

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

A humán immundeficiencia vírus és az egér leukémia vírus proteináz működési sajátosságainak *in vitro* tanulmányozása

Fehér Anita

Témavezető: Dr. Tózsér József

**Debreceni Egyetem
Orvosi- és Egészségtudományi Centrum
Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet
Debrecen
2004**

1. BEVEZETÉS

1.1. A retrovirális proteinázok szerepe a vírusok életciklusában

A különböző retrovírusok által kódolt, homodimer formában aktív proteinázok (PR) tulajdonságait szerkezetvizsgálati és biokémiai módszerek alkalmazásával intenzíven tanulmányozzák. Az ezirányú kutatások fő hajtóerejét elsősorban a ma még gyógyíthatatlan betegség, a szerzett immunhiányos szindróma (AIDS) elleni gyógyszerfejlesztés során potenciálisan felhasználható ismeretek bővítésére irányuló törekvés jelenti.

A retrovirális proteinázok elsőként felismert szerepe a vírus életciklusában a Gag és a Gag-Pro-Pol prekursor fehérjék funkcionális részekre történő hasítása volt. Feltételezhető azonban, hogy különféle virális illetve celluláris fehérjék hasítása által a retrovirális proteináz szerepet játszik a vírusfertőzés korai fázisában is. Kimutatták, hogy a ló vészes vérszegénységét okozó vírus (EIAV) esetén a kapszidban lévő nukleokapszid protein (NC) elhasad a vírus RNS reverz transzkripciója során. Több celluláris fehérjéről is kiderült, hogy szubsztrátjai a HIV-1 proteináznak, ami szintén szerepet játszhat a vírus patogenitásában; de a virális proteináznak a fertőzés korai fázisában betöltött szerepét pontosan még nem ismerjük

A retrovirális életciklus késői fázisában a provírus a celluláris RNS polimeráz II. segítségével RNS-sé íródik át, ezután az újonnan képződő mRNS-ek a citoplazmába kerülve templátként szolgálnak a Gag illetve Gag-Pro-Pol poliproteinek translációjához. A *gag* gén a vírus szerkezeti fehérjéit (MA: mátrix protein, CA: kapszid protein, NC: nukleokapszid protein), a *pol* pedig a replikációs enzimeket (RT: reverz transzkriptáz, IN: integráz) kódolja. A proteináz génje (*pro*) a Gag és Pol fehérjéket kódoló szekvenciák között lokalizálódik a genomban. A vírusgénnek expressziója vírustól függően, különböző módon történhet. Például az emlős C típusú retrovírusok esetében (MuLV) a Gag és Pro-Pol génjei azonos leolvasási keretben vannak, de stop-kodon választja el őket egymástól, mely a transláció során időnként szupresszálódik. A madár mieloblasztóma vírus (AMV) esetén is azonos a *gag* és *pro* leolvasási keret, az elválasztó stop-kodon hiánya miatt azonban a proteináz a szerkezeti fehérjéket kódoló szekvenciákkal ekvivalens mennyiségben íródik át. A többi retrovírusban a *gag*, *pro* és *pol* gének külön leolvasási keretben vannak kódolva, ilyenkor az enzimfehérjék -1 irányú kereteltolódással átíródó mRNS-ről szintetizálódnak (HIV-1, BLV, HTLV). A különböző kódolási lehetőségek eredményeként a Pro és Pol enzimfehérjék a szerkezeti fehérjékhez képest általában csak lényegesen kisebb mennyiségben (5-10%) szintetizálódnak.

A Gag és Gag-Pro-Pol poliproteinek a gazdasejt membránjának burokkfehérjében (Env) koncentrált részein, annak belső felületénél csoportosulva a vírus genomi RNS-ével együttesen éretlen részecskébe rendeződnek, és lefűződnek a sejtről. A virális replikáció késői szakaszának utolsó lépésében a lefűződő vírusrészecske egy érési folyamaton megy keresztül, mely a proteináz enzim ma még nem ismert módon történő aktiválódásával kezdődik. A Gag illetve Gag-Pro-Pol prekursor poliproteinek funkcionális vírusfehérjékké történő processzálása révén a vírus fertőzőképesé válik, a proteináz funkció nélkül viszont éretlen marad, nem lesz képes újabb sejtek fertőzésére. Ezen alapulnak a különböző proteináz-gátlók alkalmazásával megvalósuló antiretrovirális próbálkozások.

1.2. A retrovirális proteinázok általános jellemzése

A retrovirális proteinázok 99-138 aminosavból álló, 11-15 kDa molekulatömegű fehérjék, két egyforma alegységből épülnek fel. Elsődleges és másodlagos szerkezetük a celluláris aszpartil proteinázok egyik doménjével analóg.

A konzervatív régiók közül az N-terminálishoz közel helyezkedik el az aktív centrumot kódoló katalitikus triád (Asp-Thr/Ser-Gly). Az ezt alkotó aminosavak konformációja minden ismert kristáyszerkezetben azonos. A katalitikus triplet hidrogén kötések hálózatán keresztül kapcsolódik egymáshoz, melyet a kötés geometriájára és erős jellegére utalva tűzoltófogásnak (fireman's grip) neveznek. Egy másik többé-kevésbé konzervatív régió a flexibilis „flap” régió, mely a szubsztrát illetve inhibitor kötődésekor ráhaljlik a ligandra, majd azzal számos kölcsönhatást alakít ki, ezáltal stabilizálja a komplexet. A harmadik konzervatív régió (Gly-Arg-Asp/Asn) a C-terminális közelében helyezkedik el és ionpárok kialakításával a dimerizációban játszik fontos szerepet.

A retrovirális proteinázok savas pH optimumú (pH 5-6) enzimek, részletes biokémiai jellemzésüket oligopeptid és poliprotein szubsztrátokon végezték. A hasítás poliprotein szubsztrátoknál alacsony, oligopeptidek esetében magas (2-3 M NaCl) ionerősség mellett történik nagyobb hatékonysággal. A különböző retrovirális hasítási helyeket reprezentáló oligopeptid szubsztrátok hidrolízise jól nyomon követhető HPLC technikával, és megfelelően módosított szubsztrátok alkalmazása esetén spektroszkópiásan vagy fluorimetriásan is. Az effektív hidrolízishez proteináztól függően minimálisan 6-7 tagú peptidszakasznak kell az enzimhez kötődnie.

1.3. A HIV-1 proteináz mint antivirális célpont az AIDS terápiájában

A HIV-1 reverz transzkriptáz és HIV-1 proteináz ellen tervezett gátlószerek különböző kombinációkban történő alkalmazása (HAART, highly active antiretroviral therapy) képes jelentősen lecsökkenteni a HIV fertőzött betegek halálozását, azonban nem eredményezi a vírusnak a fertőzött szervezetből történő teljes eliminálását, ezért a vírus-szint alacsonyan tartása érdekében hosszútávú terápia szükséges. Ez több kedvezőtlen következménnyel is jár, melyek közül legsúlyosabb az alkalmazott gátlószerekkel szemben rezisztens vírusformák megjelenése és gyors elszaporodása a terápia idején; amelyet a retrovírusok magas mutációs rátája és rekombinációs képessége tesz lehetővé. Ezért szükség szerű a további gyógyszerfejlesztés, mely elsősorban a már bevált célfehérjék (RT, PR) ellen ható, de az eddigieknél előnyösebb tulajdonságokkal rendelkező inhibitorok tervezésére, másfelől a vírusreplikáció egyéb lépéseit gátló szerek kifejlesztésére irányul. Mindebben hasznos segítséget nyújthat az alkalmazott drogokkal szembeni rezisztencia kialakulásában szerepet játszó genetikai háttér tényezők feltérképezése.

