

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Virális- és gazdafehérjék szerepe, kölcsönhatása az I-es típusú humán
immundeficiencia vírus életciklusában**

Tóth Ferenc

Témavezető: Dr. Tózsér József



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

Debrecen, 2019

Virális- és gazdafehérjék szerepe, kölcsönhatása az I-es típusú humán immundeficiencia vírus életciklusában

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudomány tudományágban

Írta: Tóth Ferenc, okleveles molekuláris biológus

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. Szabó Gábor, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Minárovits János, az MTA doktora
Prof. Dr. Bay Péter, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Élettudományi központ, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet diszkussziós szobája (3.201-3.202)

2020. január 22. 11 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Gál Péter, az MTA doktora
Dr. Kókai Endre, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szabó Gábor, az MTA doktora
tagok: Dr. Minárovits János, az MTA doktora
Dr. Bay Péter, az MTA doktora
Dr. Gál Péter, az MTA doktora
Dr. Kókai Endre, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK,
Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme

2020. január 22. 13 óra

1. BEVEZETÉS

1.1 A retrovírusok

A retrovírusok a vírusok egy olyan speciális családját (*Retroviridae*) alkotják, amelynek jellegzetessége, hogy tagjai burokkal, valamint diploid, pozitív szálú RNS genommal rendelkeznek. A családot 2017-ben az *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) az *Ortervirales* rendbe sorolta be, mely vírusok közös jellemzője a polimeráz (Pol) poliproteinjükben található homológ aszpartil proteáz domén, a gazdasejt által előállított transzfer RNS (tRNS) molekulák primerként történő felhasználása a genom replikációjához, valamint a virionban megtalálható kapszid (CA) és nukleokapszid (NC) fehérjék jelenléte. A *Retroviridae* családba az *Orthoretrovirinae* és *Spumaretrovirinae* alcsaládok tartoznak. Az *Orthoretrovirinae* alcsalád Lentivírus nemzetségébe tartozik a család talán legismertebb képviselője a humán immundeficiencia vírus (HIV), a szerzett immunhiányos tünetegyüttes (AIDS) kórokozója.

A retrovírusok lipid burokkal körülvett virionjainak átmérője 80-100 nm között változik, a lipid burookban (Env) virális glikoproteinek találhatóak. A belső kapszid mag (core) mátrix (MA) és kapszid (CA) fehérjékből épül fel, alakja fajonként eltérő. A magon belül a nukleokapszid fehérjével kapcsolva található az RNS genom. A családba tartozó fajok genomja 7-12 kb méretű, lineáris, pozitív polaritású és nem szegmentált. A család fajainak különlegessége azok replikációs stratégiája, amelyben az RNS-ről reverz transzkripció révén keletkező DNS intermedier a gazda genomjába integrálódik.

A virális genom szerveződése alapján egyszerű és összetett retrovírusokat különböztetünk meg. Minden retrovírus tartalmaz három, a poliproteint kódoló génszakaszt: a *gag* kódolja a szerkezeti fehérjéket, mint a mátrix (MA), a kapszid (CA) és a nukleokapszid (NC); a *pol* kódolja a replikációért és integrációért felelős reverz transzkriptáz (RT) és integráz (IN) enzimeket, valamint a génekről átíródó poliproteinek feldarabolásáért felelős proteáz enzimet (PR); továbbá az *env*, amely a lipid burok felszíni (SU) és transzmemb-

rán (TM) fehérjéinek genetikai információját hordozza. Az egyszerű retrovírusok csak ezeket az alapvető géneket tartalmazzák, míg az összetett retrovírusok (mint például a HIV-1) további, járulékos fehérjéket kódoló géneket is hordoznak, amelyek a génexpresszió szabályozásán túl (Tat, Rev), a sikeres fertőzést (Nef), a gazdasejtben történő túlélést (Vif), illetve a későbbi kijutást segítik elő (Vpu), elsősorban a gazdasejt különböző fehérjéivel történő kölcsönhatások révén.

1.2. A retrovírusok életciklusa

A retrovírusok életciklusa korai és késői fázisra osztható, ahol a provirális DNS integrációja jelenti a választópontot. A HIV-1 életciklusának első lépéseként receptor-mediált endocitózis vagy direkt membránfúzió révén jut be a sejtbe. A citoplazmában a lipid buroktól elválasztott kapszid magban megtörténik a virális RNS átírása - tehát a provirális DNS elkészítése - a reverz transzkriptáz enzim révén. A központi magban maradt fehérjékből és a keletkezett DNS-ből kialakult preintegrációs komplex (PIC) bekerül a sejtmagba. A legtöbb retrovírussal ellentétben a PIC sejtmagba történő bejutása a lentivírus nemzetségben aktív folyamat, amely lehetővé teszi a nem osztódó sejtek fertőzését is. A sejtmagban a virális DNS az integráz enzim segítségével integrálódik a gazdasejt genomjába (provírus képződés), amellyel véget ér az életciklus korai szakasza.

Az integrációt követően a provírus inaktívvá válhat (látens fertőzés), vagy megkezdődhet a virális gén expressziója (produktív fertőzés), ahol a késői fázis kezdő lépéseként provirális DNS-ből a celluláris RNS polimeráz II enzim segítségével RNS keletkezik. A keletkezett messenger RNS (mRNS) molekulákról a korábban említett esszenciális gének (*gag*, *pol*, *env*) által kódolt fehérjék, illetve összetett retrovírusok esetében további fehérjék íródnak át.

A *gag* és a *pol* génekről átíródott mRNS-ek lokalizációjuknak megfelelően a Gag és Gag-Pol poliproteinek, vagy az újonnan keletkezett virionok genomjaként szolgálnak. Az *env* gén által kódolt poliprotein egy kisebb, illesztett mRNS-ről íródik át, a szintetizált fehérje glikozilálódik, majd a plazmamembránba való transzport során, egy celluláris proteináz által hasad

a megfelelő fehérje alegységeire (SU és TM). A járulékos fehérjék templátjaként többszörösen illesztett mRNS-ek szolgálnak. Az elsődleges terméként szintetizálódó Gag és Gag-Pol poliproteinek a gazdasejt membránjának Env fehérjében gazdag részein, a membrán belső felületénél csoportosulnak, majd a virális genom mRNS-sel egy toroid-szerű "éretlen" részecskévé formálódnak, melyet a vírusburok zár be.

A vírus a lefűződés (*budding*) révén kerül ki, majd a virionban a poliproteineket a virális proteáz hasítja kisebb funkcionális egységekre. Ez a proteolitikus hasítás szükséges a vírus „éréséhez” és a fertőzőképesség kialakulásához.

1.3. A HIV-1 kapszid jellemzése

A kapszid fehérje 231 aminosavrészből épül fel és két egymástól független doménből áll. Az N-terminális „core” doménből és a C-terminális oligomerizációs doménből, amelyek egy rövid összekötő szakasszal kapcsolódnak egymáshoz. A C-terminális domén tartalmaz egy evolúciósan megőrzött, 20 aminosavból álló peptid szekvenciát (Major Homology Region), amely minden lenti- és onkovírusban azonosítható, elengedhetetlen komponens a fehérje szerkezet fenntartásához, valamint az egyéb virális és sejtek fehérjékkel történő kapcsolatok kialakításához.

