

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Virális- és gazdafehérjék szerepe, kölcsönhatása az I-es
típusú humán immundeficiencia vírus életciklusában**

Tóth Ferenc

Témavezető: Dr. Tózsér József



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2019

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	6
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	8
2.1 A retrovírusok	8
2.2. A retrovírusok életciklusa	10
2.3. A HIV-1 kapszid jellemzése	12
2.4. A HIV-1 PR jellemzése	14
2.5. A PR szerepe a HIV-1 fertőzés korai fázisában	17
2.6. Kapszidhoz kötődő gazdasejt fehérjék szerepe a HIV-1 fertőzés korai fázisában	19
3. CÉLKITŰZÉS	23
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	24
4.1. A mutációk szerkezetre kifejtett hatásának becslése	24
4.2. A rekombináns HIV-1 kapszid fehérje mutagenézise, expressziója és tisztítása ...	24
4.3. Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia	26
4.4. A rekombináns HIV-1 PR expressziója és tisztítása	26
4.5. A rekombináns CA fehérjék hasíthatóságának vizsgálata HIV-1 proteázzal	27
4.6. CA proteolitikus fragmensek tömegspektrometriás azonosítása	27
4.7. A rekombináns CA fehérjék hasíthatóságának vizsgálata limitált tripszines emésztéssel	27
4.8. A pGEX-4T-3-CypA expressziós vektor készítése	28
4.9. A CypA-GST fúziós fehérje tisztítása	28
4.10. His₆-HIVCA „pull-down” assay	28
4.11. A HIV-1 vektor rendszer pMDLg/pRRE plazmidjának módosítása	29
4.12. Vírusrészek előállítása	29
4.13. Fertőzőképesség vizsgálata	30
4.14. Statisztikai elemzés	30

4.15. Transzdukció és mintagyűjtés tömegspektrometriás (MS) elemzéshez	30
4.16. A transzdukált sejtek fehérje összetételének tömegspektrometriás elemzése	31
4.17. A tömegspektrometriás adatok statisztikai elemzése	31
5. EREDMÉNYEK	33
5.1. A HIV-1 kapszid fehérje másodlagos szerkezetének <i>in silico</i> vizsgálata	33
5.2. A vad típusú és mutáns HIV-1 kapszid fehérjék hasítása HIV-1 proteázzal	33
5.3. A vad típusú és mutáns HIV-1 kapszid fehérjék másodlagos szerkezetének CD spektroszkópiás vizsgálata	36
5.4. A vad típusú és mutáns HIV-1 kapszid fehérjék tripszines emésztése	38
5.5. His ₆ -HIVCA és CypA-GST rekombináns fehérjék kölcsönhatásának vizsgálata „pull-down” technikával	40
5.6. Vad típusú és L189F mutáns CA fehérjéket hordozó pszeudovírus részecskék fertőzőképességének vizsgálata	41
5.7. A lentivirális vektorral történő transzdukció hatására bekövetkező fehérje szintű változások tömegspektrometriás vizsgálata a fertőzés korai fázisában	43
5.8. A tömegspektrometriás adatok statisztikai elemzése	44
5.9. A változást mutató gazdafehérjék kapcsolata a HIV-1 fehérjével és életciklusával	46
6. MEGBESZÉLÉS	51
7. ÖSSZEFOGLALÁS	56
7. SUMMARY	57
8. IRODALOMJEGYZÉK.....	58
9. TÁRGYSZAVAK/KEYWORDS	77
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	78
11. FÜGGELÉK	79

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AIDS	szerzett immunhiányos tünetegyüttes
ALV	madár leukémia vírus
CA ¹	kapszid fehérje
CD	cirkuláris dikroizmus
Coomassie	“Coomassie Brilliant Blue 250” fehérje festék
Cyp A	ciklofilin A
DTT	ditiotritol
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EIAV	ló vészes vérszegénységét okozó vírus
GST	glutation-S-transzferáz
HIV	humán immundeficiencia vírus
HPLC	magas nyomású folyadékkromatográf
HTLV	humán T-sejtes leukémia vírus
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IN ¹	integráz
IPTG	izopropil-β-D-tiogalaktopiranozid
MA ¹	mátrix fehérje
MHR	major homology region
mRNS	messenger RNS
NC ¹	nukleokapszid
NMR	mágneses magrezonancia spektroszkópia
P1, P2, P3, stb. ²	szubsztrát aminosavrésze
PCR	polimeráz láncreakció
PDB	fehérje adatbázis
PIC	preintegrációs komplex
PMSF	fenil-metil-szulfonil-fluorid
PR ¹	retrovirális proteáz

¹ A retrovírus fehérjék kétbetűs nevezéktana Leis és mtsai, (1988) szerint. A nem ismert funkciójú fehérjéket p betűvel és a fehérjék molekulatömegét kDa-ban kifejező számmal jelölik.

² A szubsztrát, valamint a szubsztrátkötő alhelyek elnevezése Schechter és Berger (1967) szerint. A szubsztrát aminosav oldalláncok a hasítási helytől N-terminális felé haladva P1, P2, P3, stb., míg a C terminális felé haladva P1', P2', P3', stb., vannak jelölve. A megfelelő szubsztrátkötőhelyek jelölése S1, S2, S3, stb., illetve S1', S2', S3', stb.

RP	fordított-fázisú
RT ¹	reverz transzkriptáz
S1, S2, S3, stb. ²	enzim szubsztrátkötő helyeinek a része
SDS	nátrium dodecil szulfát
SU ¹	„surface” fehérje
TM ¹	transzmembrán fehérje
tRNS	transzfer RNS

1. BEVEZETÉS

A retrovírusok családjába tartozó I-es típusú humán immundeficiencia vírus (HIV-1) a szerzett immunhiányos tünetegyüttes (AIDS) kórokozója. A vírus általi fertőzés következményeként kialakulhat betegség nélküli virémia, daganatképződés, vérszegénység, immunhiány, illetve különböző idegrendszeri elváltozások. Napjainkban az aktív antiretrovirális terápia (HAART) alkalmazása sikeresen lassítja a fertőzés következtében kialakuló komplikációk megjelenését, jóllehet a vírus magas mutációs rátája miatt végleges gyógymód jelenleg még nem áll rendelkezésünkre. Az UNIADS becslése szerint 2017-ben 36,9 millió HIV fertőzött élt világszerte, 1,8 millió új fertőzöttet regisztráltak és 940 ezren haltak meg a fertőzés következtében kialakuló betegségekben valamelyikében. Másrészt a HIV-alapú pszeudotipizált öninaktiváló vektorok a leggyakrabban alkalmazott eszközök közé tartoznak, a génterápiás kísérletek során.

A HIV-1 fertőzés korai fázisának legkritikusabb pontja az úgynevezett dekapozidáció folyamata, amelynek elősegítése, vagy késleltetése egyaránt okozhatja akár a vírushelyezés terminációját is. Ebben a folyamatban jelentős szerepe van a kapszid fehérje megfelelő stabilitásának és számos gazdasejt által termelt fehérjének is, azonban a sejtbe bejutó kapszid magok heterogenitása, valamint a rendelkezésre álló vizsgálati módszerek korlátai miatt a folyamat részletei, illetve annak végrehajtásában résztvevő szereplők mibenléte továbbra sem tisztázott. Az említett szereplők (virális és gazda fehérjék egyaránt) azonosítása, valamint az azonosított faktorok szerepének alapos ismerete hozzájárulhat a vírus életciklusának alaposabb ismeretéhez, ezáltal új, hatékonyabb HIV-1 ellenes terápiák kifejlesztéséhez, amelyek a jelenleg alkalmazott terápiás módszerekre rezisztens törzsek terjedését is képesek lehetnek hatékonyan gátolni.

Munkacsoportunk és egy független munkacsoport korábban vizsgálta a HIV-1 proteáz (PR) illetve annak lehetséges célpontjait a virális fehérjék körében, ahol a kapszid fehérjét a proteáz szubsztrátjaként azonosították. Mivel a proteáz része a sejtbe bejutó magi struktúrának feltételezhetően szerepet játszik a fertőzés korai fázisában is, például a kapszid monomerek hasítása révén. Munkám során elsőként célul tűztük ki a kapszid fehérjében azonosított hasítóhelyeken olyan mutációk (W23A, A77P, A78V, L189F, L189I és L189P) létrehozását, amelyek a proteázon korábban végzett specificitás vizsgálatok eredményei alapján megváltoztatják a kapszid fehérje virális proteáz általi hasíthatóságát, ezáltal a későbbiekben eszközként szolgálhatnak a proteáz korai fázisban betöltött szerepének alaposabb

vizsgálatához, különös tekintettel azokra a körülményekre, amikor a vírus vagy vírus alapú vektor receptor-mediált endocitózis révén jut be a sejtbe, ahol a lizoszómában kialakuló pH viszonyok miatt a kapszid monomer szerkezete is elősegítheti a proteolízist. A létrehozott mutáns fehérjékben tanulmányoztuk a hatást, amelyet ezek a módosított hasítóhelyek fejtenek ki azok szerkezetére, legismertebb interakciós partnerével a ciklofilin A-val (CypA) kialakított kapcsolatára, illetve HIV-1 PR és tripszin általi hasíthatóságára.

A HIV-1, valamint a génterápiás célokra kifejlesztett HIV-alapú vektorok replikációja nagymértékben függ a gazdasejt saját fehérjéitől. Azoktól, amelyek a veleszületett immunitás részeként próbálják megakadályozni az életciklus kezdeti lépéseit a sejtbe történő bejutás után, valamint azoktól, amelyeket a vírus sikeres fertőzés esetén saját replikációjának elősegítésére használ fel. Több gazdasejt fehérje szerepe a HIV-1 életciklusában jól definiált, azonban a közelmúltban végzett kísérletek eredményeképpen több száz olyan gazdasejt fehérjét kódoló gén került kimutatásra, amelyek expressziójának változása szintén a vírusfertőzéssel hozható kapcsolatba. Ezen gének termékeinek közvetlen vizsgálata segíthet tisztázni azok pontos szerepét, így egy több géntermékre kiterjesztett proteomikai vizsgálat segíthet leszűkíteni a vizsgálandó célpontok körét. További munkánk során egy HIV-1 alapú vektorrendszer felhasználásával 293T sejtekben terveztük vizsgálni a pszeudovírus által okozott gazdafehérje expresszióban bekövetkező változásokat jelölés nélküli („label-free”) kvantitálás segítségével. Kísérletünk során célunk az volt, hogy a vírusfertőzés korai időpontjaiban olyan fehérjéket találjunk, amelyek expressziója megváltozik a pszeudovírus részecskékkel történő transzdukciónak hatására.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 A retrovírusok

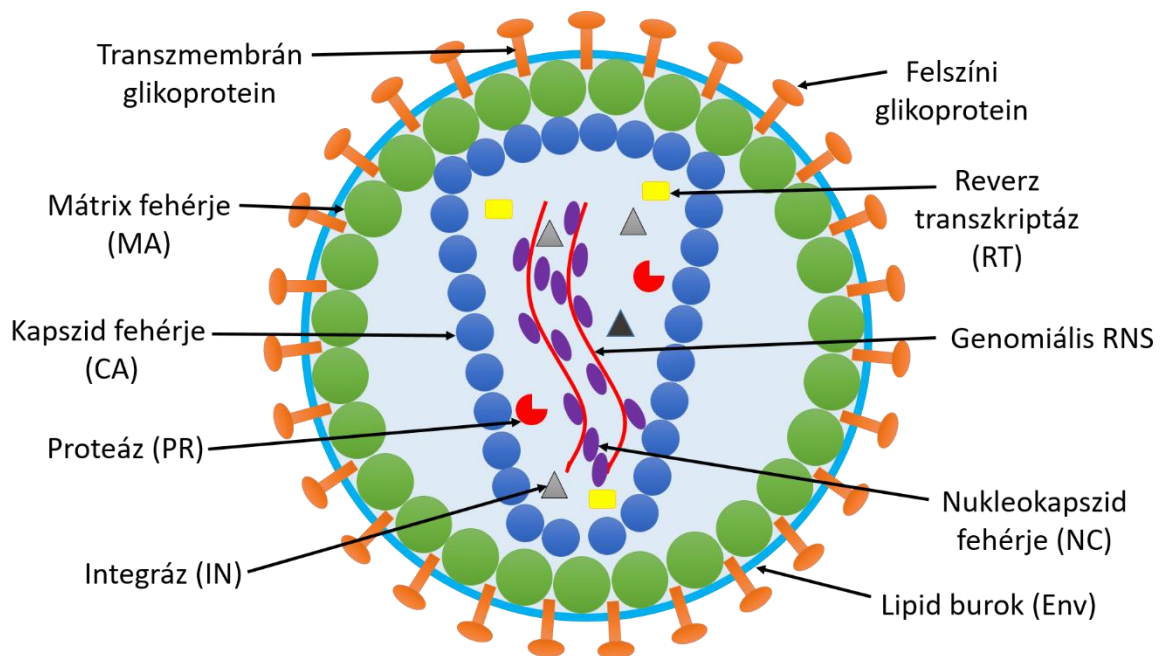
A retrovírusok a vírusok egy olyan speciális családját (Retroviridae) alkotják, amelynek jellegzetessége, hogy tagjai burokkal, valamint diploid, pozitív szálú RNS genommal rendelkeznek. A családot 2017-ben az International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) az Ortervirales rendbe sorolta be, amelybe besorolt vírusok közös jellemzője a polimeráz (Pol) poliproteinjükben található homológ aszpartát proteáz domén, a gazdasejt által elállított transzfer RNS (tRNS) molekulák primerként történő felhasználása a genom replikációjához, valamint a virionban megtalálható kapszid (CA) és nukleokapszid (NC) fehérjék jelenléte. A Retroviridae családba az Orthoretrovirinae és Spumaretrovirinae alcsaládok tartoznak. Az Orthoretrovirinae alcsalád Lentivírus nemzetségébe tartozik a család talán legismertebb képviselője a humán immundeficiencia vírus (HIV), a szerzett immunhiányos tünetegyüttes (AIDS) kórokozója (<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>).

A retrovírusok felfedezése Vilhelm Ellermann és Oluf Bang nevéhez kötődik (Ellermann és Bang, 1909), akik 1908-ban a csirke leukózis betegség okozójaként azonosították a víruscsalád egyik képviselőjét, a napjainkban madár leukémia vírusként (ALV) ismert patogént. Mivel a csirkék az embertől fejlődéstanilag igen távol állnak ahhoz, hogy modell szervezetként szolgálhassanak a humán megbetegedésekhez, továbbá a humán daganatos megbetegedések nem fertőzőek, a csirkékben leírt átvihetőséget semmilyen módon nem hozták kapcsolatba az emberekben okozott megbetegedésekkel (Coffin és mtsai, 1997). Ilyen módon a retrovírus kutatások ezután évtizedeken keresztül az állatokban okozott tumoros megbetegedésekre korlátozódtak, majd a madarak után 1936-ban John Bittner felfedezésének köszönhetően (Bittner, 1936) az emlősökre is kiterjedtek.

Jóllehet az emberi tumorokból történő vírusok kimutatására és izolációjára vonatkozó törekvések már az 1960-as években fokozódtak, az első humán patogén retrovírust, a humán T-sejtes leukémia vírust (HTLV), a T-sejtes leukémia kórokozóját csak 1980-ban fedezték fel (Poiesz és mtsai, 1980), amelyet a HIV-1 azonosítása követett 1983-ban (Barre-Sinoussi és mtsai, 1983; Gallo és mtsai, 1984; Levy és mtsai, 1984). Az AIDS felfedezése és a HIV fertőzöttek számának ugrásszerű és tartós növekedése évtizedekre előtérbe helyezte a retrovírusokkal kapcsolatos kutatásokat, a fertőzés következtében kialakuló CD4+ limfociták számának csökkenése (immunhiányos állapot), valamint a következtében kialakuló opportunista kórokozók fertőzésével szembeni érzékenység, súlyos idegrendszeri

komplikációk, valamint a limfóma és kaposi szarkóma kialakulásának nagy valószínűsége (Gottlieb és mtsai, 1981; Navia és mtsai, 1986) pedig tovább növelte az igényt a megfelelő terápiás módszer kifejlesztésére. Napjainkra a különböző antiretrovirális szerek, illetve az aktív antiretrovirális terápia (HAART) sikeresen lassítják a fertőzés következtében kialakuló komplikációk megjelenését, jóllehet a vírus szaporodásának teljes megszüntetése a magas mutációs ráta következtében kialakuló rezisztenciák miatt továbbra sem megoldott. A becslések szerint 2017-ben 36,9 millió HIV fertőzött élt világszerte, 1,8 millió új fertőzöttet regisztráltak és 940 ezren haltak meg a fertőzés következtében kialakuló betegségekből (Unaid 2018).

A retrovírusok lipid burokkal körülvett virionjainak átmérője 80-100 nm között változik, a lipid burokan (Env) virális glikoproteinek találhatók (1. ábra). A belső kapszid mag (core) mátrix (MA) és kapszid (CA) fehérjékből épül fel, alakja fajonként eltérő. A magon belül a nukleokapszid fehérjével kapcsolva található az RNS genom. A családba tartozó fajok genomja 7-12 kb méretű, lineáris, pozitív polaritású és nem szegmentált. A család fajainak különlegessége azok replikációs stratégiája, amelyben az RNS-ből reverz transzkripció révén keletkező DNS intermedier a gazda genomjába integrálódik.



1. ábra. *A retrovírus virion szerkezete*

A virális genom szerveződése alapján egyszerű és összetett retrovírusokat különböztetünk meg (Coffin 1992; Murphy és mtsai, 1995). Minden retrovírus tartalmaz 3 poliproteint kódoló génszakaszt: a *gag* kódolja a szerkezeti fehérjéket, mint a mátrix (MA), a kapszid (CA) és a nukleokapszid (NC); a *pol* kódolja a replikációért és integrációért felelős reverz transzkriptáz (RT) és integráz (IN) enzimeket, valamint a génekről átíródó poliproteinek feldarabolásáért felelős proteáz enzimet (PR); és az *env*, amely a lipid burok felszíni (SU) és transzmembrán (TM) fehérjéinek genetikai információját hordozza. Az egyszerű retrovírusok csak ezeket az alapvető géneket tartalmazzák, míg az összetett retrovírusok (mint például a HIV-1) további, járulékos fehérjéket kódoló géneket is hordoznak, amelyek a génextpresszió szabályozásán túl (Tat, Rev), a sikeres fertőzést (Nef), a gazdasejtben történő túlélést (Vif), illetve a későbbi kijutást segítik elő (Vpu) elsősorban a gazdasejt különböző fehérjéivel történő kölcsönhatások révén.

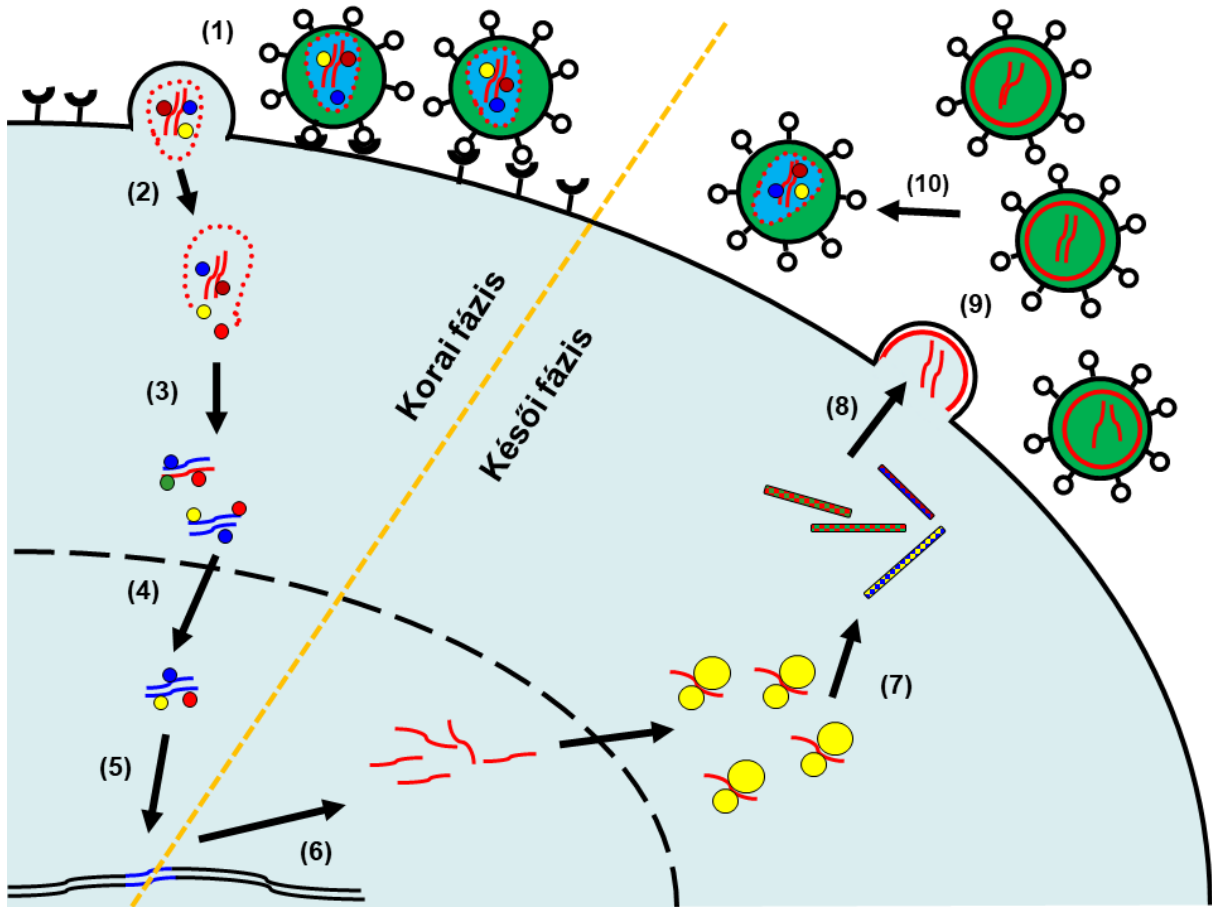
2.2. A retrovírusok életciklusa

A retrovírusok replikációja több szempontból is különlegesnek nevezhető. Ennek a folyamatnak a vizsgálata vezetett a reverz transzkriptáz felfedezéséhez (Temin 1976) és jelentős szerepet játszott az első génterápiás kísérletek elindításában is (Rosenberg 1991).

Életciklusuk korai és késői fázisra osztható (2. ábra), ahol a provirális DNS integrációja jelenti a választópontot. A HIV-1 életciklusának első lépéseként receptormediált endocitózis vagy direkt membránfúzió révén jut be a sejtbe. A citoplazmában a lipid buroktól elválasztott kapszid magban megtörténik a virális RNS átírása, a provirális DNS elkészítése a reverz transzkriptáz enzim révén (Varmus és Brown, 1989). A központi magban maradt fehérjékből és a keletkezett DNS-ből kialakult preintegrációs komplex (PIC) bekerül a sejtmagba. A legtöbb retrovírussal ellentétben a PIC sejtmagba történő bejutása a lentivírus nemzetségben aktív folyamat, amely lehetővé teszi a nem osztódó sejtek fertőzését is (Tözsér és Oroszlan, 2003).

A sejtmagban a virális DNS az integráz enzim segítségével integrálódik a gazdasejt genomjába (provírus képződés), amellyel véget ér az életciklus korai szakasza. Az integrációt követően a provírus inaktívvá válhat (látens fertőzés), vagy megkezdődhet a virális gének expressziója (produktív fertőzés) ahol a késői fázis kezdő lépéseként provirális DNS-ből a celluláris RNS polimeráz II enzim segítségével RNS keletkezik (Kirchhoff, 2013). A keletkezett messenger RNS (mRNS) molekulákról a korábban említett esszenciális gének (*gag*,

pol, *env*) által kódolt fehérjék, illetve összetett retrovírusok esetében további fehérjék íródnak át.



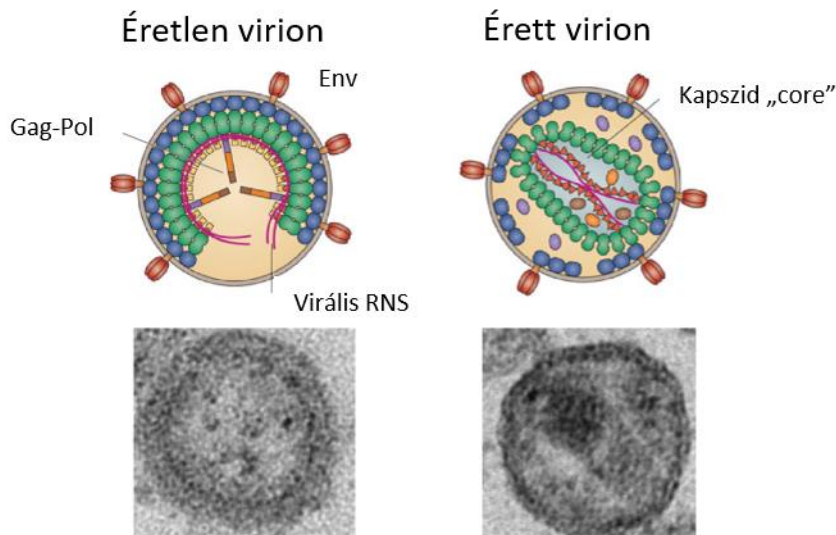
2. ábra. A retrovírusok életsiklusának lépései (Tózsér, 2003 alapján)

- | | |
|--|----------------------------|
| 1: Kötődés és bejutás | 6: A provírus expressziója |
| 2: A vírusburok elvesztése | 7: Transzláció |
| 3: Provirális DNS szintézis | 8: Összerendeződés |
| 4: Preintegrációs komplex (PIC) bejutása a magba | 9: Lefűződés |
| 5: Integráció | 10: A virion „érése” |

A *gag* és a *pol* génekről átíródott mRNS-ek lokalizációjuknak megfelelően a Gag és Gag-Pol polipeptidek, vagy az újonnan keletkezett virionok genomjaként szolgálnak. Az *env* gén által kódolt polipeptid egy kisebb, illesztett mRNS-ről íródik át, a szintetizált fehérje glikozilálódik, majd a plazmamembránba való transzport során, egy celluláris proteináz által

hasad a megfelelő fehérje alegységeire (SU és TM). A járulékos fehérjék templátjaként többszörösen illesztett mRNS-ek szolgálnak. Az elsődleges termékként szintetizálódó Gag és Gag-Pol poliproteinek a gazdasejt membránjának Env fehérjében gazdag részein, a membrán belső felületénél csoportosulnak, majd a virális genom mRNS-sel egy toroidszerű "éretlen" részecskévé formálódnak, melyet a vírusburok zár be.

