

A marha leukémia vírus proteáz jellemzése és összehasonlítása más retrovirális proteázokkal

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés

Sperka Tamás



Témavezető:
Prof. Dr. Tőzsér József

Debreceni Egyetem
Orvosi- és Egészségtudományi Centrum
Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet
Debrecen, 2007

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

Köszönöm Dr. Bagossi Péter és Dr. Boross Péter egyetemi adjunktus Uraknak, valamint Dr. Zahuczky Gábor tudományos munkatárs Úrnak a gyakorlati munkában nyújtott hasznos tanácsait.

Köszönöm kollegáimnak, Dr. Fehér Anitának, Dr. Kádas Jánosnak, Matúz Krisztinának és Miklóssy Gabriellának, hogy bármikor számíthattam rájuk.

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

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

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

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AIDS	szerzett immunhiányos szindróma
AMV	madár mieloblasztóma vírus
ATL	felnőtt T-sejtes leukémia
BLV	marha leukémia vírus
CA ¹	kapszid fehérje
Coomassie	<i>Coomassie Brilliant Blue 250</i> fehérje festék
CREB/ATF	cAMP válaszadó elem/aktiváló transzkripció faktor
Cyp A	ciklofilin A
DNS	dezoxi-ribonukleinsav
DTT	ditiotreitól
ECL	erősített kemilumineszcencia
EDTA	etilén-diamin-tetraacetát
EF-1 α	elongációs faktor-1 α
EIAV	ló vészes vérszegénységét okozó vírus
FIV	macska immundeficiencia vírus
GST	glutation-S-transzferáz
Gypsy	ecetmuslica retroelem
HAM	trópusi spasztikus mielopátia
HFV	humán foamy vírus
HIV	humán immundeficiencia vírus
HLA	humán leukocita antigén
HPLC	magas nyomású folyadékkromatográf
HTLV	humán T-sejtes leukémia vírus
IN ¹	integráz
IPTG	izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid
K _i	gátlási állandó
k _{kat}	katalitikus hatékonyság
K _M	Michaelis állandó
MA ¹	mátrix fehérje
MBP	maltóz-kötő fehérje
MMLV	Moloney egér leukémia vírus
MMTV	egér emlőtumor leukémia vírus
MPMV	Mason-Pfizer majom vírus
mRNS	hírvivő ribonukleinsav

NC ¹	nukleokapszid fehérje
Nef	HIV-re jellemző szabályozó fehérje
NF-κB	nukleáris faktor-κB
NMR	mágneses magrezonancia
P1, P2, P3, stb. ²	szubsztrát aminosavrészei
PCR	polimeráz láncreakció
PDB	fehérje adatbázis
PIC	preintegrációs komplex
PMSF	fenil-metil-szulfonil-fluorid
PVDF	polivinilidénfluorid
PR ¹	retrovirális proteáz
RNáz H	ribonukleáz H
RNS	ribonukleinsav
RMS	eltérések négyzetei átlagának négyzetgyöke
RP	fordított-fázisú
RSV	Rous szarkóma vírus
RT ¹	reverz transzkriptáz
S1, S2, S3, stb. ²	enzim szubsztrátkötő helyei
SDS	nátrium dodecil szulfát
SIV	majom immundeficiencia vírus
STLV	majom T-sejtes leukémia vírus
SU ¹	felületi fehérje
TFA	trifluor-ecetsav
TM ¹	transzmembrán fehérje
TSP	trópusi spasztikus paraparézis
Ty	élesztőgomba retroelem
Vpr	HIV-re jellemző szabályozó fehérje
WDSV	süllő bőr szarkóma 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	7
1.1.	A RETROVÍRUSOK	7
1.2.	A RETROVÍRUSOK ÉLETCIKLUSA	8
1.3.	A MARHA LEUKÉMIA VÍRUS (BLV)	12
1.4.	A RETROVIRÁLIS PROTEÁZOK (PR)	13
2.	CÉLKITŰZÉS	17
3.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	19
3.1.	RETROVIRÁLIS PROTEÁZOK	19
3.2.	SZINTETIKUS OLIGOPEPTID SZUBSZTRÁTOK	19
3.3.	ENZIMAKTIVITÁSOK MÉRÉSE ÉS A KINETIKAI ÁLLANDÓK MEGHATÁROZÁSA	19
3.4.	A BLV PROTEÁZ MUTAGENEZISE ÉS A MUTÁNS ENZIMEK ÖNPROCESSZÁLÓ ÉS FOLDING KÉPESSÉGÉNEK VIZSGÁLATA	21
3.5.	GÁTOLHATÓSÁGI VIZSGÁLATOK	22
3.6.	MOLEKULÁRIS MODELLEZÉS	22
4.	EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS	25
4.1.	A BLV PROTEÁZ JELLEMZÉSE ÉS ÖSSZEHASONLÍTÁSA A HTLV-1 ÉS HIV-1 PROTEÁZOKKAL	25
4.1.1.	<i>A BLV PR szerkezeti modellje</i>	25
4.1.2.	<i>A BLV PR szubsztrátspecifitásának vizsgálata retrovírusokban előforduló természetes hasítási helyeket tartalmazó oligopeptid szubsztrátokkal</i>	28
4.1.3.	<i>A BLV PR jellemzése HTLV-1 CA/NC hasítási helyen alapuló oligopeptid szubsztrátsorozattal végzett kísérletek segítségével</i>	31
4.1.3.1.	A BLV PR szubsztrátkötő helyének kiterjedése	31
4.1.3.2.	A BLV PR S4 kötőhelyének jellemzése	32
4.1.3.3.	A BLV PR S3 kötőhelyének jellemzése	33
4.1.3.4.	A BLV PR S2 kötőhelyének jellemzése	34
4.1.3.5.	A BLV PR S1 kötőhelyének jellemzése	37
4.1.3.6.	A BLV PR S1' kötőhelyének jellemzése	38
4.1.4.	<i>A BLV PR szubsztrátkötő helyeit érintő mutációk hatása</i>	40
4.1.5.	<i>A BLV PR gátolhatósági profilja</i>	46

4.2.	TIZENEGY KÜLÖNBÖZŐ RETROVIRÁLIS PROTEÁZ S2 SZUBSZTRÁTKÖTŐ HELYEINEK ÖSSZEHASONLÍTÓ VIZSGÁLATA	48
4.2.1.	<i>Relatív enzimaktivitások meghatározása és összehasonlítása, P2 pozícióban aminosavcseréket tartalmazó, 1-es típusú természetes hasítási helyet reprezentáló oligopeptid szubsztráton</i>	48
4.2.2.	<i>Az S2 szubsztrátkötő helyek homológ modelljeinek felépítése és a mért enzimaktivitások molekuláris szintű értelmezése</i>	50
4.2.3.	<i>1-es típusú természetes hasítási hely szekvenciák P2 pozíciójában megjelenő aminosavrészek vizsgálata</i>	53
5.	ÖSSZEFOGLALÁS	56
6.	IRODALOMJEGYZÉK	58
7.	KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA	68

1. BEVEZETÉS

1.1. A RETROVÍRUSOK

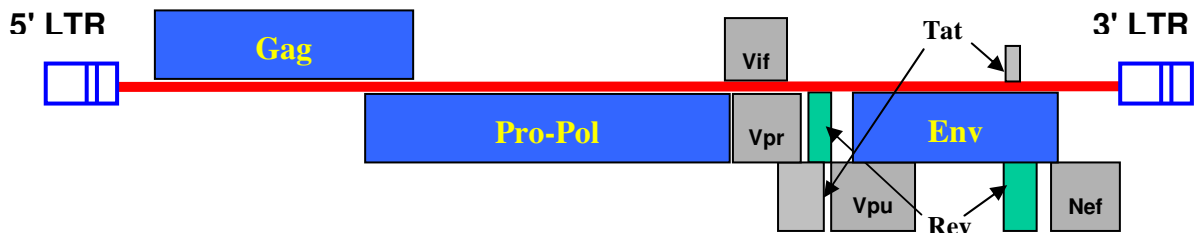
A retrovírusok létezése már a múlt század elején ismert volt, azonban a humán T-sejtes leukémia vírus (HTLV) és a humán immunodeficiencia vírus (HIV) felfedezéséig nem tudtak olyan retrovírusról, amely az embert is megfertőzheti. Kutatásuk az elmúlt két évtizedben az AIDS (Gallo és Montagnier, 1988) megjelenésének és rohamos elterjedésének következtében került előtérbe. Ma már bizonyított, hogy retrovírussal történő fertőzés a gerincesek bármely osztályában előfordulhat, melynek kimenetele sokféle lehet: betegség nélküli virémia, daganatképződés, idegrendszeri elváltozások, anémia vagy immunhiány.

A retrovírusok burokkal rendelkező, pozitív szálú diploid RNS genomot tartalmazó vírusok nagy és szerteágazó családot képviselnek, amely családot általános rendszertani tulajdonságokkal jellemzünk: felépítés, összetétel, szaporodási tulajdonságok (Coffin 1992, 1996). A vírusrészecskék átmérője általánosan 80-100 nm között változik, külső lipid burkukban virális glikoproteinek találhatóak. A belső nukleoprotein „mag” alakja és elhelyezkedése a család különböző fajaiban eltérő. A vírusrészecske RNS átlagosan 7-12 kilobázis nagyságú, mindig diploid, lineáris, nem osztott és pozitív lefutású. A családba tartozó fajok replikációs sajátossága, hogy az DNS intermedieren keresztül történik, amely a fertőzött sejt genomjába beépül.

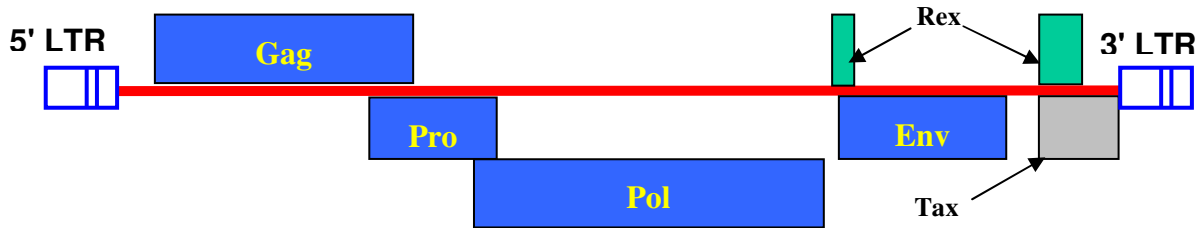
A virális genom szerveződése szerint két csoportra: egyszerű és összetett retrovírusokra osztjuk őket (Coffin, 1992; Murphy és mtsai., 1994). Minden retrovírus legalább három poliproteint kódoló gént tartalmaz: *gag*, melyen a vírusrészecske mátrix (MA), kapszid (CA) és nukleokapszid (NC) fehérjék genetikai információi helyezkednek el; *pol*, mely az integráz (IN), reverz transzkriptáz (RT) és ribonukleáz H (RNáz H) enzimeket kódolja és az *env*, mely a burokkfehérje transzmembrán (TM) és felszíni részének (SU) információit hordozza. Egy járulékos, kisebb *pro* gén is megtalálható minden retrovírusban, amely a vírusrészecske proteáz (PR) enzimét kódolja. Az egyszerű retrovírusok általában csak ezeket az alapvető információkat, míg az összetett retrovírusok más járulékos, regulációs fehérjéket is kódolnak (1.1.1 ábra).

Evolúciós rokonságokat figyelembe véve hét csoportra, rendszertanilag nemzetségre osztjuk a retrovírusokat. Öt csoport jeleníti meg az onkogén hatással is bíró vírusokat, a maradék két csoport egyike a *Lentivirus* nemzetség, melynek képviselője a HIV-1 is (Coffin és mtsai., 1997).

A



B

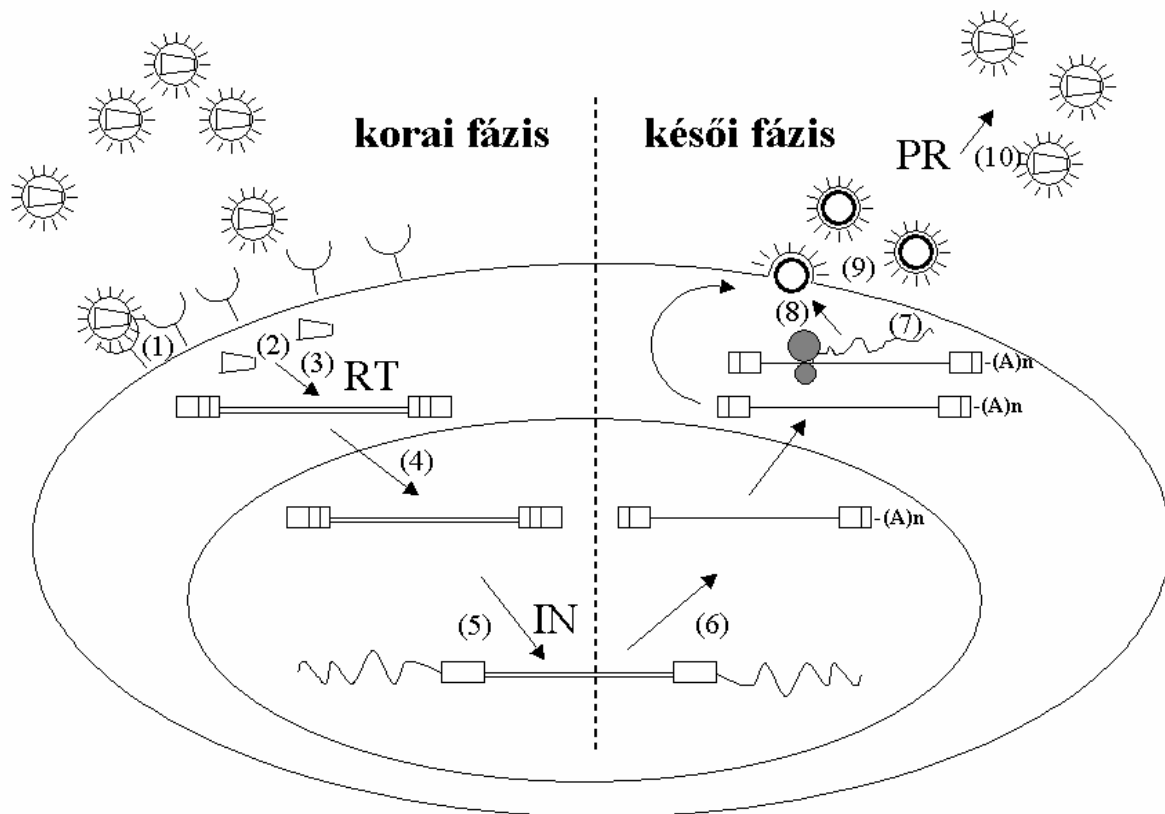


1.1.1. ábra: Retrovírus genomok vázlatos szerkezete.

A különböző leolvasási keretekben szintetizálódó poliproteinek (kék) és regulációs fehérjék (szürke, illetve zöld). A: HIV-1 provirális DNS; B: BLV provirális DNS.

1.2. A RETROVÍRUSOK ÉLETCIKLUSA

A vírus receptor-mediált endocitózissal vagy direkt membránfúzióval juthat be a gazdasejtbe (1.2.1. ábra). A genom-RNS pozitív szálú és szabályos, eukarióta sejtre jellemző mRNS szerkezetet mutat, de közvetlen fehérjeszintézishez mégsem ez használódik fel. A sejtbe bejutó vírus RNS-ét a reverz transzkriptáz (RT) átírja DNS-sé. A reverz transzkripció valószínűleg a citoplazmában, a vírus "mag" struktúrában megy végbe (Varmus és Brown, 1989). Egyes adatok szerint a PR szerepet játszhat ebben a fázisban.



1.2.1. ábra: A retrovírusok életciklusa (Tőzsér, 2001 alapján).

(1) Kötődés-penetráció: receptor-antireceptor kölcsönhatás. Endocitózis vagy direkt fúzió. (2) A vírusburok elvesztése, pH-függő vagy pH-független úton. (3) Provirális DNS szintézis, melyért a RT felelős. (4) A preintegrációs komplex bejutása a magba. (5) Integráció az IN segítségével. (6) Provírus expressziója. (7) Transzláció. (8) Vírusrészcseke összerendeződése. (9) Vírusrészcseke lefűződése. (10) A vírusrészcseke “érése” a PR segítségével.

Az újonnan képződő DNS-nukleoprotein komplex bekerül a sejtmagba, ahol a vírus DNS a gazdasejt genomjába beépül (provírus képződés). A provirális DNS a celluláris RNS polimeráz II segítségével átíródik RNS-sé. Az egyláncú, diploid RNS genom minden szaporodni képes retrovírusban legalább 4 gént (5'-*gag-pol-pro-env*-3') tartalmaz. Az emlős C-típusú retrovírusok (pl.: MMLV) *gag* és *pol* génjei stop-kodonnal (AUG) vannak elválasztva, mely transzláció során néha néma marad (Yoshinaka és mtsai., 1985). A többi ismert nukleotidszekvenciájú retrovírusban a *gag* és *pol* gén különböző leolvasási keretben van kódolva. A Pol fehérjék a leolvasási keret -1 irányú eltolódásával szintetizálódnak (pl. HIV-1) vagy két eltolódás is van, ebben az esetben a *gag* és a *pol* gének között van a *pro* gén (pl. BLV, HTLV). A PR kódolása többféleképpen történhet. A PR, a madár C-típusú vírusai (pl. RSV) kivételével, a *pro* vagy a *pol* génen van kódolva és a szerkezeti fehérjékhez képest

csak lényegesen kisebb mennyiségben (5-10%) szintetizálódik. Egy kisebb, illesztett mRNS-ről írónak át az *env*-kódolt fehérjék, melyek előbb glikozilálódnak, majd a plazmamembránba vezető útjuk során egy felületi glikoproteinre (SU) és egy transzmembrán fehérjére (TM) hasadnak egy celluláris proteáz hatására (1.1.1. és 1.2.2. ábra).

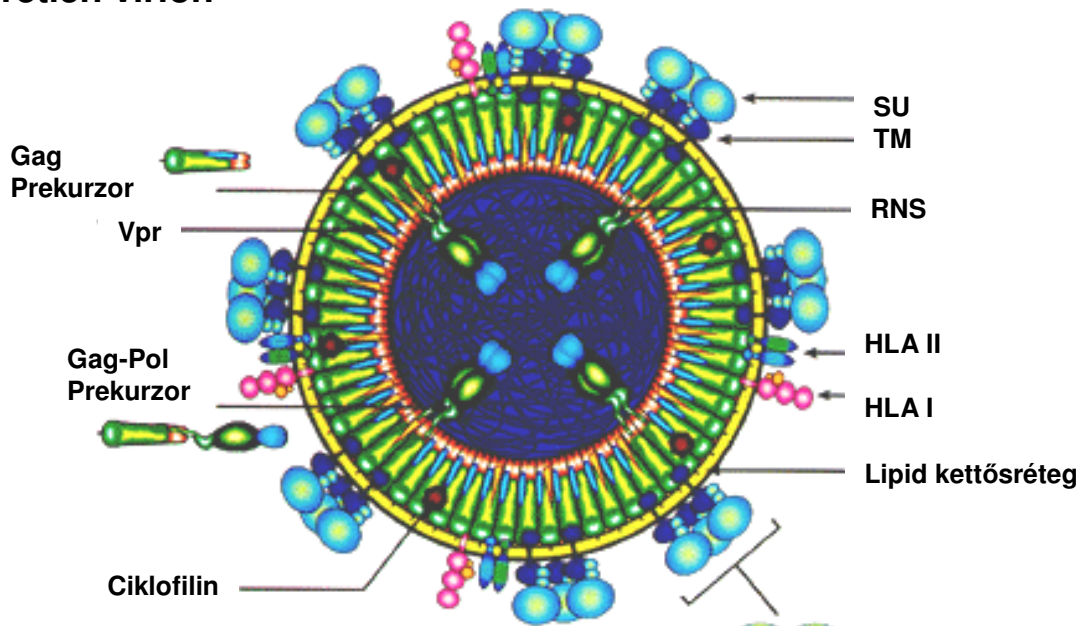
A transláció elsődleges termékeként szintetizálódó Gag és Gag-Pro-Pol poliproteinek a gazdasejt membránjának Env fehérjében koncentrált részein, a membrán belső felületénél csoportosulnak. A genom mRNS-sel egy toroidszerű "éretlen" részecskévé formálódnak, melyet a vírusburok zár be. A vírus a sejtből kikerül ("lefűződés" révén), majd a proteáz aktiválódik és elhasítja a poliproteineket, aminek során a vírus "éretté", fertőzőképesé válik. Ezen átalakulás morfológiailag is jól nyomon követhető (Yoshinaka és Luftig, 1977, 1.2.2. ábra). A proteáz funkció nélkül a vírusrészecske éretlen marad, és a működőképes fehérjék hiányából adódóan nem lesz képes újabb sejtek fertőzésére.

Miközben a vírus által kódolt PR szerepe a késői fázisban jól feltárt, addig a korai fázisban betöltött szerepéről keveset tudunk. Először a ló vészes vérszegénységét okozó vírus (EIAV), majd a HIV esetében is bizonyossá vált, hogy a PR a „mag” struktúra része, amely a sejtbe lép (Roberts és Oroszlan, 1989; Welker és mtsai., 2000). Mind a receptor-mediált endocitózis, mind a makropinocitózis útján belépő „mag” olyan savas környezetbe kerül, melynek pH-ja kedvező a PR működése szempontjából. A „mag” struktúra mozgása a sejtmag irányába kapcsolatot igényel a sejt aktin filamentumaival (Bukrinskaya és mtsai., 1998), ezért valószínűsíthető, hogy az aktin komponenseinek proteolitikus hasítása fontos lépés ebben a folyamatban.

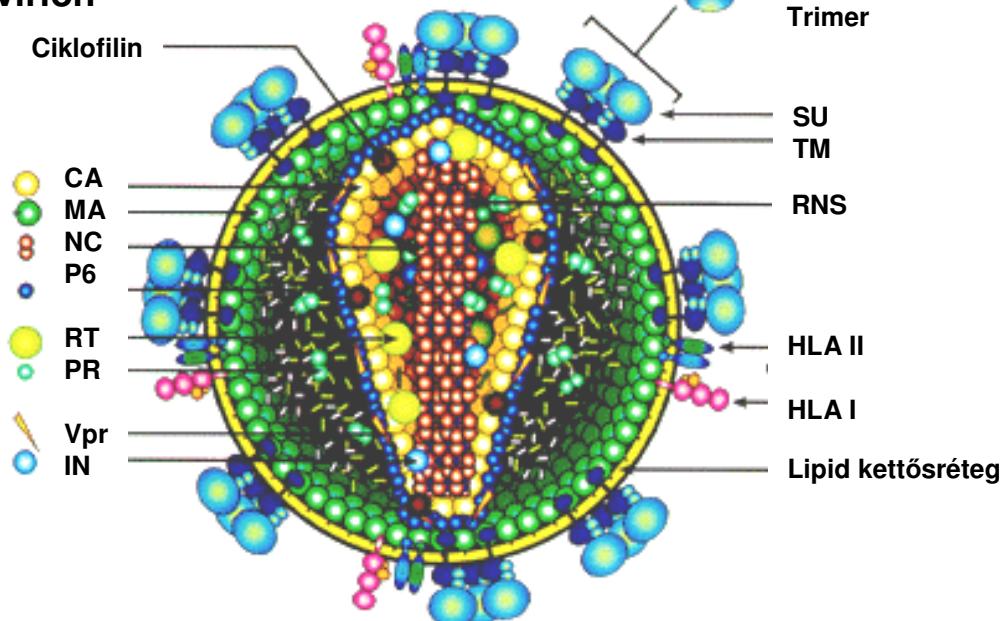
Celluláris proteineket szintén kimutattak a vírusrészecskében (1.2.2. ábra) (összefoglaló irodalom: Ott, 2002). Ilyen volt például a celluláris peptidil-prolil izomeráz, a ciklofilin A (Cyp A), mely a kapszidhoz kötötten kerül a vírusrészecskébe, és jelenléte növeli a fertőzőképességet (Franke és mtsai., 1994; Thali és mtsai., 1994). Aktint és különböző aktin kötött fehérjéket szintén kimutattak. A sejtbe történő belépés után ezen fehérjék sorsa nem tisztázott, de nagyrészüket már a vírusrészecskében feldarabolódik.