A kapszid fehérje a *gag* gén terméke, amelyet a PR hasít ki a Gag poliproteinből. Fontos szerepet játszik mind az összerendeződés folyamatában, mind a vírus bejutása utáni korai fázisban. A Gag poliprotein PR általi feldarabolása a virion „érésének” részfolyamata, amely elsősorban az érett virális, HIV-1 esetében a MA, CA, NC és a p6 fehérjék megjelenését jelenti. A folyamat a virion nagymértékű szerkezeti átrendeződését is előidézi, ahol az ilyen módon megrövidült fehérjék aminosav összetételüknek megfelelő konformációt vesznek fel, és amely új funkciók megjelenését vonja maga után, majd végül elvezet egy kúp alakú kapszid magot magában foglaló érett virion megjelenéséig. A mag körülbelül 1500 darab CA fehérjéből áll, amelyek megközelítőleg 250 hexamert és pontosan 12 db pentamert alakítanak ki. A CA fehérjék N-terminális doménjükkel szerveződnek hexamerekké, amelyek C-terminális doménjeik révén 6 másik hexamerrel kapcsolódnak

rácsba és alakítják ki az érett virionra jellemző kúp alakú struktúrát, amelyet a pentamerek zárnak és ezáltal stabilizálnak a végeken lévő megfelelő pozíciókban.

1.4. A HIV-1 proteáz jellemzése

A HIV-1 PR a Gag-Pol poliprotein részeként szintetizálódó, 99 aminosav-részből felépülő proteolitikus enzim, amely olyan aszpartil proteázokra jellemző tulajdonságokat mutat, mint a pepsztatinnal való gátolhatóság és a katalitikus aszpartát mutációjával előidézhető enzimaktiváció. Azonban a tipikus celluláris aszpartil proteázoktól eltérően két egyforma alegységből épül fel, dimerként működik. Első- és másodlagos szerkezete a celluláris aszpartil proteázok egyik doménjével analóg, túlnyomóan β -redőket és alegységként 1 α -hélixet tartalmaz. A két alegység N- és C-terminális láncai összehasonlítva alkotnak egy négyrétegű antiparallel β -redőt.

A HIV-1 PR három jellegzetes régiója az aktív centrum, a lebeny (flap) és a C-terminális közelében elhelyezkedő konzervált dimerizációs régió. Az aktív centrumot alkotó katalitikus triádok (Asp-Thr-Gly) mindkét alegység esetében az N-terminális közelében helyezkednek el, aminosav-részei hidrogénkötések hálózatán keresztül kapcsolódnak egymáshoz, amit tűzoltófogásnak („fireman’s grip”) neveznek, amely elnevezés a kötés geometriájára és erős jellegére utal. A flexibilis lebeny régió többé-kevésbé konzervált, a szubsztrát, illetve az inhibitor kötődésekor elmozdul és ráhajlik a ligandra, ezáltal stabilizálva a kapcsolatot. A harmadik konzervált régió (Gly-Arg-Asn) a C-terminális közelében található és ionpárok kialakításával a dimerizációban játszik fontos szerepet.

A HIV-1 PR pH optimuma savas (4,5-6,5), hasítási helyeit virális poliproteinek felhasználásával és az érett fehérjék N- és C-terminális szekvenciáinak meghatározásával azonosították. Jóllehet a hasítási helyek összehasonlításával nem sikerült konszenzus hasítási szekvenciát azonosítani, a szekvenciák többnyire hidrofóbak. A HIV-1 PR-nak legalább hét aminosav hosszúságú peptidre van szüksége a szekvencia felismeréséhez és a sikeres hasításhoz, amelynek számos hidrogénkötéssel, nyújtott béta konformációban kell az enzimhez kötődnie.

Annak ellenére, hogy az enzim homodimerként működik, az azonosított természetes hasítóhelyek szekvenciája nem mutat szimmetrikus aminosav eloszlást, és szimmetrikus szubsztrátok iránti preferenciát sem sikerült kimutatni. Működése jelentős hasítóhely szekvencia függést mutat, amelynek legfontosabb jellemzője az aminosavrész mérete és a β -elágazás megléte, ugyanakkor specificitás vizsgálatokban a P1 és P1' helyen lévő aminosavrészek bizonyultak a legkritikusabb tényezőknek a hasíthatóság szempontjából. Ezért úgy döntöttünk, hogy a CA fehérjét érintő vizsgálatokban ezeken a helyeken módosítjuk a meglévő hasítóhelyek szekvenciáit, hogy a proteolitikus hasításnak ellenálló, vagy arra fokozottan érzékeny fehérjéket hozzunk létre.

1.5. A PR szerepe a HIV-1 fertőzés korai fázisában

Régóta ismert tény, hogy számos vírus fehérje mellett a PR is része a kapszid magnak, amely bejut a sejt citoplazmájába, ezáltal az is elképzelhető, hogy a korai fázisban is hozzájárul a vírus fertőzőképességéhez a virális fehérjék további módosításával, vagy éppen a gazdasejt megfelelő fehérjéinek hasítása révén. Egy másik lentivírussal (equine infectious anaemia virus, EIAV) elvégzett kísérletben igazolták azt, hogy a PR képes a nukleokapszid fehérje kisebb fragmensekre történő hasítására, amely felfedezés alapjául szolgált a PR korai fázisban betöltött szerepét feltételező elméleteknek. Azt is igazolták, hogy a kapszid mag felépítésében részt vevő fehérjék (CA, NC) szubsztrátjai a virális proteáznak *in vitro*. Az *in vivo* PR gátlási vizsgálatok ezzel szemben ellentmondásos eredményekhez vezettek: míg néhányan egyértelműen kimutatták a korai fázisra kifejtett gátlást, addig mások nem figyeltek meg ilyen hatást. Habár ezen ellentmondásos eredményeknek köszönhetően a PR szerepe a korai fázisban a mai napig nem tisztázott, feltételezhető, hogy szerepet játszik abban.

A korábban említett virális fehérjékkel együtt a CA is a PR szubsztrátjának bizonyult *in vitro*, és ez a hasítás feltételezhetően a pH változás által előidézett konformációs változásnak köszönhető. A poliakrilamid gélelektroforézissal elválasztott CA fragmensek N-terminális szekvenálásának és tömegspektrometriás azonosításának eredményeként két fő CA hasítási helyet

azonosítottak: az A77 és A78, valamint az L189 és L190 aminosavrészek között. Ezeken a helyeken kívül egy másik kutatócsoport további három hasítóhelyet azonosított az A22 és W23, a G116 és W117, valamint az A204 és L205 aminosavrészek között. Ezek a hasítóhelyek mind kívül esnek a CA MHR régióján, ezáltal alkalmasak lehetnek olyan mutáns CA létrehozására, amely szerkezetében nem, de PR általi hasíthatóságában változik, ezáltal esz-közként szolgál a két fehérje kölcsönhatásának vizsgálatára a HIV-1 fertőzés korai szakaszában.

