

EGYETEMI DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Humán immundeficiencia vírus 1 proteáz ellenes
makromolekuláris inhibitorok
tervezése, előállítása és jellemzése

Miklóssy Gabriella

Témavezető:
Dr. Bagossi Péter

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

Debrecen, 2008

1. BEVEZETÉS

1.1. A retrovírusok jellemzése

A retrovírusok pozitív szálú, diploid RNS-genommal rendelkező vírusok, a Retroviridae családba tartoznak. A családon belül megkülönböztethetjük az Orthoretrovirinae és a Spumaretrovirinae alcsaládot. Az Alpharetrovirus, Betaretrovirus, Deltaretrovirus, Epsilonretrovirus és Gammaretrovirus nemzetség mellett az Orthoretroviridae alcsaládba tartozik a Lentivirus nemzetség, melynek nevezetes képviselője a humán immunodeficiencia vírus (HIV).

A retrovírus virionok átmérője 80-100 nm között változik, külső lipid burkukban virális glikoproteinek (Env) találhatóak. A burokfehérjék három heterodimert tartalmaznak, melyek egy felszíni receptorkötő alegységből (SU) és egy ezzel nem-kovalens kölcsönhatásban lévő transzmembrán (TM) alegységből állnak. A belső protein mag, mely mátrix (MA) és kapszid (CA) fehérjékből épül fel, alakja és elhelyezkedése a család különböző fajaiban eltérő. A magban található a nukleokapszid (NC) fehérjével asszociált virális genom, amely az életciklushoz nélkülözhetetlen 3 enzimet is kódolja: a proteázt (PR), a reverz transzkriptázt (RT) és az integrázt (IN).

A virális genom szerveződése szerint megkülönböztethetjük az egyszerű és az összetett retrovírusokat. A legegyszerűbb esetben, pl. az egér leukémia vírus (MLV) esetében, a retrovirális replikációhoz csupán három, a vírus által kódolt gén szükséges. A *gag*, mely a virion strukturális fehérjéit, a *pol*, mely a virális enzimeket és az *env*, mely a burokfehérjét kódolja. Az integrálódott provírusban ez a három gén mindig ugyanabban a sorrendben található (5'-*gag-pol-env*-3') és mindkét végén a reverz transzkripció során keletkező, jellegzetes hosszúságú ismétlődő végszekvenciák (LTR, long terminal repeat) találhatóak. Az LTR tartalmazza a retrovirális genom hatékony transzkripciójához szükséges promóter és enhanszer elemeket, valamint az mRNS 3'-végi poliadenilációjához szükséges szekvenciákat.

A HIV-1, a Lentivirus genus többi tagjával együtt, összetett genommal rendelkezik, ami azt jelenti, hogy az egyszerű retrovírusokra jellemző géneken kívül egyéb géntermékeket is kódol. A Tat és a Rev fehérjék *transz*-aktiváló elemként szabályozzák a HIV-1 génexpressziót. A Tat fehérje a HIV-1 LTR-specifikus transzkripciójának hatásos aktivátora és ezért egy erőteljes pozitív visszacsatolást hoz létre. A Tat fehérjének ez a hatása a Rev fehérje felhalmozódását eredményezi, ami meggátolja a többszörösen illesztett, szabályozó mRNS-ek szintézisét és aktiválja az egyszerűen illesztett, a strukturális fehérjéket kódoló mRNS szintézisét.

1.2. A retrovírusok életrajza

A retrovírusok életrajza két szakaszra osztható, melyeket korai és késői fázisnak nevezünk. A korai fázis első lépéseként a vírus membrán fúzióval vagy receptor közvetített endocitózissal bejut a sejtbe. A reverz transzkripció a belépő kapszid struktúrában történik meg, melyben a pozitív szálú RNS-genom dupla szálú DNS-genommá íródik át. A genomi DNS-ből és a belépő kapszid néhány fehérje komponenséből preintegrációs komplex (PIC) formálódik, amely bejut a sejtmagba. A legtöbb retrovírus esetében ez passzív lépés, így csak osztódó sejteket képesek megfertőzni, melyek sejtmaghártyája nem ép, azonban a HIV-1 és a Lentivírus alcsaládba tartozó egyéb retrovírusok esetében a PIC aktív transzportja lehetővé teszi nem osztódó sejtek fertőzését is. A virális DNS a PIC nélkülözhetetlen részét képező IN segítségével beépül a gazdasejt genomjába. A késői fázis első lépése a virális DNS transzkripciója, mely a celluláris RNS-polimeráz II közvetítésével megy végbe. A keletkezett mRNS molekulák egy része módosíthatatlanul elhagyja a sejtmagot és a Gag, illetve Gag-Pro-Pol poliproteinek templátja lesz vagy a vírusburokba kerül és az utódvírusok genomjának templátjaként szolgál. Egy kisebb, illesztett mRNS-ről íródhatnak át az *env*-kódolt fehérjék, melyek előbb glikozilálódnak, majd a plazmamembránba való transzport során egy felületi (SU) és egy transzmembrán (TM) fehérjére hasadnak egy celluláris proteáz hatására. Számos, többszörösen illesztett mRNS szolgál a kiegészítő fehérjék, mint a Tat, Rev, Vif, Nef, Vpr szintézisének templátjaként. A Gag fehérjék a gazdasejt membránjának Env proteinekben koncentrált részein, a membrán belső felületén csoportosulnak, majd a fánk-alakú kapszid struktúrával rendelkező „éretlen” vírusrészecske a „lefüződés” (budding) révén kikerül a sejtből. A vírus a poliproteinek meghatározott helyeken elhasító proteáz aktiválódása után válik „éretté”, fertőzőképpé. Ekkor a vírusrészecskének tömör, kúp-alakú belső szerkezete van. Mivel csak az „érett” vírusrészecskék fertőzőképesek, a PR működése nélkülözhetetlen a vírus replikáció során.

