

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

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés

Zahuczky Gábor

Debreceni Egyetem
Orvosi- és Egészségtudományi Centrum
Debrecen, 2003

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm Prof. Dr. Fésüs László akadémikus, tanszékvezető egyetemi tanár Úrnak, hogy tanulmányaimat a DE OEC Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézetben végezhettem és munkámat mindvégig támogatta.

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

Köszönöm Dr. Bagossi Péter egyetemi adjunktus Úrnak a molekuláris modellezésben nyújtott hasznos tanácsait.

Köszönöm Pető Szilvia és Szabó Katalin asszisztenseknek a számtalan gyakorlati segítséget.

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

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AIDS	szerzett immunhiányos szindróma
AMV	madár mieloblasztózis vírus
APP	amiloid prekursor protein
as	aminosav
ATL	felnőtt T-sejtes leukémia
BLV	marha leukémia vírus
CA ¹	kapszid protein
CARD	a kaspázt megkötő domén
CK1 és CK2	kazein kináz 1 és 2
Coomassie	“Coomassie Brilliant Blue 250” fehérje festék
DED	halál effektor domén
DTT	ditiotritol
EDTA	etilén-diamin-tetraacetát
EIAV	ló vészes vérszegénységét okozó vírus
ER	endoplazmatikus retikulum
Erk 1/2	extracelluláris jel-szabályozott kináz 1 és 2
FAD	familiáris Alzheimer betegség
Gas-2	“growth arrest-specific” protein
HIV	humán immundeficiencia vírus
HTLV	humán T-sejtes leukémia vírus
IAP	apoptózis inhibitor fehérje
ICE	interleukin-1 β konvertáló enzim
IN ¹	integráz
MA ¹	mátrix protein
MBP	maltóz-kötő fehérje
MEKK	mitogén-aktivált protein kináz/ERK kináz
MST	emlős STE20-szerű kináz
MuLV	egér leukémia vírus
NC ¹	nukleokapszid
P1, P2, P3, stb. ²	szubsztrát aminosav része
PAK	p21 aktivált protein kináz
PARP	poli(ADP-ribóz) polimeráz
PCR	polimeráz láncreakció
PDB	fehérje adatbázis
PR ¹	retrovirális proteináz

¹ A retrovírus fehérjék kétbetűs nevezéktana Leis és mtsai., (1988) szerint. A nem ismert funkciójú fehérjéket p betűvel, majd azt követően a fehérjék molekulatömegét kDa-ban kifejező számmal jelölik.

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

PS-1, PS-2	preszenilin-1, -2
RP	fordított-fázisú
RMS	négyzetes középérték
RSV	Rous szarkóma vírus
RT ¹	reverz transzkriptáz
[S]	szubsztrátkoncentráció
S1, S2, S3, stb. ²	enzim szubsztrátkötő helyeinek a része
SREBP	szterol szabályozóelem-kötő fehérje
TFA	trifluor-ecetsav
v	reakciósebesség

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	1.
1.1. A retrovirális proteinázok (PR)	1.
1.1.1. <i>A PR szerepe a retrovírusok életciklusában</i>	1.
1.1.2. <i>A retrovirális proteinázok általános jellemzése</i>	3.
1.1.3. <i>A HTLV-BLV csoport</i>	5.
1.2. A kaszpázok	6.
1.2.1. <i>A kaszpázok élettani szerepe</i>	6.
1.2.2. <i>A kaszpázok általános jellemzése</i>	8.
1.2.3. <i>Foszforiláció szempontjából érdekes kaszpáz szubsztrátok</i>	11.
2. CÉLKITŰZÉS	14.
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	15.
4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS	19.
4.1. BLV PR klónozása <i>Esherichia coli</i> -ba és specifitásának összehasonlítása a HTLV-I proteináz specifitásával	19.
4.1.1. <i>A BLV PR önprocesszálása fúziós fehérjéből</i>	19.
4.1.2. <i>A BLV PR tisztítása</i>	20.
4.1.3. <i>A BLV PR kinetikai jellemzése</i>	20.
4.2. A HTLV-I PR szubsztrátspecifitásának vizsgálata és a HIV-1 proteinázzal történő összehasonlítása	23.
4.2.1. <i>A HTLV-I, a BLV és a HIV-1 proteinázok összehasonlító vizsgálata a HIV-1 MA/CA természetes hasítási helyének szekvenciáján alapuló oligopeptidekkel</i>	23.
4.2.2. <i>A HTLV-I és a HIV-1 proteinázok összehasonlító vizsgálata a HTLV-I CA/NC természetes hasítási helyének szekvenciáján alapuló oligopeptidekkel</i>	25.
4.2.3. <i>A HTLV-I és a HIV-1 proteinázok térszerkezetének összehasonlítása</i>	29.
4.2.4. <i>A HTLV-I és a HIV-1 proteinázok S4 kötőhelyének jellemzése</i>	32.
4.2.5. <i>A HTLV-I és a HIV-1 proteinázok S3 kötőhelyének jellemzése</i>	33.
4.2.6. <i>A HTLV-I és a HIV-1 proteinázok S2 kötőhelyének jellemzése</i>	34.
4.2.7. <i>A HTLV-I és a HIV-1 proteinázok S1 és S1' kötőhelyének jellemzése</i>	35.

4.3.	Kaspáz hasítási helyek foszforilációjának hatása a szubsztrátok kaspáz enzimekkel történő hasíthatóságára	37.
4.3.1.	<i>Preszenilin-2 (PS-2) hasítási helyet reprezentáló oligopeptid foszforilációjának hatása kaspáz-3, -7, -8 enzimekkel történő hasíthatóságra</i>	37.
4.3.2.	<i>A P4 Ser foszforilációjának hatása kaspáz-3, -7, -8 enzimekkel történő hasíthatóságra</i>	39.
4.3.3.	<i>A P1 Asp cseréje Ser vagy foszfo-Ser aminosavakra megakadályozza a kaspáz-3, -7, -8 enzimekkel történő hasíthatóságot</i>	40.
5.	ÖSSZEFOGLALÁS	42.
6.	IRODALOMJEGYZÉK	44.
7.	KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA	51.

1. BEVEZETÉS

A proteázok (vagy peptidázok) a peptidkötés hasítását (proteolízis) katalizáló enzimek. A proteázok általánosan két fő kategóriába sorolhatók: exopeptidázok, melyek az aminosavakat a fehérjeláncok végéről képesek lehasítani, illetve endopeptidázok (vagy proteinázok), melyek a peptidkötés hasítását a peptidláncon belül katalizálják.

A proteinázok szerepe alapvető fontosságú számos fiziológiai folyamatban, mint például a gyulladás, fertőzés, allergiás reakciók, véralvadás, sejtnövekedés és a sejthalál. A proteinázok terápiás szempontból is fontos célfehérjék, mivel az ellenük tervezett inhibitorok alkalmazásával nem kívánt élettani hatásuk megakadályozható vagy csökkenthető. A proteinázok a katalitikus mechanizmusuk alapján tovább csoportosíthatóak: szeril (pl.: kimotripszin, tripszin, elasztáz, szubtilizin, stb.), ciszteinil (papain, katepszinek, kaszpázok, stb.), aszpartil (pepszin, renin, számos virális proteináz, stb.) és metallo-proteinázok (mátrix metallo-proteinázok, termolizin, stb.).

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

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

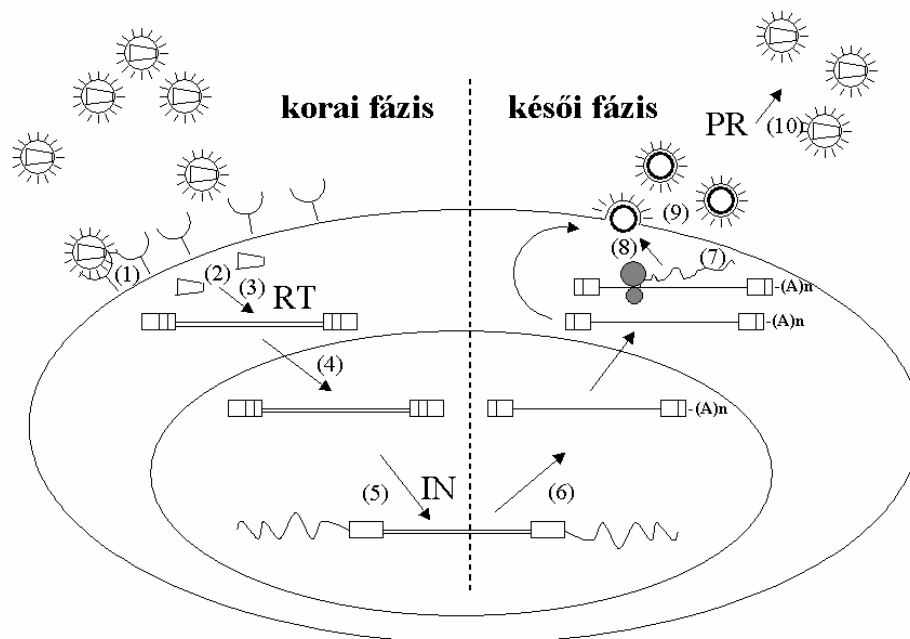
1.1. A retrovirális proteinázok (PR)

1.1.1. A PR szerepe a retrovírusok életrajzában

A retrovírusok kutatása az elmúlt két évtizedben a ma még gyógyíthatatlan, krónikus betegség, a szerzett immunhiányos szindróma (AIDS) (Gallo és Montagnier, 1988) megjelenésének és rohamos elterjedésének következtében került előtérbe. A retrovírusok

létezése már a múlt század elején ismert volt, azonban a HTLV és a HIV felfedezéséig nem tudtak olyan retrovírusról, amely az embert is megfertőzheti. Ma már minden gerinces retrovírus fertőzésére ismert példa, melyeknek kimenetele sokféle lehet: betegség nélküli virémia, daganatképződés, idegrendszeri elváltozások, anémia és immunhiány.

A retrovírusok burokkal rendelkező, pozitív szálú diploid RNS-t tartalmazó vírusok. A vírus receptor-mediált endocitózissal, vagy direkt membrándiffúzióval juthat be a gazdasejtbe (1.1. ábra). A genom-RNS pozitív szálú és szabályos, eukarióta sejtre jellemző mRNS szerkezetet mutat, de közvetlen fehérjeszintézishez mégsem ez használódik fel. A sejtbe bejutó vírus RNS-ét a reverz transzkriptáz (RT) átírja DNS-sé. A reverz transzkripció valószínűleg a citoplazmában, a vírus "core" struktúrában megy végbe (Varmus és Brown, 1989). Egyes adatok szerint a PR szerepet játszhat ebben a fázisban. Az EIAV vírus kapszidjának preparálása során a nukleokapszid (NC) protein *in situ* hasítását észlelték (Roberts és Oroszlán, 1989). A NC szintén hasad a kapszidban lévő endogén RNS reverz transzkripciója során. Ezért feltételezhető, hogy a sejtbe a kapsziddal együtt bejutó PR kritikus szerepet játszik a reverz transzkripcióban és az integrációban (Roberts és mtsai., 1991).



1.1. ábra: A retrovírusok életciklusa (Tózsér, 2001). (1) Kötődés-penetráció: receptor-antireceptor kölcsönhatás. Endocitózis vagy fúzió. (2) A vírusburok elvesztése, pH-függő vagy pH-független úton. (3) Provirus szintézis, melyért a RT felelős. (4) A preintegrációs komplex bejutása a magba. (5) Integráció az IN segítségével. (6) Provirus expressziója. (7) Transzláció. (8) Virion összerendeződés. (9) Virion lefűződés (budding). (10) A virion "érése" a PR segítségével.

Az újonnan képződő DNS-nukleoprotein komplex bekerül a sejtmagba, ahol a vírus DNS integrálódik a gazdasejt genomjába (provírus képződés). A provírus DNS a celluláris RNS polimeráz II segítségével átíródik RNS-sé. Az egyláncú, diploid RNS genom minden replikáció-kompetens retrovírusban legalább 4 gént (5'-*gag-pol-pro-env*-3') tartalmaz. Az emlős C-típusú retrovírusok (pl.: MuLV) *gag* és *pol* génjei stop-kodonnal (AUG) vannak elválasztva, mely transzláció során néha szupresszálódik (Yoshinaka és mtsai., 1985). A többi ismert nukleotid szekvenciájú retrovírusban a *gag* és *pol* gén különböző leolvasási keretben van kódolva. A Pol fehérjék a leolvasási keret -1 irányú eltolódásával szintetizálódnak (pl. HIV-1) vagy két eltolódás is van, ebben az esetben a *gag* és a *pol* gének között van a *pro* gén (pl. BLV, HTLV). A genom méretű mRNS transzlációjával a *gag* génről a mátrix protein (MA), a kapszid protein (CA) és a nukleokapszid protein NC, míg a *pol* génről a RT és az integráz (IN) szintetizálódnak.

A PR kódolása többféleképpen történhet. A PR, a madár C-típusú vírusai (pl. RSV) kivételével, a *pro* vagy a *pol* génen van kódolva és a strukturális fehérjékhez képest csak lényegesen kisebb mennyiségben (5-10%) szintetizálódnak. Egy kisebb, illetékt mRNS-ről írják át az *env*-kódolt fehérjék, melyek előbb glikozilálódnak, majd a plazmamembránba való transzport során egy felületi glikoproteinre (SU) és egy transzmembrán fehérjére (TM) hasadnak, egy celluláris proteáz hatására.

A transzláció elsődleges termékeként szintetizálódó poliproteinek a genom mRNS-sel egy toroidszerű "éretlen" részecskévé formálódnak, melyet a vírusburok zár be. A vírus a sejtből kikerül ("lefűződés" révén), majd a proteináz ma még nem ismert módon aktiválódik és elhasítja a poliproteineket, aminek során a vírus "éretté", fertőzőképpé válik. Ezen átalakulás morfológiailag is jól nyomon követhető (Yoshinaka és Luftig, 1977).

1.1.2. A retrovirális proteinázok általános jellemzése

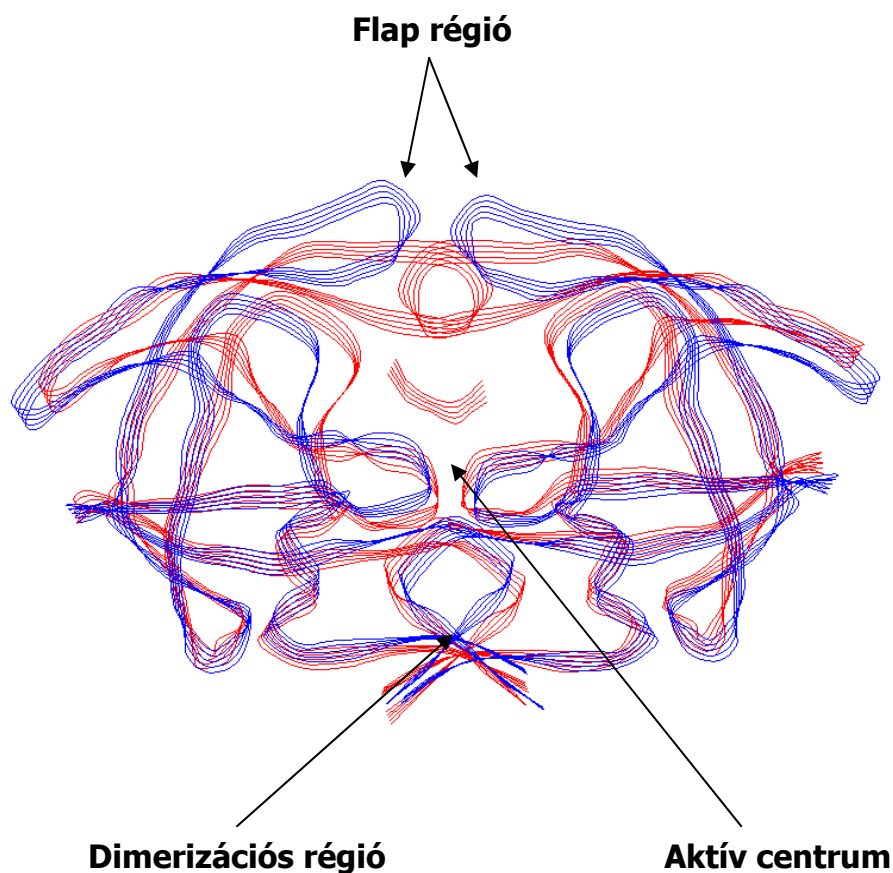
A retrovirális proteinázok pH optimuma savas, 5-6 közötti (Oroszlan és Luftig, 1990; Kuo és Shafer, 1994). A hatékony hidrolízishez minimum 6-7 tagú peptidszakasznak kell az enzimhez kötődnie (Tózsér és mtsai., 1991a), nyújtott β -redő konformációban. A retrovirális proteinázok természetes hasítási helyein található aminosavak általában hidrofób jellegűek, viszont általánosan érvényes konszenzus szekvencia nem adható meg (Oroszlan és Tózsér, 1990). A hasítási helyek osztályozása a HIV-1 PR esetében lehetséges, miszerint az 1. típusú hasítási helyek Asn-Tyr/Phe↓Pro aminosavakat tartalmaznak, a 2. típusúak pedig a P2-P2' helyeken hidrofóbbak (Tózsér és mtsai., 1992, az elnevezés a Schechter és Berger nevezéktana

alapján, 1967). Ez az általánosítás azonban úgy tűnik a többi retrovirális proteináz esetében nem alkalmazható. Érdekes jellemzőjük, hogy nagy ionerősség (2M NaCl) mellett lényegesen aktívabbak oligopeptid szubsztrátokon, mint alacsony ionerősségnél (Kotler és mtsai., 1989). Több celluláris fehérjéről derült ki, hogy szubsztrátjai a HIV proteinázoknak (Riviere és mtsai., 1991; Chou és mtsai., 1996), ami szerepet játszhat a vírus patogenitásában is (Kaplan és Swanstrom, 1991).

Számos retrovirális proteináz szekvenciája ismert. A retrovirális proteinázok 99-126 aminosavból álló, 11-15 kDa molekulatömegű fehérjék. Homodimer formában aktívak, amit röntgenkristallográfiai vizsgálatok is alátámasztottak (Navia és mtsai., 1989; Wlodawer és Erickson, 1993). A retrovirális proteinázok elsődleges és másodlagos szerkezete a celluláris aszpartil-proteinázok egyik doménjével analóg (Toh és mtsai., 1985), számos béta redőt tartalmaznak és enzimtől függően egy, vagy két rövid alfa hélixet. A két alegység N- és C-terminális láncai összefonódva alkotnak egy négyrétegű antiparalel béta redőt.

Az enzimben 3 jellegzetes régió található (1.2. ábra):

- az N-terminálishoz közel helyezkedik el az aszpartil proteinázokra jellemző aktív centrumot kódoló katalitikus triád (-Asp-Thr/Ser-Gly-),



1.2. ábra: A HIV-1 PR zárt (piros) és nyitott (kék) formája. A nyilak a PR jellegzetes régióit jelölik.

- egy másik többé-kevésbé konzervatív régió az úgynevezett "flap" régió, amely flexibilis, és a szubsztrát kötődésekor ráhajlik a szubsztrátra, mintegy stabilizálva az enzim-szubsztrát komplexet,

- a dimerizációs régió, melyért elsősorban az N- és C-terminális szekvenciák a felelősek.

Az alegységek katalitikus triádjai (-Asp-Thr/Ser-Gly-) hurkot alkotnak, amely analóg a celluláris aszpartil proteinázokra leírt ψ -struktúrával. Ezen aminosavak konformációja, minden ismert kristályszerkezetben azonos (Wlodawer és Gustchina, 2000). A két katalitikus triplet hidrogénkötések hálózatán keresztül jellemző módon kapcsolódik egymáshoz (Davies, 1990; Wlodawer és Erickson, 1993), melyet az irodalomban tűzoltó fogásnak neveznek, utalva a kötés geometriájára és igen erős voltára. A szerkezeti információkon túlmenően a HIV-1 PR kinetikai állandóinak pH és izotópfüggése alapján az alábbi reakciómechanizmus tételvezhető fel (Hyland és mtsai., 1991): A PR aktív centruma teljesen szimmetrikus és a két karboxil csoport által kötött vízmolekula oxigén atomján egyszeres negatív töltést tartalmaz. A szubsztrát kötődésekor, mely során kialakul az enzim-szubsztrát komplex, a vízmolekula negatív töltése révén nukleofil támadást indít a szubsztrát peptidkötés karbonil szénatomja ellen. A katalízis átmeneti állapota során a szubsztrát karbonil szénatomja tetraédes konformációt vesz fel, a negatív töltés pedig a karbonil oxigénre helyeződik át. A karboxil hidrogén egy újabb hidrogén kötés létesítésével a szubsztrát peptidkötésének a hasadását eredményezi, miközben kialakul az enzim-termék komplex. A szubsztrát diffúziójával az enzim visszaalakul szabad formájába és a katalitikus ciklus kezdődhet előlről.