A vírus a „budding” (lefűződés) révén kerül ki, majd a virionban a poliproteineket a virális proteáz hasítja kisebb funkcionális egységekre (Oroszlán és Gilden, 1980; Dickson és mtsai, 1984). Ez a proteolitikus hasítás szükséges a vírus „éréséhez” (3. ábra) (Yoshinaka és Luftig, 1977; Tözsér és Oroszlan, 2003) és a fertőzőképesség kialakulásához (Lu és Wong, 1979; Katoh és mtsai, 1985).



3. ábra. A HIV-1 virion érése (Novikova és mtsai, 2019) alapján.

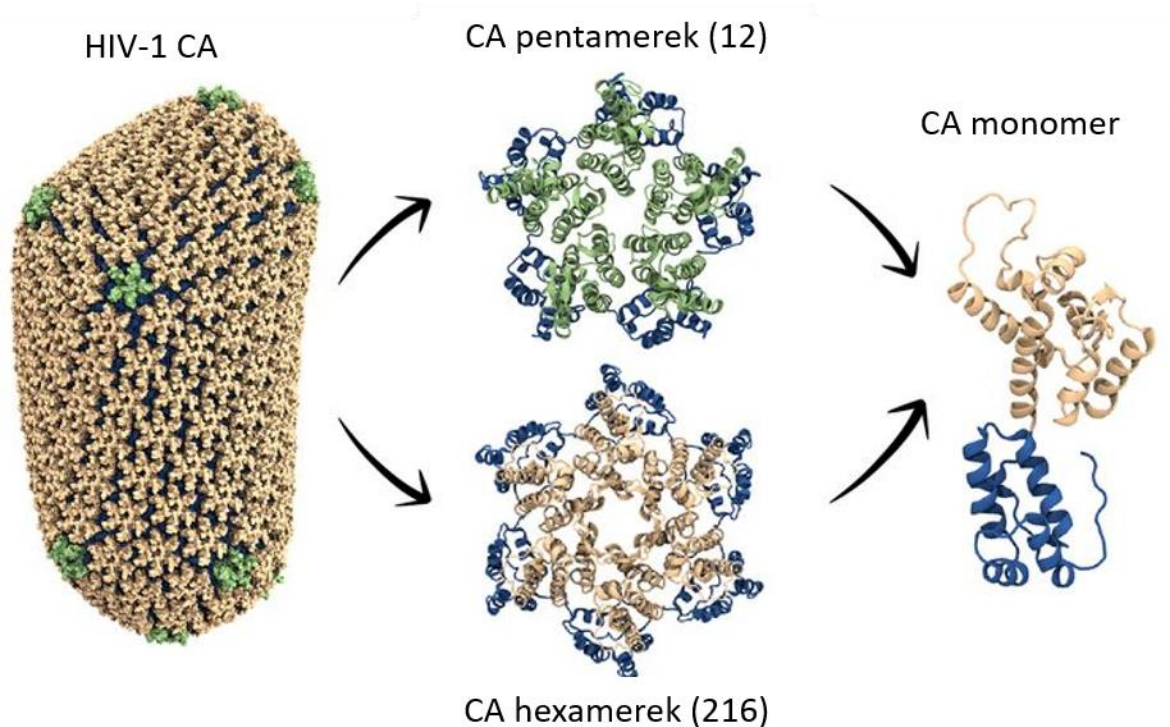
2.3. A HIV-1 kapszid jellemzése

A kapszid fehérje 231 aminosavrészből épül fel és két egymástól független doménből áll. Az amino(N)-terminális „core” domén az 1.-től a 145. aminosavrészig tart (Gitti és mtsai, 1996; Momany és mtsai, 1996), 7 α -hélixet, 2 β -hajtút és egy kifelé forduló, prolinban gazdag hurkot foglal magában. A doménben előforduló mutációk okozhatják a fertőzőképesség teljes elvesztését, aberráns mag struktúra kialakulását vagy a reverz transzkripció defektjét is (Tang és mtsai, 2001). A prolinban gazdag hurkot a gazdasejtek peptidil-prolil izomeráz ciklofilin A (CypA) fehérje kötőhelyeként azonosították, amely fehérje szintén jelentős szerepet játszik a

virion fertőzőképességének kialakításában (Sokolskaja és mtsai, 2004; Qi és mtsai, 2008). A karboxi(C)-terminális oligomerizációs domén a 146.-tól a 231. aminosavrészig tart (Gamble és mtsai, 1997), szükséges szerkezeti eleme a Gag oligomerizációnak, ezáltal a virion kialakulásában alapvető szerepet játszik. Globuláris szerkezetében 4 α -hélix található és tartalmaz egy evolúciósan megőrzött, 20 aminosavból álló peptid szekvenciát (Major Homology Region, MHR) is (Wills és Craven, 1991). Az MHR minden lenti- és onkovírusban azonosítható, elengedhetetlen komponens a fehérje szerkezet fenntartásához, valamint az egyéb virális és sejtek fehérjékkel történő kapcsolatok kialakításához. A két domén egy rövid összekötő szakasszal kapcsolódik egymáshoz (Freed, 1998), amely szintén elengedhetetlen „szereplő” a megfelelő kapszid szerkezet felvételéhez és stabilitásához (Jiang és mtsai, 2011). NMR spektroszkópiás (Gitti és mtsai, 1996) és röntgen krisztallográfiás (Gamble és mtsai, 1997) vizsgálatok igazolták azt, hogy a HIV-1 CA fehérje nagyrészt α -helikális másodlagos szerkezetet vesz fel. Ezen kívül a rekombináns p24 (CA) fehérje CD-spektroszkópiás vizsgálata is azt mutatta ki, hogy természetes körülmények között a fehérje 56 %-a α -hélixekbe, 3%-a β -redőkbe 20 %-a pedig kanyarokba rendeződik (Misselwitz és mtsai, 1995), míg a maradék 21 % rendezetlennek mutatkozott.

A kapszid fehérje a *gag* gén terméke, amelyet a PR hasít ki a Gag poliproteinből. Fontos szerepet játszik mind az összerendeződés folyamatában, mind a vírus bejutása utáni korai fázisban. A gag poliprotein PR általi feldarabolása a virion „érésének” részfolyamata, amely elsősorban az érett virális, HIV-1 esetében a MA, CA, NC és a p6 fehérjék megjelenését jelenti (Henderson és mtsai, 1992). A folyamat a virion nagymértékű szerkezeti átrendeződését is előidézi, ahol az ilyen módon megrövidült fehérjék aminosav összetételüknek megfelelő konformációt vesznek fel, és amely új funkciók megjelenését vonja maga után, majd végül elvezet egy kúp alakú kapszid magot magában foglaló érett virion megjelenéséig (von Schwedler és mtsai, 1998; de Marco és mtsai, 2010). A mag körülbelül 1500 darab CA fehérjéből áll, amelyek megközelítőleg 250 hexamert és pontosan 12 db pentamert alakítanak ki (Ganser és mtsai, 1999; Li és mtsai, 2000; Pornillos és mtsai, 2011). A CA fehérjék N-terminális doménjükkel szerveződnek hexamerekké, amelyek karboxi-terminális doménjeik révén 6 másik hexamerrel kapcsolódnak rácsba (Lanman és mtsai, 2003; Ganser-Pornillos és mtsai, 2007; Pornillos és mtsai, 2009) és alakítják ki az érett virionra jellemző kúp alakú struktúrát, amelyet a pentamerek zárnak és ezáltal stabilizálnak a végeken lévő megfelelő pozíciókban (4. ábra).

Már a korai kísérletek is arra utaltak, hogy a CA megfelelő stabilitásának jelentős szerepe van a HIV-1 fertőzésben az által, hogy befolyásolja az úgynevezett dekapozidáció sebességét a fertőzés korai fázisában (Tang és mtsai, 2001; Tang és mtsai 2003; Forshey és mtsai, 2002; Tang és mtsai, 2007; Joshi és mtsai, 2006; Yang és mtsai, 2012). A folyamat, illetve annak végrehajtásában résztvevő szereplők mibenléte azonban a megfelelően specifikus és érzékeny vizsgálati módszerek hiánya miatt továbbra sem teljesen tisztázott. A vírusokból izolált, illetve *in vitro* összeszerelt kapszidok nagy heterogenitást mutatnak, ráadásul nagy részük hibás, ami szintén megnehezíti a vizsgálatukat. Az évek folyamán számos módszert fejlesztettek ki a folyamat vizsgálatára, azonban egyikük sem volt képes választ adni minden felmerülő kérdésre.



4. ábra. Az érett HIV-1 kapszid szerkezete és építőelemei (Quinn és mtsai, 2018) alapján.

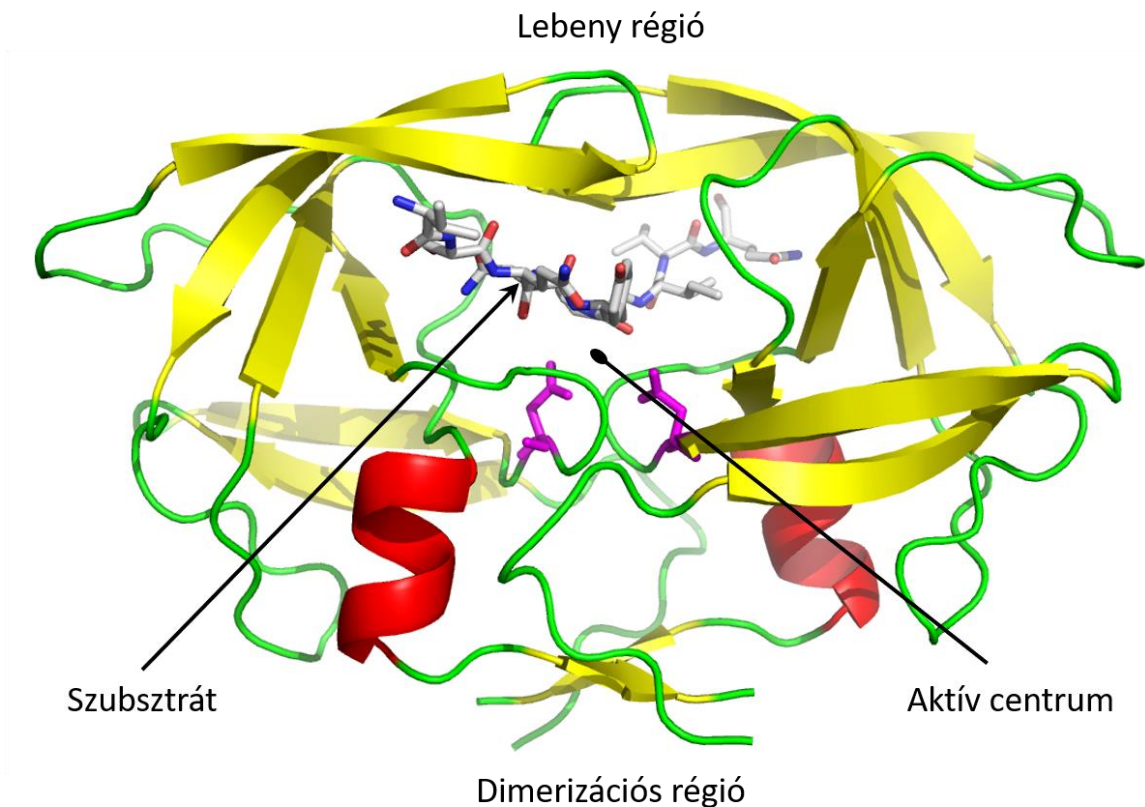
2.4. A HIV-1 PR jellemzése

A HIV-1 PR a Gag-Pol poliprotein részeként szintetizálódó, 99 aminosavrészből felépülő proteolitikus enzim, amely olyan aszpartil proteázokra jellemző tulajdonságokat mutat, mint a pepsztatinnal való gátolhatóság és a katalitikus aszpartát mutációjával előidézhető enziminaktiváció. Azonban a tipikus celluláris aszpartil proteázoktól eltérően két egyforma

alegységből épül fel, dimerként működik. Első- és másodlagos szerkezete a celluláris aszpartil proteázok egyik doménjével analóg (Toh és mtsai, 1985), túlnyomóan β -redőket és alegységenként 1 α -hélixet tartalmaz. A két alegység N- és C-terminális láncai összefonódva alkotnak egy négyrétegű antiparallel β -redőt.

A HIV-1 PR három jellegzetes régiója az aktív centrum, a lebeny (flap) és a C-terminális közelében elhelyezkedő konzervált dimerizációs régió (5. ábra). Az aktív centrumot alkotó katalitikus triádok (Asp-Thr-Gly) mindkét alegység esetében az N-terminális közelében helyezkednek el, aminosavrészei hidrogénkötések hálózatán keresztül kapcsolódnak egymáshoz (Davies, 1990; Wlodawer és Erickson, 1993), amit tűzoltófogásnak („fireman’s grip”) neveznek, amely elnevezés a kötés geometriájára és erős jellegére utal. A flexibilis lebeny régió többé-kevésbé konzervált (Miller és mtsai, 1989; Navia és mtsai, 1989), a szubsztrát, illetve az inhibitor kötődésekor elmozdul és ráhajlik a ligandra, ezáltal stabilizálva a kapcsolatot (Sluis-Cremer és Tachedjian, 2002). Továbbá konformációjával szabályozza az aktív centrumba történő be- és kilépést, nyitott, vagy zárt állapot kialakításával (Hornak és mtsai, 2006). A harmadik konzervált régió (Gly-Arg-Asn) a C-terminális közelében található és ionpárok kialakításával a dimerizációban játszik fontos szerepet.

A HIV-1 PR pH optimuma savas (4,5-6,5) (Grinde és mtsai, 1992), hasítási helyeit virális poliproteinek felhasználásával és az érett fehérjék N- és C-terminális szekvenciáinak meghatározásával azonosították. Jóllehet a hasítási helyek összehasonlításával nem sikerült konszenzus hasítási szekvenciát azonosítani, a szekvenciák többnyire hidrofóbak. A HIV-1 PR-nak legalább hét aminosav hosszúságú peptidre van szüksége a szekvencia felismeréséhez és a sikeres hasításhoz, amelynek számos hidrogénkötéssel, nyújtott béta konformációban kell az enzimhez kötődnie (Wlodawer és Erickson, 1993). A rövidebb, nem hasítható peptidok kompetitív gátlószerek lehetnek (Kotler és mtsai, 1988; Roberts és mtsai, 1990; Tözsér és mtsai, 1991). A természetes hasítóhelyek analiziséből arra következtettek, hogy a PR bizonyos aminosavakat preferál a hasítóhelyek mellett és annak környezetében, amely alapján úgy gondolták, hogy két fő típust különböztethetünk meg: az 1-es típusnál Tyr(Phe)*Pro- a P1-P1' helyeken (nevezéktan: Schechter és Berger, 1967 alapján), a 2-es típusnál pedig prolin kivételével hidrofób aminosavak szerepelnek a P1 és P1' helyeken (Pettit és mtsai, 1991; Tözsér és mtsai, 1991). Oligopeptid szubsztrátokkal végzett specificitási kísérletek a későbbiekben alátámasztották a két típus létezését (Tozser és mtsai, 1992; Griffiths és mtsai, 1992), továbbá kimutatták az enzim P2 és P2' pozícióban található aminosavrész preferenciáit is. A hasítóhely P1 pozíciójában elsősorban hidrofób aminosavak dominálnak, de valin és izoleucin nem



5. ábra: A vad típusú HIV-1 proteáz fehérje VSQNYPIVQ peptid szubsztráttal alkotott komplex szerkezeti modellje. A szerkezetben az α -hélixek piros, a β -redők sárga színnel vannak jelölve. Az ábrán lila színnel az aktív centrum katalitikus aszpartátjai vannak kiemelve (Mótyán János készítette).

figyelhető meg. A P1' a P1-hez hasonló azzal a kivétellel, hogy prolin aminosav gyakran előfordul itt. A P2 és P2' helyeken hidrofób, vagy kis poláris, míg a külsőbb pozíciókban különféle aminosavrészek találhatóak. Az 1-es típusú hasítóhelyet tartalmazó szubsztrátokkal végzett kísérletek kis aminosavrészekre (pl. cisztein és aszparagin) mutattak preferenciát a P2 helyen és β -elágazású valinra vagy izoleucinra a P2' pozícióban (Tozsér és mtsai, 1992). A 2-es típusú hasítóhelyet tartalmazó peptidekkel végzett kísérletekben pedig a P2 helyen a β -elágazású aminosavak (legfőképpen a valin), míg a P2' helyen a glutamin bizonyult a legkedvezőbbnek (Griffiths és mtsai, 1992). Jóllehet az enzim homodimerként működik, az azonosított természetes hasítóhelyek szekvenciája nem mutat szimmetrikus aminosav eloszlást, és szimmetrikus szubsztrátok iránti preferenciát sem sikerült kimutatni (Tözsér és mtsai, 1997). Mivel a PR szubsztrát-kötő zsebei egymással átfedésben vannak a szubsztrát oldalláncai

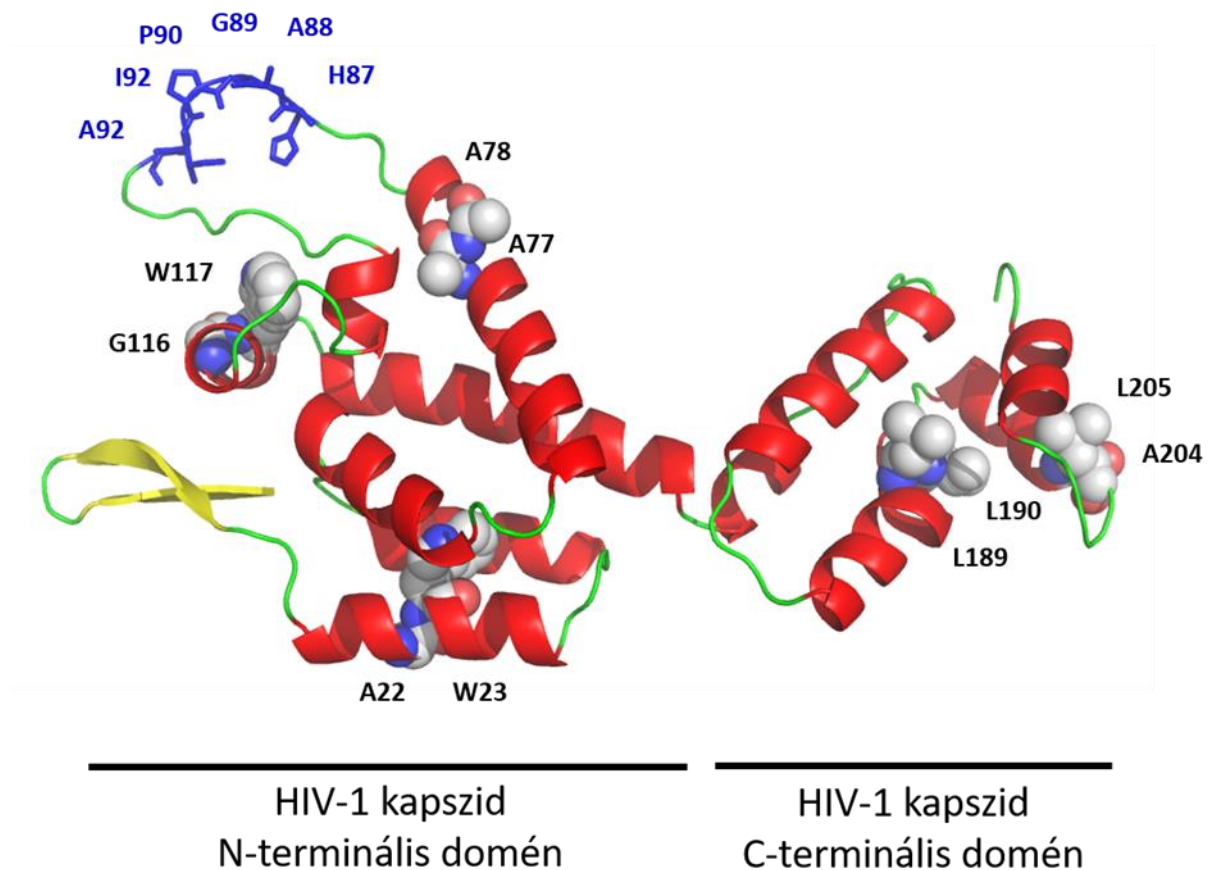
kölcsönhathatnak egymással, ami az adott oldallánc alternatív pozicionálódását okozhatja és egy energetikailag nem-additív kapcsolat alakul ki a ligand oldallánca és a szubsztrát-kötő zseb között (Tözsér és Oroszlan, 2003). A PR működése jelentős hasítóhely szekvencia függést mutat, amelynek legfontosabb jellemzője az aminosavrész mérete és a β -elágazás megléte (Tözsér és mtsai, 1997), ugyanakkor specificitás vizsgálatokban a P1 és P1' helyen lévő aminosavrészek bizonyultak a legkritikusabb tényezőknek a hasíthatóság szempontjából. Ezért úgy döntöttünk, hogy a CA fehérjét érintő vizsgálatokban ezeken a helyeken módosítjuk a meglévő hasítóhelyek szekvenciáit, hogy a proteolitikus hasításnak ellenálló, vagy arra fokozottan érzékeny fehérjéket hozzunk létre.

2.5. A PR szerepe a HIV-1 fertőzés korai fázisában

Régóta ismert tény, hogy számos vírus fehérje mellett a PR is része a kapszid magnak (Roberts és mtsai, 1991; Welker és mtsai, 2000), amely bejut a sejt citoplazmájába, ezáltal az is elképzelhető, hogy a korai fázisban is hozzájárul a vírus fertőzőképességéhez a virális fehérjék további módosításával, vagy éppen a gazdasejt megfelelő fehérjeinek hasítása révén (Tözsér és Oroszlan, 2003). Egy másik lentivírussal (equine infectious anaemia virus- EIAV) elvégzett kísérletben igazolták azt, hogy a PR képes a nukleokapszid fehérje kisebb fragmensekre történő hasítására (Roberts és mtsai, 1991), amely felfedezés alapjául szolgált a PR korai fázisban betöltött szerepét feltételező elméleteknek. Azt is igazolták, hogy a kapszid mag felépítésében részt vevő fehérjék (CA, NC) szubsztrátjai a virális proteáznak *in vitro* (Tözsér és mtsai, 2003, 2004; Rumlová és mtsai, 2003), valamint több mint 30 olyan sejtfehérjét azonosítottak, amelyek célpontjai lehetnek a HIV proteáznak (Shoeman és mtsai, 1990, 1993; Tomasselli és mtsai, 1991; Wagner és mtsai, 2015). Más kutatások szerint a PR aktivitása felel az egyes sejt vonalakban megfigyelhető nekrotikus (Blanco és mtsai, 2003; Ventoso és mtsai, 2005), vagy apoptotikus (Strack és mtsai, 1996) sejthalálért. Az *in vivo* PR gátlási vizsgálatok ezzel szemben ellentmondásos eredményekhez vezettek: míg néhányan egyértelműen kimutatták a korai fázisra kifejtett gátlást (Baboonian és mtsai, 1991; Venaud és mtsai, 1992; Nagy és mtsai, 1994; Stefanidou és mtsai, 2012), addig mások nem figyeltek meg ilyen hatást (Jacobsen és mtsai, 1992; Kaplan és mtsai, 1996). Jóllehet ezen ellentmondásos eredményeknek köszönhetően a PR szerepe a korai fázisban a mai napig nem tisztázott, feltételezhető, hogy szerepet játszik abban.

A korábban említett virális fehérjékkel együtt a CA is PR szubsztrátjának bizonyult *in vitro*, és ez a hasítás feltételezhetően a pH változás által előidézett konformációs változásnak

köszönhető. A poliakrilamid gélelektroforézissel elválasztott CA fragmensek N-terminális szekvenálásának és tömegspektrometriás azonosításának eredményeként két fő CA hasítási helyet azonosítottak: a 77. alanin és 78. alanin, valamint a 189. leucin és 190. leucin aminosavrészek között (Tözsér és mtsai, 2003) (6. ábra). Ezeken a helyeken kívül egy másik



6. ábra. A vad típusú HIV-1 kapszid fehérje szerkezete (Mótyán János készítette). A szerkezetben az α -hélixek piros, a β -redők sárga színnel vannak jelölve. Az ábrán a proteolitikus hasítási helyeket térkitöltő modellekkel ábrázoltuk, a ciklofilin kötő hurokhoz tartozó aminosavrészek pedig kék színű pálcika ábrázolással lettek kiemelve.

kutatócsoport további három hasítóhelyet azonosított a 22. alanin és 23. triptofán, a 116. glicin és 117. triptofán, valamint a 204. alanin és 205. leucin aminosavrészek között (Rumlová és mtsai, 2003). Az itt felsorolt hasítási helyek szerkezeti tulajdonságai azonban nem felelnek meg a proteáz-mediált hidrolízis szerkezeti követelményeinek, mivel a szubsztrátnak nyújtott béta konformációban kell az enzimhez kötődnie (Wlodawer és Erickson, 1993). A kapszid fehérje szerkezetét 7,5-ös pH-n határozták meg, ahol az ellenáll a proteolitikus hasításnak, azonban

szerkezete és magasabb szerveződése fokozottan érzékeny a kémhatásra; pH 6,6 alatt a CA oligomerek monomerekké esnek szét, amelyek „olvadt gombóc” szerkezetet vesznek fel (Misselwitz és mtsai, 1995; Ehrlich és mtsai, 2001). A fehérje ezen állapotában a hasítási helyek szabaddá válnak és lehetővé válik a proteázhoz történő kötődés, illetve a fentebb bemutatott proteolitikus hasítás is.

Habár a HIV-1 sejtbe történő bejutása leginkább direkt fúzióval történik, amelynél a citoplazmába belépő kapszid mag, illetve a monomerek szerkezete a citoplazma semleges pH-ján nincs kitéve a fentebb leírt változásoknak, az endocitózissal történő belépés tovább növelheti a sikeres fertőzés esélyét a vírus izolátumtól és a gazda sejt típusától függően (Fackler és Peterlin, 2000; Daেকে és mtsai, 2005; Maurin és mtsai, 2007), továbbá a génterápiában használt HIV-alapú pszeudovírus részecskék is ezt az útvonalat használják. Az endocitotikus úton történő bejutás révén a lizoszóma savas pH-ja egyrészt jótékony hatással lehet a PR aktivitására, másrészt a CA szerkezet változása miatt szabaddá váló hasítóhelyek lehetővé teszik annak hasítását, ezáltal felgyorsulhat a dekaposzidáció folyamata is.

A bemutatott hasítóhelyek mind kívül esnek a CA MHR régióján, ezáltal alkalmasak lehetnek olyan mutáns CA létrehozására, amely szerkezetében nem, de PR általi hasíthatóságában változik, ezáltal eszközként szolgál a két fehérje kölcsönhatásának vizsgálatára a HIV-1 fertőzés korai szakaszában.