1.3. A HIV-1 proteáz jellemzése

A retrovirális proteázok 99-138 aminosavból álló, 11-15 kDa molekulatömegű fehérjék, amelyek több, aszpartil proteázokra jellemző tulajdonságot mutatnak (pepszatinnal való gátlhatóság, a katalitikus aszpartát mutációjával előidézhető enzimaktiváció). Azonban a két, topológiailag hasonló, de mégsem teljesen egyforma domént hordozó egyláncú celluláris aszpartil proteázoktól eltérően, a retrovirális proteázok két egyforma alegységből felépülő, dimerként működő enzimek. A retrovirális proteázok első- és másodlagos szerkezete a celluláris aszpartil proteázok egyik doménjével analóg, számos β -

redőt és enzimtől függően egy vagy két rövid α -hélixet tartalmaznak. A két alegység N- és C-terminális láncai összefonódva alkotnak egy négyrétegű antiparallel β -redőt.

A HIV-1 proteázt három jellegzetes régióval jellemezhetjük: az aktív centrum, az ún. flap és a C-terminális közelében elhelyezkedő konzervált régió. Az aktív centrumot kódoló katalitikus triád (Asp-Thr/Ser-Gly) az N-terminális közelében helyezkedik el. Az alegységek katalitikus triádjai hurkot alkotnak, amely analóg a celluláris aszpartil proteázokra leírt ψ -struktúrával. A flexibilis „flap” régió többé-kevésbé konzervatív, mely a szubsztrát, illetve az inhibitor kötődésekor elmozdul és ráhajlik a ligandra, így stabilizálva a komplexet. A harmadik konzervált régió (Gly-Arg-Asp/Asn) a C-terminális közelében helyezkedik el és ion párok kialakításával a dimerizációban játszik fontos szerepet.

A HIV-1 PR savas pH-jú (4,5-6,5) környezetben mutatja a legnagyobb aktivitást és a celluláris aszpartil proteázokhoz hasonlóan *in vitro* nagy ionerősség (1-2 M NaCl) mellett is aktív. A PR pontos hasítási helyeit a virális poliproteinek felhasználásával és az érett fehérjék N- és C-terminális szekvenciáinak meghatározásával azonosították. A hasítási helyek összehasonlításával nem találtak egységes aminosavsortrendet, de elmondható, hogy a szekvenciák többnyire hidrofób jellegűek.

Számos munkacsoport módosította az eredeti, HPLC-n alapuló peptid esszét. Néhány esetben radioaktivitás segítségével detektálták a hasítási termékeket. Az egyik módosított peptid szubsztrát N-terminális prolint tartalmazott és a hasítás során keletkező N-terminális primer amint fluoreszkaminnal detektálták. A PR aktivitásának mérésére kolorimetriás esszéket is kidolgoztak. Az izatint használó módszer a minta elfőzését igényli, így nem alkalmazható mikrotiter lemezre, míg egy másik módszer, melynek során a szintetikus peptid hidrolízisét két nem enzimikus lépés követi, alkalmas a HIV-1 PR aktivitásának nagy átersztőképességű mérésére. Először a HIV-1 proteázra írtak le fluorogén aktivitásmérő módszert. Szubsztrátként a HIV-1 MA₂CA hasítási helyen alapuló peptidet használták, mely tartalmazott az 5-((2-aminoetil)amino)naftalén-1 szulfonsavval, vagyis az EDANS nevű fluorofórral módosított glutamátot és a 4-(4-dimetilaminofenilazo)benzoesavval, vagyis DABCYL nevű akceptor molekulával módosított lizint. Az akceptor molekulát úgy választották ki, hogy az abszorpciós spektruma átfedjen a fluorofór emissziós spektrumával, ezért az EDANS teljes gerjesztési energiája csak a proteolitikus hasítás következtében tud felszabadulni. Később más proteázokra (pl. citomegalovírus PR, hepatitis C vírus NS3 PR) is kifejlesztettek hasonló elven alapuló mérési módszereket.

1.4. A HIV-1 proteáz inhibitorai

Kezdetben a kis molekulájú inhibitorokra koncentráltak a proteázt célzó hatóanyagok tervezésekor, különösen a szubsztrát alapú peptidszerű gátlószerekre. A klinikumban jelenleg használatos minden inhibitor ebbe a típusba tartozik. A klinikumban jelenleg 9 HIV-1 PR inhibitorot alkalmaznak. Közös tulajdonságuk, hogy P1 pozícióban fenil csoportot hordoznak és egy nem hidrolizálódó átmeneti-állapotot mimikáló csoportot (pl. hidroxietilamin) tartalmaznak a hasítandó kötésnek megfelelő helyen. Azonban a kis molekulájú inhibitorokkal szemben - a reverz transzkriptáz hibajavító funkciójának hiánya miatt - gyorsan rezisztencia fejlődik ki, és az egyik inhibitorral történő kezelés során megjelenő rezisztens törzsekre gyakran más inhibitorok is hatástalanok lesznek. Az aktív centrumot, a dimerizációs felszínt vagy a flap régiót célzó, nem peptidszerű komponensek új lehetőséget jelenthetnek az AIDS elleni küzdelemben. A HIV-1 PR ellenes inhibitorok sikere alapján a HTLV-1 PR is ígéretes célpontnak tűnik az általa okozott betegségek kezelésére, megelőzésére.

A dimer formában aktív proteáz makromolekuláris inhibitorokkal is gátolható, melyek nagy kölcsönható felületük miatt kevésbé lehetnek érzékenyek a rezisztenciát okozó mutációkra. Irodalomból ismert, hogy a defektív PR monomerek tervezése és a fertőzött sejtekben történő expressziója hatékony módszer a PR gátlására. Hasonló módszert alkalmaztak a HIV-1 Gag, Tat, Rev, Env és Vpr fehérjéivel szemben. A kis molekulájú inhibitorok alkalmazásánál számolni kell a kombinált terápia (HAART, highly active anti-retroviral therapy) mellékhatásainak kialakulásával, pl. inzulin rezisztencia, lipodisztrófiás szindróma, érelmeszesedés. A makromolekuláris inhibitorok eltérő kémiai szerkezetük miatt várhatóan nem váltják majd ki az előbb említett mellékhatásokat.

