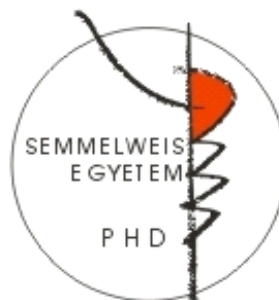


Szabályozó hatású emésztőenzimek a krónikus pankreatitisz patomechanizmusában

Doktori tézisek

Dr. Szmola Richárd

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Sahin-Tóth Miklós, egyetemi docens, PhD

Hivatalos bírálók: Dr. Rakonczay Zoltán, tudományos munkatárs, PhD

Dr. Varga Gábor, egyetemi tanár, PhD, DSc

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Enyedi Péter, egyetemi tanár, PhD, DSc

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Tretter László, egyetemi docens, PhD

Dr. Venekei István, egyetemi docens, PhD

Budapest
2007.

I. BEVEZETÉS

A krónikus pankreatitisz a hasnyálmirigy állományának fokozatos pusztulásával járó megbetegedés, amely elhúzódó lefolyása során a táplálék felszívódásának zavarához, valamint a cukorháztartás felborulásához vezet. A súlyos következményekkel járó kórkép hatékony megelőzésének és oki kezelésének módja a mai napig nem ismert. Mérföldkövet jelentett a pankreatitist okozó tényezők kutatásában, amikor a betegség genetikai hátterére derült fény *Whitcomb és mtsai.* munkája nyomán: a munkacsoport azonosított egy mutációt a humán kationos tripszinogént kódoló génben, amely örökletes pankreatitisz kialakulásához vezethet. Az örökletes pankreatitist gyermekkorban kezdődő, visszatérő akut pankreatitiszes epizódok jellemzik, amelyekből idővel a krónikus pankreatitisz kórképe alakul ki. A mutációt hordozó betegekben nagymértékben emelkedett a hasnyálmirigy karcinóma kialakulásának a kockázata is.

Állatkísérletes pankreatitisz modellekből régóta ismert, hogy a betegség kialakulásának egyik indító tényezője a tripszinogén korai aktiválódása tripszinné az acinus sejtekben. Ez a mechanizmus a humán betegségben még nem nyert közvetlen megerősítést, de tanulmányozására páratlan lehetőséget nyújt a genetikailag meghatározott pankreatitisz kutatása, ami a klasszikus örökletes típuson túl magába foglalja a betegség összes olyan formáját, amely a tripszinogén illetve a tripszin inhibitor gén mutációin alapszik. Biokémiai kutatások kimutatták, hogy a kationos tripszinogén génjének mutációi felborítják a proteáz–antiproteáz egyensúlyt a hasnyálmirigyben azáltal, hogy a kationos tripszinogén tripszinné való átalakulását segítik elő. A patológias körülmények között aktiválódott intrapancreaticus tripszin az emésztőenzimek aktivációs kaszkádját a hasnyálmirigyen belül indítja el, aminek szöveti önmérsztődés és következményes pankreatitisz az eredménye. A tripszin központi kóréletteni szerepét alátámasztják a tripszint gátló inhibitor génjének funkcióvesztéses mutációi is, amelyek a pankreatitisz kóroki tényezői lehetnek a védő hatású inhibitor mennyiségének csökkentése által.

A genetikailag meghatározott pankreatitisz patomechanizmusának megismerése új betekintést adott a krónikus pankreatitisz kórélettanába. A tripszin központi szerepe ebben a betegségben évtizedeken keresztül arra ösztönözte a kutatókat, hogy mélyebben vizsgálják a tripszin aktivitás hasnyálmirigyen belüli szabályozását.

II. CÉLKITŰZÉSEK

A hasnyálmirigyen belül aktiválódott nemkívánatos tripszin enzimatisz lebontása régóta feltételezett védőmechanizmus a krónikus pankreatitisz kialakulása ellen. Munkánk célja volt két hasnyálmirigy proteáz biokémiai jellemzése, továbbá lehetséges védő szerepük felderítése a hasnyálmirigy működésében.