1.3.1. HIV-1 proteináz inhibitorok

A jelenleg klinikai használatban lévő HIV-1 PR gátlószerek mindegyike szubsztrátanalóg (peptidomimetikum). A természetes szubsztrátokhoz hasonlóan döntően hidrofób kölcsönhatásokat alakítanak ki az enzimmel. P1

pozícióban¹ fenil csoportot hordoznak, további közös tulajdonságuk, hogy a hasítandó kötésnek megfelelő helyen egy nem-hidrolizáló átmeneti állapotot utánzó csoportot (pl. hidroxietilamin) tartalmaznak.

1.3.2. A rezisztencia problémája

Az antivirális terápia gyakori sikertelenségének legfőbb oka az alkalmazott gátlószerekkel szemben rezisztens vírusformák megjelenése és elszaporodása a kezelés idején. Ezért elsősorban a proteináz kódoló régióban kialakuló mutációk tehetőek felelőssé, melyek közül számos az enzim szubsztrátkötő zsebén belül lokalizálódik. Ezek amellet, hogy gátolják az inhibítorkötődést, többnyire kedvezőtlenül befolyásolják az enzim katalitikus hatékonyságát. A rezisztens mutációk egy másik csoportja a szubsztrátkötő zseben kívül található aminosavakat érinti. A mutációk halmozása azonban az enzimefunkció által limitált, a megfelelő Gag és Gag-Pro-Pol hasítási helyek kellő hatékonyságú hidrolízise ugyanis elengedhetetlen a vírusreplikációhoz.

Egyes adatok alapján viszont úgy tűnik, hogy a PR gátlószerek jelenlétéből adódó szelekciós nyomás a lerontott enzimaktivitást ellensúlyozó változásokat is indukálhat.

1.4. Az egér leukémia vírus (MuLV) vizsgálatának gyakorlati jelentősége

Az egér leukémia vírus (MuLV) az emlős C-típusú retrovírusok (újabb nevezéktan szerint γ -retrovírusok) tipikus képviselője, eredetileg BALB/c egerek szarkómájából izolálták. Újszülött egérbe juttatva 3 hónap alatt limfoid leukémia fejlődik ki.

Az alapvető retrovírusmodellként is számontartott egér leukémia vírus (MuLV) komoly gyakorlati jelentősége ellenére csak viszonylag keveset tudunk róla, különösen kevés információval rendelkezünk a vírus által kódolt proteinázra vonatkozóan.

1.4.1. Génterápiás felhasználás

Génterápia során különböző genetikai eredetű betegségeket próbálunk orvosolni a megfelelő információt hordozó DNS molekulának a beteg sejtekbe történő bejuttatásával. A retrovírusok sajátos életciklusa alkalmassá teszi őket génterápiás célú felhasználásra. A replikációjukhoz szükséges integrációs mechanizmusuk minden egyéb módszerhez képest (DNS mikroinjekció, lipofekció, elektroporáció, kémiai transzfekció) hatékonyabb géntranszfert tesz lehetővé. A virális genom jelentős része géntechnológiai úton egyszerűen kicserélhető a terápiás céllal bejuttatni kívánt génszekvenciára. A virális burokképlete (Env) változtatásával meghatározható a célsejtspektrum, mely kellően szelektív génterápiás eljárások kidolgozására kínál lehetőséget. A mára klinikai alkalmazásba került retrovirális vektorok közül a HIV-en alapulóak mellett kétségkívül az egér leukémia vírus módosításával kifejlesztett vektorok a legjelentősebbek.

¹ 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.

1.4.2. Inhibitorfejlesztés

A retrovirális proteinázok vírusreplikációban betöltött, esszenciális szerepe miatt a HIV-1 proteináz ígéretes célfehérjévé vált az AIDS terápiájában. Mára már több, HIV-1 proteináz ellen kifejlesztett inhibitor került klinikai felhasználásra, de a rezisztens formák gyors megjelenése és kisselektálódása miatt további inhibitor-fejlesztésre van szükség. A különböző retrovirális proteinázok összehasonlító vizsgálata révén megismerhetjük ezen enzimek specificitásának közös jellemvonásait. A mindeddig csak kevésbé vizsgált és jellemzett MuLV bevonásával nyerhető ismeretek hasznos segítséget nyújthatnak az újabb gátlókterek tervezésében.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Az AIDS elleni terápia során alkalmazott PR inhibitorokkal szembeni rezisztencia kialakulásáért kezdetben szinte kizárólag a proteináz mutációit tették felelőssé. Az általánosan elfogadott nézet szerint ezen mutációk egy része az enzim aktív centrumán belül lokalizálódó primer mutáció, melyek az inhibitor kötődésének gátlásán keresztül vezetnek a gyógyszerrezisztencia kialakulásához, de többnyire kedvezőtlenül befolyásolják az enzim katalitikus hatékonyságát. Ezek a primer mutációk további, az enzim aktív centrumán kívül elhelyezkedő mutációk megjelenését indukálják, melyek közvetlenül nem befolyásolják az inhibitor kötődését, viszont többnyire jótékony hatást gyakorolnak az enzim katalitikus hatékonyságára. Az utóbbi időszak kutatásai kimutatták, hogy a rezisztencia kialakulása során megjelennek mutációk a virális genomnak a proteinázt kódoló régióján kívül eső területein is. Ezek a változások leginkább két Gag hasítási helyet, az NC/p1 illetve p1/p6 helyeket érintik. E két helyre inhibitorok nélkül is szignifikáns szekvencia-polimorfizmus jellemző, valamint hidrolízisük a poliprotein processzálas sebességmeghatározó lépésének számít.

Munkánk során a vad típusú és különböző mutáns HIV-1 proteinázok kinetikai vizsgálatát terveztük az NC/p1 és p1/p6 hasítási helyek eredeti illetve különféle mutált változatait reprezentáló oligopeptid szubsztrátok alkalmazásával. Mivel a rezisztens Gag mutációk közvetlenül egy, vagy néhány kritikus proteináz mutáció kialakulását követően jelennek meg, ezért csak az előforduló mutációk valamelyikét hordozó, egyszeresen mutáns enzimformákat tanulmányoztunk. Ezek egy része primer mutációt tartalmazó aktív centrum-mutáns volt (V82S, V82A, I84V), a többiek az enzim egyéb régióiban lokalizálódó szekunder mutációt hordozó variánsok voltak (M46L, L90M). Az NC/p1 és p1/p6 helyek szekvencia polimorfizmusát és/vagy terápia során megjelenő mutációit reprezentáló oligopeptid szubsztrátoknak a vad típusú illetve mutáns HIV-1 proteinázokkal történő vizsgálatával kívántuk alátámasztani, hogy az inhibitorok jelenlétében kialakuló Gag hasítási hely mutációk a primer proteináz-mutációk által lerontott enzimfunkciót kompenzációs mutációkként ellensúlyozó, a gyógyszerrezisztencia kialakulásához jelentős mértékben hozzájáruló változásoknak tekinthetők.

