

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

RETROVIRÁLIS PROTEÁZOK KINETIKAI VIZSGÁLATA

Eizert (Rosmann) Helga

Témavezető: Prof. Dr. Tózsér József



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

Debrecen, 2013

RETROVIRÁLIS PROTEÁZOK KINETIKAI VIZSGÁLATA

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta:

Eizert (Rosmann) Helga
okleveles biológus/kémikus

Készült a

Debreceni Egyetem

Molekuláris Sejt- és Immunbiológia
doktori iskolája keretében

Témavezető: Prof. Dr. Tózsér József, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Gergely Lajos, az MTA doktora
tagok: Dr. Kónya József, Ph.D.
Dr. Kovács Mihály, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja: 2013. október 14., DE OEC Orvosi Mikrobiológiai Intézet

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Dombrádi Viktor, az MTA doktora
Dr. Gál Péter, Ph.D.

A bíráló bizottság:

elnök: Prof. Dr. Gergely Lajos, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Dombrádi Viktor, az MTA doktora
Dr. Gál Péter, Ph.D.
Dr. Kónya József, Ph.D.
Dr. Kovács Mihály, az MTA doktora

Az értekezés védésének időpontja: 2013. október 14. 13:00 óra, a DE OEC Belgyógyászati Intézet „A” épület tantermében.

1. BEVEZETÉS

A retrovírusokat eredetileg a huszadik század korai szakaszában kezdték el tanulmányozni, amikor felfedezték, hogy bizonyos madár retrovírusok daganatos betegségeket okozhatnak madarakban. Amióta felfedezték a patogén emberi retrovírusokat intenzív tanulmányozásuk előrehaladottá vált, beleértve az emberi immunhiányt okozó vírus 1 felfedezését (HIV-1), a HIV-2 és a humán T-sejtes leukémia vírus 1-t (HTLV-1). A HIV-1 PR fontos szerepet játszik a vírus replikációban, így hatékony célpont a szerzett immunhiányos tünetegyüttes terápiában (AIDS). Emellett ismert tény, hogy a jelenlegi proteáz inhibitoroknak a hosszú távú hatékonysága korlátozott, mivel rezisztencia kialakulásához vezet. A HIV-1 PR mutációi során olyan aminosavak jelentek meg, amelyek megfelelnek más retrovirális proteázokban hasonló helyen található aminosavrészeknek. Korábban, a P4-P3' régióban egyszeres aminosavcseréket tartalmazó oligopeptid szubsztrátok (Val-Ser-Gln-Asn-Tyr↓Pro-Ile-Val-Gln) felhasználásával, különböző retrovirális proteázok specificitását már jellemezték, köztük a HIV-1, HIV-2, ló fertőző anémia vírus (EIAV), egér leukémia vírus (MMLV), és madár mieloblasztóma vírus (AMV) proteolitikus enzimekét. Úgy döntöttünk, hogy kiterjesztjük a szubsztrátspecificitási vizsgálatokat más retrovirális proteázokra (egér emlőtumor vírus (MMTV), Pfizer Mason majom vírus (MPMV), HTLV-1, marha leukémia vírus (BLV), humán foamy vírus (HFV), süllő bőr szarkóma vírus (WDSV)), hogy ezáltal jobban megértsük a szubsztrát (HIV-1 Gag természetes hasítási hely szekvenciája (MA/CA)) oldalláncok alapvető kölcsönhatását a különböző retrovirális proteázokkal. A retrovirális proteázok működésének és specificitásának jellemzése segíthet a retrovírus család megismerésében. A retrovirális proteázok vizsgálatával célunk volt a szubsztrátspecificitás összehasonlítása, teljes mértékben megérteni a közös jellemzőit, valamint a különbségek feltérképezése. A specificitási eredményeket számítógépes modellezéssel együtt próbáltuk értelmezni.

A spumavírusok endémiát okoznak több főemlős között. Ez az alcsalád tartalmaz egy speciális típusú retrovírust, amely kifejlesztett egy különálló replikációs stratégiát, amelynek elemei egyaránt retrovírusokká és hepadnavírusokká. Egy másik különlegessége a foamy vírusoknak (FVS) az, hogy nem okoz betegséget a természetes gazdaszervezetben, valamint a zoonózisban fertőzött emberekben. Úgy tűnik, hogy a FV vektoroknak néhány alaptulajdonságai kedvezően eltekinthetőek az ortoretrovírusok vektoraitól és ez további alaputatásokat indít el a vírusokon, valamint a hasznosításuk szempontjából a génterápiában. A habos vírus PR-ja elengedhetetlen a virális fertőzőképességéhez, mivel az aktív centrum Asp mutációja nem fertőző virionokat eredményez, amint korábban a HIV-1 PR esetében is találtak. Korábban, a HFV PR-t klónozták fúziós formában (maltóz kötő fehérjével), és

jellemezték a fúziós fehérjét. Összehasonlították a processzált és fúziós formákat, a vad típusú és mutáns (S25T) PR-zokat. Azt kapták, hogy a fúziós formákat tanulmányozhatjuk a processzált enzimek helyet összehasonlítás céljából. A HFV PR katalitikus állandói jóval alacsonyabbak voltak, mint a korábban meghatározott különböző retrovirális proteázokké. A HFV PR pH értéke sokkal nagyobb volt, mint a HIV-1 PR esetében, attól függően, hogy melyik a felhasznált szubsztrát, milyen ionerősség mellett és egyéb kísérleti körülményeket számontartva. Továbbá, a dimer stabilitása a HFV PR-nak sokkal alacsonyabb volt, mint a HIV-1 proteázé. Különböző mutációkat terveztünk meg közel a katalitikus aszpartáthoz, hogy felfedezhessük ezeknek az aminosavaknak a szerepét e szokatlan paraméterek értékeiben. Kíváncsiak voltunk annak a megállapításában, hogy hasonlóan az ortoretrovírusokhoz, a mutált aminosavak (konzervált aminosavak a HIV-1 PR szekvenciából, azonos pozíciókban) javítani fogják-e a pH-optimum és stabilitás értékeit a spumavírus proteázoknak. E oldalláncok szerepének vizsgálata segíthet megérteni a foamy PR szokatlan jellemzőit és talán a különböző replikációs ciklusukat és biológiájukat.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Retrovírusokról általában

A retrovírusok burokkal rendelkező pozitív szálú RNS-t tartalmazó vírusok, egyedi morfológiával és replikációval. Ezek a vírusok abban különböznek, hogy a virálisan kódolt reverz transzkriptázt használják, hogy átírják a vírus RNS-ét provírus DNS-sé, amely beépül a fertőzött gazdasejt genomjába. A vírus részecskék átmérője körülbelül 80-100 nm között változik. Ezek körül virális glikoproteinek találhatóak lipid burookban, amelyek a fertőzött sejtől származnak, a vírus lefűződése folyamatában a sejt membránjáról. A genom magja két, rendszerint azonos, egyszálú pozitív RNS-molekulából áll. A genom mérete átlagosan 7-12 kilobázis nagyságú, 7 kb a madár leukózis vírusok esetében és 12 kb a foamy vírusok esetében.