A mezotripszin biokémiai jellemzése

A mezotripszin a humán hasnyálban található minor tripszin izoforma, amely különleges inhibitor rezisztenciája miatt került a figyelem középpontjába. A szokatlan rezisztencia hátterében a 198-as arginin szerepe sejthető. A rendelkezésünkre álló nagy mennyiségű struktúrális ismeret ellenére a gátlószer kontrollja alól felszabadult enzim biológiai funkciója rejtett maradt.

Fő céljaink a következők voltak:

1. Az Arg¹⁹⁸ szerepének vizsgálata a mezotripszin szokatlan inhibitor rezisztenciájának hátterében.
2. A mezotripszin szerepének vizsgálata az emésztőenzimek aktiválásában illetve lebontásában.
3. A mezotripszin biológiai és patológiai funkciójának feltárása.
4. A hasnyálmirigyen belüli mezotripszinogén aktiváció biokémiai alapjának megismerése.

A kimotripszin C biokémiai jellemzése

Előzetes megfigyeléseink alapján felmerült, hogy a kimotripszin C rendelkezik a Rinderknecht által leírt ismeretlen enzimatisz aktivitással (enzim Y), amely a hasnyálban található tripszin hatástalanításáért felelős a bélben. A kimotripszin C a nemkívánatos intrapancreatikus tripszin lebontása által fontos védelmi mechanizmus lehet a krónikus pankreatitisz kialakulása ellen.

Fő céljaink a következők voltak:

1. A kimotripszin C szerepének vizsgálata a humán kationos tripszin lebontásában.
2. A tripszin bontás Ca²⁺ koncentráció függésének vizsgálata.
3. A hasítási helyek meghatározása és a tripszin degradáció pontos mechanizmusának leírása.
4. Bizonyítani, hogy a kimotripszin C azonos az enzim Y-nal, a humán hasnyálból izolált eddig ismeretlen tripszin bontó aktivitással.

III. MÓDSZEREK

Az expressziós plazmidok készítése

Először az emésztőenzimek génjeit tartalmazó expressziós plazmidok elkészítésére került sor: az enzimek cDNS-ét polimeráz láncreakció segítségével amplifikáltuk és a pTrapT7 (tripszinogének) vagy a pcDNA3.1 (elasztázok és kimotripszinogének) plazmidba klónoztuk. A mutációkat a rekombináns gén irányított mutagenézisével vittük a fehérjékbe.

Az emésztő proenzimek termelése

A humán tripszinogén izoformákat *E. coli* Rosetta(DE3) törzsben termeltettük. A tenyészet centrifugálása után a zárványtesteket izoláltuk ultrahang kezelés segítségével, amit a fehérjék *in vitro* renaturálása követett. Az elasztázok és kimotripszinogének termelése humán embrionális vese sejtekben (HEK 293T) történt tranziens transzfekcióval, a sejtek a médiumba termelték a kívánt fehérjét.

Az emésztőenzimek tisztítása

A zimogéneket affinitás kromatográfia segítségével tisztítottuk, az oszlophoz kötött ekotin nevű inhibitor felhasználásával. Egyes fehérjéket hatékonyabban tisztítottunk ioncserélő és gélfiltrációs kromatográfias módszerek kombinálásával.

A proteázok aktivitásának meghatározása

Az enzimaktivitást szintetikus peptid szubsztrátokon mértük. A proteolitikus hasítás eredményeképpen sárga *p*-nitroanilin keletkezett, amelynek felszaporodását spektrofotométer segítségével követtük.

A fehérjék elektroforetikus elválasztása

A fehérjéket gélelektroforézissel tettük láthatóvá. Az elektroforetikus elválasztás redukáló Tris-glicin géleken történt. Az N-terminális aminosavak azonosítása céljából a mintákat szekvenáló membránokra transzferáltuk és N-terminális szekvenálásnak vetettük alá.