2. CÉLKITŰZÉS

A HIV-1 PR működése nélkülözhetetlen a fertőzőképes vírus kialakulásához, ezért fontos célpont az AIDS-terápiában. Az eddig alkalmazott inhibitorokkal szemben rövid idő alatt rezisztencia alakul ki, ezért állandó az igény az újabb, széles specificitású inhibitorok kifejlesztésére. A HTLV-1 PR szintén ígéretes lehet az ATL és a TSP/HAM terápiájában. Munkánk során az alábbi célokat tűztük ki:

- Egy nagy áteresztőképességű és gyors, mikrotiter lemez alapú fluoreszcens aktivitásmérő módszer kidolgozását, mely alternatívát jelenthet a hagyományos HPLC-módszer mellett és lehetővé teszi a különböző retrovirális proteázok aktivitásának közvetlen és gyors összehasonlítását, inhibitorok tesztelését és gátlási állandóik meghatározását.
- Új HIV-1 PR ellenes makromolekuláris inhibitorok előállítását, melyek nagy kölcsönható felületük miatt kevésbé lehetnek érzékenyek a rezisztenciát okozó mutációkra és amelyek felhasználhatóak lennének AIDS-ellenes génterápiás alkalmazásokban. Az irodalmi példáktól eltérően, a mutációs stratégiánkban a hidrofил aminosavakat részesítenénk előnyben az oldékonyság növelése és a magasabb hatékony koncentráció elérése érdekében.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Oligopeptidek

Az oligopeptideket szilárd fázisú peptidszintézissel készítették, Model 430A automata peptid szintetizátorral vagy félautomata Vega peptid szintetizátorral. A tisztításhoz RP-HPLC-t használtak. A peptidek szekvenciáját Beckman 6300 aminosav analizátorral ellenőrizték. Az EDANS/DABCYL tartalmú peptideket és a fluoreszcens kontroll peptidként használt RE(EDANS)-t Dr. Ivo Blaha szintetizálta.

3.2. HPLC módszer

A tisztított HIV-1 és HTLV-1 proteázokat a korábban leírtak alapján állítottuk elő. A PR preparátumok fehérjekoncentrációját aminosavanalízissel határoztuk meg. A proteázok aktivitás-mérése 20 µl reakcióelegyben történt. Aktív centrum titrálással határoztuk meg az aktív enzimek mennyiségét. A HIV-1 PR aktív centrum titrálásához a Compound 3 nevű inhibitorot használtuk, míg a HTLV-1 PR esetében az IB-268-at. A reakcióelegyeket 1 óráig 37°C-on inkubáltuk, majd 180 µl 1%-os TFA-oldattal állítottuk le. A szubsztrátot lineáris víz-acetonitril gradienssel, 0,05% TFA jelenlétében választottuk el a termékektől és a pufferkomponensektől. Az elválasztást 206 nm-en követtük és a hidrolízis mértékét a kromatográfias görbe integrálásával számítottuk. Az enzimkoncentrációkat úgy állítottuk be, hogy a szubsztrátok hidrolízise 20% alatt maradjon. A kinetikai paramétereket a reakciósebesség és szubsztrátkoncentráció adatok Michaelis-Menten egyenlethez illesztésével határoztuk meg, nemlineáris regressziós módszerrel, a Fig.P program felhasználásával. A kinetikai állandók standard deviációi 20% alatt voltak. A katalitikus állandót az aktív centrum titrálással kapott aktív enzimkoncentrációk felhasználásával számoltuk.

3.3. Mikrotiter lemez alapú fluoreszcens módszer

A PR esszék során a 110 µl térfogatú reakcióelegyet fehér színű mikrotiter lemez lyukaiba mértünk, 5 percig 37°C-on előinkubáltuk, majd 90 µl fluoreszcens peptid szubsztrát hozzáadásával indítottuk a reakciót. A fluoreszcens szignál emelkedését 460 nm-en detektáltuk 37°C-on, 355 nm gerjesztési hullámhossz mellett Wallac 1420 Victor2 fluoriméter-luminométer felhasználásával. A gátlásvizsgálatok reakciói is 200 µl végtérfogatban játszódtak le, de az elegy tartalmazott 2 µl DMSO-t vagy DMSO-ban oldott inhibitorot.

A belső szűrő hatás meghatározása a kinetikai méréseknél alkalmazott szubsztrátkoncentráció tartományban történt, a RE(EDANS) dipeptid fluoreszcenciájának mérésével.

Az adatfeldolgozást egy házi készítésű Fortran programmal (KiDet, Bagossi Péter munkája) végeztük. A program egyenest illeszt a fluoreszcens jel-idő görbe kezdeti szakaszára, korrigál a belső szűrő hatással és kiszámolja a k_{kat} és K_M értékeket a Michaelis-Menten egyenlet nemlineáris analízisével. Az enzimkoncentrációt, illetve az inhibitor állandót is kiszámoltathatjuk a programmal, melyhez a Williams-Morrison egyenletet használja.

A fluoreszcens módszer validálásához a reakció végén 100 μl reakcióelegyet eppendorfcövekbe mértünk, 100 μl stop-oldattal leállítottunk és a mintákat reverz fázisú HPLC segítségével analizáltuk.

3.4. Molekuláris modellezés

Az aminosavcseréket egy nagy felbontású HIV-1 PR kristályszerkezetben vagy előzőleg a Sybyl programmal minimalizált szerkezetekben hajtottuk végre. A B monomerben a kiválasztott aminosavat mind a 20 természetes aminosavra kicseréltük. A mutált szerkezeteket a Sybyl programmal energiainimalizáltuk. Az intermonomer kölcsönhatási energiákat a dimer energiájának és az egyes monomerek energiájának különbségéből számoltuk. Az ígéretes mutánsokat a minimalizálás után kapott kedvező inter- és intramolekuláris energiák, a modellek grafikus vizsgálatával kapott szerkezeti információk, és az általunk preferált stratégia alapján választottuk ki és vetettük alá az *in silico* mutagenézis következő körének. A szerkezeteket Silicon Graphics Fuel grafikus számítógéprendszer és a Sybyl program segítségével vizsgáltuk.

3.5. A HIV-1 proteáz mutagenézise

A mutagenézis alapjául egy 5 mutációt tartalmazó stabilizált HIV-1 proteáz szekvenciát kódoló pET expressziós vektort használtunk. Mutánsainkat a QuikChange mutagenézis eljárást követve állítottuk elő.

