

EGYETEMI DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Retrovirális proteinázok és kaszpázok specificitásának vizsgálata  
molekuláris biológiai, enzimológiai és molekuláris modellezési  
módszerekkel

Zahuczky Gábor

Debreceni Egyetem  
Orvosi- és Egészségtudományi Centrum  
Debrecen, 2003

# 1. BEVEZETÉS

A proteinázok szerepe alapvető fontosságú számos fiziológiai folyamatban, mint például a gyulladás, fertőzés, allergiás reakciók, véralvadás, sejtnövekedés és a sejthalál. A proteinázok terápiás szempontból is fontos célfehérjék, mivel az ellenük tervezett inhibitorok alkalmazásával nem kívánt élettani hatásuk megakadályozható vagy csökkenthető.

Az AIDS elleni terápiában jelenleg számos retrovirális proteináz inhibitor van klinikai használatban, azonban a terápia során, ezek ellen gyorsan kifejlődik a rezisztencia. A rezisztencia kifejlődése mutáns proteinázok megjelenésének köszönhető, és azt tapasztalták, hogy a mutánsokban jellemzően egyéb vad típusú retrovirális proteinázokra jellemző aminosavak jelennek meg. Olyan inhibitorok tervezése és használata, amelyek különböző retrovirális proteinázok ellen is hatékony, lecsökkentheti az esélyét az életképes mutánsok megjelenésének. Ilyen inhibitorok tervezéséhez segítséget nyújthatnak a szubsztrátspecifitász vizsgálatok.

A fehérjék foszforilációja az egyik legalapvetőbb biokémiai szabályozási mechanizmus. A proteinázok különböző szubsztrátok iránti affinitását alapvetően befolyásolhatja azok foszforiláltsági foka. Annak eldöntésére, hogy az adott fehérje, adott aminosavdallancának foszforilációja befolyásolja-e egy adott proteináz által történő hasíthatóságát és így a foszforilációnak lehet-e szabályozó szerepe a fehérje esetében, szintén felhasználhatóak a specificitás vizsgálatok.

## **A retrovirális proteinázok (PR<sup>\*</sup>)**

A retrovírusok kutatása az elmúlt két évtizedben a ma még gyógyíthatatlan, krónikus betegség, a szerzett immunhiányos szindróma (AIDS) megjelenésének és rohamos elterjedésének következtében került előtérbe. A retrovírusok létezése már a múlt század elején ismert volt, azonban a humán T-sejtes leukémia vírus (HTLV) és a humán immundeficiencia vírus (HIV) felfedezéséig nem tudtak olyan retrovírusról, amely az embert is megfertőzheti. Ma már minden gerinces retrovírus fertőzésére ismert példa, melyeknek kimenetele sokféle lehet: betegség nélküli virémia, daganatképződés, idegrendszeri elváltozások, anémia és immunhiány.

A retrovirális proteinázok első felismert szerepe a vírus életciklusában a Gag és a GagPol prekursor fehérjék funkcionális részekre való hasítása volt. Egyes irodalmi adatok

---

\* 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.

szerint a sejtbe a kapsziddal együtt bejutó proteináz, a vírus nukleokapszid fehérjéjének hasításával kritikus szerepet játszik a vírusfertőzés korai szakaszában is. Több celluláris fehérjéről is kiderült, hogy szubsztrátjai a HIV proteinázoknak (pl.: vimentin, MAP2, NF- $\kappa$ B, stb.), ami szintén szerepet játszhat a vírus patogenitásában.

A retrovirális proteinázok 99-126 aminosavból álló, 11-15 kDa molekulatömegű homodimer formában aktív aszpartil proteinázok. A retrovirális proteinázok elsődleges és másodlagos szerkezete a celluláris aszpartil-proteinázok egyik doménjével analóg, számos béta redőt tartalmaznak és enzimtől függően egy, vagy két rövid alfa hélixet. A két alegység N- és C-terminális láncai összefonódva alkotnak egy négyrétegű antiparalel béta redőt. Az enzimben 3 jellegzetes régió található: az N-terminális közel helyezkedik el az aszpartil proteinázokra jellemző aktív centrumot kódoló katalitikus triád (-Asp-Thr/Ser-Gly-); a "flap" régió, amely flexibilis, és a szubsztrát kötődésekor ráhajlik a szubsztrátra; és a dimerizációs régió, melyért elsősorban az N- és C-terminális szekvenciák a felelősek.

A retrovirális proteinázok természetes hasítási helyein található aminosavak általában hidrofób jellegűek, viszont általánosan érvényes konszenzus szekvencia nem adható meg. A hasítási helyek osztályozása a HIV-1 PR esetében lehetséges, miszerint az 1. típusú hasítási helyek Asn-Tyr/Phe↓Pro aminosavakat tartalmaznak, a 2. típusúak pedig a P2-P2'<sup>†</sup> helyeken hidrofóbbak. Ez az általánosítás azonban úgy tűnik a többi retrovirális proteináz esetében nem alkalmazható.

A humán T-sejtes leukémia vírus (HTLV) és a marha leukémia vírus (BLV) a retrovírusok családjába tartozik, ezen belül is a csoport harmadik tagjával, a majom T-sejtes leukémia vírussal (STLV) együtt, egy külön csoportot alkotnak, az úgynevezett HTLV-BLV csoportot. A csoport tulajdonságai részben eltérnek a többi retrovírustól, a csoporton belül viszont jelentős a hasonlóság, ami megnyilvánul hasonló genomiális szerkezetükben, a Tax és a Rex szabályozó fehérjék jelenlétében és nukleotid szekvenciájuk homológiájában. A BLV ezért a HTLV modelljének tekinthető. Mindeztáig nem rendelkezünk kristályszerkezettel a csoport egyik tagjának proteinázáról sem, korábbi eredmények alapján viszont jelentős lehet a különbség a csoport tagjainak és a lentivírusok (pl.: HIV-1, HIV-2, stb.) proteinázainak specifitása között.

---

<sup>†</sup> 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.

## A kaszpázok

A programozott sejthalál evolúciósan konzervált folyamatában döntő szerepet játszó proteolitikus rendszernek tagjai a kaszpázok. Ezek az enzimek egy olyan kaszkádfolyamat részesei – elindítói illetve végrehajtói -, amely proapoptotikus szignálok hatására indul el, és számos fehérje hasításában tetőzik. Az apoptózis erőteljesen szabályozott folyamatának következményeként a nemkívánatos sejtek meghatározott morfológiai változásokon mennek keresztül (lekerekedés, membrán kitüremkedések képződése, DNS kondenzálódás és fragmentáció, zsugorodás és membránnal határolt, különböző sejtalkotórészeket magában hordozó apoptotikus testekre történő feldarabolódás), melynek eredményeképpen a sejteket a fagociták eliminálják, elkerülve ezzel a gyulladós reakciókat. A kaszpázaktivációnak jelenleg két fő útvonala ismert. Az egyik kiváltója sejt felszíni stimulus (extrinsic vagy halálreceptor útvonal), amely halálligand-halálreceptor kapcsolódáson keresztül valósul meg, míg a másikat (intrinsic vagy mitokondriális útvonal) celluláris stressz okozza, és a citokróm c mitokondriumból történő felszabadulása által előidézett aktiválással valósul meg.