Az alapvető retrovírusmodellként is számontartott egér leukémia vírust (MuLV) komoly gyakorlati jelentősége ellenére is csak kevésbé vizsgálják. Különösen kevés ismerettel rendelkezünk a vírus által kódolt proteinázra vonatkozóan. Ezért azt terveztük, hogy az egyéb fehérjék esetében (HIV-1-PR, BLV-PR, HFV-PR) már jól bevált pMalc2 rendszerben próbáljuk előállítani az MuLV proteinázt. A pMalc2 expressziós rendszerben a fehérjék maltóz kötő proteinnel (MBP) fúziós formában termelődnek, mely azon túl, hogy egy amilóz oszlopon történő affinitás kromatográfiás lépést tesz lehetővé (elősegítvén ezáltal a rekombináns fehérje tisztítását), segíti a vele fúzióban lévő fehérjepartner foldingját is az expresszió során. Az MuLV-PR-t kódoló cDNS szekvencia pMalc2 plazmidba való klónozásán és az expresszált fehérje tisztításán kívül tervbe vettük az enzim részletes jellemzését, a víusból izolált MuLV proteinázzal illetve a HIV-1 proteinázzal történő összehasonlító vizsgálatát is.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Vad típusú és mutáns HIV-1 proteinázokat kódoló konstrukciók, és az enzimek tisztítása

A pET vektorba klónozott, stabilizációs mutációkat tartalmazó (Q7K, L33I, L63I, C67A, C95A) HIV-1 proteinázt *E. coli*ban expresszálták és inklúziós testből tisztították. Ezt a klónt használták templátként a mutáns proteinázokat kódoló, irányított mutagenézissel létrehozott konstrukciók előállításához. A mutációkat szekvenálással ellenőrizték. Az expresszált enzimeket a vad típusú proteinázra korábban kidolgozott eljárás alapján tisztították.

3.2. Az MuLV proteinázt kódoló pMalc2 konstrukciók előállítása

A proteinázt kódoló régiót a teljes hosszúságú MuLV cDNS-t tartalmazó klónból PCR reakcióban szaporítottuk fel, az 5' oldalon tompa véggel, a gag terminációs kód mutációját (TAG→CAG) tartalmazó primerrel, a 3' végen egy stop kodont és egy *EcoRI*. restrikciós hasítási helyet kódoló oligonukleotid felhasználásával. A PCR terméket a megfelelő restrikciós emésztést követően *XmnI*/*EcoRI*. enzimekkel hasított és calf intestinal phosphatase (CIP) enzimmel defoszforilált pMalc2 plazmidba ligáltuk, és a restrikciós analízissel valamint szekvenálással ellenőrzött konstrukciót DH5 α illetve BL21 sejtekbe transzformáltuk.

A C-terminális His₆ farokkal fúziós formát expresszáló vektort (pMBP-MPR-H₆) a fenti konstrukció stop kodonjának mutációjával és egy Xa faktor hasítási helyet illetve hat hisztidint kódoló oligonukleotid-párnak a *BamHI*/*HindIII*. enzimekkel megemésztett, mutáns pMBP-MPR plazmidba történő ligálásával állítottuk elő. A stop kodon mutációt illetve az aktív centrum mutáns konstrukcióhoz szükséges D32A mutációt Quick Change mutagenézis protokoll segítségével alakítottuk ki, és mindegyik konstrukciónkat szekvenálással ellenőriztük.

3.3. Az MuLV proteináz expressziója és a fehérje tisztítására szolgáló eljárások

A pMBP-MPR konstrukcióval transzformált DH5 α és BL21 sejteket 100 μ g/ml ampicillin (pRIL plazmiddal történő kotranszfecció esetében ezenfelül 30 μ g/ml chloramphenicol) jelenlétében, LB médiumban növesztettük, majd 1 mM IPTG-vel indukáltuk. Az expressziót követően a sejteket centrifugáltuk, és bakteriális proteázinhibitor-koktél tartalmazó lízis pufferben szuszpendáltuk. A szonikálással történő feltárá után a szuszpenziót centrifugáltuk, és a felülúszóba került fúziós fehérjét amilóz oszlopon történő affinitás kromatográfiával választottuk el a bakteriális fehérjétől. Az oszlopra kötődött fehérjét 20 mM maltózt tartalmazó lízis pufferrel eluáltuk, és ezt követően az MuLV proteinázt Xa faktorral szabadítottuk fel a fúziós formából. A processzált proteinázt kationcserélő oszlopon választottuk el a maltózkötő fehérjétől; ennek során a proteináz a kis mennyiségben visszamaradó fúziós formával együtt eluálódott. Teljesen tiszta proteinázhoz egy második amilóz affinitás kromatográfia átfolyó frakcióinak koncentrálásával, és az ezzel egyidejűleg végzett puffercserével jutottunk. A tiszta enzimet PL pufferben (20 mM Pipes, pH 7.0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 10% glicerol, 5% etilén glikol, 0.5% Nonidet P-40 és 10 mM DTT) tároltuk.

A vad típusú és D32A aktív centrum mutáns proteináz His-farokkal fúziós formáit kódoló konstrukciókat, illetve a kontrollként használt, MBP-H₆-t expresszáló plazmidot a baktériumsejtekben ritkán előforduló tRNS-eket kódoló pRIL plazmiddal együtt transzformáltuk DH5 α és BL21 sejtekbe, az expresszió és

a sejtfeltárás az előzőekben leírtaknak megfelelően történt. A baktériumszuszpenzió centrifugálása során a felülúszóba került fúziós fehérjéket első lépésben Ni-kelát oszlopon történő affinitás kromatográfiával tisztítottuk. A 250 mM imidazolt tartalmazó ekvilibráló pufferrel eluált fúziós proteineket puffercserét követően Xa faktorról processzáltuk, majd az MBP-eredetű fehérjefragmentumok egy részét 1.5 M ammónium szulfáttal történő kisózás útján távolítottuk el. A kisózás során oldatban maradó proteinázt puffercserét követően katicserélő kromatográfiával sikerült megtisztítanunk. A tiszta proteinázt tartalmazó eluátum pufferét végül PL pufferre cseréltük.

3.4. Az MuLV proteináz izolálása vírustól

1 ml vírusszuszpenzióhoz 20 térfogat hideg acetont adtunk, és 30 percig jégen tartottuk. Centrifugálást követően a leülepedett pelletet kiszárítottuk, majd 2 ml extrakciós puffer (20 mM Tris, pH 7.2, 5 mM DTT, 1 M NaCl) hozzáadásával oldottuk vissza. Az extraktum centrifugálását követően a proteinázt is tartalmazó felülúszó pufferét PL pufferre cseréltük.