3.6. Az enzimek tisztítása

A stabilizált vad típusú és mutáns HIV-1 proteázok expressziója a megfelelő plazmidokat hordozó *E. coli* BL21(DE3) kultúrákban történt. A fehérje expressziót 1 mM IPTG hozzáadásával, 3,5 órán keresztül végeztük. Az expresszió után a sejteket centrifugálással gyűjtöttük össze és szonikálással tártuk fel. A lizátumot centrifugáltuk, majd 3 M urea-tartalmú lízis pufferrel szuszpendáltuk és újra szonikáltuk. Ezt a mosási lépést még háromszor ismételtük

meg, melynek eredményeképpen tiszta inklúziós testeket nyertünk. Az utolsó mosási lépés után kapott pelletet feloldottuk a denaturációs pufferben. A fehérjéket HPLC-vel tisztítottuk 0,05% TFA jelenlétében kialakított lineáris víz- acetonitril gradiens (0-100%) segítségével. A proteáz tartalmú frakciók tisztaságát 16%-os poliakriamid géleken ellenőriztük. A tiszta fehérjéket tartalmazó frakciókat összegyűjtöttük és SpeedVac SVC 100H koncentrátor segítségével beszárítottuk. A proteáz tartalmú száraz pelleteket 6 M guanidin-hidroklorid oldatban vettük fel.

3.7. Makromolekuláris inhibitorok gátlási vizsgálatai

A kísérletek során a 3.3. pontban leírt protokollt alkalmazva mikrotiter lemez lyukaiba mértünk 10 µl denaturált fehérjeoldatot, mely az aktív és inaktív proteázok különböző arányának 6 M guanidin-hidroklorid oldatát tartalmazta. Az elegyet 15 percig inkubáltuk 37 °C-on, majd a fluoreszcens peptid szubsztrát hozzáadásával indítottuk a reakciót. Kontroll fehérjeként egy N- és C-terminálisán csonkolt dimerizációra nem képes proteázt (PR₅₋₉₅) használtunk. Meghatároztuk a vad PR aktivitását a kontroll, illetve az inaktív fehérjéket is tartalmazó reakcióelegyekben, majd a kontroll fehérjéhez viszonyított aktivitásértékek százalékát ábrázoltuk az inaktív:aktív fehérjék arányának függvényében SigmaPlot program segítségével.

3.8. Heterodimer-képzés vizsgálata

A mutáns proteázok és az N-terminális hexahisztidin véget tartalmazó vad típusú proteáz 6 M guanidin-hidroklorid oldatát összekevertük 1:1 moláris arányban, illetve külön-külön is vizsgáltuk a fehérjéket kontrollként. A nikkel-kelát ProBond töltetet ekvibráltuk a fehérjeoldat hozzáadása előtt. A szuszpenziót jégen inkubáltuk, majd a töltetet centrifugálással szeparáltuk és háromszor mostuk az ekvibráló pufferrel. A fehérjéket 20%-os poliakrilamid géleken vizsgáltuk Coomassie Brilliant Blue festés után.

3.9. NMR-spektroszkópia

A kísérletekhez az ¹⁵N-jelölt PR_{RE} és PR_{RER} fehérjéket valamint a jelöletlen proteázokat inklúziós testből tisztítottuk reverz fázisú HPLC segítségével. A fehérjéket 30-50 mM hangyasav oldattal szemben dializáltuk, majd ~2 mg/ml koncentrációjúra töményítettük Millipore YM-10 (Millipore, Bedford, MA) koncentrátorokat használva. A heteronukleáris korrelációs (HSQC, Heteronuclear Single Quantum Coherence) spektrum felvételéhez négy, egyenként 320 µl térfogatú mintát készítettünk: ¹⁵N-PR_{RE}, ¹⁵N-PR_{RER}, illetve mindkettő 1:1

arányú keveréke a jelöletlen proteázzal. A fehérjét Ishima és mtsai hígítási protokollja szerint preparáltuk.

3.10. A HIV-1 vektorrendszer plazmidjainak módosítása

Az eredeti HIV-1 vektorrendszert (mely Dr. Didier Trono ajándéka) módosítottuk egy hatékonyabb promóter és a mutáns proteázok szekvenciáinak bejuttatásával. A citomegalovírus (CMV) promóterének szekvenciáját polimeráz láncreakcióval felszaporítottuk és a pWOX-GFP plazmid *BamHI* és *MluI* restrikciós helyei közé ligáltuk a zöld fluorescens fehérjét (GFP) kódoló szakasz elé. A proteázt kódoló szakaszt a pMDLg/pRRE plazmidból a pT7Blue-3 plazmid *PstI* és *StyI* restrikciós helyei közé klónoztuk. A mutáns proteázokat a QuikChange mutagenézis eljárást követve állítottuk elő. A mutáns proteázokat kódoló fragmenteket ezután visszaklónoztuk a pMDLg/pRRE plazmidba. Az N- és C-terminálison csonkolt proteázt „átfedő” (overlapping) PCR-ral hoztuk létre.

3.11. Vírusrészecskék előállítás

A vírusrészecskék előállításához 293T sejteket polietilénimin segítségével transzfektáltuk, összesen 35,5 µg plazmid bejuttatásával: 10 µg pWOX-CMV-GFP (transzfer vektor plazmid), 6,5 µg pMDLg/pRRE (csomagoló plazmid, mely tartalmazza a vad típusú proteázt kódoló szekvenciát), 2,5 µg pRSV.rev (Rev kódoló plazmid), 3,5 µg pMD.G (VSV-G burokfehérjét kódoló plazmid) és 13 µg pMDLg/pRRE-M (a mutáns proteáz szekvenciáját kódoló plazmid) vagy lazac sperma DNS. A vírusrészecskéket tartalmazó kondicionált médiumot 24, 48 és 72 óra múlva gyűjtöttük, majd ultracentrifugálással töményítettük. A vírusrészecskéket tartalmazó pelletet PBS-ben felvettük és szétporciózva -70 °C-on tároltuk. A kapszid fehérje (p24) teljes mennyiségét ELISA módszerrel határoztuk meg, melyhez a vírus lízise után a hasítatlan Gag poliproteint HIV-1 proteázzal hasítottuk.

