

EGYETEMI DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

A marha leukémia vírus proteáz jellemzése és összehasonlítása más
retrovirális proteázokkal

Sperka Tamás

Témavezető:
Prof. Dr. Tőzsér József

Debreceni Egyetem
Orvosi- és Egészségtudományi Centrum
Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet

Debrecen, 2007

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 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 jellemezzük: felépítés, összetétel, szaporodási tulajdonságok. A vírusrészecskék átmérője általánosan 80-100 nm között változik, külső lipid burkukban virális glikoproteinek találhatók. 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 intermediéren keresztül történik, amely a fertőzött sejt genomjába beépül.

A virális genom szerveződése szerint két csoportra: egyszerű és összetett retrovírusokra osztjuk őket. Minden retrovírus legalább három poliproteint kódoló gént tartalmaz: *gag*, melyen a vírusrészecske mátrix (MA)¹, 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 burokfehérje 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.

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.

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.

1.2. A RETROVÍRUSOK ÉLETCIKLUSA

A vírus receptor-mediált endocitózissal vagy direkt membránfúzióval juthat be a gazdasejtbe. A genom-RNS pozitív szálú és szabályos, eukarióta sejtre jellemző mRNS szerkezetet mutat, de közvetlen fehérjeszintézishez mégsem ez használandó 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. Egyes adatok szerint a PR szerepet játszhat ebben a fázisban.

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.: Moloney egér leukémia vírus (MMLV)) *gag* és *pol* génjei stop-kodonnal (AUG) vannak elválasztva, mely transzláció során néha néma marad. 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. marha leukémia vírus (BLV), HTLV). A PR kódolása többféleképpen történhet. A PR, a madár C-típusú vírusai (pl. rous szarkóma vírus (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 íródna 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.

A transzláció 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 sejtéből 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. 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. 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, ezért valószínűsíthető, hogy az aktin komponenseinek proteolitikus hasítása fontos lépés ebben a folyamatban.

Celluláris proteineket szintén kimutattak a vírusrészecskében. 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. 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 RNázH is szerepel a HIV-1 PR szubsztrátjai között s a PR maga is végigmegy egy öndegradációs folyamaton.

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 retrovírustól, 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. Annyi bizonyos, hogy a vírus által kódolt transz-aktivátor Tax 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, de ismert apoptózist indukáló képessége is. 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. 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. BLV fertőzött nyulak modellrendszerként szolgálhatnak limfotróp retrovírusok elleni oltóanyagok kifejlesztésében. 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. 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. Mindezekon 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.

1.4. A RETROVIRÁLIS PROTEÁZOK

Minden fertőzőképes retrovírus kódol egy proteázt (PR), mely része a Gag vagy Gag-Pol poliproteinnak. 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, 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. 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. A katalitikus tripletek hidrogénkötések hálózatán keresztül, jellemző módon kapcsolódnak egymáshoz, amit a kötés térszerkezetére és igen erős jellegére utalva tűzoltófogásnak (*fireman's grip*) neveznek. Egy másik többé-kevésbé konzervatív

régió a mozgékony *flap* régió, mely a szubsztrát illetve inhibitor kötődésekor elmozdul és ráhajlik a ligandra, majd azzal számos kölcsönhatást alakít ki, melyekkel stabilizálja a komplexet. A harmadik konzervatív régió (Gly-Arg-Asp/Asn) a C-terminális közelében helyezkedik el és ionpárok kialakításával a dimerizációban játszik fontos szerepet.