3.5. MuLV Gag fehérjefragmensek klónozása, tisztítása és proteolízise

A különböző hosszúságú MuLV Gag fragmenseket (Gag Δ 1 és Gag Δ 2) a teljes MuLV cDNS-t tartalmazó klónból PCR reakció segítségével szaporítottuk fel. Az 5' végi primerek *SacI*. restriktions hasítási helyet, és a megfelelő genomi régiókkal hibridizáló szekvenciát tartalmazták, a 3' végen pedig egységesen a *gag* terminációs kód környéki régióval hibridizáló, de a stop kodon helyén a Gln tripletjét, valamint egy *HindIII*. felismerési helyet is tartalmazó primert használtunk. A *SacI*. és *HindIII*. enzimekkel emésztett PCR fragmenseket az azonos enzimekkel meghasított és CIP kezeléssel defoszforilált pET23b vektorba ligáltuk. A konstrukciókat restriktions analízissel és DNS szekvenálással ellenőriztük, majd BL21(DE3) sejtekbe transzformáltuk. A fehérjeexpressziót 1 mM IPTG hozzáadásával indukáltuk, és két óra eltelté után a centrifugálással összegyűjtött sejteket lizozimmal illetve szonikálással tártuk fel. Az expresszált fehérjéket Ni-kelát affinitás kromatográfiával, majd egy azt követő, Superdex 75 oszlopon végzett gélszűréssel tisztítottuk meg. A kitermelési százalék 3.7 mg/l kultúrának adódott a Gag Δ 1, és 9.2 mg/l kultúrának a Gag Δ 2 fehérje esetén. A proteolitikus emésztést 250 mM Na-foszfát, pH 5.6, 1 mM EDTA összetételű pufferben végeztük, 0.6 μ M Gag Δ 1 és 1.2 μ M Gag Δ 2 fehérjeszubsztráttal, 20 nM MuLV PR, illetve 33 nM HIV-1 proteináz jelenlétében.

3.6. Oligopeptidek

3.6.1. A spektrofotometriás mérésnél használt peptidet (Lys-Ala-Arg-Val-Nle-p-nitroPhe-Glu-Ala-Nle-amide) a Sigma-Aldrich kft.-től szerztük be (L6525).

3.6.2. A fluoreszcens mérésnél alkalmazott peptidet (MuLVp12/CA: RE(Edans)SQAFPLRAK(Dabcyl)R-OH) Dr. Ivo Blaha (Ferring Leciva) szintetizálta és bocsájtotta rendelkezésünkre.

3.6.3. A HPLC alapú mérésnél használt oligopeptideket szilárd fázisú peptidszintézissel készítették, Model 430A automata peptid szintetizátorral (Applied Biosystems, Inc.) vagy félautomata Vega peptid szintetizátorral (Vega-Fox Biochemicals). A tisztításhoz reverz fázisú HPLC-t használtak. A peptideket aminosav analízissel, illetve

alkalmanként gázfázisú szekvenálással ellenőrizték. A törzsoldatok desztillált vízzel vagy 10 mM DTT-oldattal készültek, a pontos koncentrációt aminosavanalízissel határozták meg.

3.7. A retrovirális proteinázok enzimaktivitásának mérésére alkalmas eljárások

3.7.1. Spektroszkópiás módszer az MuLV proteináz pH függésének vizsgálatára

70 nM tisztított proteinázt adtunk 100-350 μ M kromogén szubsztráthoz. A reakciókat META pufferben (50 mM MES, 100 mM Tris, 50 mM nátrium acetát, 1 M NaCl) végeztük, 10 percig 37 °C-on, különböző pH (3-7) értékeknél. A 310 nm-en bekövetkező abszorbanciacsökkenést Hitachi U-3000 spektrofotométerrel követtük nyomon. Az abszorbanciaértékeket kalibrációs görbe segítségével konvertáltuk át szubsztrátkoncentrációra. A Michaelis-Menten és pH optimum görbéket Sigma-Plot program (SPSS Inc.) segítségével szerkesztettük.

3.7.2. Fluoreszcens módszer az MuLV proteináz gátolhatóságának vizsgálatára

A gátlási kísérletekhez kifejlesztett mikrotiter-lemez-módszerben az MuLV p12/CA szubsztrát Dabcy/Edans fluoreszcens analógját használtuk, a reakciókat PNF (250 mM Na-foszfát puffer pH 5.6, 5% glicerol, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 500 mM NaCl) pufferben végeztük. A fluoreszcencianövekedés 460 nm-en történő detektálását 355 nm excitációs hullámhossz alkalmazása mellett, Victor Wallace fluoriméter-luminométer készülékkel végeztük. Az „inner-filter” hatást korrigáltuk, a K_i értékeket Williams és Morison (1979) egyenlete alapján számítottuk.

3.7.3. HPLC alapú proteináz assay a HIV-1 és MuLV proteináz specificitásvizsgálataira

A HPLC alapú proteináz mérést 5 μ l enzimnek 10 μ l 2x töménységű reakciópufferrel (0.5 M K-foszfát puffer, pH 5.6, 10% glicerol, 2 mM EDTA, 10 mM DTT, 4 M NaCl), illetve 5 μ l szubsztrátoldattal történő összekeverésével végeztük; a vad típusú és különböző mutáns HIV-1 proteinázok esetén 0.5-7 mM, MuLVPR esetében 0.01-1.32 mM szubsztrátkoncentráció-tartományban, melyet a becsült K_M értékek alapján választottunk meg. Az enzimkoncentrációkat úgy állítottuk be, hogy a szubsztrát hidrolízise 20% alatt maradjon. A 20 μ l-es reakcióelegyeket 37 °C-on, 1 óráig inkubáltuk, majd a reakciókat 180 μ l 1%-os trifluor-ecetsav (TFA) oldattal állítottuk le, és Nova-Pak C_{18} -as reverz fázisú kromatográfiás oszlopra injektáltuk. A szubsztrát és termékcsúcsokat 0-100% lineáris víz-acetonitril gradienssel választottuk el egymástól, 0.1% TFA jelenlétében. Az elválasztást 206 nm-en követtük nyomon, a hidrolízis mértékét a kromatográfiás csúcsok 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 6 különböző koncentrációt teszteltünk. A kinetikai paramétereket a reakciósebesség és szubsztrátkoncentráció adatok Michaelis-Menten egyenlethez történő illesztésével határoztuk meg, nemlineáris regressziós módszerrel, a Fig.P program felhasználásával. A kinetikai állandók SD értékei 25 % alatt voltak. Azoknál a peptideknél, melyeknél nem volt lehetőségünk a szubsztrátkoncentráció növelésére (a HIV-1p1/p6 hely mutáns változatainak, illetve az MuLV Gag hasítási

peptidek alacsony sókoncentráció mellett történő méréseinek esetében), a k_{cat}/K_M értékeket pszeudo-elsőrendű reakciókörülmények között, a görbe lineáris szakaszából állapítottuk meg. Azoknál a peptideknél (HIV-1 NC/p1, MuLV p12E/p2E), ahol a Michaelis-Menten görbe már igen kis szubsztrátkoncentrációnál a telítési szakaszba ért, illetve termékgátlás lépett fel, a k_{cat}/K_M értékeket ismert specificitási állandóval rendelkező szubsztrátok jelenlétében, kompetíciós mérésekkel határoztuk meg.

3.8. Aktív centrum titrálás a pontos enzimkoncentráció meghatározására

Az aktív centrum titrálást a vad típusú, a V82A, I84V, M46L és L90M mutáns HIV-1 proteinázok és az MuLV-PR esetén DMP 323, a V82S HIV-PR mutánsnál amprenavir jelenlétében végeztük, az előbbieken ismertetett, HPLC-n alapuló mérési módszerrel. Az inhibitor 0-10 μ M koncentrációtartományban, DMSO-s oldat formájában juttattuk a reakcióelegybe. A gátlási görbét három különböző szubsztrátkoncentrációnál vettük fel, az aktív enzimkoncentrációt DynaFit program segítségével határoztuk meg.