A „mag” más fehérjéi mellett a HIV-1 RT, az RNáz H és a Nef is szerepel a HIV-1 PR szubsztrátjai között (Tomasselli és mtsai., 1993; Welker és mtsai., 1996, 2000). Emellett a PR maga is végigmegy egy öndegradációs folyamaton (Mildner és mtsai., 1994), miközben a Vpr sértetlen marad a kapszidban (Welker és mtsai., 2000).

Éretlen virion



Érett virion



- Processzált peptidek a CA és NC között,
- NC és p6 között,
- Valamint a PR-től disztálisan.

1.2.2. ábra: Modellek a retrovírusok felépítésére.

Az éretlen HIV-1 vírusrészecske (fent). A Gag és Gag-Pol poliproteineket különböző színek jelölik, érzékelte azt, hogy a domének megfelelnek az ezekből az előformákból kialakuló „érett” proteineknek. Az Env fehérje SU és TM komponense kiemelkedik a lipid membránból, akárcsak az elkülönülten beépülő HLA „gazda” fehérjék. A ciklofilin szintén celluláris proteinként vesz részt a vírusrészecske felépítésében. Az érett HIV-1 vírusrészecske (lent). A kúp-alakú „mag” jellemző erre a nemzetségre nézve. A Vpr a HIV-re jellemző járulékos fehérje. (Coffin és mtsai., 1997).

1.3. A MARHA LEUKÉMIA VÍRUS (BLV)

A marha leukémia vírus (BLV) és a (HTLV) a csoport harmadik tagjával, a majom T-sejtes leukémia vírussal (STLV) együtt, egy külön csoportot alkot az onkogén hatású vírusok között, az úgynevezett HTLV-BLV csoportot. A csoport tulajdonságai részben eltérnek a többi retrovírusétól, a csoporton belül viszont meglehetősen nagy a hasonlóság. Ilyen eltérés például az, hogy ezek a vírusok a sejtimortalizációt nem a promóter régióba beékelődve vagy onkogén szekvenciát kódolva hozzák létre. Tumort kiváltó hatásuk még nem teljesen ismert, valószínűleg többféle folyamat is közrejátszik benne (Cann és Chen, 1990; Haas és mtsai., 1992). Annyi bizonyos, hogy a vírus által kódolt transz-aktivátor Tax (1.1.1. ábra) protein számos celluláris gén expressziójának és funkciójának szabályozásával fontos szerepet játszik ebben a folyamatban. A Tax képes számos celluláris jelátviteli útvonalba beavatkozni, ilyenek például a CREB/ATF és NF- κ B (Jeang, 2001), de ismert apoptózist indukáló képessége is (Yamada és mtsai., 1994). A HTLV-1 emberben felnőtt T-sejtes leukémiát (ATL), trópusi spasztikus paraparézist/mielopátiát (TSP/HAM) okozhat. A HTLV-2 „szőrös” sejtes (hairy cell) leukémiát hozhat létre, míg a BLV szarvasmarhában okoz limfoszarkómát, de az előbbiekkal ellentétben a B-limfocitákat támadja meg (Johnson és mtsai., 2001). Eltérően a többi retrovírustól, az e csoportba tartozó vírusok enzimfehérjéi egyszeres (PR) és kettős (RT, IN) leolvasási kereteltolódással szintetizálódnak.

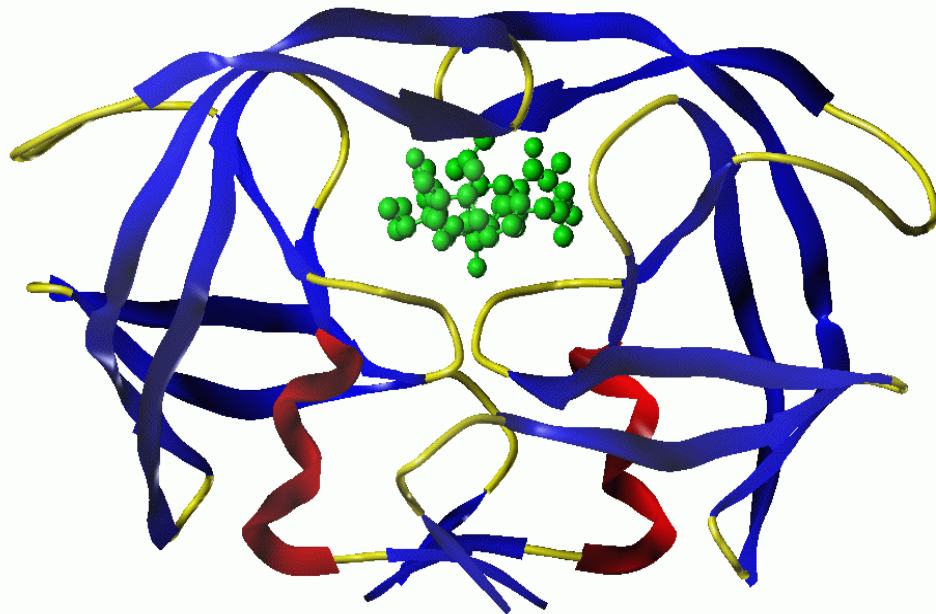
A marha leukémia vírust fontos modellnek tartják a humán T-sejtes leukémia vírus működésének megértése és az ellene való védekezés lehetőségeinek vizsgálata szempontjából (Willems és mtsai., 2000). BLV fertőzött nyulak modellrendszerként szolgálhatnak limfotróp retrovírusok elleni oltóanyagok kifejlesztésében (Altanerova és mtsai., 2004). A HTLV-1 PR, csakúgy, mint a HIV-1 PR, kemoterápiás célpont, különösen a trópusi spasztikus paraparézis esetében, ahol az aktív replikációnak szerepet tulajdonítanak a betegség kifejlődésében (Sheremata és mtsai., 1993). A fertőző BLV klón elérhetősége szarvasmarha és juh modellekkel együtt, kiváló lehetőséget teremt HTLV-1 ellenes kezelések tervezéséhez. Ennél fogva hasznos meghatározni a BLV nyújtotta modell alkalmazhatóságának fokát *in vivo* rendszerekben, proteáz gátlószereket használva. Mindezekén túl, bár általánosan elfogadott, hogy a BLV emberben nem fertőz, nem szaporodik és nem járul hozzá daganat kifejlődéséhez; a közelmúltban immunológiai csúcstechnikákat alkalmazva azt találták, hogy BLV ellen reagáló antitestek gyakran előfordulnak humán plazmában, hangsúlyozva a további tanulmányok fontosságát (Buehring és mtsai., 2003).

1.4. A RETROVIRÁLIS PROTEÁZOK

Minden fertőzőképes retrovírus kódol egy proteázt (PR), mely része a Gag vagy Gag-Pol poliproteinnek. A PR meghatározott helyeken hasítja a virális poliproteineket, azoktól eltérő működőképes fehérjéket eredményezve, ezzel kialakítva egy tömör „mag” struktúrát az érett vírusrészecske számára. A fertőzés korai fázisában feltehetően részt vesz a preintegrációs komplex kialakításában. A proteáz funkciója tehát több szempontból is alapvető a vírus számára.

Számos retrovirális proteáz szekvenciája ismert. Általában 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 klasszikus celluláris aszpartil proteázoktól (renin, pepszin) eltérően - melyek két topológiailag hasonló, de mégsem teljesen egyforma domént hordozó egyláncú molekulák - a retrovirális proteázok két egyforma alegységből felépülő, dimerként működő enzimek.

A retrovirális proteázok elsődleges és másodlagos szerkezete a celluláris aszpartil proteázok egyik doménjével analóg (Toh és mtsai, 1985), számos β -redőt, hurkot 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 (1.4.1. ábra).



1.4.1. ábra: A HIV-1 proteáz kristályszerkezet alapján készült szalagmodellje.

Pirossal az α -helixeket, kézzel a β -redőket, sárgával a hurkok régiókat jelöltük. A bekötődött szubsztátot zöld színnel, gömb és pálcika ábrázolással mutatjuk be.

A konzervált régiók közül az N-terminálishoz közel helyezkedik el az aktív centrumot kódoló katalitikus triád (Asp-Thr/Ser-Gly). Az alegységek katalitikus triádjai hurkot alkotnak, amely analóg a celluláris aszpartil proteázokra leírt ψ -struktúrával. Az ezt felépítő aminosavak konformációja minden ismert kristályszerkezetben azonos (Wlodawer és Gustchina, 2000). A katalitikus tripletek hidrogénkötések hálózatán keresztül, jellemző módon kapcsolódnak egymáshoz (Davies., 1990; Wlodawer és Erickson, 1993), amit a kötés térszerkezetére és igen erős jellegére utalva tűzoltófogásnak (*fireman's grip*) neveznek. Egy másik többé-kevésbé konzervatív régió a mozgékony *flap* régió (Miller és mtsai., 1989; Navia és mtsai., 1989), mely a szubsztrát illetve inhibitor kötődésekor elmozdul és ráhajlik a ligandra, majd azzal számos kölcsönhatást alakít ki, melyekkel stabilizálja a komplexet (Miller és mtsai., 1989; Swain és mtsai, 1990; Jaskolski és mtsai, 1991). A harmadik konzervatív régió (Gly-Arg-Asp/Asn) a C-terminális közelében helyezkedik el és ionpárok kialakításával a dimerizációban játszik fontos szerepet (1.4.2. ábra).

A retrovirális proteázok pH optimuma savas (pH 5-6), részletes biokémiai jellemzésüket oligopeptid és poliprotein szubsztrátokon végezték (Dunn és mtsai, 1994; Tomasselli és Henrikson, 1994). A hasítás poliprotein szubsztrátoknál alacsony, oligopeptidok esetében viszont magas (2-3 M NaCl) ionerősség mellett hatékonyabb (Kotler és mtsai, 1989; Wondrak és mtsai, 1991; Szeltner és mtsai, 1996). A különböző retrovirális hasítási helyeket reprezentáló oligopeptid szubsztrátok hidrolízise jól nyomon követhető HPLC technikával, megfelelően módosított szubsztrátok alkalmazása esetén pedig spektroszkópiásan vagy fluorimetriásan is. A peptidkötő régió eléggé kiterjedt, a hatékony hidrolízishez proteáztól függően minimálisan 6-7 tagú peptidszakasznak kell nyújtott β -redő konformációban az enzimhez kötődnie (Tözsér és mtsai, 1991a; Weber és mtsai, 1993). A kapcsolódó szubsztrát oldalláncai számára elkülöníthető 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 nem teljes.

A retrovirális proteázok természetes hasítási helyein található aminosavak többnyire hidrofób karakterűek, viszont általánosan érvényes konszenzus szekvencia nem adható meg (Oroszlan és Tözsér, 1990). Jelenleg a retrovirális proteáz hasítási helyeket két csoportra osztjuk (Pettit et al., 1991; Griffiths et al., 1992; Tözsér et al., 1992). Az 1-es típusú hasítási hely P1 pozícióban aromás, P1' pozícióban Pro aminosavrészt tartalmaz, míg a 2-es típusú hidrofób oldalláncúakat (kivéve Pro). A P2 és P2' hely meghatározónak mutatkozik a specificitás kialakításában (Griffiths et al., 1992; Tözsér et al., 1992). A főemlős lentivírusok (mint pl. a

HIV-1) 1-es típusú szekvenciái P2 helyen Asn, P2' helyen pedig béta-elágazó hidrofób (Val vagy Ile) oldalláncú aminosavrészeket tartalmaznak, miközben a 2-es típusúak P2 pozícióban rendszerint béta-elágazót. Az 1-es típusú hasítási hely számos okból kifolyólag nagyon fontos. A pepszintől eltekintve, nincs olyan proteáz, melynél a szubsztrát Pro aminosavrésze imino oldalon szerepelne. A Pro aminosavréz, különösen, ha Tyr vagy Phe után következik a szekvenciában (mint az 1-es típusú hasítási helyeknél), valamelyest nagyobb valószínűséggel jelenik meg a megelőző peptidkötéssel cisz helyzetben, mint transzban (MacArthur és Thornton, 1991). A HIV-1 PR konformációs szelektivitása a hasított peptidkötés transz izomerének irányába mutat, ahogyan ezt NMR és kinetikai vizsgálatok bizonyították (McCornack és mtsai., 1997; Vance és mtsai., 1997).

A proteáz aktiválódása, és egyben a poliproteinek hasítása a vírusrészecskében a proteáz N-terminálisának hidrolízisével veszi kezdetét, és ebben valószínűleg több tényező játszik szerepet. A dimerizáció előfeltétele a proteolitikus aktivációnak (Babe és Craik, 1997). Az, hogy a processzási folyamat nem indul meg a Gag poliproteinek oligomerizációjával egy időben, arra utal, hogy léteznek egyéb regulációs tényezők is. Az aktiváció késleltetéséért felelős mechanizmusra vonatkozó újabb elképzelések szerint a szabályozásban fontos lehet a dimerizációs felszínen lévő kéntartalmú aminosavak reverzibilis oxidatív módosítása (Davis és mtsai., 2003).

	1	10	20	30	40	50	
HIV1PQITLW..	QRPLVTIRIG.....	GOLKEALL	DTG	ADDTVLEE..M..N..LPGKWK..PKM	IGGIGG	FIKVRQY
HIV2PQFSLW..	KRPVVTAHIE.....	GQPVEVLL	DTG	ADDSIVAG..I..E..LGNNYS..PKI	VGGIGG	FINTKEY
SIVPQFSLW..	RRPVVTAHIE.....	GQPVEVLL	DTG	ADDSIVTG..I..E..LGPHYT..PKI	VGGIGG	FINTKEY
EIAVVTYNLE..	KRPTTIVLIN.....	DTPLNVLL	DTG	ADTSVLTTAHYNRLKYRGRKYQ..GTG	IGGVGG	NVETFST
FIVYNKVGTTTTLE..	KRPEILIFVN.....	GYPKIFLL	DTG	ADITILNRRDFQ.VKN.SIENG..RQN	MIGVGG	GKRGTNY
RSVLAMTMEHKDRPLVRVILTNTGSHPVKQORSVYITALL			DSG	ADITIISEEDWP...TDWPVMEANPQ	IHGIGG	GIPMRKS
MMTVWVQEISD.SRPMLHISL.....	NGRRFLGLL	DTG	ADKTCIAGRDPW...ANWPIHQTESSL	OGLVGM	ACGVARS	
MPMVWVQPITC.QKPSLTLWL.....	DDKMFTGLI	DTG	ADVTIIKLEDWP...PNWPITDTLTN	LRGIGQ	SNNPKQS	
HFVMNPLQLL.....	QPLPAEIK.....	GTKLLAHW	DSG	ATITCIPESFLEDEQP..I..K..KTL	IKTIHG	EKQONVY
HTLV1PVIPLDPARRPVIKAQVDTQTSHP....	KTIEALL	DTG	ADMTVLPIALFS....SNTPLK..NTS	VLGAGG	QTQDHFK	
BLVLSIPLA.RSRPSVAVYLSGPWLQP...	SQNQALMLV	DTG	AENTVLPQNWLV....RDYPRI..PAA	VLGAGG	VSRNRYN	
MLLVTLDDQGGQGDPP..	PEPRITLKV.....	GQPVTFV	DTG	AQHSVLTQ..N..P..GPLSDK..SAW	VQGATG	GKRYRWT
WDSV	PIDCPYEKSGTKTTQDVITTKNAEIMVTVN.....	HTKIPMLV	DTG	ACLTAIAGGAATVVP.DLKLNT..EII	AVGISA	EPVPHVL	
	60	70	80	90			
HIV1	..DQIPVEICG.....	HKAIGTVLVG....	PTPVNII	GRN	LLTQIGCTLNF.....		
HIV2	..KNVEIEVLN.....	KKVRATIMTG....	DTPINIF	GRN	ILTALGMSLNL.....		
SIV	..KNVEIEVLG.....	KRIKGTIMTG....	DTPINIF	GRN	ILTALGMSLNL.....		
EIAV	..P.VTIKKKG.....	RHIKTRMLVA....	DIPVTIL	GRD	ILQDLGAKLVL.....		
FIV	..INVHLEIRDENYKT.QCIFGNVCVL.EDNSLIQPLL			GRD	NMIKFNIRLVMAQ.....		
RSV	.RDMIELGVINRDGSLERPLLLFPAVA....	MVRGSIL	GRD	CLOGLGLRLTNL.....			
MMTV	.SQPLRWQH.ED.KSGIHPFVIPTL.....	PFTLW	GRD	IMKEILVRLMTDSPDSDL.....			
MPMV	.SKYLTWRDKENN.SGLIKPFVIPNL.....	PVNLW	GRD	LLSQMKIMMCS.....			
HFV	.YVTFKVKGRKVE....	AEVIASPYEYILLSPTDVPWL	TQQ	PLQLTILVPLQYQEKILSKTALPEDQKQ			
HTLV1	.LTSPLVLRIRLPFRT.TPIVLTSLV...DTKNNWAI		GRD	ALQCCQGVLYLPEAKGPPVIL.....			
BLV	.WLOGPLTLALKPEG.PFITIPKILV...DTFDKWQIL		GRD	VLSRLQASISIPEEVRPPMVG.....			
MLLV	..TDRKVHLAT.....	GKVTHSFLHV...PDCPYPLL	GRD	LLTKLKAQIHFEQSGAQVMGPMGQPLQVL			
WDSV	.AKPTKIQIEN.....	TNIDISPWYN...PDQTFHIL	GRD	TLSKMRAIVSFEKNGEMTVLLPPTYHKQL			

1.4.2. ábra: A retrovirális proteázok szekvenciaösszehasonlítása (sárga háttérrel, keretben: a retrovirális proteázok konzervált régiói; piros: katalitikus aszpartát).

2. CÉLKITŰZÉS

A retrovirális proteázok (így a HIV-1 PR, HTLV-1 PR) kemoterápiás célpontok. Emellett azt is tudjuk, hogy a HIV-1 proteázban rezisztencia kialakulása során létrejövő mutációk számos esetben olyan aminosavak megjelenését jelentik, amelyek megfelelnek más retrovirális proteázokban hasonló helyen található aminosavrészeknek (Louis és mtsai., 1998). Ezért különböző retrovirális proteázok működésének és specificitásának megismerése segíthet hatásos inhibitorok tervezésében, melyek a gyógyszeres kezelésnek ellenálló mutáns HIV-1 PR formák ellen is hatékonyak. Számos retrovirus proteolitikus enzimének (HIV-1, HIV-2, SIV, RSV, FIV, és EIAV) három-dimenziós szerkezete már ismert (Wlodawer és Gutschina, 2000), utolsóként a HTLV-1 kristályszerkezetét határozták meg (Li és mtsai., 2005). A HIV-1, FIV és EIAV PR számítógépes modelljeinek összevetése a később meghatározott kristályszerkezetekkel igazolta, hogy a molekuláris modellezés igen jó közelítéssel írja le az enzimek szubsztrátkötő helyeit (Weber, 1991; Wlodawer és mtsai., 1995; Gutschina és mtsai., 1996). Ezért kristályszerkezet hiányában a retrovirális fehérjebontó enzimek molekuláris modellezése fontos és eredményes eszköz lehet működésük megértéséhez.

A marha leukémia vírus értékes modell-rendszere a HTLV-1-nek (Willems és mtsai., 2000). Már elérhető fertőzőképes BLV klón (Altanerova és mtsai., 2004), amely a kidolgozott állatkísérletes rendszerekkel együtt segítséget nyújthat HTLV-1 ellenes módszerek kifejlesztéséhez. Mindazonáltal, a BLV proteáz részletes és összehasonlító szubsztrátspecificitás és gátlhatóság vizsgálata ezidáig nem készült el. Ennek megvalósítása érdekében célul tűztük ki a BLV PR molekuláris modelljének felépítését, specificitásának részletes jellemzését természetes hasítási helyeket reprezentáló oligopeptid szubsztrátok, a HTLV-1 PR CA/NC hasítási hely (Lys-Thr-Lys-Val-Leu↓Val-Val-Gln-Pro-Lys, ahol a nyíl a hasítási helyet jelzi) szekvenciájában egyszeres aminosavrész-cseréket tartalmazó peptidsorozat és különböző gátlószerek felhasználásával. Vizsgálni kívántuk a szubsztrátkötő zsebeiben HIV-1 PR felé mutató mutációk hatását is. Miután ezen a vizsgálatok jelentős részét a HTLV-1 és HIV-1 proteázokkal korábban munkacsoportunk elvégezte (Tózsér és mtsai., 2000; Kádas és mtsai., 2004), a BLV PR eredményeink alapján jóslott tulajdonságait közvetlenül össze tudjuk hasonlítani a HTLV-1 és HIV-1 proteolitikus enzimekével.

Korábban, a P4-P3' régióban egyszeres aminosavcseréket tartalmazó kiterjedt oligopeptidkészlet (Val-Ser-Gln-Asn-Tyr↓Pro-Ile-Val-Gln) felhasználásával, különböző

retrovirális proteázok specificitását már jellemezték, köztük a HIV-1, HIV-2 (Tózsér és mtsai., 1991a, 1992), EIAV (Weber és mtsai., 1993), MMLV (Menendez-Arias és mtsai., 1994) és AMV (Tózsér és mtsai., 1996) proteolitikus enzimekét. A módosított peptidekre mért, és az eredeti peptidre vonatkoztatott relatív aktivitás értékeket összehasonlítva karakterizálták az enzimek specificitását. Ezen vizsgálatok alapján a P2 pozíciót találták az egyik legkritikusabbnak a specificitásbeli különbségek meghatározásában. Ezért úgy döntöttünk, hogy a P2-es pozícióra koncentrálva kiterjesztjük a vizsgálatokat a BLV valamint olyan különböző retrovirális proteázokra (MPMV, MMTV, HTLV-1, HFV és WDSV proteázok), melyek révén vizsgálatainkban a *Retroviridae* család mind a hét nemzetsége képviseltetve lesz és közvetlenül összehasonlíthatóvá válik.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. RETROVIRÁLIS PROTEÁZOK

A retrovirális proteázokat korábban leírt módszerek alapján tisztítottuk: MPMV PR (12 kDa-s forma, Zabransky és mtsai., 1998), MMTV PR (GST-fúziós fehérjéből, Menendez-Arias és mtsai., 1992), MMLV PR (MBP-hisztidin-farok fúziós fehérjéből, Fehér és mtsai., 2004), HTLV-1 PR (inklúziós testből, Louis és mtsai., 1999a), BLV PR (inklúziós testből, Zahuczky és mtsai., 2000), WDSV (inklúziós testből, Fodor és mtsai., 2002), MBP-HFV PR (MBP-fúziós fehérjeként, Fenyőfalvi és mtsai., 1999). A HIV-1, HIV-2 (Tózsér és mtsai., 1992), EIAV (Weber és mtsai., 1993) és AMV (Tózsér és mtsai., 1996) proteázokra mért értékeket korábbi közleményekből vettük át.