A retrovirális proteázok pH optimuma savas (pH 5-6), részletes biokémiai jellemzésüket oligopeptid és poliprotein szubsztrátokon végezték. A hasítás poliprotein szubsztrátoknál alacsony, oligopeptidek esetében viszont magas (2-3 M NaCl) ionerősség mellett hatékonyabb. 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. A kapcsolódó szubsztrát oldalláncái 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. Jelenleg a retrovirális proteáz hasítási helyeket két csoportra osztjuk. Az 1-es típusú hasítási hely $P1^2$ pozícióban aromás, $P1'$ pozícióban Pro aminosavrést tartalmaz, míg a 2-es típusú hidrofób oldalláncúakat (kivéve Pro). A $P2$ és $P2'$ hely meghatározónak mutatkozik a specificitás kialakításában. 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 aminosavréseket 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 aminosavrése imino oldalon szerepelne. A Pro aminosavrésszel, 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. A HIV-1 PR konformációs szelektivitása a hasított peptidkötés transz izomerének irányába mutat, ahogyan ezt NMR és kinetikai vizsgálatok bizonyították.

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

A 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. 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.

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. 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, majom immundeficiencia vírus (SIV), RSV, macska immundeficiencia vírus (FIV) és EIAV) három-dimenziós szerkezete már ismert, utolsóként a HTLV-1 kristályszerkezetét határozták meg. 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. 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. Már elérhető fertőzőképes BLV klón, amely a kidolgozott állatkísérletes rendszerekkel együtt segítséget nyújthat HTLV-1 ellenes módszerek kifejlesztéséhez. Mindazonáltal, a BLV proteáz részletes és összehasonlító szubsztrátspecificitás és gátolhatóság 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, a BLV PR eredményeink alapján jósolt 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, MMLV és madár mieloblasztóma vírus (AMV) 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 koncentrálna kiterjesztjük a vizsgálatokat a BLV valamint olyan különböző retrovirális proteázokra (Mason-Pfizer majom vírus (MPMV), egér emlőtumor leukémia vírus (MMTV), HTLV-1, humán foamy vírus (HFV) és süllő bőr szarkóma vírus (WDSV) proteázok), melyek révén vizsgálatainkban a *Retroviriade* 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. A HIV-1, HIV-2 EIAV és AMV proteázokra mért értékeket korábbi közleményekből vettük át.

3.2. SZINTETIKUS OLIGOPEPTID SZUBSZTRÁTOK

Az oligopeptideket szilárd fázisú peptidszintézissel készítették, Model 430A automata peptid szintetizátorral vagy félautomata Vega peptid szintetizátorral. A tisztításhoz RP-HPLC-t használtak. 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.

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

A retrovirális proteázok aktivitásmérése 20 μ l reakcióelegyben történt: 5 μ l 1,6 mM koncentrációjú szubsztrátoldat, 5 μ l enzimkészítmény, 10 μ l, 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 reakcióelegyeket 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 μ l 1% TFA hozzáadásával állítottuk le, majd a szubsztrátot RP-HPLC-vel választottuk el a termékektől, valamint a pufferkomponensektől, Nova-Pak C18 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. Ezek alapján a többi enzim esetében a termékek azonosításához a retenciós időket vettük figyelembe. Mindegyik mintánál két párhuzamos mérést végeztünk, számításainkhoz az átlagértékeket 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 μ l 0,03-2,90 mM koncentrációjú szubsztrátoldatot használtunk a hozzávetőleges K_M értéktől függően, és 5 μ l 12-7800 nM koncentrációjú enzimkészítményt. Minden szubsztrátpeptidre hat különböző koncentrációt teszteltünk. A kinetikai paramétereket a Fig.P program 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. 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 kihatja magát az MBP-fúziós fehérjéből és inklúziós testből tisztítható. Mutánsainkat megfelelő oligonukleotid párokat felhasználva, Quick-Change mutagenézis eljárást követve állítottuk elő. A mutációkat DNS-szekvenálással ellenőriztük, melyet ABI-Prism *dye terminator cycle sequencing kit* 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 fehérjét 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 (polivinilidénfluorid) membránra vittük át. Az immunoblottot kémiaiag szintetizált BLV proteázzal immunizált nyulakból származó antiszérummal, peroxidáz konjugált anti-nyúl második antitesttel és ECL detekciós kit segítségével végeztük el. Azokat a mutáns enzimeket, melyek jelentős mértékben képesek voltak önmagukat a fúziós fehérjéből kihatni, 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 határoztuk meg, 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. A munkánk során használt redukált peptidkötést tartalmazó inhibitorokat (IB 268 és IB 269 (APQVL-r-PVMHP)) Dr. Ivo Blaha szintetizálta.