3.12. Fertőzőképesség vizsgálata

A fertőzőképesség vizsgálatához 293T sejteket 24-lyukú lemezen növesztettünk 300 µl 10% FBS, illetve antibiotikum és glutamin tartalmú DMEM-ben, amíg kb. 50%-ban borították be a lyukak felszínét. Éjszakai inkubáció után a sejteket 24 ng kapszid fehérje tartalmú vírussal fertőztük 120 µl DMEM-ben. Két nap múlva a sejteken lévő tápfolyadékot kiegészítettük kétszeres FBS, antibiotikum és glutamin tartalmú DMEM-mel. A hetedik napon a sejteket felkapartuk, mostuk PBS-sel és a GFP-pozitív sejtek arányának meghatározásához 10000 sejtet számoltunk meg áramlási citométer segítségével.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

4.1. Mikrotiter lemez alapú fluoreszcens módszer kidolgozása retrovirális proteázok gátlásvizsgálataihoz

4.1.1. HIV-1 és HTLV-1 természetes hasítási helyen alapuló peptidek vizsgálata HPLC módszerrel

A HTLV-1 CA↓NC hasítási helyet (KTKVL↓VVQPK) reprezentáló peptid mindkét proteáznak jó szubsztrátja, ezért mi is ezt a peptidet választottuk a számunkra érdekes módosítások elvégzéséhez. A peptid N- és C-terminális végére beépítettük a fluoreszcens donor csoportot, az EDANS-t és a kioltó akceptor csoportot, a DABCYL-t. Az így kapott szubsztrátot (FSP-354) HTLV-1 proteázzal hasítottuk és a reakcióelegyet először a hagyományos HPLC módszerrel vizsgáltuk. Az eredeti szubsztráthoz hasonlóan az FSP-354 K_M értéke alacsony, a katalitikus állandó viszont sokkal kisebb volt, így együtt kb. 200x alacsonyabb specificitási állandót (k_{kat}/K_M) eredményeztek. Az FSP-404 peptidben a P1 leucint fenilalaninra cseréltük. Érdekes módon a csere a HTLV-1 proteázzal mért kinetikai paramétereket nem változtatta meg jelentősen az FSP-354 szubsztráthoz képest, habár ugyanezen változás az eredeti (nem jelölt) szubsztrát esetén duplájára növelte a specificitási állandót. Korábbi vizsgálatainkból tudjuk, hogy a HTLV-1 PR több aminosavrészt igényel az N-terminálison, mint a HIV-1 PR, így megszentetizáltattuk a P1 helyen fenilalanint tartalmazó szubsztrát N-terminálison egy aminosavval hosszabb, viszont C-terminálison rövidebb módosítását. Az így kapott FSP-405 peptid a HTLV-1 proteáznak sokkal rosszabb szubsztrátja lett. Ez arra utal, hogy a C-terminális megfelelő hossza szintén fontos a hatékony hidrolízishez. Érdekes, hogy az FSP-354 és FSP-404 sokkal jobb szubsztrátjai lettek a HIV-1 proteáznak, mint a HTLV-1 proteáznak, pedig a nem fluoreszcens analógjaikat a HTLV-1 PR jobban hasította.

Hasonlóképpen teszteltük a HIV-1 MA↓CA (VSQNY↓PIVQ) hasítási helyen alapuló szubsztrát EDANS/DABCYL variánsát. A módosítatlan peptidhez hasonlóan a HTLV-1 PR nem hasította a fluoreszcens formát, miközben a HIV-1 proteáznak jobb szubsztrátja lett.

4.1.2. A belső szűrő hatás kalibrálása a mikrotiter lemez alapú fluoreszcens módszerhez

Magas szubsztrátkoncentráció esetén előfordulhat, hogy a már elhasított szubsztráton lévő EDANS molekula fluoreszcenciáját elnyeli egy még hasítatlan szubsztrát DABCYL molekulája, így a ténylegesnél kisebb jelet kapunk. Ez a jelenség a belső szűrő hatás, melyet korrigálni kell a fluoreszcens energia transzfer (FRET)-alapú szubsztrátokkal történő

enzimkinetikai méréseknél. Mérési módszerünk beállításakor egy alternatív módszert dolgoztunk ki a belső szűrő hatás korrekcióra, melyben egy kis módosított peptidet, RE(EDANS)-t használtuk a hasítási termék megjelenítésére. A fluoreszcens szubsztrátok minden egyes koncentrációjánál mértük a RE(EDANS) fluoreszcenciáját és a görbék meredekségének csökkenéséből számoltuk a konverziós faktort úgy, hogy az illesztett görbe kiindulási pontját az egységnyi pontra vonatkoztattuk.

4.1.3. Mikrotiter lemez alapú módszer

A fluoreszcens szubsztrátokat mikrotiter lemez alapú módszerrel is megvizsgáltuk, melyben az EDANS csoport fluoreszcenciája a szubsztrát hasítása után jelenik meg és válik detektálhatóvá. A fluoreszcens esszé körülményei némileg különböznek a HPLC módszerétől, mivel a magas sókoncentráció (2 M), melyet általában használtunk a retrovirális proteázok aktivitás mérésekor, zavarta a fluoreszcens jel detektálását. A mikrotiter lemez alapú fluoreszcens módszer validálásához a mérés befejeztével a reakcióelegy egy részét felinjektáltuk HPLC-re és a specificitási állandókat meghatároztuk a csúcsok alatti területek alapján is. A HPLC módszerrel nyert eredmények megegyeztek a fluoreszcens módszerrel nyert és a belső szűrő hatással korigált eredményekkel.

4.1.4. A HIV-1 és a HTLV-1 proteáz gátlási profiljának összehasonlítása

Kiválasztottunk néhány, már klinikai használatban lévő HIV-1 PR ellen tervezett és néhány HTLV-1 PR hasítási helyen alapuló inhibitor rendszerünk kipróbálására. A klinikumban használatos inhibitorok közül csupán az Indinavir gátolta a HTLV-1 proteázt. Két, a HTLV-1 hasítási helyén alapuló, sztatintartalmú peptidet is megvizsgáltunk, melyek közül az egyik peptid egyik proteázt sem gátolta, míg a másik a HTLV-1 proteáz mérsékelt gátlószere, ugyanakkor a HIV-1 PR elleni legjobb inhibitor a vizsgált HTLV-1 PR gátlószerek közül. A hasítható kötések helyén redukált peptidkötést tartalmazó új komponensek bizonyultak az eddig vizsgált legjobb HTLV-1 PR gátlószereknek.