1.1.3. A HTLV-BLV csoport

A humán T-sejtes leukémia vírus (HTLV) és a marha leukémia vírus (BLV) a retrovírusok családjába tartozik, ezen belül is a csoport harmadik tagjával, a majom T-sejtes leukémia vírussal (STLV) együtt, egy külön csoportot alkotnak, az úgynevezett HTLV-BLV csoportot. Ezen csoport tulajdonságai részben eltérnek a többi retrovírustól, a csoporton belül viszont nagy a hasonlóság. Ilyen eltérés például, hogy ezen vírusok a sejtimmortalizációt nem a celluláris genomba beépülve vagy onkogén szekvenciát kódolva hozzák létre. Tumort kiváltó hatásuk még nem teljesen ismert, valószínűleg többféle folyamat is közrejátszik benne (Cann és Chen, 1990; Haas és mtsai., 1992). Az bizonyos, hogy a vírus által kódolt transz-aktivátor Tax onkoprotein számos celluláris gén expressziójának és funkciójának szabályozásával fontos szerepet játszik ebben a folyamatban. A Tax képes számos celluláris jelátviteli útvonalba beavatkozni, ilyenek például a CREB/ATF és NF- κ B (Jeang, 2001), de ismert apoptózist

indukáló képessége is (Yamada és mtsai., 1994). A HTLV-I emberben felnőtt T-sejtes leukémiát (ATL), trópusi spasztikus paraparézist/mielopátiát (TSP/HAM) okozhat. A HTLV-II „szőrös” sejtes (hairy cell) leukémiát hozhat létre, míg a BLV szarvasmarhában okoz limfoszarkómát, de az előbbiekkal ellentétben a B-limfocitákat támadja meg (Johnson és mtsai., 2001). Eltérően a többi retrovírustól, ebbe a csoportba tartozó vírusok enzimeik fehérjéi egyszeres (PR) és kettős (RT, IN) leolvasási keretelölással vannak kódolva.

1.2 A kaspázok

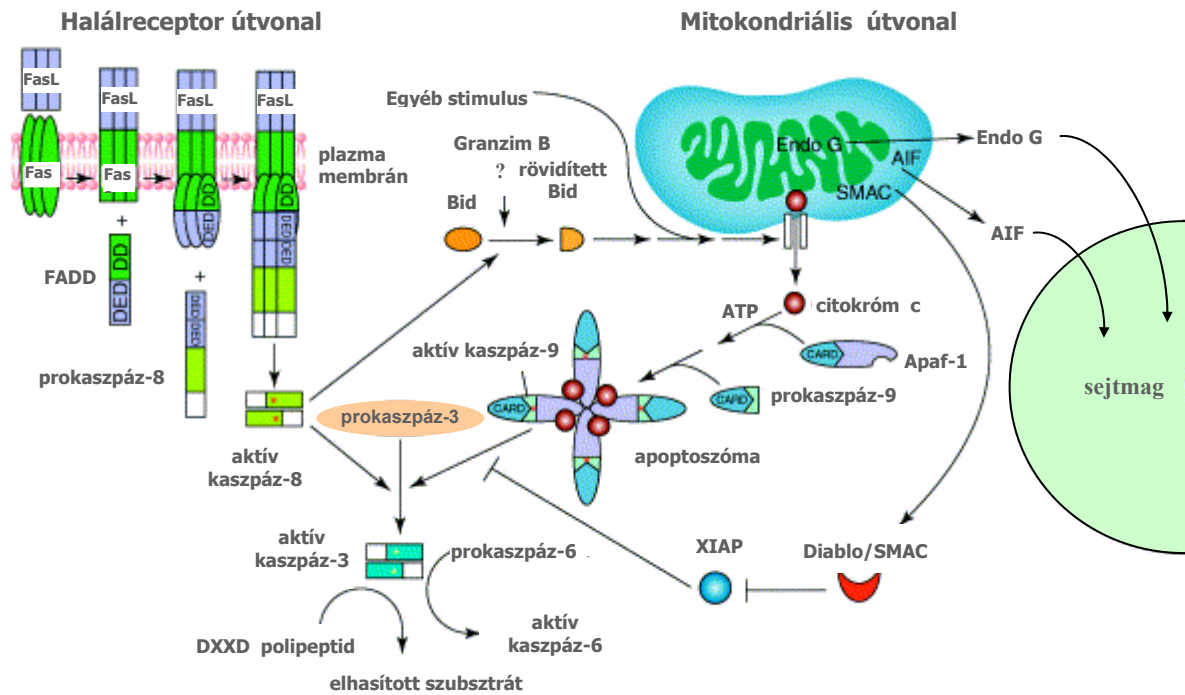
1.2.1 A kaspázok élettani szerepe

A kaspázok első képviselőjét 1992-ben azonosították (Cerretti és mtsai., 1992) amikor sikerült klónozni azt a proteinázt, amelyik az interleukin-1 β (IL-1 β) citokin inaktív formájának hasításáért és így annak aktiválásáért felelős. Később az interleukin-1 β konvertáló enzimről (ICE) kiderült, hogy az egy új típusú ciszteinil proteináz (Thornberry és mtsai., 1992), amelynek aldehid alapú inhibitorokkal történő gátlásával humán vérből származó érett monociták IL-1 β termelését sikerült blokkolni. Az érdeklődés az új proteináz iránt igazán akkor erősödött föl, amikor bizonyították, hogy a *C. elegans* CED-3 fehérjéje, amelynek szintje a fereg embriogenezise alatt magas, amikor az apoptotikus sejtelhalás szintje is jelentős, homológ az ICE enzimmel és így valószínűsítették a ciszteinil proteinázok egy új osztályának részvételét a programozott sejtelhalásban (Yuan és mtsai., 1993).

A programozott sejtelhalás evolúciósan konzervált folyamatában döntő szerepet játszó proteolitikus rendszernek tagjai a kaspázok. Ezek az enzimek egy olyan kaszkádfolyamat részesei – elindítói illetve végrehajtói -, amely proapoptotikus szignálok hatására indul el, és számos fehérje hasításában tetőzik. Az apoptózis erőteljesen szabályozott folyamatának következményeként a nemkívánatos sejtek meghatározott morfológiai változásokon mennek keresztül (lekerekedés, membrán kitüremkedések képződése, DNS kondenzálódás és fragmentáció, zsugorodás és membránnal határolt, különböző sejtalkotórészeket magában hordozó apoptotikus testekre történő feldarabolódás), melynek eredményeképpen a sejteket a fagociták eliminálják, elkerülve ezzel a gyulladással kapcsolatos reakciókat (Nicholson és Thornberry, 1997; Salvesen és Dixit, 1997; Cryns és Yuan, 1998).

Jelenleg két fő apoptotikus kaszkádútvonal ismert. Az egyik kiváltója sejt felszíni stimulus (extrinsic vagy halálreceptor útvonal), amely halálligand-halálreceptor kapcsolódáson keresztül valósul meg, míg a másikat (intrinsic vagy mitokondriális útvonal)

celluláris stressz okozza, és a citokróm c mitokondriumból történő felszabadulása által előidézett aktiválással valósul meg (1.3. ábra) (Budihardjo és mtsai, 1999). Nemrég egy olyan új útvonalat írtak le, amelyet az endoplazmatikus retikulumban (ER) bekövetkező stressz indukál és amelyben a kaszpáz-12 játszik szerepet (Nakagawa és mtsai., 2000).



1.3. ábra: A kaszpázaktiváció két fő útvonala (Kaufmann és Hengartner, 2001 alapján módosítva)

Az iniciátor kaszpázok (-2, -8, -9, -10) minden kaszpázfüggő apoptotikus útvonalban végrehajtó kaszpázokat (-3, -6, -7) aktiválnak, melyek az általuk katalizált limitált proteolízis által specifikus celluláris célfehérjéket aktiválnak vagy inaktiválnak. Feltétlenül meg kell azonban jegyezni, hogy számos apoptotikus folyamat esetében (pl.: sejtsugorodás, membránkitüremkedések, magkondenzáció) bizonyították, hogy a kaszpáz inhibitorok alkalmazása nem állította meg a folyamatot, a sejtek egy elnyújtott, hosszabb folyamat végén elhaltak. Következésképpen, valószínűleg létezik az apoptózisnak kaszpáz-független formája is (Borner és Monney, 1999).

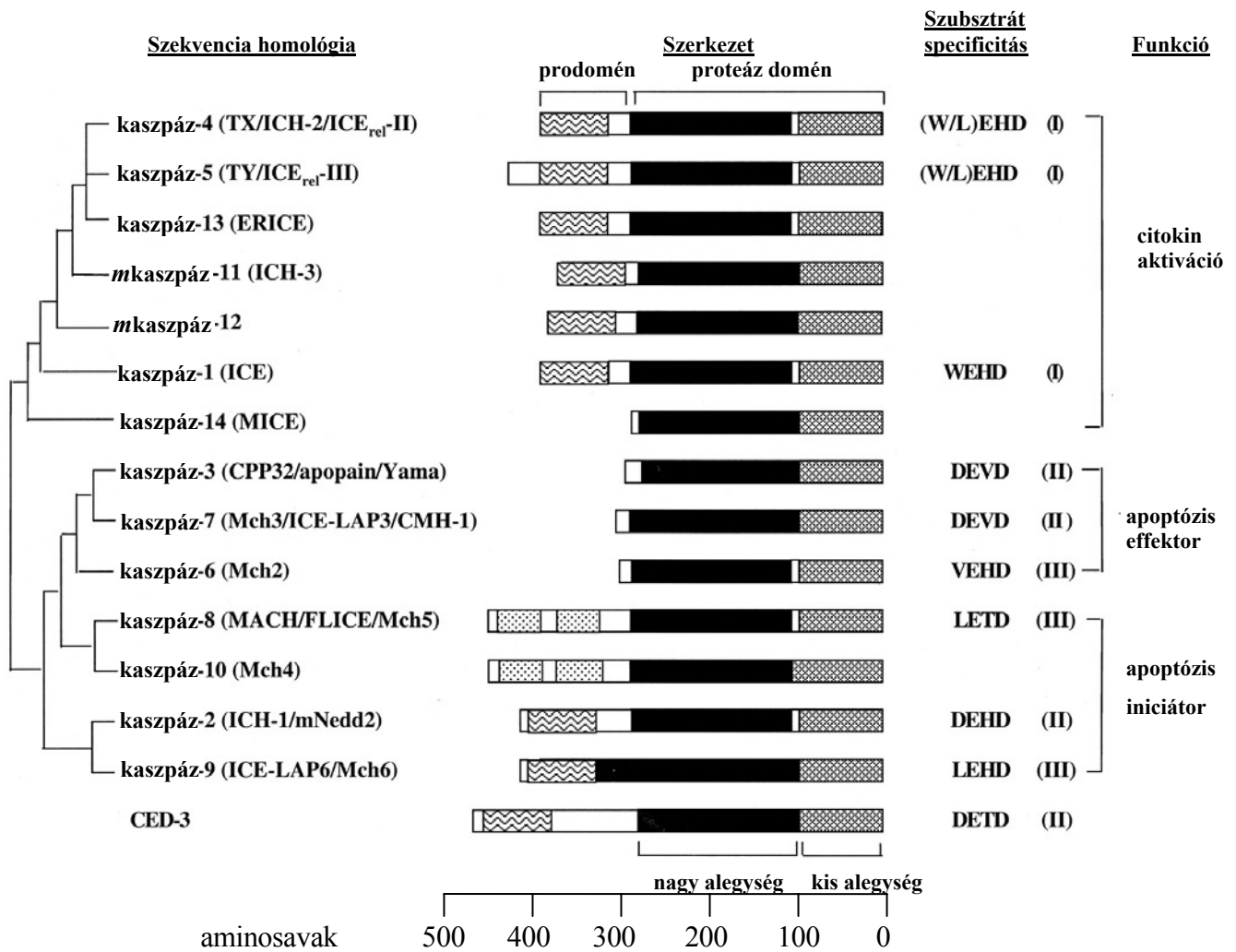
Az apoptózis iniciátor és végrehajtó kaszpázok mellett élettani szempontból a kaszpázok harmadik csoportját a citokin aktiváló kaszpázok (-1, -4, -5, -11, -12, -13, -14) alkotják, amelyek a gyulladási folyamatokban játszanak szerepet (Wang és Leonardo, 2000).

1.2.2 A kaszpázok általános jellemzése

A kaszpázok legfontosabb tulajdonságait nevükben rejtik, az enzimes család tagjai ui. kivétel nélkül P1 aszpartát specifikus ciszteinil proteinázok (Caspase = cysteine-dependent aspartate-specific protease) (Stennicke és Salvesen, 1999). Az első kaszpáz (kaspáz-1, ICE) azonosítása óta 14 emlős kaszpázt és 5 *Drosophila* kaszpázt klónoztak (Chang és Yang, 2000). Látszó prekursor (zimogén) prokaspázok formájában szintetizálódnak, aktiválódásuk a fentebb vázolt, gondosan szabályozott útvonalakon történik.

Szerkezetüket tekintve minden prokaspáz tartalmaz egy nagymértékű homológiát mutató proteáz domént, amely domén két alegységre, a ~20 kD méretű nagy, illetve a ~10 kD méretű kis alegységekre osztható fel. Az enzim aktivitásához mindkét alegység szükséges (Nicholson és mtsai., 1995). Ugyancsak minden kaszpázban megtalálható egy N-terminális peptidszakasz, ún. prodomén. Hossza igen változó lehet, az iniciátor és gyulladáshoz szerepet játszó kaszpázoké hossza 100 aminosav feletti, míg az effektor kaszpázoké 30 aminosav alatt van (1.4. ábra). A hosszú prodoménon különböző motívumok találhatók, nevezetesen a prokaspáz-8, -10 két tandem kópia DED domént, míg a kaszpáz-1, -2, -5, -4, -9 valamint a CED-3 CARD domént tartalmazzák. Ezen domének mediálják a prokaspázok egymással, illetve adaptereikkel történő összekapcsolódását, így fontos szerepet játszanak a prokaspázok aktivációjában.

Enzimatisma tulajdonságait tekintve a kaszpázok egyéb ciszteinil proteinázokhoz hasonlóan, valószínűleg a katalitikus tiol csoportjuk oxidációra való erős hajlama miatt, teljes aktivitásuk megtartásához redukáló környezetet igényelnek. Átmeneti fémek jelenléte, melyek egyrészt hajlamosak a katalitikus Cys tiol csoportjaival koordinációs komplexeket képezni, másrészt képesek az oxidációt katalizálni, szintén aktivitáscsökkenést okoz. Zn^{2+} jelenléte például már mM-os nagyságrendben teljes gátlást eredményez (Stennicke és Salvesen, 1997). Ca^{2+} esetében nem tapasztaltak hasonló hatást, így a Ca^{2+} apoptózis gátló tulajdonsága (Bian és mtsai., 1997) nem a kaszpázokhoz köthető. A kaszpázok pH optimuma 6.8 – 7.4 között található, aktivitásuk 0-150 mM NaCl koncentráció között stabil, következésképpen a fiziológias pH és ionerősség változások szignifikánsan nem változtatnak a kaszpázok aktivitásán, így ezek az enzimek maximálisan aktívak az élő és elhaló humán sejtek citoszóljában található paraméterek között (Stennicke és Salvesen, 1997).



1.4. ábra: Az emlős kaspázok és a CED-3 csoportosítása, doménszerkezete. (Zárójelben a kaspázok alternatív nevei találhatóak; a pöttyös doboz DED domén, a hullámos CARD domén) (Chang és Yang, 2000 alapján módosítva)

Jelenleg 5 kaspáz kristályszerkezete ismert, melyeket tetrapeptid aldehid inhibitorokkal határoztak meg (Wilson és mtsai, 1994; Blanchard és mtsai, 1999; Rotonda és mtsai, 1996; Chai és mtsai, 2001; Renatus és mtsai, 2001). A szerkezetekből kitűnik, hogy az érett kaspázok tetramerek (pl.: a kaspáz-3 esetében p17 és p13 egységekből álló heterodimerek C2 szimmetriájú homodimere), két egymástól függetlenül működő aktív centrummal. Mind a két heterodimer egyszerű globuláris domént képez, amelynek közepén egy alfa-hélixekkel határolt hatmenetes β -redő található (1.5. ábra).

A kaspázok meglehetősen specifikus endopeptidázok, mivel minden ismert képviselőjük szinte kizárólagosan aszpartát mellett hasít (Stennicke és Salvesen, 1998). Ma már azonban olyan természetes szubsztrátok is ismertek, amelyek hasítási szekvenciájukban P1 helyen glutamátot tartalmaznak. Ilyenek például a tumor nekrosis faktor receptor-I (p60)

fehérje, amit a kaszpáz-7 GELE motívum mellett képes hasítani (Ethell és mtsai., 2001), a Max fehérje, amelyben IEVE hasítási helyet azonosítottak, amit a kaszpáz-5 és -7 enzimek *in vitro* hasítanak (Krippner-Heidenreich és mtsai., 2001), és a DRONC *Drosophila* kaszpáz, amely önmagát is glutamát, TQTE szekvencia mellől hasítja ki (Hawkins és mtsai., 2000). Specificitás alapján történő csoportosításukra az S4 alzsebük specificitásában található különbségek adnak lehetőséget (Nicholson, 1999): az 1. csoport tagjainak (kaspáz -1, -4, -5, -13) S4 zsebe toleráns, de jobban kedvelik a nagy hidrofób aminosavakat. A 2. csoportban szigorúan csak P4 Asp-ot kedvelő tagok találhatóak (kaspáz -2, -3, -7), míg a 3. csoport tagjai (kaspáz-6, -8, -9) a P4 elágazó láncú alifás oldalláncokat szeretik.



1.5. ábra A kaszpáz-3 tetramer Ac-DEVD-CHO inhibitor molekulával képzett komplexében. Az inhibitort labda-és-pálcika modellel ábrázoltuk. A tetramer négy alegységét négyféle színnel jelöltük, amelyben a lila-kék és narancssárga-citromsárga monomerpárok alkotnak egy-egy heterodimert, amelynek dimere az érett kaszpázokra jellemző tetramer.

A kaszpázok katalitikus mechanizmusa a szeril és aszpartil proteinázokéhoz hasonlóan szintén tetraédes szubsztrát intermedieren keresztül történik. A katalízis során az enzim Gly238 és Cys285 aminosavak amid nitrogénjein található hidrogén atomok szolgálnak donorként a hasítandó amid kötés karbonil oxigénjének polarizációjához, és az oxianion koordinációjához. Ezáltal a karbonil szénatom elektrofil hajlama növekszik, és könnyebben fogadja a Cys285 nukleofil kén atomjának támadását, mivel a Cys285 kén atomjának nukleofilítását a His237 imidazol gyűrűjén található nemkötő elektrópárral bíró nitrogénatomja megnöveli, protont átvéve a Cys285 tiol csoportjától. Ezután a His237 protonált imidazol gyűrűje savként viselkedve képes az intermedier amino csoportjának protonálására, távozásra kényszerítve azt. A hidrolízis befejezéseként a His237 szerepet játszik a vízmolekula polarizációjában segítve ezáltal a dezacilációhoz szükséges második tetraédes intermedier kialakítását (Stennicke és Salvesen, 1999; Grütter, 2000).

1.2.3 Foszforiláció szempontjából érdekes kaszpáz szubsztrátok

Bár az eddig azonosított fiziológiás kaszpáz szubsztrátok száma meghaladja a hatvanat, ez a lista folyamatosan bővül. Ezek a fehérjék általában interdomén összekötő szekvenciájukban tartalmazzak egy vagy néhány kaszpáz hasítási helyet, tehát a kaszpázok szubsztrát fehérjéjüket nem lebontják, hanem a hasítás által fehérjefunkció aktiválódás vagy inaktíválódás megy végbe. A teljesség igénye nélkül a legjellemzőbb kaszpázszubsztrát fehérjetípusok és néhány képviselőjük: sejthalál fehérjék (Bcl-2, Bcl-X_L, Bid, IAP, prokaspázok), sejtciklus szabályozó fehérjék (Cdc27, Ciklin A, MDM2), citoskeletális fehérjék (aktin, gelsolin, Gas-2, laminin), DNS metabolizmusban résztvevő fehérjék (DNS dependens protein kináz, ICAD, PARP), neurodegeneratív betegségekben szerepet játszó fehérjék (amiloid prekursor protein (APP), huntingtin, preszenilinek (PS-1 és PS-2)), jelátvitelben szerepet játszó fehérjék (fokális adhéziós kináz, MEKK1, protein kináz C delta, theta), transzkripciós faktorok (IκB-α, NF-κB, STAT1, SREBP) és egyéb fehérjék (Hsp90, transzglutamináz).

Számos celluláris kaszpáz szubsztrát fehérje potenciális, vagy meghatározott foszforilációs helyet tartalmaz a hasítási hely régiójában (1.1. táblázat). Utóbbi fehérjék funkciójának foszforilációs szabályozását több esetben bizonyították.