3.9. Molekuláris modellezés

A HIV-1 proteináz modellek egy nagy felbontású HIV-1 PR röntgenkristallográfiai szerkezetéből (Protein DataBank kód: 1FGC) homológ modellezéssel készültek, amely tartalmazott egy szubsztrátanalóg inhibitor is. A szerkezetek minimalizálása az AMMP program segítségével történt, korábban közölt eljárásnak megfelelően. A hidrofób kölcsönhatások elemzése az INTG programmal történt.

Az MuLV proteináz homológ modellje a Modeller3 program segítségével a HIV-1 proteináz kristályszerkezetén alapulva épült fel.

A szerkezeteket Silicon Graphics O2 grafikus munkaállomáson Sybyl (Tripos Inc., St. Louis, MO, USA) molekuláris modellező programcsomag segítségével jelenítettük meg és elemeztük.

3. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

4.1. *A HIV proteinek szekvencia-polimorfizmusának és a gyógyszerrezisztens mutációinak hatása az NC/p1 illetve p1/p6 hasítási helyek proteolitikus processzálására*

4.1.1. *Az NC/p1 és p1/p6 hasítási helyek vad típusú HIV-1 proteináz által katalizált hidrolízisének kinetikai paraméterei*

A vad típusú HIV-1 proteináznak a két vizsgált Gag hasítási hely eredeti szekvenciáira meghatározott specificitási állandója (k_{cat}/K_M) korábbi irodalmi adatoknak megfelelően alacsonyabbnak bizonyult a többi Gag és Gag-Pro-Pol hasítási helyre mérhető értékhez képest. A két Gag hasítási hely esetében szinte azonosnak adódó együtthatók különböző k_{cat} és K_M értékekből tevődnek össze: a k_{cat} illetve K_M egyaránt magasabb volt a p1/p6 szubsztrátnál, mint az NC/p1 helyet reprezentáló peptid esetében.

4.1.2. *Vad típusú és mutáns HIV-1 proteinázok specificitási állandóinak meghatározása mutáns hasítási hely szubsztrátokra vonatkozóan*

A két Gag hasítási hely különböző mutáns változataira vonatkozó kinetikai paraméterek meghatározása az adatok Michaelis-Menten egyenlethez történő nem lineáris illesztésével több esetben nem volt lehetséges. Az NC/p1 szubsztrátoknál ugyanis magasabb szubsztrát koncentráció-tartományban gyakran fellépett a termékgátlás, emiatt a rájuk vonatkozó specificitási állandó értékeket egységesen a HTLV CA/NC hasítási helyet reprezentáló szubsztrát P3 helyen Gly-t tartalmazó változatának jelenlétében, kompetitív módszerrel határoztuk meg. Több p1/p6 szubsztrát esetén viszont a megnövekedett K_M érték miatt csak pszeudo-elsőrendű reakciókörülmények között tudtuk elvégezni a méréseket, ezért a p1/p6-os szubsztrátoknál a specificitási állandók meghatározását - ugyancsak egységesen - lineáris illesztéssel végeztük. Az eredeti szubsztrátokkal elvégzett összehasonlító mérések alapján azonban megállapítottuk, hogy ez várhatóan nem okoz jelentősebb eltérést a specificitási állandó értékében.

4.1.3. *NC/p1 hasítási szekvenciát reprezentáló peptid processzálása vad típusú és mutáns HIV-1 proteináz enzimekkel*

A vad típusú enzimnek a különböző NC/p1 hasítási hely mutánsokkal történő vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a természetes szekvencia-variabilitás nincs számottevő hatással e hely hidrolízisének hatékonyságára, szemben a P2 Ala→Val rezisztens mutációval, amely – kiváltképp ha a P3Arg természetes variációként megjelenő aminosavcserével párosul – jelentős mértékben megnöveli az NC/p1 szekvencia hasíthatóságát. Molekuláris modellezés alapján ez úgy értelmezhető, hogy a P2Val nagyobb méretéből adódóan megnő a van der Waals kölcsönhatási felület, így tökéletesebbé válik a szubsztrát illeszkedése az enzim S2 zsebébe, és ezen a P3Arg által kialakított kedvező kölcsönhatások (az enzim Arg8, Glu21, Phe53, Pro81, Val82 és Asp29 valamint a szubsztrát P1Asn oldalláncával) tovább javítanak.

Ugyanezeknek a hasítási szekvenciáknak a mutáns enzimekkel történő vizsgálata során is hasonló tendenciát figyelhetünk meg, azzal a különbséggel, hogy a V82 mutáns proteinázok esetében a szubsztrátszekvencia P2Val mutációja önmagában kedvezőbb hatással volt a hely hidrolízisére, mint a P3Arg

cserével együttesen. Ez a P3Arg és az enzim 82-es valinja között kialakuló kedvező hidrofób kölcsönhatás hiányával magyarázható a hasonló pozícióban kis méretű Ala-t vagy Ser-t hordozó mutáns enzimek esetében.

A várakozásoknak megfelelően a V82S és a V82A aktív centrum mutánsok a vad típushoz képest csökkent, a másodlagos mutációt hordozó L90M pedig megemelkedett katalitikus hatékonyságot mutattak, ellentétben az I84V és M46L enzimekkel, melyek az általunk meghatározott értékek alapján nem az általánosan elfogadott eméletnek megfelelően viselkedtek.

4.1.4. A p1/p6 hasítási szekvenciát reprezentáló peptidek processzálása vad típusú és mutáns HIV-1 proteínáz enzimekkel

Az adatbankba került HIV-1 izolátumok analízise alapján a p1/p6 hasítási helyre erős szekvencia-polimorfizmus jellemző, azonban ennek hatását a proteínáz-hasítással szembeni érzékenységre vonatkozóan mindeddig nem vizsgálták. A p1/p6 hely polimorf változatainak a vad típusú és mutáns enzimekkel való hasíthatóságát tanulmányozva azt tapasztaltuk, hogy ezek a természetes aminosavcserék nem befolyásolják számottevő mértékben az eredeti szekvencia hidrolízisének hatékonyságát. Kivételt képez ezalól a P1 aminosav leucinra történő cseréje, mely oly mértékben lerontja a hely hasíthatóságát, ami alapján felmerül a kérdés, hogy vajon a P1Leu mutációt hordozó vírusok egyáltalán replikációképesek-e.

A természetes szekvenciaváltozatokkal ellentétben a rezisztens mutációként megjelenő P1'Phe csere esetén viszont azt tapasztaltuk, hogy a vad típusú és mutáns enzimekkel egyaránt jelentősen nő az eredeti p1/p6 hasítási hely hidrolízisének mértéke. Ez, hasonlóképpen mint az NC/p1 P2Val esetében, a mutáns aminosavoldallánc nagyobb méretéből adódik, amely így nagyobb hidrofób kölcsönhatási felület kialakítására képes az enzim S1' zsebet alkotó aminosavak oldalláncaival, ezáltal optimálisabbá válik a szubsztrát illeszkedése az enzim szubsztrátkötő helyébe. A van der Waals kölcsönhatások maximalizálása tehát meghatározó a hasítási hatékonyság szempontjából.