2.6. Kapszidhoz kötődő gazdasejt fehérjék szerepe a HIV-1 fertőzés korai fázisában

A legjobban jellemzett humán fehérje, ami a kapszidhoz kötődik a peptidil-prolil izomeráz, ciklofilin A fehérje (CypA), amely a HIV-1 életciklusának késői fázisában képes kötődni a HIV-1 gag poliproteinhez (Luban és mtsai, 1993; Braaten és mtsai, 1996). A CypA a lefűződés folyamán a virionba is becsomagolódik, amely elengedhetetlennek bizonyult a vírus megfelelő fertőzőképességének fenntartásához (Franke és mtsai, 1994; Thali és mtsai, 1994; Yoo és mtsai, 1997), jóllehet későbbi kutatások szerint a gazdasejtben jelenlévő CypA sokkal fontosabb a fertőzőképességhez (Sokolskaja és mtsai, 2004; Qi és mtsai, 2008; Fassati, 2012). Egyes eredmények szerint bizonyos sejttípusokban (pl HeLa és H9 T sejtek), illetve vírus izolátumok esetében a HIV-1 replikációja független a ciklofilintől (Yin és mtsai, 1998; Sokolskaja és mtsai, 2004). Az A92E vagy G94D CA mutációkat hordozó vírusok nem képesek az említett sejtekben történő replikációra azonban a CA-CypA kölcsönhatás megszüntetése visszaállítja fertőzőképességüket (Yin és mtsai, 1998; Sokolskaja és mtsai, 2004; Hatziioannou

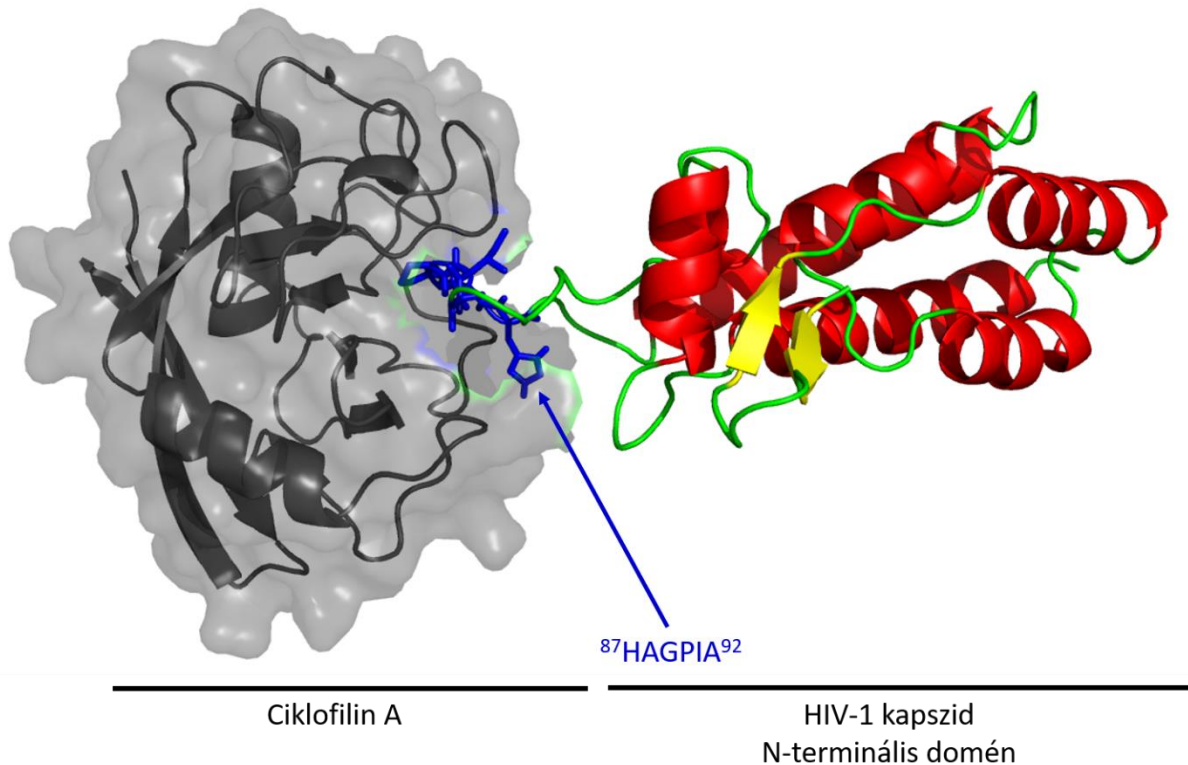
és mtsai, 2005; Song és Aiken 2007). A CypA a kapszid fehérjén található CypA-kötő hurokhoz kapcsolódik (87HAGPIA92 az amino-terminális doménen) (7. ábra). A CypA pontos szerepe a HIV-1 fertőzés korai szakaszában továbbra sem tisztázott, valószínűleg a kapszid magot stabilizálja (Wiegers és mtsai, 1999). Újabb eredmények szerint a CA mellett a Vpr (Solbak és mtsai, 2010) és a p6 fehérjéhez is képes kötődni (Solbak és mtsai, 2012). A CypA kapszidhoz való kötődése ciklosporinnal, vagy bármely kötőhely aminosavrész mutagenézisével gátolható. Egyes sejtvonalakban bármely módszer használata gátolja a fertőzés folyamatát a reverz transzkripció előtt vagy közben beavatkozva.

Az utóbbi néhány évtizedben számos kutatás során próbáltak azonosítani további specifikus gazdasejt fehérjéket, amelyek részt vehetnek a HIV-1 fertőzés korai fázisának irányításában a fertőzés akadályozása vagy éppen segítése révén. Ezen kutatások közül a legjelentősebbek kis interferáló RNS (siRNS) könyvtárak felhasználásával igyekeztek megtalálni azokat a géneket és fehérjéket, amelyek szükségesek a fertőzés lépéseire (Brass és mtsai, 2008; König és mtsai, 2008; Zhou és mtsai, 2008; Jäger és mtsai, 2012). Ezek közül néhány, mint például a „transportin-3” (TNPO3), a „cellular protein cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 6” (CPSF6) vagy a „nuclear pore komplex protein 153” (NUP153) és 358 (NUP358 vagy RunBP2) fehérjék mind képesek kapcsolatba lépni a CA fehérjével (Lee és mtsai, 2010; Ambrose és Aiken, 2014; Campbell és Hope, 2015).

A TNPO3 egy nukleáris transzport fehérje, a kezdeti feltételezések szerint a virális integrázhoz való kötődése révén segíti elő a PIC bejutását a sejtmagba (Christ és mtsai, 2008), azonban későbbi kutatások szerint hatását inkább a kapszidhoz való kötődése révén (Krishnan és mtsai, 2010) fejt ki. Egy kísérletben azt is kimutatták, hogy rekombináns TNPO3 hozzáadása a tisztított kapszid preparátumokhoz elősegíti annak szétszerelődését *in vitro*, amit a CypA képes volt gátolni (Shah és mtsai, 2013). Jóllehet ezek megfigyelések azt sugallják, hogy a CypA és TNPO3 fehérjék együttműködése szükséges a dekapszidáció folyamatának megfelelő koordinációjához, a közelmúltban végzett kísérletek eredményei inkább azt jelzik, hogy a TNPO3 hatását inkább indirekt módon, a CPSF6 fehérje elkülönítése révén fejt ki, és inkább befolyásolja a virális genom integrációját, mint a sejtmagba történő transzportot (De Iaco és Luban 2011; De Iaco és mtsai, 2013).

A CPSF6 fehérje szintén kötődik a kapszidhoz, a HIV-1 fertőzés korai fázisának több lépésében is szerepet tulajdonítanak neki (Saito és mtsai, 2016). Egyik valószínű szerepe a kapszid nukleáris transzportjának elősegítésében van (Lee és mtsai, 2010; Schaller és mtsai, 2011; Price és mtsai, 2012; Chin és mtsai, 2015; Bejarano és mtsai, 2019), ezen kívül több

közelmúltban végzett kutatás is alátámasztotta a virális genom integrációjában betöltött szerepét (Schaller és mtsai, 2011; Koh és mtsai, 2013; Sowd és mtsai, 2016; Rasheedi és mtsai, 2016; Achuthan és mtsai, 2018).



7. ábra. A vad típusú HIV-1 CA N-terminális doménjének kapcsolata a CypA fehérjével (Mótyán János készítette). Az ábrán a ciklofilin kötő hurokhoz tartozó aminosavrészek kék színű pálcika ábrázolással lettek kiemelve. A szerkezetekben az α -hélixek piros, a β -redők sárga színnel vannak jelölve.

Végül Rasaiyaah és munkatársai ahhoz az elmélethez találtak meggyőző adatokat, amely szerint a makrofágokban a HIV-1 a CypA és CPSF6 fehérje révén kerüli el a citoszólban lokalizálódó DNS szenzor ciklikus GMP-AMP (cGAS) általi felismerést (Rasaiyaah és mtsai, 2013).

A NUP153 és NUP358 nukleoporin fehérjék a magpórus komplex fontos alkotóelemei a korábban említett kísérletek közül kettőben is (Brass és mtsai, 2008; König és mtsai, 2008) azonosították mindkettőt. A NUP358 a pórusok citoplazmatikus oldalán a citoplazmatikus filamentumok kiindulási pontján, vagy ahhoz közel található (Wu és mtsai, 1995) és az ezzel

kapcsolatos kísérletek eredményei szerint jelentős szerepe van a HIV-1 magi transzlokációjában (Zhang és mtsai, 2010; Bichel és mtsai, 2013). Továbbá, egy közelmúltban közzétett kísérlet eredményei szerint ezen hatását másik két gazdafehérjével: a korábban említett CPSF6-al és egy kinezin motoros fehérjével a KIF5B-vel („kinesin family member 5B”) kölcsönhatásban képes kifejtteni (Dharan és mtsai, 2016).

A NUP153 a pórusok magi oldalán található nukleoporin fehérje. Jóllehet elsőként integrázt kötő fehérjeként ismerték fel (Woodward és mtsai, 2009), később a HIV-1 fertőzésben betöltött szerepének genetikai determinánsaként a kapszid fehérjét azonosították be (Matreyek és Engelman, 2011). Képes kapcsolódni a kapszidhoz egy újabb nukleoporinnal, a NUP93-al együtt (Di Nunzio és mtsai, 2013). A HIV-1 replikációban betöltött szerepét számos kutatás során alátámasztották (Di Nunzio és mtsai, 2012, 2013; Matreyek és mtsai, 2013), továbbá Buffone és munkatársai egy közelmúltban közzétett kísérletben azt is igazolták, hogy elengedhetetlenül szükséges a nem osztódó sejtekben történő fertőzéshez (Buffone és mtsai, 2018).

Az itt bemutatott fehérjéken kívül még több száz olyan létezik, amelyről kimutatták, hogy szerepet játszik a HIV-1 életciklusában, azonban többségüknél a szerep mibenléte, illetve az életciklushoz történő kapcsolódási pontja továbbra sem ismert. Ezen fehérjéknek a HIV-1 életciklusára kifejtett hatásának alapos vizsgálata jelentős mértékben hozzájárulhat az újabb HIV-1 ellenes terápiák megjelenéséhez.

3. CÉLKITŰZÉS

A HIV-1 fertőzés korai fázisának legkritikusabb pontja a dekapozidáció folyamata, amelynek elősegítése vagy késleltetése egyaránt okozhatja a vírushatóság terminációját. A folyamatban részt vevő szereplők azonosítása, valamint azok szerepének ismerete hozzájárulhat a vírus életciklusának alaposabb ismeretéhez, ezáltal új, hatékonyabb HIV-1 ellenes terápiák kifejlesztéséhez.

Munkánk során a következő célokat tűztük ki:

1. A kapszid fehérje korábban azonosított hasítóhelyein olyan mutációkat terveztünk létrehozni (W23A, A77P, A78V, L189F, L189I és L189P), amelyek a proteázon korábban végzett specificitás vizsgálatok eredményei alapján megváltoztatják a kapszid fehérje virális proteáz általi hasíthatóságát, ezáltal a későbbiekben eszközként szolgálhatnak a proteáz korai fázisban betöltött szerepének alaposabb vizsgálatához. A létrehozott mutáns fehérjékben terveztük tanulmányozni a hatást, amelyet ezek a módosított hasítóhelyek fejtenek ki HIV-1 PR és tripszin általi hasíthatóságára. Ezen kívül vizsgálni terveztük a mutációk hatását a mutáns fehérjék szerkezetére, valamint CypA fehérjével kialakított kapcsolatára.

2. Egy HIV-1 alapú vektorrendszer felhasználásával 293T sejtekben terveztük vizsgálni a pszeudovírus transzdukciónál okozott gazdafehérje expresszióban bekövetkező változásokat jelölés nélküli (label-free) kvantitálás segítségével azért, hogy olyan gazda eredetű fehérjéket azonosítsunk amelyek feltehetően szerepet játszanak a pszeudovírussal történő transzdukciónál korai fázisában.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. A mutációk szerkezetre kifejtett hatásának becslése

A másodlagos szerkezeteket a SOPMA másodlagos szerkezet becslő szerver (Combet et al. 2000) használatával becsültük meg, a mutációk stabilitásra kifejtett hatásának becslése pedig a Site Directed Mutator (SDM) szerver segítségével történt (Worth és mtsai, 2011) a vad típusú teljes hosszúságú HIV-1 CA kristályszerkezetének (PDB code: 3NTE) (Du és mtsai., 2011) felhasználásával. Az ábrák a Pymol programmal (PyMol Molecular Graphics System; Version 1.3 Schrödinger, LLC) készültek.

4.2. A rekombináns HIV-1 kapszid fehérje mutagenézise, expressziója és tisztítása

A vad típusú (wt) HIVIIIB kapszid fehérjét kódoló és vele N-terminálison 6 hisztidin aminosavból felépülő, túlnyúló véget kódoló plazmid (His₆-HIVCA) Dr. Carol Carter (Department of Molecular Genetics and Microbiology, S.U.N.Y. Stony Brook, USA) ajándéka volt. A fenti plazmidban a mutációkat QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) segítségével hoztuk létre az 1. táblázatban feltüntetett oligonukleotid primerek (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA) felhasználásával. A létrehozott mutációkat tartalmazó plazmidokat QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Hilden, Németország) felhasználásával tisztítottuk, és T7 promoter primer (Promega, Madison, WI, USA), majd Prism dye terminator cycle sequencing kit és 3100-Avant Genetic Analyzer (mindkettő Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) segítségével szekvenáltuk, annak igazolására, hogy valóban tartalmazzák a kívánt mutációt.

A mutáns rekombináns kapszid fehérjéket BL21 (DE3) *E. coli* sejtekben (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) expresszáltuk. Az expressziót 0,4 mM IPTG (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) hozzáadásával indukáltuk és 3 órán keresztül, 37°C-on végeztük. A bakteriális sejteket lízis pufferben (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM fenil-metil-szulfonil-fluorid (PMSF), pH 8,0), szonikálással tártuk fel. A lizátumot 17500 g-n centrifugáltuk 25 percig, 4 °C-on, majd a pelletet ismét lízis pufferrel mostuk és centrifugáltuk, a fentiekkel azonos körülmények között. A pelletet denaturáló pufferben (20 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 0,1% Triton-X-100, 40 mM imidazol, 8 M urea, pH 7,5) szuszpendáltuk fel, majd újra szonikáltuk és centrifugáltuk a fentebb leírt körülmények

HIV-1 CA W23A	forward: 5'-CAC CTA GAA CTT TAA ATG CAG CGG TAA AAG TAG TAG AAG AGA AGG-3' reverse: 5'- CCT TCT CTT CTA CTA CTT TTA CCG CTG CAT TTA AAG TTC TAG GTG-3'
HIV-1 CA A77P	forward: 5'-GAC CAT CAA TGA GGA ACC TGC AGA ATG GGA TAG AG-3' reverse: 5'-CTC TAT CCC ATT CTG CAG GTT CCT CAT TGA TGG TC-3'
HIV-1 CA A78V	forward: 5'-CCA TCA ATG AGG AAG CTG TAG AAT GGG ATA GAG TAC-3' reverse: 5'-GTA CTC TAT CCC ATT CTA CAG CTT CCT CAT TGA TGG-3'
HIV-1 CA L189F	forward: 5'-GGA TGA CAG AAA CCT TCT TGG TCC AAA ATG CGA AC-3' reverse: 5'-GTT CGC ATT TTG GAC CAA GAA GGT TTC TGT CAT CC-3'
HIV-1 CA L189I	forward: 5'-AAT TGG ATG ACA GAA ACC ATC TTG GTC CAA AAT GCG AAC- 3' reverse: 5'-GTT CGC ATT TTG GAC CAA GAT GGT TTC TGT CAT CCA ATT-3'
HIV-1 CA L189P	forward: 5'-AAT TGG ATG ACA GAA ACC CCG TTG GTC CAA AAT GCG AAC- 3' reverse: 5'-GTT CGC ATT TTG GAC CAA CGG GGT TTC TGT CAT CCA ATT-3'

1. táblázat. A HIV-1 CA mutagenezis primerek listája

között. A felülúszót 0,22 µm pórusméretű fecskendő szűrőn (Merck, Millipore, Darmstadt, Németország) szűrtük, majd ÄKTA prime (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Egyesült Királyság) készüléken, Ni-NTA Superflow affinitás töltetet (Quiagen) tartalmazó kromatográfias oszlopra vittük fel, amit előtte CA-kötő pufferrel (20 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 0,1% Triton-X-100, 40 mM imidazol, pH 7,5) ekvibráltunk. A CA-kötő pufferrel végzett alapos mosás után a kikötődött fehérjét CA eluáló pufferben (20 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 500 mM, pH 7,5) eluáltuk. A tisztított fehérje frakciókat ioncserélt (MQ) vízzel szemben dializáltuk 4 °C-on egy éjszakán keresztül, majd Concentrator plus készülék (Eppendorf, Hamburg, Németország) segítségével koncentráltuk. A fehérje koncentrátum összetevőit gélszűréssel választottuk el Superose 12 10/300 GL gélszűrő oszlopon (GE Healthcare, Little Chalfont, Egyesült Királyság), amelyet előzőleg ekvibráló pufferrel ekvibráltunk (50 mM NaH₂PO₄, 0,15 M NaCl, pH 7,0). Az elválasztást szobahőmérsékleten, 1 ml/perc sebességgel végeztük. A preparátumok tisztaságát SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel ellenőriztük, majd a megfelelő tisztaságú mintákat dializáltuk és

koncentráltuk a fentebb leírt módszer szerint. A tisztított fehérje preparátumok koncentrációját NanoDrop készüléken (Thermo Scientific), 280 nm hullámhosszon mért elnyelésük alapján határoztuk meg.

4.3. Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia

A cirkuláris dikroizmus spektrumokat Jasco-810 spektropolariméteren mértük szobahőmérsékleten 10 mM nátrium foszfát pufferben 7,5-ös pH-n (Dr. Kurtán Tibor munkája). A CD dekonvolúciót CDSSTR analízis programmal végeztük (Compton és Johnson, 1986; Manavalan és Johnson, 1987; Sreerama és Woody, 2000), amelyek a Dichroweb honlapján (Whitmore és Wallace 2004; 2008) elérhetőek.

4.4. A rekombináns HIV-1 PR expressziója és tisztítása

A stabilizáló mutációkat tartalmazó vad-típusú HIV-1 proteázt (Louis et al. 1999; Bhuvaneshwari Mahalingam et al. 1999) kódoló plazmid Dr. John M. Louis (Laboratory of Chemical Physics, NIDDK, NIH) ajándéka volt. A fehérjét BL21 (DE3) *E. coli* sejtekben (Invitrogen) expresszáltuk. Az expressziót 1 mM IPTG (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) hozzáadásával indukáltuk, majd 3 órán keresztül, 37°C-on végeztük. A kultúrát 6 000 g-n centrifugáltuk 20 percig 4 °C-on, majd a sejteket tartalmazó pelletet, egy korábban leírt módszer szerint kezeltük (Mahalingam és mtsai, 2001). Röviden leírva, a sejteket 20 ml A pufferben (50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8,2) vettük fel, majd 100 mg/ml lizozimmal kiegészítve tártuk fel, jégen történő szonikálással. A lizátumot 20 000 g-n centrifugáltuk 20 percig 4 °C-on. A pelletet B-pufferben (A puffer kiegészítve 2 M guanidin-HCl-dal és 1% Triton X-100-zal) szuszpendáltuk, majd újra centrifugáltuk. A pelletben lévő inklúziós testeket A pufferben mostuk és ismét centrifugáltuk. Ezt az utolsó pelletet C pufferben (50 mM Tris, 5 mM EDTA, 7.5 M guanidin-HCl, pH 8,0) oldottuk, majd 0,22 µm pórusméretű fecskendő szűrőn (Millipore) szűrtük. A mintákat Superose 12 10/300 GL gélszűrő oszlopra (GE Healthcare) vittük fel, amelyet előzőleg D pufferrel ekvilibráltunk (50 mM Tris, 4 M guanidin-HCl, 5 mM EDTA pH 8,0). Az elválasztást szobahőmérsékleten, 0,5 ml/perc sebességgel végeztük. A megfelelő csúcshoz tartozó frakciókat egyesítettük, majd reverz fázisú HPLC-vel POROS 20 R2 oszlopon történt tisztítás után SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel győződünk meg a kiválasztott fehérje frakciók tisztaságáról. Az enzim foldingja többlépéses dialízissel történt, először 50 mM hangyasav oldattal (pH 2,8), majd 50 mM Na-acetát (pH 5,0) pufferrel szemben. A tisztított,

dializált fehérje koncentrációját NanoDrop készüléken (Thermo Scientific), 280 nm hullámhosszon mért elnyelésük alapján határoztuk meg.

4.5. A rekombináns CA fehérjék hasíthatóságának vizsgálata HIV-1 proteázzal

A rekombináns kapszidok (vad típus és a mutánsok is) hasításhoz a CA fehérjét (10 μ M végkoncentráció) 20:1 mólarányban inkubáltuk rekombináns HIV-1 proteázzal (0,5 μ M) PR reakció pufferben (100 mM Na-acetát, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 5,5) 4 óráig 37 °C-on, a korábban leírt módszernek megfelelően (Tözsér et al. 2003). Az inkubálás után a reakciókat kétszeres töménységű, β -merkaptóetanolt is tartalmazó, tricín-SDS mintafelvivő pufferrel állítottuk le, majd 10 percig 95 °C-on inkubáltuk. A mintákat 16 %-os, tricines, SDS-poliakrilamid géleken (Invitrogen) analizáltuk. A fragmensek hozzávetőleges molekulatömegét Precision Plus Protein Dual Xtra molekulásúly marker (BIO-RAD, Hercules, CA, USA) segítségével határoztuk meg. A tömegspektrometriás mérésekhez készített mintákat tartalmazó reakciókat azonos mennyiségű tömény hangyasav hozzáadásával állítottuk le.

4.6. CA proteolitikus fragmensek tömegspektrometriás azonosítása

A mérések előtt a mintákat ZipTip C18 töltettel ellátott pipettahegyek (Millipore) használatával tisztítottuk, hogy a PR reakció puffer komponenseit eltávolítsuk. A reakcióban keletkező fragmensek molekulatömegét és szekvenciáját Voyager DE PRO MALDI TOF készüléken (Applied Biosystems) határoztuk meg. A méréseket lineáris üzemmódban végeztük. Az eredményeket Data Explorer szoftver segítségével értékeltük ki. (A mérések a DE BMBI Proteomikai Szolgáltató Laboratóriumban készültek).

4.7. A rekombináns CA fehérjék hasíthatóságának vizsgálata limitált tripszines emésztéssel

A rekombináns kapszidokat 1:100 tripszin:CA mólarányban inkubáltuk pH 7,5-ön 2 óráig 37 °C-on egy korábban leírt reakció pufferben (Hausdorf és mtsai, 1994). A reakcióelegyek 10 μ M (végkoncentráció) rekombináns CA fehérjét és 100 nM tripszint tartalmaztak, a reakciókat 6X-os töménységű, β -merkaptóetanolt is tartalmazó, SDS mintafelvivő pufferrel állítottuk le, majd 10 percig 95 °C-on inkubáltuk. A mintákat 16 %-os SDS-poliakrilamid géleken, gélelektroforézis segítségével vizsgáltuk.

4.8. A pGEX-4T-3-CypA expressziós vektor készítése

A ciklofilin A fehérjét kódoló régiót a PPIA (NM_021130) human cDNA ORF Clone-ból (Origene, Rockville, MD, USA) szaporítottuk fel Phusion High-Fidelity DNA polimerase (New England BioLabs, Beverly, MA, USA) használatával, a következő primer pár alkalmazásával: 5'-GAGGGATCCATGGTCAACCCACCGTGTCTTCG-3' (forward) és 5'-GCGACGCGGCCGCAATT TATTCGAGTTGTCCACAGTCAG-30 (reverz). A primerek BamHI és NotI restrikciós endonukleáz hasító helyeket is tartalmaztak (aláhúzott részek). A PCR reakciót egy korábban leírt protokoll szerint végeztük el (Lee és mtsai, 2008). A PCR terméket BamHI és NotI enzimekkel emésztettük, majd a korábban ugyanezekkel az enzimekkel hasított pGEX-4T-3 plazmidba (Addgene, Cambridge, MA, USA) ligáltuk be.

4.9. A CypA-GST fúziós fehérje tisztítása

A CypA-GST fehérjét kódoló plazmidot *E.coli* B121(DE3) sejtekbe (Invitrogen) transzformáltuk, majd ezeket a sejteket használtuk az expresszióhoz, amelyet 0,1 mM IPTG hozzáadásával indukáltunk, majd a sejteket 3 órán keresztül inkubáltuk 37 °C-on. A centrifugálással elkülönített sejteket egy korábban leírt módszer szerint tártuk fel (Lee és mtsai, 2008). A lizátumot ezután egy Bio-Scale™ Mini Profinity™ GST oszlopra (BIO-RAD, Hercules, CA, USA) vittük fel, amit korábban CypA-kötő pufferrel (10 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 7,4) ekvibráltunk. Ezzel a pufferrel történt alapos mosás után a kikötődött rekombináns fehérjét CypA eluáló pufferrel (20 mM glutation, 100 mM Tris-HCl, 5mM EDTA, pH 8,0) eluáltuk az oszlopról. A tisztított fehérjét MQ vízzel szemben dializáltuk egy éjszakán át 4 °C-on, majd Concentrator Plus készülékkel beszáritottuk. A tömény fehérjét MQ vízben oldottuk be újra, majd koncentrációját NanoDrop készülékkel (Thermo Scientific) határoztuk meg 280 nm-es hullámhosszon mért elnyelésük alapján. A mintákat SDS-poliakrilamid gélelektroforézis segítségével vizsgáltuk.