3.2. SZINTETIKUS OLIGOPEPTID SZUBSZTRÁTOK

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 (Copeland és Oroszlán, 1988). A peptideket aminosav analízissel, illetve alkalmanként gázfázisú szekvenálással ellenőrizték. A peptid-törzsoldatok desztillált vízzel vagy 10 mM DTT-oldattal készültek, a pontos koncentrációt aminosavanalízissel határozták meg. A peptid oldatokat Dr. Stephen Oroszlantól és Dr. Terry D. Copelandtól kaptuk (Molecular Virology and Carcinogenesis Laboratory, NCI-FCRDC, Frederick, MD, USA).

3.3. RELATÍV ENZIMAKTIVITÁSOK MÉRÉSE, SZÁMOLÁSA ÉS A KINETIKAI ÁLLANDÓK MEGHATÁROZÁSA

A retrovirális proteázok aktivitásmérése 20 µl reakcióelegyben történt: 5 µl 1,6 mM koncentrációjú szubsztátoldat, 5 µl enzimmészítmény, 10 µl, dupla töménységű inkubációs puffer: 0,5 M foszfát puffer (pH 5,6, 10% glicerol, 2 mM EDTA, 0,4% Nonidet P-40, 4 M

NaCl, 10 mM DTT) felhasználásával. A reakcióelegyet 37 °C-on 1-4 órán át, illetve a WDSV és a HFV PR esetében 24 órán át inkubáltuk, és úgy állítottuk be az enzimkoncentrációkat, hogy a szubsztrát hidrolízise 20% alatt maradjon. A reakciókat 180 µl 1% TFA hozzáadásával állítottuk le, majd a szubsztrátot RP-HPLC-vel választottuk el a termékektől, valamint a pufferkomponensektől, Nova-Pak C18 (Waters Associates, Inc.) kromatográfiás oszlopon (3,9 x 150 mm), lineáris víz-acetonitril gradienssel (0-100%), 0,05% TFA jelenlétében. Az elválasztást 206 nm-en követtük és a hidrolízis mértékét a kromatográfiás görbe csúcs alatti területeinek meghatározásával számítottuk. Az integrációs értékeknek megfelelő peptidmennyiség kiszámításához korábban meghatározott referenciaértékeket használtunk. A referenciaértékeket, valamint a hasítási helyeket a csúcsoknak megfelelő frakciók aminosavanalízisével és szekvenálásával határozták meg a HIV-1 proteázra (Tózsér és mtsai., 1992). Ezek alapján a többi enzim esetében a termékek azonosításához a retenciós időket vettük figyelembe. Mindegyik mintánál két párhuzamos mérést végeztünk, számításainkhoz az átlagértéküket használtuk. A standard hiba 10% alatt volt. A relatív aktivitás-értékeket az elhasított peptidek időegységre vonatkoztatott moláris mennyisége alapján számoltuk, és elosztottuk a VSQVY↓PIVQ szubsztrátra mért értékkel, mely P2 helyen a legkisebb oldalláncot tartalmazza azok közül a szubsztrátok közül, melyeket az összes általunk vizsgált proteáz képes volt elhidrolizálni.

A kinetikai állandók meghatározásánál az enzimaktivitás mérésénél részletezett módon jártunk el, a következő kiegészítésekkel: a reakcióelegy összeállításához 5 µl 0,03-2,90 mM koncentrációjú szubsztrátoldatot használtunk a hozzávetőleges K_M értéktől függően, és 5 µl 12-7800 nM koncentrációjú enzimkészítményt. Minden szubsztrátpeptidre hat különböző koncentrációt teszteltünk. A kinetikai paramétereket a Fig.P program (Fig.P Software Corp.) felhasználásával a reakciósebesség és szubsztrátkoncentráció adatok Michaelis-Menten egyenlethez való illesztésével határoztuk meg, nemlineáris regressziós módszerrel. A kinetikai állandók standard deviációi 20% alatt voltak. Az alkalmazott peptidek hidrolízise általában a Michaelis-Menten kinetikát követte az általunk használt szubsztrátkoncentráció tartományban, azonban azoknál a peptideknél, melyeknél nem volt lehetőségünk a koncentrációjuk növelésére, a k_{kat}/K_M értékeket a görbe lineáris szakaszából állapítottuk meg. Azoknál a peptideknél, ahol a Michaelis-Menten görbe már igen kis szubsztrátkoncentrációnál a telítési szakaszba ért, a k_{kat}/K_M értékeket ismert k_{kat}/K_M értékekkel rendelkező szubsztrátok segítségével, kompetíciós mérésekkel határoztuk meg (Fersht, 1985). A hasítási helyek a csúcsoknak megfelelő frakciók aminosavanalízisével lettek megerősítve, általában a hasítási hely gazdavírusának proteázát használva kontrollként. Egyéb

esetekben a termékek azonosításához a retenciós időket és az integrációs értékeik arányát vettük figyelembe. Bizonytalanság esetén a hasítási helyet tömegspektrometriás módszerrel is igazoltuk.

3.4. A BLV PROTEÁZ MUTAGENEZISE ÉS A MUTÁNS ENZIMEK ÖNPROCESSZÁLÓ ÉS FOLDING KÉPESSÉGÉNEK VIZSGÁLATA

A mutagenézis alapjául a BLV proteázt kódoló régiót és az N-terminálison túlnyúló, nyolc aminosav hosszúságú N-terminális szekvenciát tartalmazó pMAL-BLVPr klónt használtuk. A proteáz kihalásítja magát az MBP-fúziós fehérjéből és inklúziós testből tisztítható (Zahuczky és mtsai., 2000). Mutánsainkat a Genosys Sigma cégtől rendelt, megfelelő oligonukleotid párokat felhasználva, Quick-Change mutagenézis eljárást (Stratagene) követve állítottuk elő. A mutációkat DNS-szekvenálással ellenőriztük, melyet ABI-Prism *dye terminator cycle sequencing kit* (Perkin-Elmer) és Applied Biosystems Model 373A szekvenátor segítségével hajtottunk végre.

A fehérjeexpressziót 1 mM izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid (IPTG) hozzáadásával, 3,5 órán keresztül végeztük, 5 ml vad vagy mutáns MBP-BLV PR fúziós fehérjéket kódoló plazmidokat tartalmazó *Escheria coli* DH5 α baktérium kultúrában. Az expresszió után a sejteket centrifugálással gyűjtöttük össze, majd 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1% Triton X-100-t tartalmazó, pH 8,2 pufferben, szonikálással tártuk fel. A fehérjemintákat SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel választottuk el és PVDF membránra vittük át Towbin és mtsai. (1979) szerint. Az immunoblottot kémiaiilag szintetizált BLV proteázzal immunizált nyulakból származó antiszérummal (Zahuczky és mtsai., 2000), peroxidáz konjugált anti-nyúl második antitesttel és ECL detekciós kit (Pierce) segítségével végeztük el. Azokat a mutáns enzimeket, melyek jelentős mértékben képesek voltak önmagukat a fúziós fehérjéből kihalítani, a vad típusú BLV proteázhoz hasonló módon ioncserés kromatográfiával megtisztítottuk, nagy térfogatú (500 ml) expressziót követően. A többi mutáns proteázt fúziós formában tisztítottuk meg, amilóz-affinitás kromatográfiát alkalmazva. Coomassie festett SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel győződünk meg a fehérjék tisztaságáról, mely alapján legalább 95%-ban tisztának bizonyult az összes mutáns.

A folding hatékonyság vizsgálatához a fehérjekoncentrációkat Bradford spektrofotometriás eljárással (Bio-Rad) határoztuk meg (Bradford 1976), a vad-típusú és mutáns BLV proteázok HPLC alapú aktív centrum titrálásához pedig KTKVL-r-VVQPK

(IB268) peptidet használtunk, ahol -r- a redukált peptidkötést jelenti (Kádas és mtsai., 2004). A munkánk során használt redukált peptidkötést tartalmazó inhibitorokat (IB 268 és IB 269 (APQVL-r-PVMHP)) Dr. Ivo Blaha szintetizálta (Ferring Leciva).

3.5. . GÁTOLHATÓSÁGI VIZSGÁLATOK

A gátolhatósági vizsgálatokhoz mikrotiter lemez alapú fluoreszcens eljárást alkalmaztunk (Bagossi és mtsai., 2004). Munkánk során Dabcyl/Edans fluoreszcens festékmolekulával jelölt HTLV-1 kapszid↓nukleokapszid hasítási helyen alapuló oligopeptid szubsztrátot (RE(Edans)TKVL↓VVQPK(Dabcyl)R) használtunk. Az enzim, szubsztrát, inhibitor elegyet 96 lyukú lemezen 250 mM foszfát, pH 5,6 pufferben inkubáltuk, amely még 5% glicerolt, 1mM EDTA-t, 5 mM DTT-t, 500 mM NaCl-t és 1% DMSO-t is tartalmazott. 355 nm gerjesztési hullámhossz mellett a növekvő fluoreszcenciát Victor Wallace fluoriméter segítségével 460 nm hullámhosszon detektáltuk. A belső szűrő-hatás korrekciót és a K_i értékeket a KiDet program alkalmazásával határoztuk meg (Bagossi és mtsai., 2004).

3.6. MOLEKULÁRIS MODELLEZÉS

A BLV PR modelljének felépítéséhez a szubsztrát-alapú sztatin inhibitorral meghatározott HTLV-1 kristályszerkezet (Li és mtsai., 2005) szolgált kiindulópontul. A modellezés során a HTLV PR megfelelő aminosavréseket kicseréltük a BLV proteázéira. A BLV PR dimer számítógépes modelljét a TKVL↓VVQP és SQNY↓PIVQ szekvenciájú peptidszubsztrátokat használva hoztuk létre az AMMP program segítségével (Harrison, 1993), ahogyan azt korábban leírták a HTLV-1 proteázra (Tözsér és mtsai., 2000). Mivel a HTLV-1 kristályszerkezete nem tartalmazza az utolsó 10 aminosavrést, ezért minta hiányában a BLV PR 118-126 aminosavréstét magába foglaló C-terminális szakaszt nem modelleztük. Egy konzervált vízmolekula a *flap* régió és a peptid között helyezkedik el és egy H^+ -iont használtunk a két katalitikus Asp oldallánc töltött oxigénatomjainak stabilizására. Az összes új atom pozícióját sp⁴ potenciál-készlettel hoztuk létre, 15 ciklusos Kohonen algoritmust felhasználva (Harrison, 1999), majd a nemkötő és geometriai tagok energia-minimalizációja következett. Végezetül, a teljes proteáz-szubsztrát komplexet 400 lépéses minimalizációnak vetettük alá. A szerkezeteket Sybyl (Tripos Inc.) vagy RasMol (Sayle és

Milner-White, 1995) grafikus programmal jelenítettük meg, Silicon Graphics vagy Linux munkaállomásokat használva. Az elkészült modelleket a *Protein Data Bank* adatbázisban helyeztük el, a BLV PR - TKVL↓VVQP komplexet 2IM6, a BLV PR - SQNY↓PIVQ komplexet 2IM7 kód alatt.

A különböző retrovirális proteázok S2 szubsztrátkötő helyeinek összehasonlító vizsgálatánál a HIV-1, HIV-2, SIV, EIAV, FIV és RSV proteolitikus enzimek szerkezet-alapú szekvencia-illesztéseit kiegészítettük a BLV, HTLV-1, MPMV, MMTV, MMLV, HFV és WDSV enzimjeinek szekvenciáival (1.4.2. ábra). A szerkezeti illesztés Whatif (Vriend, 1990), a kiindulási többszörös illesztés ClustalW (Thompson és mtsai., 1994) programmal készült, ez utóbbi eredményeit a szerkezeti illesztés alapján kézi úton javítottuk ki. A filogenetikus fa elkészítéséhez ClustalW és Phylip (Felsenstein, 1989) programokat használtunk. Az összes vizsgált retrovirális proteáz esetében a Modeller (Sali és Blundell, 1993) programot vettük igénybe a kezdeti modellek felépítéséhez. A program megengedi több minta kristályszerkezet bemenetként való felhasználását, és képes több homológ modellt létrehozni kimenetként. A HIV-1 (Mahalingam és mtsai., 2002), HIV-2 (Tong és mtsai., 1995), EIAV (Gustchina és mtsai., 1996), FIV (Kervinen és mtsai., 1998) és RSV (Wu és mtsai., 1998) proteázok pillanatnyilag elérhető legjobb felbontású (1.2-2.4 Å) kristályszerkezeteit használtuk mintaként a modellezés során (PDB elérési kódok [és a felbontások], sorrendben: 1K1T [1.2 Å], 1IDA [1.7 Å], 1FMB [1.8 Å], 4FIV [1.8 Å], 1BAI [2.4 Å]) és három párhuzamos modellt állítottunk elő enzimenként. Az AMV proteázra kapott eredmények értelmezéséhez az RSV proteolitikus enzimének szerkezetét használtuk: az AMV és RSV fehérjebontó enzimek mindössze két aminosavrészben különböznek, melyek nem vesznek részt az enzim-szubsztrát kölcsönhatásban (Tózsér és mtsai., 1996). A QVY↓PIV hexapeptid modelljét minden egyes retrovirális proteáz modell esetében mindkét irányban a szubsztrátkötő helyhez illesztettük, és egy szerkezetileg konzervált vízmolekulát helyeztünk az enzimek *flap* régiója és a szubsztrát közé. A szubsztrátszekvencia P2 helyen a legkisebb oldalláncot tartalmazza azok közül a peptidok közül, melyeket az összes általunk vizsgált proteáz képes volt elhidrolizálni, valamint ezeket az aminosavrészeket tartalmazza P3 - P3' helyen a relatív enzimaktivitások mérésénél referenciaként használt oligopeptid is.

A modell felépítés után esetlegesen még meglévő kedvezőtlen van der Waals kölcsönhatásokat Sybyl (Tripos Inc., St. Louis, MO, USA) programmal történő rövid energiaminimalizálással távolítottuk el, a következő paraméterek mellett: Kollman-féle *all atom force field* (Weiner és mtsai., 1986), 8 Å vágási határérték, 20 Simplex és 100 Powell iteráció. Ezen iterációk alatt az enzim katalitikus aszpartátjai, valamint az enzim és a

szubsztrát közötti hidrogén-kötésben résztvevő atomok szabad mozgását korlátoztuk, a régió konzervált hidrogén-kötés hálózatának fenntartása érdekében. Távolság megszorítások nélkül további 100 Powell iterációt alkalmaztunk a katalitikus aszpartátok esetében.

A szerkezeteket Sybyl vagy Whatif grafikus program segítségével vizsgáltuk, Silicon Graphics Indigo2 vagy O2 számítógépeket használva. Az RMS (*root mean square*) eltéréseket a Whatif program moduljával számoltuk. A kötőhelyek méreteit a P2 Gly szubsztrátot tartalmazó minimalizált szerkezetekből határoztuk meg, s a három modellre és két irányra kapott értékeket enzimenként átlagoltuk. Minden egyes proteázra legalább három értékből számoltuk az átlagot. Az aminosavrészek méreteit az irodalomból vettük (Zamyatin, 1972).

Az S2 zsebeket felépítő aminosavrészeket korábban valószínűsítették a HIV-1 és HIV-2 (Tózsér és mtsai., 1992), EIAV (Weber és mtsai., 1993), AMV (Tózsér és mtsai., 1996), MMLV (Boross és mtsai., 1999) és HTLV-1 (Tózsér és mtsai., 2000) proteolitikus enzimek esetén. A BLV, MMTV, MPMV, HFV és WDSV proteázok megfelelő aminosavrészei az enzimek aminosav-sorrendjeinek illesztéséből adódtak (1.4.2. ábra) és kristályszerkezetekkel vagy homológ modellekkel lettek megerősítve.

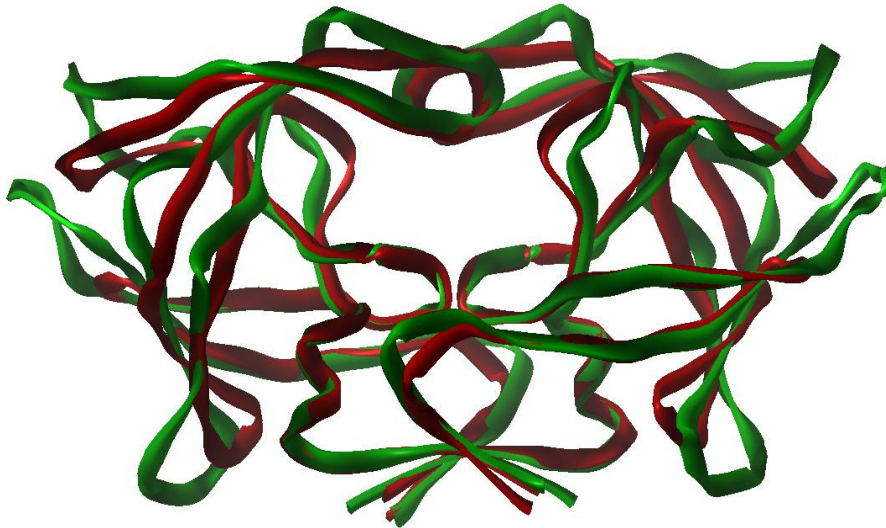
4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

4.1. A BLV PROTEÁZ JELLEMZÉSE ÉS ÖSSZEHASONLÍTÁSA A HTLV-1 ÉS HIV-1 PROTEÁZOKKAL

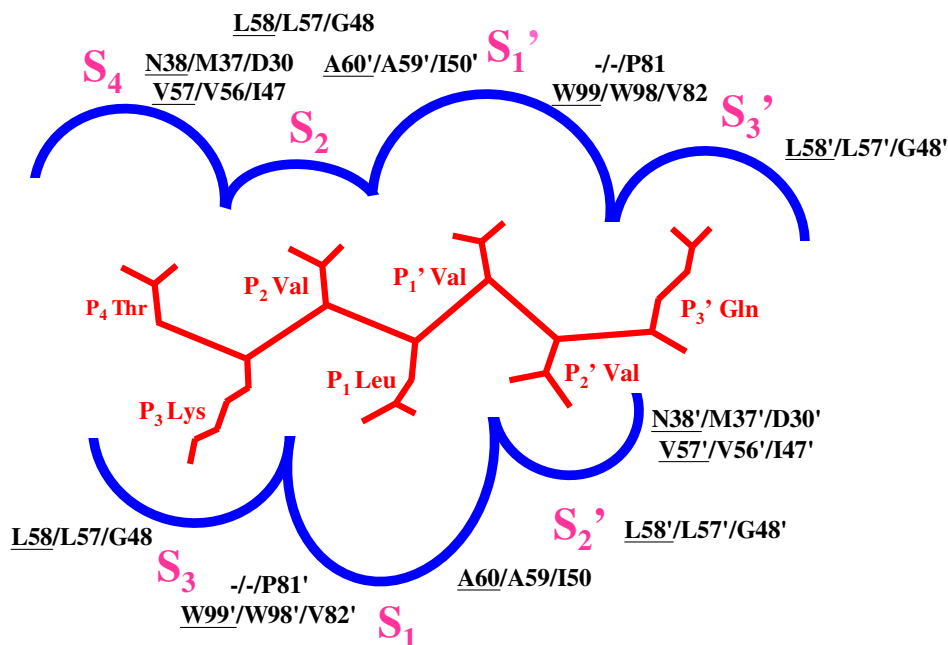
4.1.1. *A BLV PR szerkezeti modellje*

A hagyományos szubsztrátspecifitászvizsgálatokat, szerkezetvizsgáló módszereket (NMR, röntgen-kristallográfia, stb.) jól kiegészítik a molekuláris modellek által nyújtott információk. A kinetikai mérések eredményei a modell segítségével többnyire jól értelmezhetőek, a kölcsönható aminosavak feltérképezhetőek, a kötődéskor fellépő kölcsönhatások jósolhatóak. A BLV PR kristályszerkezetének hiányában, specificitásának molekuláris szintű megértéséhez számítógépes modelljét két peptidszubsztráttal építettük fel. A BLV PR aminosavszekvenciáját a legjobb kiindulási szerkezet meghatározása céljából ismert szerkezetű retrovirális proteáz szekvenciákhoz illesztettük. Bár a HIV-1 proteázra számos kristályszerkezet elérhető, a BLV-vel közeli rokon HTLV-1 proteolitikus enzimének kristályszerkezete csak a közelmúltban lett meghatározva (Li és mtsai., 2005). A BLV, HTLV-1 és a HIV-1 PR hossza eltér (HIV-1 PR: 99 aminosav, HTLV-1 PR: 125 aminosav, BLV PR: 126 aminosav). A hosszbeli eltérések ellenére a HTLV-1 és HIV-1 proteolitikus enzimjeinek háromdimenziós struktúrája a meghatározó régiók nagyfokú hasonlóságát mutatja, így a szubsztrátkötő hely és a dimerizációs felület tekintetében is. Ennek következtében ezek konzerváltságára lehetett számítani a BLV PR modellje esetén is (4.1.1.1. ábra). A szubsztrátkötő helyeket felépítő aminosavakat összehasonlítva (4.1.1.1. táblázat), a BLV és a HIV-1 PR között 55 %, a BLV és a HTLV-1 PR esetében 89 % azonosságot vagy hasonlóságot találtunk, összhangban a rokonsági fokokkal. A szubsztrátkötő helyek egyszerűsített rajzát a 4.1.1.2. ábra jeleníti meg. A BLV és HTLV-1 PR többlet aminosavai általában felszíni extra hurkok formájában mutatkoznak. A BLV és HTLV proteázokban ezenkívül egy 10 aminosavból álló rész a C-terminálnál a nem párhuzamos béta-redőt kialakító szekvenciát hosszabbítja meg. Egyes korábbi tanulmányok szerint ezek az aminosavrészek nem szükségesek a HTLV-1 PR működéséhez (Precigoux és mtsai., 1993; Herger és mtsai., 2004), míg mások szerint a 116-120 aminosavrészig terjedő szakasz nélkülözhetetlennek mutatkozik (Hayakawa és mtsai., 1992). A BLV PR dimer végső modellje (szubsztráttal) a HTLV-1 PR kristályszerkezetével összehasonlítva 0.79 Å RMS

(*root mean square*) értékkel rendelkező 223 pár C α atomra vonatkoztatva és 1.72 Å RMS értékkel 175 pár C α atomra vonatkoztatva a HIV-1 PR kristályszerkezetével összehasonlítva. Ezek az értékek azonos tartományban mozognak az RSV S9 PR és HIV-1 proteázokra inhibitorral mért, 194 pár C α atomra vonatkoztatott, 1.25 RMS értékkel.



4.1.1.1. ábra: A BLV PR HTLV-1 kristályszerkezete és a HIV-1 PR saját kristályszerkezete alapján készült szalagmodelljei.



4.1.1.2. ábra: A HTLV-1 kapsid|nukleokapszid hasítási helyet reprezentáló szubsztát elhelyezkedése a BLV, HTLV-1 és HIV-1 proteáz S4-S3' zsebeiben.

A sematikus ábrán minden zseb relatív méretét az egyes szubsztát oldalláncokat körülvevő vastag sáv által behatárolt terület mutatja be. Az ábrán csak azokat az aminosav alegységeket emeltük ki, amelyek legalább két enzim esetén különböznek. Azon BLV PR aminosavrészeket, amelyeket munkánk során megváltoztattunk, aláhúzással jelöltük.

4.1.1.1. táblázat: A BLV, HTLV-1 és HIV-1 proteázok szubsztrátkötő zsebeit valószínűsíthetően alkotó aminosavrészek.