A retrovírusok szerteágazó családját általános tulajdonságokkal jellemezhetjük: az általuk okozott betegség, a szöveti tropizmus és gazdaszervezetek spektruma, a virion morfológiája, és a genom komplexitása által. Az *oncovírusok* közé tartoznak azok a retrovírusok, amelyek könnyen halhatatlanná teszik a célsejteket, vagy az átalakításukért felelősek. A *lentivírusok* neurológiai betegségeket és immunszuppressziót okoznak. A *spumavírusok* által képviselt emberi „habos” vírus (HFV) egy különleges citopatológiai hatást gyakorol, de úgy tűnik, nem okoz klinikai betegséget. Evolúciós rokonságokat figyelembe véve a retrovírusokat hét csoportra osztjuk.

Minden retrovírus legalább három fő kódolási tartományt (gént) tartalmaz: *gag*, melyről szintetizálódnak a mátrix protein, kapszid protein és nukleoprotein fehérjék; *pol*, mely a reverz transzkriptáz és integráz enzimeket kódolja és az *env* gén, mely a felszíni részének és a burokkfehérje transzmembrán információit hordozza. Egy járulékos, kisebb, *pro* gén is jelen van minden retrovírusban, amely kódolja a virion proteáz enzimet (PR).

A hét retrovírus családnak egyik közös jellemzője az, hogy a legtöbb vírus izolátum betegségeket okozhat a természetes közegben, vagy a véletlenül fertőzött gazdáiban. Egyes csoportban, mint a humán T-sejtes leukémia vírus (deltavírus) esetében a gén expresszió és replikáció alacsony hatékonyságot mutatott szövettenyésztésben és fertőzött emberekben egyaránt. A HTLV-vel fertőzött emberek kis hányada szenved rosszindulatú T-sejtes limfómától. Más esetekben, mint például a lentivírusok esetében (pl. HIV) a fertőzött sejtek gyorsan elpusztulhatnak. A lentivírusok nagy hatékonysággal tudnak szaporodni következmények nélkül, míg más kísérleti- vagy zoonózián fertőzött gazdáiban már az alacsony szintű replikáció halálos is lehet. Ezzel szemben a madár limfóma vírusok vagy az egér leukémia vírusok gyakran indukálnak rosszindulatú, immunhiányos, vagy idegrendszeri elváltozásokat a gazdaszervezetekben. A patogenitás alól egyetlen kivétel van és az a spumavírus nemzetség. Bár a foamy vírusok gyakran sejtkárosítók szövettenyésztésben nincsenek egyértelmű összefüggések bármilyen betegséggel. A foamy vírusok sok gerincesben helyi járványt okoznak, beleértve a teheneket, házi- és vad-macskákat, lovakat és az összes vizsgált főemlősöt, kivéve az embert. Érdekes viszont, hogy a FV eloszlása követi a lentivírusokét; minden csoport, amely fertőzött lentivírussal, fertőzött egy FV-sal is. Ez a tény ad egy "plusz"-t a FV tanulmányozására, és erősíti annak a fontosságát, hogy jobban megismerjük. A molekuláris- és immunológiai alapjait a FV-gazdaszervezet kölcsönhatásoknak csak most kezdjük megérteni, de ebből sokat tanulhatunk a foamy retrovírus alkalmazkodásáról. Az EIAV egy erős homológiát mutat az immunhiányos vírusokkal, és a HIV fontos modellje. Az MPMV a D-típusú retrovírus családnak a prototípusa, AIDS-szerű szindrómát idéz elő a nem-emberi főemlősökben, és ez különbözik a majom immunhiány vírusától (SIV). Az MMTV egy B-típusú retrovírus és leggyakrabban indukciós mellrákkal társul egereknél. A BLV etiológiai ágense az enzootikus szarvasmarha leukózisának, egy olyan betegség (limfoszarkóma), amely a B-sejteket támadja meg. A WDSV kapcsolódik a hal bőrdaganatokhoz.

A retrovírusok életciklusa

A HIV fertőzés egy virális glikoprotein kötődéssel kezdődik a gazdasejten, a sejtfelszíni CD4 receptorok és egyéb koreceptorok felismerésével. Miután a virion burka és a gazdasejt citoplazma

membránja fuzionálnak, a HIV vírus a genetikai információt felszabadítja a gazdasejt citoplazmájában. A virális RNS átíródik DNS-sé a reverz-transzkriptáz segítségével; tehát a DNS kettős szálú lesz és beépül a gazdasejt genomjába (provírus képződik). A virális genom is replikálódik a gazdasejt genomjába. A legfontosabb enzim számunkra a proteáz (PR), amely része a Gag-Pro-Pol poliproteineknek. A vírusgének expressziója vírustól függően különböző módon történhet. A legtöbb retrovírusban a *gag* és *pol* gének különböző leolvasási keretben vannak kódolva, ilyenkor az enzimfehérjék -1 irányú kereteltolódással átíródó mRNS-ről szintetizálódnak (HIV-1, BLV, HTLV). A legtöbbször csak a Gag poliprotein van lefordítva egy kisebb mennyiségben (HIV-1 esetében csak 5%-ban). Egy nagyobb Gag-Pro poliprotein szintetizálódik a translációs kereteltolódásnak köszönhetően. A HTLV-1 és BLV (a deltaretrovírus nemzetség tagjai) PR-zok kódolása külön *gag-pro* és a *gag-pro-pol* leolvasási keretben valósul meg. Egy figyelemre méltó kivétel a translációs leolvasási keretben az MMLV (gammaretrovírus) esete, amelyben egy stop-kodon (AUG) van a két gén között, de a Gag és Pro-Pol génjei azonos leolvasási keretben vannak. Ez ritkán szupreszálódik a transláció során. A WDSV ugyanazokkal a jellemzőkkel rendelkezik, mint az MMLV ebben a tekintetben. Ezek a hal vírusok egyedülálló természetes körülmények között replikálódnak, közel 4°C-on. A madár C-típusú vírusok (pl. RSV) proteáza a *gag* génen van kódolva (azonos a *gag* és *pro* leolvasási keret) és ezzel egyenértékű strukturális fehérjék szintetizálódnak, ellentétben a többi retrovírusokkal, ahol a PR csak 5-10%-a szintetizálódik a Gag poliproteinnél.

A vírus részecske csomagolása egy önálló egység, a Gag prekursor poliproteinek irányítása alatt történik. Amikor a vírus prekursor poliproteinek, a vírus RNS és egyéb elemek a vírus részecskébe vannak csomagolva és felszabadulnak a fertőzött sejtekből, akkor ők még éretlenek és nincs fertőző képességük. A vírus csak akkor válik fertőző képessé miután a PR hasítja a Gag és Gag-Pol funkcionális fehérjéket.

Minden retrovírusnak azonos az életciklusa beleértve a bejutást, a reverz transzkripciót, az integrációt, a translációt, összerendeződést és lefűződést (rügyszépzést). A retrovírusok életciklusa általában két szakaszra oszlik: a korai fázis véget ér a vírus genetikai információ integrálódásával a gazdasejt kromoszómájába, míg a késői fázis tartalmazza a vírus fehérje expressziót és a vírusérést. A legtöbb retrovírus esetében, az összerendeződés és a bimbózás a sejtek felszínén fordul elő. A Gag és Gag-Pro-Pol poliproteinek a gazdasejt membránjának Env fehérjében koncentrált részein csoportosulnak és a vírus RNS a fertőzött sejt felszínén. Miután minden vírus komponens lokalizálódik a sejtmembránon, megtörténik a vírusrészecskék összerendeződése. Az összerendeződött "éretlen" részecskék lefűződnek a membránról és egy „érés” következik be.