3.5. . GÁTOLHATÓSÁGI VIZSGÁLATOK

A gátolhatósági vizsgálatokhoz mikrotiter lemez alapú fluoreszcens eljárást alkalmaztunk. 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 fluori-luminométer segítségével 460 nm hullámhosszon detektáltuk. A belső szűrő-hatás korrekciót és a K_i értékeket a KiDet program alkalmazásával határoztuk meg.

3.6. MOLEKULÁRIS MODELLEZÉS

A BLV PR modelljének felépítéséhez a szubsztrát-alapú sztatin inhibitorral meghatározott HTLV-1 kristályszerkezet szolgált kiindulópontul. A modellezés során a HTLV PR megfelelő aminosavrészeit 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, ahogyan azt korábban leírták a HTLV-1 proteázra. Mivel a HTLV-1 kristályszerkezete nem tartalmazza az utolsó 10 aminosavrészt, ezért minta hiányában a BLV PR 118-126 aminosavrészét 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 sp^4 potenciál-készlettel hoztuk létre, 15 ciklusos Kohonen algoritmust felhasználva, majd a nemkötő és geometriai tagok energia-minimalizációja következett. Végezetül, a teljes proteáz-szubsztrát komplexet 400 lépéses minimalizációnak vetettük alá. A szerkezeteket Sybyl vagy RasMol 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. A szerkezeti illesztés Whatif, a kiindulási többszörös illesztés ClustalW programmal készült, ez utóbbi eredményeit a szerkezeti illesztés alapján kézi úton javítottuk ki. A filogenetikus fa elkészítéséhez ClustalW és Phylip programokat használtunk. Az összes vizsgált retrovirális proteáz esetében a Modeller 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, HIV-2, EIAV, FIV és RSV 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 aminosavrésszben különböznek, melyek nem vesznek részt az enzim-szubsztrát kölcsönhatásban. 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 peptidek 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 programmal történő rövid energiaminimalizálással távolítottuk el, a következő paraméterek mellett: Kollman-féle *all atom force field*, 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.

Az S2 zsebeket felépítő aminosavrészeket korábban valószínűsítették a HIV-1 és HIV-2, EIAV, AMV, MMLV és HTLV-1 proteolitikus enzimek esetén. A BLV, MMTV, MPMV, HFV és WDSV proteázok megfelelő aminosavrészei az enzimek aminosav-sorrendjeinek illesztéséből adódtak 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-krisztallográfia, 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, specifitásának 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. 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. A szubsztrátkötő helyeket felépítő aminosavakat összehasonlítva, 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 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, míg mások szerint a 116-120 aminosavrészig terjedő szakasz nélkülözhetetlennek mutatkozik. A BLV PR dimer végső modellje (szubsztráttal) a HTLV-1 PR kristályszerkezetével összehasonlítva 0.79 Å RMS (*root mean square*) értékkel rendelkező 223 pár Cα atomra vonatkoztatva és 1.72 Å RMS értékkel 175 pár Cα 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 Cα atomra vonatkoztatott, 1.25 RMS értékkel.

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

A BLV PR szubsztrátspecifitásának 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 peptidek előzőleg hasíthatónak bizonyultak a megfelelő retrovirális proteázokkal, illetve a HTLV-1 és a HIV-1 proteolitikus enzimek specifitásának összehasonlítására sikerrel alkalmazták őket. Az oligopeptidek többségét (50-ből 40-et) mind a BLV, mind a HIV-1 PR képes volt bontani. 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 peptidek 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. A legtöbb esetben a hidrolízis elmaradását nem a peptid kötődésének hiánya okozta, hiszen e peptidek az enzim aktivitását képesek voltak gátolni HTLV-1 P1 Phe aminosavrész-cserét tartalmazó szubsztráttal végzett mérésekben. A specifitásvizsgálatok 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. A 31. peptidet a HIV-1 az autentikusnak megfelelő helyen (DLVL↓LSAE) bontotta, míg a BLV egy aminosavrészrel 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. Másrésről a 49. peptidet a HIV-1 PR hasította az eredeti helyhez (LECL↓LSIP) képest egy aminosavrészlet 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 függnék 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.

