

Humán immundeficiencia vírus 1 proteáz ellenes
makromolekuláris inhibitorok
tervezése, előállítása és jellemzése

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés

Miklóssy Gabriella



Témavezető:
Dr. Bagossi Péter

Debreceni Egyetem
Orvos- és Egészségtudományi Centrum
Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet
Debrecen, 2008

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

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

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Bagossi Péter egyetemi adjunktus Úrnak a munkám során nyújtott szakmai irányításáért és támogatásáért.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Tőzsér József egyetemi tanár Úrnak, hogy számos elméleti és gyakorlati tanáccsal segítette munkámat.

Köszönöm Dr. Boross Péter egyetemi tanársegéd Úrnak a gyakorlati munkában nyújtott hasznos tanácsait.

Köszönöm Dr. Kádas János, Dr. Sperka Tamás, Dr. Varga Angelika, Bander Pálma és Matúz Krisztina kollégáimnak és egyben barátaimnak, hogy bármikor számíthattam rájuk.

Köszönöm Pető Szilvia, Szabó Katalin, Bereczki Kamilla és Vágóné Toldi Hajnalka asszisztenseknek a számtalan gyakorlati segítséget.

Köszönet illeti kollaborációs partnereinket, Dr. John M. Louist és Dr. Rieko Ishimat az NMR vizsgálatok elvégzéséért.

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

Köszönöm férjemnek, Ruff Gábornak, hogy mindvégig segítette munkámat és mindenben kitartott mellettem.

Köszönöm szüleim és testvéreim támogatását, akik nélkül mindez nem valósulhatott volna meg.

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AIDS	szerzett immunhiányos szindróma
ATLL	felnőtt T-sejtes leukémia/limfóma
CA ¹	kapszid protein
CMV	citomegalovírus
DABCYL	4-(4-dimetilaminofenilazo)benzoesav
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium- tápfolyadék
DMSO	dimetil-szulfoxid
DTT	ditiotreitol
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
FBS	fötális marha szérum
FRET	fluoreszcencia-rezonancia energia transzfer
GFP	zöld fluoreszcens fehérje
Gua-HCL	guanidin-hidroklorid
HAM	HTLV-1 asszociált mielopátia
HIV	humán immundeficiencia vírus
HPLC	magas nyomású folyadékkromatográf
HTLV	Humán T-Limfotróp Vírus
IN ¹	integráz
IPTG	izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid
MA ¹	mátrix protein
MLV	egér leukémia vírus
NMR	mágneses magrezonancia
PBS	foszfát puffer
P1, P2, P3, stb. ²	szubsztrát aminosavrésze
PEG	polietilénlikol
PIC	preintegrációs komplex
PVDF	poliviniliden-fluorid
PR ¹	retrovirális proteáz
RP	fordított-fázisú
RT ¹	reverz transzkriptáz
SDS PAGE	nátrium dodecil szulfát poliakrilamid gélelektroforézis
SU ¹	sejtfelszíni protein
TFA	trifluor-ecetsav
TM ¹	transzmembrán protein
TSP	trópusi spasztikus paraparézis
VSV	vezikuláris sztomatitis vírus

¹ A retrovírus fehérjék kétbetűs nevezéktana Leis és mtsai., (1988) szerint. A nem ismert funkciójú fehérjéket p betűvel, majd azt követően 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.

TARTALOMJEGYZÉK

1.	BEVEZETÉS	6
1.1.	A retrovírusok jellemzése	6
1.2.	A retrovírusok életsiklusa	8
1.3.	A HIV-1 proteáz jellemzése	10
1.4.	A HIV-1 proteáz inhibitorai	12
2.	CÉLKITŰZÉS	14
3.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	15
3.1.	Oligopeptidek	15
3.2.	HPLC módszer	15
3.3.	Mikrotiter lemez alapú módszer	16
3.4.	Molekuláris modellezés	16
3.5.	A HIV-1 proteáz mutagenézise	17
3.6.	Az enzimek tisztítása	17
3.7.	Makromolekuláris inhibitorok gátlási vizsgálatai	18
3.8.	Heterodimer-képzés vizsgálata	18
3.9.	NMR-spekroszkópia	19
3.10.	A HIV-1 vektorrendszer plazmidjainak módosítása	19
3.11.	Vírusrészecskék előállítása	20
3.12.	Fertőzőképesség vizsgálata	20
4.	EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS	21
4.1.	Mikrotiter lemez alapú fluoreszcens módszer kidolgozása retrovirális proteázok gátlásvizsgálataihoz	21
4.1.1.	<i>HIV-1 és HTLV-1 természetes hasítási helyen alapuló peptidek vizsgálata HPLC módszerrel</i>	21
4.1.2.	<i>A belső szűrő hatás kalibrálása a mikrotiter lemez alapú fluoreszcens módszerhez</i>	22
4.1.3.	<i>Mikrotiter lemez alapú módszer</i>	24
4.1.4.	<i>A HIV-1 és a HTLV-1 proteáz gátlási profiljának összehasonlítása</i>	24
4.2.	<i>Makromolekuláris HIV-1 proteáz inhibitorok vizsgálata</i>	25
4.2.1.	<i>HIV-1 proteáz in silico mutagenézise</i>	25
4.2.2.	<i>In vitro gátlásvizsgálatok</i>	28
4.2.3.	<i>NMR vizsgálatok</i>	32

4.2.4.	<i>A fertőzőképesség gátlásának vizsgálata</i>	33
5.	ÖSSZEFOGLALÁS	38
6.	IRODALOMJEGYZÉK	39
7.	KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA	48

1. BEVEZETÉS

1.1. A retrovírusok jellemzése

A retrovírusok pozitív szálú, diploid RNS-genommal rendelkező vírusok, a Retroviridae családba tartoznak. A családon belül megkülönböztethetjük az Orthoretrovirinae és a Spumaretrovirinae alcsaládot. Az Alpharetrovirus, Betaretrovirus, Deltaretrovirus, Epsilonretrovirus és Gammaretrovirus nemzetség mellett az Orthoretroviridae alcsaládba tartozik a Lentivirus nemzetség, melynek nevezetes képviselője a humán immunodeficiencia vírus (HIV).

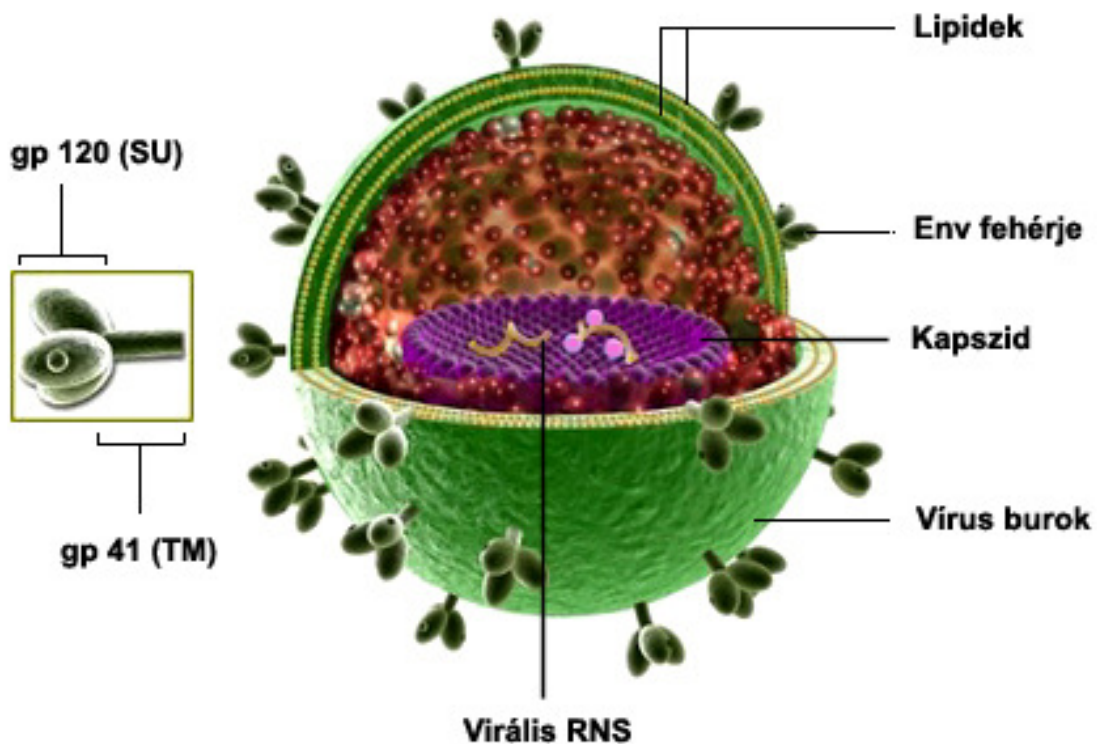
A retrovírusokat Vilhelm Ellerman és Oluf Bang fedezte fel 1908-ban (Ellerman és Bang, 1908). A kutatások az első 60 évben kizárólagosan állatok megfertőződésével és megbetegedésével foglalkoztak. Az első humán patogén retrovírus, a HTLV-1 (Humán T-Limfotróp Vírus 1) felfedezése 1980-ban történt (Poiesz és mtsai, 1980). A HTLV-1 fertőzés számos betegséget okozhat, pl. felnőtt T-sejtes leukémiát/limfómát (ATLL), trópusi spasztikus paraparesist/HTLV-1 asszociált mielopátiát (TSP/HAM) (Johnson és mtsai, 2001). A HTLV-1 fertőzés egyes területeken endemikus (pl. Japán, Irán, Peru, Kolumbia, a Karib-térség), és a fertőzöttek számát 10-20 millióra becsülik (Verdonck és mtsai, 2007).

A HTLV-1 felfedezését a szerzett immunhiányos tünetegyüttest (AIDS-t) okozó vírus, a HIV-1 azonosítása követte 1983-ban (Barré-Sinoussi és mtsai, 1983; Gallo és mtsai, 1984; Levy és mtsai, 1984). A becslések szerint 2007-ben 33,2 millióra tehető a HIV-1 fertőzöttek száma és 2,1 millióan haltak meg valamilyen, az AIDS miatt kialakuló betegségben (UNAIDS, 2007).

A retrovírus virionok átmérője 80-100 nm között változik, külső lipid burkukban virális glikoproteinek (Env) találhatók. A buroklevele három heterodimert tartalmaznak, melyek egy felszíni receptorkötő alegységből (SU) és egy ezzel nem-kovalens kölcsönhatásban lévő transzmembrán (TM) alegységből állnak (1. ábra). A belső protein mag, mely mátrix (MA) és kapszid (CA) fehérjékből épül fel, alakja és elhelyezkedése a család különböző fajaiban eltérő. A magban található a nukleokapszid (NC) fehérjével asszociált virális genom, amely az életciklushoz nélkülözhetetlen 3 enzimet is kódolja: a proteázt (PR), a reverz transzkriptázt (RT) és az integrázt (IN) (Coffin, 1992, 1997).

A virális genom szerveződése szerint megkülönböztethetjük az egyszerű és az összetett retrovírusokat. A legegyszerűbb esetben, pl. az egér leukémia vírus (MLV) esetében, a retrovirális replikációhoz csupán három, a vírus által kódolt gén szükséges (Varmus és Brown, 1989). A *gag*, mely a virion struktúrális fehérjéit, a *pol*, mely a virális enzimeket és

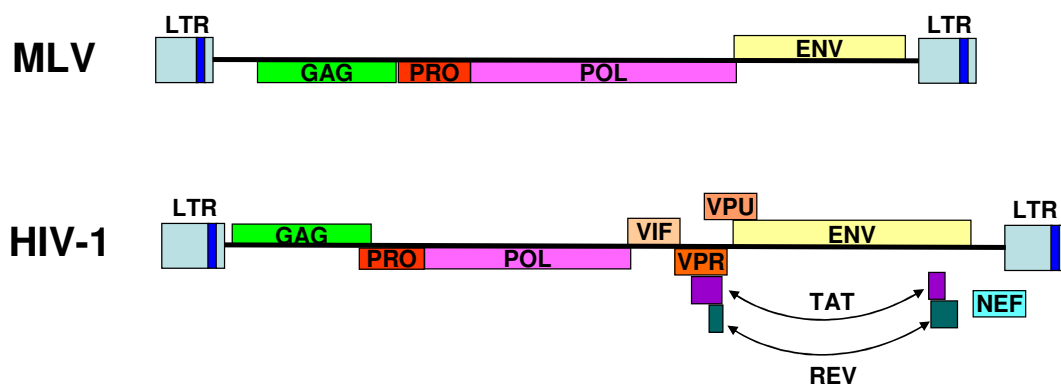
az *env*, mely a burokleféréjét kódolja. Az integrálódott provírusban ez a három gén mindig ugyanabban a sorrendben található (5'-*gag-pol-env*-3') és mindkét végén a reverz transzkripció során keletkező, jellegzetes hosszúságú ismétlődő végszekvenciák (LTR, long terminal repeat) találhatók (2. ábra). Az LTR tartalmazza a retrovirális genom hatékony transzkripciójához szükséges promóter és enhanszer elemeket, valamint az mRNS 3'-végi poliadenilációjához szükséges szekvenciákat. Az egyszerű retrovírusok esetében az integrálódott províusról két különböző transzkriptum keletkezik, mégpedig a genomi RNS, ami mRNS-ként is szolgál a Gag és Pol szintéziséhez, illetve egy kisebb illesztett mRNS, ami az Env fehérjét kódolja. A virális génexpressziót *cisz*-aktiváló virális DNS vagy RNS szekvenciák és a gazdasejt által kódolt *transz*-aktiváló faktorok együttesen szabályozzák.



1. ábra: A HIV-1 virion szerkezete (<http://www.tibotec-hiv.com> alapján).

A HIV-1, a Lentivirus genus többi tagjával együtt, összetett genommal rendelkezik (2. ábra), ami azt jelenti, hogy az egyszerű retrovírusokra jellemző géneken kívül egyéb géntermékeket is kódol (Cullen és Greene, 1990; Pavlakis és Felber, 1990). A Tat és a Rev fehérjék *transz*-aktiváló elemként szabályozzák a HIV-1 génexpressziót (Cullen és Greene, 1989; Pavlakis és Felber, 1990). A Tat fehérje a HIV-1 LTR-specifikus transzkripciójának

hatásos aktivátora és ezért egy erőteljes pozitív visszacsatolást hoz létre. A Tat fehérjének ez a hatása a Rev fehérje felhalmozódását eredményezi, ami meggátolja a többszörösen illesztett, szabályozó mRNS-ek szintézisét és aktiválja az egyszeresen illesztett, a strukturális fehérjéket kódoló mRNS szintézisét (Cullen és Greene, 1989; Kim és mtsai, 1989; Pavlakis és Felber, 1990). A HIV-1 esetében 9 különböző géntermékről több mint 20 eltérő mRNS keletkezik (Cullen és Greene, 1990; Pavlakis és Felber, 1990). Ezek egyike, a Nef protein, korai géntermék, amelynek szabályozó szerepe van, míg a Vpr, a Vpu és a Vif késői géntermékek, melyeknek a morfogenezisben és a vírusok sejtből való kijutásában van szerepük.

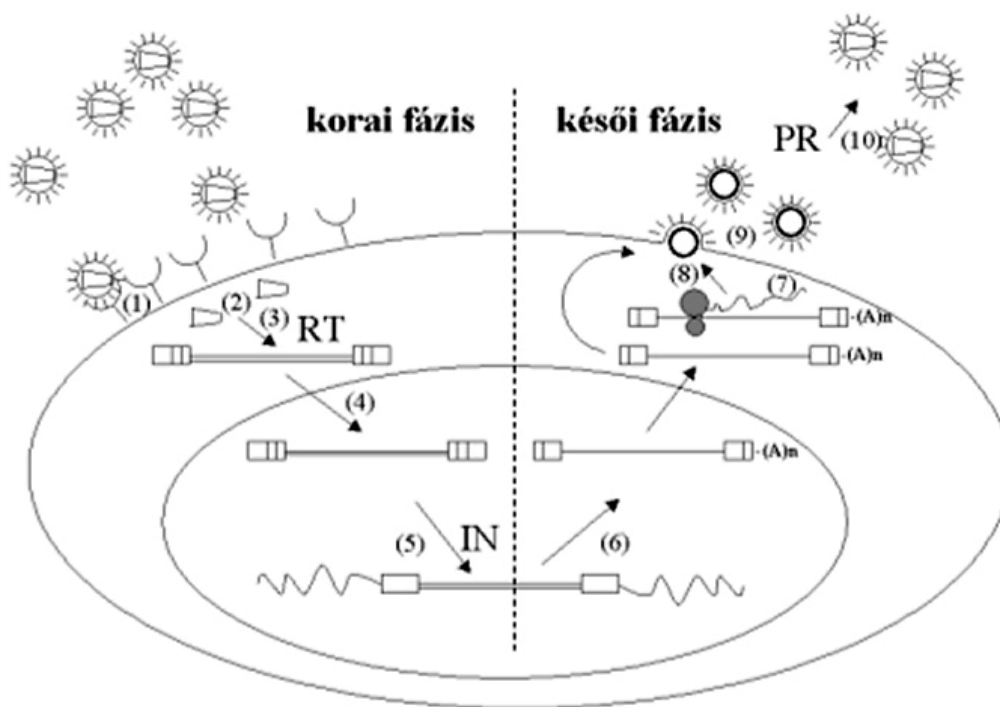


2. ábra: Az MLV, egy tipikus egyszerű retrovírus és a HIV-1, mint összetett retrovírus sematikus genomszerkezete (Cullen, 1991 alapján).