A foamy vírus (FV) egyedüli tagja a *Spumaretrovirinae* alcsoportjának, a *Retroviridae* családnak. A spumavírusok komplex retrovírusok akiknek replikációs ciklusuk hasonlít a hepadnavírusokhoz, amely kihasználja a késői reverz transzkriptáz lépést, és a különböző promóterek hasznosítását az RNS-nek, amely virion-asszociált fehérjéket és kiegészítő fehérjéket kódol. Eltérően az ortoretrovírusoktól, a FV PR csak egyszer hasítja a Gag rokon fehérjét a lefűződés előtt vagy közben. A FV genom tartalmazza a *pro* gént mely felelős a PR kódolásáért a *pol* leolvasási keretben. Csak az integráz (IN) tartomány hasad ki a Pol-ból, amely eredményez egy érett reverz transzkriptázt (RT), ami N-terminálisan van kódolva (PR-RT). A FV részecskék hasonlítanak a hagyományos retrovírusok éretlen formáira. Ez arra utal, hogy hiányzik a Gag hasítása és az ebből következő kapszidfehérje átrendeződése az életciklus extracelluláris szakaszában. A másodlagos FV Gag processzási helye (ami FV PR által történik) azt sugallja, hogy fontos szerepet játszik a foamy vírus replikáció korai lépéseiben, amely magában foglalja a sejtes- és a PR-függő szétesés útvonalát. Valószínűleg a vírus fuzionál a sejtmembránnal és a vírusrészecske bevonulást nyer a sejtbe „viropexis” (a sejt felemészti a virion-t) által. A FV részecskék tartalmaznak virális RNS-t és DNS-t (körülbelül 5:1-hez). Mivel a FV csoport tulajdonságai nagy részben eltérnek a többi retrovírus családtagokétól (egyedi replikációs stratégia), úgy tűnik, különösen fontos, hogy ez értékes új rendszert megvizsgáljunk.

Retrovirális proteázok

A retrovirális proteázok kulcsfontosságú enzimek a vírus életciklusában, az ő szerepük a poliproteinek (Gag és Gag-Pro-Pol) prekursor fehérjék funkcionális részekre történő hasítása. A retrovirális proteázok a celluláris aszpartil-proteázok (jellemző tulajdonságot mutatnak) alcsaládba tartozó endoproteolitikus enzimek, az aktív centrumot egy konzervált -Asp-Thr/Ser-Gly- (DT/SG)-katalitikus triád reprezentálja. Az aktív retrovirális proteázok homodimerek, 99-138 aminosavból álló, két azonos alegységből épülnek fel. Ezek az enzimek katalizálják a peptidkötés hidrolízist egy savbázis mechanizmus útján, ami a két konzervált katalitikus Asp oldallánc mediálása által megy végbe. Minden egyes monomer egy kompakt struktúra, és négy strukturális elemekből áll össze: két különálló „hajtű” hurok, a katalitikus aszpartátot tartalmazó széles hurok, és egy rövid α -hélix a C-terminális közelében. Kiegészítésként a négy alapvető szerkezeti elem mellett, a két alegység N- és C-terminális láncai alkotnak egy négyrétegű antiparallel β -redőt.

A retrovirális proteázok aminosav szekvenciái nagymértékben hasonlóak, különösen azokban a régiókban ahol fontos a szerkezet és a funkció megőrzése. A proteázok háromdimenziós (3D) szerkezetét összevetve nagy hasonlóság mutatkozik a középső régióban. A konzervált régiók közül

közös az aktív centrumot kódoló katalitikus triád ((Asp-Thr/Ser-Gly), a „flap” régió, amely a dimerizációban játszik fontos szerepet. Eltérően a pepszin-típusú proteázoktól, melyek egyetlen egy „flap” régióval rendelkeznek, az aktív retrovirális proteázok két „flap” régióval rendelkeznek, mindegyik alegységből egy dimerként működő enzimek. A „flap” egy flexibilis régió mely kötődéskor ráhajlik a szubsztrátra az aktív helyen, kölcsönhatást alakít ki, és kiszabadítja a termékeket ugyanonnan.

Kis molekula tömegű FV PR nem található a tisztított virionba, ellentétben más retrovírusok PR-zával. Egy másik új jellemzője, hogy az aktív dimernek a katalitikus centrumjában DTG helyett DSG van. A madár- és a retrotranszpozon proteázok, ugyancsak Ser oldalláncot tartalmaznak Thr helyett.

A PR-zok szubsztrátspecifitása megértése fontos a gyógyszerekkel szembeni rezisztencia molekuláris alapjának tanulmányozásában, és az új gyógyszerek fejlesztésében. A hatékony hidrolízishez minimálisan 6-7 tagú peptiddel rendelkező szubsztrátot igényel, a kapcsolódó szubsztrát oldalláncai képesek bekötődni az enzim 7 különböző alszobába. Az alszobák aminosav oldalláncokat képesek szelektálni méretük alapján, hogy melyek férnek bele az adott zsebbe. Egyes zsebek között jelentős kölcsönhatás áll fenn, amely jelentősen korlátozza a hasítást egyes aminosavak között. A retrovirális proteázok szubsztrátspecifitása hasonlóságainak, valamint különbségeinek megértéséhez, molekuláris modelleket hoztunk létre a vizsgált enzimek esetében.

A természetes polimorfizmuson kívül, a gyógyszerekkel szembeni rezisztencia kialakulását tartják kritikus pontnak a jelenlegi HIV-ellenes sikertelen kezelésben. Úgy becsülik, hogy több mint 70%-a a HIV-1 fertőzött egyéneknek hordoz magával rezisztenciáért felelős mutáns HIV-1 PR formákat és közel 5-10% ellenáll minden jelenlegi RT- és PR-gátlószernak. Rosszabbá teszi a helyzetet az, hogy ezek a mutáns vírustörzsek eljutnak közvetlenül újonnan megfertőződött egyénekhez, ami megfelel mintegy 10-15%-ának az újonnan fertőzött eseteknek. A PR-ban megjelenő egyszeres vagy többszörös mutációk multidrug rezisztenciát és keresztrezisztenciát okozhatnak. A PR-ban lévő 99 aminosav közül 45 pozícióban lévő mutációt társítottak a proteáz-inhibitorokkal való kezeléssel. Egyes esetekben, a bekövetkezett strukturális változások (a mutációk által) egyetértésében vannak a kinetikai és stabilitási változásokkal.