4.10. His₆-HIVCA „pull-down” assay

A His₆-HIVCA fehérjét Ni-NTA mágneses agaróz gyöngyökkel (Qiagen) inkubáltuk 1 óráig 4 °C -on foszfáttal pufferelt sóoldatban (PBS), amelyet 20 mM imidazollal és 0,05 % Tween 20-al (pH 8.0) egészítettünk ki. A gyöngyökhöz kikötött His₆-HIVCA-t ezután CypA-GST fehérjével inkubáltuk PBS-ben 1 óráig 4 °C -on. A nem kötődött anyagokat mosással távolítottuk el, majd a kikötődött komplexeket „pull-down” eluáló pufferrel (50 mM NaH₂PO₄,

300 mM NaCl, 250 mM imidazol, 0.05% Tween20, pH 8.0) eluáltuk, majd 14 %-os SDS-poliakrilamid gélen ellenőriztük.

4.11. A HIV-1 vektor rendszer pMDLg/pRRE plazmidjának módosítása

A HIV-1 pszeudovírus részecskék előállításához szükséges harmadik generációs vektorrendszer (Dull és mtsai, 1998) Dr. Didier Trono (Department of Genetics and Microbiology, University of Geneva Medical School, Geneva, Svájc) ajándéka volt. A CA fehérjét kódoló szakaszt AvrII és PmlI restrikciós enzimek segítségével hasítottuk ki a pMDLg/pRRE plazmidból, majd a pT7 Blue-3 plazmid (Novagen, Madison, WI, USA) ugyanazon hasítóhelyei közé ligáltuk be. A mutagenézist a 3.2. fejezetben leírt módon végeztük el, az ugyanott bemutatott L189F mutagenézis primerek felhasználásával. A mutáció létrehozása után a génszakaszt visszaligáltuk a pMDLg/pRRE vektorba.

4.12. Vírusrészecskék előállítása

A vírusrészecskék előállításához 293T sejteket (ATCC® CRL-3216™) (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) használtunk, melyeket 10% főtális marha szérumot (FBS) (Invitrogen), 1 % L-glutamint és 1% penicillin streptomycin antibiotikumot tartalmazó Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Invitrogen) tenyésztő médiumban növesztettük. A sejteket polietilénimin (Sigma-Aldrich) segítségével transzfektáltuk egy korábban leírt protokoll szerint (Miklossy és mtsai, 2008). Röviden összefoglalva, a transzfekciót pWOX-CMV-GFP (transzfer vektor plazmid), pMDLg/pRRE (csomagoló plazmid), pRSV.rev (Rev kódoló plazmid), pMD.G (VSV-G burokfehérjét kódoló plazmid) és lazac sperma DNS (Sigma-Aldrich) felhasználásával végeztük el 1% FBS-tartalmú DMEM tápfolyadékban. Az L189F mutáns fehérjét tartalmazó vírus részecskék termeléséhez a vad típusú CA-ot kódoló pMDLg/pRRE plazmid mellett vagy helyett L189F mutáns CA-ot kódoló pMDLg/pRRE-L189F plazmidot is használtunk. A plazmidokat (Dull és mtsai, 1998) Dr. Didier Trono (University of Geneva Medical School, Genf, Svájc) bocsátotta rendelkezésünkre, amit munkacsoportunk módosított tovább (Miklossy és mtsai, 2008). A transzfekciós elegyet 6 óra elteltével tenyésztő médiumra cseréltük. A vírusrészecskéket tartalmazó kondicionált médiumot 24, 48 és 72 óra múlva gyűjtöttük, centrifugáltuk, átszűrtük 0,45 µm pórusméretű PVDF szűrőn (Millipore), majd Ultracel-100 K Amicon Ultra centrifuga szűrővel (Millipore) töményítettük, végül -70 °C-on tároltuk. A termelt pszeudovírus mennyiségét a reverz

transzkriptáz (RT) aktivitás alapján határoztuk meg kolorimetriás kit (Sigma-Aldrich, Roche) segítségével, vagy a p24 (kapszid) fehérje koncentrációját határoztuk meg HIV-1 p24 Antigen ELISA (ZeptoMetrix, MA, USA) felhasználásával.

4.13. Fertőzőképesség vizsgálata

293T sejteket 24 lyukú sejttenyésztő edényben növesztettünk a vírusrészecskék előállításánál leírt médiumban. 50% konfluencia elérése után a sejteket 10 ng kapszid fehérje tartalmú vírussal fertőztük üres DMEM-ben. 24 óra múlva a sejteken lévő tápfolyadékot kiegészítettük kétszeres FBS, antibiotikum és glutamin tartalmú DMEM-mel. A hetedik napon a sejteket felkapartuk, PBS-el mostuk és a GFP-t termelő sejtek arányának meghatározásához 10 ezer sejtet számoltunk meg áramlási citometria segítségével (FACS Calibur, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Az adatok kiértékelését FlowJo szoftver (FlowJo LLC, Ashland, OR, USA) segítségével végeztük.

4.14. Statisztikai elemzés

A statisztikai elemzéseket a GraphPad QuikCalcs ingyenes web számológép használatával (<http://graphpad.com/quickcalcs/ttest2>) végeztük el.

4.15. Transzdukció és mintagyűjtés tömegspektrometriás (MS) elemzéshez

293 T sejteket T25-ös sejttenyésztő flaskában 50 %-os konfluenciánál transzdukáltuk 5 ng RT aktivitásnak megfelelő HIV-1 pszeudovirionnal, vagy pszeudoviriont nem tartalmazó kondicionált médiummal (mock) kezeltük 4 µg/ml polibrén (Sigma-Aldrich) hozzáadásával, 1 ml-es végső térfogatban. A kondicionált médium azon sejtek felülűsóját tartalmazta, amelyek a vírusrészecskék előállításánál leírt módszerrel lettek kezelve, a vírusrészecskék előállításához szükséges plazmidok hozzáadása nélkül. Ezután a sejteket 37 °C-on inkubáltuk 5 % CO₂ tartalom mellett. 0, 4 és 12 óra elteltével a sejteket 10 percig tripszinnel kezeltük, majd jéghideg PBS-el mostuk, hogy a nem kötődött pszeudovírus részecskéket eltávolítsuk. Minden időpontban kettő minta került begyűjtésre a pszeudovírral transzdukált és a kontroll minták esetében is. A végső, sejteket tartalmazó pelleteket 4 ml cOmplete protease inhibitor koktéllal (Sigma-Aldrich) kiegészített lízis pufferben inkubáltuk (150 mM NaCl, 1.0 % Triton X-100, 0.5% nátrium deoxikolát, 0.1% SDS, 50 mM Tris, pH 8,0) 30 percig

szobahőmérsékleten. A lizátumot centrifugáltuk, a felülúszót 24 ml hideg (-20 °C) acetonnal kevertük össze, majd -20 °C-on tároltuk egy éjszakán keresztül.

4.16. A transzdukált sejtek fehérje összetételének tömegspektrometriás elemzése

A lizált sejtek fehérje tartalmát az acetonos kicsapás után beszárítottuk, majd 25 mM ammónium bikarbonát (Sigma-Aldrich) pufferben oldottuk vissza. A fehérjéket tripszines emésztésnek vetettük alá (Csósz és mtsai., 2018) és a keletkezett fragmenseket kollaborációs partnerünk (George Tsaprailis, University of Arizona, Tucson, AZ, USA) LC-MS/MS segítségével elemezte duplikátumban jelölés nélküli (label-free) kvantitálás módszerrel, minden egyes minta esetében. Az LC-MS/MS spektrumok alapján azonosított fehérje és peptid szekvenciákat Scaffold v4.4.6. (Proteome Software Inc.) szoftver segítségével ellenőriztük. A 89 %-nál nagyobb konfidenciával azonosított peptideket fogadtunk el. A fehérjéket akkor tekintettük azonosítottnak, ha legalább 2 peptiddel tudtuk azonosítani. Amennyiben a szoftver nem humánként azonosított egy fehérjét, további analízist végeztünk. A kérdéses fehérjékben azonosított peptidek szekvenciáit Protein BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) program (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) segítségével újra ellenőriztük a UniProtKB/Swiss-Prot (swissprot) adatbázisban human (taxid:9606) vagy HIV-1 (taxid:11676) szűrők, illetve blastp (protein-protein BLAST) algoritmus alkalmazásával. A humán vagy HIV-1 eredetüként is 99 %-nál nagyobb valószínűséggel megtalált fehérjéket ezután humánként ill. HIV-1 fehérjeként kezeltük, míg a más fajokhoz tartozókat kizártuk a további elemzésből. A *Rhodobacter capsulatus* citokróm c fehérje (az MS/MS mérések belső standardja), a szarvasmarha hasnyálmirigy tripszin inhibitor és szérum albumin (a sejtek tápfolyadékának összetevője), valamint a sertés eredetű tripszin (a pszeudovírus részecskék eltávolításához használt enzim) fehérjéket megtartottuk az adathalmazban, és referenciaként használtuk. A fehérjék mennyiségének meghatározása a tömegspektrometriás adatokból a normalizált MS/MS spektrumok száma alapján történt. Minden fehérje esetében az adott körülményre vonatkozó négy elemzésből származó értékek alapján kiszámolt átlaggal dolgoztunk.

4.17. A tömegspektrometriás adatok statisztikai elemzése

A statisztikai elemzéshez egy saját fejlesztésű R-szoftvert használtunk (Dr. Emri Miklós munkája), amely STRING (Franceschini és mtsai, 2012), circilize

(https://jokergoo.github.io/circlize_book/book/), lsmmeans (Lenth, 2016), matrixStats (<https://github.com/HenrikBengtsson/matrixStats>), reshape2 (Wickham, 2007) és ggplot2 (Ginestet, 2009) csomagokon alapul. Azt feltételezve, hogy a technikai ismétlésekből származó adatok Poisson eloszlást mutatnak (Marioni és mtsai, 2008) és a biológiai ismétlések nagy varianciái negatív binomiális eloszlással modellezhetők (Robinson és Oshlack, 2010), egy módosított általános lineáris modellt használtunk a mért fehérje adatok csoport szintű eltéréseinek leírására a 4 és 12 órás időpontokban.

5. EREDMÉNYEK

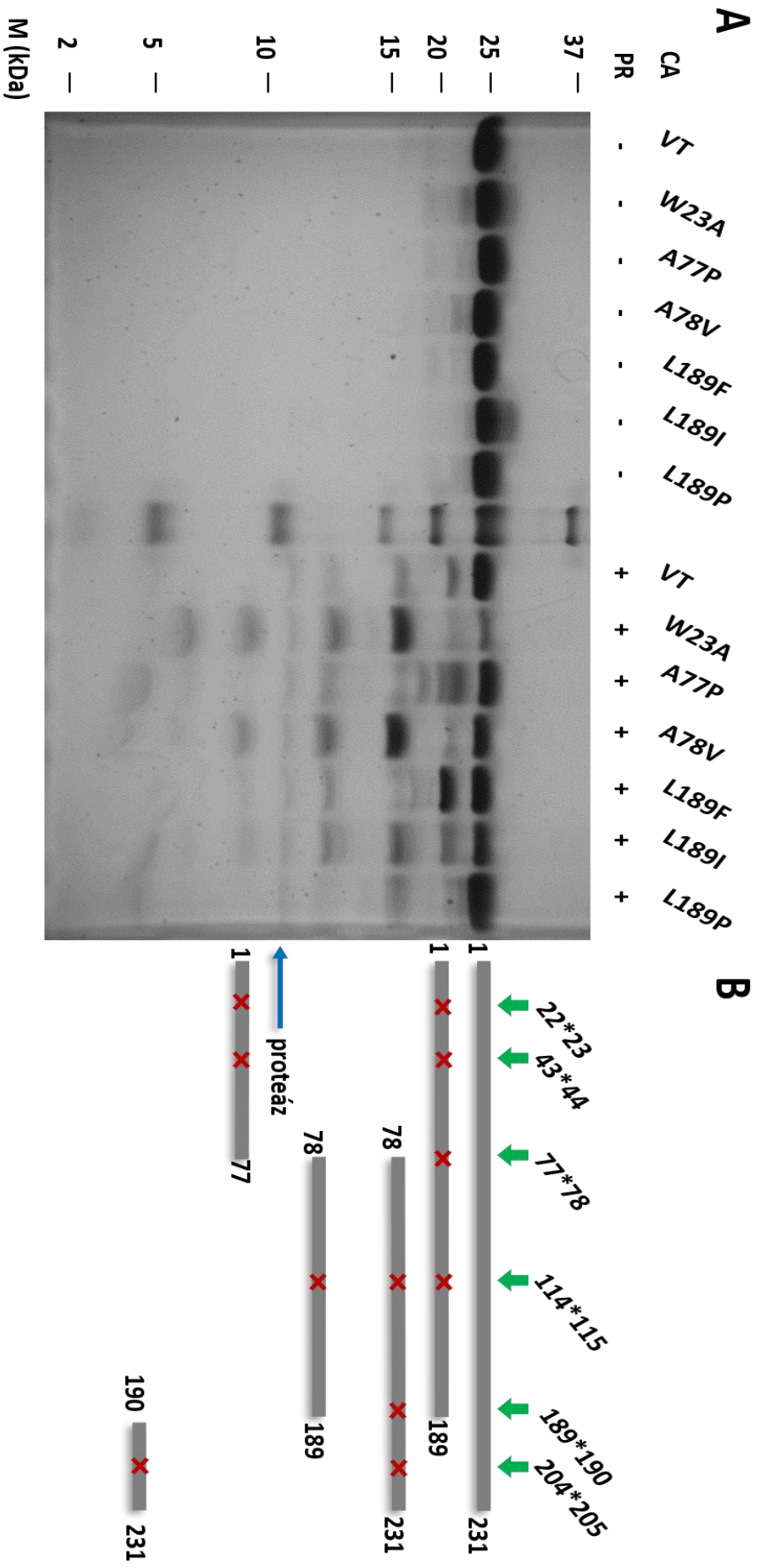
5.1. A HIV-1 kapszid fehérje másodlagos szerkezetének *in silico* vizsgálata

A fehérje hasítási helyein létrehozott aminosav cserék megváltoztathatják a fehérje másodlagos vagy harmadlagos szerkezetét, így a megváltozott hasítóhelyek mellett ezek az eltérések is hozzájárulhatnak a fehérjék működésében esetlegesen megfigyelhető változások előidézéséhez (pl. aberráns kapszid mag struktúrák kialakulása). A CA HIV-1 PR általi hasítását 5,5-ös pH-n hajtottuk végre, amely megfelel az endoszómák savas pH-jának, illetve ahol a CA olvadt gombolyag szerkezetet vesz fel, ezzel lehetővé téve a hasítóhelyekhez történő hozzáférést a PR számára. Ilyen körülmények között azonban nem kapunk információt szerkezetben esetlegesen bekövetkező változásokról.

A mutációk fehérje szerkezetre kifejtett hatását az SDM szerver segítségével becsültük meg, amely egy stabilitási pontot számol a mutáns és vad típusú fehérje szabadenergiájában lévő eltérésekkel analóg módon (Worth és mtsai, 2011) (Dr. Mótyán János munkája). A legmagasabb értékeket az A77P és L189P mutánsokra becsültük, ami arra utalt, hogy ezek a mutációk nagymértékben destabilizálják a fehérjék szerkezetét, valamint azok hibás működését is előidézhetik. Az L189I mutációt semlegesnek, míg az A78V és L189F mutációkat kis mértékben destabilizálónak becsültük, amelyek elenyésző mértékű változást okozhatnak a fehérje szerkezetében. A másodlagos szerkezet becslése nem jósolt semmiféle változást a W23A mutáció esetében, és az SDM szerver is csak kismértékű szerkezet destabilizáló hatást feltételezett.

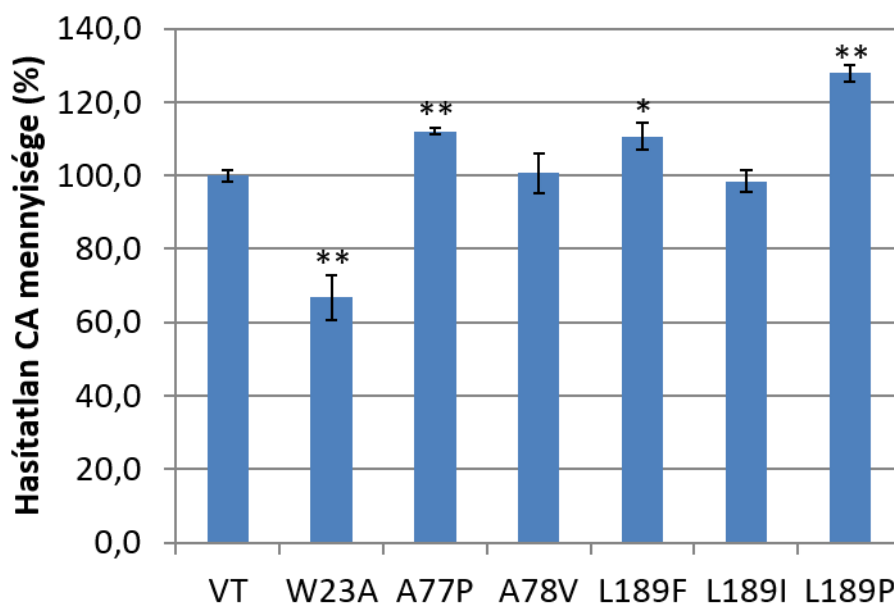
5.2. A vad típusú és mutáns HIV-1 kapszid fehérjék hasítása HIV-1 proteázzal

A módosított proteolitikus hasítóhelyek *in vitro* CA hasításra kifejtett hatásának meghatározásához olyan mutációkat terveztünk a HIV-1 PR specificitási jellemzőinek figyelembevételével, amelyekben a hasítóhelyek P1 (A77P, L189F, L189I és L189P) vagy a P1' (W23A és A78V) aminosavrészeit kicseréltük. A mutáns, rekombináns CA fehérjéket *E. coli* baktériumban expresszáltuk, majd a megfelelő tisztítási lépések után rekombináns, vad típusú HIV-1 proteázzal emésztettük (8. A ábra).



8. ábra. A vad típusú és mutáns HIV-1 CA fehérjék hasítása HIV-1 proteázzal (Tóth és mtsai., 2016 alapján). (A) Az emésztett CA fehérjék gélelektroforézis képe. A rekombináns CA fehérjéket a HIV-1 PR-al (+), vagy anélkül (-) inkubáltuk 5,5 ós pH-n 37 C-on 4 óráig, majd a reakció elegyeket SDS-pollakrilamid gélben vizsgáltuk. Az M a molekulatömeg standardot (Precision Plus Dual Xtra standard) jelzi. (B) A proteáz által generált proteolitikus termékek sematikus rajza látható, amelyen zöld nyíljal jelöltük a módosított hasítónyelveket és piros kereszttel azokat a helyeket ahol a hasítás elmaradása hozzájárul az aktuális fragmens megjelenéséhez.

Mivel a HIV-1 PR S1- és S1' kötőhelyei egyaránt nagyok és hidrofóbak, azt feltételeztük, hogy a P1' helyen lévő alanin aminosavréssz valinra történő cseréje az Ala77 és Ala78 (A78V) valamint a P1 helyen lévő leucin aminosavréssz fenilalaninra (L189F) történő cseréje a Leu189 és Leu190 aminosavrésszek közötti hasítóhelyeknél elősegíti a fehérje proteolízisét. A P1 helyeken lévő aminosavrésszek prolinra (A77P és L189P) vagy izoleucinra (L189I) történő cseréje azonban várakozásaink szerint gátolja a hasítást ezen a helyen, ugyanis egyetlen természetes vagy ismert mesterségesen létrehozott hasítóhely sem tartalmazza ezeket az aminosavrésszeket ebben a pozícióban. Ezen mutációk mellett vizsgáltuk a Trp23Ala mutánst is, amely korábbi kísérletekben fokozottan érzékenynek bizonyult a proteolitikus hasítással szemben (Tang és mtsai, 2001), feltételezhetően a triptofán aminosavréssz túlságosan nagy ahhoz, hogy optimálisan illeszkedjen a HIV-1 PR S1'-kötőhelyére.



9. ábra. A hasítatlan CA mennyiségének összehasonlítása a proteolitikus emésztés után (Tóth és mtsai., 2016 alapján). Az értékeket 3 független kísérletből származó adatokból számoltuk. A hasítatlan CA mennyiségét denzitometriás elemzéssel határoztuk meg, ahol az értékeket a PR nélkül inkubált CA mennyiségekhez hasonlítottuk. A vad típusra (VT) számolt értéket 100%-nak tekintettük. A hibásávok szórását ($\pm SD$, $n=3$) jelölnék. * $P < 0,01$, ** $P < 0,001$.

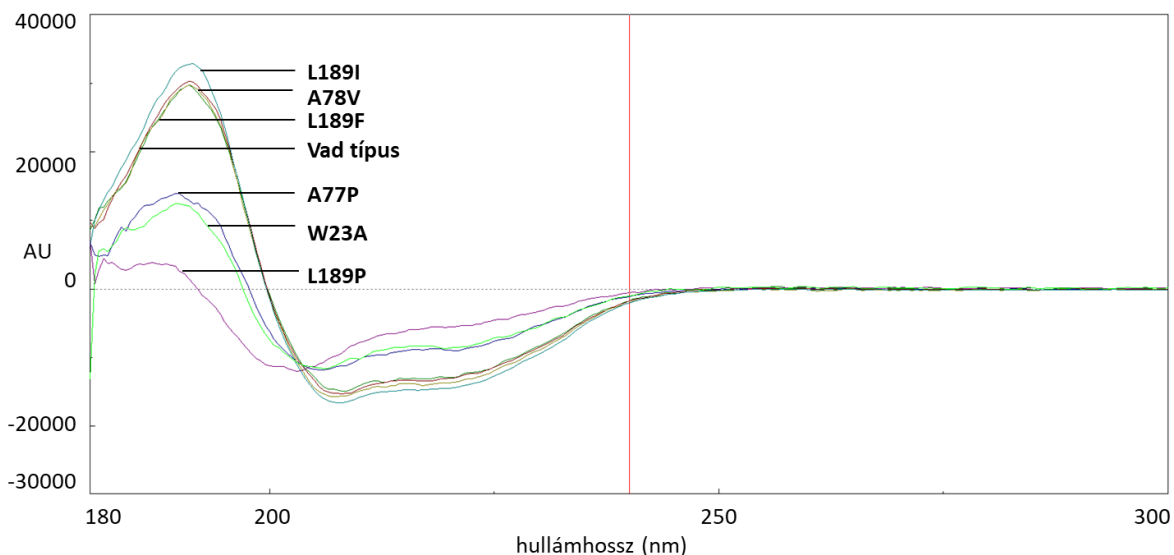
Várakozásunknak megfelelően az A77P és L189P mutációk gátolták a proteolitikus hasítást ezeken a hasítóhelyeken, ahogy azt megfigyeltük a hasítóhelyekhez köthető proteolitikus termékeknek (8.B ábra) megfelelő méretű sávok intenzitásának változásából (az

A77P mutánsnál a 78-231 fragmens mennyisége csökken, valamint az 1-189 fragmens mennyisége növekszik, míg L189P esetében az 1-189 fragmens eltűnése figyelhető meg). A W23A mutáns CA fokozottan érzékenynek bizonyult a proteolitikus hasítással szemben, ez a megfigyelés megerősíti a korábban közölt eredményeket (Tang és mtsai, 2001). Az A78V és L189F mutánsok szintén érzékenyebbnak bizonyultak a proteolitikus hasítással szemben, ahogyan azt láthatjuk a hasítóhelyekhez köthető fragmensek (78–231 és 1–189 fragmens) mennyiségének növekedéséből, jóllehet az L189F mutáns összességében vett hasítása csökkent (9. ábra), míg a reakció végén megmaradt A78V CA mennyisége nem mutatott szignifikáns eltérést a vad típusú kapszidhoz viszonyítva. Meglepő módon az L189I mutáció láthatóan nem gátolta a hasítást a hasítóhelyen.

5.3. A vad típusú és mutáns HIV-1 kapszid fehérjék másodlagos szerkezetének CD spektroszkópiás vizsgálata

CD spektroszkópia segítségével vizsgáltuk a fehérjék szerkezetét, hogy meghatározzuk a hasítóhely mutációk hatását a CA fehérje szerkezetére. A 180-tól 300 nm-ig terjedő tartományban vizsgáltuk az egyes fehérjékhez tartozó spektrumok molekuláris ellipticitását (10. ábra), majd a mutáns CA fehérjék spektrumait a vad típusú CA fehérje spektrumához hasonlítottuk. A CD spektrumokat a CDSSTR analízis program segítségével elemeztük, amelyet a 2. táblázatban összesítettünk. Ezeket a spektrumokat 7,5-ös pH-n vettük fel, ahol a CA fehérje fenntartja szerkezeti épségét (Misselwitz és mtsai, 1995; Ehrlich és mtsai, 2001).

A vad típusú CA fehérje pozitív ellipticitást mutatott, amely 190 nm-en érte el maximumát és egy határozott negatív ellipticitást, amely 208 nm-en érte el minimumát, valamint egy 220 nm-nél megjelenő vállat is megfigyelhetünk. A spektrum metszéspontja 200 nm-nél található (9. ábra). A másodlagos szerkezeti elemek eloszlása összhangban van a hexahisztidinnel kapcsolt CA fehérjéről korábban közölt, 7,5-os pH-n mért eredményekkel (Gitti et al. 1996; Gamble et al. 1997; Misselwitz et al. 1995; Hausdorf et al. 1994) és a becslésekkel, amelyeket a vad típusú fehérje aminosav szekvenciája alapján végeztünk (2. táblázat). Az A78V és L189F mutánsok spektruma a vad típusúhoz nagyban hasonló tulajdonságokkal rendelkezett, míg az L189I mutáns esetében a spektrum némileg magasabb maximummal rendelkezik 191 nm-en. A W23A, A77P és L189P mutánsok spektruma számos tulajdonságában eltér a vad típusútól. A spektrumok nagymértékben csökkent maximumai és minimumai, valamint eltolódott metszéspontjai a másodlagos szerkezetek különböző mértékű eltolódását jelzik.



10. ábra. A rekombináns HIV-1 CA fehérje és mutánsainak cirkuláris dikroizmus spektruma a közeli UV tartományban 7,5-os pH-n (Tóth és mtsai., 2016 alapján). A kivétta fényút hossza 0,02 cm volt.

A CD spektroszkópiás mérések eredményei alapján összefoglalásként elmondhatjuk, hogy az A78V, L189F és L189I mutánsok szerkezete csak kis különbségeket mutat, azok a vad típushoz nagyon hasonlóak. A W23A és A77P mutánsok kifejezettebb változást mutattak a másodlagos szerkezetek eloszlásának tekintetében, az L189P CA mutáns szerkezete pedig nagymértékben különbözik a túlnyomóan α -helikális szerkezettel rendelkező vad típusú kapszid szerkezetétől (2. táblázat).