1.2. A retrovírusok életciklusa

A retrovírusok életciklusa két szakaszra osztható, melyeket korai és késői fázisnak nevezünk (3. ábra). A korai fázis első lépéseként a vírus membrán fúzióval vagy receptor közvetített endocitózissal bejut a sejtbe. A reverz transzkripció a belépő kapszid struktúrában történik meg, melyben a pozitív szálú RNS-genom dupla szálú DNS-genommá íródik át. A genomi DNS-ből és a belépő kapszid néhány fehérje komponenséből preintegrációs komplex (PIC) formálódik, amely bejut a sejtmagba. A legtöbb retrovírus esetében ez passzív lépés, így csak osztódó sejteket képesek megfertőzni, melyek sejtmaghártyája nem ép, azonban a HIV-1 és a Lentivírus alcsaládba tartozó egyéb retrovírusok esetében a PIC aktív transzportja lehetővé teszi nem osztódó sejtek fertőzését is (Tőzsér és Oroszlán, 2003). A virális DNS a PIC nélkülözhetetlen részét képező IN segítségével beépül a gazdasejt genomjába. A késői fázis első lépése a virális DNS transzkripciója, mely a celluláris RNS-polimeráz II közvetítésével megy végbe. A keletkezett mRNS molekulák egy része módosítatlanul elhagyja a sejtmagot és a Gag, illetve Gag-Pro-Pol poliproteinek templátja lesz vagy a

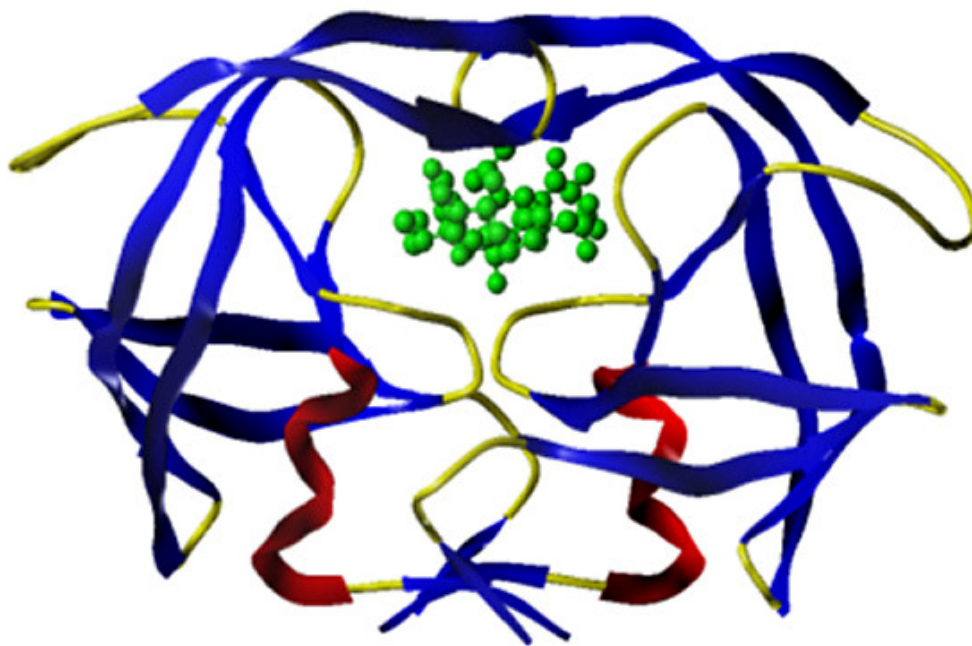
vírusburokba kerül és az utódvírusok genomjának templátjaként szolgál. Egy kisebb, illesztett mRNS-ről íródnak át az *env*-kódolt fehérjék, melyek előbb glikozilálódnak, majd a plazmamembránba való transzport során egy felületi (SU) és egy transzmembrán (TM) fehérjére hasadnak egy celluláris proteáz hatására. Számos, többszörösen illesztett mRNS szolgál a kiegészítő fehérjék, mint a Tat, Rev, Vif, Nef, Vpr szintézisének templátjaként. A Gag fehérjék a gazdasejt membránjának Env proteinekben koncentrált részein, a membrán belső felületén csoportosulnak, majd a fánk-alakú kapszid struktúrával rendelkező „éretlen” vírusrészcseke a „lefűződés” (budding) révén kikerül a sejtől. A vírus a poliproteineket meghatározott helyeken elhasító proteáz aktiválódása után válik „éretté”, fertőzőképessé. Ekkor a vírusrészcsekek tömör, kúp-alakú belső szerkezete van. Mivel csak az „érett” vírusrészcsekek fertőzőképesek, a PR működése nélkülözhetetlen a vírus replikáció során (Tőzsér, 2003).



3. ábra: A retrovírusok életciklusa (Tőzsér, 2003 alapján). (1) Kötődés-penetráció. (2) A vírusburok elvesztése. (3) Provirális DNS-szintézis. (4) A preintegrációs komplex bejutása a magba. (5) Integráció. (6) Provírus expressziója. (7) Transzláció. (8) Virion összerendeződése. (9) Virion lefűződése. (10) A virion „érése” a PR segítségével.

1.3. A HIV-1 proteáz jellemzése

A retrovirális proteázok 99-138 aminosavból álló, 11-15 kDa molekulatömegű fehérjék, amelyek több, aszpartil proteázokra jellemző tulajdonságot mutatnak (pepszatinnal való gátolhatóság, a katalitikus aszpartát mutációjával előidézhető enzimaktiváció). Azonban a két, topológiailag hasonló, de mégsem teljesen egyforma domént hordozó egyláncú celluláris aszpartil proteázoktól eltérően, a retrovirális proteázok két egyforma alegységből felépülő, dimerként működő enzimek. A retrovirális proteázok első- és másodlagos szerkezete a celluláris aszpartil proteázok egyik doménjével analóg (Toh és Mutsaers, 1985), számos β -redőt és enzimtől függően egy vagy két rövid α -hélixet tartalmaznak. A két alegység N- és C-terminális láncai összefonódva alkotnak egy négyrétegű antiparallel β -redőt (4. ábra).



4. ábra: A HIV-1 proteáz kristályszerkezet alapján készült szalagmodellje. Piros szín jelöli az α -héliceket, kék a β -redőt, sárga a hurok régiókat. A bekötődött szubsztrátot zöld színnel, valamint gömb és pálcika ábrázolással mutatjuk be.

A HIV-1 proteázt három jellegzetes régióval jellemezhetjük: az aktív centrum, az ún. flap és a C-terminális közelében elhelyezkedő konzervált régió. Az aktív centrumot kódoló katalitikus triád (Asp-Thr/Ser-Gly) az N-terminális közelében helyezkedik el. Az alegységek katalitikus triádjai hurkot alkotnak, amely analóg a celluláris aszpartil proteázokra leírt ψ -struktúrával (Oroszlán és Tőzsér, 1990). A katalitikus tripletek hidrogénkötések hálóját alkotják, keresztül kapcsolódnak egymáshoz (Davies, 1990; Wlodawer és Erickson, 1993), amit

tűzoltófogásnak („fireman’s grip”) neveznek, utalva a kötés geometriájára és erős jellegére. A flexibilis „flap” régió többé-kevésbé konzervatív (Miller és mtsai, 1989; Navia és mtsai, 1989), mely a szubsztrát, illetve az inhibitor kötődésekor elmozdul és ráhajlik a ligandra, így stabilizálva a komplexet (Miller és mtsai, 1989; Swain és mtsai, 1990; Jaskolski és mtsai, 1991). A harmadik konzervált régió (Gly-Arg-Asp/Asn) a C-terminális közelében helyezkedik el és ion párok kialakításával a dimerizációban játszik fontos szerepet.

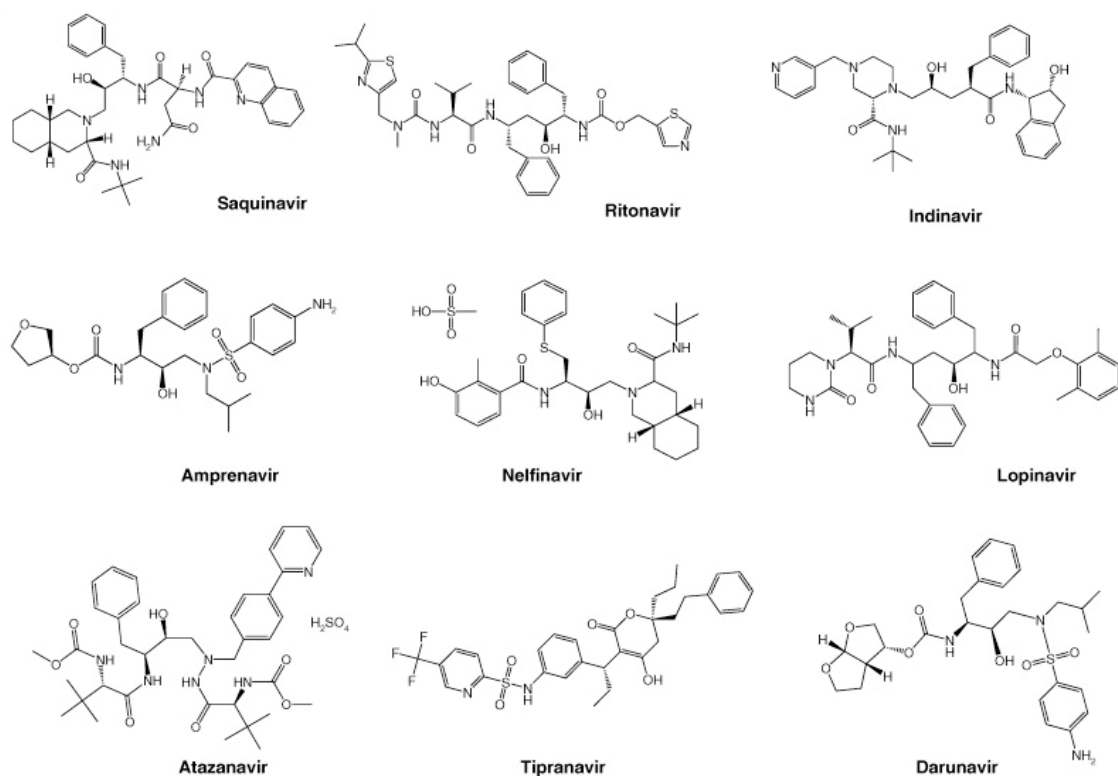
A HIV-1 PR savas pH-jú (4,5-6,5) környezetben mutatja a legnagyobb aktivitást (Grinde és mtsai, 1992) és a celluláris aszpartil proteázokhoz hasonlóan *in vitro* nagy ionerősség (1-2 M NaCl, (Kotler és mtsai, 1989)) mellett is aktív. A PR pontos hasítási helyeit a virális poliproteinek felhasználásával és az érett fehérjék N- és C-terminális szekvenciáinak meghatározásával azonosították. A hasítási helyek összehasonlításával nem találtak egységes aminosavsorrendet, de elmondható, hogy a szekvenciák többnyire hidrofób jellegűek. Az a felfedezés, hogy kis szintetikus peptidek szubsztrátként vagy inhibitorként funkcionálhatnak, megkönnyítette a PR specificitásának részletes tanulmányozását (Katz és Skalka, 1994). A HIV-1 PR esetén legalább hét aminosavnyi szekvencia szükséges a felismeréshez és a hasításhoz. A rövidebb, nem hasítható peptidek kompetitív gátlószerek lehetnek (Kotler és mtsai, 1988; Roberts, 1990; Tözsér és mtsai, 1991).

Számos munkacsoport módosította az eredeti, HPLC-n alapuló peptid esszét. Néhány esetben radioaktivitás segítségével detektálták a hasítási termékeket (Hyland és mtsai, 1990). Az egyik módosított peptid szubsztrát N-terminális prolint tartalmazott és a hasítás során keletkező N-terminális primer amint fluoreszkaminnal detektálták (Leis és mtsai, 1989). A PR aktivitásának mérésére kolorimetriás esszéket is kidolgoztak. Az izatint használó módszer (Broudhurst és mtsai, 1991) a minta elfőzését igényli, így nem alkalmazható mikrotiter lemezre, míg egy másik módszer, melynek során a szintetikus peptid hidrolízisét két nem enzimatis lépés követi (Stebbins és Debouck, 1997), alkalmas a HIV-1 PR aktivitásának nagy átersztőképességű mérésére. Először a HIV-1 proteázra írtak le fluorogén aktivitásmérő módszert (Matayoshi és mtsai, 1990; Wang és mtsai, 1990). Szubsztrátként a HIV-1 MA↓CA hasítási helyen alapuló peptidet használták, mely tartalmazott az 5-((2-aminoetil)amino)naftalén-1 szulfonsavval, vagyis az EDANS nevű fluorofórral módosított glutamátot és a 4-(4-dimetilaminofenilazo)benzoesavval, vagyis DABCYL nevű akceptor molekulával módosított lizint. Az akceptor molekulát úgy választották ki, hogy az abszorpciós spektruma átfedjen a fluorofór emissziós spektrumával, ezért az EDANS teljes gerjesztési energiája csak a proteolitikus hasítás következtében tud felszabadulni. Később

más proteázokra (pl. citomegalovírus PR, Holskin és mtsai, 1995; hepatitis C vírus NS3 PR, Liu és mtsai, 1999) is kifejlesztettek hasonló elven alapuló mérési módszereket.

1.4. A HIV-1 proteáz inhibitorai

Kezdetben a kis molekulájú inhibitorokra koncentráltak a proteázt célzó hatóanyagok tervezésekor, különösen a szubsztrát alapú peptidszerű gátlószerekre. A klinikumban jelenleg használatos minden inhibitor ebbe a típusba tartozik (Wlodawer, 2002; Randolph és DeGoey, 2004). A klinikumban jelenleg alkalmazott 9 HIV-1 PR inhibitor neve és szerkezete látható az 5. ábrán. A tipranavir kivételével mindegyik inhibitor szerkezete a HIV-1 PR természetes hasítási helyének szerkezetére hasonlít. Közös tulajdonságuk, hogy P1 pozícióban fenil csoportot hordoznak és egy nem hidrolizálódó átmeneti-állapotot mimikáló csoportot (pl. hidroxietilamin) tartalmaznak a hasítandó kötésnek megfelelő helyen (Menendez és Tőzsér, 2008).



5. ábra: Az AIDS-terápiában alkalmazott HIV-1 proteináz inhibitorok (Menendez-Arias és Tőzsér, 2008).

Azonban a kis molekulájú inhibitorokkal szemben - a reverz transzkriptáz hibajavító funkciójának hiánya miatt - gyorsan rezisztencia fejlődik ki, és az egyik inhibitorral történő

kezelés során megjelenő rezisztens törzsekre gyakran más inhibitorok is hatástalanok lesznek (Swanstrom és Eron 2000; Barbaro és mtsai, 2005). Az aktív centrumot (Yehia és mtsai, 2004), a dimerizációs felszínt (Schramm és mtsai, 1991, 1999; Caflisch és mtsai, 2000; Hwang és Chmielewski 2004, 2005) vagy a flap régiót (Rezacova és mtsai, 2002; Sperka és mtsai, 2005) célzó, nem peptidszerű komponensek új lehetőséget jelenthetnek az AIDS elleni küzdelemben. A HIV-1 PR ellenes inhibitorok sikere alapján a HTLV-1 PR is ígéretes célpontnak tűnik az általa okozott betegségek kezelésére, megelőzésére (Tózsér és Weber, 2007).

A dimer formában aktív proteáz makromolekuláris inhibitorokkal is gátolható, melyek nagy kölcsönható felületük miatt kevésbé lehetnek érzékenyek a rezisztenciát okozó mutációkra (Babe és mtsai, 1995; McPhee és mtsai, 1996; Rozzelle és mtsai, 2000, Todd és mtsai, 2000a). Irodalomból ismert, hogy a defektív PR monomerek tervezése és a fertőzött sejtekben történő expressziója hatékony módszer a PR gátlására (Babe és mtsai, 1995; Junker és mtsai, 1996; McPhee és mtsai, 1996; Rozzelle és mtsai, 2000; Todd és mtsai, 2000a, 2000b). Hasonló módszert alkalmaztak a HIV-1 Gag (Trono és mtsai, 1989; Shimano és mtsai, 1999), Tat (Pearson és mtsai, 1990; Modesti és mtsai, 1991; Fraisier és mtsai, 1998), Rev (Bevec és mtsai, 1992; Liu és mtsai, 1994), Env (Buchscher és mtsai, 1992; Steffy és Wong-Staal 1993; Buchscher és mtsai, 1995; Chen és mtsai, 1996) és Vpr (Sawaya és mtsai, 2000) fehérjéivel szemben. A kis molekulájú inhibitorok alkalmazásánál számolni kell a kombinált terápia (HAART, highly active anti-retroviral therapy) mellékhatásainak kialakulásával, pl. inzulin rezisztencia, lipodisztrófiás szindróma, érelmeszesedés (Tózsér 2001; Rudich és mtsai, 2005). A makromolekuláris inhibitorok eltérő kémiai szerkezetük miatt várhatóan nem váltják majd ki az előbb említett mellékhatásokat. A transz-domináns negatív HIV-1 proteázokkal elsőként Craik és munkatársai foglalkoztak (Babe és mtsai, 1995; Junker és mtsai, 1996; McPhee és mtsai, 1996; Rozelle és mtsai, 2000; Todd és mtsai, 2000a; 2000b). Bemutatták, hogy az Asp25Lys, Gly49Trp és Ile50Trp mutációkat hordozó PR (PR_{KWW}) a vad típusú PR igen hatékony gátlószere *in vitro* és sejtkultúrás kísérletekben. Ezek az aminosavcserek segítenek megakadályozni a PR_{KWW}:PR_{KWW} homodimerek kialakulását a térbeli és elektrosztatikus taszítás miatt, valamint azt is célozzák, hogy a PR_{wt}:PR_{KWW} heterodimerekben erősebb kölcsönhatások alakuljanak ki, mint a vad típusú PR_{wt}:PR_{wt} homodimerekben. A több aminosavcsert hordozó fehérjék alkalmasabbak a génterápiás felhasználásra, mivel a kevesebb mutációt tartalmazókkal összehasonlítva kisebb az esély a visszaalakulásra.