3. CÉLKITŰZÉSEK

A retrovírusok életciklusuk sajátosságainak adódóan génterápiás vektorok alapjául szolgálhatnak, így a foamy vírus is egy modell rendszer lehet a géntranszferben, mivel úgy tűnik, hogy képtelen betegséget okozni az emberben. Összehasonlítva a HIV-1 és a MLV-alapú vektorokkal, a foamy vektorok képesek hasonló vagy nagyobb géntranszfer hatást elérni. Célunk az volt, hogy elemezzük a proteáz szerkezet-funkció kapcsolatát, mert ennek az ismerete segítené megérteni az egyedi replikációs ciklusukat. Kristály szerkezet hiányában, egy foamy proteáz modell épült annak érdekében, hogy megértsük a molekuláris alapját a szokatlan paramétereknek (kisebb dimer stabilitás és magasabb pH optimum a HIV-1 PR-hoz képest). Eddig, a vad típusú FV PR szubsztrát specificitást és mutáció tolerálhatóságát nem jellemezték részletesen. Korábban, a Ser-t az aktív helyről kicseréltek Thr-re, hogy fokozzák az enzim aktivitását és stabilitását. Az S25T mutáns enzim növekedett dimer stabilitása és pH optimuma a vad típusúval szemben, elindított bennünket további mutációk tervezésére és tesztelésére az aktív hely (térbeli) közelében.

A retrovírusokat asszociálják emberi és állati betegségekkel; ezért a retrovirális proteázok kemoterápiás célpontokká váltak. A HIV-1 PR-ban bekövetkező mutációk miatt (melyeknek a PR köszönheti a rezisztenciáját) az inhibitorok tervezése korlátozódott. A retrovirális proteázok összehasonlító tanulmánya remélhetőleg hozzájárul a proteázok általános és speciális jellemzői megértésében, és segítséget nyújthat a HIV-1 PR mutációs képességének feltérképezésében. A mutációk által megjelölt aminosavak megfelelnek más retrovirális proteázokban hasonló helyen található aminosavrészeknek. Korábban, a P4-P3' régióban egyszeres aminosavcserét tartalmazó kiterjedt oligopeptid szubsztrátok (Val-Ser-Gln-Asn-Tyr↓Pro-Ile-Val-Gln) felhasználásával, különböző retrovirális proteázok specificitását már jellemezték, köztük a HIV-1, HIV-2, EIAV, MMLV és AMV proteolitikus enzimekét. A relatív aktivitás értékek arányait vizsgáltuk a peptidek hasíthatóságának kimutatására. Ezek az értékek összehasonlítva karakterizálták az enzimek specificitását. A vizsgálatok alapján a P2 pozíciót találták az egyik legkritikusabbnak a specificitásbeli különbségek meghatározásában. Kiterjesztettük a vizsgálatainkat a P1, P3 és P4 pozíciók specificitás jellemzésével ugyanazt a proteáz sorozatot használva (HIV-1, HIV-2, EIAV, MMLV, AMV, MPMV, MMTV, HTLV-1, BLV, HFV és WDSV proteázok), melyek révén vizsgálatainkban a *Retroviridae* család mind a hét nemzetsége képviseltetve lesz, és közvetlenül összehasonlítóvá válik. A fő indoklása a retrovirális proteázok specificitásának tanulmányozásában az, hogy szükség van olyan proteáz inhibitoroknak a

fejlesztésére és aztán klinikai használatára, amelyektől a különböző vírusok és vírus törzsek nem menekülhetnek.

I. Cél: HFV PR jellemzése (vad és mutáns foamy proteázok)

1. Kicserélni és feltárni, hogy a HFV PR-ok egyes aminosavaknak (amelyek közel vannak az enzim katalitikus aszpartáthoz) mi a szerepük a magasabb pH-optimum és kisebb dimer stabilitásban, a klasszikus retrovirális PR-zal (például HIV-1 PR) összehasonlítva. E tanulmányozáshoz elkészítettük a foamy mutánsokat úgy, hogy az aktív centrum körüli meghatározó aminosavrészeit a HIV-1 PR strukturálisan megfelelő aminosavrészeire cseréltük. Szekvencia illesztés és a foamy proteáz molekuláris modellje alapján terveztük meg a mutánsokat, a szerkezet-funkció tanulmányozására.
2. A foamy vírus proteázok pH-függés vizsgálata (pH: 4.5 és 8.5 között) annak érdekében, hogy megfigyeljük azoknak az aminosavrészeknek a jelentőségét, amelyek közel vannak a katalitikus aszpartáthoz a vad-típusú enzimben, valamint az egyszeri- (Q8R, H22L, S25T, T28D) és dupla (Q8R-T28D, H22L-T28D) mutánsokban.
3. A foamy vírus proteázok dimer stabilitás jellemzése, urea denaturálással, két különböző pH értéken (6.0 és 7.2).

II. Cél: A retrovirális proteázok szubsztrátspecificitás jellemzése

1. Kiterjeszteni a vizsgálatainkat különböző alcsaládokba tartozó retrovirális proteinázokra (MMTV, MPMV, HTLV-1, BLV, HFV, WDSV) olyan szintetikus oligopeptidsorozaton, amely a HIV-1 Gag természetes hasítási hely szekvenciáját tartalmazták (mátrix↓kapszid), és amelyben szisztematikusan egy-egy aminosavat cseréltünk ki.
2. Összehasonlítani és megérteni a retrovirális proteázok specificitásainak molekuláris hátterét molekuláris modellezés segítségével.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Retrovirális proteázok

Korábban már leírt eljárások alapján tisztítottuk a retrovirális proteázokat. Ezek a következők: HIV-2 PR, MPMV PR, MMTV PR, MMLV PR, HTLV-1 PR, BLV PR, WDSV PR, HFV PR. A HIV-1, EIAV és AMV proteázokra mért értékeket korábbi közleményekből vettük át.

Oligopeptidok

Az oligopeptideket szilárd fázisú peptidszintézissel készítették, Model 430A automata peptid szintetizátorral vagy félautomata Vega peptid szintetizátorral. A tisztításhoz reverz fázisú HPLC-t használtak. A peptidok szekvenciáját Beckman 6300 aminosav analízátorral ellenőrizték és a megfelelő peptid koncentrációkat aminosav analízissel határozták meg. A peptid-törzsoldatok desztillált vízzel vagy 5 mM DTT-oldattal készültek. A következő peptidokat használtuk fel a hasíthatósági reakciókban: a HIV-1 MA/CA hasítási helyet reprezentáló oligopeptid (VSQNY↓PIVQ) és analógjait (aminosav szubsztitúciót tartalmazó a P1, P3 és P4 pozíciókban), és a HFV oligopeptid szubsztrátot (SRAVN↓TVTQS).

Retrovirális proteáz relatív aktivitás vizsgálata

A retrovirális proteázok aktivitásmérése 20 µl reakcióelegyben történt: 5 µl 0.4 mM koncentrációjú szubsztrátoldat, 5 µl enzimmészítmény, 10 µl dupla töménységű inkubációs pH 5.6-os foszfát (0.25 M) pufferben, amely 7.5% glicerolt, 5 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.2% Nonidet P-40 és 2 M NaCl-ot tartalmazott. A reakcióelegyet 37°C-on inkubáltuk 1 óráig HIV-2, MPMV, MMTV, MMLV esetében HTLV-1 PR és BLV PR esetében 20 óráig, WDSV PR és HFV PR esetében 24 óráig inkubáltuk. A reakciót 180 µl 1%-os TFA-oldattal leállítottuk és automata injektor segítségével Nova-Pak C₁₈ reverz fázisú kromatográfiás oszlopra felvittük. A szubsztrátot lineáris víz-acetonitril gradienssel (0-100%), 0.05% TFA jelenlétében választottuk el a termékektől és a pufferkomponensektől. Az enzimkoncentrációkat úgy állítottuk be, hogy a szubsztrátok hidrolízise 20% alatt maradjon. A relatív aktivitás értékeket az elhasított peptidok időegységre vonatkoztatott moláris mennyisége alapján számoltuk, és elosztottuk a VSQNY↓PIVQ szubsztrátra mért értékekkel. A HIV-1, EIAV és AMV proteázokra mért értékeket korábbi közleményekből vettük át. Párhuzamos méréseket végeztünk, és számításainkhoz az átlagértéküket használtuk. A kinetikai állandók standard deviációi 20% alatt voltak. Az integrációs értékeket megfelelő peptidmennyiség kiszámításához korábban meghatározott

referenciaértékeket használtunk viszonyítva a referencia szubsztráthoz (SP-211). Korábbi tanulmányok is jeleztek erős korrelációt a relatív aktivitások és a specifikus állandók között; ezért a meghatározott aktivitás értékeket k_{cat}/K_m értékeknek vettük.

