozíció valóban azt a két csoportot jelentik, amelyek az oldószer számára a legkevésbé hozzáférhetőek.

Pacifastin családba tartozó inhibitort most először sikerül működőképes formában fágfelszínen bemutatni. Úgy gondolom, hogy ez az eredmény új dimenziókat nyit majd ennek a különlegesen érdekes, nem-kanonikus viselkedési jegyeket mutató inhibitor családnak a vizsgálatában. Az előítéletmentes evolúciós megközelítés és az ez alapján tervezett egyedi variánsok nagyfelbontású szerkezet-funkció vizsgálata még számos értékes eredménnyel szolgálhat. Kis méret, nagy stabilitás, nagy aktivitás, ezek mind olyan tulajdonságok, amelyek ezeket az inhibitorokat a makromolekuláris kölcsönhatások vizsgálatának különlegesen hálás modellrendszerévé teszik. Sőt, ezek a molekulák akár proteáz-gátláson alapuló gyógyszerek tervezésének kiindulópontjául is szolgálhatnak majd.

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Természetesen köszönet illeti Gráf Lászlót, aki annak idején lehetővé tette, hogy ezen a témán kezdhessek el dolgozni az ELTE Biokémiai Tanszékén és mind a diplomamunkám, mind a PhD munkám témavezetője volt.

Pál Gábornak köszönöm, hogy kidolgozta a törzs-specifitási probléma megoldásának kiméra-mutagenezisen és fágbemutatáson alapuló koncepcióját, valamint azt, hogy megtanította ennek az irányított evolúciós megközelítésnek az elméletét, és gyakorlatát. Ugyancsak köszönöm Neki, hogy felkutatta az eredmények elemzésének és statisztikai analízisének a dolgozatban használt módszerét. Nélküle ez a dolgozat nem jöhetett volna létre.

Perczel Andrást és Gáspári Zoltánt köszönet illeti azért, hogy az NMR spektroszkópia méréseket elvégezték, és a kiértékelésekhez szükséges tudásukat megosztották velem, mindezt mindig optimista hangulatban. Gáspári Zoltánnak külön köszönöm, hogy segített algoritmizálni a Pál Gábor által javasolt kiértékelési eljárást, és az általa írt programmal kiértékelte az adatokat.

Énekes Vilmosnénak, Eminek köszönöm, hogy csendes szorgalommal és kedves gondoskodással biztosította a technikai feltételeket ahhoz, hogy a laborban mindig gördülékeny munka folyhasson.

Patthy Andrásnak köszönöm, hogy megtanított a HPLC-s technikákat, és magas minőségű peptideket szintetizált a kísérletekhez, Kékesi Katalinnak pedig azt, hogy a tömegspektroszkópiás méréseket elvégezte.

Nagy Attilának azt köszönöm, hogy szakdolgozati munkám kezdetén megismertetett a DNS manipulációs technikákkal, Fodor Krisztiánnak pedig azt, hogy barátságos hangulatot teremtett a laborban. Carminita Frostnak köszönöm, hogy kutatói bátorságra és alaposságra tanított. Továbbá köszönöm az ELTE Biokémiai Tanszék összes tagjának, hogy szakmai problémákkal bizalommal fordulhattam hozzájuk.

Köszönöm a GenoID Kft. (jelenlegi munkahelyem) összes dolgozójának, hogy felhőtlen jókedvükkel átsegítették a dolgozatírás időszakán.

Végül de valójában elsősorban köszönet illeti a családomat és barátaimat, akik csöndes és optimista biztatással mind a napos mind borús napokon mellettem álltak.

RÖVIDÍTÉSEK ÉS MAGYARÁZATOK JEGYZÉKE

2YT = tápanyagban gazdag baktérium táptalaj, összetétele: 16 g bacto Trypton, 10 g bacto Yeast extract (élesztő kivonat), 5g NaCl, pH =7.0 / 1 l desztillált víz

3D-TOCSY-HSQC= 3D-**T**otal **C**orrelated **S**pectroscopy - **H**eteronuclear **S**ingle **Q**uantum **C**orrelation, háromdimenziós spektrumot eredményező heteronukleáris pulzus szekvencia.

7B2 = intracellular protein of unknown function, más néven secretogranin, proprotein convertase-2 precursor éréséhez szükséges (Martens és mtsi. 1994).

α 2M = **alpha-2 Makroglobulin**, nagyméretű szérum fehérje, amit a máj termel, a fehérje elektroforézis során a fő alkotó eleme a géliképen megjelenő alfa-2 csíknak.

ϵ_{nm} = moláris extinkciós együttható, adott hullámhosszon mérve az adott molekula sajátja, a következő összefüggésben lehet koncentrációmérésre használni: $A = c \cdot l \cdot \epsilon_{\text{nm}}$, ahol A, a mért abszorbancia, l a az anyagban megtett fényt cm-ben, c a koncentráció M-ban.

μF =mikro Farad, elektromos kapacitás mértékegysége

Ω = ohm, elektromos ellenállás mértékegysége.

Amp^{R} = **ampicillin resistance**, ampicillin elleni rezisztenciát biztosító genotípus jele. Az ezzel a genotípussal rendelkező baktériumok a β -laktamáz fehérjét expresszálják, ami elbontja a baktérium sejtfalszintézisét gátló β -laktám gyűrűt tartalmazó antibiotikumokat.

anti-Flag-Tag-IgG = olyan ellenanyag, ami az YKDDDDK lineáris epitópot ismeri fel. Ez a peptid egyben enterokináz hasító helyet (DDDDK) is tartalmaz.

anti-M13KO7-HRP-konjugált-IgG = olyan immunoglobulin G ellenanyag, ami az M13KO7 fágot ismeri fel és torna peroxidáz (= **Horseredish Peroxidase**) enzim van hozzákapcsolva. A peroxidáz által elbontott szubsztráton keresztül, fotometriásan detektálni lehet a jelenlévő (kikötődött) ellenanyag mennyiségét.

BAPNA = **benzoyl-L-arginine p-nitroanilide**, tripszinszerű szerinproteázok fotometriás szubsztrátja, a hasítást követően felszabaduló paranitroanilin sárgás színét 405 nm-en lehet detektálni.