A kaszpázok legfontosabb tulajdonságaikat nevükben rejtik, az enzimes család tagjai ui. P1 aszpartát specifikus ciszteinil proteinázok (Caspase = cystein-dependent aspartate-specific protease). Az első kaszpáz (kaspáz-1 vagy interleukin 1 $\beta$  konvertáló enzim (ICE)) azonosítása óta 14 emlős kaszpázt és 5 *Drosophila* kaszpázt klónoztak. Látens prekursor (zimogén) prokaspázok formájában szintetizálódnak, aktiválódásuk a fentebb vázolt, gondosan szabályozott útvonalakon történik.

Szerkezetüket tekintve minden prokaspáz tartalmaz egy nagymértékű homológiát mutató proteáz domént, amely domén két alegységre, a ~20 kD méretű nagy, illetve a ~10 kD méretű kis alegységekre osztható fel. Az enzim aktivitásához mindkét alegység szükséges. Ugyancsak minden kaszpázban megtalálható egy változó hosszúságú N-terminális peptidszakasz, úgynevezett prodomén, ami a prokaspázok egymással, illetve adaptereikkel történő összekapcsolódásának mediálásával játszhat fontos szerepet a prokaspázok aktivációjában. Jelenleg 5 kaszpáz kristályszerkezete ismert, melyeket tetrapeptid aldehid inhibitorokkal határoztak meg. A szerkezetekből kitűnik, hogy az érett kaszpázok tetramerek (pl.: a kaszpáz-3 esetében p17 és p13 egységekből álló heterodimerek C2 szimmetriájú homodimere), két egymástól függetlenül működő aktív centrummal. Mind a két heterodimer egyszerű globuláris domént képez, amelynek közepén egy alfa-hélixekkel határolt hatmenetes  $\beta$ -redő található.

A kaszpázok meglehetősen specifikus endopeptidázok, mivel minden ismert képviselőjük szinte kizárólagosan aszpartát mellett hasít. Ma már azonban olyan természetes szubsztrátok is

ismertek, amelyek hasítási szekvenciájukban P1 helyen glutamátot tartalmaznak. Ilyenek például a tumor nekrozis faktor receptor-I (p60) fehérje, amit a kaszpáz-7 GELE motívum mellett képes hasítani, a Max fehérje, amelyben IEVE hasítási helyet azonosítottak, amit a kaszpáz-5 és -7 enzimek *in vitro* hasítanak, és a DRONC *Drosophila* kaszpáz, amely önmagát is glutamát, TQTE szekvencia mellől hasítja ki. Specificitás alapján történő csoportosításukra az S4 alzsebük specificitásában található különbségek adnak lehetőséget: az 1. csoport tagjainak (kaspáz -1, -4, -5, -13) S4 zsebe toleráns, de jobban kedvelik a nagy hidrofób aminosavakat. A 2. csoportban szigorúan csak P4 Asp-ot kedvelő tagok találhatóak (kaspáz -2, -3, -7), míg a 3. csoport tagjai (kaspáz-6, -8, -9) a P4 elágazó láncú alifás oldalláncokat szeretik.

Bár az eddig azonosított fiziológias kaszpáz szubsztrátok száma meghaladja a hatvanat, ez a lista folyamatosan bővül. Ezek a fehérjék általában interdomén összekötő szekvenciájukban tartalmaznak egy vagy néhány kaszpáz hasítási helyet, tehát a kaszpázok szubsztrát fehérjéjüket nem lebontják, hanem a hasítás által fehérjefunkció aktiválódás vagy inaktiválódás megy végbe. A legjellemzőbb kaszpázszubsztrát fehérjék között találhatóak sejthalál fehérjék, sejtciklus szabályozó fehérjék, citoskeletális fehérjék, DNS metabolizmusban résztvevő fehérjék, neurodegeneratív betegségekben szerepet játszó fehérjék, jelátvitelben szerepet játszó fehérjék, transzkripciós faktorok, stb.

Számos celluláris kaszpáz szubsztrát fehérje potenciális, vagy meghatározott foszforilációs helyet tartalmaz a hasítási hely régiójában. Utóbbi fehérjék funkciójának foszforilációs szabályozását több esetben bizonyították. Ismert például a preszenilin-2 (PS-2) hasítási hely Ser 327 és Ser 330 oldalláncainak foszforilációja, ami gátolja a kaszpázok általi hasíthatóságát, így fokozva antiapoptotikus tulajdonságát. Bizonyított az I $\kappa$ B- $\alpha$ , MST1 és Max fehérjék P1' Ser oldalláncainak foszforilációja és a kaszpázhasítás szempontjából jellemző szabályozó szerepe. A sejtciklus G<sub>0</sub>  $\rightarrow$  G<sub>1</sub> átmenete során tapasztalt aktin átrendeződéshez kapcsolódó Gas-2 fehérje hiperfoszforilációja és a fehérje apoptózis szabályozó szerepe ismert. A Gas-2 fehérje kaszpáz-3 és kaszpáz-7 szubsztrátnak bizonyult. A Gas-2 fehérje foszforilációjának szempontjából a kaszpáz hasítási hely P4 Ser oldallánca jöhet számításba, amely nem egyedülálló, hiszen az SREBP-1 és PAK-2 fehérjék szintén potencionális P4 foszforilációs helyeket tartalmaznak. Különlegesebbnek tűnik a Bid fehérje P2' Ser oldalláncának foszforilációja (P2 Thr kevésbé volt foszforilálható), amely teljesen meggátolta a kaszpáz-8 enzimmel történő hasíthatóságát.

## 2. CÉLKITŰZÉS

A HTLV-I és BLV PR között nagy mind a szekvenciabeli, mind a specificitásbeli hasonlóság ezért a BLV PR a HTLV-I PR jó modelljének ígérkezett. Mivel a HTLV-BLV csoport tagjairól még nem rendelkezünk kristályszerkezettel és a BLV PR specificitását csak a HIV-1 és HIV-2 proteinázokkal hasonlították össze, ezért célul tűztük ki a BLV PR klónozását és tisztítását, majd specificitásának a HTLV-I PR-al történő összehasonlítását, a HTLV-I és BLV PR természetes hasítási helyeit reprezentáló oligopeptidek segítségével.

A HTLV PR-t már részben karakterizálták. Specificitásának a HIV-1 PR-al történő kellő részletességű összehasonlítását még nem írták le, ezért célul tűztük ki az enzim HIV-1 PR-al történő összehasonlítását, a HIV-1 PR MA/CA természetes hasítási helyén alapuló oligopeptid sorozattal. Mivel a sorozat számos tagját a HTLV-I PR nem hasította, ezért az összehasonlítást egy új, a HTLV-I CA/NC természetes hasítási helyén alapuló oligopeptid szubsztrátsorozattal is elvégeztük. Célunk volt továbbá a HTLV-I PR modelljének felépítése, a mérési eredményeinknek a molekuláris modellezés eszközével történő értelmezése.