A foamy mutánsok előkészítése

A mutagenézis alapjául egy pMBP-HFV PR klónt használtunk. A DNS (p13HFV) plazmidot, ami a PR szekvenciát kódolja, megfelelő oligonukleotid primerekkel az adott mutáns konstrukciójára használtuk. Mutánsainkat a QuikChange mutagenézis eljárást követve állítottuk elő.

A foamy proteázok expressziója

A fehérjék expressziója a megfelelő plazmidokat hordozó *E. coli* BL21 (DE3) 500 ml kultúrában történt. A fehérje expressziót 1 mM IPTG hozzáadásával, 5 órán keresztül, 37°C-on végeztük. Az expresszió után a sejteket centrifugálással gyűjtöttük össze, 25 ml lízis pufferben (50 mM Tris, pH 7.2, 1 mM EDTA és 100 mM NaCl) és felszuszpendáltuk. A sejteket ki-befagysztással és szonikálással tártuk fel, jégen. A lizátumot centrifugáltuk, majd a felülúszót amilóz oszlopra vittük fel és a frakciókat összegyűjtöttük. A kötött fehérjét 20 mM maltóz-t tartalmú lízis pufferrel eluáltuk. A fehérjekoncentrációkat Bradford spektrofotometriás eljárással határoztuk meg. A fehérjeminták tisztaságát SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel ellenőriztük, 10-20%-os gradiens gélen.

A foamy proteázok aktivitás vizsgálata

Kinetikai paraméterek meghatározása 50 mM MES, 100 mM Tris, 50 mM acetát, 1 M NaCl, pH 6.3-as pufferben (META) történt. A rendszer pH puffere érzékeny volt a hőmérsékletre, ezért állítottam be, 37°C-ra. A reakcióelegy tartalmazott 1.4-22 mM tisztított enzimet és 0.2-1.0 mM szubsztrátot (SRAVN↓TVTQS), és ezt inkubáltuk 1 órán át. A reakciókat 180 μ l 1% trifluoecetsav (TFA) hozzáadásával állítottuk le. Korábban, a proteáz által katalizált hidrolízis hasítási termékeit aminosavanalízissel határozták meg a vad-típusú HFV proteázra. A mutáns enzimekkel ugyanolyan hasítási termékeket kaptunk, mivel azonosak voltak a retenciós idők. A kinetikai állandók meghatározásához (< 20% alatt maradt a szubsztrát hidrolízise) az adatokat Michaelis-Menten egyenlethez való illesztéssel határoztuk meg a Fig. P program felhasználásával.

A foamy proteázok pH optimum vizsgálata

A pH optimum értékeléséhez a META puffer-ben mértünk aktivitást, pH 3 és 9 közötti tartományban. A reakcióelegyeket 1 óráig inkubáltuk és HPLC módszerrel elemeztük. Minden esetben a kromatográfiás módszer szobahőmérsékleten ment végbe. Szimmetrikus harang alakú pH optimum görbéket illesztettünk, nemlineáris regressziós módszerrel, a SigmaPlot program segítségével.

A foamy proteázok urea denaturációs vizsgálata

Az urea denaturáló hatását META pufferben mértük, pH 6.0 vagy pH 7.2, növekvő urea koncentráció mellett: 0-6 M. A proteáz aktivitást HPLC módszerrel mértük. Az UC50 érték az a sebesség, amilyen urea koncentrációnál a kezdeti sebesség a felére csökken. Szigmoidális urea denaturáció görbéket illesztettünk a nemlineáris regressziós módszerrel, a SigmaPlot program segítségével.

Retrovirális proteázok szekvencia illesztése és molekuláris modellezése

A HIV-1, HIV-2, SIV, EIAV, FIV és RSV proteázok szerkezet-alapú illesztése volt a sablon a többi proteolitikus enzim szekvencia illesztésére: BLV, HTLV-1, MPMV, MMTV, MMLV, WDSV és HFV. A többszörös szerkezeti illesztés ClustalW programmal indult, a szerkezeti illesztés Whatif programmal, majd kézi korrekciók alapján a szekvencia illesztés. A molekuláris modellek készítésében az általunk ismert proteázok kristályszerkezetét használtuk (HIV-1, HIV-2, EIAV, FIV és RSV). A FV PR homológ modellje, a HIV-1 proteináz-inhibitor komplex kristályszerkezet alapján épült fel. Mindegyik retrovirális proteáz szubsztrátkötő helyében a modell oligopeptidot VSQNY↓PIVQ helyeztük be, az energiainimalizálással eltávolítottuk a már meglévő nem kedvező, van der Waals kölcsönhatásokat. A szerkezeti vizsgálati eljárást a korábban leírt Sybyl molekuláris modellező programcsomag segítségével alkalmaztuk, Silicon Graphics Fuel számítógépen, grafikus rendszert használva. Az aminosavrészek méreteit az irodalomból vettük át.

5. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

5.1. HFV PROTEÁZOK JELLEMZÉSE

A foamy proteázok mutációi és a molekuláris modellezés

A foamy PR mutáns formáit (Q8R, H22L, S25T, T28D, Q8R-T28D, H22L-T28D) a homológ molekuláris modell alapján terveztük meg, hogy az aktív centrum meghatározó aminosavrészeit a klasszikus retrovírus (HIV-1 PR) strukturálisan megfelelő aminosavrészeire cseréltük. Vizsgálni akartuk a mutált aminosavak szerepét a magasabb pH-optimum, és/vagy az alacsonyabb dimer stabilitását illetően. A mutáció toleranciájának vizsgálatához néhány aminosavrészt cseréltünk ki közel a katalitikus aszpartáthoz. Ezek lehetnek a szubsztrátkötő zsebeinek néhány aminosavrészei.