4.1.3. 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 specificitásvizsgálatot végzett a HIV-1 és HTLV-1 proteázokra, illetve eredményesen alkalmazta HTLV-1 proteázban HIV-1 PR felé mutató mutációk okozta specificitásváltozások tanulmányozására. Így alkalmunk adódott a különböző proteolitikus enzimek specificitásának ugyanazon szubsztrátokkal történő, közvetlen összehasonlítására. Az oligopeptid-készlet az N-terminális felől rövidített származékokat és P4-P1' pozíciókban egyszeres aminosavrészlet-cseréket tartalmazó peptideket tartalmazott és használhatónak bizonyult a BLV PR szubsztrát-specificitásának karakterizálásában is.

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 specificitási 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.

4.1.3.1. A BLV PR szubsztrátkötő helyének mérete

A természetes hasítási hely szekvenciáját tartalmazó dekapeptid mindhárom enzim számára jó szubsztrátnak bizonyult. Fontos megjegyezni, hogy ez egyéb retrovirális proteázok esetében is igaz, így ezen oligopeptid általános PR szubsztrátnak tekinthető, s alkalmasnak találták fluoreszcens gátlási vizsgálatok kivitelezéséhez is. 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. 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 enzimjeinél Asp csere esetén is megfigyelhető volt, míg a HTLV-1 PR számára az Asp a legrosszabb szubsztituensnek bizonyult.

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. 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 hidrofóbabb kötőhelyet alkotnak a HIV-1 proteázénál. Így azt mondhatjuk, hogy BLV PR S4 szubsztrátkötő zsebe erősen hasonlít más (nem főemlős) retrovírusokéhoz. 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.

4.1.3.3. A BLV PR S3 kötőhelyének jellemzése

A P3 származékok mindegyike is hasíthatónak bizonyult a BLV proteázzal. A specifikációs állandó változása a BLV PR esetében jóval szűkebb tartományt ölel fel, mint a

másik két enzimnél, az egyetlen kiugró értéket az alaninra történő csere szolgáltatja. Eredményeink alapján változatos aminosavrészek lehetnek elfogadottak a proteázok ezen kötőhelyein.

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. A zsebet felépítő aminosavak többsége azonos vagy hasonló a három proteázban. 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 specificitásaikra: jellemzően kedvezőtlennek bizonyultak a HIV-1 PR számára, míg a HTLV-1 PR néhányukat jó hatékonysággal hidrolizálta. 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. 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. Az Asn38 és Tyr68 okán a BLV PR S2 kötőhelye hidrofílebb sajátosságokkal bír, mint a HTLV-1 proteolitikus enzime jó egyetértésben a P2 helyen szerint, aszparagint vagy aszpartátot tartalmazó oligopeptidekre mért viszonylag magas kinetikus hatékonysággal.

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 aminosavrész-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.

Szerkezeti vizsgálatok azt mutatták, hogy ezen alzsebek 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 találhatók. Mindemellett, felépítésükben nem konzervatív aminosavrészek is részt vesznek. 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 aminosavrészre 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. 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 aminosavrészek nagyfokú hasonlóságának függvényében meglepő; valamint lényeges elem lehet a specificitás vizsgálatok szekvencia-függésének megértésében is.