A proteolízis és a fehérje foszforiláció együttes tanulmányozása a foszforilált oldalláncok közvetlen szerepének feltárásával ritka az irodalomban. A foszforilálható aminosavak azonosítására és a foszforiláció hatásának vizsgálatára rendszerint helyspecifikus mutagenézist alkalmaznak, az aminosav-jelölt Ser az első esetben Ala vagy Gly, míg a második esetben Asp aminosavra történő cserélésével. Mivel egy korábbi munkában a retrovirális proteinázok alkalmazásával munkacsoportunk már bebizonyította, hogy foszforilált oligopeptidek alkalmazása kiváló eszköz lehet a foszforilációnak a proteolízisre kifejtett szerepének tanulmányozására, ezért célul tűztük ki kaszpáz szubsztrátok P4, P3 és P1' Ser oldalláncainak foszforilációjának a szubsztrátok proteolízisére gyakorolt hatásának vizsgálatát. A vizsgálatainkhoz a PS-2 és Gas-2 kaszpáz szubsztrátokat mimikáló foszforilált illetve nem foszforilált oligopeptideket használtunk. További célunk volt a kaszpázok specificitása szempontjából esszenciális P1 Asp szerepének jellemzése a PARP, egy jól hasadó fehérje hasítási helyének szekvenciájával bíró, valamint abban P1 helyen Ser illetve foszfo-Ser mutációt tartalmazó oligopeptidek felhasználásával.

### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

**ENZIMEK:** A BLV PR-t kódoló régiót cDNS BLV klónból polimeráz láncreakcióval (PCR) sokszoroztuk fel. A PCR-hoz használt 5' primer EcoRI hasítási hely szekvenciát tartalmazott a kódoló régiótól 5' irányban, 3' primerből pedig kétfélet használtunk: az egyik a PR C-terminálisánál végződött, a másik a „pro reading frame” proteáz utáni teljes szekvenciáját tartalmazta és mindkettő tartalmazott két stop kodon után egy Sall hasítási hely szekvenciát. A felsokszorozott DNS fragmenteket pMal-c2 vektorba klónoztuk a maltóz kötő fehérje (MBP) génje után. Mindkét konstrukció tartalmazott egy 8 aminosav hosszú N-terminális túlnyúló szekvenciát. A vektorokat *E. coli* DH5 $\alpha$  sejtekbe transzformáltuk és a sejteket Luria-Bertani tápfolyadékban 37 °C-on 100  $\mu$ g/ml ampicilin koncentráció mellett növesztettük. Amikor a sejtszuszpenzió elérte a 0.6-0.8 abszorbanciát 600 nm-es hullámhosszon, a sejteket 1 mM IPTG hozzáadásával indukáltuk, és két órán keresztül expresszáltattuk a fehérjét. A sejteket lecentrifugáltuk és SDS-poliakrilamid gél mintafelvívő pufferben történő lizálás után SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel győződünk meg az expresszió sikerességéről. Nagy mennyiségű fehérje tisztításánál a sejteket centrifugálás után lízis pufferben szuszpendáltuk (50 mM Tris-HCL pH 8.0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1 mM PMSF). A sejteket a lizozim-DOC módszerrel lizáltuk. Az inklúziós testeket 0.5% Triton X-100 tartalmú lízis pufferben mostuk, lecentrifugáltuk, majd a pelletet 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 6 M guanidin-HCl pufferben oldottuk, jégen. A mintát 4 °C-on két lépésben dializáltuk, először 2 M guanidin-HCl tartalmú 100mM Tris-HCl pH 8.0 pufferrel, majd A pufferrel (20 mM Tris-HCl pH 7.2, 100mM NaCl, 1 mM EDTA, 5% glicerin, 0.1% Triton X-100) szemben. Végül centrifugálás után a felülúszót 0.22  $\mu$ m-es membránszűrőn leszűrtük. Ezután kationcserés eljárással Econo-Pak High S oszlopon (Bio-Rad) tisztítottuk A puffer és A puffer + 1M NaCl lineáris gradienssel. A legnagyobb aktivitású frakciókat Amicon-10-el koncentráltuk, majd A-pufferrel ekvilibrált Superdex G-75 HR 10/30 gélszűrő oszlopon tisztítottuk. Az így kapott legnagyobb aktivitású frakciókkal végeztük a kinetikai méréseinket.

A rekombináns HTLV-I proteinázt kódoló régió pET-23b plazmidba volt klónozva. Az enzim expressziója és tisztítása publikált módszer alapján történt.

A humán rekombináns kaspáz-3, -7 és -8 enzimeket a Biomol Research Laboratories (Plymouth Meeting, PA, USA) cégtől szereztük be, illetve az irodalomban leírt módon *E.coli*-ban expresszáltattuk és tisztítottuk. A klónokat Dr. Guy S. Salvesen (Burnham Institute, La Jolla, California) biztosította. Az enzimkoncentrációkat acetil-Asp-Glu-Val-Asp-CHO inhibitorral történő titrálással határoztuk meg.

A mutáns kaszpáz-3 enzimeket QuikChange helyspecifikus mutagenézis kit (Stratagene) segítségével készítettük a vad típusú kaszpáz-3 nukleotidszekvenciáját tartalmazó pET23b templát plazmid felhasználásával. A mutáns kaszpáz-3 enzimeket az irodalomban leírt módon *E.coli*-ban expresszáztattuk és tisztítottuk, majd SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel győződünk meg az expresszió sikerességéről.

OLIGOPEPTIDEK: Az oligopeptideket szilárd fázisú peptidszintézissel készítették, Model 430A automata peptid szintetizátorral (Applied Biosystems, Inc.) vagy félautomata Vega peptid szintetizátorral (Vega-Fox Biochemicals). A tisztításhoz RP-HPLC-t használtak. A peptideket aminosav analízissel, illetve alkalmanként gázfázisú szekvenálással ellenőrizték. A peptid-törzsolatok desztillált vízzel vagy 10 mM DTT-oldattal készültek, a pontos koncentrációt aminosavanalízissel határozták meg. A peptid oldatokat Dr. Stephen Oroszlántól és Dr. Terry D. Copelandtól kaptuk (Molecular Virology and Carcinogenesis Laboratory, NCI-FCRDC, Frederick, MD, USA). A foszforilált peptidek szintézise publikált módszer alapján történt.

ENZIMAKTIVITÁS MÉRÉSE: A retrovirális proteinázok aktivitás-mérése a következő reakcióelegyben történt: 0.01-4 mM szubsztrátoldat a hozzávetőleges  $K_M$  értéktől függően, 1-40 nM retrovirális PR készítmény, 0.25 M foszfát puffer pH 5.6, 5% glicerol, 1 mM EDTA, 0.2% Nonidet P-40, 2 M NaCl. A kaszpázok aktivitás-mérése a következő reakcióelegyben történt: 50 mM HEPES, pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.1 % CHAPS, 1 mM EDTA, 10 mM DTT és 10 % glicerol, 0.01–6.0 mM szubsztrát végkoncentráció mellett. A 20  $\mu$ l végtérfogatú reakcióelegyeket 37 °C-on 1 órán át inkubáltuk. Ha nem tapasztaltunk jelentős hidrolízist, a reakciót 16 órás inkubálással is lejátszottuk. A reakciókat 180  $\mu$ l 1% TFA hozzáadásával állítottuk le, majd a szubsztrátot RP-HPLC-vel választottuk el a termékektől, valamint a pufferkomponensektől, Nova-Pak C18 (Waters Associates, Inc.) kromatográfias oszlopon (3.9 x 150 mm), lineáris víz-acetonitril gradienssel (0-100%), 0.1% TFA jelenlétében. Az elválasztást 206 nm-en követtük és a hidrolízis mértékét a kromatográfias görbe integrálásával számítottuk. A csúcsok integrációs értékeinek megfelelő peptidmennyiség kiszámításához korábban meghatározott referenciaértékeket használtunk. Ezen referenciaértékeket, valamint a hasítási helyeket, a csúcsoknak megfelelő frakciók aminosavanalízisével és szekvenálásával határozták meg. Ezek alapján a termékek azonosításához a retenciós időket vettük figyelembe.