A HIV-1 PR-inhibitor komplex kristályszerkezete felhasználásával készült a HFV PR modell a Modeller program segítségével. A HFV proteáz aminosavszekvenciáját a legjobb kiindulási szerkezet meghatározása céljából ismert szerkezetű retrovirális proteáz szekvenciákhoz illesztettük. A HIV-1 és a HFV proteáz aminosavszekvenciáját összehasonlítva, 23% azonosságot és 30% hasonlóságot találtunk. A szubsztrátkötő helyeket felépítő aminosavakat összehasonlítva, a HFV és a HIV-1 PR között 47% azonosságot vagy hasonlóságot találtunk. Ellenben a HFV és a HIV-1 PR hossza eltér; HIV-1 PR: 99 aminosav, HFV PR: 125 aminosav. A hosszbeli eltérések ellenére a HFV és a HIV-1 proteolitikus enzimjeinek 3D-s struktúrája a meghatározó régiók nagyfokú hasonlóságát mutatja. Ennek következtében a szubsztrátkötő hely és a dimerizációs felület konzerváltságára lehetett számítani a HFV modellje esetében is (mint más retrovirális enzimek esetében). Viszont meghatározott szerkezeti jellemzői még nincsenek feltárva, amíg a kristály szerkezete felépül.

A foamy proteázok tisztítása

Az expresszási és tisztítási protokoll segítségével tiszta és aktív fúziós enzimet nyertünk ki. A specifikus aktivitása hasonló volt a processzált enziméhez. Az amilóz oszlopon tisztított fehérje frakciókat összegyűjtöttük, a fúziósfehérjéket ammónium-szulfáttal kicsaptuk és koncentráltuk. A csapadékot feloldottuk β -merkaptóetanolt tartalmazó lízis pufferben. A foamy proteázok aktivitását máris mértük jégen, mert azt tapasztaltuk, hogy -20°C -on idővel inaktív. A tisztítást sikeresen alkalmaztuk a mutáns és vad-típusú enzimekre egyaránt, amilóz-affinitás kromatográfiát használva.

A vad-típusú és a mutáns foamy proteázok katalitikus állandói

Összehasonlítottuk a vad-típusú és mutáns MBP-HFV proteázok aktivitás értékeit. Az S25T foamy mutáns specificitási állandója ugyanaz volt, mint a vad-típusúé. Az egyszeri mutánsok (T28D, Q8R, H22L) értékei alacsonyabbak voltak, mint a vad-típusú enzimé. A specificitási állandó e kettős mutáns (H22L-T28D) esetében alacsonyabb volt. De a Q8R-T28D mutánsra mért érték pedig magasabb volt, mint a vad-típusúé. Az enzim koncentráció meghatározása fehérjekoncentráció mérésel történt (Bradford-módszerrel). Az enzim koncentrációkat használtuk a k_{cat} értékek kiszámításához a kísérletileg mért V_{max} értékekből. A legtöbb mutáns esetén a k_{cat} közel hasonló értéket mutatott a vad-típussal. Ez arra utal, hogy a mutánsok folding-képessége is valószínűleg hasonló a vad-típusúéhoz. A mutáns enzimek k_{cat} értékeinek kis variációja összehasonlítva a vad-típusú enzimével utalhat kis variációkra a katalitikus állandókat illetően és a helyesen foldingolt enzimre is.

A foamy proteázok pH optimuma

Meghatároztuk a vad-típusú és mutáns foamy proteázok pH profilját. A legalacsonyabb pH optimum 6.2 volt a Q8R mutáns foamy proteáz esetében, míg a legmagasabb 6.8 volt a T28D mutáns foamy proteáz esetében. A FV PR pH optimuma közel semleges. Ezek az értékek kicsit magasabbak, mint más retrovirális enzimek pH optimum értékei (mind savas pH-n mutatnak maximális aktivitást). Ez jelezheti, hogy bizonyos hasítási események késve fordulnak elő a foamy vírus által fertőzött sejtekben. A H22L mutáns pH optimuma közel volt a vad-típusú PR-hoz. Alacsonyabb pH optimum volt megfigyelhető a szerint tartalmazó vad-típusú HFV PR esetében, összehasonlítva a treonint tartalmú mutáns (S25T) pH optimumával. A megnövekedett pH optimum a megnövekedett dimer stabilitás következménye lehet. A HIV-1 PR esetében a dimerizáció erősen függ a pH-tól, mivel magasabb pH-n kevésbé stabil dimereket alkot.

A foamy proteázok urea denaturálása

A vad-típusú és mutáns enzimek dimer stabilitása kerültek összehasonlításra urea denaturáció görbék meghatározásával, két pH-értéken (6.0 és 7.2). A $D_{1/2}$ legalacsonyabb érték a vad-típusú esetében volt, míg az S25T és T28D mutánsok kevésbé voltak érzékenyek az urea hatására, mindkét pH-értéken. A dimer stabilitást növelte a Ser25→Thr mutáció, ami összhangban van a javasoltakkal (ez az oldallánc szerepet játszik a dimerizációban). A dimer stabilitása nőtt a H22L mutáns mindkét pH-n, amint vártuk. A T28D és Q8R egyszeres mutánsok nagyobb stabilitást mutattak, mint a vad-típusú enzim. A T28D mutáns

sokkal stabilabb volt, mint a kettős mutáns Q8R-T28D enzim. Az enzimek stabilitása korrelált a hidrogén-kötés kialakító képességével. Csak egy hidrogén-kötés alakítható ki Gln-Thr és Arg-Thr aminosav oldalláncok között, ellentétben Gln-Asp és Asp-Arg oldalláncok között, ahol két hidrogénkötés is létrejöhet. Míg a vad-típusú HFV PR-nak ugyanaz volt az urea érzékenysége mindkét pH-értéken, a mutáns enzimek nagyobb érzékenységet mutattak pH 6.0-nál, mint pH 7.2-nél.

5.2. RETROVIRÁLIS PROTEÁZOK SZUBSZTRÁTSPECIFICITÁS VIZSGÁLATA

Korábban, a laboratórium munkatársai és a kollaborációs partnereink jellemezték a HIV-1, HIV-2, EIAV és AMV proteázok szubsztrátspecificitását 1-es típusú HIV-1 (MA és CA fehérjék között) hasítási helyen alapuló szintetikus oligopepid sorozat felhasználásával. Eredményeinket kibővítettük a HTLV-1, BLV, MPMV, MMTV, MMLV, WDSV és HFV proteázok jellemzésével, így minden retrovírus nemzetség legalább egy tagja karakterizálva lett. A HTLV-1 és HFV PR-zok nem tudták hidrolizálni az eredeti peptidet. A HFV PR nem hidrolizálta a többi peptidet sem, kivéve a P3-Val-t tartalmazó szubsztrátot; a további vizsgálatokból kivontuk ezt az enzimet. A tizenegy enzimmel kiterjesztettük vizsgálatainkat a szubsztrát P1, P3 és P4 szubsztrátkötő helyeire vonatkozóan. A különböző retrovirális proteázok feltérképezését ugyanazon laboratóriumban, ugyanazt a szintetikus oligopeptidsorozatot használva, ugyanolyan reakció körülmények mellett végeztük, így az eredmények összehasonlíthatóak. Az is kiderült korábban, hogy a relatív aktivitás értékek és a k_{cat}/K_m kinetikai paraméterek között erős korreláció áll fenn, így a mért enzimaktivitás értékek megfelelőek a specificitási állandóknak.