IV. EREDMÉNYEK

A mezotripszin inhibitor bontó aktivitása [I]

1. Az Arg¹⁹⁸ szerepének vizsgálatához a rekombináns gén irányított mutagenézisével a mezotripszinben a 198-as arginint glicinre cseréltük. Az így kapott R198G mezotripszin mutánst a szójabab tripszin inhibitor és a pankreatikus szekretoros tripszin inhibitor erősen gátolta. **Összefoglalva elmondhatjuk, hogy az Arg¹⁹⁸ oldallánc térbeli hatása miatt gátolja a tripszin inhibitorok kötődését a mezotripszinhez.**
2. A hasnyálmirigyben található zimogéneket (kimotripszinogén, proelasztáz, tripszinogén) a mezotripszin 500–1000-szer gyengébben aktiválta, mint a kationos illetve anionos tripszinek. **Kísérleteinkkel kizártuk a mezotripszin korábban feltételezett szerepét az emésztő zimogének hasnyálmirigyen belüli aktiválásában.**
3. A következőkben a kationos és anionos tripszinogén izoformák lebontását vizsgáltuk mezotripszin által. A két fő humán tripszinogén izoformát a mezotripszin gyengén bontotta, ezért **kijelenthetjük, hogy a mezotripszin általi emésztőenzim lebontás nem játszhat védő szerepet a hasnyálmirigy működésében.**
4. A mezotripszin gyorsan hasította a szójabab tripszin inhibitor ún. reaktív peptidkötését, valamint teljesen és irreverzibilisen bontotta a pankreatikus szekretoros tripszin inhibitor. **Az eredmények alapján feltételezhető, hogy a hasnyálmirigyen belül aktiválódott mezotripszinogén hozzájárulhat a pankreatitisz kialakulásához a védő funkciójú pankreatikus szekretoros tripszin inhibitor lebontása által.**
5. A patológiás aktivátor katepszin B erőteljesen aktiválta a mezotripszinogént, az aktiváció kezdeti sebessége számottevően magasabb volt a két másik izoformához viszonyítva. **A katepszin B a humán tripszinogén izoformák közül a mezotripszinogént aktiválta a leghatékonyabban, ezért a mezotripszin általi inhibitor bontás megindítója lehet.**

A kimotripszin C tripszint bontó aktivitása [II]

1. A humán kationos tripszint kimotripszin C-vel inkubálva pH 8,0-on és 37 °C-on, mikromoláris Ca^{2+} koncentrációk jelenlétében a tripszin aktivitás gyors eltűnését figyeltük meg. A tripszint bontó aktivitás kizárólag a kimotripszin C-re volt jellemző, a vizsgált egyéb elasztáz és kimotripszin izoformáknak nem volt ilyen aktivitása. A kimotripszin C tehát specifikusan bontja a tripszint, és ezáltal semlegesíti annak proteáz hatását. **Az eredmények alapján feltételezhető a kimotripszin C védő funkciója a hasnyálmirigyben a nemkívánatos tripszin inaktiválása által.**
2. A kimotripszin C általi tripszin lebontás első lépéseként a $\text{Leu}^{81}\text{-Glu}^{82}$ peptidkötés elhasad a Ca^{2+} -kötő hurokban, amelyet az $\text{Arg}^{122}\text{-Val}^{123}$ peptidkötés tripszin által történő hasítása követ. **A tripszin gyors lebomlásának mind a $\text{Leu}^{81}\text{-Glu}^{82}$ peptidkötés kimotriptikus, mind pedig az $\text{Arg}^{122}\text{-Val}^{123}$ peptidkötés triptikus hasadása előfeltétele.**
3. A Ca^{2+} koncentráció emelése fokozatosan gátolta a kationos tripszin kimotripszin C által történő lebontását, 1 mM Ca^{2+} koncentrációnál teljes gátlást figyeltünk meg. Kísérleteinkben igazoltuk, hogy az intakt kötőhely feltétele a Ca^{2+} általi stabilizálásnak. **Összefoglalva elmondhatjuk, hogy millimoláris Ca^{2+} koncentrációk gátolták a kimotripszin C által történő hasítást a 81-es leucin után a Ca^{2+} -kötő hurok stabilizálásával.**
4. A kimotripszin C nemcsak a kationos, hanem az anionos és a mezotripszin lebontására is képes, valamint a tripszinogén izoformákat is kiválóan inaktiválja. **Megfigyeléseink bizonyítják, hogy a kimotripszin C tulajdonképpen az ismeretlen tripszinogén bontó enzim Y. A Rinderknecht által izolált hasnyálmirigy frakciók kimotripszin C szennyezése megmagyarázza a megfigyelt tripszinogén lebontást.**