2. CÉLKITŰZÉS

A HIV-1 PR működése nélkülözhetetlen a fertőzőképes vírus kialakulásához, ezért fontos célpont az AIDS-terápiában. Az eddig alkalmazott inhibitorokkal szemben rövid idő alatt rezisztencia alakul ki, ezért állandó az igény az újabb, széles specificitású inhibitorok kifejlesztésére. A HTLV-1 PR szintén ígéretes lehet az ATL és a TSP/HAM terápiájában. Munkánk során az alábbi célokat tűztük ki:

- Egy nagy áteresztőképességű és gyors, mikrotiter lemez alapú fluoreszcens aktivitásmérő módszer kidolgozását, mely alternatívát jelenthet a hagyományos HPLC módszer mellett és lehetővé teszi a különböző retrovirális proteázok aktivitásának közvetlen és gyors összehasonlítását, inhibitorok tesztelését és gátlási állandóik meghatározását.
- Új HIV-1 PR ellenes makromolekuláris inhibitorok előállítását, melyek nagy kölcsönható felületük miatt kevésbé lehetnek érzékenyek a rezisztenciát okozó mutációkra és amelyek felhasználhatóak lennének AIDS-ellenes génterápiás alkalmazásokban. Az irodalmi példától eltérően, a mutációs stratégiánkban a hidrofíl aminosavakat részesítenénk előnyben az oldékonyság növelése és a magasabb hatékony koncentráció elérése érdekében.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Oligopeptidek

Az oligopeptideket szilárd fázisú peptidszintézissel készítették, Model 430A automata peptid szintetizátorral (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) vagy félautomata Vega peptid szintetizátorral (Vega-Fox Biochemicals Div., Newbery Energy Corp., Tucson, Arizona). A tisztításhoz RP-HPLC-t használtak (Copeland és Oroszlán, 1988). A peptidek szekvenciáját Beckman 6300 aminosav analízátorral ellenőrizték. A peptid-törzsoldatok desztillált vízzel vagy 10 mM DTT-oldattal készültek, melyek pontos koncentrációját aminosav analízissel határozták meg (Louis és mtsai, 1999a). A peptid oldatokat Dr. Stephen Oroszlántól és Dr. Terry D. Copelandtól kaptuk (Frederick, MD, USA). Az EDANS/DABCYL tartalmú peptideket és a fluoreszcens kontroll peptidként használt RE(EDANS)-t Dr. Ivo Blaha (Ferring Leciva, Prága, Csehország) szintetizálta. A fluoreszcens peptidek törzsoldatait vízzel készítettük.

3.2. HPLC módszer

A tisztított HIV-1 és HTLV-1 proteázokat a korábban leírtak alapján állítottuk elő (Louis és mtsai, 1991, 1999a; Mahalingam és mtsai, 2001). A PR preparátumok fehérjekoncentrációját aminosavanalízissel határoztuk meg. A PR esszéhez 5 µl (8-140 nM) tiszta proteázt, 10 µl 2x inkubációs puffert (0,5 M kálium-foszfát puffer, pH 5,6, 10% glicerol, 2 mM EDTA, 10 mM DTT, 4 M NaCl) és 5 µl (0,01-1,3 mM) szubsztrátot használtunk. Aktív centrum titrálással határoztuk meg az aktív enzimek mennyiségét. Ezekben a kísérletekben 4,8 µl szubsztrátot mértünk a reakcióelegybe és 0,2 µl térfogatú, különböző koncentrációjú inhibitoroldatot. A HIV-1 PR aktív centrum titrálásához a Compound 3 nevű (Grobely és mtsai, 1990) inhibitort használtuk, míg a HTLV-1 PR esetében az IB-268-at. A várható K_M -értéktől függően választottuk az alkalmazott szubsztrátkoncentrációtartományt. A reakcióelegyeket 1 óráig 37 °C-on inkubáltuk, 180 µl 1%-os TFA-oldattal leállítottuk és automata injektor segítségével Nova-Pak C₁₈ reverz fázisú kromatográfiás oszlopra (3,9 mm x 150 mm, Waters Associates Inc.) vittük fel. A szubsztrátot lineáris víz-acetonitril gradienssel (0-100%), 0,05% TFA jelenlétében választottuk el a termékektől és a pufferkomponensektől. Az elválasztást 206 nm-en követtük és a hidrolízis mértékét a kromatográfiás görbe integrálásával számítottuk. Az enzimkoncentrációkat úgy állítottuk be, hogy a szubsztrátok hidrolízise 20% alatt maradjon. A kinetikai paramétereket a reakciósebesség és szubsztrátkoncentráció adatok Michaelis-

Menten egyenlethez illesztésével határoztuk meg, nemlineáris regressziós módszerrel, a Fig.P program (Fig.P Software Corp.) felhasználásával. A kinetikai állandók standard deviációi 20 % alatt voltak. A katalitikus állandót az aktív centrum titrálással kapott aktív enzimkoncentrációk felhasználásával számoltuk.

3.3. Mikrotiter lemez alapú fluoreszcens módszer

A PR esszék során fehér színű mikrotiter lemez lyukaiba mértünk 10 μ l (60-4800 nM) proteázt és 100 μ l PNF puffert (250 mM foszfát puffer, pH 5,6, 5% glicerol, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 500 mM NaCl). Az elegyet 5 percig 37 °C-on előinkubáltuk, majd 90 μ l PNF pufferben oldott fluoreszcens peptid szubsztrát (2-40 μ M) hozzáadásával indítottuk a reakciót. A fluoreszcens szignál emelkedését 460 nm-en detektáltuk 37 °C-on, 355 nm gerjesztési hullámhossz mellett Wallac 1420 Victor2 fluoriméter-luminométer (Wallac Oy, Turku, Finland) felhasználásával. A gátlásvizsgálatok reakciói is 200 μ l végtérfogatban játszódtak le, de az elegy tartalmazott 2 μ l DMSO-t vagy DMSO-ban oldott inhibitor.

A belső szűrő hatás meghatározása a kinetikai méréseknél alkalmazott szubsztrátkoncentráció tartományban történt, a RE(EDANS) dipeptid fluoreszcenciájának mérésével.

Az adatfeldolgozást egy házi készítésű Fortran programmal (KiDet, Bagossi Péter munkája) végeztük. A program egyenest illeszt a fluoreszcens jel-idő görbe kezdeti szakaszára, korrigál a belső szűrő hatással és kiszámolja a k_{kat} és K_M értékeket a Michaelis-Menten egyenlet nemlineáris analízisével. Az enzimkoncentrációt, illetve az inhibitor állandót is kiszámoltathatjuk a programmal, melyhez a Williams-Morrison egyenletet (Williams és Morrison, 1979) használja.

A fluoreszcens módszer validálásához a reakció végén 100 μ l reakcióelegyet eppendorfcövekbe mértünk, 100 μ l stop-oldattal (7,8 M Gua-HCl, 2% TFA) leállítottunk és a mintákat reverz fázisú HPLC segítségével analizáltuk.

3.4. Molekuláris modellezés

Az aminosavcseréket egy nagy felbontású HIV-1 PR kristályszerkezetben (Mahalingam és mtsai, 2002) vagy előzőleg a Sybyl programmal (Tripos Inc., St. Louis, MO, USA) minimalizált szerkezetekben hajtottuk végre. A B monomerben a kiválasztott aminosavat mind a 20 természetes aminosavra kicseréltük. A mutált szerkezeteket a Sybyl programmal energiaminimalizáltuk (500 Powell iteráció, AMBER all atom force field (Weiner és mtsai,

1986), 8 Å cutoff, 4-es dielektromos állandó). Az intermonomer kölcsönhatási energiákat a dimer energiájának és az egyes monomerek energiájának különbségéből számoltuk. Az ígéretes mutánsokat a minimalizálás után kapott kedvező inter- és intramolekuláris energiák, a modellek grafikus vizsgálatával kapott szerkezeti információk, és az általunk preferált stratégia alapján választottuk ki és vetettük alá az *in silico* mutagenézis következő körének. A szerkezeteket Silicon Graphics Fuel grafikus számítógéprendszer és a Sybyl program segítségével vizsgáltuk.

3.5. A HIV-1 proteáz mutagenézise

A mutagenézis alapjául egy 5 mutációt (Q7K, L33I, L63I, C67A és C95A) tartalmazó stabilizált HIV-1 proteáz szekvenciát kódoló pET expressziós vektort használtunk (Louis és mtsai, 1999b; Mahalingam és mtsai, 1999). Kísérleteinkben ezt a pentamutáns enzimet tekintettük vad típusúnak, melynek kinetikai paraméterei megegyeznek a stabilizáló mutációkat nem tartalmazó eredeti enzim paramétereivel (Louis és mtsai, 1999b; Mahalingam és mtsai, 1999). Mutánsainkat a megfelelő oligonukleotid párokat felhasználva (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA), a QuikChange mutagenézis eljárást követve (Stratagene, La Jolla, CA, USA) állítottuk elő. A mutációkat DNS-szekvenálással ellenőriztük, melyet ABI Prism dye terminator cycle sequencing kit és 3100-Avant Genetic Analyzer (mindkettő Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) segítségével hajtottunk végre.

3.6. Az enzimek tisztítása

A stabilizált vad típusú és mutáns HIV-1 proteázok expressziója a megfelelő plazmidokat hordozó *E. coli* BL21(DE3) kultúrákban történt 37 °C-on növesztve 100 µg/ml ampicillin-tartalmú Luria-Bertani tápoldatban, amíg a 600 nm-en mért abszorbanciájuk 0,7 és 1 közé került. Ekkor 1 mM IPTG-vel indukáltuk az expressziót 3,5 órán keresztül. A sejteket 2000 g-vel 20 percig 4 °C-on történő centrifugálással gyűjtöttük be, majd a felülúszó eltávolítása után felvettük a pelletet lízis pufferben (50 mM Tris, pH 8,2, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,5% Triton X-100) és jégen történő szonikálással (Branson Sonifier 450, Branson Ultrasonic Corporation, Danbury, CT, USA) feltártuk. A lizátumot 9000 g-vel 20 percig 4 °C-on centrifugáltuk, majd 3 M urea-tartalmú lízis pufferrel szuszpendáltuk és újra szonikáltuk. Ezt a mosási lépést még háromszor ismételtük meg, melynek eredményeképpen tiszta inklúziós testeket nyertünk. Az utolsó mosási lépés után kapott pelletet feloldottuk a denaturációs pufferben (50 mM Tris, pH 8,0, 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 8 M urea) és átszűrtük 0,22 µm pórusméretű szűrőn (Millipore, Billerica, MA, USA). A fehérjéket POROS 20R2 kromatográfiás oszlopon (PerSeptive

Biosystems Inc., Framingham, MA, USA) HPLC-vel tisztítottuk 0,05% TFA jelenlétében kialakított lineáris víz-acetonitril gradiens (0-100%) segítségével. A proteáz tartalmú frakciók tisztaságát 16%-os poliakriamid géleken ellenőriztük. A tiszta fehérjéket tartalmazó frakciókat összegyűjtöttük és SpeedVac SVC 100H koncentrátor (Savant Instruments Inc., Farmingdale, NY, USA) segítségével beszárítottuk. A proteáz tartalmú száraz pelleteteket 6 M guanidin-hidroklorid oldatban vettük fel. Az oldatok fehérjekoncentrációját Bradford spektrofotometriás eljárással (Bio-Rad) határoztuk meg (Bradford, 1976) marha szérum albumin standard sor felhasználásával, majd minden oldatból azonos fehérjetartalmú hígítást készítettünk.

3.7. Makromolekuláris inhibitorok gátlási vizsgálatai

A kísérletek során a 3.3. pontban leírt protokollt alkalmazva mikrotiter lemez lyukaiba mértünk 10 µl denaturált fehérjeoldatot (0,91 µM-9,1 µM), mely az aktív és inaktív proteázok különböző arányának 6 M guanidin-hidroklorid oldatát tartalmazta, 150 µl PNF puffert és 20 µl PNF pufferben oldott 1% PEG-et. Az elegyet 15 percig inkubáltuk 37 °C-on, majd 20 µl PNF pufferben oldott fluoreszcens peptid szubsztrát (9,55 µM) hozzáadásával indítottuk a reakciót. Az RE(EDANS)-SQNY↓PIVRK-(DABCYL)R szekvenciájú fluoreszcens peptid szubsztrátot (FSP-407) Dr. Ivo Blaha (Ferring Leciva, Prága, Csehország) bocsájtotta rendelkezésünkre. A nyíl a HIV-1 PR hasítási helyét jelzi. Kontroll fehérjeként egy N- és C-terminálisán csonkolt dimerizációra nem képes proteázt (PR₅₋₉₅) használtunk (Ishima és mtsai, 2001, 2007). Meghatároztuk a vad PR aktivitását a kontroll, illetve az inaktív fehérjéket is tartalmazó reakcióelegyekben, majd a kontroll fehérjéhez viszonyított aktivitásértékek százalékát ábrázoltuk az inaktív:aktív fehérjék arányának függvényében SigmaPlot program (Systat Software, Inc., Point Richmond, CA, USA) segítségével.

3.8. Heterodimer-képzés vizsgálata

A mutáns proteázok és az N-terminális hexahisztidin véget tartalmazó vad típusú proteáz (0,5 nmol X₂₈-PR (Wondrak és Louis, 1996)) 6 M guanidin-hidroklorid oldatát összekevertük 1:1 moláris arányban, illetve külön-külön is vizsgáltuk a fehérjéket kontrollként. Az ekvilibráló pufferrel (50 mM nátrium-acetát, pH 5,0, 100 mM NaCl, 5% glicerol, 1% Triton X-100) 20x-ra hígítottuk az elegyeket és 15 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. A nikkel-kelát ProBond töltetet (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) a fent leírt pufferrel ekvilibráltuk a fehérjeoldat hozzáadása előtt. A szuszpenziót 30 percig inkubáltuk jégen, majd a töltetet centrifugálással szeparáltuk és háromszor mostuk az

ekvilibráló pufferrel. Végül SDS-PAGE mintafelvívő puffert adtunk a töltethez és 10 percig inkubáltuk 95 °C-on. A szuszpenziót centrifugáltuk és a fehérjét 20%-os poliakrilamid géleken vizsgáltuk Coomassie Brilliant Blue festés után.

3.9. NMR-spektroszkópia

A kísérletekhez az ^{15}N -jelölt PR_{RE} és PR_{RER} fehérjét valamint a jelöletlen proteázokat inklúziós testből tisztítottuk reverz fázisú HPLC segítségével (Louis és mtsai, 2003). A szétporciózott csúcsfrakciót (~0.5 mg/ml) –70 °C-on tároltuk. A fehérjét 30-50 mM hangyasav oldattal szemben dializáltuk, majd ~2 mg/ml koncentrációjúra töményítettük Millipore YM-10 (Millipore, Bedford, MA) koncentrátorokat használva. A fehérjeoldatokat 4 °C-on tároltuk. A heteronukleáris korrelációs (HSQC, Heteronuclear Single Quantum Coherence) spektrum felvételéhez négy, egyenként 320 μl térfogatú mintát készítettünk: ^{15}N - PR_{RE} , ^{15}N - PR_{RER} , illetve mindkettő 1:1 arányú keveréke a jelöletlen proteázzal. A fehérjét Ishima és mtsai hígítási protokollja szerint preparáltuk (Ishima és mtsai, 2007), vagyis a ~35 μM koncentrációjú enzim egy térfogategységét 1,3-2,3 térfogatnyi 5 mM nátrium-acetát, pH 6 oldattal, majd 3-4 térfogatnyi 100 mM nátrium-acetát, pH 5,8 oldattal kevertük. A kevert minták esetén a két fehérje aránya 1:1 volt. A spektrumot Bruker 600 MHz spektrofotométer segítségével vettük fel.

3.10. A HIV-1 vektorrendszer plazmidjainak módosítása

Az eredeti HIV-1 vektorrendszert (mely Dr. Didier Trono ajándéka, Department of Genetics and Microbiology, University of Geneva Medical School, Genf, Svájc) (Dull és mtsai, 1998; Trono, 2007) módosítottuk egy hatékonyabb promóter és a mutáns proteázok szekvenciáinak bejuttatásával (5. ábra). A citomegalovírus (CMV) promóterének szekvenciáját polimeráz láncreakcióval (PCR) felszaporítottuk és a pWOX-GFP plazmid *Bam*HI és *Mlu*I restrikciós helyei közé ligáltuk a zöld fluorescens fehérjét (GFP) kódoló szakasz elé. A proteázt kódoló szakaszt a pMDLg/pRRE plazmidból a pT7Blue-3 plazmid (Novagen, Madison, WI, USA) *Pst*I és *Sty*I restrikciós helyei közé klónoztuk. A mutáns proteázokat a QuikChange mutagenézis eljárást követve állítottuk elő, majd az eredményt DNS szekvenálással ellenőriztük, melyet ABI Prism dye terminator cycle sequencing kit és 3100-Avant Genetic Analyzer (mindkettő Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) segítségével hajtottunk végre. A mutáns proteázokat kódoló fragmenteket ezután visszaklónoztuk a pMDLg/pRRE plazmidba. Az N- és C-terminálison csontolt proteázt „átfedő” (overlapping) PCR-ral hoztuk

létre (Ho és mtsai, 1989). A felhasznált oligonukleotidok szekvenciája megtekinthető a <http://biochemistry.med.unideb.hu/SBBG/OligoDB.html> oldalon. A klónozás során standard eljárásokat használtunk (Sambrook és mtsai, 1989.)

3.11. Vírusrészecskék előállítása

A víusrészecskék előállításához 293T sejteket használtuk, melyeket 10% főtális marha szérumot (FBS) tartalmazó Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) tápfolyadékban tartottunk fent. A sejteket polietilénimin (Sigma, St. Louis, MO, USA) segítségével transzfektáltuk. A sejteket addig növesztettük, míg megközelítőleg 70%-ban borították be a 75 cm²-es tenyésztőflaska alját és ekkor végeztük el a transzfekeciót összesen 35,5 µg plazmid bejuttatásával: 10 µg pWOX-CMV-GFP (transzfer vektor plazmid), 6,5 µg pMDLg/pRRE (csomagoló plazmid, mely tartalmazza a vad típusú proteázt kódoló szekvenciát), 2,5 µg pRSV.rev (Rev kódoló plazmid), 3,5 µg pMD.G (VSV-G buroklehérjét kódoló plazmid) és 13 µg pMDLg/pRRE-M (a mutáns proteáz szekvenciáját kódoló plazmid) vagy lazac sperma DNS (Sigma, St. Louis, MO, USA). A transzfekeciót 1% FBS-tartalmú DMEM tápfolyadékban hajtottuk végre, amit 5-7 óra elteltével 10% FBS-tartalmúra cseréltünk. A víusrészecskéket tartalmazó kondicionált médiumot 24, 48 és 72 óra múlva gyűjtöttük, centrifugáltuk, átszűrtük 0,45 µm pórusméretű PVDF szűrőn (Millipore, Billerica, MA, USA), majd 100000 g-vel 2 óráig 4 °C történő ultracentrifugálással töményítettük. A víusrészecskéket tartalmazó pelletet PBS-ben felvettük és szétporciózva -70 °C-on tároltuk. A kapszid fehérje (p24) teljes mennyiségét ELISA módszerrel határoztuk meg (p24 ELISA, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA), melyhez a vírus lízise után a hasítatlan Gag poliproteint HIV-1 proteázzal hasítottuk. A hasítás mértékét Western blottal ellenőriztük anti-CA antitest felhasználásával, ami Dr. Robert Gorelick ajándéka volt (Frederick, MD, USA).