A kinetikai állandók meghatározásához minden szubsztrátpeptidre 6 különböző koncentrációt teszteltünk, és úgy állítottuk be az enzim koncentrációkat, hogy a szubsztrát

hidrolízise 20% alatt maradjon. A kinetikai paramétereket a reakciósebesség és szubsztrátkoncentráció adatok Michaelis-Menten egyenlethez való illesztésével határoztuk meg, nemlineáris regressziós módszerrel, a Fig.P program (Fig.P Software Corp., Durham, NC) felhasználásával. A kinetikai állandók standard deviációi 20 % alatt voltak. A szubsztrát hidrolízis általában a Michaelis-Menten kinetikát követte az általunk használt szubsztrátkoncentráció tartományban, azonban azoknál a peptideknél, melyeknél nem volt lehetőségünk a koncentrációjuk növelésére, a  $k_{cat}/K_M$  értékeket a görbe lineáris szakaszából állapítottuk meg. Azoknál a peptideknél, ahol a Michaelis-Menten görbe már igen kis szubsztrát koncentrációnál a telítési szakaszba ért, a  $k_{cat}/K_M$  értékeket ismert  $k_{cat}/K_M$  értékekkel rendelkező szubsztrátok segítségével, kompetíciós mérésekkel határoztuk meg.

MOLEKULÁRIS MODELLEZÉS: A Rous sarcoma vírus (RSV) PR, HIV-1 PR natív illetve inhibitorokkal alkotott komplexeinek kristályszerkezete ismert. Az RSV PR- és HIV-1 PR-inhibitor komplex kristályszerkezete alapján modellezték az RSV-PR- és HIV-1 PR-szubsztrát komplexet és a HIV-2 PR-t is. Az RSV PR kristályszerkezetében nem volt látható teljesen a flap régió, ezt modellezéssel egészítették ki. A HTLV-I PR modellezése során az RSV kristályszerkezetéből indultunk ki. A HOMOMA (HOMolog MOdel MAker) program segítségével az RSV PR aminosavjait megfeleltettük a HTLV-I PR aminosavjaival úgy, hogy a lehető legnagyobb homológiát kapjuk. Ezt követően két deléción alkalmazására volt szükség – egy 5 aminosav hosszúságú az RSV 22-26 aminosavai között egy hurokban és egy 3 aminosavas a flap régió hurokszakaszában-, hogy megkapjuk a HTLV-I PR aminosavszekvenciának megfelelő szerkezetet. A kapott szerkezetet az AMMP program segítségével (Harrison, 1993) Thr-Gln-Val-Leu↓Val-Val-Gln-Pro oligopeptiddel alkotott komplexében minimalizáltuk, sp4 paraméterkészlet alkalmazásával.

A kaszpáz-3 PS-2 szubsztráttal alkotott modelljét a humán kaszpáz-3-inhibitor kristályszerkezetből építettük fel az inhibitor oldalláncainak szubsztrátoldalláncokra történő cseréjével, Sybyl 6.7 software csomag (Tripos Inc., St. Louis, MO, USA) alkalmazásával. A kicserélt oldalláncok konformációjának megtalálásához mindegyik rotálható kötés torziós szögének  $15^\circ$ -ként történő elforgatásával konformációs keresést végeztünk „Kollman all-atom” erőter alkalmazásával, a 8 angströmnél távolabbi kölcsönhatások elhanyagolásával. A módosított aminosavak legkisebb energiájú konformereinek megtalálása után a teljes enzim-szubsztrát komplexre húsz Powell iterációt alkalmaztunk. Az így felépített enzim modell Ca atomjai és a kiindulási kristályszerkezet Ca atomjai közötti RMS deviáció 0.13 angströmnek adódott.

A kapott modelleket Silicon Graphics (Indigo2 illetve O2) számítógépeken jelenítettük meg. A szubsztrát és enzim között kialakuló kölcsönhatásokat az aminosavak atomjainak azonosítása, távolságmérések és a kölcsönhatási energia meghatározása alapján valószínűsítettük. Ezekkel a módszerekkel becsültük a szubsztrátkötő zsebekbe illeszthető aminosavak minőségét illetve a kötődéshez szükséges konformációváltozást.

## 4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

### A BLV PR klónozása és specificitásának összehasonlítása a HTLV-I PR specificitásával

A BLV proteinázt kódoló régiót pMal-c2 vektorba, az *E.coli malE* génje után klónoztuk. Két konstrukciót készítettünk, mindkettő 8 aminosavas N-terminálisan túlnyúló régiót tartalmazott. A pMAL-BLVPr klón csak a PR kódoló régiót tartalmazta, a pMal-BLVPrpro klón pedig a teljes pro gént tartalmazta. Az expresszió után poliklonális nyúl anti-BLV PR antitesttel, immunoblot kísérlettel végeztük el az expresszió ellenőrzését, azonban a várt 58-60 kDa méretű fehérjék megjelenése helyett 14 kDa méretű fehérjesávot kaptunk mindkét klónunk esetében. A megjelenő sáv mérete jó egyezést mutatott a virionból tisztított PR méretével. Eredményeink alapján egyértelmű, hogy az expresszió során nem csak az N-terminális, hanem a C-terminális régió is processzálódik.

A BLV PR nagy része inklúziós testekbe került az expresszálas során, amiről SDS-PAGE gélelektroforézis és immunoblot kísérletekkel bizonyosodtunk meg. Az enzim tisztítása során kationcserét majd géliszűrést alkalmaztunk. A tisztítás végére sikerült tiszta enzimet nyernünk. A tisztított enzim végkoncentrációja 2  $\mu\text{M}$ -nak adódott. További koncentrálas illetve -20 °C-on történő hosszabb tárolás során részleges önprocesszálást tapasztaltunk, ami kettős sávként jelent meg az SDS-poliakrilamid gélen. Részleges önprocesszálást, a 116. és 117. aminosav között történő hasítást, korábban már mások is leírták.

A BLV PR és a HTLV-I PR összehasonlító kinetikai jellemzéséhez a BLV és a HTLV-I PR természetes hasítási helyeit reprezentáló oligopeptideket használtunk. Egy BLV peptid kivételével, amelyet csak a BLV PR hasított, az összes többi tanulmányozott peptidet mindkét enzim hasította, bár néhány esetben meglehetősen különböző specificitási állandóval. Általánosan megállapíthatjuk, hogy a BLV PR esetében jelentősen kisebb  $k_{\text{cat}}$  értékeket kaptunk a HTLV-I PR-hoz képest, azonban az igen kis  $K_M$  értékek következtében a specificitási állandók nagyságrendileg hasonlóknak adódtak. A BLV PR esetében néhány szubsztrátnál a  $K_M$  igen kis értékének következtében a  $k_{\text{cat}}/K_M$  értékeket nem tudtuk

közvetlenül a Michaelis-Menten görbéből kiszámolni. Ezeknél a peptideknél kompetíciós mérést alkalmaztunk, ismert  $k_{cat}/K_M$  értékű szubsztrátok alkalmazásával. Számos, a HTLV-I proteinázzal már korábban letesztelt HIV-1 inhibitorot kipróbáltunk, mint a BLV proteináz potencionális gátlószerét. Ezek egyike sem gátolta BLV proteinázt, pedig a Compound-3 korábban a HTLV-I PR jó inhibitorának bizonyult. Az MPMV és AMV proteinázok inhibitora szintén nem gátolta a BLV proteinázt. A két sztatín alapú inhibitor viszont, amelyeket a HTLV-I PR hasítási hely alapján terveztünk gátolta a BLV proteinázt, annak ellenére, hogy az egyik a HTLV-I ellen hatástalanak bizonyult.