Ismert például a PS-2 hasítási hely Ser 327 és Ser 330 oldalláncainak foszforilációja, ami gátolja a kaszpázok általi hasíthatóságát, így fokozva antiapoptotikus tulajdonságát (Walter és mtsai., 1999). Bizonyított az IκB-α, MST1 és Max fehérjék P1' Ser

oldalláncainak foszforilációja és a kaspázhasítás szempontjából jellemző szabályozó szerepe (Barkett és mtsai., 1997; Graves és mtsai., 2001; Krippner és mtsai., 2001).

A sejtciklus $G_0 \rightarrow G_1$ átmenete során tapasztalt aktin átrendeződéshez kapcsolódó Gas-2 fehérje hiperfoszforilációja és a fehérje apoptózis szabályozó szerepe ismert (Brancolini és Schneider, 1994; Lee és mtsai., 1999). A Gas-2 fehérje kaspáz-3 és kaspáz-7 szubsztrátnak bizonyult (Brancolini és mtsai., 1995; Sgorbissa és mtsai., 1999). A Gas-2 fehérje foszforilációjának szempontjából a kaspáz hasítási hely P4 Ser oldallánca jöhet számításba, amely nem egyedülálló, hiszen az SREBP-1 és PAK-2 fehérjék szintén potencionális P4 foszforilációs helyeket tartalmaznak (Wang és mtsai., 1995; Walter és mtsai., 1998).

Különlegesebbnek tűnik a Bid fehérje P2' Ser oldalláncának foszforilációja (P2 Thr kevésbé volt foszforilálható), amely teljesen meggátolta a kaspáz-8 enzimmel történő hasíthatóságát (Desagher és mtsai., 2001).

1.1. táblázat. Foszforilálható kaspáz hasítási hely szekvenciák. Vastag betűvel jelöltem (S^P), a bizonyítottan foszforilálható hasítási helyeket.

Protein	Szekvencia	foszforiláló kináz
PS-1	A-Q-R-D-↓-S ^P -H-L-G ^a	PKA
PS-2	M-E-E-D-↓-S ^P -Y-D-↓-S ^P -F-G-E-P ^b	CK1, CK2
Gas-2	S ^P -R-V-D-↓-G-K-T-S ^c	?
SREBP-1	S-E-P-D-↓-S ^P -P-V-F ^d	Erk1/2
SREBP-2	D-E-P-D-↓-S ^P -P-P-V ^d	Erk1/2
IκB-α	D-R-H-D-↓-S ^P -G-L-D ^e	MEKK1
MST1	D-E-M-D-↓-S ^P -G-T-M ^f	MST1
p21(Waf1/Cip1)	S ^P -M-T-D-↓-F-Y-H-S ^g	PKC
Bid	L-Q-T ^P -D-↓-G-S ^P -Q-A ^h	CK1, CK2

a) A hasítás az Asp345 mellett történik egy nem azonosított kaspáz által (Grünberg és mtsai., 1998). A hasítási hely PKA és PKC konszenzus szekvenciát tartalmaz, és ezek a kinázok foszforilálhatják a PS-1 fehérjét (Walter és mtsai., 1997). A pontos foszforilációs hely nincs meghatározva.

b) A kaspáz-3 hasítja Asp326 és Asp329 (fő hasítási hely) mellett (Kim és mtsai., 1997). A Ser327 és a Ser330 oldalláncokat kazein kinázok foszforilálják (Walter és mtsai., 1998 és 1999).

c) A hasítás az Asp279 mellett történik (Brancolini és mtsai., 1996).

- d) A kaspáz-3 hasítja az Asp40 és az Asp468 mellett (SREBP-1, SREBP-2 sorrendben) (Wang és mtsai.,1995). A hasítási hely MAPK konszenzus szekvenciát tartalmaz, a fehérjéket Erk1 és 2 kinázok foszforilálják (Davis. 1993).
- e) A kaspáz-3 hasítja az Asp31 mellett (Barkett és mtsai., 1997). A Ser32-t MEKK1 foszforilálja (Lee és mtsai., 1998).
- f) Számos kaspáz hasíthatja az Asp326 mellett. A Ser327 foszforilációja csökkentette a kaspázok által történő hasíthatóságát (Graves és mtsai., 2001).
- g) A kaspáz-3 hasítja az Asp149 mellett (Park és mtsai., 1998). A Ser146 foszforilálható (Scott és mtsai., 2000).

2. CÉLKITŰZÉS

A HTLV-I és BLV PR között nagy mind a szekvenciabeli, mind a specificitásbeli hasonlóság (Sagata és mtsai., 1984; Rice és mtsai., 1987), ezért a BLV PR a HTLV-I PR jó modelljének ígérkezett. Mivel a HTLV-BLV csoport tagjairól még nem rendelkezünk kristályszerkezettel és a BLV PR specificitását csak a HIV-1 és HIV-2 proteinázokkal hasonlították össze (Andreansky és mtsai., 1991; Blaha és mtsai., 1992), ezért célul tűztük ki a BLV PR klónozását és tisztítását, majd specificitásának a HTLV-I PR-al történő összehasonlítását, a HTLV-I és BLV PR természetes hasítási helyeit reprezentáló oligopeptidek segítségével.

A HTLV PR-t már részben karakterizálták (Daenke és mtsai., 1994; Hruskova-Heidingsfeldova és mtsai., 1997; Ding és mtsai., 1998; Louis és mtsai., 1999). Specificitásának a HIV-1 PR-al történő kellő részletességű összehasonlítását még nem írták le, ezért célul tűztük ki az enzim HIV-1 PR-al történő összehasonlítását, a HIV-1 PR MA/CA természetes hasítási helyén alapuló oligopeptid sorozattal. Mivel a sorozat számos tagját a HTLV-I PR nem hasította, ezért az összehasonlítást egy új, a HTLV-I CA/NC természetes hasítási helyén alapuló oligopeptid szubsztrátsorozattal is elvégeztük. Célunk volt továbbá a HTLV-I PR modelljének felépítése, a mérési eredményeinknek a molekuláris modellezés eszközével történő értelmezése.

A proteolízis és a fehérje foszforiláció együttes tanulmányozása a foszforilált oldalláncok közvetlen szerepének feltárásával ritka az irodalomban. A foszforilálható aminosavak azonosítására és a foszforiláció hatásának vizsgálatára rendszerint helyspecifikus mutagenézist alkalmaznak, az aminosav-jelölt Ser az első esetben Ala vagy Gly, míg a második esetben Asp aminosavra történő cserélésével. Mivel egy korábbi munkában a retrovirális proteinázok alkalmazásával munkacsoportunk már bebizonyította, hogy foszforilált oligopeptidek alkalmazása kiváló eszköz lehet a foszforilációnak a proteolízisre kifejtett szerepének tanulmányozására (Tözsér és mtsai., 1999), ezért célul tűztük ki kaspáz szubsztrátok P4, P3 és P1' Ser oldalláncainak foszforilációjának a szubsztrátok proteolízisére gyakorolt hatásának vizsgálatát. A vizsgálatainkhoz a PS-2 és Gas-2 kaspáz szubsztrátokat mimikáló foszforilált illetve nem foszforilált oligopeptideket használtunk. További célunk volt a kaspázok specificitása szempontjából esszenciális P1 Asp szerepének jellemzése a PARP, egy jól hasadó fehérje hasítási helyének szekvenciájával bíró, valamint abban P1 helyen Ser illetve foszfo-Ser mutációt tartalmazó oligopeptidek felhasználásával.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

ENZIMEK: A BLV PR-t kódoló régiót cDNS BLV klónból polimeráz láncreakcióval (PCR) sokszoroztuk fel. A PCR-hoz használt 5' primer EcoRI hasítási hely szekvenciát tartalmazott a kódoló régiótól 5' irányban, 3' primerből pedig kétfélet használtunk: az egyik a PR C-terminálisánál végződött, a másik a „pro reading frame” proteáz utáni teljes szekvenciáját tartalmazta és mindkettő tartalmazott két stop kodon után egy SalI hasítási hely szekvenciát. A felsokszorozott DNS fragmenteket pMal-c2 vektorba klónoztuk a maltóz kötő fehérje (MBP) génje után. Mindkét konstrukció tartalmazott egy 8 aminosav hosszú N-terminális túlnyúló szekvenciát. A vektorokat *E. coli* DH5a sejtekbe transzformáltuk és a sejteket Luria-Bertani tápfolyadékban 37 °C-on 100 µg/ml ampicilin koncentráció mellett növesztettük. Amikor a sejtszuszpenzió elérte a 0.6-0.8 abszorbanciát 600 nm-es hullámhosszon, a sejteket 1 mM IPTG hozzáadásával indukáltuk, és két órán keresztül expresszáltattuk a fehérjét. A sejteket lecentrifugáltuk és SDS-poliakrilamid gél mintafelvívő pufferben történő lizálás után SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel győződünk meg az expresszió sikerességéről. Nagy mennyiségű fehérje tisztításánál a sejteket centrifugálás után lízis pufferben szuszpendáltuk (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1 mM PMSF). A sejteket a lizozim-DOC módszerrel lizáltuk (Sambrook és mtsai., 1989). Az inklúziós testeket 0.5% Triton X-100 tartalmú lízis pufferben mostuk, lecentrifugáltuk, majd a pelletet 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 6 M guanidin-HCl pufferben oldottuk, jégen. A mintát 4 °C-on két lépésben dializáltuk, először 2 M guanidin-HCl tartalmú 100mM Tris-HCl pH 8.0 pufferrel, majd A pufferrel (20 mM Tris-HCl pH 7.2, 100mM NaCl, 1 mM EDTA, 5% glicerin, 0.1% Triton X-100) szemben. Végül centrifugálás után a felülúszót 0.22 µm-es membránszűrőn leszűrtük. Ezután kationcserés eljárással Econo-Pak High S oszlopon (Bio-Rad) tisztítottuk A puffer és A puffer + 1M NaCl lineáris gradienssel. A legnagyobb aktivitású frakciókat Amicon-10-el koncentráltuk, majd A-pufferrel ekvilibrált Superdex G-75 HR 10/30 gélszűrő oszlopon tisztítottuk. Az így kapott legnagyobb aktivitású frakciókkal végeztük a kinetikai méréseinket.

A rekombináns HTLV-I proteinázt kódoló régió pET-23b plazmidba volt klónozva. Az enzim expressziója és tisztítása publikált módszer alapján történt (Louis és mtsai., 1999).

A humán rekombináns kaszpáz-3, -7 és -8 enzimeket a Biomol Research Laboratories (Plymouth Meeting, PA, USA) cégtől szereztük be, illetve az irodalomban leírt módon *E. coli*-ban expresszáltattuk és tisztítottuk (Stennicke és Salvesen, 1999). A klónokat Dr. Guy S.

Salvesen (Burnham Institute, La Jolla, California) biztosította. Az enzimkoncentrációkat acetil-Asp-Glu-Val-Asp-CHO inhibitorral történő titrálással határoztuk meg.

A mutáns kaszpáz-3 enzimeket QuikChange™ helyspecifikus mutagenézis kit segítségével készítettük a vad típusú kaszpáz-3 nukleotidszekvenciáját tartalmazó pET23b templát plazmid felhasználásával. A mutáns kaszpáz-3 enzimeket az irodalomban leírt módon *E.coli*-ban expresszáztattuk és tisztítottuk (Stennicke és Salvesen, 1999), majd SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel győződünk meg az expresszió sikerességéről.

OLIGOPEPTIDEK: Az oligopeptideket szilárd fázisú peptidszintézissel készítették, Model 430A automata peptid szintetizátorral (Applied Biosystems, Inc.) vagy félautomata Vega peptid szintetizátorral (Vega-Fox Biochemicals). A tisztításhoz RP-HPLC-t használtak (Copeland és Oroszlán, 1988). A peptideket aminosav analízissel, illetve alkalmanként gázfázisú szekvenálással ellenőrizték. A peptid-törzsoldatok desztillált vízzel vagy 10 mM DTT-oldattal készültek, a pontos koncentrációt aminosavanalízissel határozták meg. A peptid oldatokat Dr. Stephen Oroszlántól és Dr. Terry D. Copelandtól kaptuk (Molecular Virology and Carcinogenesis Laboratory, NCI-FCRDC, Frederick, MD, USA). A foszforilált peptidek szintézise publikált módszer alapján történt (Tózsér és mtsai., 1999).

ENZIMAKTIVITÁS MÉRÉSE: A retrovirális proteinázok aktivitás-mérése a következő reakcióelegyben történt: 0.01–4 mM szubsztrátoldat a hozzávetőleges K_M értéktől függően, 1–40 nM retrovirális PR készítmény, 0.25 M foszfát puffer pH 5.6, 5% glicerol, 1 mM EDTA, 0.2% Nonidet P-40, 2 M NaCl (Tózsér és mtsai., 1991b). A kaszpázok aktivitás-mérése a következő reakcióelegyben történt: 50 mM HEPES, pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.1 % CHAPS, 1 mM EDTA, 10 mM DTT és 10 % glycerol, 0.01–6.0 mM szubsztrát végkoncentráció mellett. A 20 µl végtérfogatú reakcióelegyeket 37 °C-on 1 órán át inkubáltuk. Ha nem tapasztaltunk jelentős hidrolízist, a reakciót 16 órás inkubálással is lejátszottuk. A reakciókat 180 µl 1% TFA hozzáadásával állítottuk le, majd a szubsztrátot RP-HPLC-vel választottuk el a termékektől, valamint a pufferkomponensektől, Nova-Pak C18 (Waters Associates, Inc.) kromatográfias oszlopon (3.9 x 150 mm), lineáris víz-acetonitril gradienssel (0-100%), 0.1% TFA jelenlétében. Az elválasztást 206 nm-en követtük és a hidrolízis mértékét a kromatográfias görbe integrálásával számítottuk. A csúcsok integrációs értékeinek megfelelő peptidmennyiség kiszámításához korábban meghatározott referenciaértékeket használtunk. Ezen referenciaértékeket, valamint a hasítási helyeket, a csúcsoknak megfelelő frakciók

aminosavanalízisével és szekvenálásával határozták meg. Ezek alapján a termékek azonosításához a retenciós időket vettük figyelembe.

A kinetikai állandók meghatározásához minden szubsztrátpeptidre 6 különböző koncentrációt teszteltünk, és úgy állítottuk be az enzim koncentrációkat, hogy a szubsztrát hidrolízise 20% alatt maradjon. A kinetikai paramétereket a reakciósebesség és szubsztrátkoncentráció adatok Michaelis-Menten egyenlethez való illesztésével határoztuk meg, nemlineáris regressziós módszerrel, a Fig.P program (Fig.P Software Corp., Durham, NC) felhasználásával. A kinetikai állandók standard deviációi 20 % alatt voltak. A szubsztrát hidrolízis általában a Michaelis-Menten kinetikát követte az általunk használt szubsztrátkoncentráció tartományban, azonban azoknál a peptideknél, melyeknél nem volt lehetőségünk a koncentrációjuk növelésére, a k_{cat}/K_M értékeket a görbe lineáris szakaszából állapítottuk meg. Azoknál a peptideknél, ahol a Michaelis-Menten görbe már igen kis szubsztrát koncentrációnál a telítési szakaszba ért, a k_{cat}/K_M értékeket ismert k_{cat}/K_M értékekkel rendelkező szubsztrátok segítségével, kompetíciós mérésekkel határoztuk meg (Fersht, 1985).

MOLEKULÁRIS MODELLEZÉS: A Rous sarcoma vírus (RSV) PR, HIV-1 PR natív (Miller és mtsai., 1989; Navia és mtsai., 1989; Wlodawer és mtsai., 1989) illetve inhibitorokkal alkotott komplexeinek (Erickson és mtsai., 1990; Fitzgerald és mtsai., 1990; Swain és mtsai., 1990; Jaskolski és mtsai., 1991; Wlodawer és Gustchina, 2000) kristályszerkezete ismert. Az RSV PR- és HIV-1 PR-inhibitor komplex kristályszerkezete alapján modellezték az RSV-PR- és HIV-1 PR-szubsztrát komplexet (Weber és mtsai., 1989) és a HIV-2 PR-t is (Gustchina és Weber, 1991). Az RSV PR kristályszerkezetében nem volt látható teljesen a flap régió, ezt modellezéssel egészítették ki (Grinde és mtsai., 1992). A HTLV-I PR modellezése során az RSV kristályszerkezetéből indultunk ki. A HOMOMA (HOMolog MOdel MAker) program segítségével (Bagossi és mtsai., nem közölt eredmény) az RSV PR aminosavjait megfeleltettük a HTLV-I PR aminosavjaival úgy, hogy a lehető legnagyobb homológiát kapjuk. Ezt követően két deléció alkalmazására volt szükség – egy 5 aminosav hosszúságú az RSV 22-26 aminosavai között egy hurokban és egy 3 aminosavas a flap régió hurokszakaszában-, hogy megkapjuk a HTLV-I PR aminosavszekvenciának megfelelő szerkezetet (4.2.2. ábra). A kapott szerkezetet az AMMP program segítségével (Harrison, 1993) Thr-Gln-Val-Leu↓Val-Val-Gln-Pro oligopeptiddel alkotott komplexében minimalizáltuk, sp4 paraméterkészlet (Weber és Harrison, 1996) alkalmazásával.

A kaszpáz-3 PS-2 szubsztráttal alkotott modelljét a humán kaszpáz-3-inhibitor kristályszerkezetből építettük fel (Mittl és mtsai., 1997) az inhibitor oldalláncainak szubsztrátoldalláncokra történő cseréjével, Sybyl 6.7 software csomag (Tripos Inc., St. Louis, MO, USA) alkalmazásával. A kicserélt oldalláncok konformációjának megtalálásához mindegyik rotálható kötés torziós szögének 15° -ként történő elforgatásával konformációs keresést végeztünk „Kollman all-atom” erőter alkalmazásával, a 8 angströmnél távolabbi kölcsönhatások elhanyagolásával. A módosított aminosavak legkisebb energiájú konformereinek megtalálása után a teljes enzim-szubsztrát komplexre húsz Powell iterációt alkalmaztunk. Az így felépített enzim modell $C\alpha$ atomjai és a kiindulási kristályszerkezet $C\alpha$ atomjai közötti RMS deviáció 0.13 angströmnek adódott.

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

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

4.1. A BLV PR klónozása *Esherichia coli*-ba és specificitásának összehasonlítása a HTLV-I proteináz specificitásával

4.1.1. A BLV PR önprocesszálása fúziós fehérjéből

A BLV proteinázt kódoló régiót pMal-c2 vektorba, az *E.coli malE* génje után klónoztuk. Két konstrukciót készítettünk, mindkettő 8 aminosavas N-terminálisan túlnyúló régiót tartalmazott. A pMAL-BLVPr klón csak a PR kódoló régiót tartalmazta, a pMAL-BLVPrpro klón pedig a teljes pro gént tartalmazta (4.1.1. ábra).

pMAL-BLVPr:

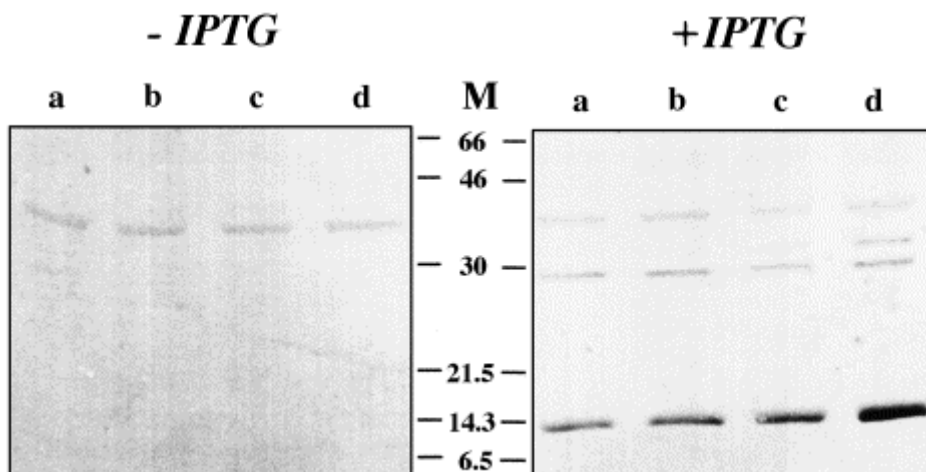
MBP	8 as	PR (126 as)
-----	------	-------------

pMAL-BLVPrpro:

MBP	8 as	PR (126 as)	26 as
-----	------	-------------	-------

4.1.1. ábra: A konstrukciókból expresszált fehérjék várható összetétele.

Az expresszió után poliklonális nyúl anti-BLV PR antitesttel, immunoblot kísérlettel végeztük el az expresszió ellenőrzését, azonban a várt 58-60 kDa méretű fehérjék megjelenése helyett 14 kDa méretű fehérjesávot kaptunk mindkét klónunk esetében (4.1.2. ábra).