Eredményeinkből jól látható, hogy a természetes szekvencia-polimorfizmussal szemben az NC/p1 illetve p1/p6 hasítási helyek AIDS terápia során megjelenő változásai nagymértékben növelik a két szekvencia hidrolízisének hatékonyságát, mely arra utal, hogy az enzimaktivitást lerontó proteínáz mutációk ellensúlyozása révén e két Gag hasítási hely mutációi hozzájárulnak a gyógyszerrezisztencia kialakításához.

4.2. Az egér leukémia vírus (MuLV) proteínáz klónozása, tisztítása és a vírusból származó enzimformával illetve HIV-1 proteínázzal történő összehasonlítása

4.2.1. Az MuLV proteolitikus enzimének klónozása és tisztítása

Az MuLV proteínázt kódoló cDNS szekvenciát pMalc2 plazmidba klónoztuk, majd a konstrukciót (pMBP-MPR) BL21 sejtekbe transzformáltuk.

Ezt követően kidolgoztunk egy eljárást az enzim tisztítására, melynek első lépésében a maltózkötő fehérjével fúziós formában expresszálódó proteínázt amilóz oszlopon történő affinitás kromatográfiával választottuk el a bakteriális fehérjétől. Az oszlopról eluált, nem teljesen homogén fúziós proteínból Xa faktor segítségével szabadítottuk fel az aktív proteínázt. A lehasított MBP-t a jelentős izoelektromos-pontbeli különbségből adódóan kationcserélő kromatográfiával, a visszamaradó fúziós proteint pedig egy második amilóz affinitás kromatográfiás lépéssel tudtuk eltávolítani a proteínáz mellől. Ez utóbbi megoldás csak a kationcserélő

kromatográfia közbeiktatása miatt volt lehetséges. Az első amilóz affinitás kromatográfias lépés maltózzal történő elúciója során ugyanis a maltóz erősen MBP-kötött állapotban marad, megakadályozva ezáltal a fúziós protein MBP-részének újbóli kikötődését az amilóz oszlophoz. Esetünkben valószínűleg a kationcserélő kromatográfia elúciójakor alkalmazott magas ionerősség távolította el a maltózt a kötőhelyéről.

A kidolgozott tisztítási eljárás, bár teljesen homogén és aktív enzimet eredményezett, nem bizonyult megfelelő hatékonyságúnak, mely elsősorban az expresszáldó fúziós fehérje erőteljes degradációjának volt a következménye. A fúziós protein autokatalitikus aktivitásának kizárását követően az is bebizonyosodott, hogy ez a degradáció a baktériumsejten belül, már az expresszió ideje alatt megtörténik (bakteriális proteázgátlók jelenlétében sem sikerült a tisztítást hatékonyabbá tennünk). Nem hozta meg a várt eredményt a baktériumsejtekben ritkán előforduló tRNS-t kódoló pRIL plazmid alkalmazása sem.

Ezért végül elhatároztuk, hogy a meglévő konstrukciónk módosításával, és egy újabb tisztítási stratégia kidolgozásával próbáljuk meg nagyobb mennyiségben előállítani az MuLV proteinázt. Kísérleteink arra utaltak, hogy a fúziós protein elsősorban N-terminálisan degradálódik, ezért az eredeti pMBP-MPR plazmidból létrehoztunk egy konstrukciót, melyből az MuLV proteináz mindkét oldalán fúziós formában expresszáldik. Az egyik fúziós partner az N-terminális MBP, a másik egy Xa hasítási helyet illetve hat hisztidint tartalmazó C-terminális farok volt. A konstrukció expresszáldását és a sejtfeltárást követően Ni-kelet affinitás kromatográfiát végeztünk, melyben a termelődött fúziós protein N-terminálisan (MBP-ben) degradált, de C-terminálisan ép, teljes hosszúságú proteinázt tartalmazó formáit is ki tudtuk nyerni a baktériumszuszpenzióból (ezeket az előző eljárás során már az első, amilóz affinitás kromatográfias lépésben elvesztettünk). Az így elválasztott fúziós proteineket Xa faktorral processzáltuk, és az MBP-eredetű szennyezés egy részét ammónium-szulfátos kisózással távolítottuk el. A kisózás során oldatban maradó enzimet végül egy kationcserélő kromatográfia révén sikerült teljesen tiszta állapotba hozni. Ezzel az eljárással az MuLV proteináz kitermelési hatékonyságát az előző módszerhez képest 3-4-szeresre növeltük.

A második tisztítási eljárás kidolgozásával párhuzamosan kísérleteket végeztünk a degradáció jelenségének tanulmányozására, hogy az így nyert információk birtokában elejét tudjuk venni a számunkra kedvezőtlen folyamatnak. A tisztított proteináz számára szubsztrátként biztosított MBP illetve MBP-MPR(D32A)-H₆ több órás inkubálás során sem hasítódott az aktív enzim által, ez alapján igazolva láttuk, hogy tényleg nem autokatalitikus degradáció történik. Ugyanakkor azonban a kontrollként alkalmazott aktív centrum mutáns pMBP-MPR-H₆ illetve üres pMBP-H₆ konstrukcióknak a vaddal azonos körülmények közötti expressziójakor csak igen kismértékű degradációt tapasztaltunk, ami arra utal, hogy az MuLV proteináz aktivitása mégis szerepet játszik a baktériumsejtekben lezajló folyamatban.

4.2.2. Az egér leukémia vírus (MuLV) proteolitikus enzimének részletes jellemzése

4.2.2.1. A rekombináns MuLV proteináz összehasonlítása a vírusból izolált enzimmel

Általánosan elfogadott, hogy a baktériumsejtben termeltetett retrovirális proteinázok úgy viselkednek, mint a víruseredetű enzimek, ezt a feltételezést azonban kísérletileg általában nem igazolják. Ezért természetes hasítási helyeket reprezentáló oligopeptid szubsztrátok felhasználásával összehasonlító méréseket végeztünk a rekombináns proteináz és a vírusból izolált enzimforma között. Az enzimek MuLV NC/CA, PR/RT,

p12(E)/p2(E) valamint a HIV-1 RT/IN hasítási szekvenciákra meghatározott specificitási állandói alapján megállapítottuk, hogy a két különböző eredetű proteináz valóban hasonlóképpen viselkedik.

4.2.2.2. Az MuLV proteináz részletes összehasonlítása a HIV-1 proteinázzal

4.2.2.2.1. A kinetikai paraméterek pH függése

Mint azt korábban már kimutatták, a HIV-1 proteináz specificitási állandója harang-görbe alakú pH függést mutat. Az MuLV proteináz kinetikai paramétereinek pH függési vizsgálata során ugyanazt a szubsztrátot felhasználva a HIV-1 PR-hoz képest (optimális pH=4.0) magasabb optimumértéket (pH=5.0) határoztunk meg. Ez azzal magyarázható, hogy a HIV-1 proteináz S2' kötőzsebének Asp 30' oldallánca és a szubsztrát P2' glutamátja között hidrogén-híd kialakítására van lehetőség (a Glu-nak vagy Asp-nak protonálódnia kell), MuLV-PR esetében viszont az Asp 30'-nak megfelelő His 37' erre nem képes, ezért a P2' glutamát jelenléte a hasítási szekvenciában nem annyira kedvező alacsonyabb pH értékek mellett, mint a HIV-1 proteináznál. Az MuLV proteináz a pH optimumérték mellett mutatta a legmagasabb k_{cat} és legalacsonyabb K_M értéket.