### **A HTLV-I PR szubsztrátspecifitását vizsgálata és a HIV-1 proteinázzal történő összehasonlítása**

A HTLV-I PR szubsztrátspecifitását olyan oligopeptidek hasíthatóságával próbáltuk vizsgálni, melyek az egyik HIV-1 PR hasítási hely (MA/CA) szekvenciájában (H-Val-Ser-Gln-Asn-Tyr↓Pro-Ile-Val-Gln-NH<sub>2</sub>) aminosavcsereket tartalmaztak. Ezeknek a peptideknak a nagy részét azonban a HTLV-I PR nem hasította az alábbi esetek kivételével: P2 hidrofób oldalláncú, illetve P4 Leu, Val, Ile, Met, Phe, vagy Thr tartalmú peptidek.

Mivel ezzel a peptidsorozattal a teljes szubsztrátspecifitás vizsgálatot nem tudtuk elvégezni, ezért a HTLV-I PR egyik természetes hasítási helyén (CA/NC) alapuló oligopeptid sorozatot választottuk (Lys-Thr-Lys-Val-Leu↓Val-Val-Gln-Pro-Lys). Általánosan megállapíthatjuk, hogy ezen oligopeptidsorozat tagjainak nagy részét a HTLV-I PR nagyobb sebességgel hidrolizálta mint a HIV-1 PR, míg az emzim-szubsztrát komplex stabilitását jellemző  $K_M$  értékekre vonatkozóan nem volt tapasztalható hasonló tendencia.

A természetes hasítási hely szekvenciáját tartalmazó dekapeptid mindkét enzim számára jó szubsztrátnak bizonyult. Az N-terminális irányából rövidített származékok közül nonapeptid már gyengébb szubsztrátja volt a HTLV-I PR-nak, míg az oktapeptid már egyáltalán nem hasadt. Tehát úgy tűnik, hogy a HTLV-I PR esetében egy kiterjedtebb szubsztrátkötő régióval kell számolni a HIV-1 PR-hoz képest.

A P4 helyen szubsztituált származékok közül a hidrofób aminosavakra (Val, Leu) és Thr-ra cserélt oligopeptidek igen jó szubsztrátjai voltak a HTLV-I proteináznak, de a P4 Asp-ot tartalmazó peptid kivételével, minden peptid meglehetősen jól hasadt. Ezzel szemben a HIV-1 PR-nál a Thr és Ser bizonyult kitüntetett szerepűnek és P4 Gly csere vezetett a hasítási hatékonyság nagymértékű visszaeséséhez.

A P4 helyen szubsztituált peptidekhez hasonlóan a P3 helyen szubsztituált származékok is mindkét enzim számára hasíthatónak bizonyultak, de míg a HTLV-I PR esetében az eredeti

P3 Lys oldalláncú peptid bizonyult a legjobbnak, addig a HIV-1 esetében a P3 Phe és Leu származékok kiugróan jó szubsztrátoknak bizonyultak. Érdekes, hogy mindkét enzimnél a P3 Gly és P3 Asp származékok mutatkoztak a legrosszabb szubsztrátoknak.

A P2 helyen szubsztituált származékoknál a Val Lys csere mindkét enzim esetében a hidrolizálhatóság teljes elvesztését jelentette. A HTLV-I PR esetében a Val Asn, Asp, Ser és Gly cserék is hasíthatatlan peptideket eredményeztek, de a P2 Ala származék is rossz szubsztrátoknak bizonyult. A HIV-1 PR esetében a P2 Gly, Leu, Ser és Asp származékoknál tapasztaltunk még nagymértékű aktivitáscsökkenést.

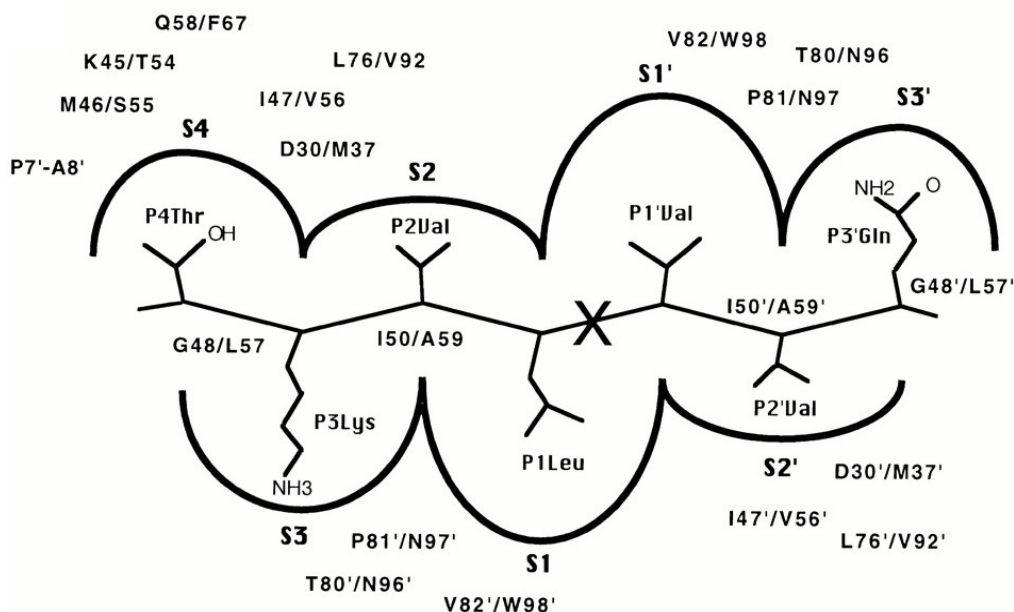
A P1 helyen szubsztituált származékok közül mindkét esetben a Phe csere bizonyult a legjobbnak, de a P1 Tyr és P1 Met tartalmú származék is mindkét enzim számára jó szubsztrátoknak bizonyult. A két enzim közötti specificitáskülönbség a legmarkánsabban a P1 Ala szubsztituált peptid esetében jelentkezett, amely származékot a HIV-1 PR csak kis hatékonysággal, míg a HTLV-I PR jól hasította.

A P1' származékok esetében a P1' Gly, Ser, Asp, Lys és Pro tartalmú származékok egyaránt rossz szubsztrátoknak bizonyultak mindkét enzim számára. A Val Leu csere egyik enzimnél sem befolyásolta lényegesen a hasíthatóságot, a Val Ile és a Val Phe csere viszont a HTLV-I PR-nál lényegesen csökkentette, míg a HIV-1 PR-nál alig befolyásolta a hasíthatóságot.

A kinetikai eredményeinket a molekuláris modellezés is segítségével elemeztük. A HTLV-I PR modellezése során az RSV kristályszerkezetéből indultunk ki. A HIV-1 és RSV PR kristályszerkezetének és aminosav szekvenciájának együttes vizsgálata azt mutatja, hogy a háromdimenziós struktúrájuk nagyfokú homológiát mutat, ezért várhatóan a HTLV-I PR számára általunk felépített modell is jól írja le az enzim térszerkezetét. Az RSV és HTLV-I PR-ok HIV-1 PR szekvenciájához képest többlet aminosavai általában extra hurkok formájában mutatkoznak, amelyek jórészt a molekula felszínén helyezkednek el.