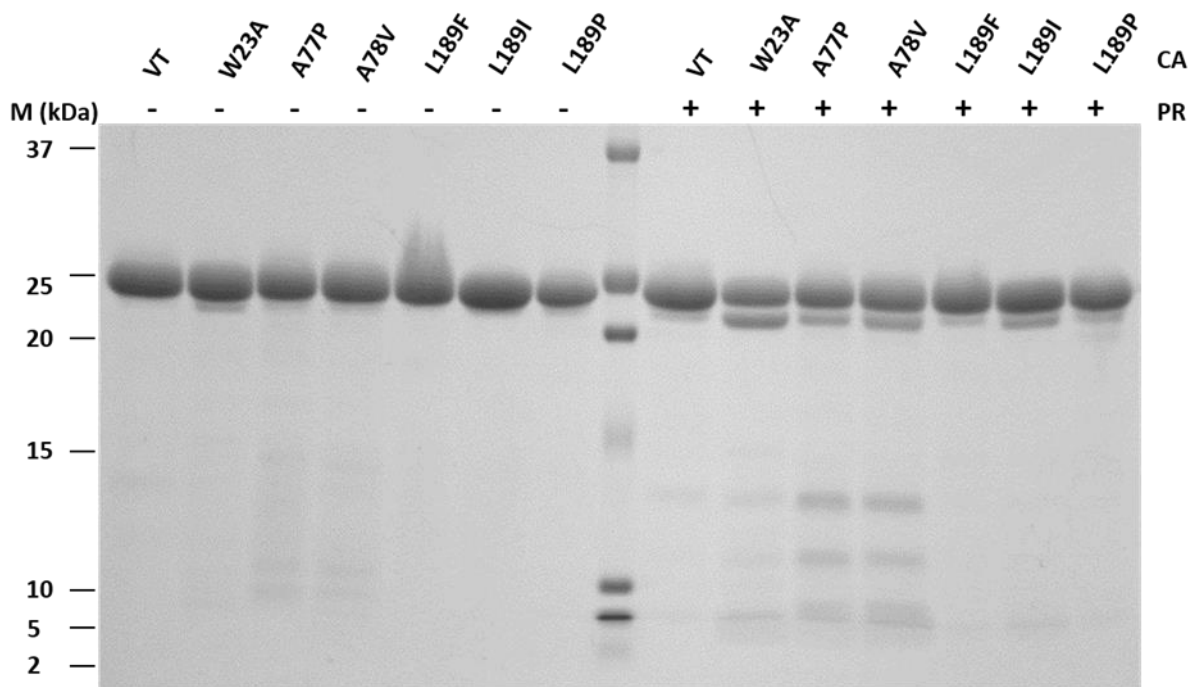
	Kristályszerkezet	Másodlagos szerk. becslés	CD spektroszkópia						
	vad típus	vad típus	vad típus	W23A	A77P	A78V	L189F	L189I	L189P
α -hélix	57	52	48	31	31	48	48	53	17
β -redő	3	11	12	19	18	11	11	11	27
Hurok	10	8	15	20	21	16	16	13	22
Rendezetlen	30	29	25	30	30	25	25	23	34

2. táblázat. A vad típusú és mutáns HIV-1 kapszid fehérjék másodlagos szerkezetének szerveződése 7,5-ös pH-n (Tóth és mtsai., 2016 alapján). A másodlagos szerkezeti elemek százalékos arányát a CD spektroszkópiás mérések eredményei alapján határoztuk meg. A táblázatban feltüntetett értékek a vad típusú HIV-1 kapszid fehérje kristályszerkezetén (3NTE.pdb) és a másodlagos szerkezet becslés (SOPMA) eredményein alapulnak.

A mutációk becsült hatásai általában összhangban voltak a CD spektroszkópiás mérések eredményeivel. Az A77P és L189P mutáns CA fehérjékre becsült nagymértékű változásokat a CD spektroszkópiás mérések megerősítették. Az A77P, L189F és L189I mutánsokra becsült hatások javarészt megegyeztek a kísérletesen meghatározott eredményekkel: míg az L189I mutáns másodlagos szerkezeti elemeinek megoszlása nagyon hasonlít a vad típusú kapszidéhoz, az A78V és L189F mutánsok mindössze kis mértékben különböznek attól.

5.4. A vad típusú és mutáns HIV-1 kapszid fehérjék tripszines emésztése

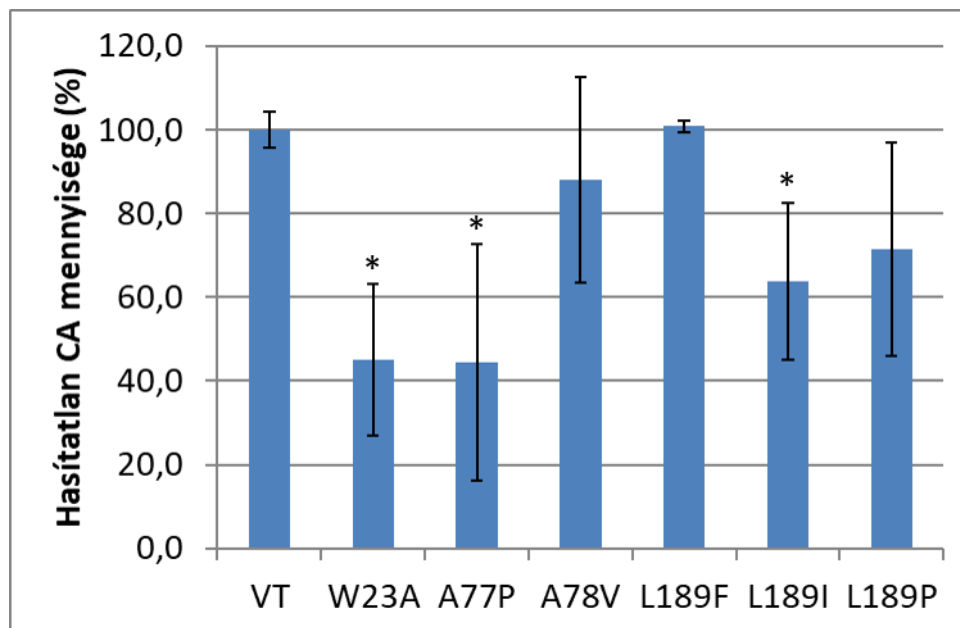
A HIV-1 CA fehérjével végzett korábbi kísérletek alapján arra lehetett következtetni, hogy a tripszines emésztésnek kitett területek elengedhetetlenül fontosak a monomerek összekapcsolódásához és a tripszines hasítással szemben mutatott érzékenység fokozódása olyan CA oligomerek kialakulásához vezet, amelyek *in vitro* rendellenes kapszidokhoz hasonló szerkezetek kialakulását idézik elő (Ehrlich és mtsai, 1994).



11. ábra. A rekombináns vad típusú és mutáns HIV-1 CA fehérjék tripszines emésztésének reprezentatív SDS gélelektroforézis képe (Tóth és mtsai., 2016 alapján). A rekombináns CA fehérjéket tripszinnel (+), vagy anélkül (-) inkubáltuk 2 órán keresztül, 37 °C-on, 7,5-ös pH-n. Az M a molekulatömeg standardot jelöli (Precision Plus Dual Xtra Standard).

Tanulmányoztuk a tripszin hasítóhelyek hozzáférhetőségét azért is, hogy megbecsüljük a vad típusú és mutáns kapszid monomerek között esetlegesen megjelenő szerkezeti különbségeket. Azonos mennyiségű fehérjét korlátozott idejű proteolízisnek vetettünk alá tripszin jelenlétében a CD spektroszkópiás mérésekhez használt körülményekkel megegyezően (pH 7,5), majd a reakcióelegyeket SDS-poliakrilamid gélelektroforézis segítségével vizsgáltuk (11. ábra).

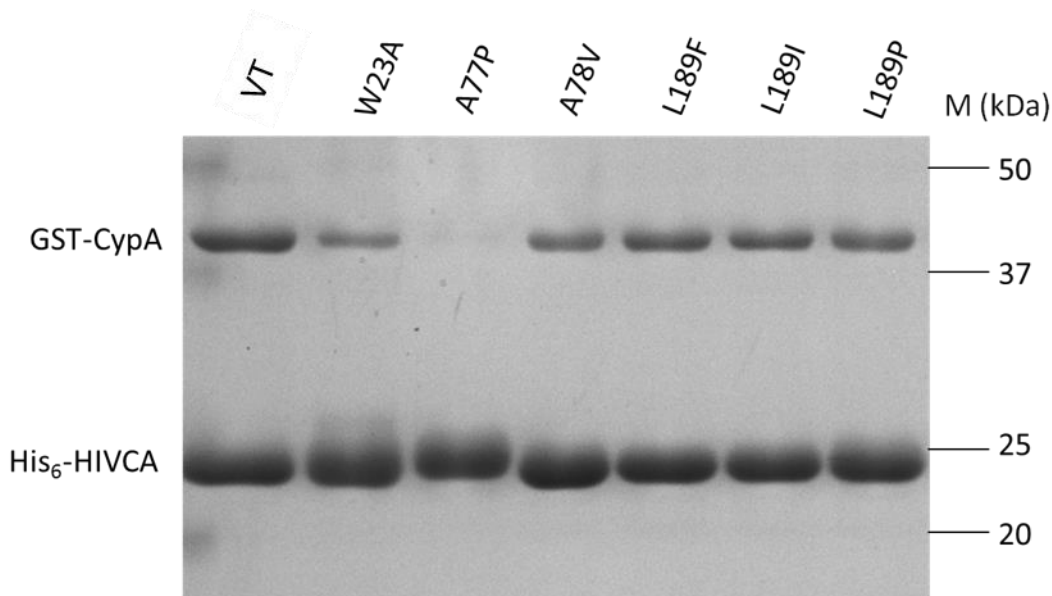
A reakció végén visszamaradt hasítatlan CA mennyiségi elemzése alapján A78V, L189F és L189P mutánsok esetében a tripszines emésztés hatékonysága a vad típusú CA fehérjéhez hasonlóan bizonyult, nem figyeltünk meg szignifikáns különbséget a hasítatlan CA mennyiségében (12. ábra). A W23A, A77P és L189I mutánsok esetében azonban a reakció végén megmaradt hasítatlan CA fehérje mennyisége szignifikáns csökkenést mutatott, vagyis ezek a mutáns CA fehérjék fokozottan érzékenyek a tripszines hasítással szemben a vad típushoz viszonyítva.



12. ábra. A tripszines emésztés után maradt hasítatlan CA mennyiségének összehasonlítása (Tóth és mtsai., 2016 alapján). Az értékeket 3 független kísérletből származó adatokból számoltuk. A hasítatlan CA mennyiségét denzitometriás elemzéssel határoztuk meg, ahol az értékeket a tripszin nélkül inkubált CA mennyiségekhez hasonlítottuk. A vad típusra (VT) számolt értéket 100%-nak tekintettük. A hibasávok szórást $\pm SD$ ($n=3$) jelölnek. * $P < 0,01$.

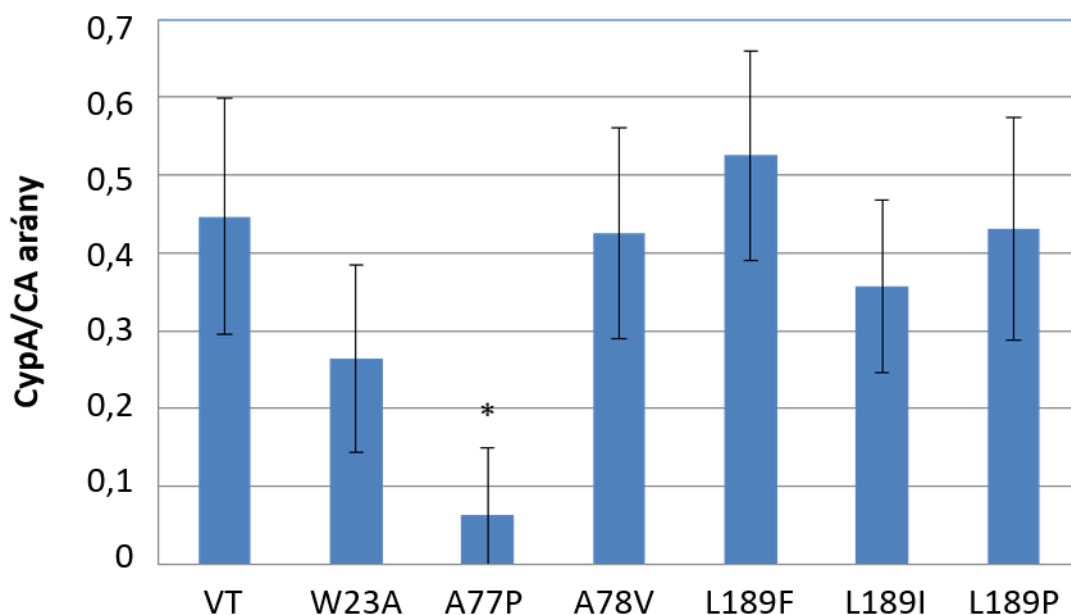
5.5. His₆-HIVCA és CypA-GST rekombináns fehérjék kölcsönhatásának vizsgálata „pull-down” technikával

A CypA fehérje kötődése a CA fehérjéhez bizonyos körülmények között elengedhetetlen fontosságú a dekapozidáció folyamatának megfelelő lefolyásához a HIV-1 fertőzés korai fázisában. Megvizsgáltuk, vajon a CA fehérje mutációi befolyásolják-e a CA-CypA kölcsönhatást és in vitro vizsgáltuk a kötődés hatékonyságát. A tisztított His₆-HIVCA és CypA-GST fehérjéket „pull-down” assay-nek vetettük alá, majd SDS-poliakrilamid gélelektroforézis segítségével vizsgáltuk az eluált fehérje komplexeket (13. ábra).



13. ábra. His₆-HIVCA és CypA-GST fehérjék „pull-down” vizsgálatának reprezentatív SDS-gélelektroforézis képe (Tóth és mtsai, 2016 alapján). Az M a molekulatömeg standard-ot (Precision Plus Dual Xtra Standard) jelöli.

A CypA fehérjéhez kapcsolódott W23A, A78V, L189F, L189I és L189P mutáns kapszidok mennyisége nem mutatott szignifikáns változást, míg az A77P mutáns CA fehérje nagymértékben csökkent CypA kötő képességgel rendelkezett a vad típusú CA fehérjéhez viszonyítva (14. ábra).

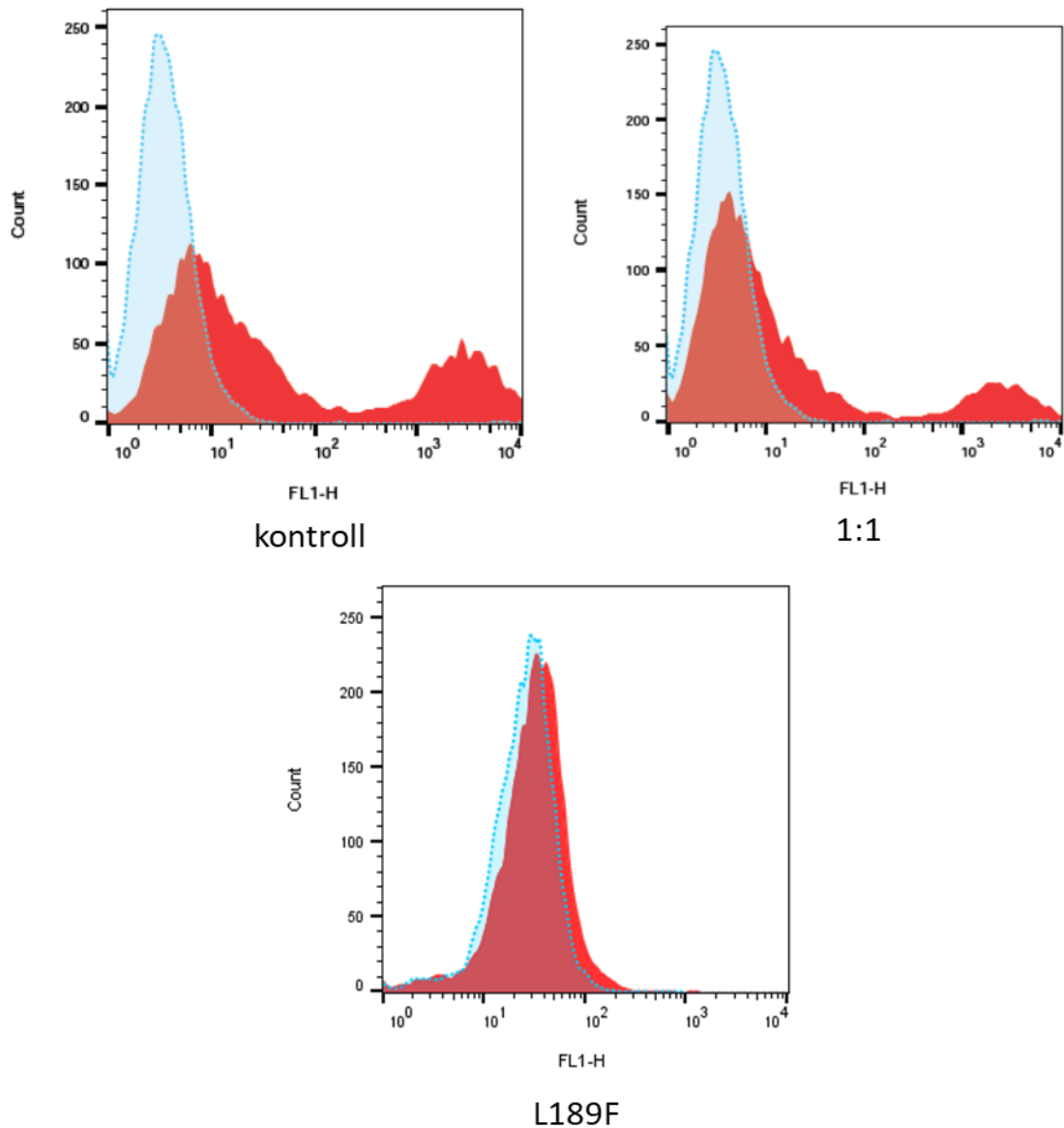


14. ábra. A rekombináns HIV-1 kapszid fehérjék CypA kötő képességének összehasonlítása (Tóth és mtsai., 2016 alapján). Az értékeket 3 független kísérletből származó adatokból számoltuk. A hasítatlan CA mennyiségét denzitometriás elemzéssel határoztuk meg, majd a fehérjék arányát oszlop diagramon ábráztuk. A hibasávok szórást $\pm SD$ ($n=3$) jelölnék. * $P<0,01$.

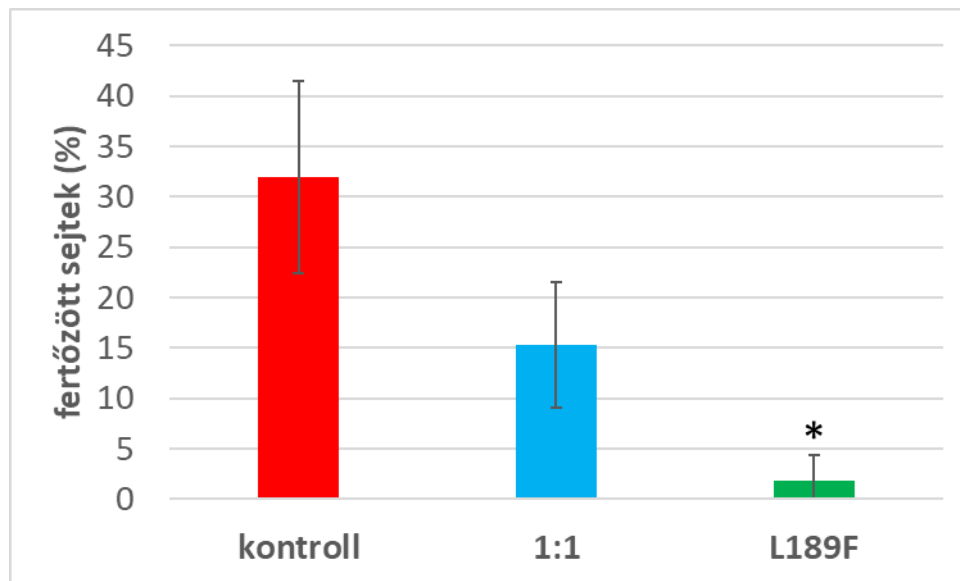
5.6. Vad típusú és L189F mutáns CA fehérjéket hordozó pszeudovírus részecskék fertőzőképességének vizsgálata

A vad típusú és mutáns CA fehérjét is tartalmazó vírus részecskék fertőzőképességének vizsgálatához egy harmadik generációs HIV-1 vektorrendszert használtunk fel, amely a GFP marker gén bejuttatására képes. A pMDLg/pRRE plazmid CA fehérjét kódoló részét pT7 Blue-3 plazmidba klónoztuk, majd a CA szekvenciáját helyspecifikus mutagenézissel módosítottuk és a mutáns szekvenciát visszajuttattuk az eredeti plazmidba. Ezután 293T sejteket transzfektáltunk az L189F és a vad típusú kapszidot kódoló plazmidok különböző arányú (1:0, 1:1 és 0:1) keverékével. A termelődött vírus oldatok p24 koncentrációját meghatároztuk, majd 293T sejteket azonos p24 mennyiséget tartalmazó pszeudovírussal transzdukáltuk. Egy hét után a GFP-t expresszáló sejtek számát áramlási citométerrel határoztuk meg. A kontroll fertőzéseknél a vad típusú CA fehérjét kódoló plazmid mellett azonos mennyiségű lazac sperma DNS-t használtunk, melyben a sejtek 32 %-a fertőződött meg (15-16. ábra). Az L189F mutáns kapszidot kódoló plazmid mennyiségének növelése csökkentette a fertőzött sejtek mennyiségét

1:1 arány esetében 15 %-ra, a kizárólag L189F kapszidot kódoló plazmid használata esetén pedig 2 %-ra csökkent a GFP pozitív sejtek száma (15-16. ábra).



15. ábra. Csak vad típusú (kontroll), egyenlő arányban vad típusú és L189F kapszidot (1:1), vagy csak L189F kapszidot hordozó vírusokkal fertőzött 293T-sejtek FACS-analízisének reprezentatív hisztogramjai. Az ábrán a mock fertőzött sejtek populációját világoskék szaggatott vonal jelzi.



16. ábra. Csak vad típusú, egyenlő arányban vad típusú és L189F kapszidot, vagy csak L189F kapszidot hordozó vírusokkal fertőzött 293T-sejtek FACS-analízisének oszlopdiagramja. A hibasávok szórást $\pm SD$ ($n=3$) jelölnék. * $P < 0,01$

5.7. A lentivirális vektorral történő transzdukció hatására bekövetkező fehérje szintű változások tömegspektrometriás vizsgálata a fertőzés korai fázisában

Kísérletünk célja az volt, hogy egy HIV-1 alapú vektorrendszer felhasználásával vizsgáljuk a gazdasejt fehérje összetételében bekövetkező változásokat a pszeudovírus részecskékkel történő transzdukció korai szakaszában. Kísérletünk során 293T sejteket transzdukáltunk vesicular stomatitis vírus G-fehérjével (VSV-G) pszeidotipizált HIV-1 vírussal, majd a sejtek lizátumát a transzdukció kezdetétől számított 0, 4 és 12 óra elteltével begyűjtöttük és jelölés nélküli kvantitálás alkalmazásával vizsgáltuk a fehérje szintű változásokat. Minden időpontban két minta került begyűjtésre a pszeudovírossal transzdukált és a kontroll minták esetében is, majd ezeket a mintákat kétszer mértük le, így minden időpontban 2 biológiai és 2 technikai ismétlésből származó adat állt rendelkezésünkre. A tömegspektrometriás mérésekből származó adatokat feltöltöttük a publikusan hozzáférhető ProteomeXchange adatbázisba (PXD010436 <https://doi.org/10.6019/PXD010436>).

A tömegspektrometriás analízisek során azonosított fehérjéket tartalmazó listát manuálisan ellenőriztük és a nem-humán, illetve nem-virális eredetűnek azonosított fehérjék esetében a mérésekből azonosított peptidok szekvenciáját ellenőriztük. Ezek többségében tévesen lettek nem-humán eredetű fehérjéként azonosítva, így ezeket javítottunk, azonban

néhány esetben az azonosított peptidek szekvenciái egyik humán vagy virális fehérjével sem mutattak egyezést, ami miatt ezeket kizártuk a további elemzésből. A *Rhodobacter capsulatus* citokróm c, szarvasmarha hasnyálmirigy tripszin inhibitor, szarvasmarha szérum albumin és a sertés eredetű tripszin fehérjéket a mennyiségi elemzéshez szolgáló referenciaként megtartottuk, de a további számításokhoz nem használtuk fel. A fehérjék mennyiségének meghatározása a tömegspektrometriás adatokból az MS/MS spektrumok száma alapján történt. Minden fehérje esetében az adott körülményre vonatkozó négy elemzésből származó értékek alapján kiszámolt átlaggal dolgoztunk.

5.8. A tömegspektrometriás adatok statisztikai elemzése

A mennyiségi elemzés után csak azokat a fehérjéket vetettük alá statisztikai elemzésnek, amelyek jelenlétét az egy adott mintához tartozó négy ismétlésből legalább két alkalommal ki tudtuk mutatni és más időpontban, illetve más kezelés következményeképpen ez nem volt lehetséges. Ezzel a módszerrel 25 olyan fehérjét azonosítottunk (3. táblázat) a transzdukált sejtekben, amelyek mennyisége valamelyik mintavételi időpontban eltér a kontrolltól. A HIST1H1E, HNRNPL, PRRC2A és a TRIM28 fehérjék csak a transzdukció után 4 órával voltak jelen a sejtekben.

4 órával a transzdukció után a CSDA, EEF1A1, EEF1D, HN1, NPM1, PGAM1 és SRSF6 fehérjék mennyisége szignifikánsan növekedett, míg a HIST1H1D és HSPA5 mennyisége szignifikánsan csökkent a transzdukált sejtekben a kontroll sejtek 4 órás időpontjához, valamint a 0 órás időponthoz képest (17. ábra).