3.12. Fertőzőképesség vizsgálata

A fertőzőképesség vizsgálatához 293T sejteket 24-lyukú lemezen növesztettünk 300 µl 10% FBS, illetve antibiotikum és glutamin tartalmú DMEM-ben, amíg kb. 50%-ban borították be a lyukak felszínét. Éjszakai inkubáció után a sejteket 24 ng kapszid fehérje tartalmú vírussal fertőztük 120 µl DMEM-ben. Két nap múlva a sejteken lévő tápfolyadékot kiegészítettük kétszeres FBS, antibiotikum és glutamin tartalmú DMEM-mel. A hetedik napon a sejteket felkapartuk, mostuk PBS-sel és a GFP-pozitív sejtek arányának meghatározásához 10000 sejtet számoltunk meg áramlási citométer segítségével (FACS Calibur, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA).

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

4.1. Mikrotiter lemez alapú fluoreszcens módszer kidolgozása retrovirális proteázok gátlásvizsgálataihoz

4.1.1. HIV-1 és HTLV-1 természetes hasítási helyen alapuló peptidek vizsgálata HPLC módszerrel

A HTLV-1 CA↓NC hasítási helyet (KTKVL↓VVQPK) reprezentáló peptid mindkét proteáznak jó szubsztrátja (SP-997 az 1. táblázatban). Ezen peptid módosított formáit korábban munkacsoportunk a két proteáz specificitásának összehasonlítására használta (Tőzsér és mtsai, 2000), ezért mi is ezt a peptidet választottuk a számunkra érdekes módosítások elvégzéséhez. A peptid N- és C-terminális végére beépítettük a fluoreszcens donor csoportot, az EDANS-t és a kioltó akceptor csoportot, a DABCYL-t. Az így kapott szubsztrátot (FSP-354) HTLV-1 proteázzal hasítottuk és a reakcióelegyet először a hagyományos HPLC módszerrel vizsgáltuk. Az eredeti szubsztráthoz hasonlóan az FSP-354 K_M értéke alacsony (1. táblázat) (Louis és mtsai, 1999a), a katalitikus állandó viszont sokkal kisebb volt, így együtt kb. 200x alacsonyabb specificitási állandót (k_{kat}/K_M) eredményeztek, de még így is a retrovirális proteázok természetes hasítási helyeit reprezentáló szubsztrátokkal mért tartományon belül van (Tőzsér és mtsai, 1991, 1993, 1996). Az FSP-404 peptidben a P1 leucint fenilalaninra cseréltük. Érdekes módon a csere a HTLV-1 proteázzal mért kinetikai paramétereket nem változtatta meg jelentősen az FSP-354 szubsztráthoz képest, habár ugyanezen változás az eredeti (nem jelölt) szubsztrát esetén duplájára növelte a specificitási állandót (Tőzsér és mtsai, 2000). Korábbi vizsgálatainkból tudjuk, hogy a HTLV-1 PR több aminosavrést igényel az N-terminálison, mint a HIV-1 PR (Tőzsér és mtsai, 2000), így megszintetizáltattuk a P1 helyen fenilalanint tartalmazó szubsztrát N-terminálison egy aminosavval hosszabb, viszont C-terminálison rövidebb módosítását. Az így kapott FSP-405 peptid a HTLV-1 proteáznak sokkal rosszabb szubsztrátja lett. Ez arra utal, hogy a C-terminális megfelelő hossza szintén fontos a hatékony hidrolízishez. Érdekes, hogy az FSP-354 és FSP-404 sokkal jobb szubsztrátjai lettek a HIV-1 proteáznak, mint a HTLV-1 proteáznak, pedig a nem fluoreszcens analógjaikat a HTLV-1 PR jobban hasította (Tőzsér és mtsai, 2000).

Hasonlóképpen teszteltük a HIV-1 MA↓CA (VSQNY↓PIVQ) hasítási helyen alapuló szubsztrát EDANS/DABCYL variánsát (FSP-407). A módosítatlan peptidhez (SP-211) hasonlóan a HTLV-1 PR nem hasította a fluoreszcens formát, miközben a HIV-1 proteáznak jobb szubsztrátja lett (1. táblázat).

kód	szekvencia	HTLV-1 PR			HIV-1 PR		
		K_M	k_{kat}	k_{kat}/K_M	K_M	k_{kat}	k_{kat}/K_M
		(mM)	(s ⁻¹)	(mM ⁻¹ s ⁻¹)	(mM)	(s ⁻¹)	(mM ⁻¹ s ⁻¹)
SP-997	KTKVL↓VVQPK	0,051 ^a	7,68 ^a	150,6 ^a	0,182 ^a	2,60 ^a	14,3 ^a
FSP-354	RE(EDANS)TKVL↓ VVQPK(DABCYL)R	0,032	0,02	0,7	0,050	0,23	4,6
FSP-404	RE(EDANS)TKVF↓ VVQPK(DABCYL)R	0,053	0,05	0,9	0,014	0,23	16,4
FSP-405	RE(EDANS)KTKVF↓ VVQK(DABCYL)R	0,020	0,001	0,06	N.m. ^b	N.m.	0,2 ^c
SP-211	VSQNY↓PIVQ	-	-	-	0,150 ^d	6,80 ^d	45,3 ^d
FSP-407	RE(EDANS)SQNY↓ PIVRK(DABCYL)R	-	-	-	0,038	7,79	205,0

1. táblázat: A HTLV-1 és a HIV-1 hasítási helyeket reprezentáló peptidek HTLV-1 és HIV-1 proteázok általi hidrolízise.

^a Ezek az adatok a Louis és mtsai, 1999a referenciából származnak

^b Nem meghatározott

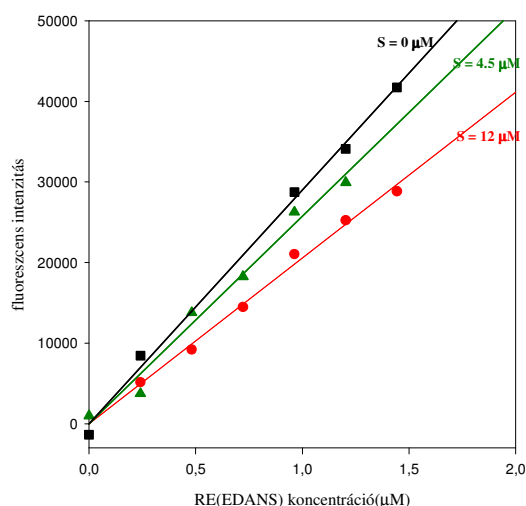
^c A k_{kat}/K_M értéket a görbe lineáris szakaszából állapítottuk meg

^d Ezek az értékek a Tózsér és mtsai, 1991 referenciából származnak

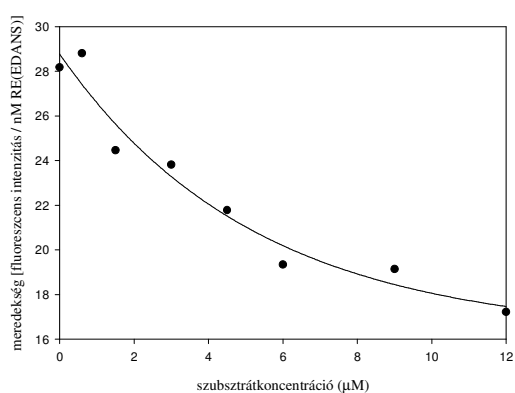
4.1.2. A belső szűrő hatás kalibrálása a mikrotiter lemez alapú fluoreszcens módszerhez

Magas szubsztrátkoncentráció esetén előfordulhat, hogy a már elhasított szubsztráton lévő EDANS molekula fluoreszcenciáját elnyeli egy még hasítatlan szubsztrát DABCYL molekulája, így a ténylegesnél kisebb jelet kapunk. Ez a jelenség a belső szűrő hatás, melyet korrigálni kell a fluoreszcens energia transzfer (FRET)-alapú szubsztrátokkal történő enzimkinetikai méréseknél (Liu és mtsai, 1999). Mérési módszerünk beállításakor egy alternatív módszert dolgoztunk ki a belső szűrő hatás korrekcióra, melyben egy kis módosított peptidet, RE(EDANS)-t használtuk a hasítási termék megjelenítésére. A fluoreszcens szubsztrátok minden egyes koncentrációjánál mértük a RE(EDANS) fluoreszcenciáját (6A. ábra) és a görbék meredekségének csökkenéséből (6B. ábra) számoltuk a konverziós faktort úgy, hogy az illesztett görbe kiindulási pontját az egységnyi pontra vonatkoztattuk (6C. ábra).

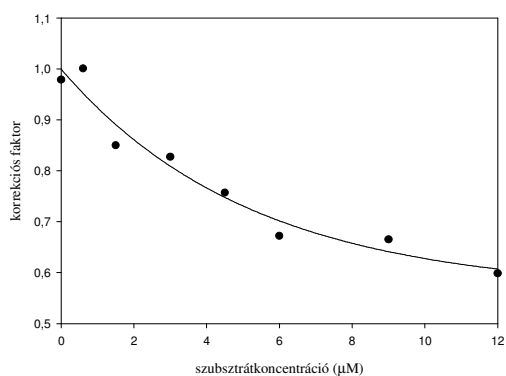
(A)



(B)



(C)



6. ábra: A belső szűrő hatást korrigáló faktor meghatározása. A RE(EDANS) jelölt dipeptid fluoreszcenciáját mértük a fluoreszcens szubsztrátok különböző koncentrációi mellett (A). A zsúfoltság elkerülése érdekében csak három reprezentatív görbét mutatunk be. A szubsztrátkoncentráció függvényében ábrázoltuk a görbék meredekségét (B). A mért pontokra egy görbe illeszthető, amelyet úgy alakítottunk át, hogy az illesztett görbe az egységnyi pontból induljon ki (C). A görbének az adott szubsztrátkoncentrációhoz tartozó pontja adja a konverziós faktort.

4.1.3. Mikrotiter lemez alapú módszer

A fluoreszcens szubsztrátokat mikrotiter lemez alapú módszerrel is megvizsgáltuk, melyben az EDANS csoport fluoreszcenciája a szubsztrát hasítása után jelenik meg és válik detektálhatóvá. A fluoreszcens esszé körülményei némileg különböznek a HPLC módszerétől, mivel a magas sókoncentráció (2 M), melyet általában használtunk a retrovirális proteázok aktivitás mérésekor, zavarta a fluoreszcens jel detektálását. A mikrotiter lemez alapú fluoreszcens módszer validálásához a mérés befejeztével a reakcióelegy egy részét felinjektáltuk HPLC-re és a specificitási állandókat meghatároztuk a csúcsok alatti területek alapján is. A HPLC módszerrel nyert eredmények megegyeztek a fluoreszcens módszerrel nyert és a belső szűrő hatással korrigált eredményekkel (2. táblázat). Figyelemreméltó, hogy az alacsony sókoncentráció (0,5 M) mellett mért eredmények jó egyezést mutattak a HPLC módszer magas sókoncentrációjú (2 M) körülményei között kapott értékekkel (2. táblázat). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy ezen szubsztrátok hidrolízisét nem fokozza a nagy ionerősség, ellentétben a jelöletlen peptidek hidrolízisével.

kód	szekvencia	HTLV-1 PR			HIV-1 PR		
		K_M	k_{kat}	k_{kat} / K_M^a	K_M	k_{kat}	k_{kat} / K_M^a
		(mM)	(s ⁻¹)	(mM ⁻¹ s ⁻¹)	(mM)	(s ⁻¹)	(mM ⁻¹ s ⁻¹)
FSP-354	RE(EDANS)TKVL↓ VVQPK(DABCYL)R	0,015	0,02	1,21 (1,37)	0,015	0,09	6,0 (5,4)
FSP-404	RE(EDANS)TKVF↓ VVQPK(DABCYL)R	0,012	0,006	0,49 (0,51)	0,038	0,43	11,3 (12,4)
FSP-407	RE(EDANS)SQNY↓ PIVRK(DABCYL)R	-	-	-	0,031	7,61	245 (258)

2. táblázat: A HTLV-1 PR és a HIV-1 PR fluoreszcens és HPLC-s módszerrel meghatározott kinetikai paramétereinek összehasonlítása alacsony sótartalom mellett.

^a A zárójelben lévő értékeket a fluoreszcens reakcióelegy HPLC-vel való megvizsgálásával mértük

4.1.4. A HIV-1 és a HTLV-1 proteáz gátlási profiljának összehasonlítása

Kiválasztottunk néhány, már klinikai használatban lévő HIV-1 PR ellen tervezett és néhány HTLV-1 PR hasítási helyen alapuló inhibitort rendszerünk kipróbálására. A HIV-1 PR gátlószerei közül a Saquinavir és az Amprenavir esetében mértük a legkisebb gátlási állandót (3. táblázat). A klinikumban használatos inhibitorok közül csupán az Indinavir gátolta a HTLV-1

proteázt (3. táblázat). Ezek az eredmények jó összhangban vannak azzal a véleménynel, miszerint a klinikumban alkalmazott HIV-1 PR inhibitorok nem gátolják a Gag processzáldását HTLV-1 fertőzött sejtekben (Pettit és mtsai, 1998). Két, a HTLV-1 hasítási helyén alapuló, sztatin-tartalmú peptidet is megvizsgáltunk, melyek a 3. táblázat 7. és 8. sorában láthatóak. Az egyik peptid egyik proteázt sem gátolta, míg a másik a HTLV-1 proteáz mérsékelt gátlószere, ugyanakkor a HIV-1 PR elleni legjobb inhibitor a vizsgált HTLV-1 PR gátlószerek közül. A hasítható kötések helyén redukált peptidkötést tartalmazó új komponensek bizonyultak az eddig vizsgált legjobb HTLV-1 PR gátlószereknek. Az IB-268 alkalmas volt a HTLV-1 PR HPLC módszerrel történő aktív centrum titrálására is.

inhibitor	HTLV-1 PR	HIV-1 PR
	K_i (nM)	K_i (nM)
Saquinavir ^a	>20 000	0,001
Ritonavir	>20 000	0,366
Nelfinavir	>20 000	0,088
Amprenavir	>20 000	0,001
Indinavir	3 475	0,440
DMP-323 ^a	>20 000	0,914
Ala-Pro-Gln-Val-Sta-Val-Met-His-Pro ^{a,b}	2 300	530
Lys-Thr-Lys-Val-Sta-Val-Gln-Pro-Lys ^{a,b}	>20 000	>20 000
IB-269: Ala-Pro-Gln-Val-Leu-r-Pro-Val-Met-His-Pro ^c	465	>20 000
IB-268: Lys-Thr-Lys-Val-Leu-r-Val-Val-Gln-Pro-Lys ^c	298	11 215

3. táblázat: A HTLV-1 és a HIV-1 proteázok gátlása különböző inhibitorokkal.

^a HPLC módszerrel Louis és mtsai (1999a) korábban már tesztelték ezeket az inhibitorokat

^b A „Sta” a sztatin csoportot jelenti

^c Az „r” a redukált peptid kötetést jelenti

4.2. Makromolekuláris HIV-1 proteáz inhibitorok vizsgálata

4.2.1. HIV-1 proteáz *in silico* mutagenézise

A vad típusú proteáz monomer és defektív monomer között valószínűleg akkor lenne a legnagyobb a kölcsönhatási energia, amikor a mutáns monomer felszíne hasonló a szubsztrátkötött vad típusú monomer felszínéhez. Mivel nagyon nehéz pontosan utánózni a kétláncú komplex felszínét (proteáz monomer + peptid szubsztrát) egy egyláncú mutáns monomerrel, ezért a defektív monomer tervezése során csak a szubsztrát bekötődését próbáltuk megakadályozni a szubsztrátkötő helyre épített "fizikai akadállyal". Az "akadály" polaritása nem volt olyan fontos, mint a korábbi stratégiákban (szubsztrátkötött enzimfelszín utánzása), ezért

szabadon választhattunk töltött vagy hidrofíl aminosavat a mutáns monomer stabilitásának és oldékonyságának javítására.

Aminosav	Az alapszerkezettől eltérő kölcsönhatási energia (kcal/mol)			
	Alapszerkezet: PR Mutált pozíció: 25	PR _{D25K} 49	PR _{D25R} 49	PR _{RE} 50
Gly	2,64	0,00	0,00	3,22
Ala	2,01	2,89	1,64	1,56
Cys	-0,69	1,89	0,61	-0,11
Ser	0,15	0,91	0,38	0,21
Thr	-1,82	0,44	0,16	-0,44
Val	2,06	0,79	0,29	-0,15
Ile	1,15	5,34	4,32	0,00
Leu	2,41	-0,01	0,67	-0,60
Met	0,01	-1,09	-0,16	-2,20
Pro	1,17	0,39	1,45	1,53
His	-5,09	0,41	0,17	-2,29
Phe	-1,25	-2,12	-0,68	-1,49
Tyr	-2,66	-2,07	-0,34	-2,88
Trp	-4,58	-0,31	-1,32	-0,72
Asp	0,00	-0,65	-0,11	1,62
Asn	-0,29	1,12	0,02	-0,69
Glu	-1,03	1,63	0,12	3,36
Gln	0,21	-0,69	-0,36	-2,06
Lys	-11,94	-0,76	-1,68	-12,84
Arg	-8,97	0,08	-5,42	-21,86

4. táblázat: A defektív heterodimer HIV-1 proteázokban számított intermonomer kölcsönhatási energiakülönbségek. Az adott pozíció két legjobb értéke vastagon van szedve.