4.2. Makromolekuláris HIV-1 proteáz inhibitorok vizsgálata

4.2.1. HIV-1 proteáz *in silico* mutagenézise

A vad típusú proteáz monomer és defektív monomer között valószínűleg akkor lenne a legnagyobb a kölcsönhatási energia, amikor a mutáns monomer felszíne hasonló a szubsztrátkötött vad típusú monomer felszínéhez. Mivel nagyon nehéz pontosan utánózni a kétláncú komplex felszínét (proteáz monomer + peptid szubsztrát) egy egyláncú mutáns

monomerrel, ezért a defektív monomer tervezése során csak a szubsztrát bekötődését próbáltuk megakadályozni a szubsztrátkötő helyre épített "fizikai akadállyal". Az "akadály" polaritása nem volt olyan fontos, mint a korábbi stratégiákban (szubsztrátkötött enzimek felszín utánzása), ezért szabadon választhattunk töltött vagy hidrofil aminosavat a mutáns monomer stabilitásának és oldékonyságának javítására.

A defektív monomer tervezésekor molekuláris mechanikai számításokat végeztünk a heterodimer proteáz intermonomer kölcsönhatásainak és a mutált monomerek teljes energiájának megállapítására úgy, hogy mind a 20 természetes aminosavat behelyettesítettük a 25. pozícióba, mivel a katalitikus aminosav (Asp25) helyettesítése tűnt a legcélszerűbb lépésnek az inaktív monomer létrehozására. Nem meglepő, hogy a pozitívan töltött aminosavak (Lys, Arg) adták a legjobb kölcsönhatási energia értékeket, melyek kedvező ion párt alkothatnak a vad típusú monomer Asp25-el. A monomer energiák tekintetében a Trp bizonyult a legkedvezőbbnek. Mivel az Asp25Lys és az Asp25Arg csere illetett legjobban a munkahipotézisünkbe, így ezeket választottuk ki további *in silico* mutagenézis vizsgálatokra.

Ezután a 49. pozíciót vizsgáltuk meg, mivel ez a flap régió csúcsán, a szubsztrátkötő hely tetején helyezkedik el. A vad típusú monomerben Gly található ezen a helyen, amit kicserélhetünk a legnagyobb aminosavra (Trp) anélkül, hogy ez károsan befolyásolná az elérni kívánt gátló hatást. Számításaink szerint a nagy hidrofób (Phe, Tyr) és a pozitívan töltött aminosavak (Lys, Arg) adtak kedvező intermolekuláris kölcsönhatási energia értékeket. Az előbb említett aminosavakat mégsem vettük figyelembe, mert hidrofobicitásuk nem illett a tervezési stratégiánkba ill. irodalomból márt ismertek voltak. Megállapítottuk, hogy a negatívan töltött aminosavak (Asp, Glu) erősítik a 25. pozícióban lévő lizinnel vagy argininnel kialakuló intramonomer kölcsönhatást és ezek a mutációk lényegesen nem változtatják meg az alegységek közötti kölcsönhatást. A hidrofil stratégiát figyelembe véve az Arg25-Glu49 kétszeres mutánst (PR_{RE}) választottuk ki a számítógépes mutagenézis következő körére és az *in vitro* kísérletekre.

Az Ile50 volt a következő mutálni kívánt aminosav, Craik és munkatársainak munkája alapján. Az Ile50 a flap régió csúcsán helyezkedik el és egy hidrofób fedőt képez a szubsztrát vagy az inhibitor tetején. Számításaink szerint ebben a pozícióban az Arg és a Lys kedvező intermonomer kölcsönhatási energiákat eredményezne. Az Arg/Lys hosszú és hajlékony lánc kölcsönhat a katalitikus vagy a 30. pozícióban lévő aszpartáttal, kedvező ionos kölcsönhatást eredményezve. Az 50. pozícióban arginint tartalmazó monomernek sokkal kedvezőbb az összenergiája, mint a lizint tartalmazónak, ezért az Arg25-Glu49-Arg50 tripla mutánst (PR_{RER}) szintén kiválasztottuk az *in vitro* vizsgálatokra.

A megnövelt hidrofób kölcsönhatási felülettel rendelkező monomer előállításához (hidrofób stratégia) a PR_{KWW} mutánst módosítottuk úgy, hogy a 25. pozícióban lévő aszpartátot hidrofób triptofánra cseréltük (PR_{WWW}). Számításaink szerint a Trp25-nek volt a legjobb a monomer energiája és a Trp49 és Trp50 aminosavakkal kedvező aromás-aromás kölcsönhatást alakíthat ki.

4.2.2. *In vitro* gátlásvizsgálatok

A mutagenézisek elvégzése után a fehérjéket *E. coli* BL21(DE3) törzsben expresszáltuk, majd inklúziós testekből tisztítottuk. A vad típusú PR aktivitását különböző mennyiségű mutáns proteáz jelenlétében mértük a laboratóriumunkban kidolgozott mikrotiter lemez alapú fluoreszcens módszer segítségével. Az eredményeket a mutánsokkal megegyező mennyiségű PR₅₋₉₅ jelenlétében mért aktivitás értékekhez viszonyítottuk. Ez a csonkolt proteáz N- és C-terminális deléciókat tartalmaz, ennek ellenére a térszerkezete a natív monomerhez hasonló, viszont inaktív, mert nem képes dimerizálódni. A PR_{WWW} gyenge dóziszfüggő gátlást mutatott, míg a PR_{RE} és a PR_{RER} mutánsok hasonló gátló hatással rendelkeznek, mint a már korábban leírt PR_{KWW} mutáns.