4.1.3.6. A BLV PR S1' kötőhelyének jellemzése

A hidrofíli aminosavak megjelenése a P1' származékok esetén is a BLV PR számára volt kedvezőbb, a HTLV-1 és a HIV-1 proteázokhoz képest. A Pro mindkét utóbbi enzimnél nagymértékű növekedést idézett elő a K_M értékében, a BLV PR esetében viszont a k_{cat} értéke lett viszonylag magas, számottevően megnövelve a specifikitási állandó számértékét. A vizsgált oligopeptidok közül a HTLV-1 és a HIV-1 proteázoknak a Leu illetve Ile, a BLV proteáznak pedig a Phe csere kedvezett leginkább. 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.

A 4.1.3. fejezetben kapott eredményeket tekintve megállapíthatjuk, hogy a BLV proteáz specifikitása (a rokonsággal összhangban) sok tekintetben a HTLV-1 proteázéhoz hasonlónak, 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 specifikitását. Az eredmények arra is rámutatnak, hogy nemcsak közvetlenül a hidrolizált kötés melletti aminosavak határozzák meg a hasítás specifikitását, 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') alzsebek 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 specifikitásának mélyebb megértéséhez és mutációs toleranciájának vizsgálatához, szubsztrátkötő zsebeinek néhány aminosav részét, egyszeresen vagy többet kombinálva a HIV-1 PR szerkezetileg megfelelő pozíciójában levő aminosav részére cseréltük ki. Több BLV PR mutáns elvesztette a vad típus önprocesszálo 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 csokolt proteáz eredményezett, amely a mutációval bevitt új hasítási helyre vagy erőteljesen megváltozott specificitásra utal. A mutációs érzékenység túlmutat a szubsztátkötő zsebeket alkotó aminosavrészen. 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; mindemellett mindkét aminosav rész mutációja 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. A HIV-1 PR esetén, a vad típusú BLV és HTLV-1 proteázokhoz hasonlóan, közel 100%-os folding-képesség tapasztalható. Számos gyógyszerrezisztens HIV-1 PR mutáns a vad típusú enzimhez hasonló folding-képességgel rendelkezik, azonban néhány egyszeres HIV-1 PR mutánsnál megfigyelhető volt ezen hajlam jelentős romlása is. 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 önprocesszálo 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, mivel korábban kimutatták, hogy a retrovirális proteázok MBP-fúziós formában is a processzált formával összevethető mértékű aktivitást. 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. 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. 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.

4.1.5. 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 illetve a hagyományos HPLC eljárással. Miközben a HIV-1 PR ellenes vegyületek 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. Ez a hatás egybecseng a megfelelő oligopeptid szubsztrátokkal BLV proteázra mért alacsonyabb K_M értékekkel. 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. A K_i értékének erőteljes ionerősség-függését a HTLV-1 és HIV-1 proteázokra korábban leírták. 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.

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. Az is kiderült, hogy a relatív aktivitás értékek és a k_{cat}/K_M kinetikai paraméterek között erős korreláció áll fenn, így a mért enzimaktivitás értékek megfeleltethetők a specificitási állandóknak. 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 enzimaktivások meghatározása és összehasonlítása, P2 pozícióban aminosavcseréket tartalmazó, 1-es típusú természetes hasítási helyet reprezentáló oligopeptid szubsztráton

Az eredeti szubsztrát P2 Asn aminosavrészének közepméretű hidrofób aminosavrészekre cserélése jól hidrolizálható peptideket eredményezett a legtöbb enzim számára. 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. 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. 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.

4.2.2. 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. Az egyéb modellek esetében hasonló RMS eltéréseket (0.9-2.9 Å) számoltunk, mint amilyeneket maguk közt a kristályszerkezetek közt kaptunk (1.0-2.7 Å); és hasonló összefüggést láttunk az RMS értékek és a szekvencia-hasonlóságok között, mint amilyenek a három-dimenziós szerkezetek között megfigyelhetők.

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. 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 aminosavréssz 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. 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 oldalláncokat elfogadó képességét, 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 ábráztuk a két legjobb P2 aminosavréssz-cserének bizonyult oldalláncok átlagtérfogatainak függvényében. 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.