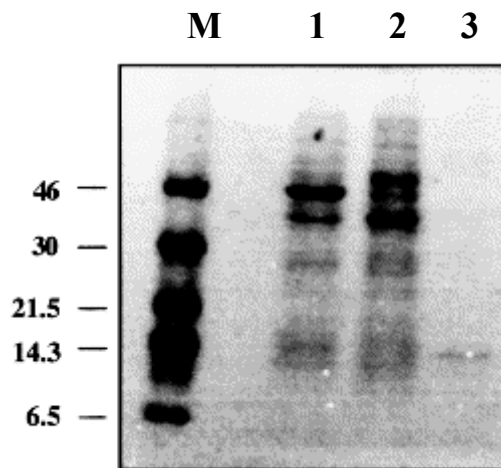


4.1.2. ábra. *E.coli*-ből preparált teljes sejt lizátum ellenőrzése immunoblottal (a, b: pMAL-BLVPr klónok; c, d: pMAL-BLVPrpro klónok)

A megjelenő sáv mérete jó egyezést mutatott a virionból tisztított PR méretével (Yoshinaka és mtsai., 1986). Eredményeink alapján egyértelmű, hogy az expresszió során a Prpro klónok esetében nem csak az N-terminális, hanem a C-terminális régió is processzálódik.

4.1.2. A BLV PR tisztítása

A BLV PR nagy része inklúziós testekbe került az expresszálas során, amiről SDS-PAGE gélelektroforézis és immunoblot kísérletekkel bizonyosodtunk meg. Az enzim tisztítása során kationcserét majd géliszűrést alkalmaztunk. A tisztítás végére sikerült tiszta enzimet nyernünk (4.1.3. ábra.).



4.1.3. ábra Teljes sejtlizátum összetétele IPTG indukció után (1), IPTG indukció nélkül (2), a tisztítás után (3). Az SDS-poliakrilamid gélt Coomassie-val festettük.

Az inklúziós testek 1 g-os nedves tömegéből körülbelül 2 mg tisztított proteináz volt nyerhető. A tisztított enzim végkoncentrációja 2 μ M-nak adódott. További koncentrálas illetve -20 °C-on történő hosszabb tárolás során részleges önprocesszálást tapasztaltunk, ami kettős sávként jelent meg az SDS-poliakrilamid gélen. Részleges önprocesszálást, a 116. és 117. aminosav között történő hasítást, korábban már mások is leírták (Pichova és mtsai., 1998).

4.1.3. A BLV PR kinetikai jellemzése

A BLV PR és a HTLV-I PR összehasonlító kinetikai jellemzéséhez a BLV és a HTLV-I PR természetes hasítási helyeit reprezentáló oligopeptideket használtunk. Egy BLV peptid kivételével, amelyet csak a BLV PR hasított, az összes többi tanulmányozott peptidet mindkét

enzim hasította, bár néhány esetben meglehetősen különböző specificitási állandóval (4.1.1. táblázat). Általánosan megállapíthatjuk, hogy a BLV PR esetében jelentősen kisebb k_{cat} értékeket kaptunk a HTLV-I PR-hoz képest, azonban az igen kis K_M értékek következtében a specificitási állandók nagyságrendileg hasonlóknak adódtak. A BLV PR esetében néhány szubsztrátnál a K_M igen kis értékének következtében a k_{cat}/K_M értékeket nem tudtuk közvetlenül a Michaelis-Menten görbéből kiszámolni. Ezeknél a peptideknél kompetíciós mérést alkalmaztunk (Fersht, 1985), ismert k_{cat}/K_M értékű szubsztrátok alkalmazásával. A módszert már korábban is alkalmaztuk HIV PR kis K_M értékkel bíró szubsztrátjainál, és eredményeink alapján a két módszerrel azonos értékek nyerhetők (Tózsér és mtsai., 1992).

4.1.1. táblázat. Természetes hasítási helyeket reprezentáló peptidek BLV és HTLV-I proteinázzal mért kinetikai állandói

Hasítási hely	Szubsztrát szekvencia	Proteáz	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($mM^{-1}s^{-1}$)
BLV MA/CA	PPAIL↓PIISE	BLV PR	< 0.01 ^a	0.04 ± 0.01	217 ^b
		HTLV-I PR	0.020 ± 0.006	3.29 ± 0.15	164.5
BLV CA/NC	KQPAIL↓VHTPG	BLV PR	< 0.01 ^a	0.18 ± 0.02	63 ^b
		HTLV-I PR		nem hasadt	
BLV PR/pX	PPMVG↓VLDAP	BLV PR	0.023 ± 0.005	0.01 ± 0.001	0.4
		HTLV-I PR	0.014 ± 0.004	0.01 ± 0.001	0.7
HTLV-1 MA/CA	APQVL↓PVMHP	BLV PR	< 0.01 ^a	0.07 ± 0.01	186 ^b
		HTLV-I PR ^c	0.069 ± 0.020	5.88 ± 0.59	85.2
HTLV-1 CA/NC	KTKVL↓VVQPK	BLV PR	< 0.01 ^b	0.17 ± 0.03	29 ^b
		HTLV-I PR ^c	0.051 ± 0.005	7.68 ± 0.17	150.6
HTLV-1 PR/pX	KGPPVIL↓PIQAP	BLV PR	0.019 ± 0.004	0.02 ± 0.001	1.1
		HTLV-I PR ^c	0.041 ± 0.010	11.82 ± 0.890	288.3

a) K_M -et nem tudtuk közvetlenül a Michaelis-Menten görbéből kiszámolni

b) kompetíciós méréssel meghatározva a VSQLY↓PIVQ szubsztrát kinetikai adatainak felhasználásával ($K_M = 0.011$ mM, $k_{cat} = 0.43$ s^{-1} , $k_{cat}/K_M = 39$ $mM^{-1}s^{-1}$)

c) Louis és mtsai., 1999.

Számos, a HTLV-I proteinázzal már korábban letesztelt HIV-1 inhibitor (Louis és mtsai., 1999) kipróbáltunk, mint a BLV proteináz potencionális gátlószerét (4.1.2. táblázat). Ezek egyike sem gátolta BLV proteinázt, pedig a Compound-3 korábban a HTLV-I PR jó inhibitorának bizonyult. A Compound-3 egyébként gátolta az EIAV és MuLV proteinázokat is (Tózsér és mtsai., 1993, Menendez és mtsai., 1993). Az MPMV és AMV proteinázok inhibitora (7. számú a táblázatban) szintén nem gátolta a BLV proteinázt. A két sztatin alapú inhibitor

viszont, amelyeket a HTLV-I PR hasítási hely alapján terveztünk gátolta a BLV proteinázt, annak ellenére, hogy az egyik a HTLV-I ellen hatástalannak bizonyult.

4.1.2. táblázat. BLV, HTLV-I és HIV-1 PR gátlási állandói HIV-1 vagy más retrovirális PR specifikus illetve sztatín alapú HTLV-I szubsztrát analóg inhibitorokkal

N.	Inhibitor	Ki (μM)		
		BLV PR	HTLV-1	HIV-1 PR
1.	Compound 3	> 10	0.080 ^a	0.0004 ^b
2.	DMP 323	> 10	> 10 ^a	0.0003 ^c
3.	UK 88,947	> 10	> 10 ^a	0.012 ^c
4.	LP149	> 10	> 10 ^a	0.0017 ^d
5.	KH164	> 10	> 10 ^a	0.400 ^e
6.	Pepstatin	> 10	> 10 ^a	> 10 ^f
7.	Pro-Tyr-Val-PheSta-Ala-Met-Thr	> 10	> 10 ^a	12.5 ^g
8.	Ala-Pro-Gln-Val-Sta-Val-Met-His-Pro ^h	0.070	0.050 ^a	0.130 ^a
9.	Lys-Thr-Lys-Val-Sta-Val-Gln-Pro-Lys ^h	0.300	> 10 ^a	> 10 ^a

a) Louis és mtsai., 1999

b) Tózsér és mtsai., 1992. Compound-3: foszfinát, átmeneti állapot analóg vegyület

c) Lam és mtsai., 1994. DMP 323: ciklikus urea vegyület; UK88,947: hidroxietilén tartalmú vegyület

d) Wlodawer és mtsai., 1995. LP149: szatin tartalmú vegyület

e) Hui és mtsai., 1991. KH164: szatin tartalmú vegyület

f) Hui és mtsai., 1991. Pepsztatin: általános aszpartil PR inhibitor

g) Hruskova-Heidingsfeldova és mtsai., 1995

h) HTLV-I hasítási helyein alapuló, sztatín-tartalmú inhibitorok

4.2. A HTLV-I PR szubsztrátspecifitásának vizsgálata és a HIV-1 proteinázzal történő összehasonlítása

4.2.1 HTLV-I, a BLV és a HIV-1 proteinázok összehasonlító vizsgálata a HIV-1 MA/CA természetes hasítási helyének szekvenciáján alapuló oligopeptidekkel

A HTLV-I PR szubsztrátspecifitását olyan oligopeptidek hasíthatóságával vizsgáltuk, melyek az egyik HIV-1 PR hasítási hely (MA/CA) szekvenciájában aminosavcseréket tartalmaztak.

Az eredeti szekvenciát (H-Val-Ser-Gln-Asn-Tyr↓Pro-Ile-Val-Gln-NH₂) tartalmazó peptid nem volt szubsztrátja a HTLV-I proteináznak csakúgy, mint a BLV proteináznak, jó szubsztrátja volt ellenben a HIV-1 proteináznak (Copeland és mtsai., 1988).

A P1 és P1' helyeken szubsztituált (P1 helyen Tyr helyett Phe, Ala, Met, Gly, Lys, Val, Pro, Ser, Trp, Cys; P1' helyen Pro helyett Val, Leu, Ile, Cys, Ser, Trp, Tyr) nonapeptidek a HTLV-I PR által nem voltak hidrolizálhatók, hasonlóan a BLV PR-hoz. A HIV-1 proteináz esetén is a P1' Pro esszenciálisnak tűnik ebben a nonapeptidben, mivel bármely más aminosavra cserélve megszűnik a hasíthatóság. A P1 Tyr lecserélése Phe-ra jobb szubsztrátot eredményez, míg más aminosavra cserélve kisebb specificitási állandójú szubsztrátot kaptak (Tózsér és mtsai., 1992).

A P2 helyen található Asn cseréje hidrofób aminosavakra hasítható szubsztrátot eredményezett, amely szintén hasonló a BLV-PR-al kapott eredményekhez. Ezek a szubsztrátok azonban még mindig jóval nehezebben hasíthatók a HTLV CA/NC természetes hasítási hely szekvenciáját tartalmazó oligopeptidhez képest (4.2.1. táblázat). Ezzel szemben a HIV-1 PR számára az eredeti Asn valamint a Cys és Ala jelenléte ad jó szubsztrátot és kisebb relatív aktivitás mérhető a többi aminosav esetében (Tózsér és mtsai., 1992). A P2' helyen szubsztituált (Ile helyett Leu, Ala, Pro, Trp) nonapeptidek nem voltak hasíthatóak a HTLV-I PR által, míg a BLV esetében Ile cseréje Leu-ra, Val-ra illetve Phe-ra hasítást eredményezett. HIV-1 PR esetében az Ile Val csere szignifikáns változást nem okozott, Leu esetében viszont az aktivitás jelentősen lecsökkent. Ezen eredmények az S2 és S2' alzsebek HTLV-I, BLV, HIV-1 irányú homológiájára engednek következtetni.

4.2.1. táblázat: HTLV-I, BLV és HIV-1 proteinázok specificitásának összehasonlítása a P2 helyen szubsztituált HIV-1 PR szubsztráttal

Relatív aktivitás			
P2 aminosav	HTLV PR ^a	BLV PR ^b	HIV PR ^c
Ala	0	0	0.53
Val	0.019	0.73	0.17
Ile	0.059	0.96	0.10
Leu	0.054	2.1	0.06
Phe	0	0	0.03
Gly	0	0	0.21
Thr	0	0	0.02
Asp	0	0	0.13
Asn ^d	0	0	1.00
Lys	0	0	0
Cys	0.011	0	0.92

a) A relatív aktivitást 0.4 mM szubsztrát koncentrációnál mértük és a HTLV CA/NC fehérjei közötti hasítási hely szekvenciáját tartalmazó peptidre (KTKVL↓VVQPK) vonatkoztattuk.

b) A relatív aktivitást 0.4 mM szubsztrát koncentrációnál mérték és a BLV MA/CA fehérjei közötti hasítási hely szekvenciáját tartalmazó peptidre (PPAIL↓PIISE) vonatkoztatták (Tózsér és mtsai., nem közölt eredmények).

c) A relatív aktivitások meghatározása 0.4 mM szubsztrát koncentrációnál történt és a HIV-1 MA/CA fehérjei közötti hasítási hely szekvenciáját tartalmazó peptidre (VSQNY↓PIVQ) vonatkoztattuk (Weber és mtsai., 1993).

d) A nem szubsztituált HIV-1 MA/CA fehérjei közötti hasítási hely szekvenciáját tartalmazó peptid.

A P3 és P3' helyeken szubsztituált (P3 helyen Gln helyett Leu, Phe, Lys, Asp, Gly, Asn, Val, Ala; P3' helyen Val helyett Leu, Phe, Lys, Gly, Ala, Ile, Ser, Thr) nonapeptidek szintén nem voltak szubsztrátjai a HTLV-I PR-nak, szemben a BLV PR-al, amely esetében a P3 helyen a Gln-t Val-ra, Leu-ra, Phe-ra cserélve hasítható peptidet kaptunk (Tózsér és mtsai., nem közölt eredmények). A HIV-1 proteinázban az S3, S3' helyekre többféle aminosav kötődhet a hidrolízis métekének lényeges megváltozása nélkül, tehát várhatóan a HTLV-I PR S3, S3' szubsztrátkötő helyei is széles specificitással rendelkeznek, azonban ezt ezzel a szubsztrátsorozattal nem tudtuk vizsgálni.

A P4 helyen szubsztituált származékok esetében a Ser-t Leu-ra, Val-ra, Ile-ra, Met-ra, Phe-ra, Thr-ra cserélve hasítható peptideket kaptunk (4.2.2. táblázat), azonban ezen szubsztrátok

csak igen kis specificitási állandóval rendelkeztek. BLV PR esetén nem sikerült hasítható szubsztrátot találnunk.

4.2.2. táblázat: HTLV-I, BLV és HIV-1 proteinázok specificitásának összehasonlítása a P4 helyen szubsztituált HIV-1 PR szubsztráttal

Relatív aktivitás			
P4 aminosav	HTLV PR ^a	BLV PR ^b	HIV PR ^c
Leu	<0.01	0	0.02
Val	<0.01	0	0.05
Ile	<0.01	0	0.03
Phe	<0.01	0	0.03
Gly	0	0	0.76
Met	<0.01	0	0.04
Lys	0	0	0.06
Arg	0	0	0.15

a) lásd 4.2.1. táblázat

b) lásd 4.2.1. táblázat

c) lásd 4.2.1. táblázat

4.2.2. A HTLV-I és a HIV-1 proteinázok összehasonlító vizsgálata a HTLV-I CA/NC természetes hasítási helyének szekvenciáján alapuló oligopeptidekkel

Mivel a 4.2.1. pontban bemutatott, már több retrovirális proteináz jellemzésére használt oligopeptid sorozat tagjainak többsége nem, vagy csak igen rossz szubsztrátja volt a HTLV-I PR-nak, a teljes szubsztrátspecificitás vizsgálatot nem tudtuk vele elvégezni. Ezért választottuk a HTLV-I PR egy saját természetes hasítási helyén alapuló oligopeptid sorozatot, amellyel a várakozásunknak megfelelően pontos kinetikai méréseket is tudtunk végezni (4.2.3. táblázat). Ezen oligopeptid-sorozatok tagjai a HIV-1 PR számára is jó szubsztrátoknak bizonyultak, amellyel a kinetikai állandók meghatározását szintén elvégeztük. Így alkalmunk adódott a HTLV-I és HIV-1 PR specificitásának ugyanazon szubsztrátokkal történő, közvetlen összehasonlítására.

4.2.3. táblázat: HTLV-I és HIV-1 proteinázok specificitásának összehasonlítása a HTLV-I CA/NC hasítási hely peptid rövidített és szubsztituált analógiáival

Szubsztrát szekvencia	HTLV-I PR			HIV-1 PR		
	K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (mM ⁻¹ ·s ⁻¹)	K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (mM ⁻¹ ·s ⁻¹)
KTKVL-↓-VVQPK	0.063	10.0	158.7	0.16	3.6	22.5
TKVL-↓-VVQPK	0.087	2.7	31.0	0.12	3.4	28.3
KVL-↓-VVQPK	ND	< 0.01	ND ^a	0.047	3.1	66.0
P4 szubsztituált peptid:						
K V KVL-↓-VVQPK	< 0.02	2.7	267.2 ^b	0.14	1.7	12.1
K L KVL-↓-VVQPK	< 0.02	2.5	209.5 ^b	0.23	1.8	7.8
K P KVL-↓-VVQPK	< 0.04	2.3	58.9 ^b	0.37	2.4	6.5
K G KVL-↓-VVQPK	0.069	6.8	98.6	0.68	0.55	0.8
K A KVL-↓-VVQPK	0.086	3.1	36.0	0.29	4.8	16.6
K S KVL-↓-VVQPK	0.23	9.2	40.0	0.059	2.7	45.8
K D KVL-↓-VVQPK	0.48	1.1	2.3	0.59	4.0	6.8
P3 szubsztituált peptid:						
KT G VL-↓-VVQPK	0.062	1.2	19.4	0.57	1.0	1.8
KT A VL-↓-VVQPK	< 0.03	2.4	114.0 ^c	0.18	2.74	15.2
KT F VL-↓-VVQPK	< 0.01	0.44	145.2 ^c	< 0.01	1.4	211.6 ^d
KT V VL-↓-VVQPK	< 0.01	0.48	107.7 ^c	< 0.01	1.8	26.9 ^d
KT L VL-↓-VVQPK	< 0.01	0.52	112.1 ^c	< 0.01	1.9	205.7 ^d
KT S VL-↓-VVQPK	0.053	2.1	38.9	0.051	1.9	37.3
KT D VL-↓-VVQPK	0.18	2.3	12.8	0.20	0.20	1.0
P2 szubsztituált peptid:						
KTK G L-↓-VVQPK	Nem hasadt ^e			ND	< 0.01	ND ^a
KTK A L-↓-VVQPK	ND	ND	0.4 ^f	0.40	0.83	2.1
KTK F L-↓-VVQPK	0.13	1.5	11.5	0.14	0.09	0.6
KTK L L-↓-VVQPK	0.028	3.3	117.9	ND	ND	0.1 ^f
KTK I L-↓-VVQPK	0.040	2.5	63.1	ND	ND	37.8 ^f
KTK N L-↓-VVQPK	Nem hasadt ^e			ND	ND	0.1 ^f
KTK D L-↓-VVQPK	Nem hasadt ^e			0.20	0.26	1.3
KTK K L-↓-VVQPK	Nem hasadt ^e			Nem hasadt ^e		
KTK S L-↓-VVQPK	Nem hasadt ^e			ND	< 0.01	ND ^a

P1 szubsztituált peptid:

KTKV G -↓-VVQPK	0.12	0.27	2.2	0.015	0.02	1.3
KTKV A -↓-VVQPK	0.19	5.7	30.0	0.016	0.02	1.3
KTKV F -↓-VVQPK	0.049	16.4	334.7	0.044	6.7	152.3
KTKV Y -↓-VVQPK	0.19	11.7	61.6	0.10	3.6	36.0
KTKV M -↓-VVQPK	0.15	4.1	27.3	0.091	4.0	44.0
KTKV S -↓-VVQPK	ND	< 0.01	ND ^a	ND	< 0.01	ND ^a
KTKV D -↓-VVQPK	Nem hasadt ^c			ND	< 0.01	ND ^a
KTKV K -↓-VVQPK	Nem hasadt ^c			Nem hasadt ^c		

P1' szubsztituált peptid:

KTKVL-↓- L VQPK	0.028	3.7	133.6	0.089	4.1	46.1
KTKVL-↓- I VQPK	0.12	1.5	12.5	0.084	2.2	62.2
KTKVL-↓- F VQPK	0.18	0.36	2.0	0.077	1.9	24.7
KTKVL-↓- G VQPK	Nem hasadt ^c			ND	< 0.01	ND ^a
KTKVL-↓- S VQPK	ND	< 0.01	ND ^a	0.013	0.03	2.3
KTKVL-↓- D VQPK	Nem hasadt ^c			ND	< 0.01	ND ^a
KTKVL-↓- K VQPK	Nem hasadt ^c			Nem hasadt ^c		
KTKVL-↓- P VQPK	ND	ND	1.1 ^g	ND	ND	0.04 ^f

a) Kismértékű hidrolízist tapasztaltunk 0.4 μM PR-al 37 °C-on 1 óra inkubálással.

b) A k_{cat}/K_M értéket kompetitív méréssel határoztuk meg a APQVL↓PVMHP szubsztráttal.

c) A k_{cat}/K_M értéket kompetitív méréssel határoztuk meg a KGVVPIL↓PIQAP szubsztráttal.

d) A k_{cat}/K_M értéket kompetitív méréssel határoztuk meg a VSQNY↓PIVQ szubsztráttal.

e) Nem tapasztaltunk hidrolízist 0.4 μM PR-al 37 °C-on 16 óra inkubálással.

f) A vizsgált koncentrációtartományban a [S] vs. v görbe lineárisnak adódott. Az egyenesből határoztuk meg a k_{cat}/K_M értékeket.