Zseb	BLV/HTLV-1/HIV-1 aminosavrészek ^a
S ₄ :	Glu₃₇/Asp₃₆/Asp₂₉ , Asn₃₈/Met₃₇/Asp₃₀ , Ala₅₆/Ser₅₅/Met₄₆ , Val₅₇/Val₅₆/Ile₄₇ , Leu₅₈/Leu₅₇/Gly₄₈ , Tyr₆₈/Phe₆₇/Val₅₆ , Trp₇₀/Leu₆₉/Gln₅₈ , Leu₉₂/Leu₉₁/Leu₇₆
S ₃ :	Arg₉/Arg₁₀/Arg₈ , Leu₃₁/Leu₃₀/Leu₂₃ , Glu₃₇/Asp₃₆/Asp₂₉ , Leu₅₈/Leu₅₇/Gly₄₈ , -/-/Thr₈₀^b , -/-/Pro₈₁^b , Trp₉₉/Trp₉₈/Val₈₂
S ₂ :	(Gly₃₅/Gly₃₄/Gly₂₇) , Ala₃₆/Ala₃₅/Ala₂₈ , (Glu₃₇/Asp₃₆/Asp₂₉) , Asn₃₈/Met₃₇/Asp₃₀ , Val₄₀/Val₃₉/Val₃₂ , Val₅₇/Val₅₆/Ile₄₇ , Leu₅₈/Leu₅₇/Gly₄₈ , (Gly₅₉/Gly₅₈/Gly₄₉) , Ala₆₀/Ala₅₉/Ile₅₀ , Tyr₆₈/Phe₆₇/Val₅₆ , Leu₉₂/Leu₉₁/Leu₇₆ , Ile₁₀₁/Ile₁₀₀/Ile₈₄
S ₁ :	Arg₉/Arg₁₀/Arg₈ , Leu₃₁/Leu₃₀/Leu₂₃ , (Asp₃₃/Asp₃₂/Asp₂₅) , (Asp₃₃/Asp₃₂/Asp₂₅) (Gly₃₅/Gly₃₄/Gly₂₇) , (Gly₅₉/Gly₅₈/Gly₄₉) , Ala₆₀/Ala₅₉/Ile₅₀ , -/-/Thr₈₀^b , -/-/Pro₈₁^b , Trp₉₉/Trp₉₈/Val₈₂ , Ile₁₀₁/Ile₁₀₀/Ile₈₄

^aA mindhárom enzimben eltérő aminosavrészeket pirosra, a kettőben különbözőket kékre színeztük. A második enzim-alegység aminosavrészeit vesszővel jelöltük. Csak az S₄-S₁ kötőhelyeket felépítő aminosav-alegységeket adtuk meg, a vesszővel jelölt kötőhelyek (mint pl. az S₁) ugyanolyan összetételűek, mint a nem vesszővel jelöltek, de természetesen a másik enzim-alegység aminosavrészei építik fel. Azon aminosavrészeket, melyek csak a peptidszubsztrát főlánc-atomjaival lépnek kölcsönhatásba, zárójelbe tettük.

^bMíg a HIV-1 PR Thr₈₀ és Pro₈₁ részt vesz a kötőhelyek kialakításában, addig a BLV és HTLV-1 proteázok megfelelő aminosav-alegységei nem hatnak kölcsön a liganddal, elhelyezkedésük nagyon különbözik az eljük beilleszkedő hurok következtében.

4.1.2. A BLV PR szubsztrátspecificitásának vizsgálata retrovírusokban előforduló természetes hasítási helyeket tartalmazó oligopeptid szubsztrátokkal

A BLV PR szubsztrátspecificitásának összehasonlítására a HTLV-1 és HIV-1 proteázokéval a HIV-1, HIV-2, EIAV, RSV, MMTV, MPMV, MMLV, HTLV-1 és BLV természetes hasítási helyeket reprezentáló, 50 tagból álló oligopeptid szubsztrátsorozatot használtunk. A kiválasztott peptidok előzőleg hasíthatónak bizonyultak a megfelelő retrovirális proteázokkal (Tózsér és mtsai., 1991b, 1993, 1997; Menendez-Arias és mtsai., 1992, 1993; Louis és mtsai., 1999a; Zahuczky és mtsai., 2000), illetve a HTLV-1 és a HIV-1 proteolitikus enzimek specificitásának összehasonlítására sikerrel alkalmazták őket (Kádas és mtsai., 2004). Az oligopeptidek többségét (50-ből 40-et) mind a BLV, mind a HIV-1 PR képes volt bontani (4.1.2.1. táblázat). Mindemellett mindössze két peptidet nem hidrolizált egyik enzim sem és tizenhatot csak egyikük. Ha $1 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ önkényes határértéket alkalmazunk a hatékonyan és a nem hatékonyan hasított szubsztrátok elválasztására, akkor azt mondhatjuk, hogy a peptidok nagyobbik része az első kategóriába tartozik mindkét enzim esetén. Ugyanakkor a HTLV-1 proteáznak mindösszesen 20 peptid volt szubsztrátja s ezeknek is csak a fele bizonyult hatékonyan hasíthatónak (4.1.2.1. táblázat). A legtöbb esetben a hidrolízis elmaradását nem a peptid kötődésének hiánya okozta, hiszen e peptidok az enzim aktivitását képesek voltak gátolni HTLV-1 P1 Phe aminosavrész-cserét tartalmazó szubsztráttal végzett mérésekben (nem közölt eredmények). A specificitásvizsgálatok eredményei lényegesen szélesebb szubsztrát-toleranciát jeleznek a BLV és HIV-1 proteázok esetében, mint amit a HTLV-1 fehérjebontó enzime mutat. Ez a tulajdonság azonban nem jelentkezik egyértelműen a BLV saját hasítási helyeit tekintve, bár az P2-P2' szubsztrátszakasz nagyobb változatosságot mutat, összevetve a HTLV-1 hasítási helyekkel. Érdekes, hogy három esetben egy-egy aminosav-alegység eltolódást tapasztaltunk az eredeti hasítási helyhez képest (4.1.2.1. táblázat). A 31. peptidet a HIV-1 az autentikusnak megfelelő helyen (DLVL↓LSAE) bontotta, míg a BLV egy aminosavrészsel előrébb (SDLV↓LLSA). A 42. peptidet a BLV PR, az eredetivel (STLL↓IENS) egyetemben, egy alegységgel elcsúszott kötés mellett (TSTL↓LIEN) is képes volt hidrolizálni, a HIV-1 proteáznak e peptid nem volt szubsztrátja. Másrészt a 49. peptidet a HIV-1 PR hasította az eredeti helyhez (LECL↓LSIP) képest egy aminosavrészsel eltolt helyen (ELEC↓LLSI). Bár ezen eltolódások összhangban vannak a HIV-1 PR lényegesen hidrofilebb természetű S4, S2 és S2' szubsztrátkötő zsebeivel (később részletezve), a jelenség nem magyarázható egyértelműen a proteázok specificitásbeli tulajdonságaival, e sajátságok erősen függenek a szubsztrátok aminosav-összetételétől.

Csak néhány peptidet hasított hatékonyan ($k_{\text{kat}}/K_M > 1 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) mind a három proteáz: a HIV-1 RT/IN, a HIV-2 RT/IN, az RSV p3/NC, az MMTV p3/p8 és a HTLV-1 MA/CA, CA/NC, PR/pX hasítási helyeket tartalmazók. Ezek a szekvenciák olyan távoli rokon retro-elemekben tűnnek fel, mint a Ty3/Gypsy és a Ty1. E szubsztrátok közös tulajdonsága, hogy két HIV-1 hasítási hely kivételével hidrofób béta-elágazó oldallánccal (Val, Ile) rendelkeznek P2 és P2' pozícióban egyaránt és egy kivétellel P1 helyen Leu fordul elő bennük. (4.1.2.1. táblázat).

4.1.2.1. táblázat: A BLV, a HTLV-1 és a HIV-1 proteázok szubsztrátspecifitásának összehasonlítása a természetes hasítási helyeket tartalmazó oligopeptid szubsztrátokkal.

Szám	Vírus	Hasítási hely ^a	Szubsztrátszekvencia	BLV PR	HTLV PR ^b	HIV-1 PR ^b
				k_{kat}/K_M ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_{kat}/K_M ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_{kat}/K_M ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)
1.	HIV-1	MA/CA	VSQNY↓PIVQ	0.06	0	45.3
2.	HIV-1	CA/p2	KARVL↓AEAMS	5.7	0	90.0
3.	HIV-1	p2/NC	TATIM↓MQRGN	32.5 ^d	0	74.0
4.	HIV-1	NC/p1	ERQAN↓FLGKI	0	0	1.0
5.	HIV-1	p1/p6	RPGNF↓LQSRP	0	0	0.6
6.	HIV-1	IN/p6	DKELY↓PLTSL	12.5	0.02	0.02
7.	HIV-1	TF/PR	VSFNF↓PQITL	0	0	6.9
8.	HIV-1	PR/RT	CTLNF↓PISP	2.5	0	24.1
9.	HIV-1	RT/RH	AETF↓YVDGAA	0.4 ^e	0	10.0
10.	HIV-1	RT/IN	IRKIL↓FLDG	71.3 ^f	8.4	202.0
11.	HIV-2	MA/CA	KGGNY↓PVQHV	0	0	0.03
12.	HIV-2	CA/p2	KARLM↓AEALK	0.05 ^e	0	2.3
13.	HIV-2	p2/NC	IPFAA↓AQQRK	0	2.6	1.1
14.	HIV-2	NC/p6	KPRNF↓PVAQV	0.1	0	0.6
15.	HIV-2	TF/PR	RGLAA↓PQFSL	0.002 ^e	0	14.6
16.	HIV-2	PR/RT	MSLNL↓PVAKV	20.8	0	110.0
17.	HIV-2	RT/IN	IRQVL↓FLEKI	25.2 ^f	113.6	58.0
18.	EIAV	MA/CA	PSEEY↓PIMID	4.8 ^f	0.7	15.2
19.	EIAV	CA/X	QKMLL↓LAKAL	16.3	0	11.8
20.	EIAV	NC/p9	QKQTF↓PIQQK	0.05	<0.01	0
21.	EIAV	PR/RT	AKLVL↓AQLSK	3.7	0	13.4
22.	EIAV	RT/UT	KEEIM↓LAYQG	1.1	<0.01	18.3
23.	RSV	MA/p2A	GTSCY↓CHGTA	0	0	2.5
24.	RSV	p2B/p10	PPYVG↓SGLYP	0	0	0

25.	RSV	p10/CA	PVVAM↓PVVIK	15.1 ^f	0.1	0
26.	RSV	CA/p3	IAAAM↓SSAIQ	0	0	0
27.	RSV	p3/NC	IQPLIM↓AVVNR	137 ^f	>100	318
28.	RSV	NC/PR	PPAVS↓LAMTM	1.2 ^d	0	0.13
29.	RSV	PR'/RT	RATVL↓TVALH	173 ^f	0.3	1.9
30.	RSV	RT/IN	TFQAY↓PLREA	0	0	0.18
31.	MMTV	MA/pp21	SDLVL↓LSAEARR ^g	(11.4) ^{f,h}	0	6.9 ^h
32.	MMTV	pp21/p3	DSKAF↓LADTW	0.03	0	7.5
33.	MMTV	p3/p8	DELIL↓PVKRR	2.6 ^e	2.6	1.5
34.	MMTV	p8/n	PVGFAG↓AMA	0	0	<0.01
35.	MMTV	n/CA	LTFTF↓PVVFMRR ^g	1.3 ^d	0.01	0.9
36.	MPMV	p12/CA	PKDIF↓PVTET	0.45	0.2	0.2
37.	MMLV	MA/p12	PRSSLY↓PALTP	0.2	0	0.2
38.	MMLV	p12/CA	TSQAF↓PLRAG	0.1	0	8.7
39.	MMLV	CA/NC	MSKLL↓ATVVS	7.9 ^f	0	0
40.	MMLV	NC/PR	TQTSL↓TLDDQ	3.5	0	0
41.	MMLV	PR/RT	PLQVL↓TLNIERR ^g	43.9 ^f	0.1	0
42.	MMLV	RT/IN	TSTLL↓IENSS	(7.5) ^{f,i}	0	0
43.	HTLV-1	MA/CA	APQVL↓PVMHP	186 ^{f,c}	85.2	16.1
44.	HTLV-1	CA/NC	KTKVL↓VVQPK	24.5	150.6	14.3
45.	HTLV-1	TF1/PR	DPASIL↓PVIP	33.3 ^f	3.8	0
46.	HTLV-1	PR/pX	KGPPVIL↓PIQAP	1.1	288.3	8.4
47.	BLV	MA/CA	PPAIL↓PIISE	217 ^{f,c}	164.5	0.3
48.	BLV	CA/NC	KQPAIL↓VHTPG	63.0 ^{f,c}	0	0
49.	BLV	TF/PR	ELECL↓LSIPL	146 ^f	0	(8.5) ^j
50.	BLV	PR/p13	PPMVG↓VLDAP	0.4 ^c	0.7	0.04

^aRetrovirális fehérjék nevezéktana Leis és mtsai., 1988 alapján. A nem ismert funkciójú fehérjéket p betűvel, majd azt követően a fehérjék molekulatömegét kDa-ban kifejező számmal jelölik.

^bA kapcsolódó specificitási állandók korábban közlésre kerültek (Kádas és mtsai., 2004).

^cÁtvéve: Zahuczky és mtsai., 2000.

^dA specificitási állandót DKELY↓PLTSL szubsztrátot használva, kompetíciós méréssel határoztuk meg.

^eA k_{cat}/K_M értékeket a görbe lineáris szakaszából állapítottuk meg.

^fA specificitási állandót VSQLY↓PIVQ szubsztrátot használva, kompetíciós méréssel határoztuk meg.

^gAzokat az aminosavrészeket, melyeket az oldhatóság növelése érdekébenadtunk a hasítási hely szekvenciához, aláhúzással jelöltük.

^hA peptidet a HIV-1 PR az eredeti MMTV hasítási helyen bontotta (L↓L), míg a BLV PR egy aminosavrésszel előrébb, a V↓L kötésnél.

ⁱEzt a peptidet a BLV PR L↓L helyen is hasította, $9.0 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ k_{cat}/K_M értékkel.

^jA peptidet a HIV-1 PR C↓L helyen hasította.

4.1.3. A BLV PR jellemzése HTLV-1 CA/NC hasítási helyen alapuló oligopeptid szubsztrátsorozattal végzett kísérletek segítségével

Méréseinkhez azért választottuk a HTLV-I PR CA/NC természetes hasítási helyén alapuló oligopeptid sorozatot, mert kutatócsoportunk e szubsztrátsorozat felhasználásával korábban sikeres specifitásvizsgálatot végzett a HIV-1 és HTLV-1 proteázokra (Tózsér és mtsai., 2000) illetve eredményesen alkalmazta HTLV-1 proteázban HIV-1 PR felé mutató mutációk okozta specifitásváltozások tanulmányozására (Kádas és mtsai., 2004). Így alkalmunk adódott a különböző proteolitikus enzimek specifitásának ugyanazon szubsztrátokkal történő, közvetlen összehasonlítására. Az oligopeptid-készlet az N-terminális felől rövidített származékokat és P4-P1' pozíciókban egyszeres aminosavész-cseréket tartalmazó peptideket tartalmazott és használhatónak bizonyult a BLV PR szubsztrát-specifitásának karakterizálásában is. A kinetikai állandókat (k_{kat}/K_M) a 4.1.3.1-3. táblázatokban adjuk meg a korábban közölt HTLV-1 és HIV-1 proteázokra vonatkozó értékekkel (Tózsér és mtsai., 2000) együtt.

Általánosan megállapíthatjuk, hogy ezen oligopeptidsorozat tagjainak nagy részét a BLV PR kisebb sebességgel hidrolizálta mind a HTLV-1, mind a HIV-1 proteázoktól, s az enzim-szubsztrát komplex stabilitását jellemző K_M értékek is általában kisebbnek adódtak, jó egyezésben a természetes hasítási helyeket reprezentáló peptidekkel kapott eredményekkel (az adatok nincsenek feltüntetve). Ugyanakkor az alacsonyabb K_M és kisebb k_{kat} értékek eredőjeként a specifitási állandók (k_{cat}/K_M) összemérhetőek voltak a másik két enzimmel kapottakkal. Megjegyzendő, hogy a HTLV-1 és a HIV-1 esetében a hidrolízis sebessége általában a HTLV-1 proteáznál volt nagyobb, míg a K_M értékére vonatkozóan nem volt tapasztalható hasonló tendencia (Tózsér és mtsai., 2000).

4.1.3.1. A BLV PR szubsztrátkötő helyének mérete

A természetes hasítási hely szekvenciáját tartalmazó deka-peptid mindhárom enzim számára jó szubsztrátnak bizonyult. Fontos megjegyezni, hogy ez egyéb retrovirális proteázok esetében is igaz (nem közölt eredmények), így ezen oligopeptid általános PR szubsztrátnak tekinthető, s alkalmasnak találták fluoreszcens gátlási vizsgálatok kivitelezéséhez is (Bagossi és mtsai., 2004; Kádas és mtsai., 2004; 4.1.5. táblázat). Az N-terminális irányából rövidített származékok jobb szubsztrátjai voltak a BLV proteáznak, csakúgy, mint a HIV-1 proteáznak, míg a HTLV-I PR esetében a tendencia épp fordított (4.1.3.1. táblázat). Ezek az eredmények

azt mutatják, hogy a BLV PR hasonlóan a HIV-1 proteolitikus enziméhez, kevésbé kiterjedt szubsztrátkötő régióval rendelkezik, mint a HTLV-1 PR.

4.1.3.2. A BLV PR S4 kötőhelyének jellemzése

Mindegyik P4 szubsztituált származék jó szubsztrátja volt az enzimnek. Közülük a hidrofób aminosavakra (mint Val vagy Leu) cserélt oligopeptidek voltak a BLV PR által legjobban hasíthatóak, hasonlóan a HTLV-1 proteázhoz, és szemben a HIV-1 proteázzal, ahol a Ser bizonyult kitüntetett szerepűnek. Viszonylagos kedvezményezettség a BLV és a HIV-1 proteolitikus enzimeinél Asp csere esetén is megfigyelhető volt, míg a HTLV-1 PR számára az Asp a legrosszabb szubsztituensnek bizonyult (4.1.3.1. táblázat).

Az S4 alzseb minden retrovirális proteáz esetében a PR felszínéhez közel helyezkedik el és többé-kevésbé nyitott az oldószer felé, így a P4 aminosav oldallánca az oldószerrel illetve a szubsztrátkötő zsebet felépítő aminosavrészekkel is kölcsönhathat. A HIV-1 és más főemlős lentivírus proteázok egyedi tulajdonsága az Asp30 jelenléte, miközben a legtöbb retrovirális PR, köztük a HTLV-1 és a BLV, megegyező pozíciójában nem töltött aminosavrész foglal helyet (1.4.2. ábra, 4.1.1.1. táblázat). A BLV PR aszparagint tartalmaz e helyen, mely még képes hidrogén-hidak kialakítására az eredeti HTLV-1 szubsztrát Thr oldalláncával, ezzel szemben a HTLV-1 PR megfelelő helyén Met található. E kritikus szerepű Asn mellett a BLV PR egyéb S4 aminosav-alegységei hidrofóbb kötőhelyet alkotnak a HIV-1 proteázénál (4.1.1. táblázat). Így azt mondhatjuk, hogy BLV PR S4 szubsztrátkötő zsebe erősen hasonlít más (nem főemlős) retrovírusokéhoz (Tózsér, 1997). Érdekes, hogy proteáz ellenes gyógyszereknek ellenálló mutáns HIV-1 proteázokban az Asp30 helyén gyakran fordul elő Asn. Az S4 kötőhely mindhárom enzim esetében meglehetősen flexibilisnek mutatkozott.

4.1.3.1. táblázat: A BLV, HTLV-1 és HIV-1 proteázok szubsztrátspecifitásának összehasonlítása rövidített és P4 helyen egyszeres aminosavrész-cseréket tartalmazó HTLV-1 CA/NC hasítási helyen alapuló oligopeptid szubsztrátokkal.

n.m.: nem meghatározott; csekély fokú hidrolízist tapasztaltunk tömény ezimmel történő inkubálás esetén.

Szubsztrát Szekvencia ^a	BLV PR			HTLV-1 PR ^b	HIV-1 PR ^b
	K _M (mM)	k _{kat} (s ⁻¹)	k _{kat} /K _M (mM ⁻¹ s ⁻¹)	k _{kat} /K _M (mM ⁻¹ s ⁻¹)	k _{kat} /K _M (mM ⁻¹ s ⁻¹)
KTKVL↓VVQPK	0.011	0.27	24.5	158.7	22.5
TKVL↓VVQPK	<0.01	0.35	55.9 ^c	31.0	28.3
KVL↓VVQPK	0.015	0.71	47.3	n.m.	66.0
P4 szubsztituált peptidek:					
K G KVL↓VVQPK	0.021	0.58	27.6	98.6	0.8
K A KVL↓VVQPK	0.042	0.22	5.2	36.0	16.6
K V KVL↓VVQPK	<0.01	0.20	73.9 ^c	267.2	12.1
K L KVL↓VVQPK	<0.03	0.74	68.0 ^c	209.5	7.8
K P KVL↓VVQPK	<0.01	0.16	52.2 ^c	58.9	6.5
K S KVL↓VVQPK	0.022	0.19	8.6	40.0	45.8
K D KVL↓VVQPK	0.048	0.90	18.7	2.3	6.8

^aAz aminosavrész-cserék félkövérrrel szedve.

^bA kapcsolódó specificitási állandók korábban közlésre kerültek (Tózsér és mtsai., 2000).

^cA specificitási állandót VSQLY↓PIVQ szubsztrátot használva, kompetíciós méréssel határoztuk meg.

4.1.3.3. A BLV PR S3 kötőhelyének jellemzése

A P3 származékok mindegyike is hasíthatónak bizonyult a BLV proteázzal. A specificitási állandó változása a BLV PR esetében jóval szűkebb tartományt ölel fel, mint a másik két enzimmél, az egyetlen kiugró értéket az alaninra történő csere szolgáltatja. Eredményeink alapján változatos aminosavrészek lehetnek elfogadottak a proteázok ezen kötőhelyein (4.1.3.2. táblázat).

Vizsgálataink azt mutatták, hogy a vizsgált enzimek S3 kötőhelyei viszonylag nyitottak, mélyek, a felszínhez közeli. Mindez szabad mozgást enged a P3 aminosav oldalláncok számára, melyek így kapcsolatba kerülhetnek mind az enzim felszínén lévő poláris, mind az S1 alzsebhez közeli hidrofób oldalláncokkal (Cameron és mtsai., 1993). A

zsebet felépítő aminosavak többsége azonos vagy hasonló a három proteázban (4.1.1.1. táblázat). A BLV PR Leu58 és Trp98' kölcsönhathat a hidrofób P3 aminosavrészekkel, a HTLV-1 proteolitikus enzimjéhez hasonló módon. A HIV-1 PR Val82' aminosavalegysége, mely szerkezeti szempontból megfelel a deltaretrovírusok Trp alegységének, mélyebb kötőhelyet eredményez, ami magyarázza a HIV-1 PR esetén a P3 Phe vagy Leu tartalmú szubsztrátokra, a kis- vagy közepes oldalláncú Ala vagy Val cserét tartalmazókhöz képest mért sokkal magasabb kinetikai állandókat. A kinetikai vizsgálatok eredményei azt mutatják, hogy a BLV PR S3 kötőhelye kisebb a HTLV-1 S3 kötőhelyénél is, bár e megállapítást a molekuláris modellezéssel nem tudtuk magyarázni.