1.6. Kapszidhoz kötődő gazdasejt fehérjék szerepe a HIV-1 fertőzés korai fázisában

A legjobban jellemzett humán fehérje, ami a HIV-1 kapszid fehérjéhez kötődik a peptidil-prolil izomeráz, ciklofilin A fehérje (CypA), amely a HIV-1 életciklusának késői fázisában képes kötődni a HIV-1 Gag poliproteinhez. A lefűződés folyamán a virionba is becsomagolódik, amely elengedhetetlennek bizonyult a vírus megfelelő fertőzőképességének fenntartásához, jöllehet későbbi kutatások szerint a gazdasejtben jelenlévő CypA sokkal fontosabb a fertőzőképességhez. Egyes eredmények szerint bizonyos sejttípusokban (pl HeLa és H9 T sejtek), illetve vírus izolátumok esetében a HIV-1 replikációja független a ciklofilintől. A CypA a kapszid fehérjén található CypA-kötő hurokhoz kapcsolódik. Pontos szerepe a HIV-1 fertőzés korai szakaszában továbbra sem tisztázott, valószínűleg a kapszid magot stabilizálja. Kapszidhoz való kötődése ciklosporinnal, vagy bármely kötőhely mutagenézisével gátolható. Egyes sejtvonalakban bármely módszer használata gátolja a fertőzés folyamatát a reverz transzkripció előtt vagy közben beavatkozva.

Az utóbbi néhány évtizedben számos kutatás során próbáltak azonosítani további specifikus gazdasejt fehérjéket, amelyek részt vehetnek a HIV-1 fertőzés korai fázisának irányításában a fertőzés akadályozása vagy éppen segítése révén. Ezek közül néhány, mint például a TNPO3, a CPSF6 vagy a NUP153 és NUP358 fehérjék mind képesek kapcsolatba lépni a CA fehérjével.

A TNPO3 (*transportin-3*) egy nukleáris transzport fehérje, amely kötődik a kapszidhoz, azonban a közelmúltban végzett kísérletek eredményei azt jelzik, hogy hatását indirekt módon, a CPSF6 fehérje elkülönítése révén fejt ki, és a virális genom integrációját befolyásolja.

A CPSF6 (*cellular protein cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 6*) fehérje szintén kölcsönhat a kapsziddal, a HIV-1 fertőzés korai fázisának több lépésében is szerepet tulajdonítanak neki. Egyik valószínű szerepe a kapszid nukleáris transzportjának elősegítésében van, ezen kívül több közelmúltban végzett kutatás is alátámasztotta a virális genom integrációjában betöltött szerepét.

A NUP153 (*nuclear pore complex protein-153*) és NUP358 (más néven RunBP2) nukleoporin fehérjék a magpórus komplex fontos alkotóelemei a korábban említett kísérletek közül kettőben is azonosították mindkettőt. A NUP358 a pórusok citoplazmatikus oldalán a citoplazmatikus filamentumok kiindulási pontján, vagy ahhoz közel található és jelentős szerepe van a HIV-1 magi transzlokációjában. Hatását másik két gazdafehérjével: a CPSF6-al és egy kinezin motoros fehérjével a KIF5B-vel (*kinesin family member 5B*) kölcsönhatásban képes kifejteni.

A NUP153 a pórusok magi oldalán található nukleoporin fehérje, amely képes kapcsolódni a kapszidhoz egy újabb nukleoporinnal, a NUP93-al együtt. A HIV-1 replikációban betöltött szerepét számos kutatás során alátámasztották, továbbá egy közelmúltban közzétett kísérletben azt is igazolták, hogy elengedhetetlenül szükséges a nem osztódó sejtekben történő fertőzéshez.

Az itt bemutatott fehérjéken kívül még több száz olyan létezik, amelyről kimutatták, hogy szerepet játszik a HIV-1 életciklusában, azonban többségüknél a szerep mibenléte, illetve az életciklushoz történő kapcsolódási pontja továbbra sem ismert. Ezen fehérjéknek a HIV-1 életciklusára kifejtett hatásának alapos vizsgálata jelentős mértékben hozzájárulhat az újabb HIV-1 ellenes terápiák megjelenéséhez.

2. CÉLKITŰZÉS

A HIV-1 fertőzés korai fázisának legkritikusabb pontja a de-kapszidáció folyamata, amelynek elősegítése vagy késleltetése egyaránt okozhatja a vírusfertőzés terminációját. A folyamatban részt vevő szereplők azonosítása, valamint az azok szerepének ismerete hozzájárulhat a vírus életciklusának alaposabb ismeretéhez, ezáltal új, hatékonyabb HIV-1 ellenes terápiák kifejlesztéséhez.

Munkánk során a következő célokat tűztük ki:

1. A kapszid fehérje korábban azonosított hasítóhelyein olyan mutációkat terveztünk létrehozni (W23A, A77P, A78V, L189F, L189I és L189P), amelyek a proteázon korábban végzett specificitás vizsgálatok eredményei alapján megváltoztatják a kapszid fehérje virális proteáz általi hasíthatóságát, ezáltal a későbbiekben eszközként szolgálhatnak a proteáz korai fázisban betöltött szerepének alaposabb vizsgálatához, különös tekintettel azokra a körülményekre, amikor a vírus vagy vírus alapú vektor receptor-mediált endocitózis révén jut be a sejtbe, ahol a lizoszómában kialakuló pH viszonyok miatt a kapszid monomer szerkezete is elősegítheti a proteolízist. A létrehozott mutáns fehérjékben terveztük tanulmányozni a hatást, amelyet ezek a módosított hasítóhelyek fejtenek ki azok szerkezetére, legismertebb interakciós partnerével, a CypA fehérjével kialakított kapcsolatára, illetve HIV-1 PR és tripszin általi hasíthatóságára.

2. A HIV-1 replikációja nagymértékben függ a gazdasejt saját fehérjéitől, amelyek közül néhány szerepe jól definiált. A közelmúltban azonban több száz gazdasejt fehérjét kódoló gén került kimutatásra, amelyek expressziójának változása szintén a vírusfertőzéssel hozható kapcsolatba. Egy több géntermékre kiterjesztett proteomikai vizsgálat segíthet leszűkíteni a vizsgálandó célpontok körét. Kísérletünkben egy HIV-1 alapú vektorrendszer felhasználásával 293T sejtekben terveztük vizsgálni a pseudovírus által okozott gazdaféhrje expresszióban bekövetkező változásokat jelölés nélküli (label-free) kvantitálás segítségével.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. A mutációk szerkezetre kifejtett hatásának becslése

A másodlagos szerkezeteket a SOPMA másodlagos szerkezet becslő szerver használatával becsültük meg, a mutációk stabilitásra kifejtett hatásának becslése pedig a Site Directed Mutator (SDM) szerver segítségével történt a vad típusú teljes hosszúságú HIV-1 CA kristályszerkezetének (PDB code: 3NTE) felhasználásával.