ND: nem határoztuk meg

Általánosan megállapíthatjuk, hogy ezen oligopeptidsorozat tagjainak nagy részét a HTLV-I PR nagyobb sebességgel hidrolizálta mint a HIV-1 PR, míg az emzim-szubsztrát komplex stabilitását jellemző K_M értékekre vonatkozóan nem volt tapasztalható hasonló tendencia.

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

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

A P4 helyen szubsztituált peptidekhez hasonlóan a P3 helyen szubsztituált származékok is mindkét enzim számára hasíthatónak bizonyultak, de míg a HTLV-I PR esetében az eredeti P3 Lys oldalláncú peptid bizonyult a legjobbnak, addig a HIV-1 esetében a P3 Phe és Leu származékok kiugróan jó szubsztrátoknak bizonyultak. Érdekes, hogy mindkét enzimmél a P3 Gly és P3 Asp származékok mutatkoztak a legrosszabb szubsztrátoknak.

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

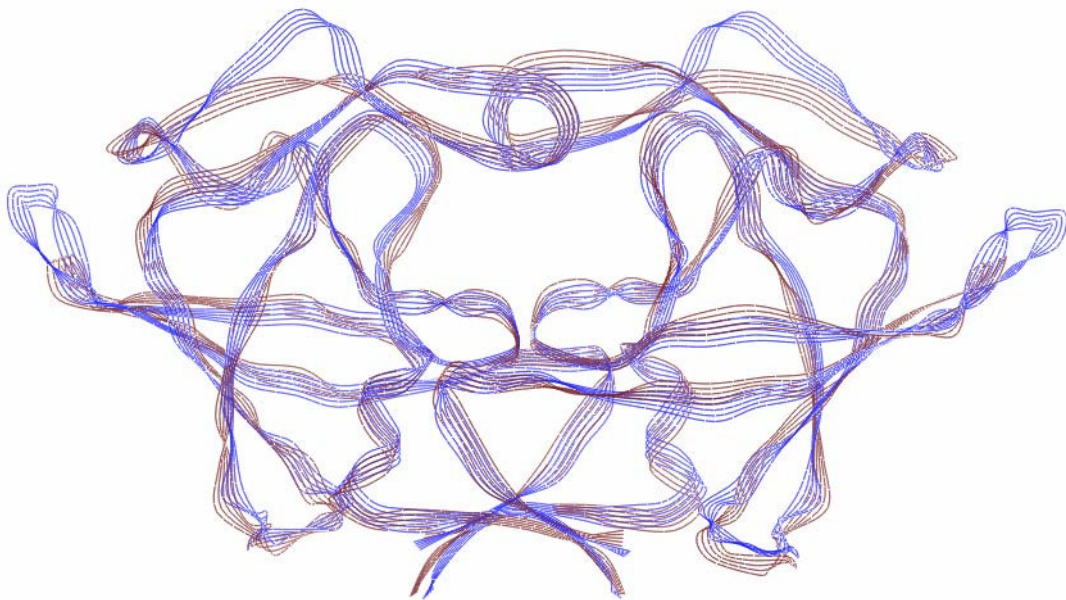
A P1 helyen szubsztituált származékok közül mindkét esetben a Phe csere bizonyult a legjobbnak, de a P1 Tyr és P1 Met tartalmú származék is mindkét enzim számára jó szubsztrátnak bizonyult. A két enzim közötti specificitáskülönbség a legmarkánsabban a P1 Ala szubsztituált peptid esetében jelentkezett,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

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

4.2.3. A HTLV-I és a HIV-1 proteinázok térszerkezetének összehasonlítása

Az 4.2.2. ábra a retrovirális proteinázok aminosavszekvenciáját mutatja: a szekvenciák illesztésénél figyelembe vettük a proteinázok háromdimenziós szerkezetét is, a HIV-1, HIV-2, SIV, EIAV, FIV, RSV proteinázoknál a kristályszerkezetből indultunk ki. Az RSV és HTLV-I PR között 20% azonosságot és 53% hasonlóságot találtunk. Az ábrán az 1.2.2. pontban bemutatott jellegzetes régiók keretbe foglalva találhatók.

A HTLV-I, RSV és a HIV-1 PR aminosavszekvenciája és hossza eltér (HIV-1 PR: 99 aminosav, HTLV-I PR: 125 aminosav, RSV PR: 124 aminosav). A HIV-1 és RSV PR kristályszerkezetének és aminosav szekvenciájának együttes vizsgálata azt mutatja, hogy a háromdimenziós struktúrájuk nagyfokú homológiát mutat, ezért várhatóan a HTLV-I PR számára általunk felépített modell is jól írja le az enzim térszerkezetét (4.2.1. ábra). Az RSV és HTLV-I PR-ok HIV-1 PR szekvenciájához képest többlet aminosavai általában extra hurkok formájában mutatkoznak, amelyek jórészt a molekula felszínén helyezkednek el. Annak eldöntése, hogy az extra hurkok, illetve egyéb addicionális aminosavak mennyiben befolyásolják az enzim működését vagy stabilitását, esetleg szubsztrátspecifitását is, további kutatásokat igényel.



4.2.1. ábra: A HTLV-I (barna) és az RSV (kék) proteinázok térbelileg egymásra helyezett számítógépes molekuláris modellje.

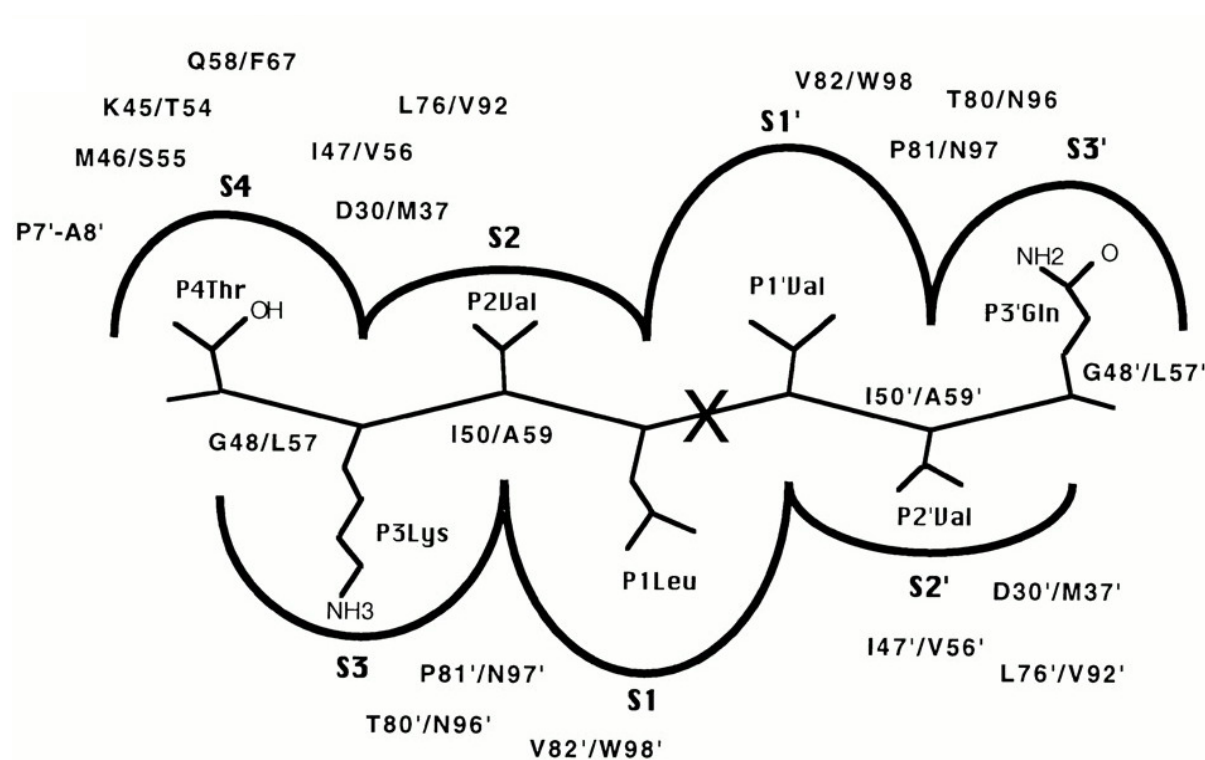
	1	10	20	30	40	50			
HIV1	PQITL	W..QRPLVTIRIG.....	GQLKEA	LLDTGA	DDTVLEE..M..N.....	LPGKWK..PKM	IGGIGG	FIKVRQY
HIV2	PQFSL	W..KRPVVTAHIE.....	GQPVEV	LLDTGA	DDSI VAG..I..E.....	LGNNYS..PKI	VGGIGG	FINTKEY
SIV	PQFSL	W..RRPVVTAHIE.....	GQPVEV	LLDTGA	DDSI VTG..I..E.....	LGPHYT..PKI	VGGIGG	FINTKEY
EIAV	VTYNL	E..KRPTTIVLIN.....	DTPLNV	LLDTGA	DTSVLT TAHYNRL...	KYRGRKYQ..GTG	IGGVGG	NVETFST
FIV	..YNKVG	TTTTL	E..KRPEILIFVN.....	GYPIKF	LLDTGA	DITILNRRDFQ.V...	KN.SIENG..RQN	MIGVGG	GKRGTTY
RSV	LAMTM	EHKDRPLVRVILTNTGSH	PVKQRSVYITA	LLDSGA	DITI ISEEDWP.....	TDWPVMEANPQ	IHGIGG	GIPMRKS
MMLV	TLDDQGG	QGQDP	P..PEPRITLKV.....	GQPVTF	LVDTGA	QHSVLTQ..N..P...	GPLSDKS..AWV	QGATGG	KRYRWT
MMTV	WVQEI	.SDSRPMLHISL.....	NGRRFLG	LLDTGA	DKTCIAGRDP.....	ANWPIHQT.ESS	LQGLVG	MACGVAR
MPMV	WVQPI	.TCQKPSLTLWL.....	DDKMEFG	LIDTGA	DVTI IKLEDWP.....	PNWPITDT.LTN	LRGIGQ	SNNPKQ.
BLV	LSIPL	.ARSRPSVAVYL...SGP	WLPQSQNALM	LVDTGA	ENTVLP.....	QNWLVRDYPRI..PAA	VLGAGG	VSRNRYN
HTLV2	PLIPL	RQQQQPILGVRI.....	SVMGQTPQPTQA	LLDTGA	DLTVIP.....	QTLVPGPVKLH..DTL	ILGASG	QTNTQFK
HTLV1	PVIPL	DPARRPVIKAQV.....	DTQTSHPKTIEA	LLDTGA	DMTVLP.....	IALFSSNTPLK..NTS	VLGAGG	QTQDHF
		1	10	20	30	40	50	60	

	60	70	80	90	100	110	120
HIV1	..DQIPVEICG.....	HKAIGTVLVG...	PTPVNI IGRNLLTQIG	CTLNF		
HIV2	..KNVEIEVLN.....	KKVRATIMTG...	DTPINIFGRNILTALG	MSLNL		
SIV	..KNVEIEVLG.....	KRIKGTIMTG...	DTPINIFGRNILTALG	MSLNL		
EIAV	..P.VTIKKKG.....	RHIKTRMLVA...	DIPVTILGRDILQDLG	AKLVL		
FIV	..INVHLEIRDENYKT.	QCIFGNVCVLEDNSLI	QPLLGRDNMIKFN	IRLVM	AQ.....		
RSV	..RDMIELGVINRDGSL	ERPLLLFPAVA...	MVRGSILGRDCLQGLG	LRLTN	L.....		
MMLV	..DRKVHLATG.....	KVTHSFLHVP...	DCPYLLGRDLLTKLK	AQIHF	E.....		
MMTV	..SSQPLRWQHED...	KSGIIHPFVI...	PTLPFTLWGRDIMKEIL	VRIMT	DSPDDSQDL.		
MPMV	..SSKYLTWRDKE...	NNSGLIKPFVI...	PNLPVNLWGRDLLSQMK	IMMCS		
BLV	..WLQGPLTLALKPE..	GPFITIPKILV.DTF	DKWQILGRDVL SRLQ	ASISI	PEEVRPPMVG		
HTLV2	..LLQTPLHIFLPFRR.	SPVILSSCLL..DTH	NKWTIIGRDALQQCQ	GLLYL	PDDPSPHQLL		
HTLV1	..LTSPLVILRLPFRT.	TPIVLTSLV..DTK	NNWAIIGRDALQQCQ	GVLYL	PEAKGPPVIL		
	70	80	90	100	110	120	

4.2.2. ábra: A retrovirális proteinázok szekvencia összehasonlítása
(sárga háttérrel, keretben: a retrovirális proteinázok jellegzetes régiói; piros: katalitikus aszpartát; kék: egyéb konzervatív aminosavak)

A szubsztrát peptid β -konformációban kötődik a PR-okhoz (4.2.3. ábra). A peptidkötő régió eléggé kiterjedt, a modell alapján a HTLV-I PR esetében is legalább hét szubsztrátkötő zseb különíthető el a kapcsolódó peptid oldalláncai számára. Ezek a zsebek az enzim homodimer jellegéből következően többnyire szimmetrikusak a hasítási helytől N- illetve C-terminális irányba, ám a peptidkötés aszimmetriája, az aszimmetrikusan kialakuló hidrogénhidak arra utalnak, hogy ez a szimmetria torzul. Ezt támasztották alá vizsgálati eredményeink is, amelyeket molekuláris modellezés segítségével értelmeztünk.

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

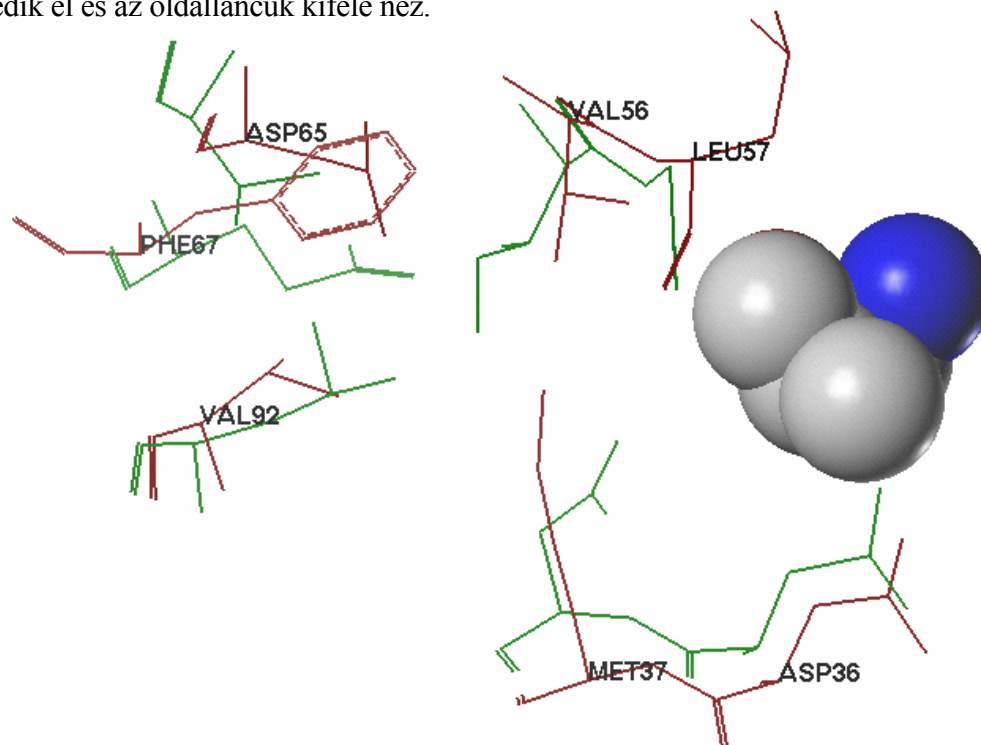


4.2.3. ábra: Az enzim-szubsztrát kötődés sematikus rajza

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

4.2.4. A HTLV-I és a HIV-1 proteínázok S4 kötőhelyének jellemzése

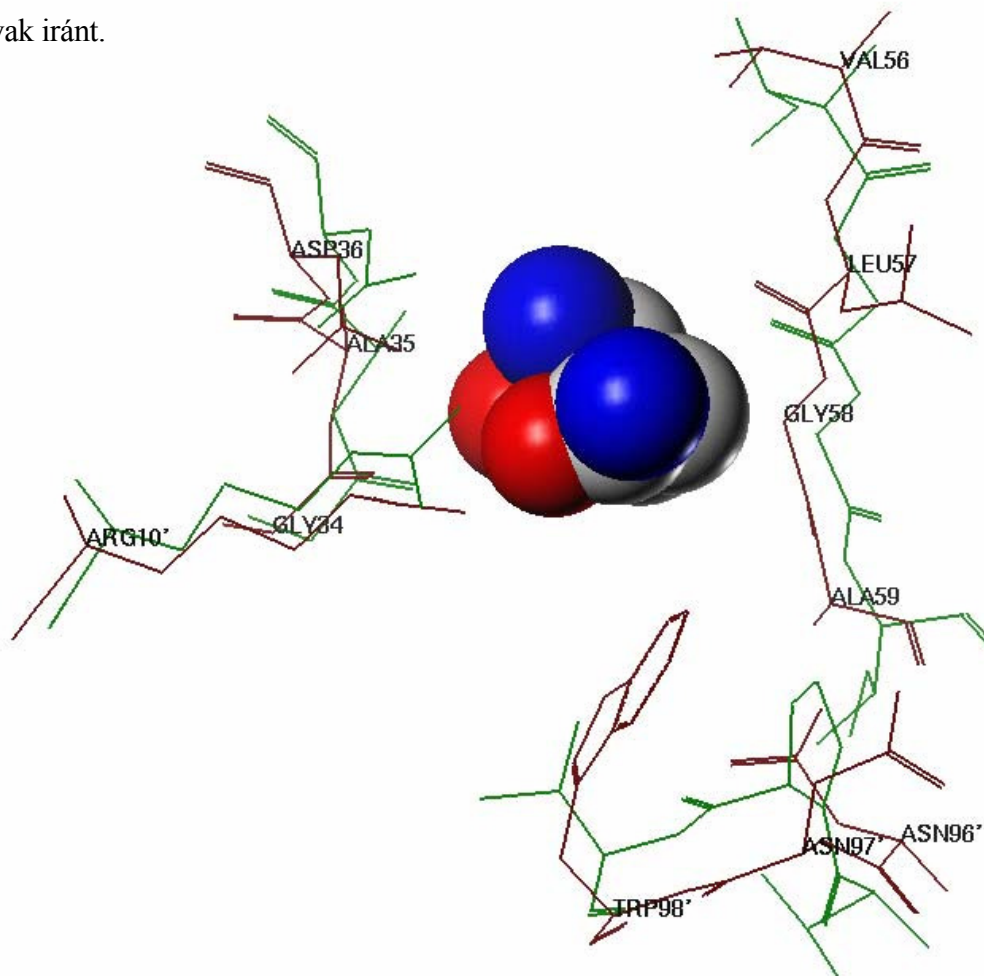
Az S4 alzseb minden retrovirális proteínáz esetében a PR molekula felszínéhez közel helyezkedik el, így a P4 aminosav az oldószerrel is kölcsönhathat. Ebből adódóan a P4 helyen várhatóan poláros aminosavak eredményeznek jó kötődést. A HIV-1 PR esetében valóban azt tapasztalták, hogy a HIV-1 poliproteinek természetes hasítási helyein a P4 pozícióban, általában poláros aminosavak fordulnak elő, valamint a HIV-1 MA/CA szubsztrát származékai közül is az eredeti Ser-t, illetve kismértékű hidrofíli oldalláncokat tartalmazó peptidek voltak a legjobb szubsztrátok (Tózsér és mtsai., 1991a). Ezzel szemben az a megfigyelés, hogy az eredeti HIV-1 peptid nem, míg a P4 helyen hidrofób aminosavakat tartalmazó származékai hasíthatóak voltak a HTLV-I PR-al ezen enzim S4 zsebének hidrofóbabb jellegére utal. A HTLV-I CA/NC peptid P4 helyen szubsztituált származékai közül a valint, leucint, izoleucint, prolint, fenilalanint valamint az eredeti treonint tartalmazó peptidek bizonyultak a legjobbaknak, ami alátámasztja ezt a feltételezést. A modell ábráján látszik, hogy a P4 Val kölcsönhathat a Val56, Met37, Val92 hidrofób oldalláncjaival (4.2.4. ábra). A Met37 helyett a HIV-1 PR-ban Asp található, amely jól magyarázza a HIV-1 PR S4 zsebének hidrofilebb jellegét. Az Asp36 és Asp65 várhatóan nem játszik lényeges szerepet a specificitás meghatározásában, mivel mindkettő a zseb szélén helyezkedik el és az oldalláncuk kifelé néz.