A defektív monomer tervezésekor molekuláris mechanikai számításokat végeztünk a heterodimer proteáz intermonomer kölcsönhatásainak (4. táblázat) és a mutált monomerek teljes energiájának (5. táblázat) megállapítására úgy, hogy mind a 20 természetes aminosavat behelyettesítettük a 25. pozícióba, mivel a katalitikus aminosav (Asp25) helyettesítése tűnt a legcélszerűbb lépésnek az inaktív monomer létrehozására. Nem meglepő, hogy a pozitívan töltött aminosavak (Lys, Arg) adták a legjobb kölcsönhatási energia értékeket (4. táblázat), melyek kedvező ion-párt alkothatnak a vad típusú monomer Asp25-el. A monomer energiák tekintetében (5. táblázat) a Trp bizonyult a legkedvezőbbnek. Mivel az Asp25Lys és az

Asp25Arg csere illet legjobban a munkahipotézisünkbe, így ezeket választottuk ki további *in silico* mutagenézis vizsgálatokra.

Aminosav	Az alapszerkezettől eltérő monomer energia (kcal/mol)			
	Alapszerkezet: PR Mutált pozíció: 25	PR _{D25K} 49	PR _{D25R} 49	PR _{RE} 50
Gly	6,32	0,00	0,00	-2,00
Ala	5,09	2,93	2,05	-2,98
Cys	4,02	3,55	1,62	-2,81
Ser	5,10	1,73	1,43	-3,37
Thr	5,33	4,79	3,89	-2,39
Val	7,25	6,70	55,33	-1,06
Ile	13,61	8,35	7,38	0,00
Leu	11,52	6,71	4,59	1,27
Met	4,82	4,11	3,81	0,22
Pro	33,18	40,51	24,32	8,37
His	24,53	18,26	16,86	15,73
Phe	5,60	5,33	1,40	2,36
Tyr	3,00	3,91	0,72	0,22
Trp	-2,48	7,44	1,81	1,76
Asp	0,00	-0,45	-11,13	-2,20
Asn	0,18	-0,73	-4,45	-3,61
Glu	3,86	-2,92	-9,08	-2,85
Gln	4,88	0,56	1,96	-3,29
Lys	9,76	11,71	15,02	3,61
Arg	5,66	10,39	7,52	-0,10

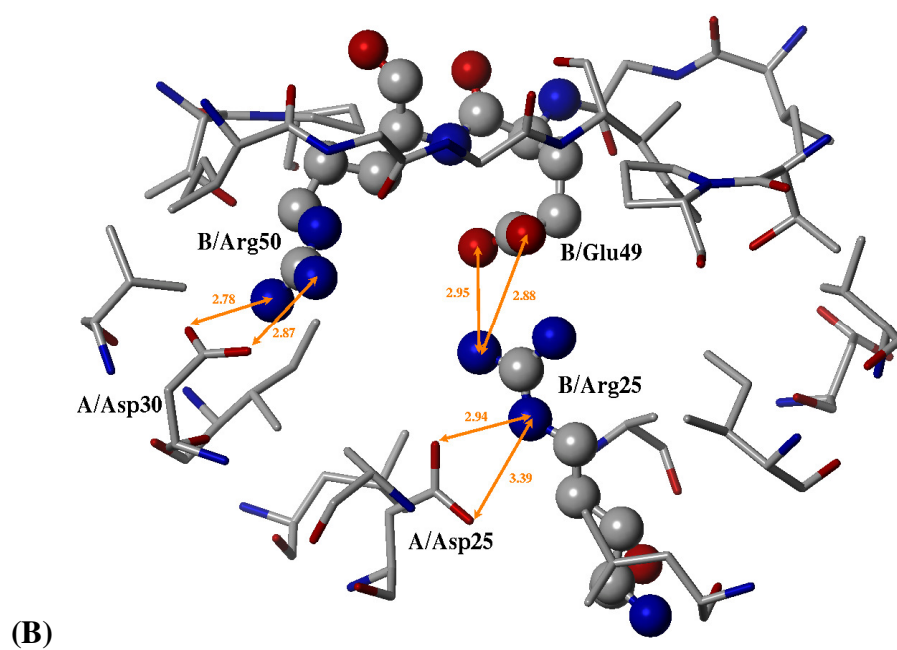
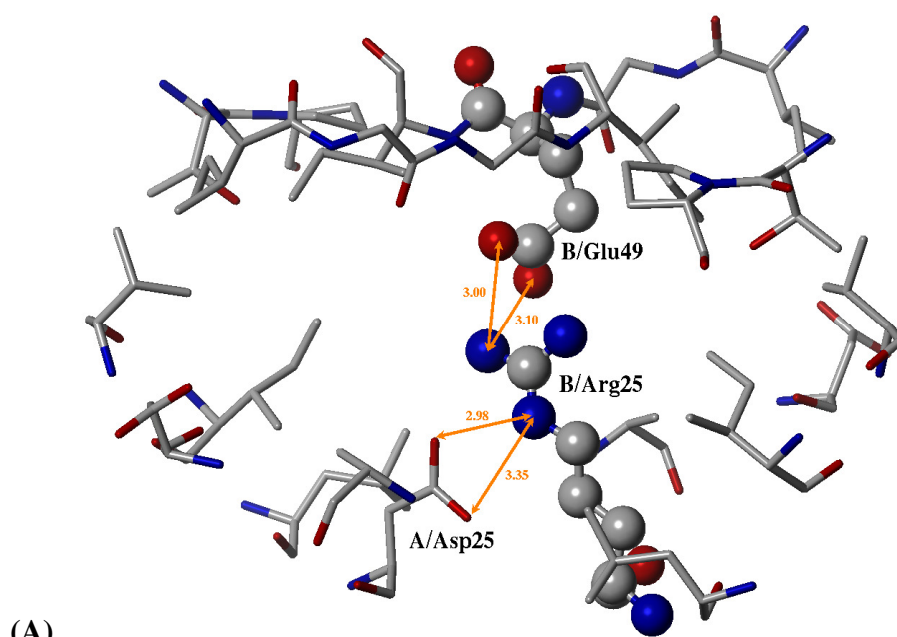
5. táblázat: A HIV-1 proteázok mutáns monomerjeinek számított összenergia-különbségei. Az adott pozíció két legjobb értéke vastagon van szedve.

Ezután a 49. pozíciót vizsgáltuk meg, mivel ez a flap régió csúcsán, a szubsztrátkötő hely tetején helyezkedik el. A vad típusú monomerben Gly található ezen a helyen, amit kicserélhetünk a legnagyobb aminosavra (Trp) anélkül, hogy ez károsan befolyásolná az elérni kívánt gátló hatást (Babe és mtsai, 1995; Junker és mtsai, 1996; McPhee és mtsai, 1996; Rozzelle és mtsai, 2000; Todd és mtsai, 2000a, 2000b). Számításaink szerint a nagy hidrofób (Phe, Tyr) és a pozitívan töltött aminosavak (Lys, Arg) adtak kedvező intermolekuláris kölcsönhatási energia értékeket (4. táblázat). Az előbb említett aminosavakat mégsem vettük figyelembe, mert hidrofobicitásuk nem illett a tervezési stratégiánkba ill. irodalomból márt ismertek voltak. A pozitívan töltött aminosavak a vad proteáz katalitikus aszpartátjával kedvező

ion párokat alkothatnak (5. táblázat), azonban ugyanazon monomer 25. pozíciójába pozitívan töltött aminosav bevitele nem lenne szerencsés (nagy pozitív értékek a 5. táblázatban a Lys és az Arg sorában). Megállapítottuk, hogy a negatívan töltött aminosavak (Asp, Glu) erősítik a 25. pozícióban lévő lizinnel vagy argininnel kialakuló intramonomer kölcsönhatást (5. táblázat) és ezek a mutációk lényegesen nem változtatják meg az alegységek közötti kölcsönhatást (4. táblázat). A 7A. ábra mutatja, amint az Arg25 és a Glu49 összekapcsolódik különösen kedvező kölcsönhatást mutatva, mivel az Arg25 oldalláncának részlegesen pozitívan töltött nitrogén atomja jól illeszkedik a vad monomer Asp25 oldallánca és a mutáns monomer Glu49 oldallánca közötti részbe, kedvező ion-párok által stabilizált triádott alkotva. A hidrofíli stratégiát figyelembe véve az Arg25-Glu49 kétszeres mutánst (PR_{RE}) választottuk ki a számítógépes mutagenézis következő körére és az *in vitro* kísérletekre.

Az Ile50 volt a következő mutálni kívánt aminosav, Craik és munkatársainak munkája alapján (Babe és mtsai, 1995; Junker és mtsai, 1996; McPhee és mtsai, 1996; Rozzelle és mtsai, 2000; Todd és mtsai, 2000a, 2000b). Az Ile50 a flap régió csúcsán helyezkedik el és egy hidrofób fedőt képez a szubsztrát vagy az inhibitor tetején. Számításaink szerint ebben a pozícióban az Arg és a Lys kedvező intermonomer kölcsönhatási energiákat eredményezne (4. táblázat). Az Arg/Lys hosszú és hajlékony lánc kölcsönhat a katalitikus vagy a 30. pozícióban lévő aszpartáttal, kedvező ionos kölcsönhatást eredményezve (7B ábra). Az 50. pozícióban arginint tartalmazó monomernek sokkal kedvezőbb az összen energiája, mint a lizint tartalmazónak (5. táblázat), ezért az Arg25-Glu49-Arg50 tripla mutánst (PR_{RER}) szintén kiválasztottuk az *in vitro* vizsgálatokra. További aminosav pozíciókat (Leu23, Ala28, Asp30, Val32, Ile47, Thr80, Val82, Ile84 és Ala95) is teszteltünk *in silico*, de lényeges javulást már nem eredményezett ezeknek az aminosavaknak a megváltoztatása.

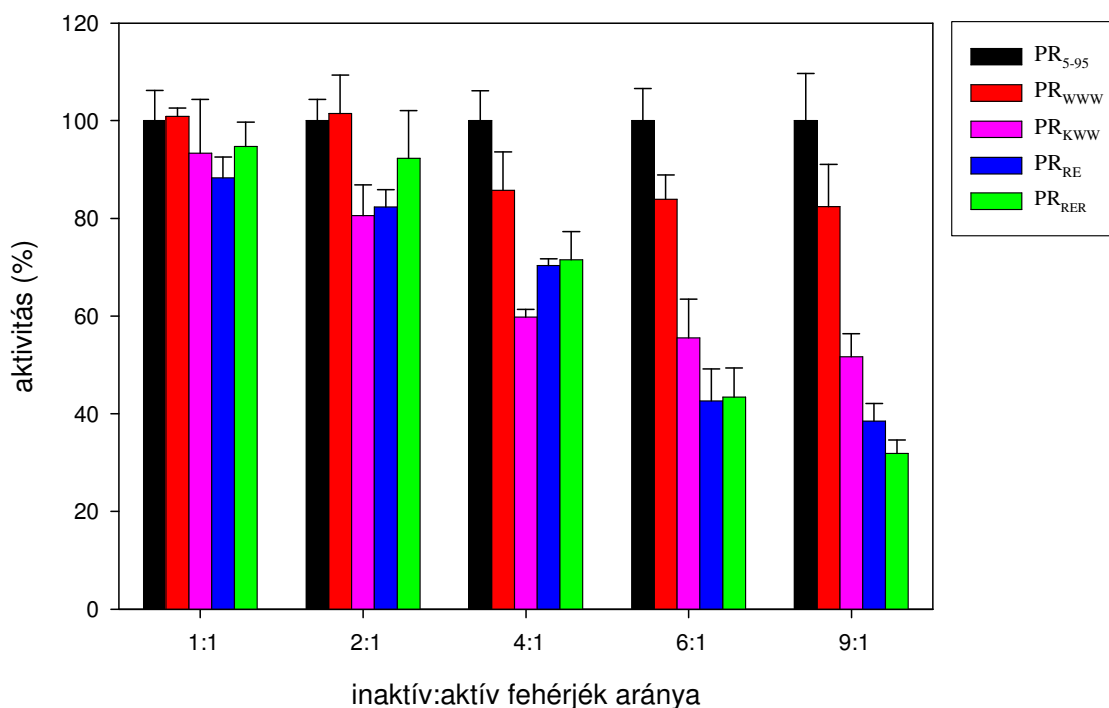
A megnövelt hidrofób kölcsönhatási felülettel rendelkező monomer előállításához (hidrofób stratégia) a PR_{KWW} mutánst módosítottuk úgy, hogy a 25. pozícióban lévő aszpartátot hidrofób triptofánra cseréltük (PR_{WWW}). Számításaink szerint a Trp25-nek volt a legjobb a monomer energiája (5. táblázat) és a Trp49 és Trp50 aminosavakkal kedvező aromás-aromás kölcsönhatást alakíthat ki.



7. ábra: A defektív heterodimer proteázok molekuláris modellje, melyek a vad típusú PR és a PR_{RE} (A), illetve a PR_{RER} (B) monomereket ábrázolják.

4.2.2. In vitro gátlásvizsgálatok

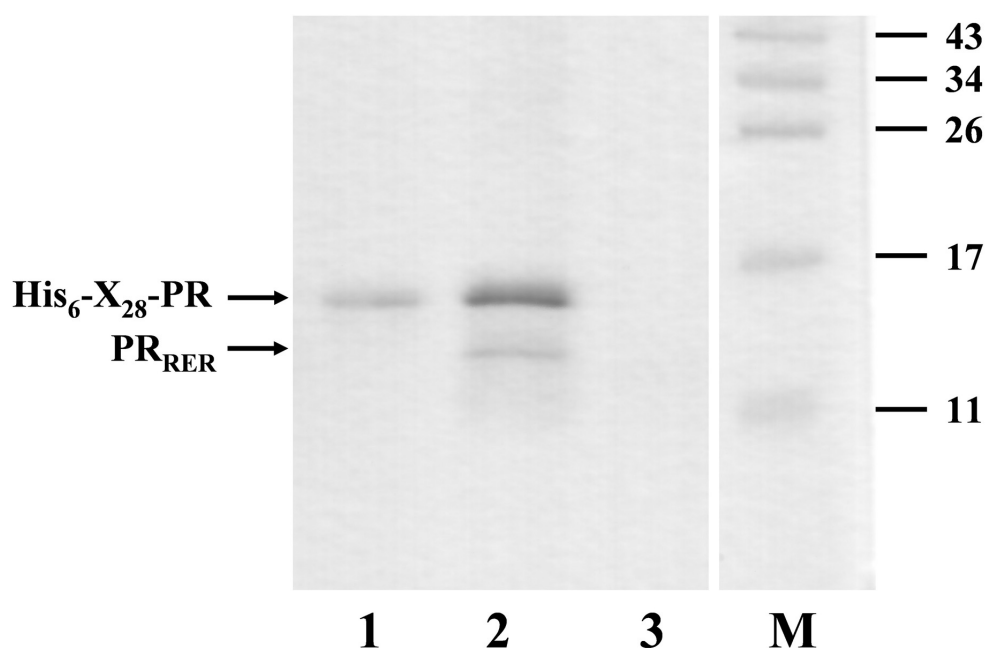
A mutagenézisek elvégzése után a fehérjéket *E. coli* BL21(DE3) törzsben expresszáltuk, majd inklúziós testekből tisztítottuk. A vad típusú PR aktivitását különböző mennyiségű mutáns proteáz jelenlétében mértük a laboratóriumunkban kidolgozott mikrotiter lemez alapú fluoreszcens módszer segítségével. Az eredményeket a mutánsokkal megegyező mennyiségű PR₅₋₉₅ (Ishima és mtsai, 2001, 2007) jelenlétében mért aktivitás értékekhez viszonyítottuk. Ez a csonkolt proteáz N- és C-terminális deléciót tartalmaz, ennek ellenére a térszerkezete a natív monomerhez hasonló, viszont inaktív, mert nem képes dimerizálódni (Ishima és mtsai, 2001, 2007). A HIV-1 PR nagyon érzékeny a különböző járulékos anyagok jelenlétére, melyek aktiválják/stabilizálják (polietilén-glikol, marha szérum albumin), esetleg gátolják (glicerol, dimetil-szulfoxid) az enzimet (Jordan és mtsai, 1992), így minden olyan kísérleti rendszerben, ahol az enzim aktivitását mérjük, döntő fontosságú a megfelelő kontroll kiválasztása. A PR_{WWW} gyenge dózisfüggő gátlást mutatott, míg a PR_{RE} és a PR_{RER} mutánsok hasonló gátló hatással rendelkeznek, mint a már korábban leírt PR_{KWW} mutáns (Babe és mtsai, 1995; Junker és mtsai, 1996; McPhee és mtsai, 1996; Rozzelle és mtsai, 2000; Todd és mtsai, 2000a, 2000b) (8. ábra).



8. ábra: A mutáns proteázok dózisfüggő gátló hatása a vad típusú proteázra.

A mi rendszerünkben nem tudtuk elérni a HIV-1 PR teljes gátlását a vizsgált legmagasabb mutáns:vad PR aránynál (9:1) sem, ellentétben az irodalomból ismert kísérlettel (Rozzelle és mtsai, 2000), ahol az összes vizsgált mutáns, beleértve a PR_{KWW} mutánst is, képes volt a vad típusú PR aktivitásának teljes gátlására 3,5:1 aránynál. Feltételezzük, hogy ezek a különbségek az eltérő kísérleti körülményeknek (pufferek, szubsztrátok, kontrollok) tulajdoníthatók.

A továbbiakban bizonyítani kívántuk, hogy a fentiekben tapasztalt gátló hatás oka a PR és a mutáns monomerek közötti specifikus kölcsönhatás. A 9. ábra szerint a Ni-kelát gyantán immobilizált vad típusú proteáz képes specifikusan megkötni az oldatban lévő PR_{RER} fehérjét. A PR_{RE} (nem mutatott eredmény) és a PR_{KWW} (Rozzelle és mtsai, 2000) esetén szintén megtörténik a specifikus heterodimerizáció.