BPTI = **Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor**, szarvasmarha pankreatikus tripszin inhibitor

BSA = **bovine serum albumin**, szarvasmarha szérum albumin

Cam^{R} = **chloramphenicol resistance**, kloramfenikol rezisztenciáért felelős gént hordozó baktérium genotípusa. A rezisztenciáért felelős gén a kloramfenikol acetyl-transzféráz, ami a kloramfenikolt acetylálva, gátolja annak az 50S riboszómához való kötését.

CAPS = 3-[cyclohexylamino]-1-propane sulfonic acid, fehérje szekvenálást megelőző blottoláshoz használt puffer vegyülete.

CFU = **colony forming unit**, kolóniát létrehozó egység. Szilárd táptalajon növő baktérium telepek száma, ami megegyezik a kikent oldatban jelenlévő baktérium sejtek számával, mert egy telep, egy sejt osztódásával jön létre.

CNBr = cyanogen bromide, bróm cián, erősen mérgező kristályos vegyület, ennek hangyasavas oldata szelektíven hasítja fehérjéket metionint követően, úgy, hogy egy homoszerin lakton gyűrű alakul ki az metionin oldalláncból.

CTLA = **Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen**, CD28 receptor családban tartozik, főleg CD4+ T sejteken fordul elő.

COCACBNH = NMR pulzus-szekvencia, ami a következő atomokat gerjeszti: karbonil-szén-alfa-szén-béta-szén-amid-nitrogén.

cbz-Gly-Pro-Arg-pNA = **carb**benzoxy- Gly-Pro-Arg-**para**nitroanilid, szerin proteázok fotometriás peptid szubsztrátja, a felszabaduló paranitroanilin 405 nm-en detektálható.

DMSO = **dimethylsulfoxide**, dimetilszulfoxid, oldatok fagyasztásakor vízkristályok képződésének megakadályozására, és hidrofób oldószerként használják.

dsDNS = „double stranded” **de**zoxiribonukleinsav, duplaszálú DNS

ssDNS = „single stranded” **de**zoxiribonukleinsav, egyszálú DNS

cDNS = „copy” DNS, mRNS-ről készített **de**zoxiribonukleinsav

dNTP = **de**zoxinucleotid**etri**phosphate, DNS szintézishez szükséges nukleotidok keveréke

E. coli BL21 DE3 pLysS = olyan *Escherichia coli* törzs, ami fehérje expresszió céljából lett létrehozva. A baktériumok genomjába egy lac promóter mögé bevitték a T7 RNS polimeráz génjét, amit szelektíven IPTG-vel lehet indukálni. Az így kifejeződő T7 RNS polimeráz specifikusan felismeri a saját promóter régióját. Az expresszálni kívánt fehérjét egy olyan plazmidba klónozzák, ami a T7 RNS polimeráz promóter régióját tartalmazza. Cam^R törzs.

E. coli K12 CJ236 = olyan *Escherichia coli* törzs, ami a *duf⁻*, *ung⁻* genotípusnak köszönhetően dUTPáz és uracil N-glikoziláz enzimeket nem tartalmaz, ezért uracilt épít be timin helyett a DNS-be. A Kunkel mutagenézishoz szükséges egyszálú DNS előállítására alkalmas ez a törzs. Cam^R törzs.

E. coli SS320 = olyan *Escherichia coli* törzs, amit az XL1Blue és az MC1061 törzsből hoztak létre, ezért egyszerre rendelkezik F pilussal, ezért M13 KO7 bakteriofággal fertőzhető (XL1Blue tulajdonság) és nagyhatékonysággal elektroporálható (MC1061 sajátja). Str^R és Tet^R törzs.

E. coli XL1Blue = olyan *Escherichia coli* törzs, F pilussal rendelkezik, ezért M13 KO7 bakteriofággal fertőzhető és plazmid DNS felszaporítására alkalmas törzs. Tet^R

EDTA = **etiléndiamin-tetraacetic acid**, etiléndiamin-tetraecetsav, kelátor, oldatban jelenlévő fémionokat köti meg.

eglin-c = piócában előforduló katepszin inhibitor.

ELISA = **Enzyme Linked Immuno Surface Assay**, enzimhez kapcsolt felszínen végzett immunvizsgálat

fágmid = olyan plazmid konstrukció, ami egyszerre tartalmaz bakteriális és fág replikációs origót is. Egy ilyen konstrukció baktérium sejtekben plazmidként tartható fent, fágként csak helper fággal együtt lehet szaporítani. A helper fág biztosítja a fágmid fágyszerű replikációjához, és fág részecsképe pakolódáshoz szükséges fehérjék génjeit.

g = a földi gravitációs potenciál jele. A centrifugális gyorsítópotenciál gyakori mértékegysége.

G3-as szűrő = 40-100 µm pórus átmérővel rendelkező üvegszűrő.

HEPES = 4-(2-**hydroxyethyl**)-1-**piperazineethanesulfonic acid**, pH = 7.0 körül használt puffer
hGH = **human growth hormone**, humán növekedési hormon

HNCA = pulzusszekvencia, ami során szelektíven az amid hidrogénen és az alfa szénen történik a besugárzás

HNCOCA = pulzusszekvencia, ami során szelektíven az amid hidrogénen, a karbonil szénen és az alfa szénen történik a besugárzás

HNCACB = pulzusszekvencia, ami során szelektíven az amid hidrogénen, az alfa szénen és béta szénen történik a besugárzás

HPLC-ESI-MS = **H**igh **P**ressure **L**iquid **C**hromatography-**E**lectrospray-**M**ass Spectrometry,

HSQC = **H**eteronuclear **S**ingle **Q**uantum **C**orrelation, kétdimenziós spektrumot eredményező pulzus szekvencia

IA3 = saccharopepsin inhibitor, élesztőben előforduló pepszin inhibitor

IAP = **i**nhibitor of **a**poptosis, apoptózist gátló inhibitor, virális fehérje

IC = **i**nhibitor **C**arboxypeptidase **Y** (CPY), carboxipeptidáz Y inhibitor, élesztő fehérje

IPTG = **i**sopropyl-beta-D-**t**hiogalactopyranoside, laktóz analóg bakteriális fehérje expressziót indít be a *lac* operonon keresztül.