Bizonyítani kívántuk, hogy a fentiekben tapasztalt gátló hatás oka a PR és a mutáns monomerek közötti specifikus kölcsönhatás. Kísérleteink szerint a Ni-kelát gyantán immobilizált vad típusú proteáz képes specifikusan megkötni az oldatban lévő PR_{RER} fehérjét. A PR_{RE} és a PR_{KWW} esetén szintén megtörténik a specifikus heterodimerizáció.

4.2.3. *NMR* vizsgálatok

A PR_{RE} és PR_{RER} monomerek foldingjának és dimerizációjának vizsgálatára, illetve annak eldöntésére, hogy képeznek-e heterodimert a vad típusú proteázzal, Ishima és mtsai által leírt egyszerű folding protokollt és ¹H-¹⁵N HSQC spektrum felvételére alkalmas mérési módszert használtuk. Az ¹⁵N-jelölt PR_{RER} HSQC spektruma egy feltekeredett monomerre jellemző képet mutatta, azonban a spektrum bizonyos tartományában észlelt jelek a fehérje egy részének fel nem tekeredett voltára is utaltak. Ezzel szemben egyenlő mennyiségű jelöletlen vad típusú PR jelenlétében megjelent néhány, csak a dimer proteázra jellemző szignál is. Bár a spektrumban látható összes jel megfejtéséhez további NMR vizsgálatok szükségesek, a heterodimerizáció ténye nem kétséges. Hasonló NMR vizsgálatokat végeztünk a ¹⁵N-jelölt PR_{RE} mutánssal is. A PR_{RER} proteáztól eltérően PR_{RE} ¹H-¹⁵N HSQC spektruma a vad típusú PR nélkül nagyon gyenge jelet adott és a feltekeredett fehérjének megfelelő

szignálok nem voltak egyértelműek. A vad típusú PR jelenlétében azonban a PR_{RE} is teljesen feltekeredett és heterodimert képezett a vad típusú proteázzal.

4.2.4. A fertőzőképesség gátlásának vizsgálata

A vad típusú és mutáns proteázokat is tartalmazó vírus részecskék fertőzőképességének vizsgálatához egy harmadik generációs HIV-1 vektorrendszert használtunk. Vektorrendszerünket négy különböző plazmid alkotja. A pWOX-GFP a transzfer vektor, melyet a célgén, jelen esetben a GFP bejuttatásához használtunk. A hatékonyság növelése érdekében módosítottuk a konstrukció eredeti promóterét, a CMV promóter GFP szekvencia elé történő beillesztésével. Az így kapott plazmidot pWOX-CMV-GFP-nek neveztük el. A pMDLg/pRRE csomagoló plazmidról íródna át a Gag és GagPol poliproteinek a transzfektált sejtekben a CMV promóter kontrollja alatt, a Rev fehérje jelenlétében, amely egy másik plazmidról, a pRSV.rev-ről íródik át. A negyedik konstrukció a pMD.G, mely a Vesicular Stomatitis Vírus G fehérjéjét kódolja. A pMDLg/pRRE plazmidot helyspecifikus mutagenézissel módosítottuk, hogy a kívánt mutációkat bejuttassuk a proteáz régióba. Majd 293T sejteket transzfektáltunk a különböző konstrukciók azonos mennyiségű plazmidjaival és a termelődött vírus részecskéket Western blottal analizáltuk CA-ellenes antitest felhasználásával. A PR_{RE} és a PR₅₋₉₅ mutáns esetében a Gag (és feltételezhetően a GagPol) expressziója nagyon gyenge volt, így ezeket a konstrukciókat a továbbiakban nem vizsgáltuk. A vad típusú proteáz teljesen elhasította a Gag és GagPol poliproteineket, míg a PR_{RER} és PR_{KWW} mutánsokat hordozó vírusokban nem figyeltünk meg hasítást. A mutáns és a vad típusú proteáz kódoló plazmidok 2:1 arányú keverékével is transzfektáltuk a 293T sejteket. A termelődött vírus oldatok koncentrációját azonosra állítottuk be a p24 mennyiségének meghatározása alapján. 293T sejteket fertőztünk azonos p24-tartalmú vírus oldatokkal, majd a GFP-t expresszáló sejtek számát áramlási citométerrel határoztuk meg. A kontroll kísérletekben lazac sperma DNS-t használtunk, melyben a sejtek 97%-a megfertőződött. Ezen kísérletek jól igazolták a fertőzési protokollunk hatékonyságát. A PR_{KWW} vagy PR_{RER} proteineket hordozó vírus részecskék fertőzőképessége drámaian lecsökkent.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A doktori értekezésemben bemutatott munkáimban célul tűztük ki egy nagy áteresztőképességű és gyors mikrotiter lemez alapú fluorometriás módszer kidolgozását, mely alkalmas különböző retrovirális proteázok aktivitásának és gátlási állandóinak közvetlen összehasonlítására, illetve részben ezen módszerre alapozva, új típusú makromolekuláris HIV-1 PR inhibitorok tervezését, előállítását és tesztelését.

Összefoglalásul elmondhatjuk, hogy a munkánk során kidolgozott fluorometriás módszer egy jó alternatíva lehet a hagyományos HPLC-alapú módszer mellett, mivel gyors és egyszerre nagy számú minta kezelését teszi lehetővé. Módszerünket a hagyományos HPLC-alapú módszerrel validáltuk vad típusú HIV-1 és HTLV-1 proteázok, valamint EDANS és DABCYL csoportokat hordozó új tervezésű szubsztrátok felhasználásával. Kidolgoztunk egy új eljárást a fluoreszcens donor és akceptor csoportokat egyszerre hordozó szubsztrátok mérése esetén fellépő belső szűrő hatás korrekciójára. Az új módszer segítségével összehasonlítottuk a HIV-1 és a HTLV-1 proteázok gátlási profilját néhány, már klinikai használatban lévő HIV-1 PR ellenes és néhány, a munkacsoportunk által tervezett HTLV-1 PR inhibitor felhasználásával. Módszerünket későbbiekben sikerrel alkalmaztuk más vad típusú és mutáns retrovirális proteázok esetében is (Kádas és mtsai, 2004; Fehér és mtsai, 2006; Sperka és mtsai, 2007).