P1 specificitás vizsgálata

Különböző retrovirális proteázok szubsztrátspecificitás összehasonlítása 1-es típusú HIV-1 MA/CA szubsztrát sorozaton azt mutatta, hogy a proteázoknak sok közös vonásuk van. Mindegyikük inkább hidrofób aminosavakat preferál a P1 helyen szubsztituált származékok közül, bár az oldallánc optimális mérete függhet az S1-et alkotó alzsebtől, és lehet függvénye a P3 oldalláncnak is. A preferencia variációk a hasított P1 szubsztituált peptideken meglepően kicsi volt. Az S1 kötőhely szubsztrátspecificitás vizsgálatában, a BLV PR kivételével, a többi enzim aromás (Phe, Tyr) oldallánc preferenciát mutatott. Ez azt sugallja, hogy az S1 zseb mérete és hidrofób természete jól konzervált a retrovirális proteázok között. A molekuláris modellezés azt jósolta, hogy mivel az S1 zseb nagyon közel van a hasítási helyhez, ki kell tölteni egy hidrofób oldallánccal, hogy hatékony hasítást érjünk el. Van azonban néhány finom specificitás különbség az enzimek kisebb aminosav oldalláncok (Leu

vagy Met) befogadását illetően. A BLV PR esetében a legkedvezőbb cserének a leucin oldalláncot tekintik ebben a pozícióban. Ez által létrejön egy alcsoportja a proteázoknak, beleértve az MMLV és WDSV proteázokat is.

P3 specificitás vizsgálata

Az S3 alzseb sokkal nyitottabb, mint az S2, ezáltal különböző oldalláncok befogadására képes. Az S3 zseb specificitás függvénye a P1 kötőhelynek; egy nagy P1 oldallánc korlátozza a P3 oldallánc méretét. Eltérően az S1 kötőhely szubsztrát specificitásától az S3 kötőhely feltérképezése során különböző aminosavrészeket észleltek. Az alfa- és béta retrovírus proteázok inkább a nagyméretű és hidrofób aminosavakat preferálták (mint például a Phe és Leu) ebben a pozícióban, ami hasonló az S1 preferenciájához. A többi enzim inkább kisebb, hidrofób maradványokat (például Val) vagy poláros aminosavakat (mint Gln) preferált ebben a pozícióban. Az S3 kötőhely specificitása korrelál a filogenetikai fával: a lentivírus proteázok előnyben részesítik az eredeti poláros származékot (Gln), valamint a nagy hidrofób oldalláncokat, míg a MMLV és WDSV proteázok kisebb, hidrofób vagy poláros aminosav rész-cseréket tolerálnak jobban (Ala, Gln, Asn). A BLV PR-nak az alanin, illetve a kis és poláros lizin csere kedvezett, a WDSV proteázoknak a glicin csere volt a legjobb. Mindazonáltal, úgy tűnik, hogy az aminosav mérete a fő specificitás meghatározó ebben a pozícióban. A HIV-1 MA/CA szubsztituált peptid sorozatban a HFV PR csak egyet volt képes hidrolizálni, a P3 Val tartalmú peptidet, ellentétben a P2-módosított szubsztrátok sorozatával, ahol sok szubsztrátot jól hasított. Meg kell említeni, hogy a deltaretrovírus proteázok közül a HTLV-1 PR nem tudott hidrolizálni egyet sem a MA/CA hasítási helyet tartalmazó szintetikus oligopeptidsoron, amit HTLV-1, 1-típusú hasítási helyen alapuló szubsztrát hiánya okoz.

A retrovirális proteázok kristályszerkezete és molekuláris modelljei azt sugallják, hogy az S3 alzseb általában nagy. Következésképpen, a P3-oldalláncot úgy lehet elhelyezni, hogy az enzim kapcsolatba kerül a belső hidrofób aminosav részekkel. Ezek a zsebek be tudnak fogadni különböző oldalláncokat, és az aktivitás értékeik viszonylag kicsik, összehasonlítva a szomszéd alzsebekkel, az S4 és S2-vel.

P4 specificitás vizsgálata

A P4 szerin csere olyan peptideket eredményezett, amelyek többé-kevésbé hidrolizálhatóak voltak a vizsgált proteázokkal. Továbbá, különböző mértékű szelektivitás is megfigyelhető volt az enzimek körében, például a deltaretrovírus proteázok (HTLV-1 PR és BLV PR) voltak a leginkább korlátozottak

(4-6 peptid nem volt hasítható), míg a WDSV PR esetében a legnagyobb volt az eltérés (4x) a legjobb és a legrosszabb szubsztrátok hasíthatósága között.

Hasonlóan az S3 zsebhez, különböző aminosavrészek illeszkednek az S4 zsebbe is. Egyes esetekben kisméretű és poláros oldalláncok előnyben részesítettek voltak a főemlős lentivírus proteázzal szemben, ahol a PR a glicint és a szerint preferálta. Ezzel szemben, a hidrofób aminosavrészek cserélése jól hidrolizálható szubsztrátokat eredményezett az EIAV PR számára, ami magyarázható a „flap” kiegészítő 50-52 maradványok jelenléte miatt, amelyek hozzájárulnak az S4 zsephez. Más enzimek nem voltak nagyon szelektívek, képesek befogadni különböző hidrofób vagy poláros oldalláncokat, ami arra utal, hogy ezen enzimek S4 zsebe zártabb és hidrofóbabb tulajdonságúak. A legjobban hasíthatónak bizonyult a P4 Ile tartalmú peptid az AMV PR esetében, míg a MPMV PR Phe helyettesítése volt a leghatékonyabb. A legjobb értékeket az eredeti szubsztrát esetében kaptuk, Asn-t tartalmú oldallánccal és a Gly-t tartalmazó peptid csere esetében. Nincsenek jól meghatározott zsebek, mint a belső kötőhelyek esetében. Az S4 zseb közel helyezkedik el a felszínhez, így a befogadott P4 oldallánc részben az oldószerrel is kölcsönhatásba léphet. A retrovirális proteázok a hidrofób aminosavrészeket preferálják, kivéve a HIV proteinázoikat, amelyek előnyben részesítik a kis oldalláncokat.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkám során lehetőségem volt a retrovirális proteázokat (HIV-1, HIV-2, EIAV, AMV, MMLV, MMPV, MMTV, BLV, HLTV-1, WDSV és HFV) tanulmányozni és szubsztrátspecifitását összehasonlítani. A HFV proteáz igencsak alacsony katalitikus aktivitást mutatott az 1-es típusú szubsztrátokon; csak egyetlen egy szubsztrát volt hasítható (P3 Val). Tanulmányoztunk pár foamy PR mutánst megvizsgálván a HIV-1 PR felé mutató mutációk hatását, szerkezetileg azonos pozíciókban. Jellemeztük a mutációk hatását a katalitikus aszpartát közelében és az eredményeket összevetettük a HIV-1 PR-zéval. Felépítettük a HFV PR molekuláris modelljét. A HFV PR mutációi vad-típusúhoz hasonló eredményekhez vezetett, vagy még magasabb pH optimumhoz. Hasonló eredményeket kaptunk a dimer stabilitás tanulmányozásában is, mindkét vizsgált pH-értéken (6.0 és 7.2). A HFV PR jobban tolerálja a mutációkat a katalitikus aszpartáthoz közeli helyeken, mint más retrovirális proteáz (pld. HIV-1 PR). A mutációs vizsgálataink azt sugallják, hogy a foamy PR szerkezete eltér a többi retrovirális enzimétől. Lehet, hogy az evolúció során a foamy enzim dimerizációs energiái nem optimalizálódtak úgy, mint a HIV-1 PR esetében. Jobban ismerve a spumavírus enzimeit és a replikációs stratégiáját segít majd a foamy vektorok tervezésében és alkalmazásában, mint lehetséges génterápia eszköz a betegségek orvoslásában.