4.2.2.2.2. Az MuLV és HIV-1 proteináz specificitásának összehasonlítása

A két enzim specificitását először különböző, MuLV és HIV-1 alapú természetes hasítási szekvenciákat reprezentáló oligopeptid szubsztrátok segítségével hasonlítottuk össze. A specificitási állandók értékei azonos, de az MuLV proteináz esetében szűkebb tartományon belül vannak (MuLVPR: 1.7- 15.0 mM⁻¹s⁻¹, HIV-1 PR: 0.02-202 mM⁻¹s⁻¹). Ez a katalitikus tartomány lényegesen magasabb, mint az AMV által kódolt proteinázra vonatkozó tartomány, ami azzal magyarázható, hogy az AMV esetében a proteináz a vírus szerkezeti fehérjével ekvivalens mennyiségben szintetizálódik, szemben a stop kodon szupresszióval illetve a leolvasási-kereteltolódással átíródó MuLV és HIV-1 proteinázokkal, melyek a képződő Gag fehérjéknek mindössze 5-10 %-át teszik ki, így szükségszerűen magasabb katalitikus aktivitással rendelkeznek.

Az MuLV alapú szubsztrátok közül csak három hasítódott a HIV-1 proteináz által, viszont az MuLV PR, bár alacsonyabb katalitikus hatékonysággal, de egy kivétellel valamennyi HIV-1 hasítási szekvencia esetében aktívnak bizonyult. Ez az MuLV széles szubsztrátspecificitását jelzi, és azzal magyarázható, hogy a legtöbb MuLV hasítási szekvencia P2 és P1 pozíciójában Leu(Val/Ala)-Leu található, ami kedvező az MuLV-PR számára, viszont a HIV-1 proteináz inkább kisebb és kevésbé hidrofób aminosavakat preferál ezeken a helyeken.

A különböző eredetű virális hasítási helyek többnyire hatékonyabban processzálódnak a vírus saját enzime által, ezt mi is csak az MuLV p12/CA illetve HIV-1 p6-ban található hasítási helyek esetében tapasztaltuk másképp. Érdekes ugyanakkor, hogy az MuLV p12(E)/p2(E) szekvenciáját a HIV-1 proteináz egy aminosav résszel eltolódott helyen hasította, hasonló jelenségre ritkán akad példa a retrovirális proteinázok

képviselőinek körében. Sejtkultúrák kísérletekben is megfigyelték az MuLV burokfehérje HIV-1 proteináz által történő processzálódását, de a hasítási hely nem lett meghatározva. Az *in vivo* adatok alapján a hasítás egy aminosavval történő feltételezett eltolódása nem okozott funkcionális defektust.

4.2.2.2.3. Rekombináns MuLV Gag fehérjerészek MuLV és HIV-1 proteinázok által történő hasítódásának vizsgálata

Az MuLV és HIV-1 proteinázok specificitásának további vizsgálatához két különböző hosszúságú MuLV Gag fehérjerészt klónoztunk pET23b plazmidba, és az expresszált proteineket Ni-kelát affinitás kromatográfiával illetve egy azt kövező gélszűrővel, igen magas kitermelési százalékot elérve homogénre tisztítottuk.

A három illetve négy MuLV Gag hasítási helyet tartalmazó fehérjeszubsztrát processzálását alacsony ionerősség mellett végeztük, ezért viszonyítási alapként a megfelelő hasítási helyeket reprezentáló oligopeptidekre vonatkozó specificitási állandókat ilyen körülmények között is meghatároztuk. Az értékek, bár hasonló tendenciát mutattak a magas ionerősségnél mért értékekkel, de azokhoz képest lényegesen alacsonyabbnak adódtak.

A fehérjeszubsztrátok MuLV proteináz által történő processzálásának kinetikai vizsgálata alapján úgy tűnt, hogy a rövidebb (~42 kDa) Gag protein a p12/CA vagy a CA/NC helyek valamelyikénél hasad elsőként, egy 40 illetve 33 kDa nagyságú fehérjefragmenst eredményezve, a 30 kDa-os végső termék pedig az intermedierekben megmaradó alternatív hely processzálása révén jelenik meg. A megfelelő oligopeptid szubsztrátok esetében tapasztaltakkal ellentétben tehát - ahol a p12/CA helyre meghatározott specificitási állandó magas és alacsony ionerősségnél egyaránt lényegesen alacsonyabbnak adódott - a p12/CA és CA/NC helyek hasításának fehérjeszintű hatékonysága hasonlóan mutatkozik. Ez sztérikus okokkal magyarázható, a Gag fehérjék erős oligomerizációs hajlamából adódóan ugyanis a hasítási szekvenciák hozzáférhetősége eltérő lehet, és ez befolyásolhatja a különböző helyek hasításának hatékonyságát.

A nagyobb Gag protein (~52 kDa) MuLV proteináz által történő processzálásának során azt tapasztaltuk, hogy már viszonylag rövid idő elteltével ugyancsak többféle intermedier jelenik meg, mely az MuLV Gag hasítási helyek fehérjeszinten hasonló sebességgel bekövetkező processzálására utal, és összhangban van az MuLV proteináz specificitási állandó-értékeinek meglehetősen szűk tartományával.

Ezeztől az eredményektől eltérően azonban, a víruson belül egyértelműen a p12/CA hasítást írták le a leggyorsabbnak. Mindez azt mutatja, hogy óvatosnak kell lenni az oligopeptidek és rekombináns fehérjeszubsztrátok *in vitro* vizsgálata során kapott hasítási sorrendeknek a vírusban kialakuló sorrendiségre történő extrapolálásakor.

Az MuLV Gag fehérjék HIV-1 proteináz szubsztrátként való tesztelése során – jó összhangban a megfelelő oligopeptid szubsztrátoknál kapott eredményekkel – a CA/NC és NC/PR helyek hasításának hiányából adódóan csak a 40 kDa nagyságú CA-NC-C-terminális fehérje fragmens jelent meg. Ez egyéb irodalmi adatokkal egybehangzóan a két enzim specificitása közötti jelentős különbséget tükrözi.

4.2.2.2.4. Az MuLV proteináz inhibitor-profilozása

Az MuLV proteináznak az AIDS terápiában alkalmazott és egyéb proteáz-inhibitorokkal szembeni érzékenységét az MuLV p12/CA hasítási hely fluoreszcens szubsztrátanalógiájának felhasználásával vizsgáltuk. A fluoreszcens mérés alacsony ionerősségű rekciókörülményei között az amprenavir bizonyult az enzim

leghatékonyabb gátlószereinek ($K_i=20$ nM). A DMP323 is jó inibitornak mutatkozott, ezt az egyéb kísérleteinkhez szükséges aktív enzimkoncentráció meghatározásához magas sókoncentráció mellett aktív centrum titráló szerként is tudtuk alkalmazni ($K_i=0.8$ nM). A HIV-1 proteínáz működését a vizsgált, AIDS-terápiában is használt inhibitorok 1 nM-nál alacsonyabb K_i értékkel gátolják, ehhez képest az MuLV PR általánosan kisebb érzékenységet mutatott a megfelelő gátlószerekkel szemben. Az MuLV PR korábban leghatékonyabbnak bizonyult inhibitora, a KH-164 azonban lényegesen gyengébbnek tűnt, mint a HIV-1 PR elleni gátlószerek.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Doktori munkám során lehetőségem nyílt két komoly gyakorlati jelentőséggel bíró retrovírus, a HIV-1 illetve az MuLV proteolitikus enzimének tanulmányozására.