3.2. A rekombináns HIV-1 kapszid fehérje mutagenézise, expressziója és tisztítása

A vad típusú HIV-1 IIIB kapszid fehérjét kódoló és vele N-terminálison 6 hisztidin aminosavból felépülő affinitás címkét kódoló (His₆-HIVCA) plazmid Dr. Carol Carter (Department of Molecular Genetics and Microbiology, S.U.N.Y. Stony Brook, USA) ajándéka volt. A fenti plazmidban a mutációkat QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit segítségével hoztuk létre.

A mutáns rekombináns kapszid fehérjéket BL21(DE3) *E. coli* sejtekben expresszáltuk, amelyet 0,4 mM IPTG hozzáadásával indukáltunk és 3 órán keresztül, 37°C-on végeztünk. A bakteriális sejteket szonikálással tártuk fel, amely után az oldhatatlan frakciót centrifugálással választottuk el, majd denaturáló pufferben oldottuk. Újabb szonikálás után az elegyet ismét centrifugáltuk, majd az ebből származó felülúszót átszűrtük és Ni-NTA Superflow töltetet tartalmazó kromatográfiás oszlopon tisztítottuk. A tisztított fehérje frakciókat ioncserélt (MQ) vízzel szemben dializáltuk, majd koncentráltuk. A koncentrátum összetevőit gélszűréssel választottuk el Superose 12 10/300 GL gélszűrő oszlopon, szobahőmérsékleten, 1 ml/perc áramlási sebességet alkalmazva. A preparátumok tisztaságát SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel ellenőriztük.

3.3. Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia

A cirkuláris dikroizmus spektrumokat Jasco-810 spektropolariméteren mértük szobahőmérsékleten 10 mM nátrium foszfát pufferben 7,5-ös pH-

n. A CD dekonvolúciót CDSSTR analízis programmal végeztük, amelyek a Dichroweb honlapján elérhetőek.

3.4. A rekombináns HIV-1 PR expressziója és tisztítása

A stabilizáló mutációkat tartalmazó vad-típusú HIV-1 proteázt kódoló plazmid Dr. John M. Louis (Laboratory of Chemical Physics, NIDDK, NIH) ajándéka volt. A fehérjét BL21(DE3) *E. coli* sejtekben expresszáltuk. Az expressziót 1 mM IPTG hozzáadásával indukáltuk, majd 3 órán keresztül, 37°C-on végeztük. A feltárást lizozimmal kiegészített pufferben végeztük szonikálással. A végső, inklúziós testeket tartalmazó pelletet 7,5 M guanidin-HCl tartalmú pufferben oldottuk, majd szűrtük. A minták fehérjetartalmának elválasztását Superose 12 10/300 GL gélszűrő oszlopon végeztük szobahőmérsékleten, 0,5 ml/perc áramlási sebességgel. A megfelelő csúcshoz tartozó frakciókat egyesítettük, majd reverz fázisú HPLC-vel POROS 20 R2 oszlopon tisztítottuk. Az enzim megfelelő feltekeredését többlépéses dialízissel biztosítottuk.

3.5. A rekombináns CA fehérjék hasíthatóságának vizsgálata HIV-1 proteázzal

A rekombináns kapszidok hasításhoz a CA fehérjét 20:1 arányban inkubáltuk rekombináns HIV-1 proteázzal reakció pufferben 4 órán át 37 °C-on. Az inkubálás után a reakciókat kétszeres töménységű, β -merkaptóetanolt is tartalmazó, tricín-SDS mintafelvivő pufferrel állítottuk le. A mintákat 16 %-os, tricines SDS-poliakrilamid géleken analizáltuk. A fragmensek hozzávetőleges molekulatömegét Precision Plus Protein Dual Xtra molekulásúly marker segítségével határoztuk meg. A tömegspektrometriás mérésekhez készített mintákat tartalmazó reakciókat azonos mennyiségű tömény hangyasav hozzáadásával állítottuk le.

3.6. CA proteolitikus fragmensek tömegspektrometriás azonosítása

A mérések előtt a mintákat ZipTip C18 töltettel ellátott pipettahegyek használatával tisztítottuk. A reakcióban keletkező fragmensek molekulatömegét és szekvenciáját Voyager DE PRO MALDI TOF készüléken határoztuk meg. A méréseket lineáris üzemmódban végeztük. Az eredményeket Data Explorer szoftver segítségével értékeltük ki.

3.7. A rekombináns CA fehérjék hasíthatóságának vizsgálata limitált tripszines emésztéssel

A rekombináns kapszidokat 1:100 tripszin:CA arányban inkubáltuk pH 7,5-ön 2 óráig 37 °C-on egy korábban leírt reakció pufferben. A reakcióelegyek 10 µM (végkoncentráció) rekombináns CA fehérjét és 100 nM tripszint tartalmaztak, a reakciókat 6X-os töménységű, β-merkaptotetanolt is tartalmazó, SDS mintafelvívő pufferrel állítottuk le, a mintákat 16 %-os SDS-poliakrilamid géleken vizsgáltuk.

3.8. A pGEX-4T-3-CypA expressziós vektor készítése

A CypA fehérjét kódoló régiót a PPIA (NM_021130) human cDNA ORF klónból szaporítottuk fel. A primerek BamHI és NotI restriktációs endonukleáz hasító helyeket is tartalmaztak. A PCR reakcióból származó termékeket BamHI és NotI enzimekkel emésztettük, majd ugyanezekkel az enzimekkel hasított pGEX-4T-3 plazmidba ligáltuk be, mely a fehérje GST-fúziós formában történő expresszióját biztosította.

3.9. A CypA-GST fúziós fehérje tisztítása

A CypA-GST fehérjét kódoló pGEX-4T-3 plazmidot *E. coli* BL21(DE3) sejtekbe transzformáltuk, majd ezeket a sejteket 0,1 mM IPTG hozzáadásával indukáltunk és 3 órán keresztül inkubáltuk 37 °C-on. A centrifugálással elkülönített sejteket egy korábban leírt módszer szerint tártuk fel. A lizátumot ezután Bio-Scale™ Mini Profinity™ GST oszlopon tisztítottuk. A tisztított fehérjét MQ vízzel szemben dializáltuk, majd Concentrator Plus készülékkel beszáritottuk. A tömény fehérjét MQ vízben oldottuk be újra.

3.10. His₆-HIVCA pull-down assay

A His₆-HIVCA fehérjét Ni-NTA mágneses agaróz gyöngyökkel inkubáltuk 1 óráig 4 °C -on foszfáttal pufferelt sóoldatban (PBS), amelyet 20 mM imidazollal és 0,05 % Tween 20-al (pH 8,0) egészítettünk ki. A gyöngyökhöz kikötött His₆-HIVCA-t ezután CypA-GST fehérjével inkubáltuk PBS-ben 1 óráig 4 °C -on. A nem kötődött anyagokat mosással távolítottuk el, majd a kikötődött komplexeket eluáltuk. Az eluátumokat 14 %-os SDS-poliakrilamid gélen vizsgáltuk.