4.1.3.4. A BLV PR S2 kötőhelyének jellemzése

A BLV PR esetén az eredeti Val cseréje egyéb hidrofób oldalláncú aminosavakra hasonló vagy éppen jobb szubsztrátot eredményezett, a legjobbnak a Phe és a Ile csere bizonyult. Az azonos szubsztitúciók a másik két enzim esetében eltérő hatást gyakoroltak a specificitásukra: jellemzően kedvezőtlennek bizonyultak a HIV-1 PR számára, míg a HTLV-1 PR néhányukat jó hatékonysággal hidrolizálta (4.1.3.2. táblázat). A nagyobb hidrofób P2 aminosavrészek kedvezményezettsége összefügg a kisebb Ala és Val alegységek jelenlétével mind a BLV, mind a HTLV PR S2 zsebében, helyettük a HIV-1 proteázban Ile47 és Ile50 található. Szemben a HTLV-1 és a HIV-1 proteolitikus enzimével, a BLV PR az Asn aminosavrészt is jól tolerálta e pozícióban, annak ellenére, hogy a P2 Asn jellemző ugyan az 1-es típusú hasítási hely szekvenciákban, de nem a 2-es típusúakban.

Az összes proteolitikus enzim S2 kötőhelye erősebben korlátozott szterikus szempontból, mint az S4 és S3 alzsebek, valamint elsősorban hidrofób aminosavrészek elfogadását valószínűsíthetjük esetükben. A zsebet alkotó aminosav-alegységek alapján a HIV-1 proteázéhoz képest a BLV proteáznál némiképp nagyobb méretű kötőhely kialakulását várjuk. A HIV-1 PR poláris szubsztrát-oldalláncok irányába megnyilvánuló toleranciája kapcsolatba hozható az S4 zsebnél már említett Asp30 aminosavrész jelenlétével (Cameron és mtsai., 1993). Az Asn38 és Tyr68 kivételével, melyek a HTLV-1 PR azonos helyein Met és Phe, a BLV PR S2 alzsebet felépítő összes egyéb aminosavrész megegyezik a HTLV-1 ugyanezen alzsebet felépítővel, de lényegesen különbözik a HIV-1 proteázét alkotóktól (4.1.1.1. táblázat). Az Asn38 és Tyr68 okán a BLV PR S2 kötőhelye hidrofílebb sajátosságokkal bír, mint a HTLV-1 proteolitikus enzime (4.1.3.4.1. ábra), jó egyetértésben a P2 helyen szerint, aszparagint vagy aszpartátot tartalmazó oligopeptidekre mért viszonylag magas

kinetikus hatékonysággal.

4.1.3.2. táblázat: A BLV, HTLV-1 és HIV-1 proteázok szubsztrátspecifitásának összehasonlítása P3 és P2 helyeken egyszeres aminosavrész-cseréket tartalmazó HTLV-1 CA/NC hasítási helyen alapuló oligopeptid szubsztrátokkal.

n.m.: nem meghatározott; csekély fokú hidrolízist tapasztaltunk tömény ezimrel történő inkubálás esetén.

n.h.: nem hasadt; nem tapasztaltunk hidrolízist 24 órán át tartó, tömény ezimrel történő inkubálás esetén sem.

Szubsztrát Szekvencia ^a	BLV PR			HTLV-1 PR ^b	HIV-1 PR ^b
	K _M (mM)	k _{kat} (s ⁻¹)	k _{kat} /K _M (mM ⁻¹ s ⁻¹)	k _{kat} /K _M (mM ⁻¹ s ⁻¹)	k _{kat} /K _M (mM ⁻¹ s ⁻¹)
KTKVL↓VVQPK	0.011	0.27	24.5	158.7	22.5
P3 szubsztituált peptidek:					
KT G VL↓VVQPK	<0.02	0.74	39.2 ^c	19.4	1.8
KT A VL↓VVQPK	<0.01	0.18	115.3 ^c	114.0	15.2
KT V VL↓VVQPK	<0.01	0.13	21.9 ^c	107.7	26.9
KT L VL↓VVQPK	<0.01	0.11	26.2 ^c	112.1	205.7
KT F VL↓VVQPK	0.042	0.44	10.5	145.2	211.6
KT S VL↓VVQPK	<0.01	0.20	55.5 ^c	38.9	37.3
KT D VL↓VVQPK	0.026	0.17	6.5	12.8	1.0
P2 szubsztituált peptidek:					
KTK G L↓VVQPK	0.20	0.19	1.0	n.h.	0.3 ^d
KTK A L↓VVQPK	<0.02	0.35	25.0 ^c	0.4	2.1
KTK L L↓VVQPK	0.025	0.29	11.6	117.9	0.1
KTK I L↓VVQPK	<0.01	0.29	54.4 ^c	63.1	37.8
KTK F L↓VVQPK	<0.02	0.32	46.5 ^c	11.5	0.6
KTK S L↓VVQPK	0.026	0.35	13.5	n.h.	0.07 ^e
KTK N L↓VVQPK	0.033	0.13	3.9	n.h.	0.1
KTK D L↓VVQPK	0.043	0.07	1.6	n.h.	1.3
KTK K L↓VVQPK	n.m.	<0.01	n.m.	n.h.	n.h.

^aAz aminosavrész-cserék félkövérrel szedve.

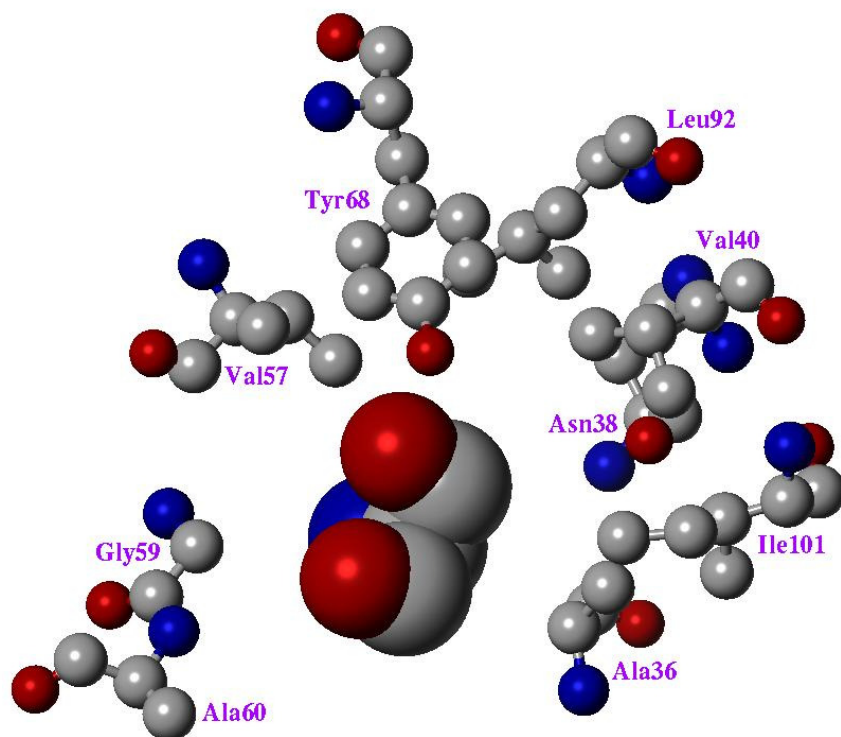
^bA kapcsolódó specificitási állandók korábban közlésre kerültek (Tózsér és mtsai., 2000).

^cA specificitási állandót VSQLY↓PIVQ szubsztrátot használva, kompetíciós méréssel határoztuk meg.

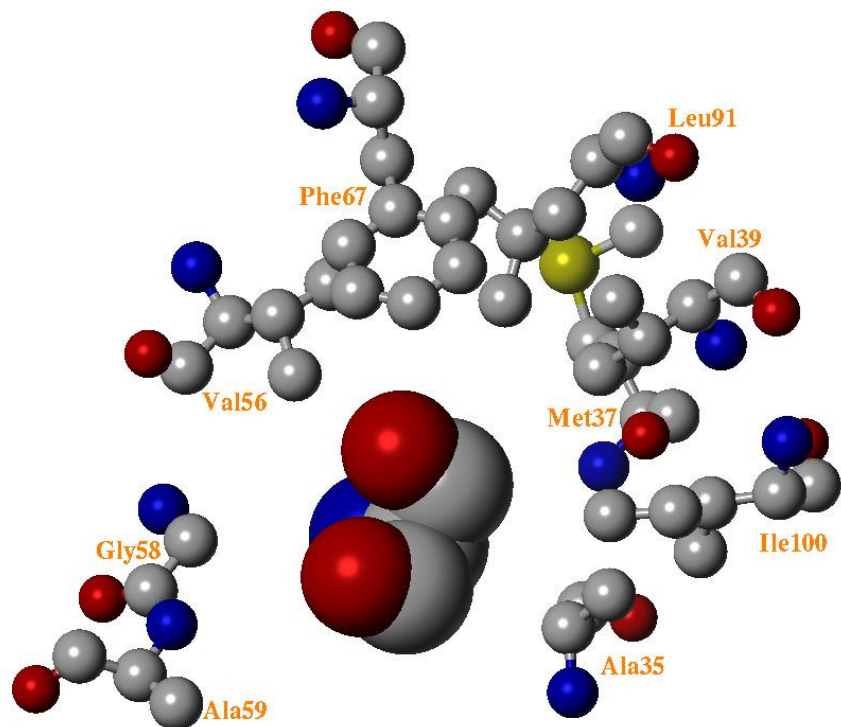
^dA k_{kat}/K_M értékeket a görbe lineáris szakaszából állapítottuk meg.

^eA specificitási állandót KTKVL↓KVQPK szubsztrátot használva, kompetíciós méréssel határoztuk meg.

A



B



4.1.3.4.1. ábra: A BLV (A) és HTLV-1 (B) proteáz S2 szubsztrátkötő zsebét alkotó aminosavrészek gömb és pálcika ábrázolással. A szubsztrát P2 oldalláncot (Ser) térkitöltő modellel ábrázoltuk.

4.1.3.5. A BLV PR S1 kötőhelyének jellemzése

Érdekes, hogy a P1 helyen szubsztituált származékok közül mind aránylag jó szubsztrátja volt a BLV proteáznak, még a töltött vagy hidrofíli aminosavrészt tartalmazók is, miközben a HTLV-1 és a HIV-1 csak a hidrofób oldalláncú és glicin aminosav- cserét tolerálták. Mindhárom esetben a Phe vagy Tyr csere bizonyult a legjobbnak, őket egyéb hidrofób oldalláncúak követték változó sorrendben, bár a BLV esetében a legkedvezőbb cserének (a másik két enzimmel ellentétben, ahol a Phe) a nagyméretű és poláros jelleggel is bíró Tyr bizonyult, utalva a BLV proteáznál már eddig is megfigyelt nagyobb mértékű hidrofilitásra. (4.1.3.3. táblázat).

Szerkezeti vizsgálatok azt mutatták, hogy ezen a zseb az S3 zsebekhez hasonlóan viszonylag konzervatív jellegűnek tekinthetők. Az enzim belsejében helyezkednek el és főként hidrofób aminosav oldalláncok befogadásának kedveznek. Az enzim működése szempontjából létfontosságú katalitikus aszpartil oldalláncok is itt találhatóak. Mindemellett, felépítésükben nem konzervatív aminosavrészek is részt vesznek (4.1.1. táblázat). A HIV-1 Thr80'-Pro81'-Val82' és más retrovirális PR ennek megfeleltethető régiója egyfajta tetőt (*roof*) képez az S1 zseb felett, szerepet játszva a kötőhely méretének kialakításában. A HTLV-1 és a BLV PR esetében ez a régió egyetlen Trp aminosav- részre cserélődik, mivel a másik két oldallánc nem lép közvetlenül kölcsönhatásba a liganddal. A Trp99' jelenléte miatt a BLV PR S1 zsebe kisebb a HIV-1 PR S1 kötőhelyétől, amely Val82' aminosav- alegységet tartalmaz azonos pozícióban. A retrovirális proteázok egy érdekes tulajdonsága, hogy az S1 zsebet alkotó terjedelmes aminosav- oldalláncok valószínűleg az S3 kötőhely felépítéséhez is hozzájárulnak. Úgy tűnik, az S1 és S3 zsebek sokkal inkább átfednek, mint az S4-S2, S2-S1' és S1'-S3' kötőhelyek (Tózsér és mtsai., 1996). Ez a jelenség tovább bonyolíthatja a szubsztrátkötőhely - ligand kapcsolatok molekuláris rendszerét és talán magyarázza a BLV PR S1 zsebének a HTLV-1 proteázéhoz viszonyított nagyobb fokú flexibilitását, amely a két enzim S1 kötőhelyét alkotó aminosav- részek nagyfokú hasonlóságának függvényében meglepő; valamint lényeges elem lehet a specificitás vizsgálatok szekvencia- függésének megértésében is (Tózsér és Oroszlan, 2003).

4.1.3.6. A BLV PR S1' kötőhelyének jellemzése

A hidrofil aminosavak megjelenése a P1' származékok esetén is a BLV PR számára volt kedvezőbb, a HTLV-1 és a HIV-1 proteázokhoz képest (Tózsér és mtsai., 2000). A Pro mindkét utóbbi enzimmél nagymértékű növekedést idézett elő a K_M értékében (az adatok nincsenek feltüntetve), a BLV PR esetében viszont a k_{kat} értéke lett viszonylag magas, számottevően megnövelve a specifikitási állandó számértékét. A vizsgált oligopeptidek közül a HTLV-1 és a HIV-1 proteázoknak a Leu illetve Ile, a BLV proteínáznak pedig a Phe csere kedvezett leginkább (4.1.3.3. táblázat). A proteáz szimmetriája folytán az S1' kötőhely nagyon hasonló az S1 kötőhelyhez, hiszen a dimer másik alegységének azonos aminosavrészei alkotják. A BLV PR esetében a specifikitási adatok alapján úgy tűnik, az S1' kötőhely megőrizte az S1 kötőhelynél megfigyelt flexibilitást.

4.1.3.3. táblázat: A BLV, HTLV-1 és HIV-1 proteázok szubsztrátspecifitásának összehasonlítása P1 és P1' helyeken egyszeres aminosavész-cseréket tartalmazó HTLV-1 CA/NC hasítási helyen alapuló oligopeptid szubsztrátokkal.

n.m.: nem meghatározott; csekély fokú hidrolízist tapasztaltunk tömény ezimmel történő inkubálás esetén.

n.h.: nem hasadt; nem tapasztaltunk hidrolízist 24 órán át tartó, tömény ezimmel történő inkubálás esetén sem.

Szubsztrát Szekvencia ^a	BLV PR			HTLV-1 PR ^b	HIV-1 PR ^b
	K _M (mM)	k _{kat} (s ⁻¹)	k _{kat} /K _M (mM ⁻¹ s ⁻¹)	k _{kat} /K _M (mM ⁻¹ s ⁻¹)	k _{kat} /K _M (mM ⁻¹ s ⁻¹)
KTKVL↓VVQPK	0.011	0.27	24.5	158.7	22.5
P1 szubsztituált peptidek:					
KTKV G ↓VVQPK	<0.01	0.09	12.9 ^c	2.2	1.3
KTKV A ↓VVQPK	0.010	0.34	34.0	30.0	1.3
KTKV M ↓VVQPK	<0.02	0.24	22.3 ^c	27.3	44.0
KTKV F ↓VVQPK	0.048	2.0	40.8	334.7	152.3
KTKV Y ↓VVQPK	0.014	0.74	52.9	61.6	36.0
KTKV S ↓VVQPK	0.017	0.11	6.5	n.m.	n.m.
KTKV D ↓VVQPK	0.032	0.11	3.4	n.h.	n.m.
KTKV K ↓VVQPK	n.m.	n.m.	2.4 ^e	n.h.	n.h.
P1' szubsztituált peptidek:					
KTKVL↓ G VQPK	0.021	0.12	5.7	n.h.	n.m.
KTKVL↓ L VQPK	0.021	0.34	16.2	133.6	46.1
KTKVL↓ I VQPK	0.021	0.23	11.0	12.5	62.2
KTKVL↓ F VQPK	<0.01	0.28	44.2 ^c	2.0	24.7
KTKVL↓ P VQPK	0.063	0.85	13.5	1.1	0.04
KTKVL↓ S VQPK	0.016	0.18	11.2	n.m.	2.3
KTKVL↓ D VQPK	n.m.	<0.01	n.m.	n.h.	n.m.
KTKVL↓ K VQPK	0.13	0.36	2.8	n.h.	n.h.

^aAz aminosavész-cserék félkövérrrel szedve.

^bA kapcsolódó specificitási állandók korábban közlésre kerültek (Tózsér és mtsai., 2000).

^cA specificitási állandót kompetíciós méréssel határoztuk meg, VSQLY↓PIVQ szubsztrátot használva.

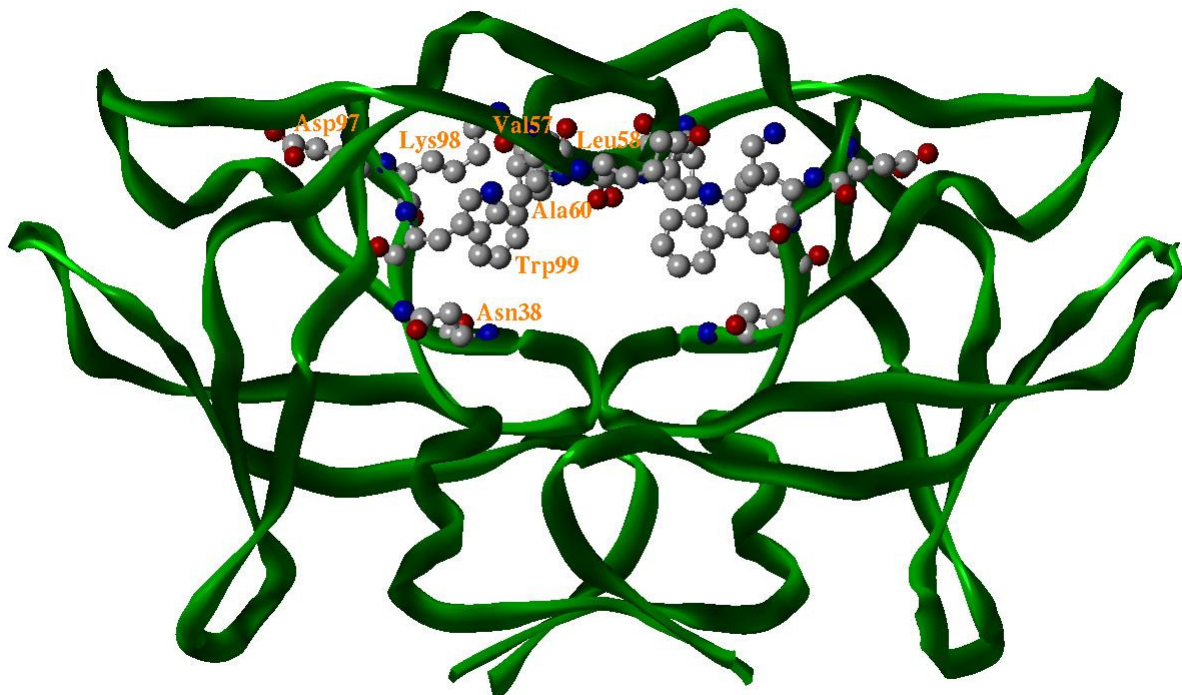
^eA specificitási állandót kompetíciós méréssel határoztuk meg, KTKVL↓KVQPK szubsztrátot használva.

A 4.1.3. fejezetben kapott eredményeket tekintve megállapíthatjuk, hogy a BLV proteáz specificitása (a rokonsággal összhangban) sok tekintetben a HTLV-1 proteázéhoz hasonlóan, de egyúttal attól szélesebbnek is adódott: egyrészt a rövidebb peptidszakaszokat nagyobb hatékonysággal volt képes bontani, másrészt kötőhelyei általánosan flexibilisebbnek bizonyultak, harmadrészt szinte mindegyik szubsztrátkötő zsebe többé-kevésbé

hidrofilebbnek mutatkozott, pl. töltéssel rendelkező oldalláncok mellett (Lys, Asp) is hasított. Ez utóbbi azért különösen érdekes, mert felveti annak a lehetőségét, hogy a bekövetkező mutációk esetleg ilyen irányba tolják el a HIV-1 PR specificitását. Az eredmények arra is rámutatnak, hogy nemcsak közvetlenül a hidrolizált kötés melleti aminosavak határozzák meg a hasítás specificitását, de a távolabbi aminosavaknak is lényeges szerepük van. Mivel a retrovirális proteázok esetében annak ellenére, hogy az enzim specifikusan hasítja a peptid illetve a poliprotein oldalláncokat, nem adható meg konszenzus szubsztrátszekvencia, összetett kölcsönhatásokat kell feltételeznünk az enzim és a szubsztrát, illetve azok aminosavoldalláncai között. Fontos még megjegyezni, hogy a szubsztrát bekötődésével az enzim-szubsztrát komplex asszimmetrikussá válik, ezért az egymás "tükörképének" megfelelő (pl.: S1-S1') alsósebek szerkezete - és így a bekötődni képes aminosavak jellege is - némileg különbözhet.

4.1.4. A BLV PR szubsztrátkötő helyeit érintő mutációk hatása

A BLV PR specificitásának mélyebb megértéséhez és mutációs toleranciájának vizsgálatához, szubsztrátkötő zsebeinek néhány aminosavrészét, egyszeresen vagy többet kombinálva a HIV-1 PR szerkezeti megfelelő pozíciójában levő aminosavrészére cseréltük ki (4.1.1.2. ábra, 4.1.4.1. ábra).



4.1.4.1. ábra: A BLV proteáz szalagmodellje. A munkánk során mutált aminosavrészek pozícióját gömb és pálcika jelöléssel emeltük ki. A jelölés csak az első monomeren látható.

A mutánsok önprocesszáló (*cisz*) aktivitásait és az előzőekben is használt HTLV-1 CA/NC hasítási helyet tartalmazó oligopeptiddel mért aktivitásait (*transz*) a 4.1.4.1. táblázatban foglaltuk össze és hasonlítottuk a HTLV-1 PR megegyező mutánsaira már közölt (Kádas és mtsai., 2004) értékekhez. Több BLV PR mutáns elvesztette a vad típus önprocesszáló képességét, ami a katalitikusan megfelelő térszerkezeti forma megjelenésének vagy a feltekeredett enzim aktivitásának hiányát valószínűsíti. Az Asn38 helyén aszpartátot tartalmazó mutánst abnormális viselkedés jellemezte: a részleges ön-kihasítás csonkolt proteázt eredményezett, amely a mutációval bevitt új hasítási helyre vagy erőteljesen megváltozott specificitásra utal (4.1.4.2. ábra). A mutációs érzékenység túlmutat a szubsztátkötő zsebeket alkotó aminosavrészekben. A számítógépes modell alapján a BLV PR Asn97 és a Lys98 nem vesz részt közvetlenül a ligand kötésében, míg a megfelelő HIV-1 PR Thr80 és Pro81 igen (4.1.1.1. táblázat); mindemellett mindkét aminosavrész mutációja (D97T (az adat nincs feltüntetve) és K98P) az enzimaktivitás teljes elvesztésével járt.

Csak egyetlen BLV PR mutáns, a W99V volt képes önmagát maradéktalanul kihasítani a fúziós fehérjéből, ezzel szemben a HTLV-1 esetében (a *flap* mutánst kivéve) a mutánsok egyike sem volt képes még részlegesen sem önmaga kihasítására az expresszió során (4.1.4.1. táblázat). A HIV-1 PR esetén, a vad típusú BLV és HTLV-1 proteázokhoz hasonlóan, közel 100%-os folding-képesség tapasztalható (Grinde és mtsai., 1992; Louis és mtsai., 1999b). Számos gyógyszerrezisztens HIV-1 PR mutáns a vad típusú enzimhez hasonló folding-képességgel rendelkezik (Gulnik és mtsai., 1995; Ermolieff és mtsai., 1997; Mahalingam és mtsai., 1999; Fehér és mtsai., 2002), azonban néhány egyszeres HIV-1 PR mutánsnál megfigyelhető volt ezen hajlam jelentős romlása is (Fehér és mtsai., 2002). Ez azt bizonyítja, hogy miközben a vad-típusú szekvencia optimálisnak látszik, addig egyszeres mutációk is jelentős hatást gyakorolhatnak az enzim feltekeredésére, amely befolyásolhatja a mutáns proteáz szekvenciákat hordozó vírusok életképességét.