4.2.4. ábra: A HTLV-I és a HIV-1 proteínáz S4 szubsztrátkötő zsebét alkotó aminosavak (barna: a HTLV-I PR; zöld: a HIV-1 PR; a szubsztrát P4 Val oldalláncot térkitöltő modellel ábráztuk). A feliratok a HTLV-I PR oldalláncainak elnevezését mutatják, amelyek HTLV-I/HIV-1 PR sorrendben az alábbiak: L57/G48, V56/I47, D65/V56, F67/Q59, V92/L76, M37/D30, D36/D30.

4.2.5. A HTLV-I és a HIV-1 proteinázok S3 kötőhelyének jellemzése

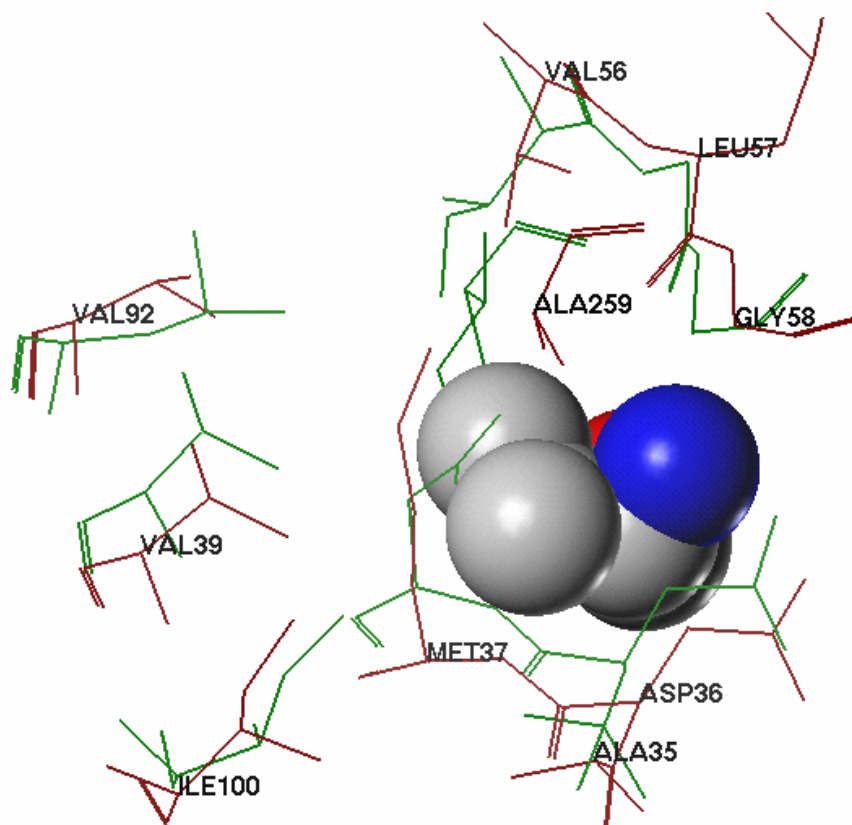
A HIV-1, HIV-2, EIAV, BLV, AMV PR-ok vizsgálata során azt tapasztalták, hogy különböző aminosavak kötődése ezen helyekre nem vezetett a hasíthatóság elvesztéséhez (Tózsér és mtsai., 1992, 1993, 1996; Weber és mtsai., 1993). Ezt az általános érvényű tendenciát alátámasztják jelenlegi vizsgálataink is (4.2.3. táblázat). Az S3 kötőhelyek általában nyitottak, viszonylag nagy méretűek és szintén a felszín közelében helyezkednek el (4.2.5. ábra). Ez viszonylag szabad mozgást enged a P3 aminosav oldalláncok számára, mely így kölcsönhatásba kerülhet mind az enzim felszínén lévő poláros, mind az alzseb mélyén található hidrofób oldalláncokkal (Cameron és mtsai., 1993). A modell ábráján jól látszik, hogy a zsebet felépítő aminosavak többsége azonos a két proteinázban. A legjelentősebb különbség a HIV-1 "flap" régiójában található Gly helyett Leu57 megjelenése a zsebben, amely csökkenti a zseb kiterjedését és magyarázatul szolgálhat a HTLV kisebb affinitására a nagyobb méretű hidrofób aminosavak iránt.



4.2.5. ábra: A HTLV-I és a HIV-1 proteináz S3 szubsztrátkötő zsebet alkotó aminosavak (barna: a HTLV-I PR; zöld: a HIV-1 PR; a szubsztrát P3 Gln oldalláncot térkitöltő modellel ábráztuk). A feliratok a HTLV-I PR oldalláncainak elnevezését mutatják, amelyek HTLV-I/HIV-1 PR sorrendben az alábbiak: D36/D30, A35/A29, G34/G28, R10'/R8', W98'/V82', N97'/P81', N96'/T80', A59/I50, G58/G49, L57/G48, V56/I47.

4.2.6. A HTLV-I és a HIV-1 proteinázok S2 kötőhelyének jellemzése

Az S2 alzsebek térbelileg mindkét PR-ban elég szűkek. A HIV-1 MA/CA természetes hasítási hely szekvenciáján alapuló sorozattal kapott eredmények alapján a HTLV-I PR S2 szubsztrátkötő helye a HIV-1 S2 zsebéhez képest hidrofóbabb és nagyobb méretű. Ezzel magyarázható, hogy míg a HIV-1 PR esetében kisméretű, hidrofób jellegű oldalláncok bizonyultak kedvezőnek (Tózsér és mtsai., 1992), addig a HTLV-I PR esetében csak közepes méretű hidrofób aminosavakat (Val, Leu, Ile) tartalmazó peptidok voltak hasíthatók (4.2.3. táblázat). Ugyanezen aminosavak bizonyultak optimálisnak a HTLV-I PR számára a HTLV-I CA/NC peptid P2 helyén is, míg a HIV-1 esetében a P2 Leu már túl nagy bizonyult. Ugyanakkor a Phe oldallánc ezen a helyen már mindkét enzim számára kedvezőtlenül nagyméretű (4.2.3. táblázat). A kinetikai eredményeket a modell is alátámasztotta, miszerint az Ile47-Val56 és az Ile50'-Ala59' csere is a zseb növekedéséhez vezet. Az Ala35 változatlan maradt, az Asp36 pedig kifelé néz, így ezek az aminosavak várhatóan nem járulnak hozzá a zseb szubsztrátspecifitáshoz (4.2.6. ábra).

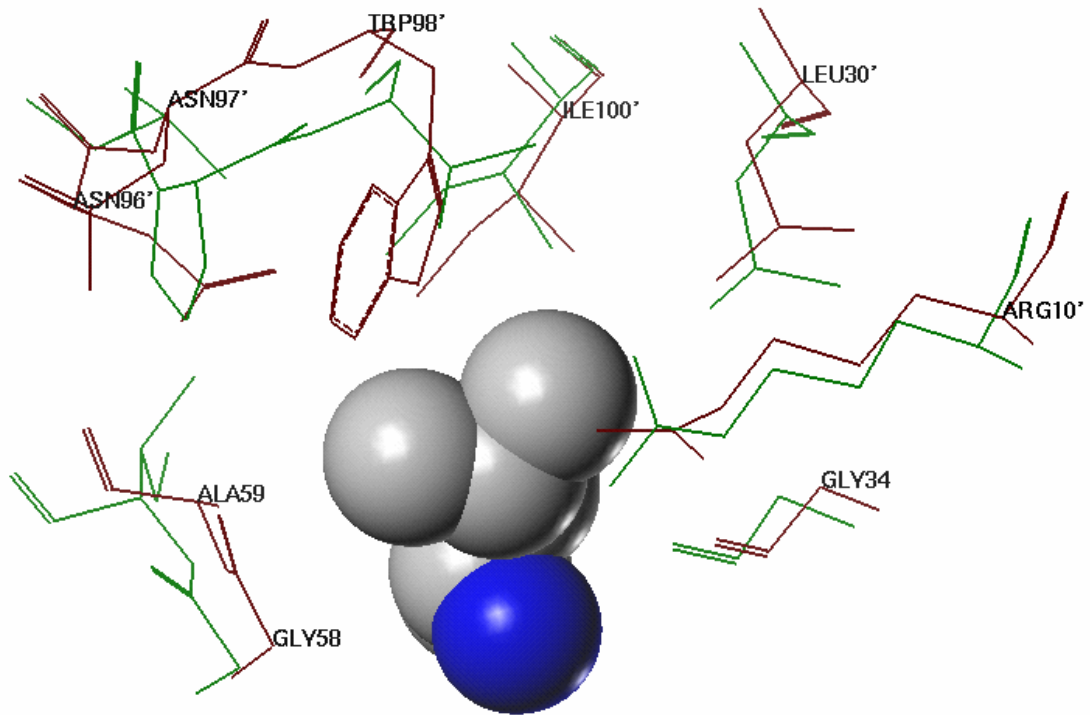


4.2.6. ábra: A HTLV-I és a HIV-1 proteináz S2 szubsztrátkötő zsebét alkotó aminosavak (barna: a HTLV-I PR; zöld: a HIV-1 PR; a szubsztrát P3 Val oldalláncot térkitöltő modellel ábrázoltuk). A feliratok a HTLV-I PR oldalláncainak elnevezését mutatják, amelyek HTLV-I/HIV-1 PR sorrendben az alábbiak: G58/G49, L57/G48, V56/I47, A59'/I50', V92/V75, V39/V32 I100/I84, M37/D30, D36/D30, A35/A29.

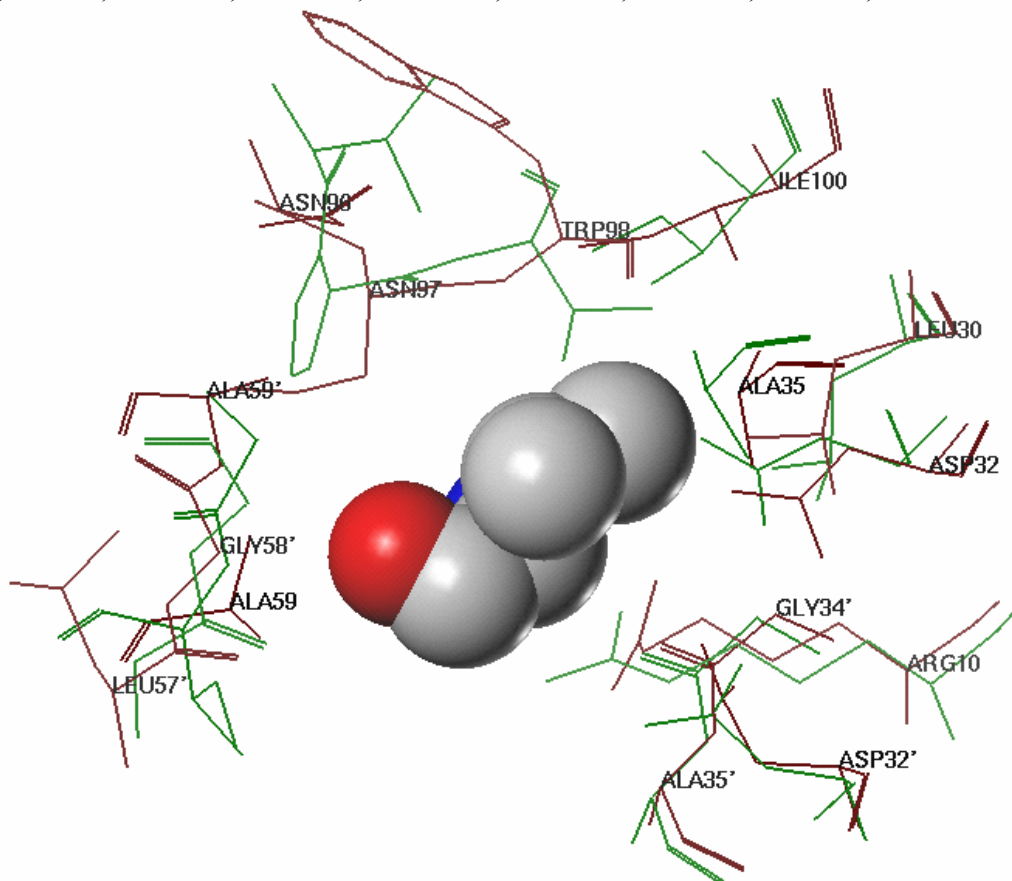
4.2.7. A HTLV-I és a HIV-1 proteínázok S1 és S1' kötőhelyének jellemzése

Korábbi vizsgálatok azt mutatták, hogy ezen alzsebek az S3 zsebekhez hasonlóan konzervatívnak tekinthetők. Viszonylag nagyok és mélyek, az enzim belsejében helyezkednek el és főként hidrofób aminosav oldalláncok befogadásának kedveznek. Az enzim működése szempontjából létfontosságú katalitikus aszpartil oldalláncok is itt találhatóak. Ezen aminosavak mellett a két enzimben változatlanul maradt a HTLV-I Gly34, Arg10, Ala59, Gly58, Leu30 oldalláncainak megfelelő aminosavak, amelyek szintén az alzsebek konzervativitása mellett szólnak. Kutatási eredményeink szerint a P1 Phe csere a HTLV-I CA/NC peptid esetében is jobb szubsztrátot eredményezett, mint a Tyr csere, hasonlóan ahhoz, amit a HIV-1 PR-zal a MA/CA szubsztrátsorozat tagjainál kaptak. Viszont a P1 Met illetve a P1 Ala csere sokkal kisebb mértékű csökkenést idézett elő a specificitási állandóban a HTLV-I PR esetében, mint a HIV-1 PR-nál. Ezen eredmények a HTLV-I PR S1 zsebének flexibilisebb voltára utalnak. A modellünk is ezt támasztja alá: a 4.2.7. ábra tetején látható Pro egy flexibilisebb Asn-ra cserélődött ki, a másik csere során pedig Trp került a régióba, amely az α és β szénatomok közötti tengelyen szabadon elfordulhat, mivel ez az aminosav az enzim felszínén helyezkedik el. A Trp98 flexibilitására utal az is, hogy az általunk használt HTLV-I PR modellben a Trp98 az S1 zsebben befelé, még az S1' zsebben inkább kifelé fordul.

Az S1' zseb az S1 zsebhez képest általánosan kisebb mérettel rendelkezik, ami a retrovirális proteínázok természetes hasítási helyeinek szekvenciájában is tükröződik. Kinetikai eredményeink azt mutatták, hogy ezen alzseb a HIV-1 PR esetében tekinthető flexibilisebbnek. Feltételezésünk szerint, ebben az esetben éppen ez a méretcsökkenés idézheti elő a Trp gátolt rotációját. A zsebet a HIV-1 PR esetében döntően hidrofób aminosav alkotják, a HTLV PR-ban már megjelenik két Asn, de az eredményeink alapján úgy tűnik, hogy ez nem elegendő ahhoz, hogy a hidrofób kölcsönhatásoknál jóval specifikusabb hidrofil kölcsönhatások jöhessenek létre (4.2.8. ábra).



4.2.7. ábra: A HTLV-I és a HIV-1 proteináz S1 szubsztrátkötő zsebét alkotó aminosavak (barna: a HTLV-I PR; zöld: a HIV-1 PR; a szubsztrát P1 Leu oldalláncot térkitöltő modellel ábrázoltuk). A feliratok a HTLV-I PR oldalláncainak elnevezését mutatják, amelyek HTLV-I/HIV-1 PR sorrendben az alábbiak: G58/G49, A59/I50, N96'/T80', N97'/P81', W98'/V82', I100'/I84', L30'/L23', R10'/R8', G34/G27.



4.2.8. ábra: A HTLV-I és a HIV-1 proteináz S1' szubsztrátkötő zsebét alkotó aminosavak (barna: a HTLV-I PR; zöld: a HIV-1 PR; a szubsztrát P1' Val oldalláncot térkitöltő modellel ábrázoltuk). A feliratok a HTLV-I PR oldalláncainak elnevezését mutatják, amelyek HTLV-I/HIV-1 PR sorrendben az alábbiak: L57'/G48', A59/I50, G58/G49, A59'/I50', N97'/P81, N96'/T80, W98'/V82, I100'/I84, A35'/A29, L30'/L23, D32'/D25, G34'/G27', R10'/R8, D32'/D25', A35'/A28'.

4.3. Kaszpáz hasítási helyek foszforilációjának hatása a szubsztrátok kaszpáz enzimekkel történő hasíthatóságára

4.3.1. Preszenilin-2 (PS-2) hasítási helyet reprezentáló oligopeptid foszforilációjának hatása kaszpáz-3, -7, -8 enzimekkel történő hasíthatóságra

A két homológ preszenilin gén (PS-1 és PS-2) mutációi gyakori okai a familiáris Alzheimer betegség (FAD) korai kialakulásának (Scheuner és mtsai., 1996). A PS proteinek olyan membránfehérjék, amelyek nagy citoplazmatikus hurkában történő endoproteolitikus hasítás következtében biológiailag aktív C-terminális és N-terminális fragmentekre hasadnak (Grünberg és mtsai., 1998). Bár a kaszpáz hasítási hely P1' és P3 Ser aminosavainak foszforilációját bizonyították, az irodalomban nincs közvetlen bizonyíték a meghatározott individuális helyzetű foszforiláció és a hasíthatóság összefüggésére (Walter és mtsai., 1999).

Vizsgálataink alapján a nem foszforilált peptid megfelelően hasadt kaszpáz-3 és -7 enzimekkel (4.3.1. táblázat), egyik enzim sem hasította viszont két helyen a szubsztrátot. Ennek oka valószínűleg az volt, hogy a peptid N-terminális irányából 2. helyen található aszpartát előtti peptidszakasz nem elegendő hosszú a hasítás számára, valamint ezen hasítási hely katalitikus rátája lényegesen alacsonyabb a másikénál (Kim és mtsai., 1997). Kiemelendőnek tartjuk, hogy erre a peptidre lényegesen nagyobb K_M értéket mértünk, mint a PARP analógra.

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

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

Megjegyzendő még, hogy a módosítatlan PS-2 szubsztrát esetében a kaszpáz-3-ra kapott specificitási állandó jelentősen nagyobbak adódott, mint amit a kaszpáz-7-re kaptunk, ami részben magyarázható azzal, hogy a kaszpáz-3 jobban tolerálja a P2 Tyr oldalláncot (Talanian és mtsai., 1997), részben pedig azzal, hogy a kaszpáz-3 kis szintetikus szubsztrátokon

sokkal aktívabb mint a kaszpáz-7 (Stennicke és mtsai., 2000). Mindenesetre ezek az eredmények is arra utalnak, hogy valószínűleg a kaszpáz-3 lehet az az enzim, amelyik hasítja a PS-2 fehérjét *in vivo* (Kim és mtsai, 1997).

4.3.1. táblázat. Kaszpáz-3, -7, -8 enzimek PS-2 szubsztrát-analógokkal mért kinetikai állandói

N ^o	peptid szekvencia	k _{cat} /K _m (mM ⁻¹ s ⁻¹)		
		kaspáz-3	kaspáz-7	kaspáz-8
1.	E D S Y D ↓ S F G E P	0.41 ± 0.02 ^a	0.06 ± 0.01 ^a	nem hasadt ^c
1b.	E L S Y D ↓ S F G E P	nem vizsgált	nem vizsgált	0.003 ± 0.0006 ^a
2.	E D S ^P Y D ↓ S F G E P	0.41 ± 0.03 ^b	0.06 ± 0.01 ^b	nem hasadt ^c
2b.	E L S ^P Y D ↓ S F G E P	nem vizsgált	nem vizsgált	0.002 ± 0.0001
3.	E D S Y D ↓ S ^P F G E P		nem hasadt ^c	
3b.	E D S Y D ↓ S ^P F G E P		nem hasadt ^c	

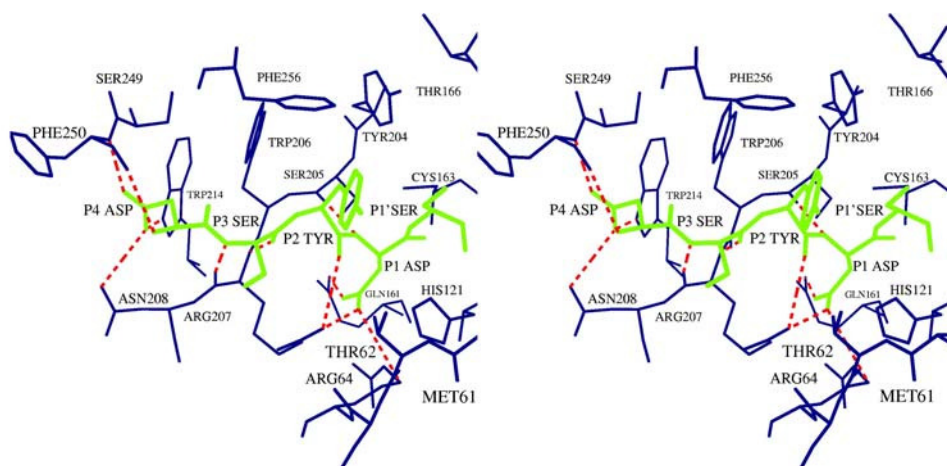
a) A tanulmányozott koncentrációtartományban a [S] vs. v görbe lineárisnak adódott és ezt használtuk fel a k_{cat}/K_M érték meghatározásához.

b) A szubsztrát (0.2mM) 16 óra inkubálás után sem hasadt 50 nM kaszpáz-3, 1 μM kaszpáz-7 és 10 μM kaszpáz-8 enzimkoncentrációnál.

c) A 0-0.2 mM koncentrációtartományban a [S] vs. v görbe görbe lineárisnak adódott és ezt használtuk fel a k_{cat}/K_M érték meghatározásához. Magasabb szubsztrát koncentrációnál gátló hatást tapasztaltunk.