V. ÖSSZEFOGLALÁS

A genetikai és biokémiai eredmények az intrapancreatikus tripszinogén aktiválódás vagy a tripszin inaktiválódás közötti elhúzó aránytalanság fontosságát támasztják alá a krónikus pankreatitisz patomechanizmusában. A szakirodalom régóta tárgyalja a kórosan aktiválódott tripszin enzimátikus lebontását mint lehetséges védőmechanizmust a betegség kialakulása ellen. Az emberi szervezetben az inhibitor rezisztens mezotripszin volt az első jelölt erre a funkcióra. Később, egy a humán hasnyálmirigyben kimutatott enzimátikus aktivitás bizonyult hatékonynak a zimogének lebontásában, az ismeretlen aktivitást enzim Y-nak nevezték el. Munkánk célja két hasnyálmirigy proteáz, a mezotripszin és a kimotripszin C, biokémiai jellemzése volt, továbbá lehetséges védő szerepük felderítése a hasnyálmirigy működésében.

Eredményeink azt mutatják, hogy a mezotripszin defektív a humán tripszinogének lebontásában, emiatt kizárható a mezotripszin általi tripszin lebontás védő szerepe a hasnyálmirigy működésében. Ugyanakkor a mezotripszin a tripszin inhibitorok gyors lebontására képes, ezt a különleges enzimátikus aktivitást a mezotripszin-specifikus Arg¹⁹⁸ okozza. Megfigyeléseink alapján a mezotripszin fiziológias szerepe a táplálékban található tripszin inhibitorok emésztése. Patológias körülmények között, a mezotripszinogén korai aktiválódása esetén, az enzim hozzájárulhat a krónikus pankreatitisz kialakulásához a védő funkciójú pancreatikus szekretoros tripszin inhibitor lebontása által.

Továbbá elmondhatjuk, hogy a kimotripszin C az eddig tisztázatlan identitású enzim Y, amely a tripszinogén lebontására képes a humán hasnyálmirigyben. A kimotripszin C specifikusan inaktiválja az összes humán tripszin és tripszinogén izoformát, a Ca²⁺-kötő hurokban elhelyezkedő Leu⁸¹-Glu⁸² peptidkötés szelektív hasítása által. A kimotripszin C tehát egy eddig ismeretlen védő hatású tényező a krónikus pankreatitisz ellen, minthogy a hasnyálmirigyben belül aktiválódott tripszin lebontására képes.

VI. A DOLGOZAT TÉMÁJÁBAN MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK

Közlemények

- I. **Szmola R**, Kukor Z, Sahin-Toth M. (2003) Human mesotrypsin is a unique digestive protease specialized for the degradation of trypsin inhibitors. *J Biol Chem.* 278, 48580-48589. IF.: 6,482
- II. **Szmola R**, Sahin-Toth M. (2007) Chymotrypsin C (caldecrin) promotes degradation of human cationic trypsin: Identity with Rinderknecht's enzyme Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 11227-11232. IF.: 9,643

Absztraktok

Szmola R, Kukor Z, Sahin-Toth M. (2003) Cathepsin B preferentially activates mesotrypsinogen of the three human trypsinogen isoforms. *Pancreatology.* 3, 434.

Kukor Z, **Szmola R**, Sahin-Toth M. (2003) Human mesotrypsin rapidly degrades trypsin inhibitors. *Pancreatology.* 3, 434.

Szmola R, Kukor Z, Sahin-Toth M. (2003) The evolutionary G198R mutation is responsible for the inhibitor resistance and substrate restriction of human mesotrypsin. *Pancreatology.* 3, 433-434.

Szmola R, Sahin-Toth M. (2006) The hunt for the mysterious Enzyme Y: A progress report. *Pancreas.* 33 (4), 500.

Szmola R, Ozsvári B, Sahin-Toth M. (2007) Chymotrypsin C regulates degradation of human cationic trypsin. *Gastroenterology.* 132 (4), Suppl 2, A-31.

Szmola R, Ozsvári B, Sahin-Toth M. (2007) Chymotrypsin C (caldecrin) promotes degradation of human cationic trypsin. *Pancreatology.* 7, 290.