Más fehérjéket 12 órával a fertőzés után nem tudtunk kimutatni a transzdukált sejtekben, viszont más időpontokban egyértelműen jelen voltak (ALYREF, CCDC86, CSDA, COX5A, HN1, MYL6, PPIF, SEPT2, SRSF6, TCOF1 és TPM3 fehérjék) (18. ábra). Ezek eltűnése arra utalhat, hogy 12 órával a fertőzés kezdete után a bejutott pszeudovírus részecskék már jelentős kontrollt gyakorolnak a gazdasejt fehérje expressziójára. Néhány fehérje (CSDA, HN1 és SRSF6) mennyisége a 4. órában jelentősen megemelkedett, majd újabb 8 óra elteltével már nem volt kimutatható a transzdukált sejtek lizátumában. A transzdukció után 12 órával a COX6B1 és PDIA3 fehérjék mennyisége szignifikánsan nőtt, míg az EEF2 és GAPDH fehérjék mennyisége csökkent a transzdukált sejtekben (18. ábra).

Név	Teljes Név	Lokalizáció	Funkció
ALYREF	Aly/REF export factor	sejtmag	RNS kötés, export
CCDC86	Coiled-Coil Domain Containing 86	ismeretlen	Ismeretlen
COX5A	Cytochrome c oxidase e subunit 5a	mitokondrium	Energiatermelés
COX6B1	Cytochrome c oxidase subunit 6B1	mitokondrium	Energiatermelés
CSDA	DNA-binding protein A	sejtmag, citoplazma	DNS kötés
EEF1A1	Elongation factor 1- alpha 1	sejtmag	RNS kötés
EEF1D	Elongation factor 1- delta	sejtmag	DNS kötés, GDP-GTP csere
EEF2	Elongation factor 2	sejtmag	RNS kötés
GAPDH	Glyceraldehyde 3- phosphate dehydrogenase	citoplazma	glikolízis, transzkripció, apoptózis, vezikuláris transzport, axonális transzport
HIST1H1D	Histone H1.3	sejtmag	a nukleoszóma és a linker DNS szakaszok összekötése, magasabb szintű szerkezetek létrehozása.
HIST1H1E	Histone H1.4	sejtmag	ld. HIST1H1D
HN1	Hematological and neurological expressed 1 protein	sejtmag, citoplazma	jelátvitel szabályozása
HNRNPL	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	sejtmag	RNS kötés, transzkripció szabályozása
HSPA5	Endoplasmic reticulum chaperone BiP	ER	fehérje folding
MYL6	Myosin light polypeptide 6	citoszkeleton, citoplazma, extracelluláris tér	A miozin szabályozó könnyű lánc fehérjéje
NPM1	Nucleophosmin	sejtmag	RNS kötés, fehérje folding, hiszton összeszerelődés, sejtsztódás

3. táblázat. A transzdukált sejtekben szignifikáns változást mutató fehérjék.

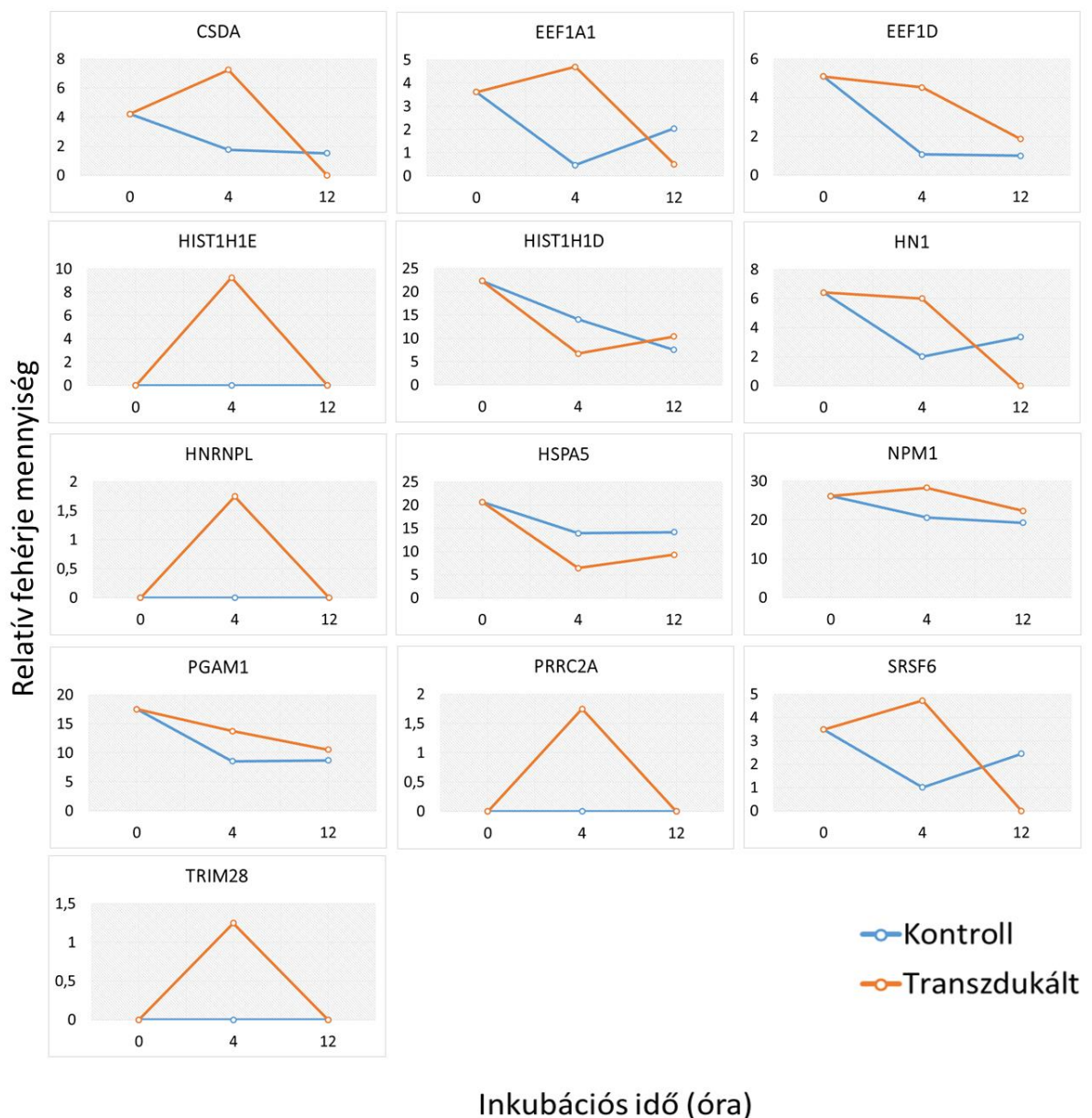
PDIA3	Protein disulfide-isomerase A3	endoplazmatikus retikulum	fehérjékben található diszulfid hidak átrendezése
PGAM1	Phosphoglycerate mutase 1	citoplazma, extracelluláris tér	3- és 2-phosphoglycerát átrendeződés
PPIF	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase F, mitochondrial	mitokondrium	fehérje folding
PRRC2A	Protein PRRC2A	sejtmag	mRNS splicing (valószínűleg)
SEPT2	Septin-2	citoplazma	filament képződés
SRSF6	Serine/arginine-rich splicing factor 6	sejtmag	RNS kötés, mRNS splicing
TCOF1	Treacle protein	sejtmag	RNS kötés
TPM3	Tropomyosin alpha-3 chain	citoszkeleton	aktin filamentum stabilizáció
TRIM28	Transcription intermediary factor 1-beta	sejtmag	DNS kötés, transzkripció szabályozása

3. táblázat. *A transzdukált sejtekben szignifikáns változást mutató fehérjék (folytatás).*

Ha a szignifikáns változást mutató fehérjék funkcióit vizsgáljuk, azt mondhatjuk, hogy 4 órával a fertőzés kezdete után emelkedik az RNS-kötő fehérjék mennyisége, amely aztán a 12 órás időpontban lecsökken. Átmeneti fehérje mennyiség növekedést a génextpresszió változása mellett okozhat a virális és gazdasejt fehérjék kapcsolatának stabilizáló hatása, valamint a fehérje lebontás sebességének a csökkenése is.

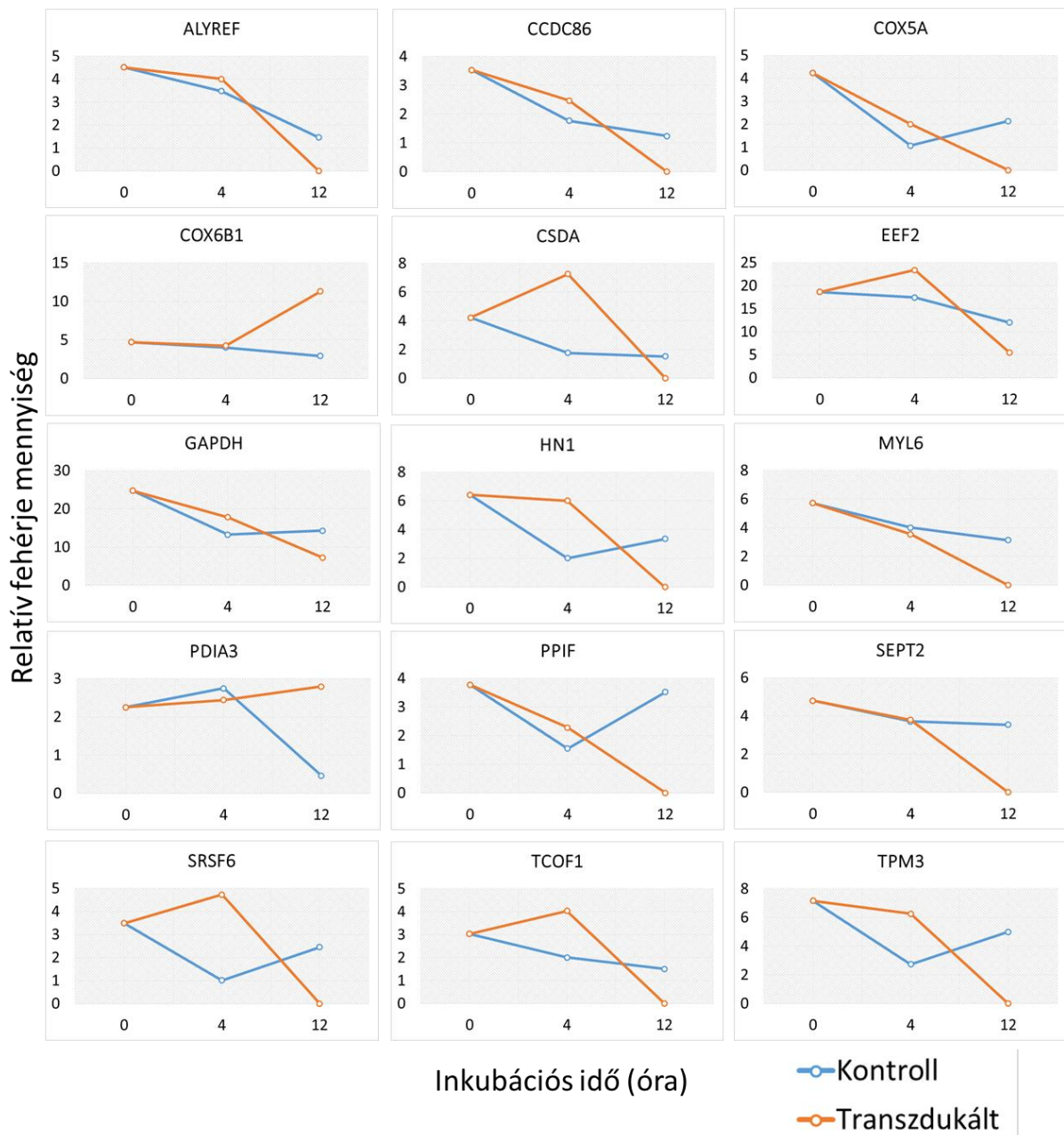
5.9. A változást mutató gazdafehérjék kapcsolata a HIV-1 fehérjéivel és életciklusával

A HIV-1 replikációja nagymértékben függ a gazdasejt saját fehérjéitől, ezért vizsgálatunkban célul tűztük ki, hogy tömegspektrometriás módszerrel azonosítsunk olyan fehérjéket, amelyek valamilyen módon befolyásolják a replikációt a vírusfertőzés korai szakaszában. Az azonosított fehérjék közül egy kivételével valamennyit kötötték valamilyen módon a HIV-1 életciklusához az irodalomban, azonban számos esetben pontos szerepük a mai napig nem tisztázott.



17. ábra. A HIV-1 pszeudovírussal transzdukált mintákban 4 óra inkubáció után szignifikáns változást ($p < 0,05$) mutató fehérjék relatív mennyiségei a kontrollhoz hasonlítva (Csősz és mtsai, 2019 alapján.). Az x tengelyen a mintavételi időpontok, az y tengelyen pedig a relatív fehérje mennyiségek láthatók. A diagramokban kék színnel jelöltük a kontroll mintát, sárgával pedig a HIV-1 pszeudovírussal kezelt mintákat.

Az EEF1A1 és EEF1D fehérjék egyaránt az EEF1 komplex részei (Sasikumar és mtsai, 2012), amely elősegíti a reverz transzkripció folyamatát az eukarióta sejtekben (Warren és mtsai, 2012). Az EEF1A1 fehérje ilyen jellegű szerepét más közlemények is alátámasztják



18. ábra. A HIV-1 pszeudovírussal transzdukált mintákban 12 óra inkubáció után szignifikáns változást ($p < 0,05$) mutató fehérjék relatív mennyiségei a kontrollhoz hasonlítva (Csősz és mtsai, 2019 alapján.). Az x tengelyen a mintavételi időpontok, az y tengelyen pedig a relatív fehérje mennyiségek láthatók. A diagramokban kék színnel jelöltük a kontroll mintát, sárgával pedig a HIV-1 pszeudovírussal kezelt mintákat.

(Li és mtsai, 2015; Rawle és mtsai, 2018). Az EEF1D kötődését a virális fehérjékhez ugyan nem, szerepét azonban máshol is igazolták (Knoener és mtsai, 2017), az EEF1 komplex részeként valószínűleg az EEF1A1 fehérjével együttműködve fejt ki hatását.

Az EEF2 fehérje a virális Gag-hoz kötődik, amely kapcsolatot a CypA képes stabilizálni, komplexük a sejt fertőzések elleni védekezésében fontos stressz granulomok összeszerelődését képes gátolni (Valiente-Echeverría és mtsai, 2014). Az EEF2 hiánya a vírus termelés csökkenését, illetve a termelt virionok csökkent fertőzőképességét vonja maga után.

Az MYL6 a szerepét a HIV életciklusában mások is kimutatták (Mohammadi és mtsai, 2013), szintén képes a Gag fehérjéhez kötődni (Engeland és mtsai, 2014), azonban ennek a kapcsolatnak a jelentősége egyelőre nem ismert.

Az NPM1 és az ALYREF a virális fehérjék közül a Rev-hez képesek kötődni. Az NPM1 feltételezések szerint a Rev nukleáris importjában működik közre (Fankhauser és mtsai, 1991; Nouri és mtsai, 2015), míg a Rev-hez kapcsolódó ALYREF fehérje nem képes RNS-t kötni, a Rev valószínűleg ezen a kapcsolaton keresztül favorizálja a virális RNS exportját a sejtbeli RNS-ekkel szemben (Taniguchi és mtsai, 2014).

A COX5A, COX6B1 és PDIA3 fehérjék szerepét korábban is kimutatták, ahogy kapcsolatukat a vírus burokfehérjével is (Zhou és mtsai, 2008; Jäger és mtsai, 2012; Mohammadi és mtsai, 2013; Knoener és mtsai, 2017). Azonban a HIV burokfehérje nincs jelen a pszeudovírusban, ezáltal kapcsolatuk a vírushoz és szerepük az életciklusban további vizsgálatra szorul.

Az SRSF6 egy a közelmúltban végzett kutatás eredménye szerint valószínűleg a virális génexpresszió gátlásáért felel (Erkelenz és mtsai., 2015), a virális Tat fehérjét kódoló mRNS-ek hasításán keresztül. Kapcsolata más virális fehérjék mRNS-ével egyelőre nem ismert.

A TRIM28 fehérje szintén ismert szereplő a HIV-1 életciklusában (Knoener és mtsai, 2017), egy nemrég közölt kutatás eredménye szerint jelentős szerepet játszik a virális gének expressziójának gátlásában (Ma és mtsai, 2019). A sejt védekező mechanizmusának fontos része lehet, erre utal a 4 órás időpontban történő megjelenése, majd eltűnése a 12 órás időpontban.

A HIST1H1E, HNRPL, CCDC86, CSDA, PPIF, PRRC2A, SEPT2, TCOF1, TPM3, HIST1H1D, PGAM1, HSPA5 és GAPDH fehérjéket szintén olyan gazdasejt faktorokként azonosították, amelyek szerepet játszanak a HIV-1 életciklusában (König és mtsai, 2008;

Mohammadi és mtsai, 2013; Knoener és mtsai, 2017; Bradley és mtsai, 2018), azonban szerepük mibenléte egyelőre ismeretlen.

A HN1 szerepe a HIV-1 életciklusában egyelőre nem ismert, jóllehet a vele kapcsolatban lévő fehérjék a transzkripció, illetve a mikrotubulus szerkezet kialakításában vesznek részt.

6. MEGBESZÉLÉS

Munkánk során célul tűztük ki olyan mutáns CA fehérjék létrehozását és vizsgálatát, amelyek fokozottan, vagy kevéssé érzékenyek a virális proteáz általi hasításra. A vad típusú és mutáns (W23A, A77P, A78V, L189F, L189P, and L189I) CA fehérjéket expresszáltuk és tisztítottuk, majd vizsgáltuk a mutációk hatását azok szerkezetére, CypA-val kialakított kapcsolatára, illetve PR általi hasíthatóságára azért, hogy olyan mutáns fehérjéket találjunk, amelyek a későbbiekben alkalmasak lehetnek a virális proteáz korai fázisban betöltött szerepének vizsgálatára.

Jóllehet a vad típusú HIV-1 elsősorban direkt fúzióval lép be a sejtbe, egyes vírus törzsek és sejtvonalak, továbbá a génterápiás célokra használt VSV burokfehérjével pszeudotipizált vírusrészecskék esetében a receptor-mediált endocitózis útvonal használata az elsődleges. A CA HIV-1 PR általi hasítását 5,5-ös pH-n hajtottuk végre, amely megfelel az endoszómák savas pH-jának, (Geisow és Evans, 1984), illetve ahol a kapszid mag monomerekre esik szét, amelyek az olvadt gombolyag szerkezetet veszik fel (Misselwitz és mtsai, 1995; Ehrlich és mtsai, 2001). Ez a szerkezet teszi lehetővé a PR kapcsolódását azokhoz a hasítóhelyekhez, amelyek egyébként a fehérje helikális részeiben vannak eltemetve. A proteolízis hatékonysága jelentősen megnövekedett a W23A, A78V és L189F mutációkat tartalmazó hasítóhelyek mellett, azonban a reakció végén megmaradt hasítatlan CA mennyisége az utóbbi kettő esetében nem (A78V) vagy csak kismértékben csökkent a vad típushoz hasonlítva. Az A77P és L189P mutációk viszont sikeresen csökkentették az adott hasítóhelyen történő enzimikus hasítás gyakoriságát, ezáltal csökkentették CA proteolízis hatékonyságát. Meglepő módon az L189I mutáció nem okozott érzékelhető változást a proteolízis hatékonyságának tekintetében, amit véleményünk szerint a hasítóhely egy aminosavrészlettel történő eltolódása okozhatott, és ezáltal egy TETIL/VQNAN 2-es típusú hasítóhely létrejött (Dunn és mtsai, 1994; Louis és mtsai, 2000) azonban ezt nem tudtuk bizonyítani, mivel a fragmensek MALDI-TOF tömegspektrometriás elemzéséből a megfelelő méretű peptidok közül egyiket sem sikerült azonosítani.

A virális proteáz általi hasíthatóság mellett szükséges volt megtudnunk azt is, hogy a mutációk milyen hatással vannak a CA kapszid szerkezetére neutrális pH-n, melyen a vírus összeszerelődése is történik. A fehérje szerkezetben bekövetkező változások ugyanis hatással lehetnek mind a PR általi hasíthatóságra, mind a CA monomerekből felépülő kapszid mag

stabilitására, amely emiatt önmagában is megváltoztathatja a vírus fertőzőképességét (Forshey és mtsai, 2002). A mutációk hatását *in silico* vizsgálatok alapján becsültük meg, majd meghatároztuk a fehérjék másodlagos szerkezeti elemeinek eloszlását CD-spektroszkópia segítségével. A becsült változások nagymértékben megegyeztek a mérési eredményeinkkel. Az A77P és L189P mutációknak nagymértékű destabilizáló hatást becsültünk a prolin aminosavrész ismert hélix-törő hatása miatt. Az A78V, L189F és L189I mutációkat semlegesnek vagy kis mértékben destabilizálónak becsültük, amelyet a CD-spektroszkópia eredményei is alátámasztottak. Egyetlen kivétel a W23A mutáció volt, amit szintén kis mértékben destabilizálónak becsültünk, azonban méréseink szerint jelentős változásokat okozott a fehérje másodlagos szerkezetében. Habár a W23A mutáció létrehozását semlegesnek becsültük, korábban közlésre került, hogy a 23. triptofán aminosavrész a fehérje szekvenciában konzervált aminosavak közé tartozik (Tang és mtsai, 2001, 2003, 2007) és hozzájárul a hidrofób kapszid mag kialakulásához (Tang és mtsai, 2007) is, ezáltal nem meglepő, hogy mutációja jelentős változást idéz elő a fehérje másodlagos szerkezetében.

A CA fehérjével végzett korábbi kísérletekből következtethető, hogy a fehérje tripszines hasításnak kitett részei elengedhetetlenül fontosak a multimerizációhoz, továbbá azt is látható, hogy a tripszines hasítással szembeni érzékenység megváltozása a rendellenes kapszid szerkezethez hasonló CA oligomer struktúrák kialakulását eredményezhetik *in vitro* (Hausdorf és mtsai, 1994). Méréseink során azt találtuk, hogy a fehérjékbe bevitt mutációk nem okoztak szignifikáns változást a tripszines hasítással szembeni érzékenységben az A78V, L189F és L189P mutánsok esetében, amely valószínűleg nem vezet el hibás fehérje multimerizációhoz. Ezzel szemben, W23A, A77P és L189I mutánsok érzékenysége különböző mértékben növekedett, amely azt sugallja, hogy ezek a fehérjék nagyobb valószínűséggel alakítanak ki hibás CA oligomer szerkezeteket. Továbbá ezek az eredmények az L189F, W23A, A77P, and L189I mutánsok esetében megegyeztek az *in silico* analízis és/vagy a CD-spektroszkópia eredményeivel.

A CA és CypA közötti kölcsönhatás fontosságát a HIV-1 életciklusában több kutatás is bizonyította (Braaten és mtsai, 1996; Braaten és Luban, 2001; Sokolskaja és mtsai, 2004). Ez a tudás vezetett el ahhoz a feltételezéshez, amely szerint a CypA szerepet játszik a dekapozidáció folyamatában is (Li és mtsai, 2009), jóllehet bizonyos sejtvonalak és vírus izolátumok esetében ezt egyértelműen megcáfolták. Az eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy az A77P mutáció kivételével a mutációk, amelyek a fehérje kisebb vagy nagyobb mértékű szerkezeti változását idézték elő nem voltak hatással a CA fehérje CypA kötő képességére. Mivel a CA fehérje

CypA-kötő felülete a fehérje felszínének egy jól hozzáférhető hurok részén található (Gamble és mtsai, 1997) a másodlagos szerkezetben bekövetkezett változások a CA fehérje más részein valószínűleg nem befolyásolják a hurok konformációját, illetve annak relatív elhelyezkedését, ezáltal nem változtatják meg a CA fehérje CypA-kötő hurkának és CypA fehérjének kölcsönhatását. Az A77P CA CypA kötő képességének megváltozása meglepő eredmény, mivel az A77P mutáció kívül esik a CypA kötő régión, ezáltal nem feltételeztük, hogy bármilyen mértékben hatással lehet a két fehérje kölcsönhatására. A CypA mellett számos fehérjéről (pl. CPSF6, RunBP2, TNPO3) kimutatták, hogy kölcsönhat a CA fehérjével és képes megváltoztatni a vírus fertőzőképességét, azonban ezek a fehérjék tudomásunk szerint nem csomagolódnak be a virionba. Ezeknek a fehérjéknek a kötőhelye egy konzervált területnek bizonyult, amelyet több aminosavrész (N57, M66, Q67, K70, N74, and T107) alakít ki a CA N-terminális doménjében (Price és mtsai, 2012). Mivel a létrehozott mutációk egyike sincs kapcsolatban az itt felsorolt fehérjék kötőhelyeivel és egyik fehérje sem csomagolódik be a virionba, a mutáns fehérjékkel kialakított kapcsolatuk vizsgálatát jelen körülmények között nem láttuk indokoltnak.

A mutáns CA fehérjéket érintő vizsgálataink alapján elmondhatjuk, hogy az elsődleges hasítási helyekhez tartozó aminosavak mutációja nem csak a kapszid fehérje PR általi hasíthatóságát változtatja meg, hanem esetenként annak másodlagos szerkezetét és egy esetben ciklofilin A kötő képességét is. A létrehozott mutáns fehérjék közül egyedül az L189F szerkezete maradt változatlan a vad típusú fehérjéhez viszonyítva, ezáltal úgy gondoljuk, ez lehet a legalkalmasabb jelölt a PR általi CA hasítás korai fázisban betöltött szerepének további vizsgálatára. Hozzá kell tennünk azonban, hogy a CA fehérje számos funkciójának következtében igen nehéz feladatnak látszik olyan mutációk létrehozása, amelyek csak a fehérje egyes tulajdonságait (pl. a hasítással szembeni érzékenység megváltoztatása) érintik. Ezen megállapításunkat egy a közelmúltban megjelent, a HIV-1 CA extrém genetikai érzékenységét vizsgáló tanulmány is alátámasztja (Rihn és mtsai, 2013).

Vizsgáltuk *in vitro* körülmények között az L189F mutáns kapszid fehérjét hordozó pszeudovírus részecskék fertőzőképességének változását, amelyhez egy harmadik generációs HIV-1 vektorrendszert módosítottunk. Az L189F mutáns kapszidot különböző mennyiségben tartalmazó pszeudovírusokkal 293T sejteket transzdukáltunk, majd vizsgáltuk a fertőzött sejtek számában bekövetkező változásokat. Mivel vizsgálataink szerint a proteolitikus hasítást befolyásoló mutációk közül az L189F nem befolyásolja a CA monomerek szerkezetét a citoplazmában uralkodó pH viszonyok között, feltételezhetjük, hogy a mutáns fehérjéket

tartalmazó pszeudovírus részecskék csökkent fertőzőképessége a virális PR általi hasíthatóság megváltozásának köszönhető. Meg kell jegyeznünk azonban, hogy ezek csak előzetes eredmények, elméletünk alátámasztásához, illetve a PR korai fázisban betöltött szerepének igazolásához további, sejtkultúras körülmények között végzett vizsgálatok szükségesek. Vizsgálataink alapján az L189F CA mutáns nem bizonyult transz-domináns negatív hatásúnak, ami arra utal, hogy jelenlétében nem keletkeznek kevert CA molekulákat tartalmazó pszeudovirionok.