IUPAC = **I**nternational **U**nion of **P**ure and **A**ppplied **C**hemistry, Nemzetközi Alkalmazott és Elméleti Kémiai Egyesület

K_i = inhibíciós egyensúlyi állandó

Kan^R = **k**anamycin **r**esistance, kanamicin rezisztenciával rendelkező baktérium genotípusa,

KCM puffer = **K**alium **C**alcium **M**agnesium puffer, kémiai transzformáláshoz használt puffer

kV = **k**ilo**V**olt, elektromos feszültség mértékegysége

LB táptalaj= **L**uria-**B**ertani táptalaj, bakteriális táptalaj, melynek összetétele: 10 g bacto tryptone, 5 g bacto élesztő kivonat, 10 g NaCl, pH = 7.0 / 1 l desztillált víz

LCI = **l**eech **c**arboxypeptidase **i**nhibitor, pióca karboxipeptidáz inhibitor

LMCI -# = *Locusta migratoria* chymotrypsin inhibitor-#, vándorsáska fajból izolált kimotripszin inhibitorok

M13KO7 Helper Fág = olyan fág ami tartalmazza a fágként szaporodásához szükséges összes fehérje génjét, azonban a replikációs origója a normálisnál rosszabb hatásfokú. Ezért amikor ugyanabban a coli sejtben egyszerre M13KO7 és normális fág-replikációs origót tartalmazó fágmid vektorok is van jelen, akkor ez utóbbi termelődése a gyorsabb. Ezért a sejtet elhagyó fágreszecskek zömében a fágmid DNS lesz jelen.

MEROPS adatbázis = peptidázokat és azok inhibitorait rendszerező elektronikus adatbázis. Weblapja: www.merops.sanger.ac.uk

MES = 2-(N-**m**orpholino)ethanesulfonic acid, pH = 6.0 körül használt puffer.

MUB = 4-**m**ethylumbelliferon, fluoreszkáló anyag, lásd aktívhelytitrálás

MUGB = **m**ethylumbelliferyl-p-**g**uanidinobenzoate hydrochloride, tripszin szubsztrát analóg, az acilenzim komplex kialakulását követően kovalensen kötve marad az enzimen, a fluorimetrián aktív MUB felszabadul, ezen keresztül detektálható a folyamat.

MUTMAC = 4-**m**ethylumbelliferoyl. p-**t**rimethylammonium **c**innamate chloride, kimotripszin szubsztrát, ami az acilenzim komplex kialakulását követően kovalensen kötve marad az enzimen, a fluorimetrián aktív MUB felszabadul, ezen keresztül detektálható a folyamat.

NMR = **N**ucler **M**agnetic **R**esonance, mag-mágneses rezonancia

NMR PIPE = **N**ucler **M**agnetic **R**esonance spektrumot processzáló és analizáló szoftver

NOE = **N**uclear **O**verhauser **E**ffect, atommagok közt fellépő Overhauser effektus

NOESY = **N**uclear **O**verhauser **E**ffect **S**pectroscopy, atommagok közt fellépő Overhauser effektuson alapuló NMR spektroszkópai módszer.

NOESY-HSQC = **N**uclear **O**verhauser **E**ffect Spectroscopy - **H**eteronuclear **S**ingle **Q**uantum **C**orrelation, az említett kétféle pulzus szekvenciát alkalmazó mérés

OD_{xnm} = **O**ptical **D**ensity **xnm**, adott hullámhosszon (x) mért optikai denzitás, (abszorbancia, vagy extinkció) jele

Oligo-dT = csupa dezoxitimin monomerből szintetikus oligonukleotid, ami az mRNS poliA 3' végére specifikus, mRNS cDNS-re történő átírásához primerként szokták használni.

pIII = protein 3, 3-as számú fehérje, M13 fonalas fág burokfehérjeje, amiből fágonként 5 helyezkedik el a fág végén. A fág a baktériumba való bejutáskor ezzel a fehérjéjével kapcsolódik a baktérium pilusának felszínéhez.

pVIII= protein 8, 8-as számú fehérje, M13 fonalas fág fő burokfehérjeje, amiből fágonként 2000-3000 darab van.

p35 = 35 kDa protein, baculovírusban előforduló 35 kDa-os fehérje, ami a vírus túlélését biztosítja a vírusherzélés hatására apoptózisra ítélt sejtekben, kaspáz inhibitor aktivitással bír.

PBS = **p**hosphate **b**uffer **s**aline, NaCl tartalmú foszfát puffer pH = 7.5 körül használják.

PCI = **p**otato **m**etallo**c**arboxypeptidase **i**nhibitor

PCR = **p**olimerase **c**hain **r**eaction, polimeráz láncreakció, adott DNS szakasz in vitro felszaporítására használt folyamat, mára a legelterjedtebb DNS manipulációs technika.

PDB ID = **P**rotein **D**ata **B**ank **I**d, fehérje adatbank azonosító

pET-17b = **p**lasmid **E**xpression **T**7, bakteriális, citoplazmatikus fehérje expressziót biztosító plazmid konstrukció.

PEG = **P**oly**E**thylene **G**licol, polietilén glikol, különböző méreteken létező, hidrófil polimer. Adalékanyag, ami megnöveli a vele együtt oldatban lévő anyagok látszólagos koncentrációját, mivel oldódásakor tetemes mennyiségű vizet von el a hidrátkurkához.

PLD = **P**acifastin **L**ike **D**omain, *Pacifastacus leminisculus* rák fajban leírt fehérje (pacifastin) doménjéhez hasonló egyéb fehérjék, illetve fehérje részek.

PMP-C; -D2 = **P**ars intercerebellaris **m**ajor **p**eptide-**C** / -D2, *Locusta migratoria* sáskafajból izolált szerin proteáz inhibitorok első elnevezése szöveti előfordulásuk alapján. A későbbiekben a faj és genus elnevezése alapján LMPI-1;-2 lett a nevük.

polyA = poly adenin, mRNS 3' végére jellemző csupa adeninből álló szekvencia rész.

Pot-# = **p**otato inhibitor - #, burgonyában megtalálható proteáz inhibitor

proSAAS = proprotein convertase subtilisin/kexin type 1 inhibitor

pS1602a = Genentech cégben kifejlesztett fágmid vektor, a humán növekedési hormon génjét tartalmazza egy olyan konstrukcióban, amiben a fehérje a pIII-as fehérje N-terminálisához kapcsolódik egy szerin-glicin linkerén keresztül.

pS1607 = Genentech cégben kifejlesztett fágmid vektor, a humán növekedési hormon génjét tartalmazza egy olyan konstrukcióban, amiben a fehérje a pVIII-as fehérje N-terminálisához kapcsolódik egy szerin-glicin linkerén keresztül.