A szubsztrát peptid  $\beta$ -konformációban kötődik a PR-okhoz (1. ábra). A peptidkötő régió eléggé kiterjedt, a modell alapján a HTLV-I PR esetében is legalább hét szubsztrátkötő zseb különíthető el a kapcsolódó peptid oldalláncai számára. Ezek a zsebek az enzim homodimer jellegéből következően többnyire szimmetrikusak a hasítási helytől N- illetve C-terminális irányba, ám a peptidkötés aszimmetriája, az aszimmetrikusan kialakuló hidrogénhidak arra utalnak, hogy ez a szimmetria torzul. Ezt támasztották alá vizsgálati eredményeink is, amelyeket molekuláris modellezés segítségével értelmeztünk.

A HTLV-I CA/NC szubsztrátot, illetve aminosavcserét tartalmazó származékait belemodelleztük a HTLV-I és a HIV-1 proteínázokba, és ezen modelleket használtuk fel a kapott kinetikai eredmények értelmezésére és a proteínáz specificitásának jellemzésére.



1. ábra: Az enzim-szubsztrát kötődés sematikus rajza

Az ábrán a HTLV-I CA/NC szubsztrát (KTKVL↓VVQPK) P4 – P3' oldalláncainak illeszkedése látható a HTLV-I és HIV-1 proteinázok szubsztrátkötő zsebeibe. A megfelelő kötőhelyek relatív méretét a szubsztrát oldalláncok körüli ívek nagysága jelképezi. A kötőhelyeket alkotó aminosavak közül csak azok vannak feltüntetve, HIV-1 PR/HTLV-I PR sorrendben, amelyek különbözőek a HIV-1 és a HTLV-I proteinázokban.

Az S4 alzseb minden retrovirális proteináz esetében a PR molekula felszínéhez közel helyezkedik el, így a P4 aminosav az oldószerrel is kölcsönhathat. Ebből adódóan a P4 helyen várhatóan poláros aminosavak eredményeznek jó kötődést. Ezzel szemben az a megfigyelés, hogy az eredeti HIV-1 peptid nem, míg a P4 helyen hidrofób aminosavakat tartalmazó származékai hasíthatóak voltak a HTLV-I PR-al ezen enzim S4 zsebének hidrofóbbabb jellegére utal. A HTLV-I CA/NC peptid P4 helyen szubsztituált származékai közül a valint, leucint, izoleucint, prolint, fenilalanint valamint az eredeti treonint tartalmazó peptidek bizonyultak a legjobbaknak, ami alátámasztja ezt a feltételezést. Modellünk alapján úgy tűnik, hogy a P4 Val kölcsönhathat a Val56, Met37, Val92 hidrofób oldalláncaival. A Met37 helyett a HIV-1 PR-ban Asp található, amely jól magyarázza a HIV-1 PR S4 zsebének hidrofílebb jellegét.

Korábbi vizsgálatok során azt tapasztalták, hogy különböző aminosavak cseréje a P3 pozícióba nem vezetett a hasíthatóság elvesztéséhez. Ezt az általános érvényű tendenciát alátámasztják jelenlegi vizsgálataink is. Az S3 kötőhelyek általában nyitottak, viszonylag nagy méretűek és szintén a felszín közelében helyezkednek el. Ez viszonylag szabad mozgást enged a P3 aminosav oldalláncok számára, mely így kölcsönhatásba kerülhet mind az enzim felszínén lévő poláros, mind az alzseb mélyén található hidrofób oldalláncokkal. A modell alapján a zsebet felépítő aminosavak többsége azonos a két proteinázban. A legjelentősebb különbség a HIV-1 "flap" régiójában található Gly helyett Leu57 megjelenése a zsebben, amely csökkenti a

zseb kiterjedését és magyarázatul szolgálhat a HTLV kisebb affinitására a nagyobb méretű hidrofób aminosavak iránt.

Az S2 alzsebek térbelileg mindkét PR-ban elég szűkek. A HIV-1 MA/CA természetes hasítási hely szekvenciáján alapuló sorozattal kapott eredmények alapján a HTLV-I PR S2 szubsztrátkötő helye a HIV-1 S2 zsebéhez képest hidrofóbabb és nagyobb méretű. Ezzel magyarázható, hogy míg a HIV-1 PR esetében kisméretű, hidrofób jellegű oldalláncok bizonyultak kedvezőnek, addig a HTLV-I PR esetében csak közepes méretű hidrofób aminosavakat (Val, Leu, Ile) tartalmazó peptidek voltak hasíthatók. Ugyanezen aminosavak bizonyultak optimálisnak a HTLV-I PR számára a HTLV-I CA/NC peptid P2 helyén is, míg a HIV-1 esetében a P2 Leu már túl nagyra bizonyult. Ugyanakkor a Phe oldallánc ezen a helyen már mindkét enzim számára kedvezőtlenül nagyméretű. A kinetikai eredményeket a modell is alátámasztotta, miszerint az Ile47-Val56 és az Ile50'-Ala59' csere is a zseb növekedéséhez vezet.

Korábbi vizsgálatok azt mutatták, hogy az S1 és S1' alzsebek az S3 zsebekhez hasonlóan konzervatívnak tekinthetők. Viszonylag nagyok és mélyek, az enzim belsejében helyezkednek el és főként hidrofób aminosav oldalláncok befogadásának kedveznek. Az enzim működése szempontjából létfontosságú katalitikus aszpartil oldalláncok is itt találhatóak. Ezen aminosavak mellett a két enzimben változatlanul maradt a HTLV-I Gly34, Arg10, Ala59, Gly58, Leu30 oldalláncainak megfelelő aminosavak, amelyek szintén az alzsebek konzervativitása mellett szólnak. Kutatási eredményeink szerint a P1 Phe csere a HTLV-I CA/NC peptid esetében is jobb szubsztrátot eredményezett, mint a Tyr csere, hasonlóan ahhoz, amit a HIV-1 PR-zal a MA/CA szubsztrátsorozat tagjainál kaptak. Viszont a P1 Met illetve a P1 Ala csere sokkal kisebb mértékű csökkenést idézett elő a specificitási állandóban a HTLV-I PR esetében, mint a HIV-1 PR-nál. Ezen eredmények a HTLV-I PR S1 zsebének flexibilisebb voltára utalnak. A modellünk is ezt támasztja alá: a Pro81 egy flexibilisebb Asn-ra cserélődött ki, a másik csere során pedig Trp került a régióba, amely az  $\alpha$  és  $\beta$  szénatomok közötti tengelyen szabadon elfordulhat, mivel ez az aminosav az enzim felszínén helyezkedik el. A Trp98 flexibilitására utal az is, hogy az általunk használt HTLV-I PR modellben a Trp98 az S1 zsebben befelé, még az S1' zsebben inkább kifelé fordul.

Az S1' zseb az S1 zsebez képest általánosan kisebb mérettel rendelkezik, ami a retrovirális proteinázok természetes hasítási helyeinek szekvenciájában is tükröződik. Kinetikai eredményeink azt mutatták, hogy ezen a zseben a HIV-1 PR esetében tekinthető flexibilisebbnek. Feltételezésünk szerint, ebben az esetben éppen ez a méretcsökkenés idézheti elő a Trp gátolt rotációját. A zsebet a HIV-1 PR esetében döntően hidrofób aminosav alkotják, a HTLV PR-

ban már megjelenik két Asn, de az eredményeink alapján úgy tűnik, hogy ez nem elegendő ahhoz, hogy a hidrofób kölcsönhatásoknál jóval specifikusabb hidrofil kölcsönhatások jöhessenek létre.