9. ábra: Coomassie Brilliant Blue-festéssel festett SDS-poliakrilamid gél, mely a Ni-kelát gyantán létrejött His₆-X₂₈-PR-PR_{RER} heterodimert mutatja.

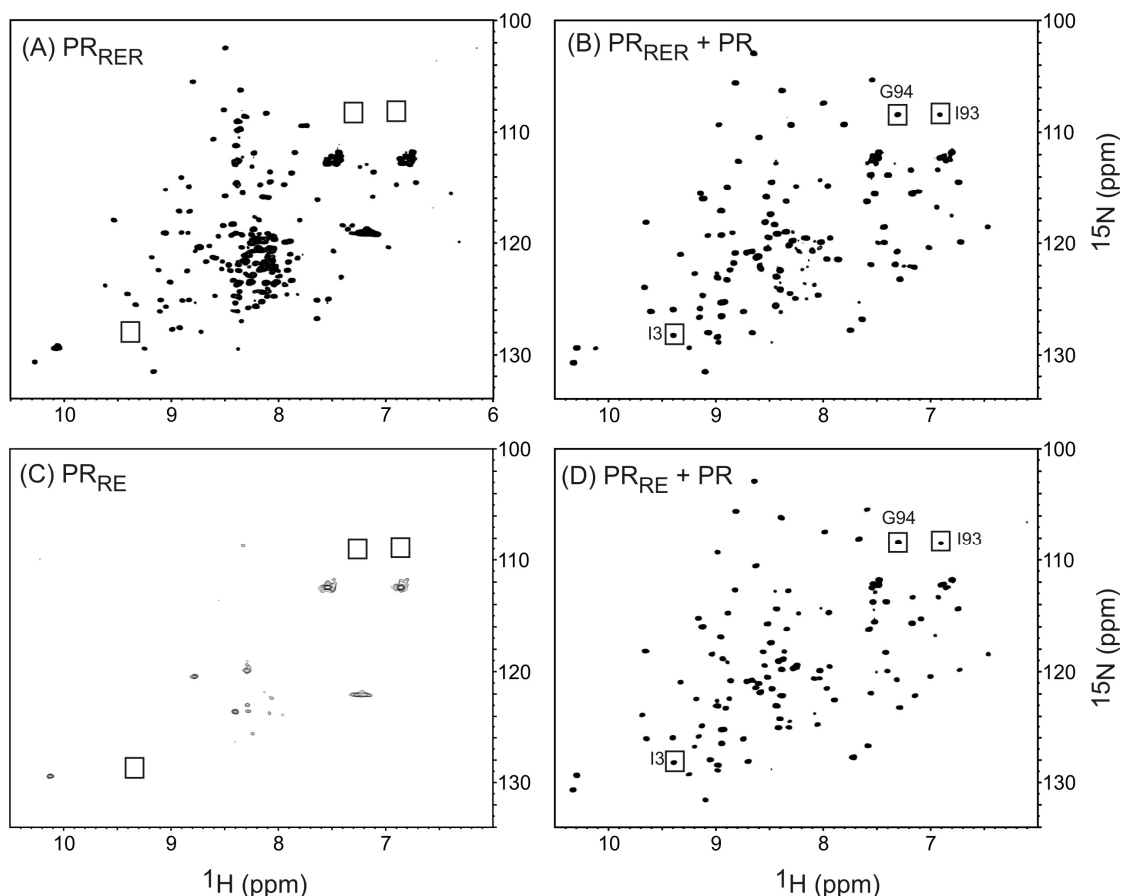
- 1. His₆-X₂₈-PR-t tartalmazó Ni-gyanta eluátum**
- 2. His₆-X₂₈-PR és PR_{RER} keverékét tartalmazó Ni-gyanta eluátum**
- 3. PR_{RER} -t tartalmazó Ni-gyanta eluátum**

4.2.3. NMR vizsgálatok

Ishima és mtsai korábbi NMR vizsgálataiban meghatározták a monomer és a dimer HIV-1 proteázra jellemző kémiai eltolódásokat (Ishima és mtsai, 2001, 2003). A PR_{RE} és PR_{RER} monomerek foldingjának és dimerizációjának vizsgálatára, illetve annak eldöntésére, hogy képeznek-e heterodimert a vad típusú proteázzal, Ishima és mtsai által leírt egyszerű folding protokollt és ¹H-¹⁵N HSQC spektrum felvételére alkalmas mérési módszert (Ishima és mtsai, 2007) használtuk. A 10A. ábrán látható ¹⁵N-jelölt PR_{RER} HSQC spektruma egy feltekeredett monomerre jellemző képet mutatva (Ishima és mtsai, 2003). A ¹H-NMR spektrum 8,0-8,5 ppm tartományában észlelt jelek azonban a fehérje egy részének fel nem tekeredett voltára is utalt. Ezzel szemben a 10B. ábrán négyzetekkel jelölve látható, hogy egyenlő mennyiségű jelöletlen vad típusú PR jelenlétében megjelent néhány, csak a dimer proteázra jellemző szignál is. Bár a spektrumban látható összes jel megfejtéséhez további NMR vizsgálatok szükségesek, a heterodimerizáció ténye nem kétséges, hiszen csak a ¹⁵N-jelölt PR_{RER} ad jelet a spektrumban. A 10A. és 10B. ábra összehasonlításából az is látszik, hogy a vad típusú PR jelenléte segíti a PR_{RER} feltekeredését.

Hasonló NMR vizsgálatokat végeztünk a ¹⁵N-jelölt PR_{RE} mutánsal is. A PR_{RER} proteáztól eltérően PR_{RE} ¹H-¹⁵N HSQC spektruma (10C. ábra) a vad típusú PR nélkül nagyon gyenge jelet adott és a feltekeredett fehérjének megfelelő szignálok nem voltak egyértelműek. A ¹H-NMR spektrum 6,9, 7,2 és 7,6 ppm-nél - csak az aminosav oldalláncokra jellemző jeleknél - tapasztalható intenzitáscsökkenése azt sugallta, hogy a fehérje nagy része még az alacsony (~28 μM-os) fehérje koncentráció ellenére is aggregálódott. A vad típusú PR jelenlétében azonban a PR_{RE} is teljesen feltekeredett és heterodimert képezett a vad típusú proteázzal (10A. ábra).

A feltekeredett monomer (PR_{RER}) előnyösebb lehet a fel nem tekeredett (PR_{RE}) monomerrel szemben, mivel a dimerizációs folyamat energianyerését nem csökkenti a foldinghoz szükséges energia, illetve a nem-natív forma gyorsabban degradálódhat a sejtes környezetben. A mutáns proteázok nem képeznek homodimert, ami segítheti a monomerek hatékony koncentrációjának fenntartását. A homodimer képződés hiányára utal az a megfigyelés is, hogy egy hatékony ciklikus urea inhibitor, a DMP323 nem kötődött a mutáns fehérjékhez és nem indukálta azok dimerizációját sem (nem mutatott eredmény), ellentétben a vad típusú HIV-1 proteázzal. Ez jó összhangban van azzal a célkitűzésünkkel, hogy a szubsztrátkötő helyre egy térbeli gátat építsünk be, amely megakadályozza a szubsztrátok kötődését és a homodimerizációt, inaktíválva ezzel a fehérjét.

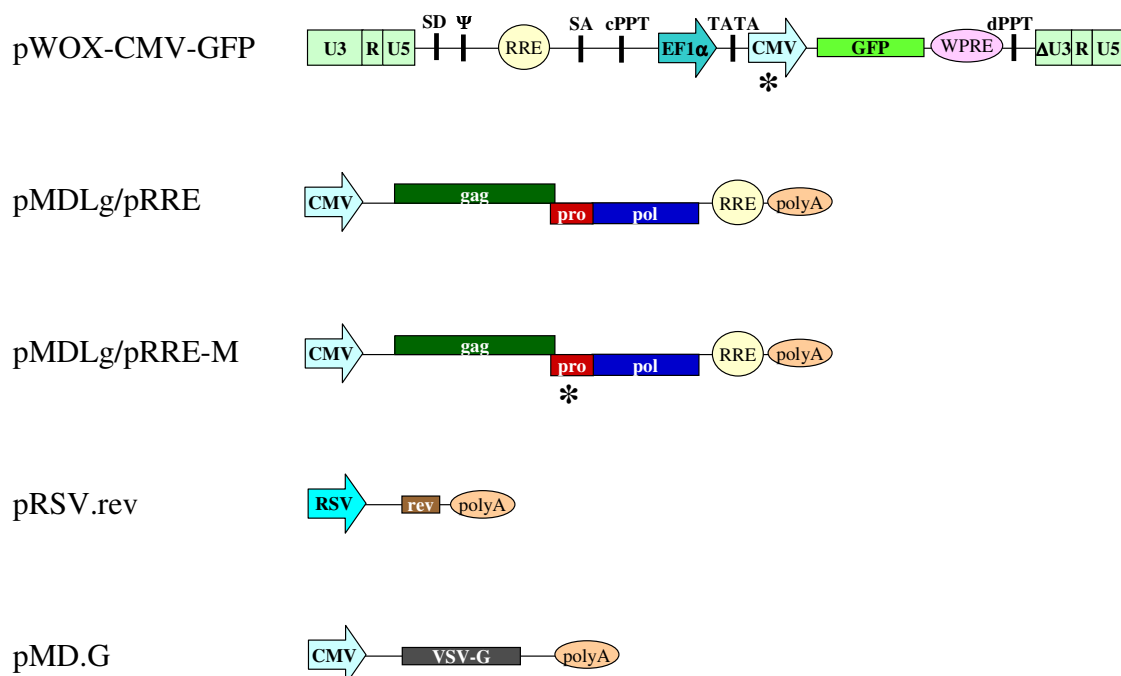


10. ábra: A mutáns proteázok ^1H - ^{15}N HSQC spektrumai, melyeken önmagukban (A, C) vagy a jelöletlen vad típusú proteázzal együtt (B, D) láthatók.

4.2.4. A fertőzőképesség gátlásának vizsgálata

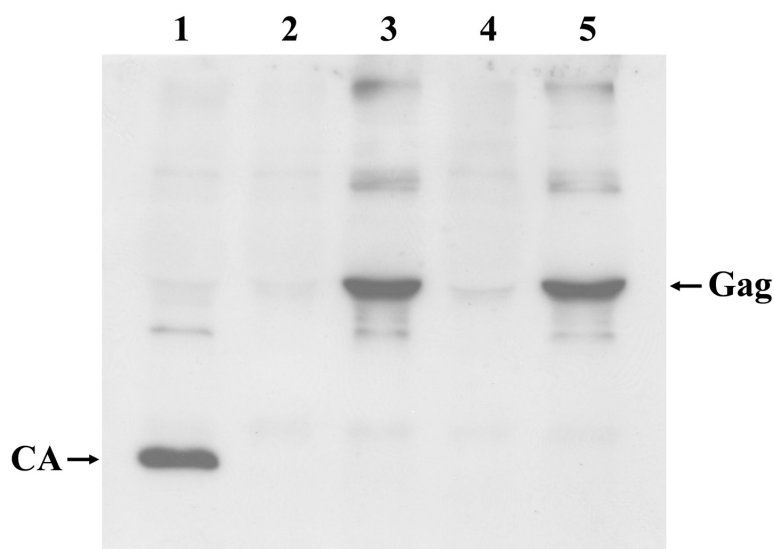
A vad típusú és mutáns proteázokat is tartalmazó vírus részecskék fertőzőképességének vizsgálatához egy harmadik generációs HIV-1 vektorrendszert (Dull és mtsai, 1998; Trono, 2007) használtunk. Mivel a vektor és a vírustermeléshez szükséges segédkonstrukciók vagy a gazdaszervezetben lévő endogén retrovírusok közötti rekombinációval replikációképes vírusok jöhetnek létre, minél több plazmid bevonásával célszerű növelni a szükséges rekombinációs lépések számát és csökkenteni a biológiai veszélyt. Vektorrendszerünket a 11. ábrán látható négy különböző plazmid alkotja. A pWOX-GFP a transzfer vektor, melyet a célgén, jelen esetben a GFP bejuttatásához használtunk. A hatékonyság növelése érdekében módosítottuk a konstrukció eredeti promóterét, a CMV promóter GFP szekvencia elé történő beillesztésével. Az így kapott plazmidot pWOX-CMV-GFP-nek neveztük el, mely segítségével termelt vírusrészecskékkel fertőzött sejtek jelentősen magasabb fluoreszcens jelet mutattak a kísérleti rendszerünkben, az eredetivel összehasonlítva (nem mutatott eredmény). A pMDLg/pRRE csomagoló plazmidról íródna át a Gag és GagPol poliproteinek a transzfektált sejtekben a CMV promóter kontrollja alatt, a Rev fehérje jelenlétében, amely egy másik plazmidról, a

pRSV.rev-ről íródik át. A negyedik konstrukció a pMD.G, mely a Vesicular Stomatitis Vírus G fehérjéjét kódolja.



11. ábra: A használt konstrukciók sematikus rajza. A csillag az eredeti vektorrendszer módosításának helyét jelzi. Rövidítések: U3, R, U5: az LTR elemei, SD: illesztési donor hely, SA: illesztési akceptor hely, Ψ: csomagoló szekvencia, RRE: Rev válaszadó elem, cPPT: középső polipurin terület, dPPT: szélső polipurin terület, EF1a: elongációs faktor 1 alfa, TATA: TATA-box, GFP: zöld fluoreszcens fehérje, WPRE: Woodchuck hepatitis vírus poszt-transzkripció szabályozó elem, CMV: humán citomegalovírus közvetlen-korai promóter, RSV: Rous szarkóma vírus promóter, polyA: poliadenilációs hely

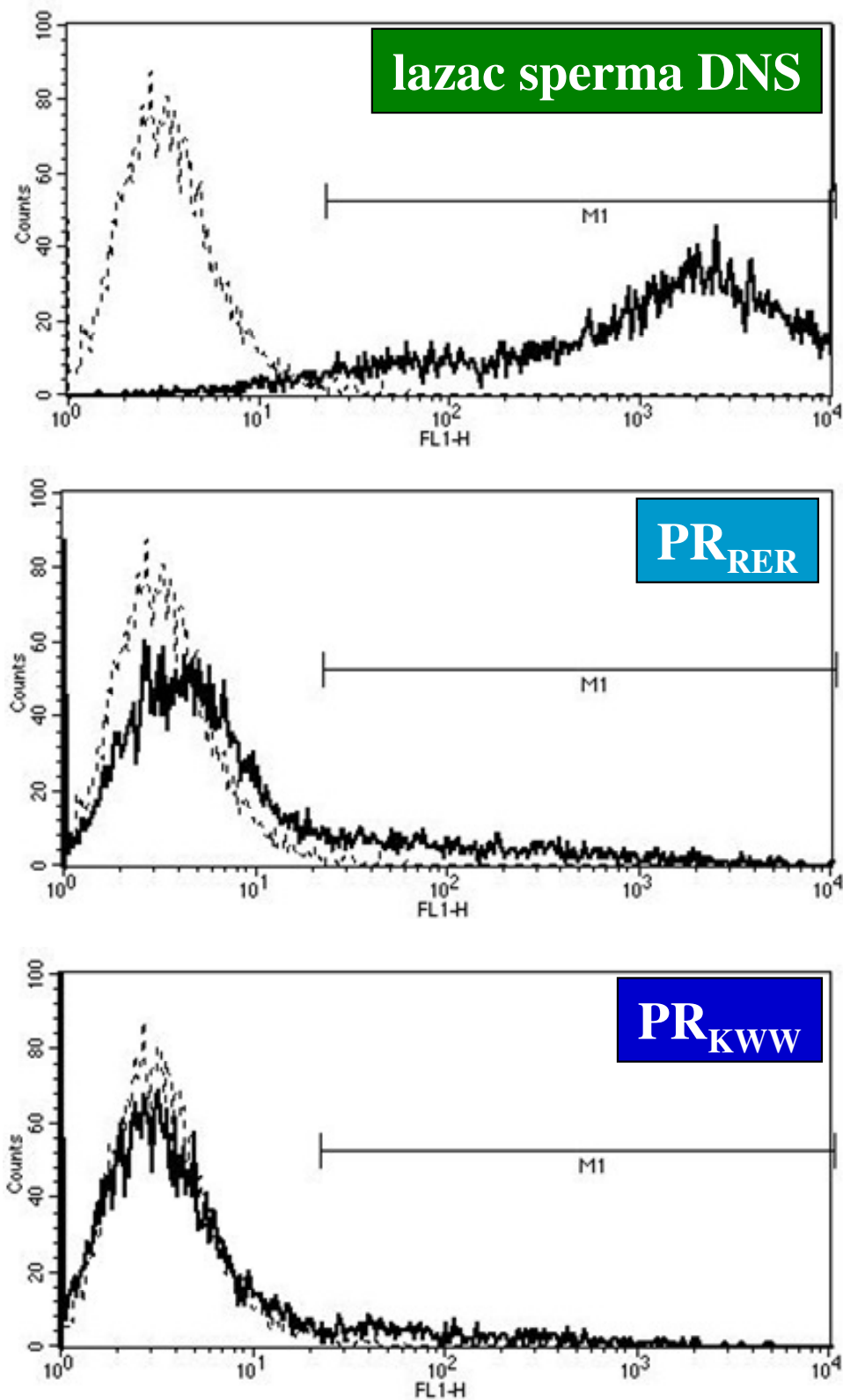
A pMDLg/pRRE plazmidot helyspecifikus mutagenézissel módosítottuk, hogy a kívánt mutációkat bejuttassuk a proteáz régióba. Majd 293T sejteket transzfektáltunk a különböző konstrukciók azonos mennyiségű plazmidjaival és a termelődött vírus részecskéket Western blottal analizáltuk CA-ellenes antitest felhasználásával (12. ábra). A PR_{RE} és a PR₅₋₉₅ mutáns esetében a Gag (és feltételezhetően a GagPol) expressziója nagyon gyenge volt, így ezeket a konstrukciókat a továbbiakban nem vizsgáltuk. A vad típusú proteáz teljesen elhasította a Gag és GagPol poliproteineket, míg a PR_{RER} és PR_{KWW} mutánsokat hordozó vírusokban nem figyeltünk meg hasítást, mivel ezek a mutánsok nem képesek aktív proteáz dimereket alkotni az éretlen vírusban.