PSI = **p**ound per **s**quare **i**nch, font per négyzet inch, a nyomás angolszász mértékegység

PVDF = **P**olyvinylidene **F**luoride, fehérjeszekvenálást megelőző elektroblottolás esetén használt membrán alapanyaga.

R1 = spin-mátrix relaxációs sebességi együtthatója

R2= spin-spin relaxációs sebességi együtthatója

RP-HPLC = **R**everse **P**hase-**H**igh **P**reassure **L**iquid **C**hromatography, fordított fázisú, nagy nyomású folyadék kromatográfia

Rex = kémiai kicserélődési állandó

RNS, mRNS = **r**ibonukleinsav, „**m**essenger” **r**ibonukleinsav, hírvivő ribonukleinsav, DNS-ről átíródó RNS molekula, ami a fehérje szekvenciáját kódolja.

rpm = **r**evolutions **p**er **m**inute, fordulatszám per perc, mindig az adott rotorra vonatkozik, át kell számolni relatív centrifugális erőre, azaz rcf-re

S² = általános rendparaméter

Sepharose-4B = affinitás kromatográfiában használatos, aktivált aldehid csoportokat hordozó agaróz gyöngyök

SERPIN = **S**erine **P**rotease **I**nhibitor, irreverzibilis módon működő szerin proteáz inhibitorok

SGIL-# = *Schistocerca gregaria* inhibitor library-#

SGPI-# = *Schistocerca gregaria* PLD-like Inhibitor-#,

SGPI-PO-# = *Schistocerca gregaria* PLD-like Inhibitor-Phage Optimized-#,

SMI = *Streptomyces* metallopeptidase inhibitor

SSI = *Streptomyces* subtilisin inhibitor

Str^R = streptomycin resistance, streptomycin rezisztenciát hordozó baktérium genotípusa

Superbroth = tápanyagban gazdag baktérium táptalaj, amit *E. coli* SS320 kompetens sejtek készítésénél használtunk. Összetétele egy literre: 32 g tryptone + 20 g élesztő kivonat + 5 g NaCl + 1.5 ml 4 N NaOH

T1 = spin-mátrix relaxációs idő

T2 = spin-spin relaxációs idő

T4 DNS ligase = T4 bakteriofág DNS ligáza, ez az enzim képes szabad DNS végeket ATP segítségével összekötni.

T4 polynucleotid kinase = T4 bakteriofág polynucleotide 5'-hydroxyl kináz, dsDNS, ssDNS és RNS szabad 5' hidroxil csoportját foszforilálja ATP segítségével.

T7 DNS polimerase = T7 bakteriofág nagy processzivitással rendelkező DNS polimeráza amelynek 3'-5' exonukleáz aktivitása is van.

TAP = tick anticoagulant peptide, kullancsból származó véralvadást gátló peptid

Tet^R = tetracilin resistance, tetraciklin rezisztenciáért felelős gént hordozó baktérium genotípusa

TFA = Tri-Fluor-Aceticacid, trifluor ecetsav, HPLC kromatográfiában általában ez az egyik elúciós oldat

TMB = 5.5'-**t**etramethyl**b**enzidine, tormaperoxidáz fotometriásan aktív szubsztrátja, a felszabaduló termék kék jelet ad, ami 360 nm és 650 nm-en detektálható. A reakciót sósavval lehet leállítani, a szubsztrát színe így sárga lesz, amit 450 nm-en lehet detektálni.

TOCSY = **T**otal **C**orrelated **S**pectroscopy, teljes korrelációs spektroszkópia

Tris = **tr**ishydroxymethylaminomethane, (HOCH₂)₃CNH₂, puffer, ami pH = 7.5- pH = 8.5 közt használatos.

Triton-X100 = nemionos detergens

Trypton = bakteriális és élesztő táptalajok összetevője, fehérjékből tripszinnel előállított peptideket tartalmazó tápanyag.

TSB = **T**ris **S**aline **B**uffer, Tris bázist és NaCl-ot tartalmazó puffer, pH7.5 - pH8.5 között használják.

Tween-20 = nemionos detergens

YIB = **y**east **i**nhibitor proteinase **B**, élesztő proteáz B inhibitor

X-EASY = NMR spektrumokat processzáló szoftver

Megjegyzések:

Az aminosavak rövidítései:

A fehérjét alkotó húsz féle aminosav IUPAC szerinti rövidítése közismert, ezért itt nem szerepel. A dolgozatban hárombetűs és egybetűs rövidítések is szerepelnek, az aminosav szekvenciákban az egybetűs kódot használtam.

A degenerált bázisok IUPAC szerinti elnevezése a következők:

R = A or G	K = G or T	S = G or C
Y = C or T	M = A or C	W = A or T
B = not A (C, G or T)	H = not G (A, C or T)	N = any nucleotide
D = not C (A, G or T)	V = not T (A, C or G)	

Az 1.2.2./1. ábrán felsorolt szekvenciák elnevezése a következő szabályt követi: **Genus Species** **PLD-like Inhibitor-#** abban az esetben, ha már ismert az inhibitor célmolekulája, ha még nem, akkor **Genus Species** **PLD-like Domain-#**. A felsorolásban szereplő fajok pedig a következők:

Anopheles gambiae = AG; *Bombyx mori* = BM; *Cicindela campestris* = CC; *Ctenocephalides felis* = CF; *Locusta migratoria* = LG; *Meladema coriacea* = MC; *Manduca sexta* = MS; *Oryza sativa* = OS; *Pacifastacus leniusculus* = PL; *Pyrocoelia rufa* = PR; *Schistocerca gregaria* = SG;

IRODALOMJEGYZÉK

Bartels C., Xia T-H., Billeter M., Günther P. Z & Wütrich K. (1995): The program XEASY for computer-supported NMR spectral analysis of biological macromolecules. *J Biomol NMR* **5**, 1-10.

Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L. (2002): Biochemisrty (5. edition) p236. W.H. Freeman and Company, New York

Bode W, Huber R. (1992): Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur J Biochem.* **204**:433-51.