### **Kaspáz hasítási helyek foszforilációjának hatása a hasíthatóságára**

Bár a PS-2 kaspáz hasítási hely P1' és P3 Ser aminosavainak foszforilációját bizonyították, az irodalomban nincs közvetlen bizonyíték a meghatározott individuális helyzetű foszforiláció és a hasíthatóság összefüggésére. Vizsgálataink alapján a nem foszforilált peptid megfelelően hasadt kaspáz-3 és -7 enzimekkel, egyik enzim sem hasította viszont két helyen a szubsztrátot. Ennek oka valószínűleg az volt, hogy a peptid N-terminális irányából 2. helyen található aszpartát előtti peptidszakasz nem elegendő hosszú a hasítás számára, valamint ezen hasítási hely katalitikus rátája lényegesen alacsonyabb a másikonál. Kiemelendőnek tartjuk, hogy erre a peptidre lényegesen nagyobb  $K_M$  értéket mértünk, mint a PARP analógra.

A peptid P3 Ser és P1' Ser foszforilált módosításainál azt találtuk, hogy míg a P3 foszfoszerint tartalmazó peptidnél mindkét enzimmél hasonló specificitási állandókat kaptunk, a P1' Ser módosított peptideket egyik enzim sem hasította. Ugyanígy mindkét esetben a P3-foszfo-Ser tartalmú peptideknél szubsztrátgátlást tapasztaltunk, ami a foszforilált peptid nemproduktív kötődésére utal.

A kaspáz-8 nem hasította ezeket a peptideket. Mivel ez a kaspáz a kaspázok 3. csoportjába tartozik, amely csoport tagjai P4 helyzetben az elágazó láncú hidrofób oldalláncokat kedvelik, ezért kaspáz-8 enzimmal teszteltük ezen peptidek P4 Leu analógjait is. Bár a peptidek igen kis specificitási állandóval hasadtak, a kaspáz-8 esetében is a másik két kaspázra jellemző adatokat kaptuk, tehát az enzim érzékeny volt a P1' foszforilációra, ugyanakkor a P3 foszforilációra nem.

Megjegyzendő még, hogy a módosítatlan PS-2 szubsztrát esetében a kaspáz-3-ra kapott specificitási állandó jelentősen nagyobbak adódott, mint amit a kaspáz-7-re kaptunk, ami részben magyarázható azzal, hogy a kaspáz-3 jobban tolerálja a P2 Tyr oldalláncot, részben pedig azzal, hogy a kaspáz-3 kis szintetikus szubsztrátokon sokkal aktívabb mint a kaspáz-7.

Eredményeink értelmezéséhez felépítettük a kaspáz-3 PS-2 szubsztrát komplex modelljét egy enzim-inhibitor kristályszerkezetből kiindulva. A modellen, ugyanúgy mint a kristályszerkezetben a P3 és P2 oldalláncok kifelé állnak, amely magyarázza az S2 és S3 alzsebek toleráns jellegét, bár kaspázok P3 Glu és P2 Val, Leu, Pro és Thr preferenciáját már leírták. A nagyméretű P1' oldalláncok kevésbé hatékony hidrolízisét valószínűleg szterikus gát

okozza, amiért a Thr 166 és Tyr 204 enzimoldallancok, valamint az általában hidrofób szubsztrát P2 oldallánc lehet a felelős. Negatív töltésű aminosavak szintén kedvezőtlennek bizonyultak ebben a helyzetben, amit kaspáz-3 és -7 esetében a Glu123, kaspáz-8 enzimnél pedig az ekvivalens pozíciójú Asp okozhat. A P1' Ser foszforilációja megnöveli az oldalláncnak mind a negatív töltését, mind a méretét, ami végső soron a peptid hasíthatóságának elvesztésével jár.

A P4 Ser foszforiláció szerepének a tanulmányozásához a Gas-2, bizonyítottan kaspáz-3 szubsztrát fehérje hasítási hely szekvenciáján alapuló oligopeptideket használtunk. Bár a kaspáz-3 konszenzus szekvenciája Asp-X-Y-Asp, a Gas-2 szerint tartalmaz P4 helyen, ami potenciónalisán foszforilálható. A foszforilálatlan peptid a kaspáz-3 és -7 enzimek jó szubsztrátjának bizonyult, a P4 foszforiláció azonban jelentősen csökkentette mindkét enzim esetében a specificitási állandót, jelezve ezzel, hogy az aszpartáttal ellentétben a szintén töltött foszfo-Ser rendkívül kedvezőtlen, a töltetlen szerin oldalláncnál is kedvezőtlenebb ebben a pozícióban. A P4 oldallánc Asp-ra történő cseréje viszont megnövelte a hasíthatóságot az eredeti, a természetes hasítási helyet mimikáló peptidhez képest. A specificitási állandó értékei a kaspáz-3 és -7 enzimeknél hasonló tendencia szerint változtak, de ez a tendencia kifejezettebb volt a kaspáz-3 esetében. A kaspáz-8 egyik peptidet sem hasította.

Az enzim-inhibitor kristályszerkezet alapján a P4 Asp erős H-kötéseket képezhet a Trp214, Phe250, és gyengébbeket az Asn208 aminosavakkal. Úgy tűnik, hogy ezek a kölcsönhatások nem olyan hatékonyak, vagy egyáltalán nem képesek kisebb (Ser) vagy nagyobb (foszfo-Ser) oldalláncok koordinálására. Egy részletes specificitásvizsgálatban korábban bebizonyították, hogy a kaspáz-3 P4 Asp preferenciája szinte kizárólagos; kevésbé tolerálja mind az azonos töltésű glutamátot, mind az izosztérikus aszparagint. Vizsgálataink alapján a foszfo-Ser szintén igen kedvezőtlen a kaspáz-3 és kevésbé, de szintén kedvezőtlen a kaspáz-7 számára.

Mivel a kaspázok specificitása szempontjából a P1 Asp kitüntetett, kipróbáltuk, hogy egy ismertén jól hasadó, konszenzus kaspáz-3 szekvenciában található P1 Asp cseréje nem okoz-e szignifikáns változást a szubsztrát hasíthatóságában. A módosítatlan peptidet jól hasították a kaspáz-3 és -7 enzimek, a kaspáz-8-nak azonban gyenge szubsztrátjának bizonyult, amit a P4 Leu csere némileg javított. Várakozásainknak megfelelően egyik kaspáz sem hasította sem a foszfo-Ser, sem a Ser analógot. A jelenség és annak molekuláris magyarázata analógnak tűnik az S4-P4 kölcsönhatással, de megnyilvánulása sokkal kifejezettebb. A P1 aszpartátot az alábbi aminosavoldallancokkal való kölcsönhatás rögzíti az enzimhez: Arg64, Arg207 és Gln161. Ezek az aminosavak abszolút konzervatívák a

kaspázokban. Ennek a komplex H-híd, sóhíd hálózatnak köszönhetően sem az aszpartátnál kisebb, sem a nagyobb töltött aminosavak nem képesek kialakítani az enzimmel hatékony kölcsönhatásokat. Mutagenézis vizsgálataink szintén alátámasztják ezeknek az aminosavaknak esszenciális jellegét, mivel kaspáz-3 enzimek ezen aminosavak bármelyikének kis méretű töltetlen oldallácú aminosavra történő kicserélésével az expresszió során önmaga kihasítására képtelen, mutáns prokaspáz-3 enzimeket kaptunk.