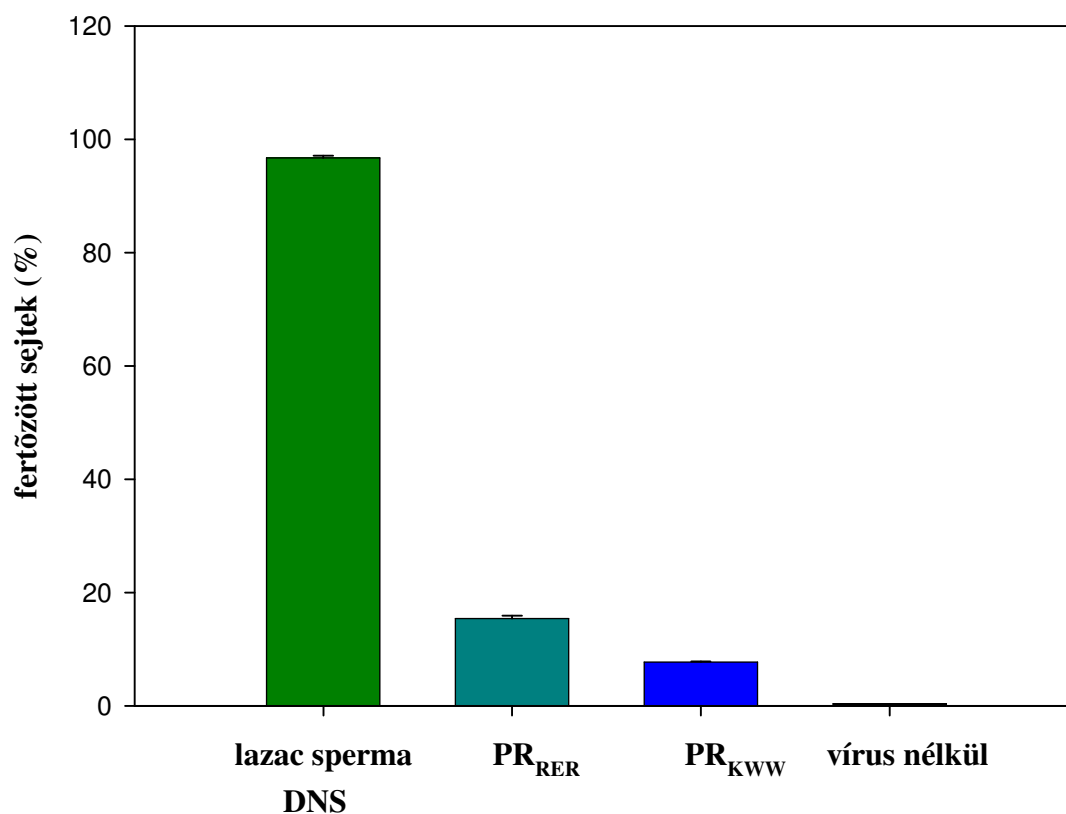
12. ábra: A vad típusú és a mutáns proteázokat kódoló vírusrészecskék analízise.

1. vad típusú PR; 2. PR₅₋₉₅; 3. PR_{KWW}; 4. PR_{RE}; 5. PR_{RER}

A mutáns és a vad típusú proteázot kódoló plazmidok 2:1 arányú keverékével is transzfektáltuk a 293T sejteket. A termelődött vírus oldatok koncentrációját azonosra állítottuk be a p24 mennyiségének meghatározása alapján. 293T sejteket fertőztünk azonos p24-tartalmú vírus oldatokkal, majd a GFP-t expresszáló sejtek számát áramlási citométerrel határoztuk meg. A kontroll kísérletekben lazac sperma DNS-t használtunk, melyben a sejtek 97%-a megfertőződött (13-14. ábra). Ezen kísérletek jól igazolták a fertőzési protokollunk hatékonyságát. A PR_{KWW} vagy PR_{RER} proteineket hordozó vírus részecskék fertőzőképessége drámaian lecsökkent (13-14. ábra), mivel a sejteknek csupán 8%, illetve 15%-a vált GFP-pozitívvá. Ezekben a kísérletekben nagyobb mértékű gátlást tapasztaltunk, mint az *in vitro* kísérletekben (8. ábra) 2:1 arány esetén, ahol 80%-os aktivitást mértünk. Hasonló megfigyelést tettek Junker és munkatársai is (Junker és mtsai, 1996).



13. ábra: Csak vad típusú, vagy vad típusú és mutáns proteázokat hordozó vírusokkal fertőzött 293T-sejtek FACS-analízise. Egy reprezentatív kísérlet hisztogramja, ahol a nem-fertőzött populációt szaggatott vonal jelöli.



14. ábra: Csak vad típusú, vagy vad típusú és mutáns proteázokat hordozó vírusokkal fertőzött 293T-sejtek FACS-analízise. Az oszlopdiagram a párhuzamos FACS-analízisek eredményét mutatja. A hiba - kis értéke miatt - nem minden esetben látszik.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A doktori értekezésemben bemutatott munkáimban célul tűztük ki egy nagy áteresztőképességű és gyors mikrotiter lemez alapú fluorometriás módszer kidolgozását, mely alkalmas különböző retrovirális proteázok aktivitásának és gátlási állandóinak közvetlen összehasonlítására, illetve részben ezen módszerre alapozva, új típusú makromolekuláris HIV-1 PR inhibitorok tervezését, előállítását és tesztelését.

Összefoglalásul elmondhatjuk, hogy a munkánk során kidolgozott fluorometriás módszer egy jó alternatíva lehet a hagyományos HPLC-alapú módszer mellett, mivel gyors és egyszerre nagy számú minta kezelését teszi lehetővé. Módszerünket a hagyományos HPLC-alapú módszerrel validáltuk vad típusú HIV-1 és HTLV-1 proteázok, valamint EDANS és DABCYL csoportokat hordozó új tervezésű szubsztrátok felhasználásával. Kidolgoztunk egy új eljárást a fluoreszcens donor és akceptor csoportokat egyszerre hordozó szubsztrátok mérése esetén fellépő belső szűrő hatás korrekciójára. Az új módszer segítségével összehasonlítottuk a HIV-1 és a HTLV-1 proteázok gátlási profilját néhány, már klinikai használatban lévő HIV-1 PR ellenes és néhány, a munkacsoportunk által tervezett HTLV-1 PR inhibitor felhasználásával. Módszerünket későbbiekben sikerrel alkalmaztuk más vad típusú és mutáns retrovirális proteázok esetében is (Kádas és mtsai, 2004; Fehér és mtsai, 2006; Sperka és mtsai, 2007).

A továbbiakban a szubsztrátkötő helyen hidrofíll, hidrofób és töltött aminosavakat hordozó mutáns HIV-1 proteázokat terveztünk és vizsgáltunk. A mutációk *in silico* megtervezése után elkészítettük és megtisztítottuk a fehérjéket, majd teszteltük azok *in vitro* és sejtkultúrák kísérletekben mutatott gátló hatását. A töltött aminosavakat hordozó mutánsaink, amelyek a HIV-1 proteáz ellen tervezett makromolekuláris inhibitorok egy új generációját képviselik, dóziszfüggő, specifikus, transz domináns gátló hatást mutattak kísérleteinkben. Elsőként detektáltuk egy vad típusú retrovirális proteáz és egy transz domináns negatív mutáns heterodimerizációját NMR spektroszkópiával. Az Asp25Arg és a Gly49Glu csere egyéb retrovirális proteázokban is gátló hatást eredményezhet a vad típusú proteázzal szemben, mivel ezen aminosavcserék célpontjai a hidrolitikus aktivitáshoz elengedhetetlen katalitikus aszpartátok.

6. IRODALOMJEGYZÉK

- Babe, L. M., Rose, J. and Craik, C. S. (1995). Trans-dominant inhibitory human immunodeficiency virus type 1 protease monomers prevent protease activation and virion maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **92**, 10069-10073.
- Barbaro, G., Scozzafava, A., Mastrolorenzo, A. and Supuran, C. T. (2005). Highly active antiretroviral therapy: current state of the art, new agents and their pharmacological interactions useful for improving therapeutic outcome. *Curr. Pharm. Des.*, **11**, 1805-1843.
- Barré-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. and Montagnier, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, **220**, 868-871.
- Bevec, D., Dobrovnik, M., Hauber, J. and Bohnlein, E. (1992). Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in human T cells by retroviral-mediated gene transfer of a dominant-negative Rev trans-activator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **89**, 9870-9874.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- Broudhurst, A. V., Roberts, N. A., Ritchie, A. J., Handa, B. K. and Kay, C. (1991). Assay of HIV-1 proteinase: a colorimetric method using small peptide substrates, *Anal. Biochem.*, **193**, 280-286.
- Buchschacher, G. L., Jr., Freed, E. O. and Panganiban, A. T. (1992). Cells induced to express a human immunodeficiency virus type 1 envelope gene mutant inhibit the spread of wild-type virus. *Hum. Gene Ther.*, **3**, 391-397.
- Buchschacher, G. L., Jr., Freed, E. O. and Panganiban, A. T. (1995). Effects of second-site mutations on dominant interference by a human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein mutant. *J. Virol.*, **69**, 1344-1348.
- Caflisch, A., Schramm, H. J. and Karplus, M. (2000). Design of dimerization inhibitors of HIV-1 aspartic proteinase: a computer-based combinatorial approach. *J. Comput. Aided Mol. Des.*, **14**, 161-179.
- Chen, S. S., Ferrante, A. A. and Terwilliger, E. F. (1996). Characterization of an envelope mutant of HIV-1 that interferes with viral infectivity. *Virology*, **226**, 260-268.

- Coffin, J.M. (1992) Structure and classification of retroviruses. The *Retroviridae* (ed. Levy, J.A.), pp. 19-49. Plenum Press, NY, USA.
- Coffin, J.M., Hughes, S.H., and Varmus, H.E. (1997). Retroviruses. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA.
- Copeland, T. D. and Oroszlan, S. (1988). Genetic locus, primary structure and chemical synthesis of human immunodeficiency virus protease. *Gene. Anal. Techn.*, **5**, 109-115.
- Cullen, B. R. (1991). Human immunodeficiency virus as a prototypic complex retrovirus. *Jornal of Virology*, **65**, 1053-1056.
- Cullen, B. R. and Greene, W. C. (1989). Regulatory pathways governing HIV-1 replication. *Cell*, **58**, 423-426.
- Cullen, B. R. and Greene, W. C. (1990). Functions of the auxiliary gene products of the human immunodeficiency virus type 1. *Virology*, **178**, 1-5.
- Davies, D.R. (1990). The structure and function of the aspartic proteinases. *Ann. Rev. Biophys. Chem.*, **19**, 189-215.
- Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R. J., Nguyen, M., Trono, D. and Naldini, L. (1998). A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J. Virol.*, **72**, 8463-8471.
- Ellermann, V. and Bang, O. (1908). Experimentelle Leukämie bei Hühnern. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. Orig.*, **46**, 595-609.
- Fehér, A., Boross, P., Sperka, T., Miklóssy, G., Kádas, J., Bagossi, P., Oroszlan, S., Weber, I.T. and Tózsér, J. (2006) Characterization of the murine leukemia virus protease and its comparison with the HIV-1 protease. *J. Gen. Virol.*, **87**(Pt 5), 1321-1330.
- Fraisier, C., Abraham, D. A., van Oijen, M., Cunliffe, V., Irvine, A., Craig, R. and Dzierzak, E. A. (1998). Inhibition of Tat-mediated transactivation and HIV replication with Tat mutant and repressor domain fusion proteins. *Gene Ther.*, **5**, 946-954.
- Gallo, R. C., Salahuddin, S. Z., Popovic, M., Shearer, G. M., Kaplan, M., Haynes, B. F., Palker, T. J., Redfield, R., Oleske, J., Safai, B., White, G., Foster, P. and Markham, P.D. (1984). Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science*, **224**, 500-503.
- Grinde, B., Cameron, C.E., Leis, J., Weber, I. and Wlodawer, A. (1992). Mutations that alter the activity of the Rous sarcoma virus protease. *J. Biol. Chem.*, **267**, 9481-9490.
- Grobelny, D., Wondrak, E.M., Galaray, R.E. and Oroszlan, S. (1990). Selective phosphinate transition-state analogue inhibitors of the protease of human immunodeficiency virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **169**, 1111-1116.

- Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K. and Pease, L. R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, **77**, 51-59.
- Holskin, B.P., Bukhtiyarova, M., Dunn, B.M., Baur, P., de Chastonay, J. and Pennington, M.W. (1995). A continuous fluorescence-based assay of human cytomegalovirus protease using a peptide substrate. *Anal. Biochem.*, **227**, 148–155.
- Hwang, Y. S. and Chmielewski, J. (2004). A unidirectional crosslinking strategy for HIV-1 protease dimerization inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **14**, 4297-4300.
- Hwang, Y. S. and Chmielewski, J. (2005). Development of low molecular weight HIV-1 protease dimerization inhibitors. *J. Med. Chem.*, **48**, 2239-2242.
- Hyland, L. J., Dayton, B. D., Moore, M. L., Shue, A. Y., Heys, J. R. and Meek, T. D. (1990). A radiometric assay for HIV-1 protease. *Anal. Biochem.*, **188**(2), 408-415.
- Ishima, R., Ghirlando, R., Tozser, J., Gronenborn, A. M., Torchia, D. A. and Louis, J. M. (2001). Folded monomer of HIV-1 protease. *J. Biol. Chem.*, **276**, 49110-49116.
- Ishima, R., Torchia, D. A. and Louis, J. M. (2007). Mutational and structural studies aimed at characterizing the monomer of HIV-1 protease and its precursor. *J. Biol. Chem.*, **282**, 17190-17199.
- Ishima, R., Torchia, D. A., Lynch, S. M., Gronenborn, A. M. and Louis, J. M. (2003). Solution structure of the mature HIV-1 protease monomer: insight into the tertiary fold and stability of a precursor. *J. Biol. Chem.*, **278**, 43311-43319.
- Jaskolski, M., Tomasselli, A.G., Sawyer, T.K., Staples, D.G., Heinrikson, R.L., Schneider, J., Kent, S.B.H. and Wlodawer, A. (1991). Structure at 2.5 Å resolution of chemically synthesised human immunodeficiency virus type 1 protease complexed with a hydroxyethylene-based inhibitor. *Biochemistry*, **30**, 1600-1609.
- Johnson, J. M., Harrod, R. and Franchini, G. (2001). Molecular biology and pathogenesis of the human T-cell leukaemia/lymphotropic virus Type-1 (HTLV-1). *Int J Exp Pathol*, **82**, 135-47.
- Jordan, S. P., Zugay, J., Darke, P. L. and Kuo, L. C. (1992). Activity and dimerization of human immunodeficiency virus protease as a function of solvent composition and enzyme concentration. *J. Biol. Chem.*, **267**, 20028-20032.
- Junker, U., Escaich, S., Plavec, I., Baker, J., McPhee, F., Rose, J. R., Craik, C. S. and Bohnlein, E. (1996). Intracellular expression of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) protease variants inhibits replication of wild-type and protease inhibitor-resistant HIV-1 strains in human T-cell lines. *J. Virol.*, **70**, 7765-7772.

- Kádas, J., Weber, I.T., Bagossi, P., Miklóssy, G., Boross, P., Oroszlan, S. and Tőzsér, J. (2004). Narrow substrate specificity and sensitivity toward ligand binding site mutations of human T-cell leukemia virus type-1 protease. *J. Biol. Chem*, **279**, 27148-27157.
- Katz, R. A. and Skalka, A. M. (1994). The retroviral enzymes. *Annu. Rev. Biochem.*, **63**, 133-173.
- Kim, S. Y., Byrn, R., Groopman, J. and Baltimore, D. (1989). Temporal aspects of DNA and RNA synthesis during human immunodeficiency virus infection: evidence for differential gene expression. *J. Virol.*, **63**, 3708-3713.
- 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.*, **264**, 3428-3435.
- Kotler M, Katz, R.A, Danbo, W., Leis, J., Skalka, A.M. (1988). Synthetic peptides as substrates and inhibitors of a retroviral protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 4185-89.
- Leis, J., Baltimore, D., Bishop, J.M., Coffin, J., Fleissner, E., Goff, S.P., Robinson, H., Skalka, A.M., Temin, H.M. and Voght, V. (1988) Standardized and simplified nomenclature for proteins common to all retroviruses. *J. Virol.*, **62**, 1808-1809.
- Leis, J., Bizub, D., Weber, I., Cameron, C. and Katz R. (1989). In *Current communication in molecular biology: Viral Proteinases as targets for chemotherapy*. ed. Kräusslich, H., Oroszlan, S. and Wimmer, E., p235 Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Lab. Press.
- Levy, J. A., Hoffmann, A. D., Kramer, S. M., Landis, J. A., Shimabukuro, J. M. and Oshiro, L. S. (1984). Recovery of AIDS-associated retroviruses from patients with AIDS or AIDS-related conditions and from clinically healthy individuals. *J. Infect. Dis.*, **152**, 734-738.
- Liu, J., Woffendin, C., Yang, Z. Y. and Nabel, G. J. (1994). Regulated expression of a dominant negative form of Rev improves resistance to HIV replication in T cells. *Gene Ther.*, **1**, 32-37.
- Liu, Y., Kati, W., Chen, C.M., Tripathi, R., Molla, A. and Kohlbrenner, W. (1999). Use of a fluorescence plate reader for measuring kinetic parameters with inner filter effect correction. *Anal. Biochem.*, **267**, 31-335.
- Louis, J. M., Ishima, R., Nesheiwat, I., Pannell, L. K., Lynch, S. M., Torchia, D. A. and Gronenborn, A. M. (2003). Revisiting monomeric HIV-1 protease. Characterization and redesign for improved properties. *J. Biol. Chem.*, **278**, 6085-6092.