Eredményeink értelmezéséhez felépítettük a kaszpáz-3 PS-2 szubsztrát komplex modelljét egy enzim-inhibitor kristályszerkezetből kiindulva (4.3.1. ábra). Az ábrán látható, hogy a szubsztrát P4 Asp és P1 Asp oldalláncai a szubsztrát lánc és az emzim közötti konzervált H-híd hálózaton kívül számos H-kötéssel vannak az enzimhez kihorgonyozva. A P3 és P2 oldalláncok kifelé állnak, amely magyarázza az S2 és S3 alzsebek toleráns jellegét, bár kaszpázok P3 Glu és P2 Val, Leu, Pro és Thr preferenciáját már leírták (Nicholson, 1999; Stennicke és mtsai., 2000). A fehérje adatbázisban (PDB) nem található P1' szubsztrát/inhibitor-oldalláncot tartalmazó kaszpáz kristályszerkezet, ezért a P1' oldalláncot konformáció-kereséssel modelleztük be a szerkezetbe. A P1' oldallánc valószínűleg a szerin és aszpartil proteinázokhoz hasonlóan β-redőszerű konformációt vesz fel, de ennek az oldalláncnak a flexibilitása alapvető a hatékony katalízis szempontjából. P1' helyzetben Ser és Gly oldalláncokról mutatták ki, hogy kedvezőek a kaszpázok számára (Stennicke és mtsai., 2000). A nagyméretű P1' oldalláncok kevésbé hatékony hidrolízisét valószínűleg sztérikus gát okozza, amiért a Thr 166 és Tyr 204 enzimoldalláncok, valamint az általában hidrofób szubsztrát P2 oldallánc lehet a felelős. Negatív töltésű aminosavak szintén kedvezőtlennek bizonyultak ebben a helyzetben, amit kaszpáz-3 és -7 esetében a Glu123, kaszpáz-8 enzimmél pedig az ekvivalens pozíciójú Asp okozhat. A P1' Ser

foszforilációja megnöveli az oldalláncnak mind a negatív töltését, mind a méretét, ami végső soron a peptid hasíthatóságának elvesztésével jár.



4.3.1. ábra. Kaszpáz-3 PS-2 enzim-szubstrát komplex modellje (sztereo ábra)

4.3.2. A P4 Ser foszforilációjának hatása kaszpáz-3, -7, -8 enzimekkel történő hasíthatóságra

Vizsgálatainkhoz a Gas-2, bizonyítottan kaszpáz-3 szubsztrát fehérje hasítási hely szekvenciáján alapuló oligopeptideket használtunk. Bár a kaszpáz-3 konszenzus szekvenciája Asp-X-Y-Asp, a Gas-2 szerint tartalmaz P4 helyen, ami potenciónalisán foszforilálható.

A foszforilálatlan peptid a kaszpáz-3 és -7 enzimek jó szubsztrátjának bizonyult, a P4 foszforiláció azonban jelentősen csökkentette mindkét enzim esetében a specificitási állandót, jelezve ezzel, hogy az aszpartáttal ellentétben a szintén töltött foszfo-Ser rendkívül kedvezőtlen, a töltetlen szerin oldalláncnál is kedvezőtlenebb ebben a pozícióban. A P4 oldallánc Asp-ra történő cseréje viszont megnövelte a hasíthatóságot az eredeti, a természetes hasítási helyet mimikáló peptidhez képest. A specificitási állandó értékei a kaszpáz-3 és -7 enzimeknél hasonló tendencia szerint változtak, de ez a tendencia kifejezettebb volt a kaszpáz-3 esetében. A kaszpáz-8 egyik peptidet sem hasította.

Az enzim-inhibitor kristályszerkezet alapján a P4 Asp erős H-kötéseket képezhet a Trp214, Phe250, és gyengébbeket az Asn208 aminosavakkal. Úgy tűnik, hogy ezek a kölcsönhatások nem olyan hatékonyak, vagy egyáltalán nem képesek kisebb (Ser) vagy nagyobb (foszfo-Ser) oldalláncok koordinálására. Egy részletes specificitásvizsgálatban (Talanian és mtsai., 1997) bebizonyították, hogy a kaszpáz-3 P4 Asp preferenciája szinte kizárólagos;

kevésbé tolerálja mind az azonos töltésű glutamátot, mind az izosztérikus aszparagint. Vizsgálataink alapján a foszfo-Ser szintén igen kedvezőtlen a kaspáz-3 és kevésbé, de szintén kedvezőtlen a kaspáz-7 számára.

4.3.2. táblázat. Kaspáz-3, -7, -8 enzimek Gas-2 szubsztrát-analógokkal mért kinetikai állandói

N ^o	peptid szekvencia	k _{cat} /K _m (mM ⁻¹ s ⁻¹)		
		kaspáz-3	kaspáz-7	kaspáz-8
1.	I S R V D ↓ G K T S P	3.70 ± 0.30 ^a	1.15 ± 0.07 ^a	nem hasadt ^c
2.	I S^P R V D ↓ G K T S P	0.10 ± 0.01 ^a	0.23 ± 0.01 ^a	nem hasadt ^c
3.	I D R V D ↓ G K T S P	181.5 ± 7.0	6.84 ± 0.95	nem hasadt ^c

a) lásd 4.3.1. táblázat

b) lásd 4.3.1. táblázat

c) lásd 4.3.1. táblázat

4.3.3. A P1 Asp cseréje Ser vagy foszfo-Ser aminosavakra megakadályozza a kaspáz-3, -7, -8 enzimekkel történő hasíthatóságot

Mivel a kaspázok specificitása szempontjából a P1 Asp kitüntetett, kipróbáltuk, hogy egy ismertén jól hasadó, konszenzus kaspáz-3 szekvenciában található P1 Asp cseréje nem okoz-e szignifikáns változást a szubsztrát hasíthatóságában. A módosítatlan peptidet jól hasították a kaspáz-3 és -7 enzimek, a kaspáz-8-nak azonban gyenge szubsztrátjának bizonyult, amit a P4 Leu csere némileg javított. Várakozásainknak megfelelően egyik kaspáz sem hasította sem a foszfo-Ser, sem a Ser analógot. A jelenség és annak molekuláris magyarázata analógnak tűnik az S4-P4 kölcsönhatással, de megnyilvánulása sokkal kifejezettebb. A P1 aszpartátot az alábbi aminosavoldalláncokkal való kölcsönhatás rögzíti az enzimhez: Arg64, Arg207 és Gln161. Ezek az aminosavak abszolút konzervatívak a kaspázokban (Wei és mtsai., 2000; Blanchard és mtsai., 2000). Ennek a komplex H-híd, sóhíd hálózatnak köszönhetően sem az aszpartátnál kisebb, sem a nagyobb töltött aminosavak nem képesek kialakítani az enzimmel hatékony kölcsönhatásokat.

Mutagenézis vizsgálataink szintén alátámasztják ezeknek az aminosavaknak esszenciális jellegét, mivel kaspáz-3 enzimben ezen aminosavak bármelyikének kis méretű töltetlen oldalláncú aminosavra történő kicserélésével az expresszió során önmaga kihasítására képtelen, mutáns prokaspáz-3 enzimeket kaptunk (4.3.2. ábra).

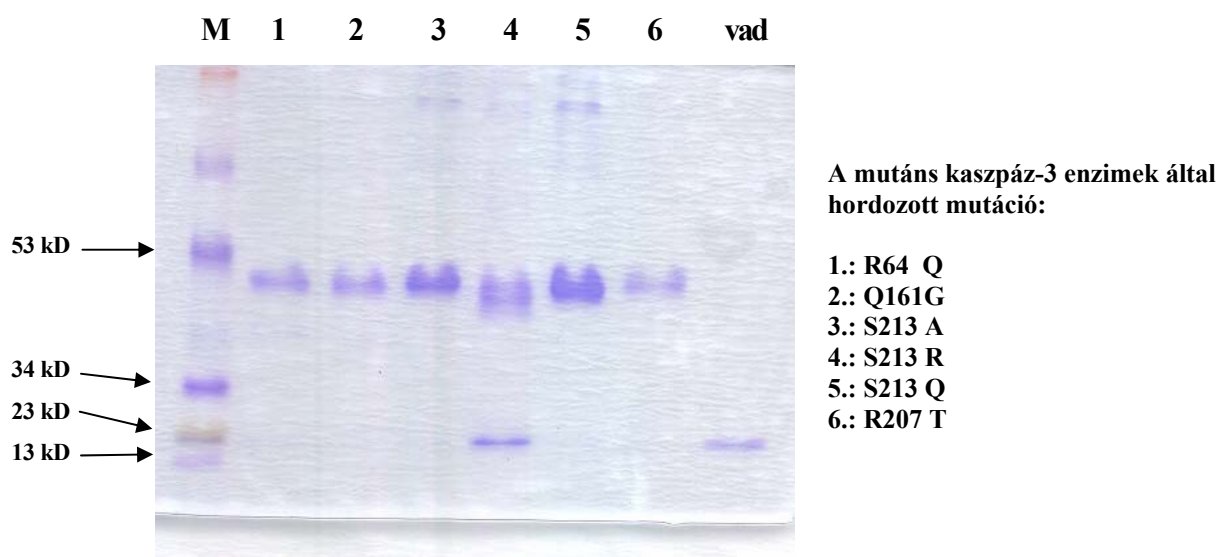
4.3.3. táblázat. Kaszpáz-3, -7, -8 enzimek PARP szubsztrát-analógokkal mért kinetikai állandói

N ^o	peptid szekvencia	k _{cat} /K _m (mM ⁻¹ s ⁻¹)		
		kaspáz-3	kaspáz-7	kaspáz-8
1.	G D E V D ↓ G V D E V	46.80 ± 8.70	11.10 ± 0.50	0.16 ± 0.02
1b.	G L E V D ↓ G V D E V	nem vizsgált	nem vizsgált	0.34 ± 0.05 ^a
2.	G D E V S ↓ G V D E V		nem hasadt ^c	
2b.	G L E V S ↓ G V D E V		nem hasadt ^c	
3.	G D E V S^P ↓ G V D E V		nem hasadt ^c	
3b.	G L E V S^P ↓ G V D E V		nem hasadt ^c	

a) lásd 4.3.1. táblázat

b) lásd 4.3.1. táblázat

c) lásd 4.3.1. táblázat



4.3.2. ábra: Mutáns kaszpáz-3 enzimek expresszálas során történő autoprocesszálása

A mutánsokat az S1 zseb méretnövelése céljával terveztük, olyan mutánsok előállítására állt szándékunkban, amelyek hasonlóan negatív töltésű, de nagyobb méretű aminosavak (pl: glutamát, foszfo-Ser) mellett képesek hasítani. A mutánsok hasítására, aktív formába alakítására képes konstrukció kialakítása még folyamatban van.

A tisztított mutáns kaszpázokat aktivitás szempontjából is ellenőriztük és azt találtuk, hogy oligopeptid szubsztráton (GDEVD↓GVDEV) csak a részleges autoprocesszálásra képes Ser213 Arg mutáns bizonyult aktívnek.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

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

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

A HTLV-I proteinázok specificitásvizsgálatait a már számos egyéb retrovíruscsalád reprezentatív képviselőjének jellemzésére is felhasznált HIV-1 MA/CA peptidsorozattal kívántuk elvégezni, de a vizsgálatok során kiderült, hogy a HTLV-BLV csoport képviselőinek a többi retrovirális proteinázétól való eltérő szubsztrátspecificitása miatt más sorozatot kell választanunk. A HTLV-I és a HIV-1 proteinázok közötti különbségek részleteit az alzsebek vonatkozásaiban a HTLV-I CA/NC peptidsorozattal tártuk fel. A vizsgálataink azt mutatták, hogy a HIV-1 proteinázoktól eltérően az S4 és S2 zsebek esetében döntően a hidrofób jellegű kölcsönhatások a meghatározóak, míg az S3, S1 és S1' zsebek specificitásában nagyobb a hasonlóság. A HIV-1 MA/CA hasítási helyhez hasonlóan úgy tűnik, hogy a HTLV-I CA/NC hasítási hely is evolúciósan az újonnan szintetizálódó poliproteinek gyors hasítására szelektálódott ki, mivel a szubsztituált szubsztrátok nagy része lényegesen lassabban hasadt mint a szubsztituátlan analógok.

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

6. IRODALOMJEGYZÉK

- Andreansky, M., Hruskova-Heidingsfeldova, O., Sedlacek, J., Konvalinka, J., Blaha, I., Jecmen, P., Horejsi, M., Strop, P. and Fabry, M. (1991) High-level expression of enzymatically active bovine leukemia virus proteinase in *E. coli*. *FEBS Lett.* 287(1-2):129-132.
- Barkett, M., Xue, D., Horvitz, H.R. and Gilmore, T.D. (1997) Phosphorylation of I κ B- α inhibits its cleavage by caspase CPP32 in vitro. *J. Biol. Chem.* 272, 29419-29422.
- Bian, X., Hughes, F.M. Jr., Huang, Y., Cidlowski, J.A. and Putney, J.W. Jr. (1997) Roles of cytoplasmic Ca²⁺ and intracellular Ca²⁺ stores in induction and suppression of apoptosis in S49 cells. *Am. J. Physiol.* 272 C1241-1249.
- Blaha, I., Tozser, J., Kim, Y., Copeland, T.D. and Oroszlan, S. (1992) Solid phase synthesis of the proteinase of bovine leukemia virus. Comparison of its specificity to that of HIV-2 proteinase. *FEBS Lett.* 309 (3):389-393.
- Blanchard, H., Kodandapani, L., Mittl, P.R., Marco, S.D., Krebs, J.F., Wu, J.C., Tomaselli, K.J. and Grutter, M.G.. (1999) The three-dimensional structure of caspase-8: an initiator enzyme in apoptosis. *Structure Fold. Des.* 7(9):1125-1133.
- Blanchard, H., Donepudi, M., Tschopp, M., Kodandapani, L., Wu, J.C. and Grütter, M.G. (2000) Caspase-8 specificity probed at subsite S(4): crystal structure of the caspase-8-Z-DEVD-cho complex. *J. Mol. Biol.* 302, 9-16.
- Borner, C. and Monney, L. (1999) Apoptosis without caspases: an inefficient molecular guillotine? *Cell Death. Differ.* 6(6) :497-507.
- Brancolini, C. and Schneider, C. (1994) Phosphorylation of the growth arrest-specific protein Gas2 is coupled to actin rearrangements during Go - G1 transition in NIH 3T3 cells. *J. Cell. Biol.* 124, 743-756.
- Brancolini, C., Benedetti, M. and Schneider, C. (1995) Microfilament reorganization during apoptosis: the role of Gas2, a possible substrate for ICE-like proteases. *EMBO J.* 14, 5179-5190.
- Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X. and Wang, X. (1999) Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 15:269-290.
- Cameron, C.E., Grinde, B., Jacques, P., Jentoft, J., Leis, J., Wlodawer, A. and Weger, I.T. (1993) Comparison of the substrate-binding pockets of the Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus type 1 proteases. *J. Biol. Chem.* 268, 11711-11720.
- Cann, A.J. and Chen, I.S.Y. (1990) Human T-cell leukemia virus types I and II. in: Fields, B.N., Knipe, D.M. (eds) *Virology*, 2nd ed. Raven Press, Ltd., New York, pp. 1501-1519.
- Cerretti, D.P., Kozlosky, C.J., Mosley, B., Nelson, N., Van Ness, K., Greenstreet, T.A., March, C.J., Kronheim, S.R., Druck, T., and Cannizzaro, L.A. (1992) Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 256(5053):97-100.
- Chai, J., Wu, Q., Shiozaki, E., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S. and Shi Y. (2001) Crystal structure of a procaspase-7 zymogen: mechanisms of activation and substrate binding. *Cell* 107(3):399-407.
- Chang, H.Y. and Yang, X. (2000) Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64(4):821-846.
- Chou, K.C. (1996) Prediction of human immunodeficiency virus protease cleavage sites in proteins. *Anal. Biochem.* 1;233(1):1-14.
- Copeland, T.D. and Oroszlan, S. (1988) Genetic locus, primary structure and chemical synthesis of human immunodeficiency virus protease. *Gene. Anal. Techn.* 5: 109-115.
- Cryns, V. and Yuan, J. (1998) Proteases to die for. *Genes. Dev.* 12(11):1551-1170.
- Ding, Y.S., Rich, D.H. and Ikeda, R.A. (1998) Substrates and inhibitors of human T-cell leukemia virus type I protease. *Biochemistry* 37(50):17514-17518.

- Daenke, S., Schramm, H. and Bangham, C.R.M. (1994) Analysis of substrate cleavage by recombinant protease of human T cell leukemia virus type 1 reveals preferences and specificity of binding. *Journ. of Gen. Virology* 75. 2233-2239.
- Davies, D.R. (1990) The structure and function of the aspartic proteinases. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 19, 189-215.
- Davis, R.J. (1993) The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.* 268, 14553-14556.
- Desagher, S., Osen-Sand, A., Montessuit, S., Magnenat, E., Vilbois, F., Hochmann, A., Journot, L., Antonsson, B., and Martinou, J.C. (2001) Phosphorylation of Bid by casein kinases I and II regulates its cleavage by caspase 8. *Mol. Cell* 8, 601-611.
- Erickson, J., Neidhart, D.J., Vandrie, J., Kempf, D.J., Wang, X.C., Norbeck, D.W., Plattner, J.J., Rittenhouse, J.W., Turon, M., Wideburg, N., Kohlbrenner, W.E., Simmer, R., Helfrich, R., Paul, D.A. and Knigge, M. (1990) Design, activity and 2,8 Å crystal structure of a C2 symmetric inhibitor complexed to HIV-1 protease. *Science* 249: 527-533.
- Ethell, D.W., Bossy-Wetzel, E. and Bredesen, D.E. (2001) Caspase 7 can cleave tumor necrosis factor receptor-I (p60) at a non-consensus motif, in vitro. *Biochim. Biophys. Acta.* 1541(3):231-238.
- Fersht, A. (1985) *Enzyme Structure and Mechanism* pp. 111-112.
- Fitzgerald., P.M.D., Mckeever, B.M., Van Middlesworth, J.F., Springer, J.P., Heimbach, J.C., Leu, C.T., Herber, W.K., Dixon, R.A.F. and Darke, P.L. (1990) Crystallographic analysis of a complex between human immunodeficiency virus type-1 protease and acetyl pepstatin at 2.0 Å resolution. *J.Biol.Chem.* 265: 14209-14219.
- Flexner, C. (1998) HIV-protease inhibitors. *N Engl J Med* 338(18):1281-1292.
- Gallo, R.C. and Montagnier, L. (1988) AIDS in 1988. *Sci.Am.* 259: 41-48.
- Graves, J.D., Draves, K.E., Gotoh, Y., Krebs, E.G. and Clark, E.A. (2001) Both phosphorylation and caspase-mediated cleavage contribute to regulation of the Ste20-like protein kinase Mst1 during CD95/Fas-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 276, 14909-14915.
- Grinde, B., Cameron., C.E., Leis., J., Weber, I.T., Wlodawer, A., Burstein., H. and Skalka, A.-M. (1992) Analysis of substrate interactions of the Rous sarcoma virus wild type and mutant proteases and human immunodeficiency virus type-1 protease using a set of systematically altered peptide substrates. *J. Biol. Chem.* 267: 9491-9498.
- Grünberg, J., Walter, J., Loetscher, H., Deuschle, U., Jacobsen, H. and Haass, C. (1998) Alzheimer's disease associated presenilin-1 holoprotein and its 18-20 kDa C-terminal fragment are death substrates for proteases of the caspase family. *Biochemistry* 37, 2263-2270.
- Grutter, M.G. (2000) Caspases: key players in programmed cell death. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10(6):649-655.
- Gustchina, A. and Weber, I.T. (1991) Comparative analysis of the sequences and structures of HIV-1 and HIV-2 proteases. *Proteins* 10: 325-339.
- Haas, L., Divers, T., Casey, J.W. (1992) Bovine leukemia virus gene expression in vivo. *J. Virol.* 66(10):6223-6225.
- Harrison, R.W. (1993) *J. Comp. Chem.*, 14. 1112-1122.
- Hawkins, C.J., Yoo, S.J., Peterson, E.P., Wang, S.L., Vernooy, S.Y. and Hay, B.A. (2000) The *Drosophila* caspase DRONC cleaves following glutamate or aspartate and is regulated by DIAP1, HID, and GRIM. *J. Biol. Chem.* 275(35):27084-27093.
- Hruskova-Heidingsfeldova, O., Andreansky, M., Fabry, M., Blaha, I., Strop, P. and Hunter, E. (1995) Cloning, bacterial expression, and characterization of the Mason-Pfizer monkey virus proteinase. *J. Biol. Chem.* 270(25):15053-15058.