Bode W, Huber R. (2000): Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. *Biochim Biophys Acta.* **1477**:241-52.

Boigegrain RA, Mattras H, Brehelin M, Paroutaud P, Coletti-Previero MA. (1992): Insect immunity: two proteinase inhibitors from hemolymph of *Locusta migratoria*. *Biochem Biophys Res Commun.* **189**:790-3.

Boigegrain RA, Pugniere M, Paroutaud P, Castro B, Brehelin M. (2000): Low molecular weight serine protease inhibitors from insects are proteins with highly conserved sequences. *Insect Biochem Mol Biol.* **30**:145-52.

Brehelin M, Boigegrain RA, Drif L, Coletti-Previero MA. (1991): Purification of a protease inhibitor which controls prophenoloxidase activation in hemolymph of *Locusta migratoria* (insecta). *Biochem Biophys Res Commun.* **179**:841-6.

Canaff L, Bennett HP, Hendy GN. (1999): Peptide hormone precursor processing: getting sorted? *Mol Cell Endocrinol.* **156**:1-6.

Craik DJ, Daly NL, Wayne C. (2001): The cystine knot motif in toxins and implications for drug design. *Toxicon* **39**:43-60.

Farrow NA, Muhandiram R, Singer AU, Pascal SM, Kay CM, Gish G, Shoelson SE, Pawson T, Forman-Kay JD, Kay LE. (1994): Backbone dynamics of a free and phosphopeptide-complexed Src homology 2 domain studied by ¹⁵N NMR relaxation. *Biochemistry* **33**:5984-6003

Frederick A Fellouse, Gabor Pal (2005): Methods for the Construction of Phage-Displayed Libraries In: Sachdev S Sidhu (ed.) Phage Display in Biotechnology and Drug Discovery, Boca Raton, -:CRC Press - Taylor and Frances Group, 2005. pp. 111-142

Finkenzstadt WR, Laskowski M Jr. (1967) Resynthesis by trypsin of the cleaved peptide bond in modified soybean trypsin inhibitor. *J Biol Chem.* **242**:771-3.

Flinn JP, Pallaghy PK, Lew MJ, Murphy R, Angus JA, Norton RS. (1999): Role of disulfide bridges in the folding, structure and biological activity of omega-conotoxin GVIA. *Biochim Biophys Acta.* **1434**:177-90.

Fodor AA, Aldrich RW. (2004): Influence of conservation on calculations of amino acid covariance in multiple sequence alignments. *Proteins.* **56**:211-21.

- Fodor K, Harmat V, Hetenyi C, Kardos J, Antal J, Perczel A, Patthy A, Katona G, Graf L. (2005): Extended intermolecular interactions in a serine protease-canonical inhibitor complex account for strong and highly specific inhibition. *J Mol Biol.* **350**:156-69.
- Gaspari Z, Patthy A, Graf L, Perczel A. (2002): Comparative structure analysis of proteinase inhibitors from the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Eur J Biochem.* **269**:527-37.
- Gaspari Z, Ortutay C, Perczel A. (2004): A simple fold with variations: the pacifastin inhibitor family. *Bioinformatics.* **20**:448-51.
- Goddard TD & Kellner CD (2005) SPARKY 3. University of California, San Francisco.
- Hamdaoui A, Schoofs L, Wateleb S, Bosch LV, Verhaert P, Waelkens E, De Loof A. (1997): Purification of a novel, heat-stable serine protease inhibitor protein from ovaries of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Biochem Biophys Res Commun.* **238**:357-60.
- Hamdaoui A, Wataleb S, Devreese B, Chiou SJ, Vanden Broeck J, Van Beeumen J, De Loof A, Schoofs L. (1998): Purification and characterization of a group of five novel peptide serine protease inhibitors from ovaries of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *FEBS Lett.* **422**:74-8.
- Hergenhahn HG, Aspan A, Soderhall K. (1987): Purification and characterization of a high-Mr proteinase inhibitor of pro-phenol oxidase activation from crayfish plasma. *Biochem J.* **248**:223-8.
- Hou S, Maccarana M, Min TH, Strate I, Pera EM (2007): The secreted serine protease xHtrA1 stimulates long-range FGF signaling in the early *Xenopus* embryo. *Dev Cell.* **13**:226-41.
- Huntington JA. (2006): Shape-shifting serpins--advantages of a mobile mechanism. *Trends Biochem Sci.* **31**:427-35.
- Kanost MR. (1999): Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. *Dev Comp Immunol.* **23**:291-301.
- Kelly CA, Laskowski M Jr, Qasim MA. (2005): The role of scaffolding in standard mechanism serine proteinase inhibitors. *Protein Pept Lett.* **12**:465-71.
- Kellenberger C, Boudier C, Bermudez I, Bieth JG, Luu B, Hietter H. (1995): Serine protease inhibition by insect peptides containing a cysteine knot and a triple-stranded beta-sheet. *J Biol Chem.* **270**:25514-9.
- Kellenberger C, Roussel A. (2005): Structure-activity relationship within the serine protease inhibitors of the pacifastin family. *Protein Pept Lett.* **12**:409-14.
- Kromer E, Nakakura N, Lagueux M. (1994): Cloning of a *Locusta* cDNA encoding a precursor peptide for two structurally related proteinase inhibitors. *Insect Biochem Mol Biol.* **24**:329-31.
- Krowarsch D, Cierpicki T, Jelen F, Otlewski J. (2003): Canonical protein inhibitors of serine proteases. *Cell Mol Life Sci.* **60**:2427-44.
- Kurth T, Ullmann D, Jakubke HD, Hedstrom L. (1997): Converting trypsin to chymotrypsin: structural determinants of S1' specificity. *Biochemistry.* **36**:10098-104.
- Laskowski M, Qasim MA. (2000): What can the structures of enzyme-inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme substrate complexes? *Biochim Biophys Acta.* **1477**:324-37.

Liang Z, Sottrup-Jensen L, Aspan A, Hall M, Soderhall K. (1997): Pacifastin, a novel 155-kDa heterodimeric proteinase inhibitor containing a unique transferrin chain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **94**:6682-7.