3.11. A HIV-1 vektor rendszer pMDLg/pRRE plazmidjának módosítása

A HIV-1 pszeudovírus részecskék előállításához szükséges harmadik generációs vektorrendszer Dr. Didier Trono (Department of Genetics and Microbiology, University of Geneva Medical School, Geneva, Svájc) ajándéka volt. A CA fehérjét kódoló szakaszt AvrII és PmlI restriktációs enzimek segítségével hasítottuk ki a pMDLg/pRRE plazmidból, majd a pT7 Blue-3 plazmid ugyanazon hasítóhelyei közé ligáltuk be. A mutagenézist a 3.2. fejezetben leírt módon végeztük el. A mutáció létrehozása után a génszakaszt visszaligáltuk a pMDLg/pRRE vektorba.

3.12. Vírusrészecskék előállítása

A vírusrészecskék előállításához 293T sejteket használtunk. A sejteket polietilénimin segítségével transzfektáltuk. A transzfekcióhoz használt plazmidokat Dr. Didier Trono bocsájtotta rendelkezésünkre, amit munkacsoportunk módosított tovább. A vírusrészecskéket tartalmazó kondicionált médiumot 24, 48 és 72 óra múlva gyűjtöttük, centrifugáltuk, és átszűrtük majd töményítettük, végül $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A termelt pszeudovírus mennyiségét a reverz transzkriptáz (RT) aktivitás, vagy a p24 (kapszid) fehérje koncentrációja alapján határoztuk meg.

3.13. Fertőzőképesség vizsgálata

A 293T sejteket 24 lyukú sejttenyésztő edényben, 50% konfluencia elérése után 10 ng kapszid fehérje tartalmú vírussal fertőztük. 7 nap elteltével a GFP-t termelő sejtek arányát áramlási citometria segítségével határoztuk meg. Az adatok kiértékelését FlowJo szoftver segítségével végeztük.

3.14. Statisztikai elemzés

A statisztikai elemzéseket a GraphPad QuikCalcs ingyenes web alkalmazás használatával végeztük el.

3.15. Transzdukció és mintagyűjtés tömegspektrometriás (MS) elemzéshez

293 T sejteket T25-ös sejttenyésztő flakában 50 %-os konfluenciánál transzdukáltuk 5 ng RT aktivitásnak megfelelő HIV-1 pszeudovirionnal,

vagy pszeudovirionot nem tartalmazó kondicionált médiummal (mock) kezeltük 4 µg/ml polibrén hozzáadásával. Ezután a sejteket 37 °C-on inkubáltuk 5 % CO₂ tartalom mellett. 0, 4 és 12 óra elteltével a sejteket tripszinnel kezeltük, majd jéghideg PBS-el mostuk, hogy a nem kötődött pszeudovírus részecskéket eltávolítsuk. A végső, sejteket tartalmazó pelleteket cOmplete protease inhibitor koktéllal kiegészített lízis pufferben inkubáltuk 30 percig szobahőmérsékleten. A lizátumot centrifugáltuk, a felülúszót hideg (-20 °C) acetonnal kevertük össze, majd -20 °C-on tároltuk egy éjszakán keresztül.

3.16. A transzdukált sejtek fehérje összetételének tömegspektrometriás elemzése

A lizált sejtek fehérje tartalmát az acetonos kicsapás után beszárítottuk, majd 25 mM ammónium bikarbonát pufferben oldottuk vissza. A fehérjéket tripszines emésztésnek vetettük alá és a keletkezett fragmenseket kollaborációs partnerünk, George Tsaprailis (University of Arizona, Tucson, AZ, USA) LC-MS/MS segítségével elemezte jelölés nélküli (label-free) kvantitálás módszerrel, minden egyes minta esetében. Az LC-MS/MS spektrumok alapján azonosított fehérje és peptid szekvenciákat Scaffold v4.4.6. szoftver segítségével ellenőriztük. A fehérjékben azonosított peptidok szekvenciáit Protein BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) program segítségével újra ellenőriztük. A fehérjék mennyiségének meghatározása a tömegspektrometriás adatokból a normalizált MS/MS spektrumok száma alapján történt.

3.17. A tömegspektrometriás adatok statisztikai elemzése

A statisztikai elemzéshez egy saját fejlesztésű R-szoftert használtunk (Dr. Emri Miklós munkája), amely STRING, circilize, lsmeans, matrixStats, reshape2 és ggplot2 csomagokon alapul. Azt feltételezve, hogy a technikai ismétlésekből származó adatok Poisson eloszlást mutatnak és a biológiai ismétlések nagy varianciái negatív binomiális eloszlással modellezhetők, egy módosított általános lineáris modellt használtunk a mért fehérje adatok csoport szintű eltéréseinek leírására a 4 és 12 órás időpontokban.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

4.1. A HIV-1 kapszid fehérje másodlagos szerkezetének *in silico* vizsgálata

A mutációk fehérje szerkezetre kifejtett hatását az SDM szervert segítségével becsültük meg, amely egy stabilitási pontot számol a mutáns és vad típusú fehérje szabadenergiájában lévő eltérésekkel analóg módon (Dr. Mótyán János munkája). A legmagasabb értékeket az A77P és L189P mutánsokra becsültük, ami arra utalt, hogy ezek a mutációk nagymértékben destabilizálják a fehérjék szerkezetét, valamint azok hibás működését is előidézhetik. Az L189I mutációt semlegesnek, míg az A78V és L189F mutációkat kis mértékben destabilizálóknak becsültük, amelyek elenyésző mértékű változást okozhatnak a fehérje szerkezetében. A másodlagos szerkezet becslése nem jósolt semmiféle változást a W23A mutáció esetében, és az SDM szervert is csak kismértékű szerkezet destabilizáló hatást feltételezett.

4.2. A vad típusú és mutáns HIV-1 kapszid fehérjék hasítása HIV-1 proteázzal

A módosított proteolitikus hasítóhelyek *in vitro* CA hasításra kifejtett hatásának meghatározásához olyan mutációkat terveztünk a HIV-1 PR specificitási jellemzőinek figyelembevételével, amelyekben a hasítóhelyek P1 (A77P, L189F, L189I és L189P) vagy a P1' (W23A és A78V) aminosav-részeit kicseréltük.

Várakozásunknak megfelelően az A77P és L189P mutációk gátolták a proteolitikus hasítást ezeken a hasítóhelyeken, ahogy azt megfigyeltük a hasítóhelyekhez köthető proteolitikus termékeknek megfelelő méretű sávok intenzitásának változásából: az A77P mutánsnál a 78-231 fragmens mennyisége csökken, valamit az 1-189 fragmens mennyisége növekszik, míg L189P esetében az 1-189 fragmens eltűnése figyelhető meg. A W23A mutáns CA fokozottan érzékenynek bizonyult a proteolitikus hasítással szemben. Az A78V és L189F mutánsok szintén érzékenyebbnak bizonyultak a proteolitikus hasítással szemben, ahogyan azt láttuk a hasítóhelyekhez köthető fragmensek (78-231 és 1-189 fragmens) mennyiségének növekedéséből, jöllehet az L189F mutáns összességében vett hasítása csökkent, míg a reakció

végén megmaradt A78V CA mennyisége nem mutatott szignifikáns eltérést a vad típusú kapszidhoz viszonyítva. Meglepő módon az L189I mutáció látványosan nem gátolta a hasítást a hasítóhelyen, amit véleményünk szerint a hasítóhely egy aminosavrésszel történő eltolódása okozhatott, és ezáltal egy TETIL/VQNAN hasítóhely létrejötté azonban ezt nem tudtuk bizonyítani, mivel a fragmensek MALDI-TOF tömegspektrometriás elemzéséből a megfelelő méretű peptidek közül egyiket sem sikerült azonosítani.