Az önprocesszáló hajlamot nem mutató mutáns fehérjék proteolitikus aktivitásainak hiányát oligopeptid szubsztráttal történő, HPLC alapú mérésekkel is igazoltuk. Koncentrált, nagy tisztaságú MBP-PR fúziós proteáz-készítményeket használtunk (az adatok nincsenek feltüntetve), mivel korábban kimutatták, hogy a retrovirális proteázok MBP-fúziós formában is a processzált formával összevethető mértékű aktivitást mutatnak (Fenyőfalvi és mtsai., 1999; Fehér és mtsai., 2002). Azokat a mutáns proteolitikus enzimeket, melyek jelentős mértékben képesek voltak önmagukat a fúziós fehérjéből kihasítani, a vad típusú BLV proteázhoz hasonló módon ioncserés kromatográfiával megtisztítottuk (az N38D mutáns csak fúziós formában maradt aktív) és meghatároztuk illetve összehasonlítottuk a folding képességeik mértékét, valamint az

előzőekben is használt HTLV-1 CA/NC hasítási helyet tartalmazó oligopeptidre mért kinetikai állandóikat (4.1.4.1. táblázat). Az egyes mutánsoknál kapott K_M értékek hasonlóak voltak a vad típusú enzimnél mért értékekhez (az N38D mutánst kivéve), de a katalitikus hatékonyságok drámaian lecsökkentek, csakúgy, mint a HTLV-1 PR esetén (Kádas és mtsai., 2004). Eredményeink azt sugallják, hogyha nem is kizárólagos, de szoros kapcsolat van az aktív szerkezeti forma felvételére való hajlam és az önprocesszálo képesség között.

Összességében azt mondhatjuk, hogy a BLV PR a HTLV-1 proteázhoz hasonlóan kevésbé tolerálja mind a szubsztrátkötő, mind az egyéb helyeit érintő mutációkat, szemben a HIV-1 PR viszonylagos érzéketlenségével. Érdeemes megjegyezni, hogy míg a HIV-1 mutációs gyakorisága magas, addig HTLV-1 (és vélhetően BLV) fertőzés után a vírus replikációja nem exogén vírusrészecskék termelésével, hanem a fertőzött sejtek osztódásával történik, kikerülve a hibageneráló reverz transzkripció lépést. Ezért a BLV és a HTLV-1 evolúciósan sokkal konzerváltabb, mint a HIV-1. Végeredményben tehát a deltaretrovírus proteázok nem mentek végig azon az evolúciós fejlődésen, amely optimalizálta a HIV-1 proteázt, így például a mutációkra történő rugalmas reagáló képességben.

4.1.4.1. táblázat: A **vad-típusú** és mutáns BLV (A) és HTLV-1 (B); **aktív** és **inaktív**; enzimek érintett szubsztrátkötő zsebeinek, HTLV-1 CA↓NC hasítási helyet reprezentáló peptid (KTKVL↓VVQPK) hidrolíziséhez köthető kinetikai paramétereinek, valamint önprocesszáló és folding képességeinek összehasonlítása.
n.m.: nem meghatározott; csekély fokú hidrolízist tapasztaltunk tömény ezimel történő inkubálás esetén.
nem hasadt: nem tapasztaltunk hidrolízist, 24 órán át tartó, tömény ezimel történő inkubálás esetén sem.

A

Enzim	Érintett zseb vagy régió ^a	Ön-processzálás/ Folding képesség(%) ^b	K _M (mM)	k _{kat} (s ⁻¹)	k _{kat} /K _M (mM ⁻¹ s ⁻¹)
BLV PR (vad-típus)	–	100/100	0.0110 ^c	0.270 ^c	24.5 ^c
BLV PR (N38D fúziós forma)	S4, S2	42/21	0.1800	0.023	0.13
BLV PR (V57I)	S4, S2	67/80	0.0075	0.006	0.80
BLV PR (L58G fúziós forma)	S4, S3, S2	0/n.m.	nem hasadt		
BLV PR (A60I fúziós forma)	S3, S2, S1	0/n.m.	nem hasadt		
BLV PR (K98P fúziós forma)	S3, S1	0/n.m.	nem hasadt		
BLV PR (W99V)	S3, S1	100/69	<0.0060	0.003	0.56 ^d
BLV PR (V57I/L58G/A60I) – Flap	Mind	12/2.7	0.0300	0.016	0.53
BLV PR (D97T/K98P/W99V fúziós forma) – Roof	S3, S1	0/n.m.	nem hasadt		
BLV PR (V56I/L58G/A60I/D97T/K98P/W99V fúziós forma)	Mind	0/n.m.	nem hasadt		

B

Enzim	Érintett zseb vagy régió ^a	Folding képesség(%) ^b	K_M (mM)	k_{kat} (s ⁻¹)	k_{kat}/K_M (mM ⁻¹ s ⁻¹)
BLV PR (vad-típus)	–	100	0.0110 ^c	0.270 ^c	24.5 ^c
HTLV-1 PR (vad-típus) ^e	–	100	0.063	10.0	158.7
HIV-1 PR (vad-típus) ^e	–	100	0.16	3.6	22.5
HTLV-1 PR (M37D) ^f	S4, S2	n.m.	nem hasadt		
HTLV-1 PR (V56I) ^f	S4, S2	n.m.	n.d.	<0.001	n.d.
HTLV-1 PR (L57G) ^f	S4, S3, S2	n.m.	nem hasadt		
HTLV-1 PR (A59I) ^f	S3, S2, S1	n.m.	0.438	(0.021)	(0.05)
HTLV-1 PR (N97P) ^f	S3, S1	n.m.	0.127	(0.002)	(0.02)
HTLV-1 PR (W98V) ^f	S3, S1	n.m.	0.200	(0.002)	(0.01)
HTLV-1 PR (V56I/L57G/A59I) – Flap ^f	Mind	24	0.155	1.68	10.87
HTLV-1 PR (N96T/N97P/W98V) – Roof ^f	S3, S1	n.m.	nem hasadt		
HTLV-1 PR (V56I/L57G/A59I/N96T/N97P/W98V) ^f	Mind	n.m.	nem hasadt		

^aMivel a PR aktív formája homodimer, a másik monomer megfelelő zsebeit (pl. S4', S2', stb.) szintén érintettek a mutációk során.

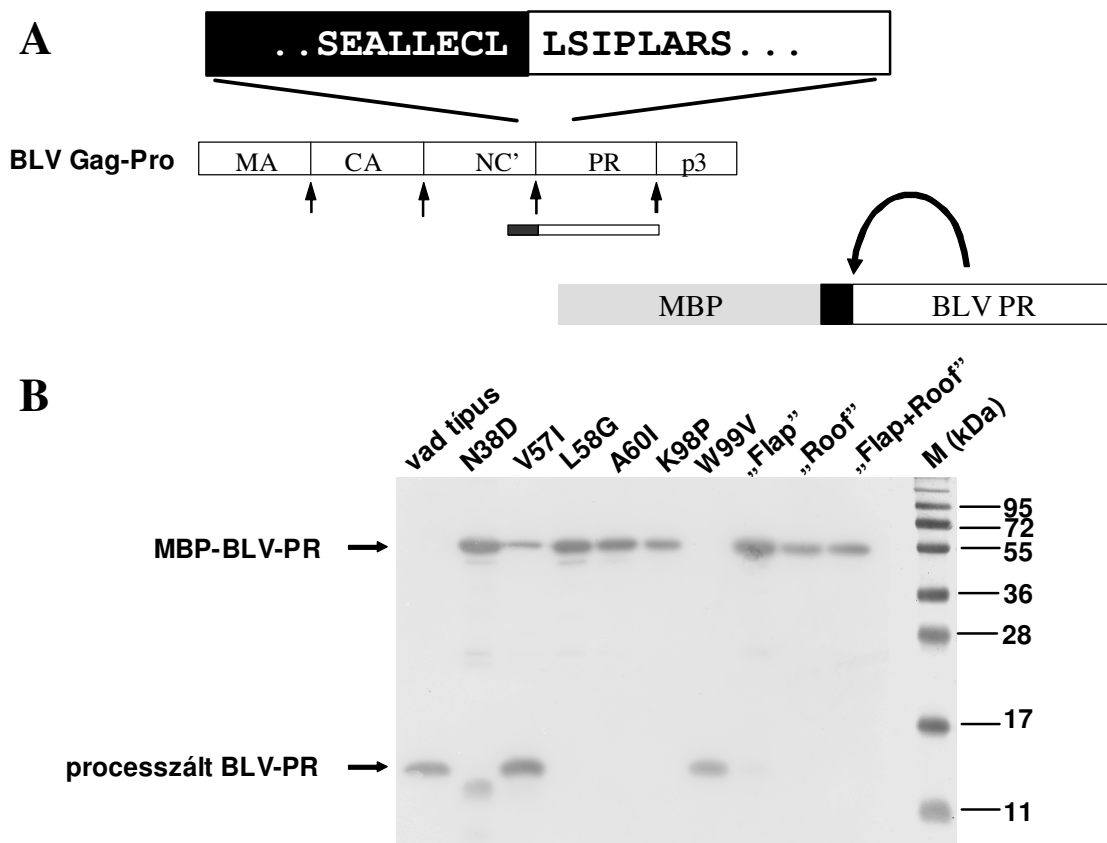
^bAz ön-processzási hatékonyságot immunoblot membrán denzitometriás kiértékelésével, a folding képességet az aktív centrum titrálással meghatározott aktív enzim mennyiségének és a teljes fehérje mennyiségének összehasonlításával határoztuk meg. A nehezen detektálható aktivitású enzimeknél ez az arány nem volt meghatározható. Ezeknél a mutánsoknál a zárójelben megadott katalitikus állandót a fehérjekoncentrációk felhasználásával számoltuk ki.

^cA 4.2.3 táblázatból átvéve.

^dEzen enzim esetében a specificitási állandót kompetíciós méréssel határoztuk meg, KTKVA↓VVQPK szubsztrátot használva.

^eEzek az adatok a Tózsér és mtsai., 2000 referenciából származnak.

^fA hozzá tartozó értékek átvéve: Kádas és mtsai., 2004.



4.1.4.2. ábra: Vad-típusú és mutáns BLV proteázok expressziója MBP-fúziós fehérje formájában

- A. Munkánk során használt fúziós fehérjék sematikus ábrája. A nyolc aminosav hosszúságú, az önkiválasztást lehetővé tevő N-terminális túlnyúló szekvenciát feketével jelöltük és külön kiemeltük a Gag-Pro polipeptide jelképező egyszerűsített ábra fölött.
- B. A vad-típusú és mutáns BLV proteázok önprocesszálozó képességét bemutató immunoblot fotója. A fúziós fehérjéket *E. coli* sejtekben expresszáltattuk és immunoblottal analizáltuk az egyes enzimek önprocesszálozó képességét. Az immunoblothoz BLV proteáz ellenes nyúl-antiszérumot használtunk. A BLV PR mutált aminosavait az egyes minták fölött megjelenítettük.

4.1.5. A BLV PR gátolhatósági profilja

Számos HIV-1 PR inhibitort klinikai gyakorlatban is használnak. Köztük tartjuk számon az indinavir, saquinavir, nelfinavir, ritonavir és amprenavir inhibitorokat is. Megvizsgáltuk, hogy ezen és más egyéb retrovirális gátlószerek milyen hatást gyakorolnak a BLV proteáz aktivitására. A legtöbb közülük korábban már tesztelve volt a munkacsoportunk által kifejlesztett és a HIV-1 és HTLV-1 proteázokon jól működő, nagy kapacitású mikrotiter lemezen alapuló fluoreszcens (Bagossi és mtsai., 2004), illetve a hagyományos HPLC eljárással (Louis és mtsai., 1999a). Az összehasonlíthatóság kedvéért a HIV-1 és HTLV-1 proteolitikus enzimjeire fluoreszcens módszerrel mért eredményeket is a 4.1.5.1. táblázatba foglaltuk. Miközben a HIV-1 PR ellenes vegyületek (inhibitor 1-11) a HIV-1 proteázt $K_i < 30$ nM értékkel gátolták, addig a BLV proteázt csak gyenge vagy gyakorlatilag elhanyagolható mértékben, kivételt csak az amprenavir és a Compound 3 jelentett. Érdekes, hogy mind a négy, szubsztrátszekvencia-alapú, HTLV-1 PR inhibitor erősebben gátolta a BLV fehérjebontó enzimjét, mint magát a HTLV-1 proteázt, ezzel szemben a HIV-1 PR ellen hatástalannak bizonyultak (4.1.5.1. táblázat). Ez a hatás egybecseng a megfelelő oligopeptid szubsztrátokkal BLV proteázra mért alacsonyabb K_M értékekkel (a Lys-Thr-Lys-Val-Leu↓Val-Val-Gln-Pro-Lys oligopeptidre a BLV, HTLV-1 és HIV-1 enzimekkel kapott kinetikai állandókat lásd a 4.1.4.1. B táblázatban). Egy e gátlószerek közül, az IB-268 nagyon hatásosan blokkolta a BLV PR működését ($K_i = 13$ nM) alacsony ionerősség mellett, ami alkalmas lehet *in vivo* BLV PR gátlási kísérletek elvégzésére. Ez a vegyület magas ionerősségű kísérletes rendszert használva (HPLC alapú módszer) még hatékonyabb volt ($K_i = 3.1$ nM) s így sikerrel alkalmazhattuk az enzim aktív-centrum titrálására (4.1.4.1. táblázat). A K_i értékének erőteljes ionerősség-függését a HTLV-1 és HIV-1 proteázokra korábban leírták (Bagossi és mtsai., 2004). Az amprenavir kivételével, melyre lényegesen másképp reagált a BLV PR és a HTLV-1 PR, a két deltaretrovírusra mért gátlási állandók jól korrelálnak ($R = 0.91$) egymással (az adat nincs feltüntetve).

4.1.5.1. táblázat: **BLV**, **HTLV-1** és **HIV-1** proteázok gátlhatósági profilja HIV-1 PR ellenes, illetve HTLV-1 hasítási helyen alapuló szubsztrát-analóg inhibitorokkal

Inhibitor	BLV PR K _i (nM)	HTLV-1 PR K _i (nM)	HIV-1 PR K _i (nM)
1. Saquinavir ^a	> 20 000	> 20 000 ^b	0.001 ^b
2. Ritonavir	11 472	> 20 000 ^b	0.366 ^b
3. Nelfinavir	> 20 000	> 20 000 ^b	0.088 ^b
4. Amprenavir	114	> 20 000 ^b	0.001 ^b
5. Indinavir	9 475	3 475 ^b	0.440 ^b
6. DMP-323	> 20 000	> 20 000 ^b	0.914 ^b
7. Compound 3 ^c	63	244	5.5
8. HBY-793 ^d	1 005	439	26
9. UK 88,947 ^e	> 20 000	> 20 000	1.5
10. KH 164 ^f	1 715	5 605	28
11. LP-149 ^g	12 959	12 582	0.54
12. Ala-Pro-Gln-Val-Sta-Val-Met-His-Pro ^a	181	2 300 ^b	530 ^b
13. Lys-Thr-Lys-Val-Sta-Val-Gln-Pro-Lys ^a	10 857	> 20 000 ^b	> 20 000 ^b
14. IB-269: Ala-Pro-Gln-Val-Leu-r-Pro-Val-Met-His-Pro	88	465 ^b	> 20 000 ^b
15. IB-268: Lys-Thr-Lys-Val-Leu-r-Val-Val-Gln-Pro-Lys	13	298 ^b	11 215 ^b

^aE gátlószerek korábban tesztelve voltak HPLC alapú módszerrel (Zahuczky és mtsai., 2000).

^bÁtvéve: Bagossi és mtsai., 2004.

^cCompound 3 (Grobely és mtsai., 1990) hatékony gátlószere a HIV-1, HIV-2 és EIAV proteázoknak.

^dEz a vegyület gátolja az EIAV proteázt 0.1 nM K_i értékkel (Powell és mtsai., 1996).

^eE vegyületet HIV-1 ellen tervezték (Baboonian és mtsai., 1991).

^fMérsékelt gátlószere az MMLV proteáznak 62 nM K_i értékkel (Menendez és mtsai., 1993).

^gEz a sztatin alapú inhibitor gátlást mutat a FIV PR ellen 260 nM K_i értékkel (Wlodawer és mtsai., 1995).

4.2. TIZENEGY KÜLÖNBÖZŐ RETROVIRÁLIS PROTEÁZ S2 SZUBSZTRÁTKÖTŐ HELYEINEK ÖSSZEHASONLÍTÓ VIZSGÁLATA

Korábban munkacsoportunk karakterizálta a HIV-1, HIV-2, EIAV és AMV proteázok specificitását 1-es típusú (HIV-1 MA/CA: VSQNY↓PIVQ) hasítási helyen alapuló peptidkészlet felhasználásával (Tózsér és mtsai., 1992, 1996; Weber és mtsai., 1993). Az is kiderült, hogy a relatív aktivitás értékek és a k_{kat}/K_M kinetikai paraméterek között erős korreláció áll fenn, így a mért enzimaktivitás értékek megfeleltethetők a specificitási állandóknak (Tózsér és mtsai., 1996). E korábbi tanulmányokat jelen vizsgálatunk kiterjesztette a BLV, valamint az MPMV, MMTV, MMLV, HTLV-1, HFV és WDSV fehérjebontó enzimjeire, s így minden retrovírus nemzetség legalább egy tagja karakterizálva lett. Kísérleteink komoly előnye, hogy ugyanazon laboratóriumban, ugyanazt az (1-es típusú HIV-1 MA/CA hasítási helyet magába foglaló) peptidsorozatot használva, ugyanolyan reakció körülmények mellett végeztük őket, így az eredmények közvetlenül összehasonlíthatóak.

4.2.1. Relatív enzimaktivitások meghatározása és összehasonlítása, P2 pozícióban aminosavcseréket tartalmazó, 1-es típusú természetes hasítási helyet reprezentáló oligopeptid szubsztráton

Az eredeti szubsztrát P2 Asn aminosavrészének középmeretű hidrofób aminosavrészekre cserélése jól hidrolizálható peptideket eredményezett a legtöbb enzim számára (4.2.1.1 táblázat). A BLV proteolitikus enziménél tapasztaltuk a legnagyobb változást, melynek P2 helyen leucint tartalmazó legjobb szubsztrátjára mért relatív aktivitás érték majdnem 200-szor volt nagyobb az eredetire mértnél. Szintén nagyon lényeges a változás a HTLV-1 és a HFV proteázok esetében, ahol az eredeti nem hasadó oligopeptid hasíthatóvá vált. A P2 Leu tartalmú peptid szintén a leginkább hasíthatónak bizonyult az MMLV PR esetén, ahogyan ezt már korábban közölték (Menendez-Arias és mtsai., 1994). A P2 Ile pedig az MMTV és a HTLV-1 PR számára volt a legjobb szubsztrát. Az AMV és MPMV proteázok a kisméretű hidrofób alanint, az EIAV PR a kissé poláros ciszteint kedvelték a legjobban, míg a HIV-1 PR az erősen poláros eredeti aszparagint. Bár a HIV-2 és a WDSV PR esetében a Cys nyújtotta a legmagasabb értékeket, az eredeti P2 aszparaginra mért is hasonlóan adódott (4.2.1.1 táblázat). A HFV PR azonos aktivitással (a kísérletes rendszer mérési hibáján belül) bontotta a P2 pozícióban Ala, Val vagy Cys tartalmú peptideket. A BLV PR, a HTLV-1 proteázhoz hasonlóan a hidrofób, viszonylag

nagyméretű aminosav-oldalláncokat (P2 Ile, Leu) kedvelte. A HIV-1 PR P2 Asn preferenciája meglehetősen egyedi, mivel a többi retrovirális proteáz ebben a pozícióban jobban elfogadta a hidrofób vagy valamelyest poláros aminosavrészeket.

Általános megállapításként elmondhatjuk, hogy a retrovirális proteolitikus enzimek számára egyaránt gyöngé szubsztrátot eredményez a P2 helyzetben megjelenő Phe vagy Gly: a molekuláris modellek azt sugallják, hogy a Phe túlságosan nagy, a Gly túlságosan kis méretű az S2 kötőhelyek számára.

4.2.1.1. táblázat: Retrovirális proteázok relatív enzimaktivitásainak összehasonlítása Val-Ser-Gln-Xaa-Tyr↓Pro-Ile-Val-Gln peptidet használva szubsztrátként.

	Lentivírus		Alfa- retrovírus	Bétaretrovírus		Gamma- retrovírus	Deltaretrovírus		Epsilon- retrovírus	Spuma- vírus	
	HIV-1 ^b	HIV-2 ^b	EIAV ^c	AMV ^d	MPMV	MMTV	MMLV	HTLV-1	BLV	WDSV	HFV
P2 aminosavrész	proteáz										
Gly	0.50	0.25	0.040	0.073	0.088	0	0.007	0	0.0006	0	0
Ala	2.5	1.5	2.0	1.9	1.02	0.14	0.76	0	0.098	0.95	1.05
Val^e	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Leu	0.30	0.75	0.28	0.20	0.53	0.35	3.6	3.0	3.9	2.0	0.18
Ile	0.50	0.25	0.52	0.59	0.70	1.9	1.2	3.3	1.3	0.59	0.038
Phe	0.15	0.25	0.080	0.014	0.018	0.22	0.12	0	0.023	0.23	0.066
Cys	4.5	2.8	2.9	1.6	0.90	0.59	1.9	0.67	0.094	2.8	1.14
Thr	0.10	0.075	1.3	0.041	0.18	0.11	0.43	0	0.042	0.18	0.063
<u>Asn</u>^f	5.0	2.5	0.40	0.045	0.18	0.015	0.24	0	0.021	2.6	0

^aAz osztályozás az International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) legutóbbi jelentésén alapul (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb>).

^bÁtvéve: Tózsér és mtsai., 1992.

^cÁtvéve: Weber és mtsai., 1993.

^dÁtvéve: Tózsér és mtsai., 1996.

^eA relatív aktivitásokat a Val-Ser-Gln-Val-Tyr↓Pro-Ile-Val-Gln peptiddel mért aktivitásra vonatkoztattuk. A korábban közölt értékeket átszámoltuk e szubsztrátra.