A HIV-1 életciklusa nagymértékben függ a gazdasejt saját fehérjéitől, illetve azoktól a folyamatoktól, amelyek normális körülmények között a sejt saját túlélését és szaporodását szolgálják. Vizsgálataink során tömegspektrometriás módszer segítségével jelölés nélküli kvantitálással 25 olyan fehérjét azonosítottunk 293T sejtekben, amelyek expressziója a pszeudovírussal történő transzdukció hatására megváltozott, vagyis feltételezhetően valamilyen módon befolyásolják a replikációt a vírusfertőzés korai szakaszában, vagy a transzdukció következtében változik a mennyiségük. Ezen, szignifikáns változást mutató fehérjék funkciója és lokalizációja igen nagy variabilitást mutat, az eredmények összesítése alapján mégis elmondhatjuk, hogy 4 órával a transzdukciót követően emelkedik az RNS-kötő fehérjék mennyisége, amely aztán a 12 órás időpontban lecsökken.

A vad típusú HIV-el korábban végzett *in vivo* képalkotó vizsgálatok szerint a vírus belépése után 30-60 perccel a dekapozidáció folyamata befejeződik (Hulme és mtsai, 2011; Xu és mtsai, 2013; Mamede és mtsai, 2017), sőt a reverz transzkripció gátlása késlelteti is ezt a folyamatot, ami azt sugallja, hogy habár a reverz transzkripció már zajlik ebben az időpontban (valószínűleg az RNS-DNS hibrid vagy a keletkezett dupla szálú provirális DNS mérete miatt destabilizálja a kapszid magot), a dekapozidáció kezdete megelőzi annak befejezését. Legkésőbb 1 órával a vírus bejutása után a sejt védelmi rendszere által is hozzáférhetővé válik az addig a kapszid mag által védett, virális RNS, provirális DNS, valamint a PIC hozzá kapcsolódó alkotóelemei is, lehetővé téve a védekezést a fertőző ágens ellen.

Tehát, amennyiben fenti megfigyelésünket a HIV-1 életciklusába próbáljuk beilleszteni, azt feltételezhetjük, hogy 4 órával a fertőzés után a sejt már aktív védekezést folytat, amely legfőképpen hozzáférhetővé vált virális RNS-ek ellen irányul, újabb 8 óra elteltével azonban a fehérjék expressziója megszűnik, ahogy a vírus átveszi az irányítást a sejt folyamatai felett. Ez a folyamat valószínűleg szintén a vírus/pszeudovírus által hordozott fehérjéken keresztül valósulhat meg, ugyanis az integráció és a virális RNS-ek expressziója csak későbbi időpontokban következnek be (Kim és mtsai, 1989; van't Wout és mtsai, 2003).

Kísérleteink folyamán szintén vizsgáltuk a mérések folyamán szignifikáns változást mutató fehérjék lehetséges kapcsolatát a HIV életciklusához. Ezen fehérjék nagy részét korábban is a replikációban szerepet játszó faktorokként azonosították különböző munkacsoportok által és módszerekkel végzett vizsgálatokban, amely egyrészt alátámasztja módszerünk helyességét, másrészt pedig megerősíti ezen szerepüket a HIV-1 életciklusában. Véleményünk szerint ezek a fehérjék, illetve más fehérjékkel alkotott kapcsolataik alaposabb vizsgálata segíthet azonosítani azokat a jelátviteli útvonalakat, amelyeken keresztül a HIV-1 képes saját céljaira használni a sejtben működő rendszereket, ezáltal újabb célpontokat szolgáltat az antivirális terápia kifejlesztéséhez, valamint a génterápiás módszerek hatékonyabbá tételéhez.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A doktori értekezésemben bemutatott munkáim során elsősorban lehetőségem volt a HIV-1 kapszid fehérje mutánsainak (W23A, A77P, A78V, L189F, L189I és L189P) tervezésére, létrehozására és tisztítására. Ezen munka során vizsgáltam a létrehozott mutáns fehérjék másodlagos szerkezetét, különböző enzimek általi hasíthatóságát, illetve kölcsönhatásukat a kapszid fehérje egyik legismertebb interakciós partnerével a ciklofilin A-val. Ezen kívül lehetőségem volt, a HIV-1 transzdukció korai fázisának vizsgálatára, amely során a fertőzött sejtek fehérje tartalmának változását követtük nyomon jelölés nélküli kvantitálás alkalmazásával, hogy újabb gazdasejt faktorokat azonosítsunk, amelyek befolyásolhatják a transzdukció kimenetelét.

A létrehozott mutáns kapszid fehérjék szerkezetében bekövetkező változásokat *in silico* becsültük meg, amelyet CD-spektroszkópia alkalmazásával támasztottunk alá. A fehérjék proteolízissel szembeni érzékenységét HIV-1 PR és tripszin által létrehozott hasítási termékek analízisével határoztuk meg. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy az elsődleges hasítási helyekhez tartozó aminosavak mutációja általában nem csak a kapszid fehérje proteáz általi hasíthatóságát változtatja meg, hanem esetenként annak másodlagos szerkezetét és CypA kötő képességét is. Jóllehet a W23A, A77P és L189P mutációk sikeresen módosítják a proteáz általi hasítást, másodlagos szerkezetük is jelentősen megváltozik, ezáltal nem alkalmasak a célkitűzésben megfogalmazott céljainkra. Mutánsaink közül egyedül az L189F tűnik szerkezetében változatlanul a vad típushoz viszonyítva, ezáltal ez lehet a legalkalmasabb jelölt a PR általi CA hasítás korai fázisban betöltött szerepének további vizsgálatára sejtkultúrás körülmények között.

A HIV-1 alapú vektor transzdukció korai fázisának proteomikai vizsgálatának eredményeképpen sikerült azonosítanunk 25 olyan fehérjét, amelynek expressziója valamilyen irányban megváltozik a HIV-1 pszeudovírussal transzdukált sejtekben a transzdukció után 4, illetve 12 órával. Az azonosított fehérjék irodalmának vizsgálata alapján összefoglalásként elmondhatjuk, hogy a jelölés nélküli kvantitálás alkalmas módszer a sejtben bekövetkező változások nyomon követésére, ugyanis a fehérjék többségét korábban is összefüggésbe hozták a HIV-1 életciklusával. Sajnos azonban néhányuk kivételével pontos szerepük a folyamatban továbbra sem tisztázott. Véleményünk szerint a vizsgálatunk során azonosított fehérjék megfelelő célpontokat kínálhatnak a HIV-1- gazdasejt kapcsolatának vizsgálatához, amely segítséget nyújthat új, hatékonyabb antivirális terápiák kifejlesztéséhez.

7. SUMMARY

Throughout the works summarized in my dissertation I had the possibility to plan, establish, and purify mutant (W23A, A77P, A78V, L189F, L189I and L189P) capsid proteins of human immunodeficiency virus type 1. In this work I have examined the changes in the secondary structure and proteolytic susceptibility of the mutant capsid proteins, as well as their interaction with the well-characterized partner cyclophilin A protein. Furthermore, I also had the opportunity to investigate the events of the early phase of HIV-1 infection with the utilization of a HIV-based self-inactivating pseudovirus. In this experiment we have followed the changes in the protein content of the transduced cells with the use of label-free proteomics to identify the host factors capable of altering the outcome of the transduction.

We have predicted the changes generated by the introduced mutations with *in silico* analysis. The results of the predictions were verified by CD-spectroscopy analysis, and the proteolytic susceptibility of the proteins were determined by the analyses of the proteolytic fragments. We concluded, that the mutations of the capsid cleavage sites not only affect the proteolytic susceptibility by the HIV-1 protease, but may also substantially alter the secondary structure, tryptic susceptibility and cyclophilin A binding ability of the monomeric capsid protein. Although the W23A, A77P, and L189P mutations were able to modify the cleavage of the capsid by the HIV-1 protease, due to the observed structural alterations, they are not suitable for our goal. Our experiments also showed that only the L189F mutant protein remains structurally unchanged, hence, it could be the best candidate for use in experiments regarding the role of HIV-1 protease in the early phase of HIV-1 infection.

With the utilization of a HIV-1 pseudovirus and label-free proteomics we have identified 25 host proteins, which showed significant alterations in their expression level 4 and/or 12 hours after the transduction. The examination of the literature regarding the interaction and role of these proteins to the HIV-1 life cycle showed that with only one exception these proteins were already verified as possible factors in the HIV-1 replication, however in most cases their exact role is still not clarified. Based on these data we concluded that label-free proteomics is a capable method for the investigation of proteomic changes in the HIV-1 replication. Moreover, we think that the thorough examination of the identified proteins presented here would give us more information regarding the host players and signaling pathways of HIV replication, eventually leading to the development of new and more effective antiviral therapies.

8. IRODALOMJEGYZÉK

- Achuthan V, Perreira JM, Sowd GA, Puray-Chavez M, McDougall WM, Paulucci-Holthausen A, et al. Capsid-CPSF6 Interaction Licenses Nuclear HIV-1 Trafficking to Sites of Viral DNA Integration. *Cell Host Microbe*. 2018;24(3):392-404.e8.
- Ambrose Z, Aiken C. HIV-1 uncoating: connection to nuclear entry and regulation by host proteins. *Virology*. 2014;454–455:371–9.
- Baboonian C, Dalgleish A, Bountiff L, Gross J, Oroszlan S, Rickett G, Smith-Burchnell C, Troke P, Merson J. HIV-1 proteinase is required for synthesis of pro-viral DNA. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991 Aug 30;179(1):17-24.
- Barre-Sinoussi F, Chermann J, Rey F, Nugeyre M, Chamaret S, Gruest J, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 1983;220(4599):868–71.
- Bejarano DA, Peng K, Laketa V, Börner K, Jost KL, Lucic B, et al. HIV-1 nuclear import in macrophages is regulated by CPSF6-capsid interactions at the nuclear pore complex. *Elife*. 2019;8.
- Bichel K, Price AJ, Schaller T, Towers GJ, Freund SM, James LC. HIV-1 capsid undergoes coupled binding and isomerization by the nuclear pore protein NUP358. *Retrovirology*. 2013;10(1):81.
- Bittner JJ. Some possible effects of nursing on the mammary gland tumor incidence in mice. *Science*. 1936;84(2172):162–162.
- Blanco R, Carrasco L, Ventoso I. Cell killing by HIV-1 protease. *J Biol Chem*. 2003;278(2):1086–93.
- Braaten D, Franke EK, Luban J. Cyclophilin A is required for an early step in the life cycle of human immunodeficiency virus type 1 before the initiation of reverse transcription. *J Virol*. 1996;70(6):3551–60.
- Braaten D, Luban J. Cyclophilin A regulates HIV-1 infectivity, as demonstrated by gene targeting in human T cells. *EMBO J*. 2001;20(6):1300–9.
- Bradley T, Ferrari G, Haynes BF, Margolis DM, Browne EP. Single-Cell Analysis of Quiescent HIV Infection Reveals Host Transcriptional Profiles that Regulate Proviral Latency. *Cell*

- Rep. 2018;25(1):107-117.e3.
- Brass AL, Dykxhoorn DM, Benita Y, Yan N, Engelman A, Xavier RJ, et al. Identification of Host Proteins Required for HIV Infection Through a Functional Genomic Screen. *Science*. 2008;319(5865):921–6.
- Buffone C, Martinez-Lopez A, Fricke T, Opp S, Severgnini M, Cifola I, et al. Nup153 Unlocks the Nuclear Pore Complex for HIV-1 Nuclear Translocation in Nondividing Cells. *J Virol*. 2018;92(19):e00648-18.
- Campbell EM, Hope TJ. HIV-1 capsid: the multifaceted key player in HIV-1 infection. *Nat Rev Microbiol*. 2015;13(8):471–83.
- Chin CR, Perreira JM, Savidis G, Portmann JM, Aker AM, Feeley EM, et al. Direct Visualization of HIV-1 Replication Intermediates Shows that Capsid and CPSF6 Modulate HIV-1 Intra-nuclear Invasion and Integration. *Cell Rep*. 2015;13(8):1717–31.
- Christ F, Thys W, De Rijck J, Gijsbers R, Albanese A, Arosio D, et al. Transportin-SR2 imports HIV into the nucleus. *Curr Biol*. 2008;18(16):1192–202.
- Coffin JM. Structure and Classification of Retroviruses. In: *The Retroviridae*. Boston, MA: Springer US; 1992;p. 19–49.
- Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE. *The Development of Retrovirology as Intellectual History*. 1997.
- Combet C, Blanchet C, Geourjon C, Deléage G. NPS@: network protein sequence analysis. *Trends Biochem Sci*. 2000;25(3):147–50.
- Compton LA, Johnson WC. Analysis of protein circular dichroism spectra for secondary structure using a simple matrix multiplication. *Anal Biochem*. 1986;155(1):155–67.
- Csősz É, Márkus B, Darula Z, Medzihradzky KF, Nemes J, Szabó E, et al. Salivary proteome profiling of oral squamous cell carcinoma in a Hungarian population. *FEBS Open Bio*. 2018;8(4):556–69.
- Csősz É, Tóth F, Mahdi M, Tsaprailis G, Emri M, Tózsér J. Analysis of networks of host proteins in the early time points following HIV transduction. *BMC Bioinformatics*. 2019; 20: 398.
- Daecke J, Fackler OT, Dittmar MT, Krausslich H-G. Involvement of Clathrin-Mediated

- Endocytosis in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Entry. *J Virol.* 2005;79(3):1581–94.
- Davies DR. The Structure and Function of the Aspartic Proteinases. *Annu Rev Biophys Chem.* 1990;19(1):189–215.
- De Iaco A, Luban J. Inhibition of HIV-1 infection by TNPO3 depletion is determined by capsid and detectable after viral cDNA enters the nucleus. *Retrovirology.* 2011;8:98.
- De Iaco A, Santoni F, Vannier A, Guipponi M, Antonarakis S, Luban J. TNPO3 protects HIV-1 replication from CPSF6-mediated capsid stabilization in the host cell cytoplasm. *Retrovirology.* 2013;10(1):20.
- Dharan A, Talley S, Tripathi A, Mamede JI, Majetschak M, Hope TJ, et al. KIF5B and Nup358 Cooperatively Mediate the Nuclear Import of HIV-1 during Infection. *PLoS Pathog.* 2016;12(6):e1005700.
- Dickson, C., Eisenman, R. H., Hunter, E. and Teich, N. Protein biosynthesis and assembly. In: Weis, R., Teich, N., Varmus, H. (eds) *RNA tumor viruses, molecular biology of tumor viruses*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1984;pp. 528-574.
- Di Nunzio F, Danckaert A, Fricke T, Perez P, Fernandez J, Perret E, et al. Human Nucleoporins Promote HIV-1 Docking at the Nuclear Pore, Nuclear Import and Integration. Chauhan A, editor. *PLoS One.* 2012;7(9):e46037.
- Di Nunzio F, Fricke T, Miccio A, Valle-Casuso JC, Perez P, Souque P, et al. Nup153 and Nup98 bind the HIV-1 core and contribute to the early steps of HIV-1 replication. *Virology.* 2013;440(1):8–18.
- Du S, Betts L, Yang R, Shi H, Concel J, Ahn J, et al. Structure of the HIV-1 Full-Length Capsid Protein in a Conformationally Trapped Unassembled State Induced by Small-Molecule Binding. *J Mol Biol.* 2011;406(3):371–86.
- Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, et al. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol.* 1998;72(11):8463–71.
- Dunn BM, Gustchina A, Wlodawer A, Kay J. Subsite preferences of retroviral proteinases. In: *Methods in enzymology.* 1994. p. 254-IN12.
- Ehrlich LS, Agresta BE, Gelfand CA, Jentoft J, Carter CA. Spectral Analysis and Tryptic

- Susceptibility as Probes of HIV-1 Capsid Protein Structure. *Virology*. 1994;204(2):515–25.
- Ehrlich LS, Liu T, Scarlata S, Chu B, Carter CA. HIV-1 Capsid Protein Forms Spherical (Immature-Like) and Tubular (Mature-Like) Particles in Vitro: Structure Switching by pH-induced Conformational Changes. *Biophys J*. 2001;81(1):586–94.
- Ellermann V, Bang O. Experimentelle Leukämie bei Hühnern. II. *Zeitschrift für Hyg und Infekt*. 1909;63(1):231–72.
- Engeland CE, Brown NP, Börner K, Schümamm M, Krause E, Kaderali L, et al. Proteome analysis of the HIV-1 Gag interactome. *Virology*. 2014;460–461:194–206.
- Erkelenz S, Hillebrand F, Widera M, Theiss S, Fayyaz A, Degrandi D, Pfeffer K, Schaal H. Balanced splicing at the Tat-specific HIV-1 3' splice site A3 is critical for HIV-1 replication. *Retrovirology*. 2015;12:29. doi: 10.1186/s12977-015-0154-8.
- Fackler OT, Peterlin BM. Endocytic entry of HIV-1. *Curr Biol*. 2000;10(16):1005–8.
- Fankhauser C, Izaurralde E, Adachi Y, Wingfield P, Laemmli UK. Specific complex of human immunodeficiency virus type 1 rev and nucleolar B23 proteins: dissociation by the Rev response element. *Mol Cell Biol*. 1991;11(5):2567–75.
- Fassati A. Multiple roles of the capsid protein in the early steps of HIV-1 infection. *Virus Res*. 2012;170(1–2):15–24.
- Forshey BM, von Schwedler U, Sundquist WI, Aiken C. Formation of a human immunodeficiency virus type 1 core of optimal stability is crucial for viral replication. *J Virol*. 2002;76(11):5667–77.
- Franceschini A, Szklarczyk D, Frankild S, Kuhn M, Simonovic M, Roth A, et al. STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Res*. 2012;41(D1):D808–15.
- Franke EK, Yuan HEH, Luban J. Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature*. 1994;372(6504):359–62.
- Freed EO. HIV-1 Gag Proteins: Diverse Functions in the Virus Life Cycle. *Virology*. 1998;251(1):1–15.
- Gallo R, Salahuddin S, Popovic M, Shearer G, Kaplan M, Haynes B, et al. Frequent detection

- and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science*. 1984;224(4648):500–3.
- Gamble TR, Yoo S, Vajdos FF, von Schwedler UK, Worthylake DK, Wang H, et al. Structure of the Carboxyl-Terminal Dimerization Domain of the HIV-1 Capsid Protein. *Science*. 1997;278(5339):849–53.
- Ganser-Pornillos BK, Cheng A, Yeager M. Structure of Full-Length HIV-1 CA: A Model for the Mature Capsid Lattice. *Cell*. 2007;131(1):70–9.
- Ganser BK, Li S, Klishko VY, Finch JT, Sundquist WI. Assembly and Analysis of Conical Models for the HIV-1 Core. *Science*. 1999;283(5398):80–3.
- Geisow MJ, Evans WH. pH in the endosome. *Exp Cell Res*. 1984;150(1):36–46.
- Ginestet C. ggplot2: elegant graphics for data analysis. *J R Stat Soc a Stat*. 2011;174:245.
- Gitti RK, Lee BM, Walker J, Summers MF, Yoo S, Sundquist WI. Structure of the Amino-Terminal Core Domain of the HIV-1 Capsid Protein. *Science*. 1996;273(5272):231–5.
- Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, et al. Pneumocystis carinii Pneumonia and Mucosal Candidiasis in Previously Healthy Homosexual Men. *N Engl J Med*. 1981;305(24):1425–31.
- Griffiths JT, Phylip LH, Konvalinka J, Strop P, Gustchina A, Wlodawer A, et al. Different requirements for productive interaction between the active site of HIV-1 proteinase and substrates containing -hydrophobic-hydrophobic- or -aromatic-Pro- cleavage sites. *Biochemistry*. 1992;31(22):5193–200.
- Grinde B, Cameron CE, Leis J, Weber IT, Wlodawer A, Burstein H, et al. Mutations that alter the activity of the Rous sarcoma virus protease. *J Biol Chem*. 1992;267(14):9481–90.
- Hatzioannou T, Perez-Caballero D, Cowan S, Bieniasz PD. Cyclophilin Interactions with Incoming Human Immunodeficiency Virus Type 1 Capsids with Opposing Effects on Infectivity in Human Cells. *J Virol*. 2005;79(1):176–83.
- Hausdorf G, Gewiss A, Wray V, Porstmann T. A recombinant human immunodeficiency virus type-1 capsid protein (rp24): its expression, purification and physico-chemical characterization. *J Virol Methods*. 1994;50(1–3):1–9.
- Henderson LE, Bowers MA, Sowder RC, Serabyn SA, Johnson DG, Bess JW, et al. Gag

- proteins of the highly replicative MN strain of human immunodeficiency virus type 1: posttranslational modifications, proteolytic processings, and complete amino acid sequences. *J Virol.* 1992;66(4):1856–65.
- Hornak V, Okur A, Rizzo RC, Simmerling C. HIV-1 protease flaps spontaneously open and reclose in molecular dynamics simulations. *Proc Natl Acad Sci.* 2006;103(4):915–20.
- Hulme AE, Perez O, Hope TJ. Complementary assays reveal a relationship between HIV-1 uncoating and reverse transcription. *Proc Natl Acad Sci.* 2011;108(24):9975–80.
- Jacobsen H, Ahlborn-Laake L, Gugel R, Mous J. Progression of early steps of human immunodeficiency virus type 1 replication in the presence of an inhibitor of viral protease. *J Virol.* 1992;66(8):5087–91.
- Jäger S, Cimermancic P, Gulbahce N, Johnson JR, McGovern KE, Clarke SC, et al. Global landscape of HIV–human protein complexes. *Nature.* 2012;481(7381):365–70.
- Jiang J, Ablan SD, Derebail S, Hercik K, Soheilian F, Thomas JA, et al. The interdomain linker region of HIV-1 capsid protein is a critical determinant of proper core assembly and stability. *Virology.* 2011;421(2):253–65.
- Joshi A, Nagashima K, Freed EO. Mutation of Dileucine-Like Motifs in the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Capsid Disrupts Virus Assembly, Gag-Gag Interactions, Gag-Membrane Binding, and Virion Maturation. *J Virol.* 2006;80(16):7939–51.
- Kaplan AH, Manchester M, Smith T, Yang YL, Swanstrom R. Conditional human immunodeficiency virus type 1 protease mutants show no role for the viral protease early in virus replication. *J Virol.* 1996;70(9):5840–4.
- Katoh I, Yoshinaka Y, Rein A, Shibuya M, Odaka T, Oroszlan S. Murine leukemia virus maturation: Protease region required for conversion from “immature” to “Mature” core form and for virus infectivity. *Virology.* 1985;145(2):280–92.
- Kim SY, Byrn R, Groopman J, Baltimore D. Temporal aspects of DNA and RNA synthesis during human immunodeficiency virus infection: evidence for differential gene expression. *J Virol.* 1989;63(9):3708–13.
- Kirchhoff F. HIV Life Cycle: Overview. In: *Encyclopedia of AIDS.* New York, NY: Springer New York; 2013. p. 1–9.

- Knoener RA, Becker JT, Scalf M, Sherer NM, Smith LM. Elucidating the in vivo interactome of HIV-1 RNA by hybridization capture and mass spectrometry. *Sci Rep.* 2017;7(1):16965.
- Koh Y, Wu X, Ferris AL, Matreyek KA, Smith SJ, Lee K, et al. Differential effects of human immunodeficiency virus type 1 capsid and cellular factors nucleoporin 153 and LEDGF/p75 on the efficiency and specificity of viral DNA integration. *J Virol.* 2013;87(1):648–58.
- Kotler, M., Danho, W., Katz, R.A., Leis, J. and Skalka, A.M. (1989). Avian retroviral proteases and cellular aspartic proteases are distinguished by activities on peptide substrates. *J.Biol.Chem.* 1989;264, 3428-3435.
- König R, Zhou Y, Elleder D, Diamond TL, Bonamy GMC, Ireland JT, et al. Global analysis of host-pathogen interactions that regulate early-stage HIV-1 replication. *Cell.* 2008;135(1):49–60.
- Krishnan L, Matreyek KA, Oztop I, Lee K, Tipper CH, Li X, et al. The requirement for cellular transportin 3 (TNPO3 or TRN-SR2) during infection maps to human immunodeficiency virus type 1 capsid and not integrase. *J Virol.* 2010;84(1):397–406.
- Lanman J, Lam TT, Barnes S, Sakalian M, Emmett MR, Marshall AG, et al. Identification of novel interactions in HIV-1 capsid protein assembly by high-resolution mass spectrometry. *J Mol Biol.* 2003;325(4):759–72.
- Lee K, Ambrose Z, Martin TD, Oztop I, Mulky A, Julias JG, et al. Flexible use of nuclear import pathways by HIV-1. *Cell Host Microbe.* 2010;7(3):221–33.
- Lee S, Han X, Choi KJ, Ding Y, Choi T, Tak E, et al. A new method for purification of functional recombinant GST-cyclophilin A protein from *E. coli*. *Indian J Biochem Biophys.* 2008;45(6):374–8.
- Leis J, Baltimore D, Bishop JM, Coffin J, Fleissner E, Goff SP, Oroszlan S, Robinson H, Skalka AM, Temin HM, et al. Standardized and simplified nomenclature for proteins common to all retroviruses. *J Virol.* 1988;62(5):1808-9.
- Lenth R V. Least-Squares Means: The R Package lsmeans. *J Stat Software*; Vol 1, Issue 1 . 2016 Jan 29
- Levy J, Hoffman A, Kramer S, Landis J, Shimabukuro J, Oshiro L. Isolation of

- lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science*. 1984;225(4664):840–2.
- Li D, Wei T, Rawle DJ, Qin F, Wang R, Soares DC, et al. Specific Interaction between eEF1A and HIV RT Is Critical for HIV-1 Reverse Transcription and a Potential Anti-HIV Target. *PLoS Pathog*. 2015;11(12):e1005289.
- Li S, Hill CP, Sundquist WI, Finch JT. Image reconstructions of helical assemblies of the HIV-1 CA protein. *Nature*. 2000;407(6802):409–13.
- Li Y, Kar AK, Sodroski J. Target Cell Type-Dependent Modulation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Capsid Disassembly by Cyclophilin A. *J Virol*. 2009;83(21):10951–62.
- Louis JM, Weber IT, Tözsér J, Clore GM, Gronenborn AM. HIV-1 protease: maturation, enzyme specificity, and drug resistance. *Adv Pharmacol*. 2000;49:111–46.
- Louis JM, Wondrak EM, Kimmel AR, Wingfield PT, Nashed NT. Proteolytic processing of HIV-1 protease precursor, kinetics and mechanism. *J Biol Chem*. 1999;274(33):23437–42.
- Lu AH, Soong MM, Wong PK. Maturation of Moloney murine leukemia virus. *Virology*. 1979;93(1):269–74.
- Luban J, Bossolt KL, Franke EK, Kalpana G V, Goff SP. Human immunodeficiency virus type 1 Gag protein binds to cyclophilins A and B. *Cell*. 1993;73(6):1067–78.
- Ma X, Yang T, Luo Y, Wu L, Jiang Y, Song Z, et al. TRIM28 promotes HIV-1 latency by SUMOylating CDK9 and inhibiting P-TEFb. *Elife*. 2019;8.
- Mahalingam B, Louis JM, Hung J, Harrison RW, Weber IT. Structural implications of drug-resistant mutants of HIV-1 protease: high-resolution crystal structures of the mutant protease/substrate analogue complexes. *Proteins*. 2001;43(4):455–64.
- Mahalingam B, Louis JM, Reed CC, Adomat JM, Krouse J, Wang Y-F, et al. Structural and kinetic analysis of drug resistant mutants of HIV-1 protease. *Eur J Biochem*. 1999;263(1):238–44.
- Mamede JJ, Cianci GC, Anderson MR, Hope TJ. Early cytoplasmic uncoating is associated with infectivity of HIV-1. *Proc Natl Acad Sci*. 2017;114(34):E7169–78.