Lu SM, Lu W, Qasim MA, Anderson S, Apostol I, Ardelt W, Bigler T, Chiang YW, Cook J, James MN, Kato I, Kelly C, Kohr W, Komiyama T, Lin TY, Ogawa M, Otlewski J, Park SJ, Qasim S, Ranjbar M, Tashiro M, Warne N, Whatley H, Wieczorek A, Wieczorek M, Wilusz T, Wynn R, Zhang W, Laskowski M Jr. (2001): Predicting the reactivity of proteins from their sequence alone: Kazal family of protein inhibitors of serine proteinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **98**:1410-5.

Malik Z, Amir S, Pal G, Buzas Z, Varallyay E, Antal J, Szilagyi Z, Vekey K, Asboth B, Patthy A, Graf L. (1999): Proteinase inhibitors from desert locust, *Schistocerca gregaria*: engineering of both P(1) and P(1)' residues converts a potent chymotrypsin inhibitor to a potent trypsin inhibitor. *Biochim Biophys Acta*. **1434**:143-50.

Manly B. J. F. (1997) Randomization, Bootstrap and Monte Carlo methods in Biology. 2nd edition, Chapman & Hall/CRC, BocaRaton, FL.

Medcalf RL. (2007): Fibrinolysis, inflammation, and regulation of the plasminogen activating system. *J Thromb Haemost*. **1**:132-42.

Mer G, Kellenberger C, Koehl P, Stote R, Sorokine O, Van Dorsselaer A, Luu B, Hietter H, Lefevre JF. (1994): Solution structure of PMP-D2, a 35-residue peptide isolated from the insect *Locusta migratoria*. *Biochemistry*. **33**:15397-407.

Mer G, Hietter H, Lefevre JF. (1996a): Stabilization of proteins by glycosylation examined by NMR analysis of a fucosylated proteinase inhibitor. *Nat Struct Biol*. **3**:45-53.

Mer G, Hietter H, Kellenberger C, Renatus M, Luu B, Lefevre JF. (1996b): Solution structure of PMP-C: a new fold in the group of small serine proteinase inhibitors. *J Mol Biol*. **258**:158-71.

Nakakura N, Hietter H, Van Dorsselaer A, Luu B. (1992): Isolation and structural determination of three peptides from the insect *Locusta migratoria*. Identification of a deoxyhexose-linked peptide. *Eur J Biochem*. **204**:147-53.

Niekamp CW, Hixson HF Jr, Laskowski M Jr. (1969): Peptide-bod hydrolysis equilibria in native proteins. Conversion of virgin into modified soybean trypsin inhibitor. *Biochemistry*. **8**:16-22.

Otlewski J, Jelen F, Zakrzewska M, Oleksy A. (2005): The many faces of protease-protein inhibitor interaction. *EMBO J*. **24**:1303-10.

Nonaka M, Yoshizaki F. (2004): Evolution of the complement system. *Mol Immunol*. **40**:897-902.

Norton RS, Pallaghy PK. The cystine knot structure of ion channel toxins and related polypeptides. *Toxicon*. 1998 Nov;36(11):1573-83.

Patthy A, Amir S, Malik Z, Bodi A, Kardos J, Asboth B, Graf L. (2002): Remarkable phylum selectivity of a *Schistocerca gregaria* trypsin inhibitor: the possible role of enzyme-inhibitor flexibility. *Arch Biochem Biophys*. **398**:179-87.

Rahman MM, Bosch LV, Baggerman G, Clynen E, Hens K, Hoste B, Meylaers K, Vercammen T, Schoofs L, De Loof A, Breuer M. (2002): Search for peptidic molecular markers in hemolymph of crowd-(gregarious) and isolated-reared (solitary) desert locusts, *Schistocerca gregaria*. *Peptides* **23**:1907-14.

Rau JC, Beaulieu LM, Huntington JA, (2007): Church FC. Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis. *J Thromb Haemost.* **1**:102-15.

Rawlings ND, Tolle DP, Barrett AJ. (2004): Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem J.* **378**:705-16.

Rawlings ND, Morton FR, Barrett AJ. (2006): MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* **34**:D270-2.

Roussel A, Mathieu M, Dobbs A, Luu B, Cambillau C, Kellenberger C. (2001): Complexation of two proteic insect inhibitors to the active site of chymotrypsin suggests decoupled roles for binding and selectivity. *J Biol Chem.* **276**:38893-8.

SaevyBR, Farr EA, Wesler WM, Markley JL, (1991) A relation database for sequence-specific NMR protein data. *J Biomol NMR* **1**: 217-136.

Schechter I, Berger A. (1967): On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun.* **27**:157-62.

Schoofs L, Veelaert D, Vanden Broeck J, De Loof A. (1997): Peptides in the locusts, *Locusta migratoria* and *Schistocerca gregaria*. *Peptides* **18**:145-56.

Seidah NG, Chretien M. (1997): Eukaryotic protein processing: endoproteolysis of precursor proteins. *Curr Opin Biotechnol.* **8**:602-7.

Sidhu SS, Weiss GA, Wells JA. (2000a): High copy display of large proteins on phage for functional selections. *J Mol Biol.* **296**:487-95.

Sidhu S.S., Lowman H.B., Cunningham B.C., and Wells J.A. (2000b): Phage display for selection of novel binding peptides. *Methods Enzymol.* **328**: 333–363.

Silverman GA, Bird PI, Carrell RW, Church FC, Coughlin PB, Gettins PG, Irving JA, Lomas DA, Luke CJ, Moyer RW, Pemberton PA, Remold-O'Donnell E, Salvesen GS, Travis J, Whisstock JC. (2001): The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J Biol Chem.* **276**:33293-6.

Simonet G, Claeys I, Broeck JV. (2002a): Structural and functional properties of a novel serine protease inhibiting peptide family in arthropods. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* **132**:247-55.

Simonet G, Claeys I, Vanderperren H, November T, De Loof A, Vanden Broeck J. (2002b): cDNA cloning of two different serine protease inhibitor precursors in the migratory locust, *Locusta migratoria*. *Insect Mol Biol.* **11**:249-56.

Simonet G, Claeys I, November T, Wataleb S, Janssen T, Maes R, De Loof A, Vanden Broeck J. (2002c): Cloning of two cDNAs encoding isoforms of a pacifastin-related precursor polypeptide in the desert locust, *Schistocerca gregaria*: analysis of stage- and tissue-dependent expression. *Insect Mol Biol.* **11**:353-60.