## 5. ÖSSZEFOGLALÁS

A doktori értekezésemben felhasznált munkáim során alkalmam volt a retrovirális proteinázok HTLV-BLV csoportjába tartozó proteinázok fő képviselőinek (HTLV-I, BLV PR) előállítására, specificitásuknak egymással, illetve a HTLV-I PR specificitásának a HIV-1 PR-al történő összehasonlítására. Lehetőségem volt még a ciszteinil proteinázok egyik élettani szempontból igen fontos szereppel bíró családjának, a kaspázoknak három képviselőjével kísérleteket végezni a szubsztrát-foszforiláció és a hasíthatóság összefüggéseinek a vizsgálatára, valamint mutáns kaspáz-3 enzimek előállítására. Vizsgálataink a két enzimes család enzim-szubsztrát kölcsönhatásainak alapos megismerését szolgálták, miközben általános összefüggések felismerésére törekedtünk.

BLV PR előállítása érdekében a proteináz cDNS-t fúziós vektorba (pMal-c2) klónoztuk, amelyből expresszáltattuk és tisztítottuk. A tisztítás során kiderült, hogy az enzim képes saját aktív formájának a kialakítására, az előállítását szolgáló konstrukcióból önmaga kihasítására, mind N- és C-terminális irányból. Sikerült az enzimet inklúziós testekből kinyernünk, majd kationcserés és gélszűrési módszerrel homogénre tisztítanunk. Tárolás során további részleges önprocesszálást tapasztaltunk, ami azonban nem járt szignifikáns aktivitáscsökkenéssel. A HTLV-I és BLV proteinázok specificitás-összehasonlítása alapján arra következtethetünk, hogy a BLV PR szélesebb specificitással rendelkezik mint a HTLV-I PR, de a specificitásbeli különbség közöttük – a szubsztrátkötő régiót alkotó részben található homológiával arányosan - nagyobb, mint ami a HIV-1 és HIV-2 PR között tapasztalható.

A HTLV-I proteináz specificitásvizsgálatait a már számos egyéb retrovíruscsoport reprezentatív képviselőjének jellemzésére is felhasznált HIV-1 MA/CA peptidsorozattal kívántuk elvégezni, de a vizsgálatok során kiderült, hogy a HTLV-BLV csoport képviselőinek a többi retrovirális proteinázétól való eltérő szubsztrátspecificitása miatt más sorozatot kell választanunk. A HTLV-I és a HIV-1 proteinázok közötti különbségek részleteit az alábbiak

vonatkozásaiban a HTLV-I CA/NC peptidsorozattal tártuk fel. A vizsgálataink azt mutatták, hogy a HIV-1 proteináztól eltérően az S4 és S2 zsebek esetében döntően a hidrofób jellegű kölcsönhatások a meghatározóak, míg az S3, S1 és S1' zsebek specificitásában nagyobb a hasonlóság. A HIV-1 MA/CA hasítási helyhez hasonlóan úgy tűnik, hogy a HTLV-I CA/NC hasítási hely is evolúciósan az újonnan szintetizálódó poliproteinek gyors hasítására szelektálódott ki, mivel a szubsztituált szubsztrátok nagy része lényegesen lassabban hasadt mint a szubsztituálatlan analógok.

A kaszpáz specificitásvizsgálatainkat konkrét kérdéskörre szűkítettük, mivel az általános specificitásvizsgálatokat már korábban elkészítették. Ez a kérdéskör a foszforiláció volt, amely egy teljesen általános szabályozási mechanizmus. A foszforiláció proteolízisre kifejtett hatásának tanulmányozása a foszforilált aminosavak közvetlen szerepének feltárásával ritka az irodalomban. Számos esetben a foszfo-Ser mimikálása érdekében helyspecifikus mutagenezissel lecserélik a Ser oldalláncot aszpartátra és így próbálnak meg funkcionális következtetéseket levonni. Vizsgálataink bebizonyították, hogy legalábbis a kaszpázspecificitás tekintetében az Asp és a foszfo-Ser semmiképpen sem tekinthető ekvivalensnek: míg a kaszpáz-3, -7, -8 enzimek számára az Asp eszenciális a P1 pozícióban, és a P4 pozícióban is erősen preferált a kaszpáz-3 és -7 enzimek számára, a foszfo-Ser ugyanezen pozíciókban erősen csökkentette vagy teljesen meggátolta a hasíthatóságot. Ebből adódóan a P1' és P4 Ser oldalláncok foszforilációjának szabályozó szerepe lehet a fehérjék kaszpáz mediált lebontásában.

## KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

### Az értekezéshez felhasznált közlemények:

**Zahuczky, G.**, Boross, P., Bagossi, P., Emri, G., Copeland, T.D., Oroszlan, S., Louis, J.M. and Tózsér, J. (2000) Cloning of the bovine leukemia virus proteinase in *Escherichia coli* and comparison of its specificity to that of human T-cell leukemia virus proteinase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1478 (1): 1-8. I.F.: 2.112

Tózsér, 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 (20): 6287-6295. I.F.: 2.849

Tózsér, J., Bagossi, P., **Zahuczky, G.**, Specht, S.I., Majerova, E. and Copeland, T.D. (2003) Effect of caspase cleavage site phosphorylation on proteolysis. *Biochem. J.* [epub ahead of print] I.F.: 4.326

### Az értekezéshez kapcsolódó előadások és poszterek:

**Zahuczky, G.**, Bagossi, P., Oroszlan, S., Tózsér, J.. A HIV-1 és HTLV-I proteínázok szubsztrátspecifitásának és szubsztrátkötő helyeinek összehasonlítása. MBKE Molekuláris Biológiai Szakosztálya 3. Munkaértekezlete, Sárospatak, Május 11-14, 1998. (AP-16)

**Zahuczky, G.**, Oroszlan, S., Bagossi, P., Tózsér, J. (1998) Characterization of the specificity of HTLV-1 proteinase. 6th Cell- and Developmental Biology Meeting, Szeged, Hungary

Sperka, T., **Zahuczky, G.**, Boross, P., Emri, G., Oroszlan, S., Tózsér, J. A humán T-sejtes vírus és a marha leukémia vírus proteolitikus enzimjeinek jellemzése. MBKE Molekuláris Biológiai Szakosztálya 4. Munkaértekezlete, Eger, Május 10-13, 1999. (AP-13)

Tózsér, J., Sperka, T., Bagossi, P., **Zahuczky, G.**, Copeland, T.D., Oroszlan, S. and Louis, J.M. Characterization of the HTLV-1 proteinase. VIIIth International Aspartic Proteinase Conference, Funchal, Madeira, Portugal, Sep. 7-12, 1999.

Tózsér, J, Bagossi P, Sperka T, **Zahuczky G**, Louis, J.M., Copeland, T.D., Oroszlan, S., Harrison, R.W. and Weber, I.T. Characterization of the specificity of HTLV-1 and HIV-1 proteinases. Retroviruses, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA, May 23-28, 2000.

**Egyéb közlemények:**

Bagossi, P., **Zahuczky, G.**, Tózsér, J., Weber, I.T. and Harrison, R.W. (1999) Improved Parameters for Generating Partial Charges: Correlation with Observed Dipole Moments. J. Mol. Model., 5, 143 – 152. I.F.: 1.011