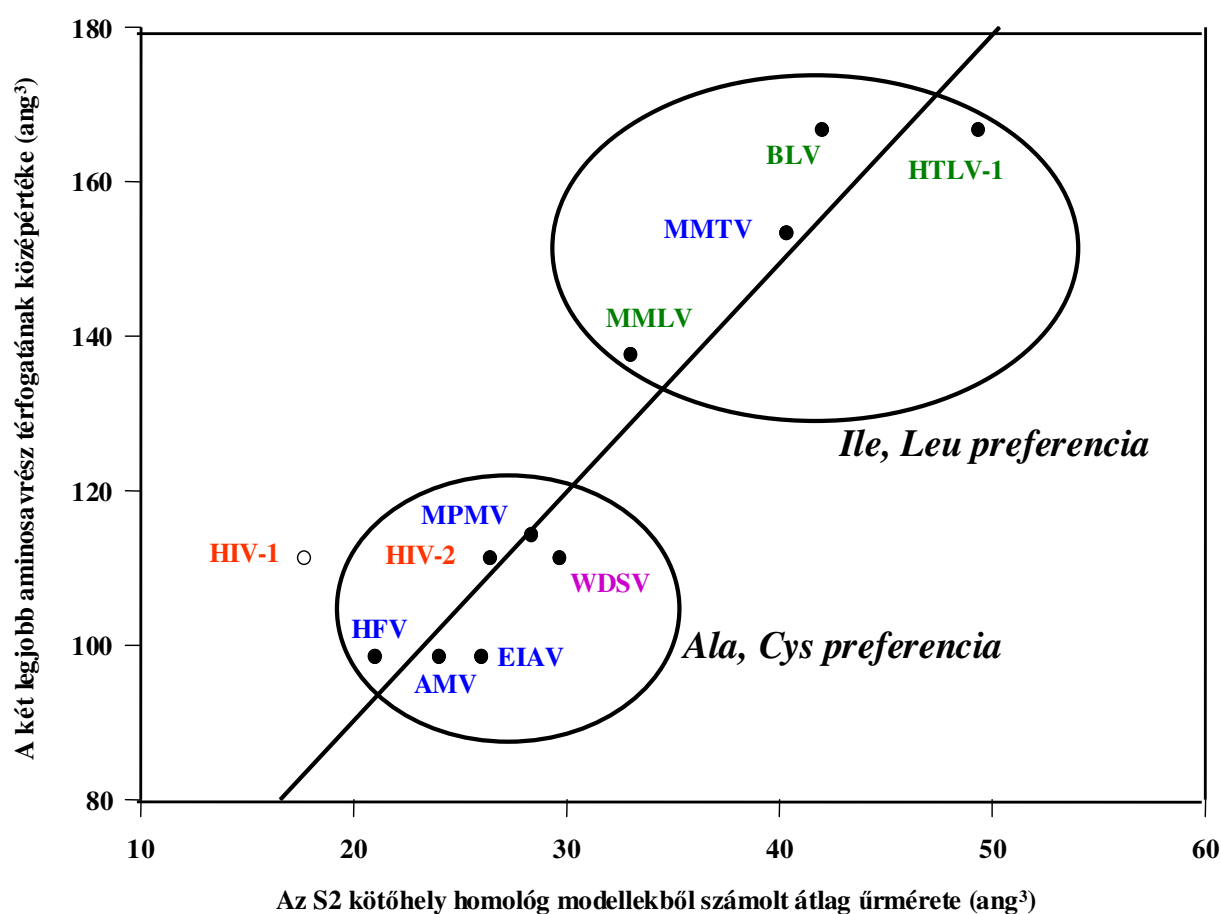
^fAz eredeti Asn aminosavrészt aláhúzással jelöltük.

4.2.2. Az S2 szubsztrátkötő helyek homológ modelljeinek felépítése és a mért enzimaktivitások molekuláris szintű értelmezése

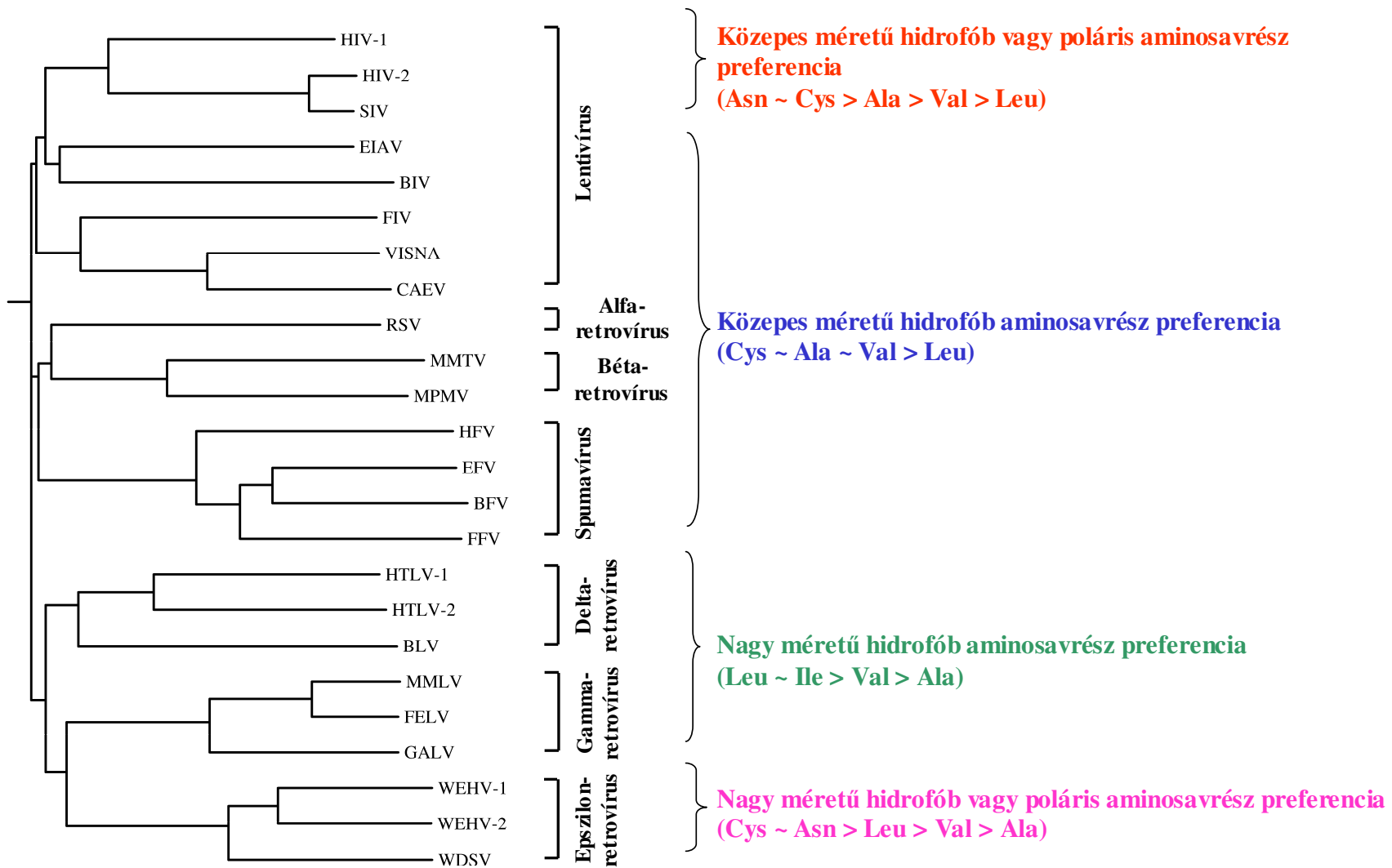
A különböző retrovirális proteázok specificitásbeli különbségeinek megértéséhez felépítettük az összes vizsgált enzim molekuláris modelljét, azonos eljárást használva. A modellek jóságának becslését az RMS (*root mean square*) eltérések kiszámításával végeztük, öt nagyfelbontású kristályszerkezetet felhasználva mintaként. A kísérletek elvégzésekor a HTLV PR három-dimenziós szerkezete még nem állt rendelkezésünkre. Természetesen a legkisebb értékeket (0.3-0.5 Å) azokra a modellekre kaptuk, melyeket saját kristályszerkezetükhöz mértünk (HIV-1, HIV-2, EIAV és RSV PR), és azok hasonló értéktartományban mozogtak, mint ahogy azt találták ugyanazon enzim különböző kristályszerkezeteinek összehasonlításakor (Chothia és Lesk, 1986). Az egyéb modellek esetében hasonló RMS eltéréseket (0.9-2.9 Å) számoltunk, mint amelyeket maguk közt a kristályszerkezetek közt kaptunk (1.0-2.7 Å); és hasonló összefüggést láttunk az RMS értékek és a szekvencia-hasonlóságok között, mint amelyenek a három-dimenziós szerkezetek között megfigyelhetőek (Chothia és Lesk, 1986).

A számítógépes modellek alapján a retrovirális proteázok S2 kötőhelyei rendszerint kicsi, hidrofób zsebek. Az S2 méretét tekintve erősebben meghatározott, mint a többi alzseb, különösképp az S3 és S4. Az S2 kötőhelyet alkotó aminosavrészek kb. fele konzervált (1.4.2 ábra). A legtöbb enzim *flap* régiójának teteje elágazó-láncú aminosavrészekből (Ile, Val, Leu) áll, de a BLV, a HTLV-1 és az MMLV proteázok a kisebb Ala alegységet tartalmazzák, mely legalább részben felelős lehet ezen enzimek nagyobb méretű P2 Ile és Leu kedvezményezettségeinek az S2 szubsztrátkötő helyeikben. Korábbi vizsgálatok azt mutatták, hogy két S2 aminosavrész kritikus szerepet tölt be az általunk használt peptidsorozat esetén annak meghatározásában, hogy az adott enzim P2 Leu vagy P2 Val preferenciát mutat-e: ezek a retrovirális proteázok HIV-1 PR Val32 és Ile47 alegységeinek megfelelő oldalláncai (Tózsér és mtsai., 1996). Ha mindkét pozícióban Ile van, a P2 preferencia Val, ha mindkét pozícióban Val helyezkedik el (BLV PR, HTLV-1 PR) a P2 preferencia Leu.. Úgy tűnik, hogy a HIV-1 és HIV-2 proteázok Asp30 alegysége okozza az említett enzimek S2 helyének polárosabb oldallánccokat elfogadó képességét (Cameron és mtsai., 1993; Tózsér és mtsai., 1992; Boross és mtsai., 1999), hiszen más proteolitikus enzimek itt hidrofób aminosavrészeket tartalmaznak, illetve a hidrofilek a zsebhez képest kifelé állnak. Valószínűsíthetően az S2 kötőhelyek fő specificitás-meghatározó tulajdonsága a méret-összeférhetőség, elektrosztatikus hozzájárulás csak a főemlős lentivírus fehérjebontó enzimek esetében van jelen (HIV-1, -2,

SIV). E megállapítást alátámasztandó, kiszámoltuk a P2 Gly szubsztráttal alkotott komplexek S2 zsebeinek méretét, majd a kapott értékeket ábrázoltuk a két legjobb P2 aminosavrész-cserének bizonyult oldalláncok átlagtérfogatának függvényében (4.2.2.1 ábra). A pontok (a HIV-1 kivételével) egy egyenes mentén helyezkednek el ($r = 0.96$) és két csoportra oszthatóak az enzimek P2 aminosavrész kedvezményezettsége alapján. A BLV PR egy csoportba került a közeli rokon HTLV-1 és a nem távoli rokon MMLV proteázokkal. A tapasztalt tendenciát megerősíti a retrovirális proteázok szekvenciája alapján felépített törzsfa analízise is (4.2.2.2 ábra).



4.2.2.1. ábra: Különböző retrovirális proteázok által két legmagasabb relatív aktivitással hasított P2-es aminosavrész átlagméreteinek ábrázolása az S2 szubsztrátkötő helyek molekuláris modellekből meghatározott átlag űrméreteinek függvényében (ang, angström: 10^{-10} m).



4.2.2.2. ábra: Retrovirális proteázok törzsfája. Az eltérő S2 specificitású csoportok külön jelölve.

4.2.3. 1-es típusú természetes hasítási hely szekvenciák P2 pozíciójában megjelenő aminosavrések vizsgálata

A tanulmányozott retrovirális proteázok természetes hasítási helyeinek P2 pozíciójában található aminosavrések általában jó egyezést mutatnak az S2 kötőhelyek tanulmányozásánál találtakkal (4.2.3.1. táblázat). A BLV, a HTLV-1 valamint a WDSV és a HFV PR esetén nincs ismert 1-es típusú hasítási hely. A hat HIV-1 és HIV-2 hasítási hely öt esetben tartalmaz P2 helyen aszparagint, az egyetlen P2 Leu tartalmú pedig igen alacsony hatékonysággal hasadt. Az EIAV PR S2 zsebének specificitása átmenetinek mutatkozik a főemlős lentivírusok (poláros aminosavréssz kedvezményezettsége) és az alfa-, béta- és gammaretrovírusok között (kis méretű, hidrofób aminosavréssz preferencia: a legjobban kedvelt alegységek VSQXY↓PIVQ szekvencia-környezetben a Cys és az Ala), míg az EIAV hasítási helyekben Glu és Thr található. Az S2 kötőhely térképezésénél az AMV proteáz esetén legjobbnak bizonyult P2 aminosavréssz (Ala) megjelenik a természetes hasítási helyeiben is, viszont az MPMV és MMTV helyek a kevésbé kedvelt izoleucint illetve treonint tartalmazzák e pozícióban (4.2.3.1. táblázat). Egyetlen MMLV hasítási hely szekvenciában jelenik meg a leginkább preferált P2 Leu, miközben a többiben a kevésbé tolerált alanin fordul elő. A vizsgálatainkban legkedveltebb P2 alegységek és a természetes hasítási helyekben található aminosavrések között fellelhető ellentmondást okozhatja az eltérő szubsztrát aminosavsorrend, amely pl. a HIV-1 esetében bizonyítottan erős hatást gyakorol a kötőhelyek (köztük a S2) preferenciájára (Tózsér és mtsai., 1997); valamint fennáll a lehetősége annak is, hogy nem minden retrovirális hasítási hely ment keresztül a hatékonyabb hidrolízist eredményező evolúciós folyamaton (Fehér és mtsai., 2002).

A megfelelő van der Waals kölcsönhatások kialakulásának fontosságát és az S2 kötőhely minél teljesebb kitöltését a gyógyszer-rezisztenciában megjelenő mutációk létrejötte is igazolja. Az egyik leglassabb HIV-1 hasítási hely, az NC/p1 (RQAN↓FLGK) P2 helyen kis méretű alanint tartalmaz, amely nem képes teljesen kitölteni a zsebet, ahogyan azt kinetikai, modellezési (Fehér és mtsai., 2002) és kristályszerkezeti vizsgálatok (Prabu-Yeyabalan és mtsai., 2002) mutatják. Ez az aminosavréssz gyakran változik valinra gyógyszeres kezelés hatására (Doyon és mtsai., 1996), mely lényegesen jobban illeszkedik az alzsebbe.

4.2.3.1. tálázat: 1-es típusú természetes hasítási helyek (-Phe/Tyr↓Pro-) a vizsgált retrovirális proteázok esetében.

Vírus ^a	Hasítási hely ^b	Oligopeptid szekvencia	K_{kat}/K_M ($mM^{-1} s^{-1}$)
HIV-1 ^c	MA/CA	VSQNY↓PIVQ	45.3
	in p6	DKELY↓PLTSL	0.02
	TF/PR	VSFNF↓PQITL	6.9
	PR/RT	CTLNF↓PISP	24.1
HIV-2 ^c	MA/CA	EKGGNY↓PVQHV	3.7
	NC/p6	KPRNF↓PVAQV	1.0
EIAV ^d	MA/CA	PSEELY↓PIMID	76.3
	NC/p9	QKQTF↓PIQQK	38.5
AMV ^e	RT/IN	TFQAY↓PLREA	0.015
MPMV	p12/CA	PKDIF↓PVTET	30.6
MMTV	n/CA	LTFTF↓PVVFMRR	6.3
MMLV	MA/p12	PRSSLY↓PALTP	2.0
	p12/CA	TSQAF↓PLRAG	1.7

^aHTLV-1, BLV, WDSV vagy HFV esetén nincs ismert 1-es típusú hasítási hely. Az összes mérés azonos kísérletes feltételek mellett lett kivitelezve.

^bA p betűt követő szám a fehérje moltömegét jelzi kilodaltonban. Az MMTV esetében az n egy kicsi, pontosan nem azonosított (valószínűsíthetően a CA előtt elhelyezkedő) peptidet jelöl.

^cÁtvéve: Tózsér és mtsai., 1991b.

^eÁtvéve: Tózsér és mtsai., 1991b.

^fÁtvéve: Tózsér és mtsai., 1996.

A BLV PR S2 szubsztrátkötő helyét mind 1-es (VSQNY↓PIVQ), mind 2-es típusú hasítási hely (KTKVL↓VVQPK) szekvenciában aminosavrész-cseréket tartalmazó peptidsorozattal vizsgálva viszonylag nagynak találtuk (a P2 Leu vagy Ile csere bizonyult a legjobbnak), bár az utóbbi esetben a zseb flexibilisebbnek mutatkozott (a Phe oldallánc is kedvező volt). Jelentékeny eltérést tapasztaltunk a hidrofilitás tekintetében: a 2-es típusú hasítási hely esetén megfigyelt poláros aminosavrész-tolerancia az 1-es típusú hasítási hely tanulmányozása során nem jelentkezett.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A doktori értekezésemben felhasznált munkáink során elvégeztük a BLV PR részletes enzimológiai vizsgálatát és a kapott eredmények alapján jellemeztük más retrovirális proteázokkal (elsősorban a HTLV-1 és HIV-1 enzimekkel) összehasonlítva.

A retrovírusok HTLV/BLV családjába tartozó BLV proteolitikus enzimjének tanulmányozása során felépítettük a proteáz számítógépes modelljét. Megvizsgáltuk a BLV PR szubsztrátspecificitását retrovírusokban előforduló természetes hasítási helyeket tartalmazó oligopeptid szubsztrátokkal. Szemben a HTLV-1 proteázzal, és hasonlóan a HIV-1 proteázhoz, a BLV PR képes volt bontani a peptidek többségét (általában az eredeti hasításnak megfelelő aminosav mellett), széles specificitást jelezve. További specificitásvizsgálatokat végeztünk az erre alkalmasnak bizonyult, HTLV-1 2-es típusú CA/NC hasítási helyen alapuló, egyszeres aminosavrész-cseréket tartalmazó oligopeptid szubsztrátsorozaton. A BLV PR tág szubsztrát-toleranciáját ezen kísérletsorozat is megerősítette, mind a 42 oligopeptidet el tudta hidrolizálni, ráadásul a P2 helyen lizint és a P1' helyen aszpartát cserét tartalmazó peptideken kívül $k_{\text{kat}}/K_M \geq 1 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ hatékonysággal. A BLV PR szubsztrátkötő régiója kevésbé kiterjedtnek bizonyult, mint a HTLV-1 proteázé. Bár mindkét enzim a nagyobb, hidrofób aminosavrészeket kedvelte S2, S1 kötőhelyein, a BLV PR sokkal inkább elfogadta a hidrofíli, sőt töltött oldalláncokat is. A kritikus S2 zsebet kiemelve megállapíthatjuk, hogy a specificitás szempontjából a méret meghatározó, de a zsebet alkotó hidrofílebb aminosavrészek hozzájárulásának köszönhetően a BLV PR meglehetősen jól tolerálta a poláros aminosavrész-cseréket is. Mindazonáltal, legtöbb tekintetben a BLV PR egyedi szubsztrátkötő zsebeinek specificitása a HTLV-1 proteázéhoz áll közel, összhangban a zsebeket valószínűsíthetően felépítő aminosavrészek (a HIV-1 proteolitikus enzimjéhez képest) nagyobb fokú hasonlóságával. Kísérleteink folytatásaként HIV-1 PR felé mutató mutációkat hoztunk létre a BLV PR szubsztrátkötő zsebeiben. Több aminosavrész-csere feltekeredésre képtelen és/vagy inaktív fehérjét eredményezett, komoly mutációs érzékenységre utalva, ahogyan ezt a HTLV-1 PR esetében szintén, de valamivel kifejezettebben, a HIV-1 PR esetén pedig kevésbé tapasztalták. Teszteltük a BLV proteázt különböző retrovirális proteázok ellen tervezett inhibitorokkal is. Figyelemre méltó, hogy a BLV PR fogékonyabb a vizsgált gátlószerekre, mint a HTLV-1 (köztük a HTLV-1 ellen tervezettekre is). Úgy tűnik, e tulajdonság összefüggésben van a BLV proteázra általánosan

alacsonyabbnak mért K_M értékekkel.

Az enzimek működése szempontjából kritikus szerepet betöltő S2 szubsztrátkötő zsebre szűkített vizsgálatainkban mért enzimaktivitások és kinetikai állandók, valamint a felépített molekuláris modellek tanulmányozása alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a BLV PR S2 szubsztrátkötő helye viszonylag nagy (a P2 Leu csere bizonyult a legjobbnak), de az előző kísérletsorozattól eltérően számottevő poláros aminosavrész-preferenciát nem tapasztaltunk. Ez az eltérés arra utal, hogy a retrovirális proteázok szubsztrátspecificitása erősen függ a hasítási hely környezetétől. Általánosságban azt mondhatjuk, hogy a főemlős (HIV-1, HIV-2, SIV) lentivírus proteázok kivételével az S2 zseb specificitása alapvetően méretfüggő és ez a tulajdonság a legtöbb esetben a természetes hasítási hely szekvenciákban is tükröződik. Az aminosavrész-kedvezményezettségek alapján olyan filogenetikai vírus-csoportok különülnek el, melyek jól követik a proteáz-szekvencia illesztés alapján felépített törzsfá menetét, de nem esnek annak csoportjaival pontosan egybe.

Összességében elmondhatjuk, hogy a mutációkkal és a gátlószerekkel szembeni érzékenységük alapján, a specificitásbeli különbségeik ellenére, a BLV és a hozzá kapcsolódó állatkísérletes rendszer jó modellnek bizonyulhat HTLV-1-t célzó inhibitorok kipróbálásához. Bízunk benne, hogy ezen értekezésben foglaltak érdemben hozzájárulnak a retrovirális proteázok szubsztrátspecificitásának jobb megértéséhez, amely segítséget nyújthat olyan széles hatástartományú inhibitorok tervezésében, melyek sikeresen gátolják a gyógyszeres kezelés hatására megjelenő, életképes HIV-1 proteáz mutánsokat.

6. IRODALOMJEGYZÉK

- Altanerova, V., Holicova, D., Kucerova, L., Altaner, C., Lairmore, M. D. and Boris-Lawrie, K. (2004): Long-term infection with retroviral structural gene vector provides protection against bovine leukemia virus disease in rabbits. *Virology* 329: 434-439.
- Babe L.M. and Craik C.S. (1997): Viral proteases: evolution of diverse structural motifs to optimize function. *Cell* 91: 427-430.
- Baboonian, C., Dalgleish, A., Bountiff, L., Gross, J., Oroszlan, S., Rickett, G., SmithBurchnell, C., Troke, P. and Merson, J. (1991): HIV-1 proteinase is required for synthesis of pro-viral DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179: 17-24.
- Bagossi, P., Kadas, J., Miklossy, G., Boross, P., Weber, I. T. and Tozser, 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.
- Boross, P., Bagossi, P., Copeland, T.D., Oroszlan, S., Louis, J.M. and Tözsér, J. (1999): Effect of substrate residues on the P2' preference of retroviral proteinases. *Eur. J. Biochem.* 264: 921-929.
- 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: 248-54.
- Buehring, G. C., Philpott, S. M. and Choi, K. Y. (2003): Humans have antibodies reactive with Bovine leukemia virus. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 19: 1105-1113.
- Bukrinskaya, A., Brichacek, B., Mann, A. and Stevenson, M. (1998): Establishment of a functional human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcription complex involves the cytoskeleton. *J. Exp. Med.* 188: 2113-2125.
- Cameron, C. E., Grinde, B., Jacques, P., Jentoft, J., Leis, J., Wlodawer, A. and Weber, I. T. (1993): Comparison of the substrate-binding pockets of the Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus type 1 proteases. *J. Biol. Chem.* 268: 11711-11720.
- Cann, A.J. and Chen, I.S.Y. (1990): Human T-cell leukemia virus types I and II. in: Fields, B.N., Knipe, D.M. (eds) *Virology*, 2nd ed. Raven Press, Ltd., New York, pp. 1501-1519.
- Chothia, C., and A. M. Lesk. (1986): The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *Embo J.* 5: 823-826.
- Coffin, J.M. (1992): Genetic diversity and evolution of retroviruses. *Curr. Top. Microbiol.*

- Immunol. 176: 143-64.
- Coffin, J.M. (1996): Retrovirus restriction revealed. *Nature* 382: 762-763.
- 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.
- Davies, D.R. (1990): The structure and function of the aspartic proteinases. *Ann. Rev. Biophys. Chem.* 19: 189-215.
- Davis, D.A., Brown, C.A., Newcomb, F.M., Boja, E.S., Fales, H.M., Kaufman, J., Stahl, S.J., Wingfield, P. and Yarchoan, R. (2003): Reversible oxidative modification as a mechanism for regulating retroviral protease dimerization and activation. *J. Virol.* 77: 3319-3325.
- Doyon, L., G. Croteau, D. Thibeault, F. Poulin, L. Pilote, and D. Lamarre (1996): Second locus involved in human immunodeficiency virus type 1 resistance to protease inhibitors. *J. Virol.* 70: 3763-3769.
- Dunn, B.M., Gustchina, A., Wlodawer, A. and Kay, J. (1994) Subsite preferences of retroviral proteinases. *Methods Enzymol.* 241: 254-278.
- Ermolieff, J., X. Lin, and J. Tang. (1997): Kinetic properties of saquinavir-resistant mutants of human immunodeficiency virus type 1 protease and their implications in drug resistance in vivo. *Biochemistry* 36: 12364-12370.
- Fehér, A., Weber, I.T., Bagossi, P., Boross, P., Mahalingam, B., Louis, J.M., Copeland, T.D., Torshin, I.Y., Harrison, R.W. and Tözser, J. (2002): Effect of sequence polymorphism and drug resistance on two HIV-1 Gag processing sites. *Eur. J. Biochem.* 269: 4114-4120.
- Fehér, A., P. Boross, T. Sperka, S. Oroszlan, and J. Tözser (2004): Expression of the murine leukemia virus protease in fusion with maltose-binding protein in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 35: 62-68.
- Felsenstein, J. (1989): PHYLIP -- Phylogeny Inference Package. *Cladistics* 5: 164-166.
- Fenyőfalvi, G., P. Bagossi, T. D. Copeland, S. Oroszlan, P. Boross, and J. Tözser (1999): Expression and characterization of human foamy virus proteinase. *FEBS Lett.* 462: 397-401.
- Fodor, S. K., and V. M. Vogt (2002): Characterization of the protease of a fish retrovirus, walleye dermal sarcoma virus. *J. Virol.* 76: 4341-4349.
- Fersht, A. (1985): *Enzyme Structure and Mechanism*. pp. 111-112.