Simonet G, Claeys I, Franssens V, De Loof A, Broeck JV. (2003): Genomics, evolution and biological functions of the pacifastin peptide family: a conserved serine protease inhibitor family in arthropods. *Peptides* **24**:1633-44.

Simonet G, Claeys I, Van Soest S, Breugelmans B, Franssens V, De Loof A, Vanden Broeck J. (2004): Molecular identification of SGPP-5, a novel pacifastin-like peptide precursor in the desert locust. *Peptides* **25**:941-50.

Simonet G, Breugelmans B, Proost P, Claeys I, Van Damme J, De Loof A, Vanden Broeck J. (2005): Characterization of two novel pacifastin-like peptide precursor isoforms in the desert locust (*Schistocerca gregaria*): cDNA cloning, functional analysis and real-time RT-PCR gene expression studies. *Biochem J.* **388**:281-9.

Thiemmara V, Pays L, Danty E, Jourdan F, Moyse E, Mehlen P. (2002): Serine protease inhibitor Spi2 mediated apoptosis of olfactory neurons. *Cell Death Differ.* **9**:1343-51.

Tripos Inc.(2001) SYBYL Molecular Modelling Package, Version 6.7. Tripos, St.Louise.

Vanden Broeck J, Chiou SJ, Schoofs L, Hamdaoui A, Vandenbussche F, Simonet G, Wataleb S, De Loof A. (1998): Cloning of two cDNAs encoding three small serine protease inhibiting peptides from the desert locust *Schistocerca gregaria* and analysis of tissue-dependent and stage-dependent expression. *Eur J Biochem.* **254**:90-5.

Wallis R. (2007): Interactions between mannose-binding lectin and MASPs during complement activation by the lectin pathway. *Immunobiology.* **212**:289-99.

Wen L, Lee I, Chen G, Huang JK, Gong Y, Krishnamoorthi R. (1995): Changing the inhibitory specificity and function of *Cucurbita maxima* trypsin inhibitor-V by site-directed mutagenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* **207**:897-902.

SUMMARY

SGPI-1 and SGPI-2 are small, single domain proteins of 35 residues isolated from the haemolymph of the desert locust *Schistocerca gregaria*. The two proteins are homologous having 50% sequence identity. SGPI-1 and SGPI-2 share the same disulfide topology, same overall structure and their main chains are almost superimposable. On the other hand, the composition of their hydrophobic core is different. SGPI-1 has a K10-W26 pair as core residues, while SGPI-2 has an F10-A26 pair.

In terms of function, both are reversible serine protease inhibitors. Such inhibitors bind to the protease like a protein substrate. However, while normal protein substrates decompose to smaller peptides upon protease action, reversible inhibitors do not. These inhibitors have a single cleavable site for the inhibited protease, but the cleavage at this site does not go to completion. Instead, it results in a thermodynamic equilibrium between the intact and the cleaved inhibitor forms. Both the intact and the cleaved inhibitors are functional and form a well-defined complex with the enzyme.

Inhibitors acting through this mechanism have a rigid surface loop, the reactive site, which binds to the protease. This loop has a canonical conformation therefore these inhibitors are called canonical inhibitors. The loop is cleaved by the protease between the P1 and P1' residues, the P1 being the one which occupies the substrate binding cavity of the enzyme. In case of inhibitors of the S1 protease clan, the nature of the P1 is a key determinant of specificity. Inhibitors having Arg or Lys P1 residue inhibit trypsin-like enzymes, while those having a hydrophobic P1 are chymotrypsin inhibitors.

Canonical inhibitors have been thought to bind to their cognate protease through a simple “lock and key” mechanism that does not involve structural rearrangements or adaptations. Based on this paradigm Laskowski and his coworkers suggested a few simple rules that should apply for all canonical inhibitors. One rule is that individual canonical loop residues act independently, therefore their contribution to the overall binding energy is additive. The second important rule is that the scaffold of the inhibitor plays a passive role in the inhibition. Its only function is to provide rigidity to the canonical loop. The third rule, which is called “interscaffolding additivity”, combines the previous two. It states that *identical residues at identical positions on two canonical loops carried by two different scaffolds will have the same contribution to the binding energy when inhibiting the same enzyme*. With other words, swapping two canonical loops will swap the activities as well. Thus, rules learned by studying

the canonical loop of one inhibitor can be readily applied to another inhibitor that has a different scaffold.

It turned out that the two very similar inhibitors, SGPI-1 and SGPI-2 do not comply to Laskowski's interscaffolding additivity rule. While SGPI-2 is a "well behaving" inhibitor, SGPI-1 has unusual properties. SGPI-1 has an Arg as P1 position so it should be a good trypsin inhibitor. However, it is almost inactive on mammalian trypsins. On the other hand it is an excellent inhibitor of arthropod trypsins. Thus, SGPI-1 is phylum-specific. When loop residues from SGPI-1 are grafted onto SGPI-2, the mutant SGPI-2 becomes a great mammalian trypsin inhibitor, with no sign of phylum specificity. Lack of interscaffolding additivity despite of almost identical scaffolds was a mystery.

In my PhD work I aimed to decipher the causes of the enigmatic non-canonical behavior of SGPI-1. With using NMR spectroscopy I found that SGPI-1 appears to be in more than one conformation even when it is in complex with the arthropod trypsin. With SGPI-2 I found that upon binding to its target enzyme many residues far from the canonical change their structural and dynamic properties. These findings suggest that these inhibitors might not work through a simple key and lock mechanism.

By using a directed evolutionary method, phage display, I could produce all the possible chimeras of the SGPI-1/SGPI-2 proteins. By selecting this pool on immobilized proteases, I could pinpoint the cause of phylum specificity of SGPI-1. It is the combination of its K10-W26 core and a proline-containing surface loop. The core orients this rigid loop in an orientation that is detrimental for binding to mammalian trypsin. This finding was verified through kinetic analyses of designed mutants of SGPI-1. Thus, in the case of SGPI-1 the composition of the core has a profound effect on the functional properties of the inhibitor. To our knowledge this is the first case when the core of a reversible inhibitor was shown to play such an active role. It suggests that special care should be taken when one predicts functional properties of a reversible inhibitor solely based on the sequence of the canonical loop – a common procedure in the era of the genome projects.