4.3. A vad típusú és mutáns HIV-1 kapszid fehérjék másodlagos szerkezetének CD spektroszkópiás vizsgálata

CD spektroszkópia segítségével vizsgáltuk a fehérjék szerkezetét, hogy meghatározzuk a hasítóhely mutációk hatását a CA fehérje szerkezetére. A 180-tól 300 nm-ig terjedő tartományban vizsgáltuk az egyes fehérjékhez tartozó spektrumok molekuláris ellipticitását, majd a mutáns CA fehérjék spektrumait a vad típusú CA fehérje spektrumához hasonlítottuk. A spektrumokat CDSSTR program segítségével analizáltuk. A spektrumokat 7,5-ös pH-n vettük fel, ahol a CA fehérje fenntartja szerkezeti épségét.

A vad típusú CA fehérje pozitív ellipticitást mutatott, amely 190 nm-en érte el maximumát és egy határozott negatív ellipticitást, amely 208 nm-en érte el minimumát, valamint egy 220 nm-nél megjelenő vállat is megfigyelhetünk. A spektrum metszéspontja 200 nm-nél található. A másodlagos szerkezeti elemek eloszlása összhangban van a His₆-HIVCA fehérjéről korábban közölt, 7,5-os pH-n mért eredményekkel és a becslésekkel, amelyeket a vad típusú fehérje aminosav szekvenciája alapján végeztünk. Az A78V és L189F mutánsok spektruma a vad típusúhoz nagyban hasonló tulajdonságokkal rendelkezett, míg az L189I mutáns esetében a spektrum némileg magasabb maximummal rendelkezik 191 nm-en. A W23A, A77P és L189P mutánsok spektruma számos tulajdonságában eltér a vad típusútól. A spektrumok nagymértékben csökkent maximumai és minimumai, valamint eltolódott metszéspontjai a másodlagos szerkezetek különböző mértékű eltolódását jelzik.

4.4. A vad típusú és mutáns HIV-1 kapszid fehérjék tripszines emésztése

Tanulmányoztuk a tripszin hasítóhelyek hozzáférhetőségét azért is, hogy megbecsüljük a vad típusú és mutáns kapszid monomerek között esetlegesen megjelenő szerkezeti különbségeket. Azonos mennyiségű fehérjét korlátozott idejű proteolízisnek vetettünk alá tripszin jelenlétében a CD spektroszkópiás mérésekhez használt körülményekkel megegyezően (pH 7,5), majd a reakcióelegyeket SDS-poliakrilamid gélelektroforézis segítségével vizsgáltuk.

Az A78V, L189F és L189P mutánsok esetében a tripszines emésztés hatékonysága a vad típusú CA fehérjéhez hasonlónak bizonyult, nem figyeltünk meg szignifikáns különbséget a hasítatlan CA mennyiségében. A W23A, A77P és L189I mutánsok esetében azonban a reakció végén megmaradt hasítatlan CA fehérje mennyisége szignifikáns csökkenést mutatott, vagyis ezek a mutáns CA fehérjék fokozottan érzékenyek a tripszines hasítással szemben a vad típusúhoz viszonyítva, amely azt sugallja, hogy ezek a fehérjék nagyobb valószínűséggel alakítanak ki hibás CA oligomer szerkezeteket.

4.5. His₆-HIVCA és CypA-GST rekombináns fehérjék kölcsönhatásának vizsgálata *pull-down* technikával

A CypA fehérje kötődése a CA fehérjéhez bizonyos körülmények között elengedhetetlen fontosságú a dekapzidáció folyamatának megfelelő lefolyásához a HIV-1 fertőzés korai fázisában. Megvizsgáltuk, vajon a CA fehérje mutációi befolyásolják-e a CA-CypA kölcsönhatást és *in vitro* vizsgáltuk a kötődés hatékonyságát. A tisztított His₆-HIVCA és CypA-GST fehérjéket *pull-down assay*-nek vetettük alá, majd SDS-poliakrilamid gélelektroforézis segítségével vizsgáltuk az eluált fehérje komplexeket.

A CypA fehérjéhez kapcsolódott W23A, A78V, L189F, L189I és L189P mutáns kapszidok mennyisége nem mutatott szignifikáns változást, míg az A77P mutáns CA fehérje nagymértékben csökkent CypA-kötő képességgel rendelkezett a vad típusú CA fehérjéhez viszonyítva. Az A77P CA fehérje CypA-kötő képességének megváltozása meglepő eredmény, mivel

az A77P mutáció kívül esik a CypA kötő régió, ezáltal nem feltételeztük, hogy bármilyen mértékben hatással lehet a két fehérje kölcsönhatására.

4.6. Vad típusú és L189F mutáns CA fehérjét hordozó pszeudovírus részecskék fertőzőképességének vizsgálata

293T sejteket transzfektáltunk az L189F és a vad típusú kapszidot kódoló plazmidok különböző arányú (1:0, 1:1 és 0:1) keverékével. A 293T sejteket azonos p24 mennyiséget tartalmazó pszeudovírussal transzdukáltuk, majd egy hét után a GFP-t expresszáló sejtek számát áramlási citométerrel határoztuk meg. A kontroll fertőzéseknél a vad típusú CA fehérjét kódoló plazmid mellett azonos mennyiségű lazac sperma DNS-t használtunk, melyben a sejtek 32 %-a fertőződött meg. Az L189F mutáns kapszidot kódoló plazmid mennyiségének növelése csökkentette a fertőzött sejtek mennyiségét 1:1 arány esetében 15 %-ra, a kizárólag L189F kapszidot kódoló plazmid használata esetén pedig 2 %-ra csökkent a GFP pozitív sejtek száma.

Mivel vizsgálataink szerint a proteolitikus hasítást befolyásoló mutációk közül az L189F nem befolyásolja a CA monomerek szerkezetét a citoplazmában uralkodó pH viszonyok között, feltételezhetjük, hogy a mutáns fehérjét tartalmazó pszeudovírus részecskék csökkent fertőzőképessége a virális PR általi hasíthatóság megváltozásának köszönhető. Meg kell jegyeznünk azonban, hogy ezek csak előzetes eredmények, elméletünk alátámasztásához, illetve a PR korai fázisban betöltött szerepének igazolásához további, sejt kultúrák körülmények között végzett vizsgálatok szükségesek.

4.7. A lentivirális vektorral történő transzdukció hatására bekövetkező fehérje szintű változások tömegspektrometriás vizsgálata a fertőzés korai fázisában

Kísérletünkben vizsgáltuk a gazdasejt fehérje összetételében bekövetkező változásokat a pszeudovírus részecskékkel történő transzdukció korai szakaszában. Kísérletünk során jelölés nélküli kvantitálás alkalmazásával vizsgáltuk a fehérje szintű változásokat.