- Manavalan P, Johnson WC. Variable selection method improves the prediction of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Anal Biochem.* 1987;167(1):76–85.
- de Marco A, Müller B, Glass B, Riches JD, Kräusslich H-G, Briggs JAG. Structural Analysis of HIV-1 Maturation Using Cryo-Electron Tomography. Hope TJ, editor. *PLoS Pathog.* 2010;6(11):e1001215.
- Marioni JC, Mason CE, Mane SM, Stephens M, Gilad Y. RNA-seq: An assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. *Genome Res.* 2008;18(9):1509–17.
- Matreyek KA, Engelman A. The Requirement for Nucleoporin NUP153 during Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection Is Determined by the Viral Capsid. *J Virol.* 2011;85(15):7818–27.
- Matreyek KA, Yücel SS, Li X, Engelman A. Nucleoporin NUP153 Phenylalanine-Glycine Motifs Engage a Common Binding Pocket within the HIV-1 Capsid Protein to Mediate Lentiviral Infectivity. Luban J, editor. *PLoS Pathog.* 2013;9(10):e1003693.
- Maurin T, Fenard D, Lambeau G, Doglio A. An Envelope-determined Endocytic Route of Viral Entry Allows HIV-1 to Escape from Secreted Phospholipase A2 Entry Blockade. *J Mol Biol.* 2007 Mar 30;367(3):702–14.
- Miklossy G, Tozser J, Kadas J, Ishima R, Louis JM, Bagossi P. Novel macromolecular inhibitors of human immunodeficiency virus-1 protease. *Protein Eng Des Sel.* 2008;21(7):453–61.
- Miller M, Jaskólski M, Rao JKM, Leis J, Wlodawer A. Crystal structure of a retroviral protease proves relationship to aspartic protease family. *Nature.* 1989;337(6207):576–9.
- Misselwitz R, Hausdorf G, Welfle K, Höhne WE, Welfle H. Conformation and stability of recombinant HIV-1 capsid protein p24 (rp24). *Biochim Biophys Acta.* 1995;1250(1):9–18.
- Mohammadi P, Desfarges S, Bartha I, Joos B, Zangger N, Muñoz M, et al. 24 Hours in the Life of HIV-1 in a T Cell Line. Emerman M, editor. *PLoS Pathog.* 2013;9(1):e1003161.
- Momany C, Kovari LC, Prongay AJ, Keller W, Gitti RK, Lee BM, et al. Crystal structure of dimeric HIV-1 capsid protein. *Nat Struct Biol.* 1996;3(9):763–70.

- Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL, Ghabrial SA, Jarvis AW, Martelli GP, et al. *Virus Taxonomy : Classification and Nomenclature of Viruses Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Springer Vienna; 1995.
- Nagy K, Young M, Baboonian C, Merson J, Whittle P, Oroszlan S. Antiviral activity of human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors in a single cycle of infection: evidence for a role of protease in the early phase. *J Virol*. 1994;68(2):757–65.
- Navia BA, Jordan BD, Price RW. The AIDS dementia complex: I. Clinical features. *Ann Neurol*. 1986;19(6):517–24.
- Navia MA, Fitzgerald PMD, McKeever BM, Leu C-T, Heimbach JC, Herber WK, et al. Three-dimensional structure of aspartyl protease from human immunodeficiency virus HIV-1. *Nature*. 1989;337(6208):615–20.
- Nouri K, Moll JM, Milroy L-G, Hain A, Dvorsky R, Amin E, et al. Biophysical Characterization of Nucleophosmin Interactions with Human Immunodeficiency Virus Rev and Herpes Simplex Virus US11. *PLoS One*. 2015;10(12):e0143634.
- Novikova M, Zhang Y, Freed EO, Peng K. Multiple Roles of HIV-1 Capsid during the Virus Replication Cycle. *Viol Sin*. 2019;34(2):119–34.
- Oroszlán, S. and Gilden, R, V. Primary structure analysis of retrovirus proteins. In: Stephenson, J. R. (ed) *Molecular Biology of RNA tumor Viruses*. Academic Press, New York, 1980;pp. 299-344.
- Pettit SC, Simsic J, Loeb DD, Everitt L, Hutchison CA, Swanstrom R. Analysis of retroviral protease cleavage sites reveals two types of cleavage sites and the structural requirements of the P1 amino acid. *J Biol Chem*. 1991;266(22):14539–47.
- Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci*. 1980;77(12):7415–9.
- Pornillos O, Ganser-Pornillos BK, Kelly BN, Hua Y, Whitby FG, Stout CD, et al. X-Ray Structures of the Hexameric Building Block of the HIV Capsid. *Cell*. 2009;137(7):1282–92.
- Pornillos O, Ganser-Pornillos BK, Yeager M. Atomic-level modelling of the HIV capsid. *Nature*. 2011;469(7330):424–7.

- Price AJ, Fletcher AJ, Schaller T, Elliott T, Lee K, KewalRamani VN, et al. CPSF6 Defines a Conserved Capsid Interface that Modulates HIV-1 Replication. Krausslich H-G, editor. *PLoS Pathog.* 2012;8(8):e1002896.
- Qi M, Yang R, Aiken C. Cyclophilin A-Dependent Restriction of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Capsid Mutants for Infection of Nondividing Cells. *J Virol.* 2008;82(24):12001–8.
- Quinn CM, Wang M, Fritz MP, Runge B, Ahn J, Xu C, et al. Dynamic regulation of HIV-1 capsid interaction with the restriction factor TRIM5 α identified by magic-angle spinning NMR and molecular dynamics simulations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(45):11519–24.
- Rasaiyaah J, Tan CP, Fletcher AJ, Price AJ, Blondeau C, Hilditch L, et al. HIV-1 evades innate immune recognition through specific cofactor recruitment. *Nature.* 2013;503(7476):402–5.
- Rasheedi S, Shun M-C, Serrao E, Sowd GA, Qian J, Hao C, et al. The Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor 6 (CPSF6) Subunit of the Capsid-recruited Pre-messenger RNA Cleavage Factor I (CFIm) Complex Mediates HIV-1 Integration into Genes. *J Biol Chem.* 2016;291(22):11809–19.
- Rawle DJ, Li D, Swedberg JE, Wang L, Soares DC, Harrich D. HIV-1 Uncoating and Reverse Transcription Require eEF1A Binding to Surface-Exposed Acidic Residues of the Reverse Transcriptase Thumb Domain. *MBio.* 2018;9(2):e00316-18.
- Rihn SJ, Wilson SJ, Loman NJ, Alim M, Bakker SE, Bhella D, et al. Extreme Genetic Fragility of the HIV-1 Capsid. Luban J, editor. *PLoS Pathog.* 2013 Jun;9(6):e1003461.
- Roberts, N. A., Martin, J. A., Kinchington, D., Broadhurst, A. V. and Craig, J.C. Rational design of peptide-based HIV proteinase inhibitors. *Science.* 1990;248, 358-61.
- Roberts MM, Copeland TD, Oroszlan S. In situ processing of a retroviral nucleocapsid protein by the viral proteinase. *Protein Eng.* 1991;4(6):695–700.
- Robinson MD, Oshlack A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol.* 2010;11(3):R25.
- Rosenberg SA. Immunotherapy and gene therapy of cancer. *Cancer Res.* 1991;51(18 Suppl):5074s-5079s.

- Rumlová M, Ruml T, Pohl J, Pichová I. Specific in vitro cleavage of Mason-Pfizer monkey virus capsid protein: evidence for a potential role of retroviral protease in early stages of infection. *Virology*. 2003;310(2):310–8.
- Saito A, Henning MS, Serrao E, Dubose BN, Teng S, Huang J, et al. Capsid-CPSF6 Interaction Is Dispensable for HIV-1 Replication in Primary Cells but Is Selected during Virus Passage In Vivo. *J Virol*. 2016;90(15):6918–35.
- Sasikumar AN, Perez WB, Kinzy TG. The many roles of the eukaryotic elongation factor 1 complex. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2012;3(4):543–55.
- Schaller T, Ocwieja KE, Rasaiyaah J, Price AJ, Brady TL, Roth SL, et al. HIV-1 Capsid-Cyclophilin Interactions Determine Nuclear Import Pathway, Integration Targeting and Replication Efficiency. Aiken C, editor. *PLoS Pathog*. 2011;7(12):e1002439.
- Schechter I, Berger A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun*. 1967;27(2):157–62.
- von Schwedler UK, Stemmler TL, Klishko VY, Li S, Albertine KH, Davis DR, et al. Proteolytic refolding of the HIV-1 capsid protein amino-terminus facilitates viral core assembly. *EMBO J*. 1998;17(6):1555–68.
- Shah VB, Shi J, Hout DR, Oztop I, Krishnan L, Ahn J, et al. The host proteins transportin SR2/TNPO3 and cyclophilin A exert opposing effects on HIV-1 uncoating. *J Virol*. 2013;87(1):422–32.
- Shoeman RL, Honer B, Stoller TJ, Kesselmeier C, Miedel MC, Traub P, et al. Human immunodeficiency virus type 1 protease cleaves the intermediate filament proteins vimentin, desmin, and glial fibrillary acidic protein. *Proc Natl Acad Sci*. 1990;87(16):6336–40.
- Shoeman RL, Sachse C, Höner B, Mothes E, Kaufmann M, Traub P. Cleavage of human and mouse cytoskeletal and sarcomeric proteins by human immunodeficiency virus type 1 protease. Actin, desmin, myosin, and tropomyosin. *Am J Pathol*. 1993;142(1):221–30.
- Sluis-Cremer N, Tachedjian G. Modulation of the oligomeric structures of HIV-1 retroviral enzymes by synthetic peptides and small molecules. *Eur J Biochem*. 2002;269(21):5103–11.
- Sokolskaja E, Sayah DM, Luban J. Target cell cyclophilin A modulates human

- immunodeficiency virus type 1 infectivity. *J Virol.* 2004;78(23):12800–8.
- Solbak SM, Reksten TR, Wray V, Bruns K, Horvli O, Raae AJ, et al. The intriguing Cyclophilin A-HIV-1 Vpr interaction: prolyl cis/trans isomerisation catalysis and specific binding. *BMC Struct Biol.* 2010;10(1):31.
- Solbak SMØ, Reksten TR, Röder R, Wray V, Horvli O, Raae AJ, et al. HIV-1 p6—Another viral interaction partner to the host cellular protein cyclophilin A. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics.* 2012;1824(4):667–78.
- Song C, Aiken C. Analysis of Human Cell Heterokaryons Demonstrates that Target Cell Restriction of Cyclosporine-Resistant Human Immunodeficiency Virus Type 1 Mutants Is Genetically Dominant. *J Virol.* 2007;81(21):11946–56.
- Sowd GA, Serrao E, Wang H, Wang W, Fadel HJ, Poeschla EM, et al. A critical role for alternative polyadenylation factor CPSF6 in targeting HIV-1 integration to transcriptionally active chromatin. *Proc Natl Acad Sci.* 2016;113(8):E1054–63.
- Sreerama N, Woody RW. Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR Methods with an Expanded Reference Set. *Anal Biochem.* 2000;287(2):252–60.
- Stefanidou M, Herrera C, Armanasco N, Shattock RJ. Saquinavir inhibits early events associated with establishment of HIV-1 infection: potential role for protease inhibitors in prevention. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(8):4381–90.
- Strack PR, Frey MW, Rizzo CJ, Cordova B, George HJ, Meade R, et al. Apoptosis mediated by HIV protease is preceded by cleavage of Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci.* 1996;93(18):9571–6.
- Tang S, Ablan S, Dueck M, Ayala-López W, Soto B, Caplan M, et al. A second-site suppressor significantly improves the defective phenotype imposed by mutation of an aromatic residue in the N-terminal domain of the HIV-1 capsid protein. *Virology.* 2007;359(1):105–15.
- Tang S, Murakami T, Agresta BE, Campbell S, Freed EO, Levin JG. Human Immunodeficiency Virus Type 1 N-Terminal Capsid Mutants That Exhibit Aberrant Core Morphology and Are Blocked in Initiation of Reverse Transcription in Infected Cells. *J Virol.* 2001;75(19):9357–66.

- Tang S, Murakami T, Cheng N, Steven AC, Freed EO, Levin JG. Human immunodeficiency virus type 1 N-terminal capsid mutants containing cores with abnormally high levels of capsid protein and virtually no reverse transcriptase. *J Virol.* 2003;77(23):12592–602.
- Taniguchi I, Mabuchi N, Ohno M. HIV-1 Rev protein specifies the viral RNA export pathway by suppressing TAP/NXF1 recruitment. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(10):6645–58.
- Temin H. The DNA provirus hypothesis. *Science.* 1976;192(4244):1075–80.
- Thali M, Bukovsky A, Kondo E, Rosenwlrth B, Walsh CT, Sodroski J, et al. Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions. *Nature.* 1994;372(6504):363–5.
- Toh, H., Ono, M., Saigo, K. and Miyata, T. (1985). Retroviral protease-like sequence in the yeast transposon Ty1. *Nature.* 1985;315, 691.
- Tomasselli AG, Hui JO, Adams L, Chosay J, Lowery D, Greenberg B, et al. Actin, troponin C, Alzheimer amyloid precursor protein and pro-interleukin 1 beta as substrates of the protease from human immunodeficiency virus. *J Biol Chem.* 1991;266(22):14548–53.
- Tóth F, Kádas J, Mótyán JA, Tózsér J. Effect of internal cleavage site mutations in human immunodeficiency virus type 1 capsid protein on its structure and function. *FEBS Open Bio.* 2016;6(8): 847–859.
- Tózsér J, Bagossi P, Weber IT, Louis JM, Copeland TD, Oroszlan S. Studies on the symmetry and sequence context dependence of the HIV-1 proteinase specificity. *J Biol Chem.* 1997;272(27):16807–14.
- Tózsér J, Bláha I, Copeland TD, Wondrak EM, Oroszlan S. Comparison of the HIV-1 and HIV-2 proteinases using oligopeptide substrates representing cleavage sites in Gag and Gag-Pol polyproteins. *FEBS Lett.* 1991;281(1–2):77–80.
- Tózsér J, Oroszlan S. Proteolytic events of HIV-1 replication as targets for therapeutic intervention. *Curr Pharm Des.* 2003;9(22):1803–15.
- Tózsér J, Shulenin S, Kádas J, Boross P, Bagossi P, Copeland TD, et al. Human immunodeficiency virus type 1 capsid protein is a substrate of the retroviral proteinase while integrase is resistant toward proteolysis. *Virology.* 2003;310(1):16–23.
- Tózsér J, Shulenin S, Louis JM, Copeland TD, Oroszlan S. In Vitro Processing of HIV-1 Nucleocapsid Protein by the Viral Proteinase: Effects of Amino Acid Substitutions at the

- Scissile Bond in the Proximal Zinc Finger Sequence †. *Biochemistry*. 2004;43(14):4304–12.
- Tozser J, Weber IT, Gustchina A, Blaha I, Copeland TD, Louis JM, et al. Kinetic and modeling studies of S3-S3' subsites of HIV proteinases. *Biochemistry*. 1992;31(20):4793–800.
- Unaids. UNAIDS DATA 2018. 2018. Available from: https://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/unaids-data-2018_en.pdf
- Valiente-Echeverría F, Melnychuk L, Vyboh K, Ajamian L, Gallouzi I-E, Bernard N, et al. eEF2 and Ras-GAP SH3 domain-binding protein (G3BP1) modulate stress granule assembly during HIV-1 infection. *Nat Commun*. 2014;5:4819.
- van 't Wout AB, Lehrman GK, Mikheeva SA, O'Keeffe GC, Katze MG, Bumgarner RE, et al. Cellular gene expression upon human immunodeficiency virus type 1 infection of CD4(+)-T-cell lines. *J Virol*. 2003;77(2):1392–402.
- Varmus, H.E. and Brown, P. Retroviruses. In: Howe, M. and Berg, D. (eds) *Mobile DNA*. ASM Press, Washington DC, USA. 1989;pp. 53-109.
- Venaud S, Yahi N, Fehrentz JL, Guettari N, Nisato D, Hirsch I, et al. Inhibition of HIV by an anti-HIV protease synthetic peptide blocks an early step of viral replication. *Res Virol*. 1992;143(5):311–9.
- Ventoso I, Navarro J, Munoz M, Carrasco L. Involvement of HIV-1 protease in virus-induced cell killing. *Antiviral Res*. 2005;66(1):47–55.
- Wagner RN, Reed JC, Chanda SK. HIV-1 protease cleaves the serine-threonine kinases RIPK1 and RIPK2. *Retrovirology*. 2015;12(1):74.
- Warren K, Wei T, Li D, Qin F, Warrilow D, Lin M-H, et al. Eukaryotic elongation factor 1 complex subunits are critical HIV-1 reverse transcription cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(24):9587.
- Welker R, Hohenberg H, Tessmer U, Huckhagel C, Kräusslich HG. Biochemical and structural analysis of isolated mature cores of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*. 2000;74(3):1168–77.
- Whitmore L, Wallace BA. DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res*. 2004;32:W668–

73.

- Whitmore L, Wallace BA. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: Methods and reference databases. *Biopolymers*. 2008;89(5):392–400.
- Wickham H. Reshaping Data with the reshape Package. *J Stat Software*; Vol 1, Issue 12. 2007 Nov 13; Available from: <https://www.jstatsoft.org/v021/i12>
- Wieggers K, Rutter G, Schubert U, Grättinger M, Kräusslich H-G. Cyclophilin A Incorporation Is Not Required for Human Immunodeficiency Virus Type 1 Particle Maturation and Does Not Destabilize the Mature Capsid. *Virology*. 1999;257(1):261–74.
- Wills JW, Craven RC. Form, function, and use of retroviral Gag proteins. *AIDS*. 1991;5(6):639–54.
- Wlodawer A, Erickson JW. Structure-Based Inhibitors of HIV-1 Protease. *Annu Rev Biochem*. 1993;62(1):543–85.
- Woodward CL, Prakobwanakit S, Mosessian S, Chow SA. Integrase interacts with nucleoporin NUP153 to mediate the nuclear import of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*. 2009;83(13):6522–33.
- Worth CL, Preissner R, Blundell TL. SDM--a server for predicting effects of mutations on protein stability and malfunction. *Nucleic Acids Res*. 2011;39(suppl):W215–22.
- Wu J, Matunis MJ, Kraemer D, Blobel G, Coutavas E. Nup358, a cytoplasmically exposed nucleoporin with peptide repeats, Ran-GTP binding sites, zinc fingers, a cyclophilin A homologous domain, and a leucine-rich region. *J Biol Chem*. 1995;270(23):14209–13.
- Xu H, Franks T, Gibson G, Huber K, Rahm N, Strambio De Castillia C, et al. Evidence for biphasic uncoating during HIV-1 infection from a novel imaging assay. *Retrovirology*. 2013;10(1):70.
- Yang R, Shi J, Byeon I-JL, Ahn J, Sheehan JH, Meiler J, et al. Second-site suppressors of HIV-1 capsid mutations: restoration of intracellular activities without correction of intrinsic capsid stability defects. *Retrovirology*. 2012;9(1):30.
- Yin L, Braaten D, Luban J. Human immunodeficiency virus type 1 replication is modulated by host cyclophilin A expression levels. *J Virol*. 1998;72(8):6430–6.
- Yoo S, Myszka DG, Yeh C, McMurray M, Hill CP, Sundquist WI. Molecular recognition in

the HIV-1 capsid/cyclophilin A complex 1. 1997;269(5):780–95.

Yoshinaka Y, Luftig RB. Murine leukemia virus morphogenesis: cleavage of P70 in vitro can be accompanied by a shift from a concentrically coiled internal strand to a collapsed form of the virus core. *Proc Natl Acad Sci.* 1977;74(8):3446–50.

Zhang R, Mehla R, Chauhan A. Perturbation of Host Nuclear Membrane Component RanBP2 Impairs the Nuclear Import of Human Immunodeficiency Virus -1 Preintegration Complex (DNA). Vij N, editor. *PLoS One.* 2010;5(12):e15620.

Zhou H, Xu M, Huang Q, Gates AT, Zhang XD, Castle JC, et al. Genome-scale RNAi screen for host factors required for HIV replication. *Cell Host Microbe.* 2008;4(5):495–504.



Nyilvántartási szám: DEENK/333/2019.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

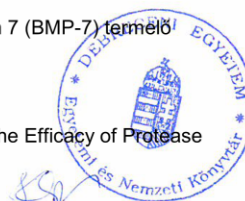
Jelölt: Tóth Ferenc
Neptun kód: VZNIWD
Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Csősz, É., **Tóth, F.**, Mahdi, M., Tsapraillis, G., Emri, M., Tőzsér, J.: Analysis of networks of host proteins in the early time points following HIV transduction.
BMC Bioinformatics. 20, 1-18, 2019.
DOI: <https://doi.org/10.1186/s12859-019-2990-3>
IF: 2.511 (2018)
2. **Tóth, F.**, Kádas, J., Mótyán, J. A., Tőzsér, J.: Effect of internal cleavage site mutations in human immunodeficiency virus type 1 capsid protein on its structure and function.
FEBS Open Bio. 6 (8), 847-859, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/2211-5463.12094>
IF: 2.143

További közlemények

3. Bozóki, B., Gazda, L., **Tóth, F.**, Miczi, M., Mótyán, J. A., Tőzsér, J.: A recombinant fusion protein-based, fluorescent protease assay for high throughput-compatible substrate screening.
Anal. Biochem. 540-541, 52-63, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2017.11.001>
IF: 2.507
4. **Tóth, F.**, Tőzsér, J., Hegedűs, C.: Indukálható bone morphogenetic protein 7 (BMP-7) termelő fogból eredetű őssejt vonal létrehozása és vizsgálata.
Fogorv. Szle. 111 (2), 38-43, 2018.
5. Mahdi, M., Matúz, K., **Tóth, F.**, Tőzsér, J.: A Modular System to Evaluate the Efficacy of Protease Inhibitors against HIV-2.
PLoS One. 9 (11), 1-13, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0113221>
IF: 3.234





6. Mótyán, J. A., **Tóth, F.**, Tózsér, J.: Research Applications of Proteolytic Enzymes in Molecular Biology.
Biomolecules. 3 (4), 923-942, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/biom3040923>
7. Csósz, É., Boross, P., Csutak, A., Berta, A., **Tóth, F.**, Póliska, S., Török, Z., Tózsér, J.:
Quantitative analysis of proteins in the tear fluid of patients with diabetic retinopathy.
Journal of Proteomics. 75 (7), 2196-2204, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2012.01.019>
IF: 4.088

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 14,483

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
4,654**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2019.10.01.



9. TÁRGYSZAVAK/KEYWORDS

I-es típusú humán immundeficiencia vírus/ human immunodeficiency virus type I

Kapszid fehérje/ capsid protein

Cirkuláris dikroizmus spektroszkópia/ circular dichroism spectroscopy

Ciklofilin A/ cyclophilin A

Proteáz/ protease

Mutagenézis/ mutagenesis

Gazdasejt válasz/ host response

Jelölés nélküli proteomika/ label free proteomics

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm Prof. Dr. Tózsér József intézetvezető egyetemi tanár Úrnak, hogy témavezetőként számos elméleti és gyakorlati tanáccsal segítette munkámat.

Köszönöm Prof. Dr. Fésüs László akadémikus, korábbi intézetvezető egyetemi tanár Úrnak, hogy tanulmányaimat a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézetben végezhettem, és munkámat mindvégig támogatta.

Köszönöm Dr. Kádas Jánosnak, Dr. Mótyán Jánosnak, Dr. Csösz Évának és Dr. Kurtán Tibornak szakmai segítségüket, valamint Dr. Joóné Matúz Krisztina, Dr. Mohamed Mahdi, Golda Mária és Szojka Zsófia kollégáimnak, hogy bármikor számíthattam rájuk.

Köszönöm Dr. George Tsaprailis-nak a jelölés nélküli kvantitálás kivitelezését, és Dr. Emri Miklósnak a tömegspektrometriai adatok statisztikai kiértékelését.

Köszönöm Janics-Pető Szilvia asszisztensnek a számtalan gyakorlati segítséget.

Köszönöm a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet dolgozóinak és mindazoknak segítségét, akik valamilyen formában hozzájárultak Ph.D. értekezésem elkészítéséhez.

Köszönöm édesanyám† támogatását, aki nélkül mindez nem valósulhatott volna meg.

A munka kivitelezéséhez az OTKA K101591, NKFIH K125238, a TÁMOP 4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0023 és TÁMOP-4.2.2.D-15/1/KONV-2015-0016 projektek nyújtottak támogatást. A kutatást a GINOP-2.3.2-15-2016-00044 számú „A gyógyszerkutatás újabb irányai: peptid-fehérje kölcsönhatások a magasabb rendű fehérjeszerveződések szabályozásában - PHARMPROT teaming” című projekt is támogatta. A disszertáció létrejöttét az Innovációs és Technológiai Minisztérium által meghirdetett Felsőoktatási Intézményi Kiválósági Program NKFIH-1150-6/2019 számon támogatta, a Debreceni Egyetem Biotechnológia tématerületi programja keretében.

11. FÜGGELÉK

1. **Tóth F**, Kádas J, Mótyán JA, Tózsér J. Effect of internal cleavage site mutations in human immunodeficiency virus type 1 capsid protein on its structure and function. *FEBS Open Bio.* 2016;6(8): 847–859.
2. Csósz É, **Tóth F**, Mahdi M, Tsaprailis G, Emri M, Tózsér J. Analysis of networks of host proteins in the early time points following HIV transduction. *BMC Bioinformatics.* 2019; 20: 398.