ÖSSZEFOGLALÓ

Az SGPI-1 és az SGPI-2 kisméretű (35 aminosavas), egy doménes fehérjék, amiket a *Schistocerca gregaria* vándorsáska hemolimfájából izoláltak. A két fehérje egymással homológ, fehérje szekvenciájuk 50 %-ban azonos. A disszulfidhidak elrendeződése, harmadlagos szerkezetük topológiája, és a peptid gerincük lefutása szinte teljesen megegyezik. Ezzel szemben a két molekula hidrofób magja eltérő, az SGPI-1-ben a K10-W26, az SGPI-2-ben az F10-A26 alkotja ezt a „minimalista” magot.

Aktivitását tekintve mindkét fehérje reverzibilis szerin proteáz inhibitor. Az ebbe a csoportba tartozó inhibitorok a szubsztráthoz hasonló módon kötnek a proteázhoz. Míg a szubsztrát fehérjék kisebb fehérje fragmentumokra esnek szét a proteolitikus hasítás eredményeként, addig a reverzibilis inhibitorok nem. Ebben az esetben, termodinamikai egyensúly áll be az ép és a hasított inhibitor formák közt. Mind az ép, mind a hasított inhibitorforma aktív és jól definiált komplexet alakít ki az enzimmal.

Az ezzel a mechanizmussal működő inhibitorok egy merev felszíni hurokkal, a reaktív hurokkal, rendelkeznek, amivel a proteázhoz kötnek. Ez a hurok kanonikus szerkezettel bír, ezért kanonikus inhibitoroknak szokták az ilyen inhibitorokat nevezni. A hurkot az enzim a P1 és P1' oldalláncok közt hasítja el, a P1 oldallánc az, amelyik az enzim szubsztrát kötő zsebébe köt. Az S1 proteázok estében a P1 kulcsfontosságú szereppel bír az enzim specifikitását illetően. Az Arg vagy Lys P1 csoporttal rendelkező molekulák a tripszinszerű proteázokat, míg a hidrofób csoporttal rendelkezők a kimotripszinszerűeket gátolják.

A kanonikus inhibitorok a mai felfogás alapján a „kulcs-zár” modell szerint kötődnek a cél proteázukhoz, a folyamat során nincs szükség szerkezeti átrendeződésre a molekulákban. Ennek a paradigmának a nyomán Laskowski és munkatársai pár egyszerű szabályt állítottak fel a kanonikus inhibitorok működését illetően. Az első szabály szerint a kanonikus hurok oldalláncai egymástól függetlenül hatnak kölcsön a proteázzal, így a kötési energiához való hozzájárulásuk összeadódik. A második fontos szabály szerint az inhibitor szerkezete passzív módon vesz részt a gátlásban. Egyetlen szerepe a gátlásban az, hogy a kanonikus hurok merevségét biztosítja. A harmadik szabály, az „interscaffolding additivity”, tehát a vázszerkezetek közötti független összeadhatóság az első két szabályt ötvözi. Azt állítja, hogy azonos oldalláncok, azonos kanonikus hurok pozíciókban de két különböző vázszerkezeten elhelyezkedve ugyanolyan módon fognak hozzájárulni a kötési energiához ugyanazon enzim gátlása során. Más szóval, a kanonikus hurkok felcserélése két vázszerkezet között az

aktivitás felcserélését eredményezi. Az egyik inhibitor működésére vonatkozó szabályok tehát igazak lesznek a másik működésére is.

Korábbi kísérletek során kiderült, hogy a két nagyon hasonló szekvenciájú és térszerkezetű SGPI-1 és SGPI-2 nem követi a vázszerkezetek közötti független összeadhatóság Laskowski-féle szabályát. Míg az SGPI-2 „normálisan viselkedő” inhibitor, addig az SGPI-1 nem. Az SGPI-1-ben a P1-es pozícióban Arg van, és eszerint tripszin inhibitor kell, hogy legyen. Az emlősökből származó tripszineket mégis alig gátolja. Ugyanakkor remek inhibitora az ízeltlábúakból izolált enzimeknek. Az SGPI-1 tehát törzs-specifikus. Amikor az SGPI-1 kanonikus hurok régióját áthelyezték az SGPI-2-es molekulára, akkor ez utóbbi hatékony emlős tripszin inhibitornak bizonyult. Az „interscaffolding” additivitás hiánya a szinte teljesen megegyező szerkezet fényében rejtélyes volt.

A PhD munkám célja az SGPI-1 rejtélyes, nem kanonikus viselkedésének feltárása volt. NMR spektroszkópiai méréseim arra utaltak, hogy az SGPI-1 több konformációban fordul elő az ízeltlábú tripszin gátlása során még a komplexben is. Az SGPI-2-ben a kimotripszin kötése során a kanonikus huroktól távol is jelentősen megváltozott az egyes pozíciók dinamikai tulajdonsága. Ezen eredmények alapján arra a következtetésre jutottam, hogy a két inhibitor nem a „kulcs-zár” mechanizmus alapján működik.

Egy irányított evolúciós megközelítést, a fágbemutatót alkalmazva előállítottam az SGPI-1/SGPI-2 összes lehetséges kiméra formáját. Proteázokon szelektálva a könyvtárt sikerült felfednem az SGPI-1 törzs-specifitásának az okát. Ez a K10-W26 mag és egy prolintartalmú hurok együttes megléte a molekulában. A hidrofób mag olyan konformációba hozza ezt a merev hurkot, hogy az akadályozza az emlős enzimhez való kötődést. Ezt a felismerést célzottan tervezett SGPI-1 mutánsok kinetikai analízisével támasztottam alá. Az SGPI-1 esetében a mag tehát nagymértékben kihat a felszín viselkedésére, és meghatározó szerepe van az inhibitor specifitásának kialakításában. Mai ismereteink szerint ez az első olyan eset, ami azt mutatja, hogy egy reverzibilis inhibitor magjának ilyen aktív szerepe van az enzimgátlásban. Ez a felismerés egyben arra is felhívja a figyelmet, hogy rendkívül körültekintőnek kell lenni, amikor egy reverzibilis inhibitor esetében kizárólag a kanonikus hurok szekvenciájából vonnak le az inhibitor funkciójára vonatkozó következtetéseket. Márpedig a genom projektek korában ez egy gyakori eljárás.