A tömegspektrometriás analízisek során azonosított fehérjéket tartalmazó listát, illetve az azonosított peptidek szekvenciáit manuálisan ellenőriztük és a tévesen nem-humán, illetve nem-virális eredetűnek azonosított fehérjék eredetét javítottuk, a sem humán sem a virális fehérjékkel nem egyező fehérjéket pedig kizártuk a további elemzésből.

4.8. A tömegspektrometriás adatok statisztikai elemzése

A mennyiségi elemzés után azokat a fehérjéket vetettük alá statisztikai elemzésnek, amelyek jelenlétét az egy adott mintához tartozó négy ismétlésből legalább két alkalommal ki tudtuk mutatni és más időpontban, illetve más kezelés következményeképpen ez nem volt lehetséges. Ezzel a módszerrel 25 olyan fehérjét azonosítottunk a transzdukált sejtekben, amelyek mennyisége valamelyik mintavételi időpontban eltér a kontrolltól.

A HIST1H1E, HNRNPL, PRRC2A és a TRIMM28 fehérjék csak a transzdukció után 4 órával voltak jelen a sejtekben, a CSDA, EEF1A1, EEF1D, HN1, NPM1, PGAM1 és SRSF6 fehérjék mennyisége szignifikánsan növekedett, míg a HIST1H1D és HSPA5 mennyisége szignifikánsan csökkent a transzdukált sejtekben ebben az időpontban a kontroll sejtek 4 órás időpontjához, valamint a 0 órás időponthoz képest.

Más fehérjéket 12 órával a fertőzés után nem tudtunk kimutatni a transzdukált sejtekben, viszont más időpontokban egyértelműen jelen voltak (ALYREF, CCDC86, CSDA, COX5A, HN1, MYL6, PPIF, SEPT2, SRSF6, TCOF1 és TPM3 fehérjék). Ezek eltűnése arra utalhat, hogy 12 órával a fertőzés kezdete után a bejutott pszeudovírus részecskék már jelentős kontrollt gyakorolnak a gazdasejt fehérje expressziójára. Néhány fehérje (CSDA, HN1 és SRSF6) mennyisége a 4. órában jelentősen megemelkedett, majd újabb 8 óra elteltével már nem volt kimutatható a transzdukált sejtek lizátumában. A transzdukció után 12 órával a COX6B1 és PDIA3 fehérjék mennyisége szignifikánsan nőtt, míg az EEF2 és GAPDH fehérjék mennyisége csökkent a transzdukált sejtekben.

Ha a szignifikáns változást mutató fehérjék funkcióit vizsgáljuk, azt mondhatjuk, hogy 4 órával a fertőzés kezdete után emelkedik az RNS-kötő

fehérjék mennyisége, amely aztán a 12 órás időpontban lecsökken. Átmeneti fehérje mennyiség növekedést a génexpresszió változása mellett okozhat a virális és gazdasejt fehérjék kapcsolatának stabilizáló hatása, valamint a fehérje lebontás sebességének a csökkenése is.

4.9. A változást mutató gazdafehérjék kapcsolata a HIV-1 fehérjéivel és életciklusával

A HIV-1 replikációja nagymértékben függ a gazdasejt saját fehérjéitől, ezért vizsgálatunkban célul tűztük ki, hogy tömegspektrometriás módszerrel azonosítsunk olyan fehérjéket, amelyek valamilyen módon befolyásolják a replikációt a vírusfertőzés korai szakaszában. Az azonosított fehérjék közül egy kivételével valamennyit kötötték valamilyen módon a HIV-1 életciklusához, azonban pontos szerepük, számos esetben a mai napig nem tisztázott.

Az EEF1A1 és EEF1D fehérjék egyaránt az EEF1 komplex részei, amely retrovírus fertőzés esetén elősegíti a reverz transzkripció folyamatát az eukarióta sejtekben. Az EEF1A1 fehérje ilyen jellegű szerepét más közlemények is alátámasztják. Az EEF1D kötődését a virális fehérjékhez ugyan nem, szerepét azonban máshol is igazolták, az EEF1 komplex részeként valószínűleg az EEF1A1 fehérjével együttműködve fejti ki hatását.

Az EEF2 fehérje a virális Gag-hoz kötődik, amely kapcsolatot a CypA képes stabilizálni, komplexük a sejt fertőzések elleni védekezésében fontos stressz-granulumok összeszerelődését képes gátolni. Az EEF2 hiánya a vírus termelés csökkenését, illetve a termelt virionok csökkent fertőzőképességét vonja maga után.

Az MYL6 a szerepét a HIV életciklusában mások is kimutatták, szintén képes a Gag fehérjéhez kötődni, azonban ennek a kapcsolatnak a jelentősége egyelőre nem ismert.

Az NPM1 és az ALYREF a virális fehérjék közül a Rev-hez képesek kötődni. Az NPM1 feltételezések szerint a Rev nukleáris importjában működik közre, míg a Rev-hez kapcsolódó ALYREF fehérje nem képes RNS-t

kötni, a Rev valószínűleg ezen a kapcsolaton keresztül favorizálja a virális RNS exportját a sejti RNS-ekkel szemben.

A COX5A, COX6B1 és PDIA3 fehérjék szerepét korábban is kimutatták, ahogy kapcsolatukat a vírus a burokfehérjével is. Azonban a HIV burokfehérje nincs jelen a pszeudovírusban, ezáltal kapcsolatuk a vírushoz és szerepük az életciklusban további vizsgálatra szorul.

Az SRSF6 egy a közelmúltban végzett kutatás eredménye szerint valószínűleg a virális génexpresszió gátlásáért felel, a virális Tat fehérjét kódoló mRNS-ek hasításán keresztül. Kapcsolata más virális fehérjék mRNS-ével egyelőre nem ismert.

A TRIM28 fehérje szintén ismert szereplő a HIV-1 életciklusában, egy nemrég közölt kutatás eredménye szerint jelentős szerepet játszik a virális gének expressziójának gátlásában. A sejt védekező mechanizmusának fontos része lehet, erre utal a 4 órás időpontban történő megjelenése, majd eltűnése a 12 órás időpontban.

A HIST1H1E, HNRPL, CCDC86, CSDA, PPIF, SEPT2, TCOF1, TPM3, HIST1H1D, PGAM1, HSDA5 és GAPDH fehérjéket szintén olyan gazdasejt faktorokként azonosították, amelyek szerepet játszanak a HIV-1 életciklusában, azonban szerepük mibenléte egyelőre ismeretlen.

A HN1 szerepe a HIV-1 életciklusában egyelőre nem ismert, jóllehet a vele kapcsolatban lévő fehérjék a transzkripció, illetve a mikrotubulus szerkezet kialakításában vesznek részt.