Megvizsgáltuk a retrovirális proteázok hasítását, amely vizsgálathoz 34 különböző szubsztrátot használtunk. Az oligopeptidok a P1, P3, és P4 pozíciókban tartalmaztak különböző aminosav cserét, a HIV-1 Gag hasítási helyen (MA↓CA: Val-Ser-Gln-Asn-Tyr↓Pro-Ile-Val-Gln). A tizenegy retrovirális proteáz specifitását vizsgáltuk, a *Retroviridae* család mind a hét nemzetsége képviselőjével, egy sor oligopeptid szubsztrát felhasználásával. A rendszer lehetővé tette számunkra, hogy vizsgáljuk meg a hasítás relatív (aktivitás értékek) arányait a peptidok hasíthatóságának kimutatására, ugyanazon feltételek mellett (amelyek magukban foglalják az alacsony pH és magas só koncentrációt). A vizsgált fehérjebontó enzimeknek a molekuláris modellezése fontos eszköz, hogy megértsük a specifitásuk közötti hasonlóságokat és különbségeket. A hasítási helyeket csoportokba osztottuk (vírus csoportok különültek el) az aminosav (-kedvezményezettség alapján) mérete és jellege által (a P1, P3, és P4 pozíciókban). A HIV-1 proteázokban rezisztencia kialakulása során (az AIDS-elleni terápiában) a létrejövő mutációk számos esetben olyan aminosavak megjelenését mutatja, amelyek megfelelnek más retrovirális proteázokban hasonló helyen található aminosavrészeknek, ezért kerestünk egy kötődést az aminosav-preferencia egy adott pozícióban és a vizsgált proteázok természetben előforduló 1-es típusú hasítási hely szekvenciái között. A proteázok specifitásbeli

különbségek jól korreláltak a retrovírusok filogenetikai fájával, melyek jól követik a proteáz-szekvencia illesztés alapján felépített törzsfa menetét, de nem esnek annak csoportjaival pontosan egybe.

A retrovirális proteázok összehasonlító tanulmánya remélhetőleg hozzájárul a proteinázok általános és speciális jellemzői megértésében, és segítséget nyújthat a HIV-1 PR mutációs képességének feltérképezésében. Fő hipotézisünk az volt, hogy a vizsgált retrovírusok enzimei evolúciósan szelektált életképes variációknak tekinthetők. Specifitásuk jellemzése rávilágíthat a retrovirális proteinázok alapvető jellegzetességeire, ami elősegítheti olyan széles spektrumú inhibitorok tervezését, amelyek elől a vírusok nem képesek kitérni különböző mutációk által.

7. Tárgyszavak: retrovirális proteáz, oligopeptid szubsztrát, enzim kinetika, szubsztrátspecifitás, pH optimum, dimer stabilitás, molekuláris modell, foamy vírus

8. PUBLIKÁCIÓS LISTA



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

Iktatószám: DEENKÉTK/270/2012.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Eizert Enikő Helga

Neptun kód: H4C01T

Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológiai Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Eizert, E.H.**, Bander, P., Bagossi, P., Sperka, T., Miklóssy, G., Boross, P., Weber, I.T., Tózsér, J.:
Amino acid preferences of retroviral proteases for amino-terminal positions in a type-1 cleavage site.
J. Virol. 82 (20), 10111-10117, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/j-vi.00418-08>
IF:5.308
2. Sperka, T., Boross, P., **Eizert, E.H.**, Tózsér, J., Bagossi, P.: Effect of mutations on the dimer stability and the pH optimum of the human foamy virus protease.
Protein Eng. Des. Sel. 19 (8), 369-375, 2006.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/protein/gzl021>
IF:3



További Közlemények

3. Tárkányi, I., Horváth, A., Szatmári, I., **Eizert, E.H.**, Vámosi, G., Damjanovich, S., Ségál-Bendirdjian, E., Aradi, J.: Inhibition of human telomerase by oligonucleotide chimeras, composed of an antisense moiety and a chemically modified homo-oligonucleotide.
FEBS Lett. 579 (6), 1411-1416, 2005.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2005.01.041>
IF:3.415

Összesített impakt faktor: 11.723

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 8.308

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2012.09.10



9. KONFERENCIA ELŐADÁSOK ÉS POSZTEREK

1. A Ph.D. értekezés alapjául szolgáló előadások és poszterek:

Tózsér, J., **Eizert, H.**, Sperka, T., Kádas, J., Miklóssy, G., Boross, P. és Bagossi P. (2006) „Retrovirális proteázok összehasonlító specifitás-vizsgálata” - A Magyar Biokémiai Egyesület 2006. évi Vándorgyűlése, Pécs

Eizert, H. (2006) „Retrovirális proteázok szubsztrátspecifitásának összehasonlítása egy 1-es típusú természetes hasítási helyen alapuló oligopeptid sorozaton” - Ph.D. és TDK Tudományos Diáktalálkozója, Debrecen

H., Eizert, P., Bagossi, T., Sperka, A., Fehér, J., Kádas, G., Zahuczky, G., Miklóssy, P., Boross, and J., Tózsér (2005) „Amino acid preferences for P1 and P4 sites of retroviral proteases in type 1 cleavage sites” - 30th FEBS Congress and 9th IUBMB Conference. The Protein World, Budapest

Eizert, H. (2005) „A retrovirális proteázok specifitásának összehasonlítása” - A Márton Áron Szakkollégium tudományos felolvasó ülésének tanulmányai. Ph.D. felolvasó ülés, Budapest

H., Eizert., P., Bagossi, T., Sperka, A., Fehér, J., Kádas, G., Zahuczky, G., Miklóssy, P., Boross, S., Oroszlán, and J., Tózsér (2005) „Amino acid preferences for substrate binding subsites of retroviral proteases in type 1 cleavage sites” - Sixth DRP Symposium, Antiviral Drug Resistance, Chantilly, Virginia, USA

2. További előadások és poszterek:

D., Popa, O., Micle, R., Iovan, **H., Rosmann**, and P., Marusca (2011) „Aspects of etiology and treatment of oropharyngeal candidiasis” - Romanian Meeting of Medicine Laboratories, Piatra Neamt, Romania

I., Tárkányi, A., Horváth, I., Szatmári, **H., Eizert**, G., Vámosi, S., Damjanovics, E., Ségal-Bendirdjian, and J., Aradi (2005) “Inhibition of human telomerase by oligonucleotide chimeras composed of an antisense moiety and a chemically modified homo-oligonucleotide” - Cold Spring Harbor Meeting. Telomeres & Telomerase, New York, USA

Eizert, H. (2005) „Sejtfelszíni thioredoxin kölcsönhatása kémiaailag módosított oligonukleotidokkal” - Ph.D. és TDK Tudományos Diáktalálkozója, Debrecen

Eizert, H., Horváth, A., Szöllősi, J., és Aradi, J. (2004) „Sejtfelszíni thioredoxin kölcsönhatása kémiaailag módosított oligonukleotidokkal” - Ph.D. Tudományos Napok, Budapest