- Hruskova-Heidingsfeldova, O., Blaha, I., Urban, J., Strop, P. and Pichova, I. (1997) Substrates and inhibitors of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) proteinase. *Leukemia* 11 Suppl 3:45-46.
- Hui, K.Y., Manetta, J.V., Gygi, T., Bowdon, B.J., Keith, K.A., Shannon, W.M. and Lai, M.H. (1991) A rational approach in the search for potent inhibitors against HIV proteinase. *FASEB J* 5(11):2606-2610.
- Hyland, L.J., Tomaszek, T.A.Jr. and Meek, T.D. (1991) Human immunodeficiency virus-1 protease. 1. Initial velocity studies and kinetic characterization of reaction intermediates by ¹⁸O isotope exchange. *Biochemistry*. 30 (34) 8441-8453.
- Hyland, L.J., Tomaszek, T.A.Jr., Roberts, G.,D., Carr, S.A., Magaard, V.W., Bryen, H.L., Fakhoury, S.A., Moore, M.L., Minnich, M.D. and Culp, J.S. (1991) 2. Use of pH rate studies and solvent kinetic isotope effects to elucidate details of chemical mechanism. *Biochemistry*. 30 (34) 8454-8463.
- Jaskolski, M., Tomasselli, A.G., Sawyer, T.K., Staples, D.G., Heinrikson, R.L., Schneider, J., Kent, S.B.H. and Wlodawer, A. (1991) Structure at 2.5 Å resolution of chemically synthesised human immunodeficiency virus type 1 protease complexed with a hydroxyethylene-based inhibitor. *Biochemistry* 30: 1600-1609.
- Jeang, K.T. (2001) Functional activities of the human T-cell leukemia virus type I Tax oncoprotein: cellular signaling through NF-kappa B. *Cytokine Growth Factor Rev.* 12(2-3):207-217.
- Johnson, J.M., Harrod, R. and Franchini G. (2001) Molecular biology and pathogenesis of the human T-cell leukaemia/lymphotropic virus Type-1 (HTLV-1). *Int. J. Exp. Pathol.* 82(3):135-147.
- Kaplan, A.H. and Swanstrom, R. (1991) Human immunodeficiency virus type 1 Gag proteins are processed in two cellular compartments. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88(10):4528-4532.
- Kaufmann, S.H. and Hengartner, M.O. (2001) Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends. Cell. Biol.* 11(12):526-354.
- Kim, T.W., Pettingell, W.H., Jung, Y.K., Kovacs, D.M. and Tanzi, R.E. (1997) Alternative cleavage of Alzheimer-associated presenilins during apoptosis by a caspase-3 family protease. *Science* 277, 373-376.
- Kobayashi, M., Ohi, Y., Asano, T., Hayakawa, T., Kato, K., Kakinuma, A. and Hatanaka, M., (1991) Purification and characterization of human T-cell leukemia virus type I protease produced in *E. coli*. *FEBS Lett.* 293: 106-110.
- Kotler, M., Danho, W., Katz, R.A., Leis, J. and Skalka, A.M. (1989) Avian retroviral proteases and cellular aspartic proteases are distinguished by activities on peptide substrates. *J.Biol.Chem.* 264: 3428-3435.
- Krippner-Heidenreich, A., Talanian, R.V., Sekul, R., Kraft, R., Thole, H., Ottleben, H. and Lüscher, B. (2001) Targeting of the transcription factor Max during apoptosis: phosphorylation-regulated cleavage by caspase-5 at an unusual glutamic residue in position P1. *Biochem J.* 358, 705-715.
- Kuo, L.C. and Shafer, J.A. (1994) *Methods in Enzymology*, 241. kötet
- Lam, P.Y., Jadhav, P.K., Eyermann, C.J., Hodge, C.N., Ru, Y., Bacheler, L.T., Meek, J.L., Otto, M.J., Rayner, M.M. and Wong, Y.N. (1994) Rational design of potent, bioavailable, nonpeptide cyclic ureas as HIV protease inhibitors. *Science* 263(5145):380-384.
- Lee, K.K., Tang, M.K., Yew, D.T., Chow, P.H., Yee, S.P., Schneider, C. and Brancolini, C. (1999) Gas2 is a multifunctional gene involved in the regulation of apoptosis and chondrogenesis in the developing mouse limb. *Dev. Biol.* 207, 14-25.

- Leis, J., Baltimore, D., Bishop, J.M., Coffin, J., Fleissner, E., Goff, S.P., Robinson, H., Skalka, A.M., Temin, H.M. and Vogt, V. (1988) Standardized and simplified nomenclature for proteins common to all retroviruses. *J. Virol.* 62: 1808-1809.
- Louis, J.M., Oroszlan, S. and Tozser, J. (1999) Stabilization from autoproteolysis and kinetic characterization of the human T-cell leukemia virus type 1 proteinase. *J. Biol. Chem.* 274(10):6660-6666
- Menendez-Arias, L., Gotte, D. and Oroszlan, S. (1993) Moloney murine leukemia virus protease: bacterial expression and characterization of the purified enzyme. *Virology* 196(2):557-563.
- Mellors, J.W. (1996) Closing in on human immunodeficiency virus-1. *Nature-Medicine* 2(3): 274-275.
- Miller, M., Jaskolski, M., Rao, J.K.M., Leis, J. and Wlodawer, A. (1989a) Crystal structure of a retroviral protease proves relationship to aspartic protease family. *Nature* 337: 576-579.
- Mittl, P.R., Di Marco, S., Krebs, J.F., Bai, X., Karanewsky, D.S., Priestle, J.P., Tomaselli, K.J. and Grütter, M.G. (1997) Structure of recombinant human CPP32 in complex with the tetrapeptide acetyl-Asp-Val-Ala-Asp fluoromethyl ketone. *J. Biol. Chem.* 272, 6539-6547.
- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B.A. and Yuan, J. (2000) Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403(6765):98-103.
- Navia, M.A., Fitzgerald, P.M.D., Mckeever, B.M., Leu, C.T., Heimbach, J.C., Herber, W.K., Sigal, I.S., Dark, P.L. and Springer, J.P. (1989) Three-dimensional structure of aspartyl protease from human immunodeficiency virus HIV-1. *Nature* 337: 615-620.
- Nicholson, D.W., Ali, A., Thornberry, N.A., Vaillancourt, J.P., Ding, C.K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P.R., Labelle, M. and Lazebnik, Y.A. (1995) Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376(6535): 37-43.
- Nicholson, D.W. and Thornberry, N.A. (1997) Caspases: killer proteases. *Trends. Biochem. Sci.* 22(8):299-306.
- Nicholson, D.W. (1999) Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ.* 6, 1028-1042.
- Oroszlan, S. and Gilden, R.V. (1980) Primary structure analysis of retrovirus proteins. In: Stephenson, J.R.(ed) *Molecular Biology of RNA tumor Viruses*. Academic Press, New York, pp. 299-344.
- Oroszlan S, Luftig RB. (1990) Retroviral proteinases. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 157:153-85.
- Oroszlan, S. and Tözsér, J. (1990) The retroviral proteinases. *Seminars in Virology.* 1: 369-378.
- Park, J.A., Kim, K.W., Kim, S.I. and Lee, S.K. (1998) Caspase 3 specifically cleaves p21^{WAF1/CIP1} in the earlier stage of apoptosis in SK-HEP-1 human hepatoma cells. *Eur. J. Biochem.* 257, 242-248.
- Pichova, I., Teplitsky, A., Cubinkova, R., Zabransky, A., Shoham, G. and Hruskova-Heidingsfeldova, O. (1998) Subsequent selfprocessing of bovine leukemia virus proteinase in vitro. *Adv. Exp. Med. Biol.* 436:109-113.
- Rao, J.K., Erickson, J.W. and Wlodawer, A. (1991) Structural and evolutionary relationships between retroviral and eucaryotic aspartic proteinases. *Biochemistry* 30(19):4663-4671.
- Renatus, M., Stennicke, H.R., Scott, F.L., Liddington, R.C. and Salvesen, G.S. (2001) Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98(25):14250-5

- Rice, N.R., Stephens, R.M. and Gilden, R.V. (1987) Sequence analysis of the bovine leukemia virus. in: *Enzootic Bovine Leukosis and Bovine Leukemia* (Burny, A., Mammerickx, M., eds.), Martinus Nijhoff Publishing, Boston, pp. 115-144.
- Riviere, Y., Blank, V., Kourilsky, P. and Israel, A. (1991) Processing of the precursor of NF-kappa B by the HIV-1 protease during acute infection. *Nature* 350(6319):625-626.
- Roberts, M.M. and Oroszlan, S. (1989) The preparation and biochemical characterisation of intact capsids of Equine infectious anemia virus. *Biochem-Biophys-Res-Commun* 160: 486.
- Roberts, M.M., Copeland, T.D. and Oroszlan, S. (1991) In situ processing of a retroviral nucleocapsid protein by the viral proteinase. *Protein Eng.* 4: 695-700.
- Rotonda, J., Nicholson, D.W., Fazil, K.M., Gallant, M., Gareau, Y., Labelle, M., Peterson, E.P., Rasper, D.M., Ruel, R., Vaillancourt, J.P., Thornberry, N.A. and Becker, J.W. (1996) The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nat. Struct. Biol.* 3(7):619-625.
- Sagata, N., Yasunaga, T., Ohishi, K., Tsuzuku-Kawamura, J., Onuma, M., Ikawa, Y. (1984) Comparison of the entire genomes of bovine leukemia virus and human T-cell leukemia virus and characterization of their unidentified open reading frames. *EMBO J.* 3(13):3231-3237.
- Salvesen, G.S. and Dixit, V.M. (1997) Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 91(4):443-446.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd ed., vol. 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1989.
- Schechter, I. and Berger, A. (1967) On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem-Biophys-Res-Commun.* 27: 157-162.
- Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., Bird, T.D., Hardy, J., Hutton, M., Kukull, W., Larson, E., Levy-Lahad, E., Viitanen, M., Peskind, E., Poorkaj, P., Schellenberg, G., Tanzi, R., Wasco, W., Lannfelt, L., Selkoe, D. and Younkin, S. (1996) Secreted amyloid b-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat. Med.* 2, 864-870.
- Schneider, C., King, R.M. and Philipson, L. (1988) Genes specifically expressed at growth arrest of mammalian cells. *Cell* 54, 787-793.
- Scott, M.T., Morrice, N. and Ball, K.L. (2000) Reversible phosphorylation at the C-terminal regulatory domain of p21^{Waf1/Cip1} modulates proliferating cell nuclear antigen binding. *J. Biol. Chem.* 275, 11529-11537.
- Sgorbissa, A., Benetti, R., Marzinotto, S., Schneider, C. and Brancolini, C. (1999) Caspase-3 and caspase-7 but not caspase-6 cleave Gas2 in vitro: implications for microfilament reorganization during apoptosis. *J. Cell. Sci.* 112 (Pt 23):4475-8442.
- Stennicke, H.R. and Salvesen, G.S. (1997) Biochemical characteristics of caspases-3, -6, -7, and -8. *J. Biol. Chem.* 272(41):25719-25723.
- Stennicke, H.R. and Salvesen, G.S. (1998) Properties of the caspases. *Biochim. Biophys. Acta* 1387(1-2):17-31.
- Stennicke, H.R. and Salvesen, G.S. (1999) Caspases: preparation and characterization. *Methods* 17, 313-319.
- Stennicke, H.R., Ratus, M., Meldal, M. and Salvesen, G.S. (2000) Internally quenched fluorescent peptide substrates disclose the subsite preferences of human caspases 1,3,6,7 and 8. *Biochem. J.* 350, 563-578.
- Swain, A.L., Miller, M.M., Green, J., Rich, D.H., Schneider, J., Kent, S.B.H. and Wlodawer, A. (1990) X-ray crystallographic structure of a complex between a synthetic protease of

- human immunodeficiency virus 1 and a substrate based hydroxyethylamine inhibitor. *Proc. Natl. Chem. Sci. USA* 87: 8805-8809.
- Swanstrom, R. (1994) Characterisation of HIV protease mutants: random, directed, selected. *Curr. Opin. Biotechnol.* 5: 409-413.
- Talanian, R.V., Quinlan, C., Trautz, S., Hackett, M.C., Mankovich, J.A., Banach, D., Ghayur, T., Brady, K.D. and Wong, W.W. (1997) Substrate specificities of caspase family proteases. *J. Biol. Chem.* 272, 9677-9682.
- Temin, H. (1976) The DNA provirus hypothesis: the establishment and implications of RNA-directed DNA synthesis. *Science* 192: 437-440.
- Thornberry, N.A., Bull, H.G., Calaycay, J.R., Chapman, K.T., Howard, A.D., Kostura, M.J., Miller, D.K., Molineaux, S.M., Weidner, J.R. and Aunins, J. (1992) A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 356(6372):768-774.
- Thornberry, N.A. (1999) Caspases: a decade of death research. *Cell Death Differ.* 6, 1023-1027.
- Thornberry, N.A. and Lazebnik, Y. (1998) Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312-1316.
- Toh, H., Ono, M., Saigo, K. and Miyata, T. (1985) Retroviral protease-like sequence in the yeast transposon Ty1. *Nature* 315: 691
- Tözsér, J., Gustchina, A., Weber, I.T., Blaha, I., Wondrak, E.M. and Oroszlan, S. (1991a) Studies on the role of the S4 substrate binding site of HIV proteinases. *FEBS Letters* 279: 356-360.
- Tözsér, J., Blaha, I., Copeland, T.D., Wondrak, E.M. and Oroszlan, S. (1991b) Comparison of the HIV-1 and HIV-2 proteinases using oligopeptide substrates representing cleavage sites in Gag and Gag-Pol polyproteins *FEBS Lett.* 281: 77-80.
- Tözsér, J., Weber, I.T., Gustchina, A., Blaha, I., Copeland, T.D., Louis, J.M. and Oroszlan, S. (1992) Kinetic and modelling studies of S3-S3' subsites of HIV proteinases. *Biochemistry* 31: 4793-4800.
- Tözsér, J., Friedman, D., Weber, I.T., Blaha, I. and Oroszlan, S. (1993) Studies on the substrate specificity of the proteinase of Equine infectious anemia virus using oligopeptide substrates. *Biochemistry* 32: 3347-3353.
- Tözsér, J., Bagossi, P., Boross, P., Louis, J.M., Majerova, E., Oroszlan, S. and Copeland, T.D. (1999) Effect of serine and tyrosine phosphorylation on retroviral proteinase substrates. *Eur. J. Biochem.* 265, 423-429.
- Tözsér, J. (2001) HIV inhibitors: problems and reality. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 946:145-159.
- Varmus, H.E. and Brown, P. (1989) Retroviruses. in: Howe, M. and Berg, D. (eds) *Mobile DNA*. ASM Press, Washington DC, pp. 53-109.
- Walter, B.N., Huang, Z., Jakobi, R., Tuazon, P.T., Alnemri, E.S., Litwack, G. and Traugh, J.A. (1998) Cleavage and activation of p21-activated protein kinase g-PAK by CPP32 (caspase 3). Effect of phosphorylation on activity. *J. Biol. Chem.* 273, 28733-28739.
- Walter, J., Grünberg, J., Capell, A., Pesold, B., Schindzielorz, A., Citron, M., Mendla, K., George-Hyslop, P.S., Multhaup, G., Selkoe, D.J. and Haass, C. (1997) Proteolytic processing of the Alzheimer disease-associated presenilin-1 generates an in vivo substrate for protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 5349-5354.
- Walter, J., Grünberg, J., Schindzielorz, A. and Haass, C. (1998) Proteolytic fragments of the Alzheimer's disease associated presenilins-1 and -2 are phosphorylated in vivo by distinct cellular mechanisms. *Biochemistry* 37, 5961-5967.
- Walter, J., Schindzielorz, A., Grünberg, J. and Haass, C. (1999) Phosphorylation of presenilin-2 regulates its cleavage by caspases and retards progression of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 1391-1396.

- Wang, J. and Lenardo, M.J. (2000) Roles of caspases in apoptosis, development, and cytokine maturation revealed by homozygous gene deficiencies. *J. Cell. Sci.* 113:753-757.
- Wang, X., Pai, J.T., Wiedenfeld, E.A., Medina, J.C., Slaughter, C.A., Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (1995) Purification of an interleukin-1 β -converting enzyme-related cysteine protease that cleaves sterol regulatory element-binding proteins between the leucine zipper and transmembrane domains. *J Biol. Chem.* 270, 18044-18050.
- Weber, I.T. and Harrison, R.W. (1996) Molecular mechanics calculations on HIV-1 protease with peptide substrates correlate with experimental data. *Protein Eng.* 9(8):679-690.
- Weber, I.T., Miller, M., Jaskolski, M., Leis, J., Skalka, A.M., and Wlodawer, A. (1989) Molecular modelling of the HIV-1 protease and its substrate binding site. *Science* 243: 928-931.
- Weber, I.T., Tözsér, J., Wu, J., Friedman, D. and Oroszlan, S. (1993) Molecular model of Equine infectious anemia virus proteinase and kinetic measurement for peptide substrates with single amino acid substitutions. *Biochemistry* 32: 3354-3362.
- Wei, Y., Fox, T., Chambers, S.P., Sintchak, J., Coll, J.T., Golec, J.M., Swenson, L., Wilson, K.P. and Charifson, P.S. (2000) The structures of caspases-1, -3, -7 and -8 reveal the basis for substrate and inhibitor selectivity. *Chem. Biol.* 7, 423-432.
- Wilson, K.P., Black, J.A., Thomson, J.A., Kim, E.E., Griffith, J.P., Navia, M.A., Murcko, M.A., Chambers, S.P., Aldape, R.A. and Raybuck, S.A. (1994) Structure and mechanism of interleukin-1 β converting enzyme. *Nature* 370(6487):270-275.
- Wlodawer, A., Miller, M., Jaskolski, M., Sathyanarayana, B.K., Baldwin, E., Weber, I.T., Selk, L.M., Clawson, L., Schneider, J. and Kent, S.B.H. (1989) Conserved folding in retroviral proteases: crystal structure of a synthetic HIV-1 protease. *Science* 245: 616-621.
- Wlodawer, A. and Erickson, J.W. (1993) Structure-based inhibitors of HIV-1 protease. *Annu. Rev. Biochem.* 62:543-585.
- Wlodawer, A., Gustchina, A., Reshetnikova, L., Lubkowski, J., Zdanov, A., Hui, K.Y., Angleton, E.L., Farmerie, W.G., Goodenow, M.M. and Bhatt, D. (1995) Structure of an inhibitor complex of the proteinase from feline immunodeficiency virus. *Nat. Struct. Biol.* 2(6):480-488.
- Wlodawer, A. and Gustchina, A. (2000) Structural and biochemical studies of retroviral proteases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1477(1-2):16-34.
- Yamada, T., Yamaoka, S., Goto, T., Nakai, M., Tsujimoto, Y. and Hatanaka, M. (1994) The human T-cell leukemia virus type I Tax protein induces apoptosis which is blocked by the Bcl-2 protein. *J. Virol.* 68(5):3374-3379.
- Yoshinaka, Y. and Luftig, R.B. (1977) Murine leukemia virus morphogenesis: Cleavage of P70 in vitro can be accompanied by a shift from a concentrically coiled internal strand ("immature") to a collapsed ("mature") form of the virus core. *Proc. Natl. Chem. Sci. USA* 74: 3446-3450.
- Yoshinaka, Y., Katoh, I., Copeland, T.D. and Oroszlan, S. (1985) Murine leukemia virus protease is encoded by the gag-pol gene and is synthesized through suppression of an amber termination codon. *Proc. Natl. Chem. Sci. USA* 82: 1618-1622.
- Yoshinaka, Y., Katoh, I., Copeland, T.D., Smythers, G.W. and Oroszlan, S. (1986) Bovine leukemia virus protease: purification, chemical analysis, and in vitro processing of gag precursor polyproteins. *J. Virol.* 57(3):826-832.
- Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H.M. and Horvitz, H.R. (1993) The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 β -converting enzyme. *Cell* 75(4):641-652.

7. KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

Az értekezéshez felhasznált közlemények:

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

Tőzsér, J., **Zahuczky, G.**, Bagossi, P., Louis, J.M., Copeland, T.D., Oroszlan, S., Harrison, R.W. and Weber, I.T. (2000) Comparison of the substrate specificity of the human T-cell leukemia virus and human immunodeficiency virus proteinases. *Eur. J. Biochem.* 267 (20): 6287-95. I.F.: 2.849

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

Az értekezéshez kapcsolódó előadások és poszterek:

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

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

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

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.

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

Egyéb közlemények:

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