- Louis, J., McDonald, R., Nashed, N., Wondrak, E.M., Jerina, D., Oroszlan, S. and Mora, P. (1991). Autoprocessing of the HIV-1 protease using purified wild-type and mutated fusion proteins expressed at high levels in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.*, **199**, 361–369.
- Louis, J.M., Oroszlan, S. and Tözsér, J. (1999a). Stabilization from autoproteolysis and kinetic characterization of the human T-cell leukemia virus type 1 proteinase. *J. Biol. Chem.* **274**, 6660–6666.
- Louis, J. M., Wondrak, E. M., Kimmel, A. R., Wingfield, P. T. and Nashed, N. T. (1999b). Proteolytic processing of HIV-1 protease precursor, kinetics and mechanism. *J. Biol. Chem.*, **274**, 23437-23442.
- Mahalingam, B., Boross, P., Wang, Y. F., Louis, J. M., Fischer, C. C., Tözsér, J., Harrison, R. W. and Weber, I. T. (2002). Combining mutations in HIV-1 protease to understand mechanisms of resistance. *Proteins*, **48**, 107-116.
- Mahalingam, B., Louis, J.M., Hung, J., Harrison, R.W. and Weber, I.T. (2001). Structural implications of drug-resistant mutants of HIV-1 protease: high-resolution crystal structures of the mutant protease/substrate analogue complexes. *Proteins*, **43**, 455–464.
- Mahalingam, B., Louis, J. M., Reed, C. C., Adomat, J. M., Krouse, J., Wang, Y. F., Harrison, R. W. and Weber, I. T. (1999). Structural and kinetic analysis of drug resistant mutants of HIV-1 protease. *Eur. J. Biochem.*, **263**, 238-245.
- Matayoshi, E.D., Wang, G.T., Kraft, G.A. and Erickson, J. (1990). Novel fluorogenic substrates for assaying retroviral proteases by resonance energy transfer. *Science*, **247**, 954–958.
- McPhee, F., Good, A. C., Kuntz, I. D. and Craik, C. S. (1996). Engineering human immunodeficiency virus 1 protease heterodimers as macromolecular inhibitors of viral maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **93**, 11477-11481.
- Menendez-Arias, L. and Tözsér, J. (2008). HIV-1 protease inhibitors: effects on HIV-2 replication and resistance. *TRENDS in Pharmacological Sciences*, **29(1)**, 42-49.
- Miller, M., Jaskolski, M., Rao, J.K.M., Leis, J. and Wlodawer, A. (1989). Crystal structure of a retroviral protease proves relationship to aspartic protease family. *Nature*, **337**, 576-579.
- Modesti, N., Garcia, J., Debouck, C., Peterlin, M. and Gaynor, R. (1991). Trans-dominant Tat mutants with alterations in the basic domain inhibit HIV-1 gene expression. *New Biol.*, **3**, 759-768.

- Navia, M.A., Fitzgerald, P.M.D., McKeever, B.M., Leu, C.T., Heimbach, J.C., Herber, W.K., Sigal, I.S., Dark, P.L. and Springer, J.P. (1989). Three-dimensional structure of aspartyl protease from human immunodeficiency virus HIV-1. *Nature*, **337**, 615-620.
- Oroszlan, S. and Tözser, J. (1990). The retroviral proteinases. *Virology*, **1**, 369-378.
- Pavlakakis, G. N., and Felber, B. K. (1990). Regulation of expression of human immunodeficiency virus. *New Biol.*, **2**, 20-31.
- Pearson, L., Garcia, J., Wu, F., Modesti, N., Nelson, J. and Gaynor, R. (1990). A transdominant tat mutant that inhibits tat-induced gene expression from the human immunodeficiency virus long terminal repeat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **87**, 5079-5083.
- Pettit, S.C., Sanchez, R., Smith, T., Wehbie, R., Derse, D. and Swanstrom, R. (1998). HIV type 1 protease inhibitors fail to inhibit HTLV-I Gag processing in infected cells. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, **14**, 1007–1014.
- Poiesz, B. J., Ruscetti, F. W., Gazdar, A.F., Bunn, P.A., Minna, J.D. and Gallo, R. C. (1980). 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 USA*, **77**, 7415-7419.
- Randolph, J. T. and DeGoey, D. A. (2004). Peptidomimetic inhibitors of HIV protease. *Curr. Top. Med. Chem.*, **4**, 1079-1095.
- Rezacova, P., Brynda, J., Fabry, M., Horejsi, M., Stouracova, R., Lescar, J., Chitarra, V., Riottot, M. M., Sedlacek, J. and Bentley, G. A. (2002). Inhibition of HIV protease by monoclonal antibodies. *J. Mol. Recognit.*, **15**, 272-276.
- Roberts, N. A., Martin, J. A., Kinchington, D., Broadhurst, A. V. and Craig, J.C. (1990). Rational design of peptide-based HIV proteinase inhibitors. *Science*, **248**, 358-61.
- Rozzelle, J. E., Dauber, D. S., Todd, S., Kelley, R. and Craik, C. S. (2000). Macromolecular inhibitors of HIV-1 protease. Characterization of designed heterodimers. *J. Biol. Chem.*, **275**, 7080-7086.
- Rudich, A., Ben-Romano, R., Etzion, S. and Bashan, N. (2005). Cellular mechanisms of insulin resistance, lipodystrophy and atherosclerosis induced by HIV protease inhibitors. *Acta Physiol. Scand.*, **183**, 75-88.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., vol. 3, Cold Spring Harbor Laboratory press, NY, USA.
- Sawaya, B. E., Khalili, K., Gordon, J., Srinivasan, A., Richardson, M., Rappaport, J. and Amini, S. (2000). Transdominant activity of human immunodeficiency virus type 1 Vpr with a mutation at residue R73. *J. Virol.*, **74**, 4877-4881.

- Schramm, H. J., de Rosny, E., Reboud-Ravaux, M., Buttner, J., Dick, A. and Schramm, W. (1999). Lipopeptides as dimerization inhibitors of HIV-1 protease. *Biol. Chem.*, **380**, 593-596.
- Schramm, H. J., Nakashima, H., Schramm, W., Wakayama, H. and Yamamoto, N. (1991). HIV-1 reproduction is inhibited by peptides derived from the N- and C-termini of HIV-1 protease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **179**, 847-851.
- Shimano, R., Inubushi, R., Oshima, Y. and Adachi, A. (1999). Inhibition of HIV/SIV replication by dominant negative Gag mutants. *Virus Genes*, **18**, 197-201.
- Sperka, T., Miklóssy, G., Tie, Y., Bagossi, P., Zahuczky, G., Boross, P., Weber, I.T., Harrison, R.W., Tőzsér, J. (2006) Bovine leukemia virus protease: comparison with human T-lymphotropic virus and human immunodeficiency virus proteases. *J. Gen. Virol*, **88**(Pt 7), 2052-2063.
- Sperka, T., Pitlik, J., Bagossi, P. and Tozser, J. (2005). Beta-lactam compounds as apparently uncompetitive inhibitors of HIV-1 protease. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **15**, 3086-3090.
- Stebbins, J. and Debouck, C. (1997). A microtiter colorimetric assay for the HIV-1 protease, *Anal. Biochem.*, **248**, 246–250.
- Steffy, K. R. and Wong-Staal, F. (1993). Transdominant inhibition of wild-type human immunodeficiency virus type 2 replication by an envelope deletion mutant. *J. Virol.*, **67**, 1854-1859.
- Swain, A. L, Miller, M.M., Green, J., Rich, D. H., Schneider, J., Kent, S.B.H. and Wlodawer, A. (1990). X-ray crystallographic structure of a complex between a synthetic protease of human immunodeficiency virus 1 and a substrate based hydroxyethylamine inhibitor. *Proc. Natl. Chem. Sci. USA*, **87**, 8805-8809.
- Swanstrom, R. and Eron, J. (2000). Human immunodeficiency virus type-1 protease inhibitors: therapeutic successes and failures, suppression and resistance. *Pharmacol. Ther.*, **86**, 145-170.
- Todd, S., Anderson, C., Jolly, D. J. and Craik, C. S. (2000a). HIV protease as a target for retrovirus vector-mediated gene therapy. *Biochim. Biophys. Acta*, **1477**, 168-188.
- Todd, S., Laboissiere, M. C. and Craik, C. S. (2000b). Yeast two-hybrid assay for examining human immunodeficiency virus protease heterodimer formation with dominant-negative inhibitors and multidrug-resistant variants. *Anal. Biochem.*, **277**, 247-253.
- Toh, H., Ono, M., Saigo, K. and Miyata, T. (1985). Retroviral protease-like sequence in the yeast transposon Ty1. *Nature*, **315**, 691.
- Tőzsér, J. (2001). HIV inhibitors: problems and reality. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **946**, 145-159.

- Tözsér, J. (2003). Stages of HIV replication and targets for therapeutic intervention. *Curr. Topics in Med. Chem.*, **3**, 1447-1457.
- Tözsér, J., Bagossi, P., Weber, I.T., Copeland, T.D. and Oroszlan, S. (1996). Comparative studies on the substrate specificity of avian myeloblastosis virus proteinase and lentiviral proteinases. *J. Biol. Chem.*, **271**, 6781–6788.
- Tözsér, J., Blaha, I., Copeland, T.D., Wondrak, E.M. and Oroszlan, S. (1991). Comparison of the HIV-1 and HIV-2 proteinases using oligopeptide substrates representing cleavage sites in Gag and Gag-Pol polyproteins. *FEBS Lett.*, **281**, 77–80.
- Tözsér, J., Friedman, D., Weber, I.T., Blaha, I. and Oroszlan, S. (1993). Studies on the substrate specificity of the proteinase of equine infectious anemia virus using oligopeptide substrates. *Biochemistry*, **32**, 3347–3353.
- Tözsér, J., Gustchina, A., Weber, I.T., Blaha, I., Wondrak, E.M. and Oroszlan, S. (1991). Studies on the role of the S4 substrate binding site of HIV proteinases. *FEBS Lett.*, **279**, 356-60.
- Tözsér, J. and Oroszlan, S. (2003). Proteolytic events of HIV-1 replication as targets for therapeutic intervention. *Curr. Pharm. Des.*, **9**, 1803-1815.
- Tözsér, J., Zahuczky, G., Bagossi, P., Louis, J.M., Copeland, T.D., Oroszlan, S., Harrison, R.W. and Weber, I.T. (2000). Comparison of the substrate specificity of the human T-cell leukemia virus and human immunodeficiency virus proteinases. *Eur. J. Biochem.*, **267**, 6287–6295.
- Tözsér, J. and Weber, I.T. (2007). The protease of human T-cell leukemia virus type-1 is a potential therapeutic target. *Curr Pharm Des.*, **13**(12), 1285-94.
- Trono, D. (2007). LVG - TronoLab. <http://tronolab.epfl.ch/page58115.html>.
- Trono, D., Feinberg, M. B. and Baltimore, D. (1989). HIV-1 Gag mutants can dominantly interfere with the replication of the wild-type virus. *Cell*, **59**, 113-120.
- UNAIDS, 2007; http://data.unaids.org/pub/EPISlides/2007/2007_epiupdate_en.pdf
- Varmus, H.E. and Brown, P. (1989). Retroviruses. In: Howe, M. and Berg, D. (eds) Mobile DNA. ASM Press, Washington DC, USA pp. 53-109.
- Verdonck, K., González, E., Van Dooren, S., Vandamme, A. M., Vanham, G. and Gotuzzo, E. (2007). Human T-lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient infection. *Lancet Infect Dis.*, **7**, 266–81.
- Wang, G.T., Matayoshi, E.D., Huffaker, J. and Krafft, G.A. (1990). Design and synthesis of new fluorogenic HIV protease substrates based on resonance energy transfer. *Tetrahedron Lett.*, **31**, 6493–6496.

- Weiner, S. J., Kollman, P. A., Nguyen, D. T. and Case, D. A. (1986). An All Atom Force Field for Simulations of Proteins and Nucleic Acids. *J. Comp. Chemistry*, **7**, 230-252.
- Williams, J.W. and Morrison, J.F. (1979). The kinetics of reversible tightbinding inhibition. *Methods Enzymol.*, **63**, 437–467.
- Wlodawer, A. (2002). Rational approach to AIDS drug design through structural biology. *Annu. Rev. Med.*, **53**, 595-614.
- Wlodawer, A. and Erickson, J. W. (1993). Structure-based inhibitors of HIV-1 protease. *Annu. Rev. Biochem.*, **62**, 543-585.
- Wondrak, E. M. and Louis, J. M. (1996). Influence of flanking sequences on the dimer stability of human immunodeficiency virus type 1 protease. *Biochemistry*, **35**, 12957-62.
- Yehia, N. A., Antuch, W., Beck, B., Hess, S., Schauer-Vukasinovic, V., Almstetter, M., Furer, P., Herdtweck, E. and Domling, A. (2004). Novel nonpeptidic inhibitors of HIV-1 protease obtained via a new multicomponent chemistry strategy. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **14**, 3121-3125.

7. KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

Az értekezéshez felhasznált közlemények:

- Miklóssy, G.,** Tőzsér, J., Kádas, J., Ishima, R., Louis, J.M., Bagossi, P. (2008) Novel macromolecular inhibitors of HIV-1 protease. *Prot. Eng. Design and Selection*, May 13 (Epub ahead of print). I.F.: **3,000**
- Bagossi, P., Kádas, J., **Miklóssy, G.,** Boross, P., Weber, I.T., Tőzsér, J. (2004) Development of a microtiter plate fluorescent assay for inhibition studies on the HTLV-1 and HIV-1 proteinases. *J. Virol. Methods*, 119, 87-93. I.F.: **1,938**

Egyéb közlemények:

- Kádas, J., Weber, I.T., Bagossi, P., **Miklóssy, G.,** Boross, P., Oroszlan, S., Tőzsér, J. (2004) Narrow substrate specificity and sensitivity toward ligand binding site mutations of human T-cell leukemia virus type-1 protease. *J. Biol. Chem*, 279, 27148-27157. I.F.: **6,696**
- Bagossi, P., Sperka, T., Fehér, A., Kádas, J., Zahuczky, G., **Miklóssy, G.,** Boross, P., Tőzsér, J. (2004) Amino acid preferences for a critical substrate binding subsite of retroviral proteases in type 1 cleavage sites. *J. Virol.*, 79, 4213-4218. I.F.: **5,398**
- Fehér, A., Boross, P., Sperka, T., **Miklóssy, G.,** Kádas, J., Bagossi, P., Oroszlan, S., Weber, I.T., Tőzsér, J. (2006) Characterization of the murine leukemia virus protease and its comparison with the HIV-1 protease. *J. Gen. Virol.*, 87(Pt 5), 1321-1330. I.F.: **3,221**
- Sperka, T., **Miklóssy, G.,** Tie, Y., Bagossi, P., Zahuczky, G., Boross, P., Weber, I.T., Harrison, R.W., Tőzsér, J. (2007) Bovine leukemia virus protease: comparison with human T-lymphotropic virus and human immunodeficiency virus proteases. *J. Gen. Virol.*, 88(Pt 7), 2052-2063. I.F.: **3,221**

Az értekezéshez kapcsolódó előadások és posztterek:

- Miklóssy, G.,** Boross, P., Kádas, J., Fehér, A., Sperka, T., Tőzsér, J., Bagossi, P.: Development of a microtiter plate fluorescent assay for inhibition profiling of retroviral proteases. 31st FEBS Congress, Istanbul, Turkey, June 24-29, 2006.
- Miklóssy G.,** Matúz K., Kádas J., Tőzsér J., Bagossi P.: Transz domináns negatív HIV proteáz gátló hatása. A Magyar Biokémiai Egyesület 2006. évi vándorgyűlése, Pécs, 2006. augusztus 30-szeptember 02.

Miklóssy G., Kádas J., Matúz K., Tőzsér J., Bagossi P.: Mutáns HIV-1 proteázok transzdomináns gátló hatása. A Magyar Biokémiai Egyesület 2007. évi vándorgyűlése, Debrecen, 2007. augusztus 26-29.

Miklóssy G., Boross P., Kádas J., Fehér A., Sperka T., Bagossi P. and Tőzsér J.: High-throughput assay for inhibition profiling of retroviral proteases. Bridges in Life Sciences, Annual Scientific Review Meeting of the Regional Cooperation for Health, Science and Technology Consortium, Pécs, October 5, 2007.

Miklóssy G., Boross P., Tőzsér J., Bagossi P.: Development of a microtiter plate fluorescent assay for testing dominant negative inhibitors of HIV-1 protease. 6th European HIV Drug Resistance Workshop, Budapest, March 26-28, 2008.

Egyéb posztterek:

Miklóssy G., Fehér A., Kádas J., Sperka T., Tőzsér J.: Az erbB2 receptor "shedding"-jének vizsgálata emlőtumor sejtekben. A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztályának 7. Munkaértekezlete, Keszthely, 2002. május 14-17.

Kádas, J., Weber, I.T., Bagossi, P., Boross, P., **Miklóssy, G.**, Louis, J.M., Copeland, T.D., Tőzsér, J.: Alteration of the substrate specificity of Human T-cell Leukemia Virus Protease. Meeting on Retroviruses 2003., Cold Spring Harbor, USA, May. 20-25, 2003.

Eizert, H., Bagossi, P., Sperka, T., Fehér, A., Kádas, J., Zahuczky, G., **Miklóssy, G.**, Boross, P., Tőzsér, J.: Amino acid preferences for P1 and P4 sites of retroviral proteases in type 1 cleavage sites. 30th FEBS Congress, Budapest, Hungary, July 2-7, 2005.

Benkő S., Tőzsér J., **Miklóssy G.**, Kádas J., Csutak A., Berta A., Rajnavölgyi É.: Constitutive and UV-B induced expression of Nod-like receptors and their functional partners in human corneal epithelial cells. Pattern-recognition receptors in human disease. A Biochemical Society Focused Meeting, Cambridge, UK, August 8 – 10, 2007.

Kádas J., Benkő Sz., **Miklóssy G.**, Csutak A., Tőzsér J.: Korneális sebgyógyulás biokémiai hátterének és az UV sugárzás hatásának vizsgálata. A Magyar Biokémiai Egyesület 2007. évi vándorgyűlése, Debrecen, 2007. augusztus 26-29.