Ezen fehérjék nagy részét korábban is a replikációban szerepet játszó faktorokként azonosították, amely egyrészt alátámasztja módszerünk helyességét, másrészt pedig megerősíti szerepüket a HIV-1 életciklusában. Véleményünk szerint ezek a fehérjék, illetve más fehérjékkel alkotott kapcsolataik alaposabb vizsgálata segíthet azonosítani azokat a jelátviteli útvonalakat, amelyeken keresztül a HIV-1 képes saját céljaira használni a sejtben működő rendszereket, ezáltal újabb célpontokat szolgáltathat az antivirális terápiák kifejlesztéséhez, valamint a génterápiás módszerek hatékonyabbá tételéhez.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A doktori értekezésemben bemutatott munkáim során elsősorban lehetőségem volt a HIV-1 kapszid fehérje mutánsainak (W23A, A77P, A78V, L189F, L189I és L189P) tervezésére, létrehozására és tisztítására. A létrehozott mutáns fehérjék szerkezetében bekövetkező változásokat *in silico* becsültük meg, amelyet CD-spektroszkópia alkalmazásával támasztottunk alá. A fehérjék proteolízissel szembeni érzékenységét HIV-1 PR és tripszin által létrehozott hasítási termékek analízisével határoztuk meg. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy az elsődleges hasítási helyekhez tartozó aminosavak mutációja általában nem csak a kapszid fehérje proteáz általi hasíthatóságát változtatja meg, hanem esetenként annak másodlagos szerkezetét és CypA-kötő képességét is. Jóllehet a W23A, A77P és L189P mutációk sikeresen módosítják a proteáz általi hasítást, másodlagos szerkezetük is jelentősen megváltozik, ezáltal nem alkalmasak a célkitűzésben megfogalmazott céljainkra. Egyedül az L189F mutáns tűnik szerkezetében változatlanak a vad típushoz viszonyítva, ezáltal ez lehet a legalkalmasabb jelölt a PR általi CA hasítás korai fázisban betöltött szerepének további vizsgálatára sejtkultúrák körülmények között.

Lehetőségem volt továbbá a HIV-1 transzdukció korai fázisának vizsgálatára, amely során a fertőzött sejtek fehérje tartalmának változását követtük nyomon jelölés nélküli kvantitálás alkalmazásával, hogy újabb gazdasejt faktorokat azonosítsunk, amelyek befolyásolhatják a transzdukció kimenetelét. Ezen vizsgálatok eredményeképpen sikerült azonosítanunk 25 olyan fehérjét, amelynek expressziója megváltozik a HIV-1 pszeudovírussal transzdukált sejtekben. Az azonosított fehérjékről rendelkezésre álló irodalmi adatok alapján összefoglalásként elmondhatjuk, hogy módszerünk alkalmas a sejtekben bekövetkező változások nyomon követésére, ugyanis a fehérjék többségét korábban is összefüggésbe hozták a HIV-1 életciklusával. Sajnos néhány kivételével pontos szerepük a folyamatban továbbra sem tisztázott. Véleményünk szerint a vizsgálatunk során azonosított fehérjék megfelelő célpontokat kínálhatnak a HIV-1- gazdasejt kapcsolatának vizsgálatához, amely segítséget nyújthat új, hatékonyabb antivirális terápiák kifejlesztéséhez.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

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

Köszönöm Dr. Fésüs László akadémikus, korábbi intézetvezető egyetemi tanár Úrnak, hogy tanulmányaimat a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézetben végezhettem, és munkámat mindvégig támogatta.

Köszönöm Dr. Kádas Jánosnak, Dr. Mótyán Jánosnak, Dr. Csósz Évának és Dr. Kurtán Tibornak szakmai segítségüket, valamint Dr. Joóné Matúz Krisztina, Dr. Mohamed Mahdi, Golda Mária és Szojka Zsófia kollégáimnak, hogy bármikor számíthattam rájuk.

Köszönöm Dr. George Tsaprailis-nak a jelölés nélküli kvantitálások kivitelezését, és Dr. Emri Miklósnak a tömegspektrometriai adatok statisztikai kiértékelését.

Köszönöm Janics-Pető Szilvia asszisztensnek a számtalan gyakorlati segítséget.

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

Köszönöm édesanyám† támogatását, aki nélkül mindez nem valósulhatott volna meg.

A munka kivitelezéséhez az OTKA K101591, NKFIH K125238, a TÁMOP 4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0023 és TÁMOP-4.2.2.D-15/1/KONV-2015-0016 projektek nyújtottak támogatást. A kutatást a GINOP-2.3.2-15-2016-00044 számú „A gyógyszerkutatás újabb irányai: peptid-fehérje kölcsönhatások a magasabb rendű fehérjeszerveződések szabályozásában - PHARMPROT teaming” című projekt is támogatta. A disszertáció létrejöttét az Innovációs és Technológiai Minisztérium által meghirdetett Felsőoktatási Intézményi Kiválósági Program (NKFIH-1150-6/2019) támogatta, a Debreceni Egyetem Biotechnológia tématerületi programja keretében.



Nyilvántartási szám: DEENK/333/2019.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Tóth Ferenc
Neptun kód: VZNIWD
Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Csósz, É., **Tóth, F.**, Mahdi, M., Tsapraillis, G., Emri, M., Tózsér, J.: Analysis of networks of host proteins in the early time points following HIV transduction.
BMC Bioinformatics. 20, 1-18, 2019.
DOI: <https://doi.org/10.1186/s12859-019-2990-3>
IF: 2.511 (2018)
2. **Tóth, F.**, Kádás, J., Mótán, J. A., Tózsér, J.: Effect of internal cleavage site mutations in human immunodeficiency virus type 1 capsid protein on its structure and function.
FEBS Open Bio. 6 (8), 847-859, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/2211-5463.12094>
IF: 2.143

További közlemények

3. Bozóki, B., Gazda, L., **Tóth, F.**, Miczi, M., Mótán, J. A., Tózsér, J.: A recombinant fusion protein-based, fluorescent protease assay for high throughput-compatible substrate screening.
Anal. Biochem. 540-541, 52-63, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2017.11.001>
IF: 2.507
4. **Tóth, F.**, Tózsér, J., Hegedűs, C.: Indukálható bone morphogenetic protein 7 (BMP-7) termelési fogból eredetű össejtvonal létrehozása és vizsgálata.
Fogorv. Szle. 111 (2), 38-43, 2018.
5. Mahdi, M., Matúz, K., **Tóth, F.**, Tózsér, J.: A Modular System to Evaluate the Efficacy of Protease Inhibitors against HIV-2.
PLoS One. 9 (11), 1-13, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0113221>
IF: 3.234





6. Mótyán, J. A., **Tóth, F.**, Tózsér, J.: Research Applications of Proteolytic Enzymes in Molecular Biology.

Biomolecules. 3 (4), 923-942, 2013.

DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/biom3040923>

7. Csósz, É., Boross, P., Csutak, A., Berta, A., **Tóth, F.**, Pólska, S., Török, Z., Tózsér, J.:

Quantitative analysis of proteins in the tear fluid of patients with diabetic retinopathy.

Journal of Proteomics. 75 (7), 2196-2204, 2012.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2012.01.019>

IF: 4.088

A közlő folyóiratok összesített impact faktora: 14,483

**A közlő folyóiratok összesített impact faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):
4,654**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2019.10.01.