- Franke, E.K., Yuan, H.E. and Luban, J. (1994): Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature* 372: 359-362.
- Gallo, R.C. and Montagnier, L. (1988): AIDS in 1988. *Sci.Am.* 259: 41-48.
- Griffiths, J. T., Phylip, L. H., Konvalinka, J., Strop, P., Gustchina, A., Wlodawer, A., Davenport, R. J., Briggs, R., Dunn, B. M. and Kay, J. (1992): Different requirements for productive interaction between the active site of HIV-1 proteinase and substrates containing -hydrophobic*hydrophobic- or -aromatic*pro- cleavage sites. *Biochemistry* 31: 5193-5200.
- Grinde, B., Cameron., C.E., Leis., J., Weber, I.T., Wlodawer, A., Burstein., H. and Skalka, A.-M. (1992): Analysis of substrate interactions of the Rous sarcoma virus wild type and mutant proteases and human immunodeficiency virus type-1 protease using a set of systematically altered peptide substrates. *J. Biol. Chem.* 267: 9491-9498.
- Grobelny, D., Wondrak, E.M., Galardy, 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.
- Gulnik, S.V., Suvorov, L.I., Liu, B., Yu, B., Anderson, B., Mitsuya, H. and Erickson., J.W. (1995): Kinetic characterization and cross-resistance patterns of HIV-1 protease mutants selected under drug pressure. *Biochemistry* 34: 9282-9287.
- Gustchina, A., Kervinen, J., Powell, D. J., Zdanov, A., Kay, J. and Wlodawer, A. (1996): Structure of equine infectious anemia virus proteinase complexed with an inhibitor. *Protein Sci.* 5: 1453-1465.
- Haas, L., Divers, T., Casey, J.W. (1992): Bovine leukemia virus gene expression in vivo. *J. Virol.* 66: 6223-6225.
- Harrison, R.W. (1993): Stiffness and energy conservation in the molecular dynamics: an improved integrator. *J. Comp. Chem.* 14: 1112-1122.
- Harrison, R. W. (1999): A self-assembling neural network for modeling polymers. *J. Math. Chem.* 26: 125-137.
- Hayakawa, T., Misumi, Y., Kobayashi, M., Yamamoto, Y. and Fujisawa, Y. (1992): Requirement of N- and C-terminal regions for enzymatic activity of human T-cell leukemia virus type I protease. *Eur. J. Biochem.* 206: 919-925.
- Herger, B. E., Mariani, V. L., Dennison, K. and Shuker, S. B. (2004): The 10 C-terminal residues of HTLV-I protease are not necessary for enzymatic activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320: 1306-1308.
- 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.
- Jeang, K.T. (2001): Functional activities of the human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein: cellular signaling through NF-kappa B. *Cytokine Growth Factor Rev.* 12: 207-217.
- 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: 135-147.
- Kádas, J., Weber, I. T., Bagossi, P., Miklóssy, G., Boross, P., Oroszlan, S. and Tözsér, J. (2004): Narrow substrate specificity and sensitivity towards ligand binding site mutations of human T-cell leukemia virus type-1 protease. *J Biol Chem* 279: 27148-27157.
- Kervinen, J., J. Lubkowski, A. Zdanov, D. Bhatt, B. M. Dunn, K. Y. Hui, D. J. Powell, J. Kay, A. Wlodawer, and A. Gustchina (1998): Toward a universal inhibitor of retroviral proteases: comparative analysis of the interactions of LP-130 complexed with proteases from HIV-1, FIV, and EIAV. *Protein Sci.* 7: 2314-2323.
- 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.
- Leis, J., Baltimore, D., Bishop, J.M., Coffin, J., Fleissner, E., Goff, S.P., Robinson, H., Skalka, A.M., Temin, H.M. and Vogt, V. (1988): Standardized and simplified nomenclature for proteins common to all retroviruses. *J. Virol.* 62: 1808-1809.
- Li, M., Laco, G. S., Jaskolski, M., Rozycki, J., Alexandratos, J., Wlodawer, A. and Gustchina, A. (2005): Crystal structure of human T cell leukemia virus protease, a novel target for anticancer drug design. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 102: 18332-18337.
- Louis, J.M., Dyda, F., Nashed, N.T., Kimmel, A.R. and Davies, D.R. (1998): Hydrophilic peptides derived from the transframe region of Gag-Pol inhibit the HIV-1 protease. *Biochemistry* 37: 2105-10.
- 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., Clore, G.M. and Gronenborn, A.M. (1999b): Autoprocessing of HIV-1 protease is tightly coupled to protein folding. *Nat. Struct. Biol.* 6: 868-875.
- MacArthur, M. W., and J. M. Thornton (1991): Influence of proline residues on protein

- conformation. *J. Mol. Biol.* 218: 397-412.
- 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.
- Mahalingam, B., P. Boross, Y. F. Wang, J. M. Louis, C. C. Fischer, J. Tözsér, R. W. Harrison, and I. T. Weber (2002): Combining mutations in HIV-1 protease to understand mechanisms of resistance. *Proteins* 48: 107-116.
- McCornack, M. A., L. T. Kakalis, C. Caserta, R. E. Handschumacher, and I. M. Armitage (1997): HIV protease substrate conformation: modulation by cyclophilin A. *FEBS Lett.* 414: 84-88.
- Menendez-Arias, L., Young, M. and Oroszlan, S. (1992): Purification and characterization of the mouse mammary tumor virus protease expressed in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 267: 24134-24139.
- Menendez-Arias, L., Gotte, D. and Oroszlan, S. (1993): Moloney murine leukemia virus protease: bacterial expression and characterization of the purified enzyme. *Virology* 196: 557-563.
- Menendez-Arias, L., I. T. Weber, J. Soss, R. W. Harrison, D. Gotte, and S. Oroszlan (1994): Kinetic and modeling studies of subsites S4-S3' of Moloney murine leukemia virus protease. *J. Biol. Chem.* 269: 16795-16801.
- Mildner, A.M., Rothrock, D.J., Leone, J.W., Bannow, C.A., Lull, J.M., Reardon, I.M., Sarcich, J.L., Howe, W.J., Tomich, C.S. and Smith, C.W. (1994): The HIV-1 protease as enzyme and substrate: mutagenesis of autolysis sites and generation of a stable mutant with retained kinetic properties. *Biochemistry* 33: 9405-13.
- 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.
- Murphy, F.A., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Ghabrial, S.A., Jarvis, A.W., Martelli, G.P., Mayo, M.A. and Summers, M.D. (eds) (1994): *Virus taxonomy: The classification and nomenclature of viruses, Retroviridae*. Springer-Verlag, Vienna, Austria.
- 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 Tözsér, J. (1990): The retroviral proteinases. *Seminars in Virology* 1: 369-378.
- Ott, D.E. Potential roles of cellular proteins in HIV-1.(2002): *Rev. Med. Virol.* 12: 359-74.

- Pettit, S. C., J. Simsic, D. D. Loeb, L. Everitt, C. A. Hutchison, 3rd, and R. Swanstrom. (1991): Analysis of retroviral protease cleavage sites reveals two types of cleavage sites and the structural requirements of the P1 amino acid. *J. Biol. Chem.* 266: 14539-14547.
- Powell, D. J., Bur, D., Wlodawer, A., Gustchina, A., Payne, S. L., Dunn, B. M. and Kay, J. (1996): Expression, characterisation and mutagenesis of the aspartic proteinase from equine infectious anaemia virus. *Eur. J. Biochem.* 241: 664-674.
- Prabu-Jeyabalan, M., E. Nalivaika, and C. A. Schiffer (2002): Substrate shape determines specificity of recognition for HIV-1 protease: analysis of crystal structures of six substrate complexes. *Structure* 10: 369-381.
- Precigoux, G., Geoffre, S., Leonard, R., Llido, S., Dautant, A., Destaintot, B.L., Picard, P., Menard, A. Guillemain, B. and Hospital, M. (1993): Modeling, synthesis and biological activity of a BLV proteinase, made of (only) 116 amino acids. *FEBS Lett.* 326: 237-240
- Roberts, M.M. and Oroszlan, S. (1989): The preparation and biochemical characterisation of intact capsids of Equine infectious anemia virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160: 486-494.
- Sali, A., and T. L. Blundell. (1993): Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* 234: 779-815.
- Sayle, R. A. and Milner-White, E. J. (1995): RASMOL: biomolecular graphics for all. *Trends Biochem. Sci.* 20: 374.
- Schechter, I. and Berger, A. (1967): On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27: 157-162.
- Sheremata, W. A., Benedict, D., Squillacote, D. C., Sazant, A. & DeFreitas, E. (1993): High-dose zidovudine induction in HTLV-I-associated myelopathy: safety and possible efficacy. *Neurology* 43: 2125-2129.
- Szeltner, Z. and Polgár, L. (1996): Conformational stability and catalytic activity of HIV-1 protease are both enhanced at high salt concentration. *J. Biol. Chem.* 271: 5458-5463.
- 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.
- Thali, M., Bukovsky, A., Kondo, E., Rosenwirth, B., Walsh, C., Sodorski, J. and Göttlinger, H.G. (1994): Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions. *Nature* 372: 363-365.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson (1994): CLUSTAL W: improving the

- sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Toh, H., Ono, M., Saigo, K. and Miyata, T. (1985): Retroviral protease-like sequence in the yeast transposon Ty1. *Nature* 315.
- Tomasselli, A.G., Sardich, J.L., Barrett, L.J., Reardon, I.M., Howe, W.J., Evans, D.B., Sharma, S.K. and Heinrickson, R.L. (1993): Human immunodeficiency virus type-1 reverse transcriptase and ribonuclease H as substrates of the viral protease. *Protein Sci.* 2: 2167-2176.
- Tomasselli, A.G. and Heinrikson, R.L. (1994): Specificity of retroviral proteases: an analysis of viral and nonviral protein substrates. *Methods Enzymol.* 241: 279-301.
- Tong, L., S. Pav, S. Mui, D. Lamarre, C. Yoakim, P. Beaulieu, and P. C. Anderson (1995): Crystal structures of HIV-2 protease in complex with inhibitors containing the hydroxyethylamine dipeptide isostere. *Structure* 3: 33-40.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354.
- Tözsér, J., Gustchina, A., Weber, I.T., Blaha, I., Wondrak, E.M. and Oroszlan, S. (1991a): Studies on the role of the S4 substrate binding site of HIV proteinases. *FEBS Letters* 279: 356-360.
- Tözsér, J., Blaha, I., Copeland, T.D., Wondrak, E.M. and Oroszlan, S. (1991b): 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., Weber, I.T., Gustchina, A., Blaha, I., Copeland, T.D., Louis, J.M. and Oroszlan, S. (1992): Kinetic and modelling studies of S3-S3' subsites of HIV proteinases. *Biochemistry* 31: 4793-4800.
- 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., 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. (1997): Specificity of retroviral proteinases based on substrates containing tyrosine and proline at the site of cleavage. *Pathol. Oncol. Res.* 3: 141-145.

- 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. (2001): HIV inhibitors: problems and reality. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 946:145-159.
- Tözsér, J., and S. Oroszlan (2003): Proteolytic events of HIV-1 replication as targets for therapeutic intervention. *Curr. Pharm. Des.* 9: 1803-1815.
- Vance, J. E., D. A. LeBlanc, P. Wingfield, and R. E. London. (1997): Conformational selectivity of HIV-1 protease cleavage of X-Pro peptide bonds and its implications. *J. Biol. Chem.* 272: 15603-15606.
- 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.
- Vriend, G. (1990): WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. *J. Mol. Graph.* 8: 52-56.
- Weber, I. T. (1991): Modeling of structure of human immunodeficiency virus-1 protease with substrate based on crystal structure of Rous sarcoma virus protease. *Methods Enzymol.* 202: 727-741.
- Weber, I.T., Tözsér, J., Wu, J., Friedman, D. and Oroszlan, S. (1993): Molecular model of Equine infectious anemia virus proteinase and kinetic measurement for peptide substrates with single amino acid substitutions. *Biochemistry* 32: 3354-3362.
- Weiner, S. J., P. A. Kollman, D. T. Nguyen, and D. A. Case (1986): An All Atom Force Field for Simulations of Proteins and Nucleic Acids. *J. Comp. Chemistry* 7: 230-252.
- Welker, R., Kottler, H., Kalbitzer, H.R. and Krausslich, H.G. (1996): Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein is incorporated into virus particles and specifically cleaved by the viral proteinase. *Virology* 219: 228-236.
- Welker, R., Hohenberg, H., Tessmer, U., Huckhagel, C. and Krausslich, H.G. (2000): Biochemical and structural analysis of isolated mature cores of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 74: 1168-1177.
- Willems, L., Burny, A., Collete, D., Dangoisse, O., Dequiedt, F., Gatot, J. S., Kerkhofs, P., Lefebvre, L., Merezak, C. and other authors (2000): Genetic determinants of bovine

- leukemia virus pathogenesis. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 16: 1787-1795.
- Wlodawer, A. and Erickson, J.W. (1993): Structure-based inhibitors of HIV-1 protease. *Annu. Rev. Biochem.* 62: 543-585.
- Wlodawer, A., Gustchina, A., Reshetnikova, L., Lubkowski, J., Zdanov, A., Hui, K. Y., Angleton, E. L., Farmerie, W. G., Goodenow, M. M. and other authors (1995): Structure of an inhibitor complex of the proteinase from feline immunodeficiency virus. *Nat. Struct. Biol.* 2: 480-488.
- Wlodawer, A. and Gustchina, A. (2000): Structural and biochemical studies of retroviral proteases. *Biochem. Biophys. Acta.* 1477: 16-34.
- Wondrak, E.M., Louis, J.M. and Oroszlan, S. (1991): The effect of salt on the Michaelis-Menten constant of the HIV-1 protease correlates with the Hofmeister series. *FEBS Lett.* 280: 344-6.
- Wu, J., Adomat, J. M., Ridky, T. W., Louis, J. M., Leis, J., Harrison, R. W. and Weber, I. T. (1998): Structural basis for specificity of retroviral proteases. *Biochemistry* 37: 4518-4526.
- Yamada, T., Yamaoka, S., Goto, T., Nakai, M., Tsujimoto, Y. and Hatanaka, M. (1994): The human T-cell leukemia virus type I Tax protein induces apoptosis which is blocked by the Bcl-2 protein. *J. Virol.* 68: 3374-3379.
- Yoshinaka, Y. and Luftig, R.B. (1977): Murine leukemia virus morphogenesis: Cleavage of P70 in vitro can be accompanied by a shift from a concentrically coiled internal strand ("immature") to a collapsed ("mature") form of the virus core. *Proc. Natl. Chem. Sci. USA* 74: 3446-3450.
- Yoshinaka, Y., Katoh, I., Copeland, T.D. and Oroszlan, S. (1985): Murine leukemia virus protease is encoded by the gag-pol gene and is synthesised through suppression of an amber termination codon. *Proc. Natl. Chem. Sci. USA* 82: 1618-1622.
- Zabransky, A., M. Andreansky, O. Hruskova-Heidingsfeldova, V. Havlicek, E. Hunter, T. Ruml and I. Pichova (1998): Three active forms of aspartic proteinase from Mason-Pfizer monkey virus. *Virology* 245: 250-256.
- Zahuczky, G., Boross, P., Bagossi, P., Emri, G., Copeland, T.D., Oroszlan, S., Louis, J.M. and Tözsér, 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. *Biochem. Biophys. Acta.* 1478: 1-8.
- Zamyatin, A. A. (1972): Protein volume in solution. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 24: 107-123.

7. KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

Az értekezéshez felhasznált közlemények:

- Bagossi, P., **Sperka, T.**, Fehér, A., Kádas, J., Zahuczky, G., Miklóssy, G., Boross, P. and Tózsér, J. (2005): Amino acid preferences for a critical substrate binding subsite of retroviral proteases in type 1 cleavage sites. *Journal of Virology* 79(7):4213-8. **IF: 5,398**
- Sperka, T.**, Miklóssy, G., Yunfeng, T., Bagossi, P., Zahuczky, G., Boross, P., Matúz, K., Harrison, R. W., Weber, I.T. and Tózsér, J. (2007): Bovin leukemia virus protease: comparison with human T-lymphotropic virus and human immunodeficiency virus proteases. *Journal of General Virology* 88(Pt 7):2052-63. **IF: 3.221**

Egyéb közlemények:

- Fehér, A., Boross, P., **Sperka, T.**, Oroszlan, S. and Tózsér, J. (2004): Expression of the murine leukemia virus protease in fusion with maltose binding protein in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* 35(1):62-8. **IF: 1.336**
- Sperka, T.**, Pitlik, J., Bagossi, P. and Tózsér, J. (2005): Beta-lactam compounds as apparently uncompetitive inhibitors of HIV-1 protease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 15(12):3086-90. **IF: 2,333**
- 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 human immunodeficiency virus type 1 protease. *Journal of General Virology* 87(Pt 5), 1321-1330. **IF: 3.221**
- Sperka, T.**, Boross, P., Eizert, H., Tózsér, J. and Bagossi, P. (2006): Effect of various mutations on the dimer stability and pH optimum of the HFV protease. *Protein Engineering, Design and Selection* 19(8):369-75. **IF: 2.107**

Az értekezéshez kapcsolódó előadás:

Tózsér, J., Bagossi, P., Kádas, J., Boross, P., Fehér, A., **Sperka, T.**: Humán retrovírusok proteolitikus enzimjei: Fitness és specificitás. A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztályának 9. Munkaértekezlete, Sopron, 2004. Máj. 10-13.

Az értekezéshez kapcsolódó poszterek:

Sperka, T., Zahuczky, G., Bagossi, P., Emri, G., Oroszlan, S. és Tózsér, J.: A humán T-sejtes leukémia vírus és a marha leukémia vírus proteolitikus enzimjeinek jellemzése. A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztályának 4. Munkaértekezlete, Eger, 1999. Máj. 10-13.

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.

Kádas, J., **Sperka, T.**, Bagossi, P., Boross, P. és Tózsér, J.: Mutáns retrovirális proteázok kinetikai jellemzése: Mutációk hatása a specificitásra. A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztályának 5. Munkaértekezlete, Sopron, 2000. Máj. 08-11.

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.

Miklóssy, G., Boross, P., **Sperka, T.**, Bagossi, P., Pichová, I. és Tózsér, J.: A Mason-Pfiser majom vírus tisztítása és szubsztrátspecificitásának vizsgálata. A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztályának 6. Munkaértekezlete, Sárospatak, 2001. Máj. 14-17.

Sperka, T., Tózsér, J., Bagossi, P., Emri, G., Zahuczky, G., Copeland, T.D., Oroszlan, S. and Louis, J.M.: Studies on the substrate-specificity of the proteolytic enzymes of Bovine Leukemia Virus. Spetsai Summer School 2001, Protein Biology: From Synthesis to Function and Disease, Island of Spetses, Greece, Sep. 4-14, 2001. .

Tózsér, J., **Sperka, T.**, Tie, Y., Zahuczky, G., Miklóssy, G., Boross, P., Harrison, R.W., Bagossi, P. and Weber, I.T.: Specificity studies on a deltaretrovirus protease. Retroviruses, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA, May. 24-29, 2005.

Miklóssy, G., Boross, P., Kádas, J., Fehér, A., **Sperka, T.**, Tózsér, J., Bagossi, P.:
Development of a microtiter plate fluorescent assay for inhibition profiling of retroviral proteases. 31st FEBS Congress, Istanbul, Turkey, 24-29 June, 2006.

Egyéb előadások:

Sperka, T.: Proteomikai lehetőségek a Debreceni Tudományegyetemen. XXXVII. Kromatográfiás Továbbképző Tanfolyam, Szeged, 2006. Jan. 25-27.

Sperka, T.: A Debreceni Egyetem Proteomika Szolgáltató Központja. Applied Biosystems/Sciex MS felhasználói találkozó-2006, Budapest, 2006. Jún. 6

Sperka, T.: Applied Biosystem Q-Trap 4000 készülék ismertetése; bioinformatikai programja. Magyar Proteomikai Társaság Vándorgyűlése, Villány, 2006. november 23-24.

Egyéb poszterek:

Sperka, T., Oláh, Zs., Bagossi, P., és Tózsér, J.: Egér emlőtumor vírus proteolitikus enzimének jellemzése. A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztályának 5. Munkaértekezlete, Sopron, 2000. Máj. 08-11.

Fehér, A., **Sperka, T.**, Bagossi, P. és Tózsér, J.: Proteáz inhibitor terápia esetén megjelenő Gag mutációk hatása a HIV proteázzal történő hasíthatóságra. A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztályának 5. Munkaértekezlete, Sopron, 2000. Máj. 08-11.

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

Csutak, A., Silver, D.M., **Sperka, T.**, Kádas, J., Vereb, G., Berta, A. and Tózsér, J.: Urokinase downregulation by aprotinin after photorefractive keratectomy in rabbit corneal epithelial cells. Association for Research in Vision and Optamology, Fort Lauderdale, Florida, USA, Apr. 25-29, 2004.

Bander, P., **Sperka, T.**, Bakondi, G., Boross, P., Miklóssy, G., Bagossi, P. és Tózsér, J.: A „tűzoltófogás” szerepe a retrovirális proteázok dimer-stabilitásában. A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztályának 9. Munkaértekezlete, Sopron, 2004. Máj. 10-13.

Fehér, A., Boross, P., **Sperka, T.**, Miklóssy, G., Bagossi, P., Oroszlan, S., Weber, I.T. and Tózsér, J.: Cloning and characterization of the murine leukemia virus protease and its comparison with the HIV-1 protease. Retroviruses, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA, May. 24-29, 2004.