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

A tanulmányozott retrovirális proteázok természetes hasítási helyeinek P2 pozíciójában található aminosavrészek általában jó egyezést mutatnak az S2 kötőhelyek tanulmányozásánál találtakkal. 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 aminosavrész kedvezményezettsége) és az alfa-, béta- és gammaretrovírusok között (kis méretű, hidrofób aminosavrész 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 aminosavrész (Ala) megjelenik a természetes hasítási helyeiben is, viszont az MPMV és MMTV helyek a kevésbé kedvelt izoleucint illetve treonint tartalmazzák e pozícióban. 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 aminosavrészek között fellelhető ellentmondást okozhatja az eltérő szubsztrát aminosavsorrend, amely pl. a HIV-1 esetében bizonyítottan erős hatást gyakorol a kötőhelyek (köztük a S2) preferenciájára; valamint fennáll a lehetősége annak is, hogy nem minden retrovirális hasítási hely ment keresztül a hatékonyabb hidrolízist eredményező evolúciós folyamaton.

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 és kristályszerkezeti vizsgálatok mutatják. Ez az aminosavrész gyakran változik valinra gyógyszeres kezelés hatására, mely lényegesen jobban illeszkedik az alzsebbe.

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 szubsztrátspecifitását 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 specifitást jelezve. További specifitásvizsgálatokat 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 hidrofil, sőt töltött oldalláncokat is. A kritikus S2 zsebet kiemelve megállapíthatjuk, hogy a specifitás szempontjából a méret meghatározó, de a zsebet alkotó hidrofilebb aminosavrészek hozzájárulásának köszönhetően a BLV PR meglehetősen jól tolerálta a poláros aminosavrész-cseréket is. Mindazonáltal, legtöbb tekintetben a BLV PR egyedi szubsztrátkötő zsebeinek specifitása 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 aminosavész-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 tervezettek 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 aminosavész-preferenciát nem tapasztaltunk. Ez az eltérés arra utal, hogy a retrovirális proteázok szubsztrátspecifitása erősen függ a hasítási hely környezetétől. Általánosságban azt mondhatjuk, hogy a főemlős (HIV-1, HIV-2, SIV) lentivírus proteázok kivételével az S2 zseb specifitása alapvetően méretfüggő és ez a tulajdonság a legtöbb esetben a természetes hasítási hely szekvenciákban is tükröződik. Az aminosavész-kedvezményezettségek alapján olyan filogenetikai vírus-csoportok különülnek el, melyek jól követik a proteáz-szekvencia illesztés alapján felépített törzsfa menetét, de nem esnek annak csoportjaival pontosan egybe.

Összességében elmondhatjuk, hogy a mutációkkal és a gátlószerekkel szembeni érzékenységük alapján, a specifitásbeli 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 szubsztrátspecifitásának jobb megértéséhez, amely segítséget nyújthat olyan széles hatástartományú inhibitorok tervezésében, melyek sikeresen gátolják a gyógyszeres kezelés hatására megjelenő, életképes HIV-1 proteáz mutánsokat.

6. KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

Az értekezéshez felhasznált közlemények:

- Bagossi, P., **Sperka, T.**, Fehér, A., Kádas, J., Zahuczky, G., Miklóssy, G., Boross, P. and Tőzsér, 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 Tőzsér, 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 Tőzsér, 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 Tőzsér, 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 Tőzsér, 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., Tőzsér, 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:

- Tőzsér, 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 posztterek:

- Sperka, T.**, Zahuczky, G., Bagossi, P., Emri, G., Oroszlan, S. és Tőzsér, 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.
- Tőzsér, 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 Tőzsér, J.: Mutáns retrovirális proteázok kinetikai jellemzése: Mutációk hatása a specificitásra. A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztályának 5. Munkaértekezlete, Sopron, 2000. Máj. 08-11.
- Tőzsér, 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 Tőzsér, 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.**, Tőzsér, 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. .
- Tőzsér, 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.**, Tőzsér, 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.