A HIV-1 proteinázzal történő vizsgálataim során az AIDS terápiában alkalmazott proteínáz gátlószerekkel szemben kifejlődő rezisztencia jelenségét helyeztük a középpontba, és ezt tanulmányoztuk a különböző HIV-1 proteináz illetve Gag hasítási hely mutációk szempontjából.

Az általánosan elfogadott elképzelés szerint az aktív centrumot érintő mutációk lerontják, az enzim egyéb régióiban lokalizálódó másodlagos mutációk viszont javítják a proteínáz katalitikus hatékonyságát. Eredményeink ezzel részben egybehangzónak (V82S, V82A és L90M), de több esetben ellentmondónak mutatkoztak (I84V és M46L).

Elvégztük a két legnagyobb szekvencia-variabilitással jellemezhető és egyben legkisebb hatékonysággal processzálódó Gag hasítási hely (NC/p1 és p1/p6) eredeti illetve mutáns változatainak a vad és mutáns enzimekkel történő átfogó vizsgálatát. Eredményeinkkel alátámasztottuk, hogy e két Gag hasítási szekvenciában a proteínáz inhibitor kezelés hatására megjelenő változások kompenzációs mutációk, melyek ellensúlyozva az enzimaktivitás csökkenésével járó proteínáz mutációkat hozzájárulhatnak a gyógyszerrezisztencia kialakításához. Ugyanakkor a természetes szekvencia-polimorfizmus nem befolyásolja számottevő mértékben a két hasítási hely processzálhatóságát. A különböző szubsztrátok hasíthatósága kapcsán tapasztalt változások alapján az enzim és szubsztrát között kialakított van der Waals kölcsönhatások maximalizálása tekinthető a specificitás fő meghatározójának, a hasonló hatás kulcsfontosságú lehet az inhibitor-hatékonyságban is.

A gyakorlati jelentősége ellenére is csak kevésbé ismert MuLV proteinázzal kapcsolatos vizsgálatainkhoz sikerült pMalc2 rendszerben klónoznunk és expresszálnunk a fehérjét. Kidolgoztunk egy háromlépéses eljárást az enzim tisztítására, melynek alacsony hatékonyságán az eredeti konstrukció módosításával és egy újabb tisztítási stratégia alkalmazásával tudtunk javítani. Az ennek kapcsán végzett kísérleteink által lehetőségünk nyílt a baktériumsejtben történő expresszió során bekövetkező fehérjedegradációs jelenség tanulmányozására is.

A tisztított, rekombináns enzimet víusból izolált formával összehasonlítva a két enzim viselkedése hasonlóan bizonyult. A rekombináns MuLV-PR működésének a HIV-1 proteinázzal történő részletes összehasonlító vizsgálata során több szinten is rámutattunk azok eltérő sajátosságaira. Spektroszkópiás mérés alkalmazásával a két enzim eltérő pH függését tapasztaltuk. A specificitásbeli különbségeket a megfelelő virális hasítási helyeket reprezentáló oligopeptid szubsztrátok mellett különböző hosszúságú MuLV Gag fehérjék szubsztrátként történő alkalmazása során is megfigyeltük. Ezek alapján az MuLV proteínáz szélesebb szubsztrátspecificitású, viszont szűkebb katalitikus tartománnyal jellemezhető enzimnek bizonyult. Eredményeink értékelése kapcsán rámutattunk az oligopeptid, fehérje és sejtszintű kísérletekben tapasztalható különbségekre is. Végezetül gátlási profilozásra kifejlesztett fluoreszcens mérési módszer segítségével összehasonlítottuk a két enzim klinikai használatba került és más PR inhibitorokkal való gátolhatóságát is, melynek kapcsán az MuLV proteínáz HIV-1 proteínázhoz képest alacsonyabb érzékenységet figyeltük meg az AIDS terápiában alkalmazott gátlószerekkel szemben.

6. KÖZLEMÉNYLISTA

1. Az értekezéshez felhasznált közlemények

- Fehér, A., Weber, I.T., Bagossi, P., Boross, P., Mahalingam, B., Louis, J.M., Copeland, T.D., Torshin, I.Y., Harrison, R.W., Tozser, J. (2002) Effect of sequence polymorphism and drug resistance on two HIV-1 Gag processing site. *European Journal of Biochemistry*, 269, 1-7. IF 2.999
- Fehér, A., Boross, P., Sperka, T., Oroszlan, S., Tözsér, J. (2004) Expression of the murine leukemia virus protease in fusion with maltose binding protein in *Escherichia coli*. *Protein Exp. Purif.*(közlésre elfogadva). IF 1.34
- Fehér, A., Boross, P., Sperka, T., Miklóssy, G., Bagossi, P., Oroszlan, S., Weber, I.T, Tözsér, J., (2004) Characterization of the Murine Leukemia Virus Protease and its Comparison with the HIV-1 Protease. *Virology* (közlésre beküldve). IF 3.363

2. Az értekezéshez kapcsolódó poszterek

- Fehér A, Sperka T, Bagossi P, Tözsér J. Proteináz inhibitor terápia esetén megjelenő Gag mutációk hatása a HIV proteinázzal történő hasíthatóságra. MBKE Molekuláris Biológiai Szakosztálya 5. Munkaértekezlete, Sopron, Május 8-11, 2000. (CP-6)
- Tözsér, J, Fehér, A., Bagossi, P., Boross, P., Louis, J.M., Copeland, T.D., Mahalingam, B., Harrison, R.W. and Weber, I.T. Effect of sequence variation and drug resistant mutations at two HIV-1 Gag cleavage sites on proteolytic susceptibility. *Retroviruses*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA, May 22-27, 2001. (P228).
- Fehér, A., Boross, P., Bagossi, P., Miklóssy, G. és Tözsér, J. Az egér leukémia vírus (MuLV) proteináz klónozása, tisztítása és jellemzése. MBKE Molekuláris Biológiai Szakosztálya 7. Munkaértekezlete, Keszthely, Május 14-17, 2002. (BP-2)
- Miklóssy, G., Fehér, A., Kádas, J., Sperka, T. és Tözsér, J. Az erbB2 receptor "shedding"-jének vizsgálata emlőtumor sejteken. MBKE Molekuláris Biológiai Szakosztálya 7. Munkaértekezlete, Keszthely, Május 14-17, 2002. (P-7)
- Tözsér J., Fehér, A., Bagossi, P., Boross, P., Louis, J.N., Copeland, T.D., Oroszlan, S., Mahalingam, B., Harrison, R.W. and Weber, I.T. Characterization of HIV-1 proteinases harboring mutations appearing in drug resistance. Third HIV DRP Symposium on Antiviral Drug Resistance, Chantilly, Virginia, USA, December 8-11, 2002 (P-25)