A továbbiakban a szubsztrátkötő helyen hidrofil, hidrofób és töltött aminosavakat hordozó mutáns HIV-1 proteázokat terveztünk és vizsgáltunk. A mutációk *in silico* megtervezése után elkészítettük és megtisztítottuk a fehérjéket, majd teszteltük azok *in vitro* és sejtkultúras kísérletekben mutatott gátló hatását. A töltött aminosavakat hordozó mutánsaink, amelyek a HIV-1 proteáz ellen tervezett makromolekuláris inhibitorok egy új generációját képviselik, dóziszfüggő, specifikus, transz domináns gátló hatást mutattak kísérleteinkben. Elsőként detektáltuk egy vad típusú retrovirális proteáz és egy transz domináns negatív mutáns heterodimerizációját NMR spektroszkópiával. Az Asp25Arg és a Gly49Glu csere egyéb retrovirális proteázokban is gátló hatást eredményezhet a vad típusú proteázzal szemben, mivel ezen aminosavcserek célpontjai a hidrolitikus aktivitáshoz elengedhetetlen katalitikus aszpartátok.

6. KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

Az értekezéshez felhasznált közlemények:

- Miklóssy, G.**, Tózsér, J., Kádas, J., Ishima, R., Louis, J.M., Bagossi, P. (2008) Novel macromolecular inhibitors of HIV-1 protease. *Prot. Eng. Design and Selection*, May 13 (Epub ahead of print). I.F.: **3,000**
- Bagossi, P., Kádas, J., **Miklóssy, G.**, Boross, P., Weber, I.T., Tózsér, J. (2004) Development of a microtiter plate fluorescent assay for inhibition studies on the HTLV-1 and HIV-1 proteinases. *J. Virol. Methods*, 119, 87-93. I.F.: **1,938**

Egyéb közlemények:

- Kádas, J., Weber, I.T., Bagossi, P., **Miklóssy, G.**, Boross, P., Oroszlan, S., Tózsér, J. (2004) Narrow substrate specificity and sensitivity toward ligand binding site mutations of human T-cell leukemia virus type-1 protease. *J. Biol. Chem*, 279, 27148-27157. I.F.: **6,696**
- Bagossi, P., Sperka, T., Fehér, A., Kádas, J., Zahuczky, G., **Miklóssy, G.**, Boross, P., Tózsér, J. (2004) Amino acid preferences for a critical substrate binding subsite of retroviral proteases in type 1 cleavage sites. *J. Virol.*, 79, 4213-4218. I.F.: **5,398**
- Fehér, A., Boross, P., Sperka, T., **Miklóssy, G.**, Kádas, J., Bagossi, P., Oroszlan, S., Weber, I.T., Tózsér, J. (2006) Characterization of the murine leukemia virus protease and its comparison with the HIV-1 protease. *J. Gen. Virol.*, 87(Pt 5), 1321-1330. I.F.: **3,221**
- Sperka, T., **Miklóssy, G.**, Tie, Y., Bagossi, P., Zahuczky, G., Boross, P., Weber, I.T., Harrison, R.W., Tózsér, J. (2007) Bovine leukemia virus protease: comparison with human T-lymphotropic virus and human immunodeficiency virus proteases. *J. Gen. Virol*, 88(Pt 7), 2052-2063. I.F.: **3,221**

Az értekezéshez kapcsolódó előadások és poszterek:

- Miklóssy, G.**, Boross, P., Kádas, J., Fehér, A., Sperka, T., Tózsér, J., Bagossi, P.: Development of a microtiter plate fluorescent assay for inhibition profiling of retroviral proteases. 31st FEBS Congress, Istanbul, Turkey, June 24-29, 2006.
- Miklóssy G.**, Matúz K., Kádas J., Tózsér J., Bagossi P.: Transz domináns negatív HIV proteáz gátló hatása. A Magyar Biokémiai Egyesület 2006. évi vándorgyűlése, Pécs, 2006. augusztus 30-szeptember 02.

Miklóssy G., Kádas J., Matúz K., Tózsér J., Bagossi P.: Mutáns HIV-1 proteázok transzdomináns gátló hatása. A Magyar Biokémiai Egyesület 2007. évi vándorgyűlése, Debrecen, 2007. augusztus 26-29.

Miklóssy G., Boross P., Kádas J., Fehér A., Sperka T., Bagossi P. and Tózsér J.: High-throughput assay for inhibition profiling of retroviral proteases. Bridges in Life Sciences, Annual Scientific Review Meeting of the Regional Cooperation for Health, Science and Technology Consortium, Pécs, October 5, 2007.

Miklóssy G., Boross P., Tózsér J., Bagossi P.: Development of a microtiter plate fluorescent assay for testing dominant negative inhibitors of HIV-1 protease. 6th European HIV Drug Resistance Workshop, Budapest, March 26-28, 2008.

Egyéb poszterek:

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

Kádas, J., Weber, I.T., Bagossi, P., Boross, P., **Miklóssy, G.**, Louis, J.M., Copeland, T.D., Tózsér, J.: Alteration of the substrate specificity of Human T-cell Leukemia Virus Protease. Meeting on Retroviruses 2003., Cold Spring Harbor, USA, May. 20-25, 2003.

Eizert, H., Bagossi, P., Sperka, T., Fehér, A., Kádas, J., Zahuczky, G., **Miklóssy, G.**, Boross, P., Tózsér, J.: Amino acid preferences for P1 and P4 sites of retroviral proteases in type 1 cleavage sites. 30th FEBS Congress, Budapest, Hungary, July 2-7, 2005.

Benkő S., Tózsér J., **Miklóssy G.**, Kádas J., Csutak A., Berta A., Rajnavölgyi É.: Constitutive and UV-B induced expression of Nod-like receptors and their functional partners in human corneal epithelial cells. Pattern-recognition receptors in human disease. A Biochemical Society Focused Meeting, Cambridge, UK, August 8 – 10, 2007.

Kádas J., Benkő Sz., **Miklóssy G.**, Csutak A., Tózsér J.: Korneális sebgyógyulás biokémiai hátterének és az UV sugárzás hatásának vizsgálata. A Magyar Biokémiai Egyesület 2007. évi vándorgyűlése, Debrecen, 2007. augusztus 26-29.