

EGYETEMI DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Humán retrovírusok proteolitikus
enzimjeinek vizsgálata

Kádas János

Témavezető:
Prof. Dr. Tózsér József

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

Debrecen, 2004

1. BEVEZETÉS

A proteázok (vagy endopeptidázok) belső peptidkötés hasítását (proteolízis) katalizáló enzimek. Szerepük alapvető fontosságú számos fiziológiai folyamatban, mint például a gyulladás, fertőzés, allergiás reakciók, véralvadás, sejtnövekedés és sejthalál. A proteázok terápiás szempontból is fontos célfehérjék, mivel az ellenük tervezett inhibitorok alkalmazásával nem kívánt élettani hatásuk megakadályozható vagy csökkenthető.

A retrovírusok által kódolt, homodimer formában aktív proteázok (PR) tulajdonságait molekuláris biológia, biokémiai, molekuláris szerkezetvizsgálati módszerek alkalmazásával igen intenzíven tanulmányozzák. 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 retrovírusok életciklusában betöltött szerepükről tudjuk, hogy retrovirális proteázok elsődleges szerepe a Gag és a Gag-Pro-Pol prekursor fehérjék funkcionális részekre történő hasítása. Feltételezhető azonban, hogy különféle virális illetve celluláris fehérjék hasítása által a retrovirális proteáz szerepet játszik a vírusfertőzés korai fázisában is. Több virális és celluláris fehérjéről is kiderült, hogy a fertőzés ezen szakaszában szubsztrátjai a HIV-1 proteáznak, ami szintén szerepet játszhat a vírus patogenitásában, de ezt a szerepét pontosan még nem ismerjük.

1.1. A RETROVÍRUSOK

A retrovírusok létezése már a múlt század elején ismert volt, azonban a humán T-sejtes leukémia vírus (HTLV) és a humán immunodeficiencia vírus (HIV) felfedezéséig nem tudtak olyan retrovírusról, amely az embert is megfertőzheti. Kutatásuk az elmúlt két évtizedben a ma még gyógyíthatatlan, krónikus betegség, az (AIDS) megjelenésének és rohamos elterjedésének következtében került előtérbe. Ma már bizonyított, hogy retrovírussal történő fertőzés a gerincesek bármely osztályában előfordulhat, melynek kimenetele sokféle lehet: betegség nélküli virémia, daganatképződés, idegrendszeri elváltozások, anémia vagy immunhiány.

A retrovírusok burokkal rendelkező, pozitív szálú diploid RNS genomot tartalmazó vírusok nagy és diverz családot képviselnek. A családot általános taxonómiai tulajdonságokkal: felépítés, összetétel, replikációs tulajdonságok, jellemzünk. A virionok átmérője általánosan 80-100 nm között változik, külső lipid burkukban virális glikoproteinek

találhatók. A belső protein „core” alakja és elhelyezkedése a család különböző fajaiban eltérő. A virion RNS átlagosan 7-12 kilobázis nagyságú, mindig diploid, lineáris, nem szegmentált és pozitív lefutású. A családba tartozó fajok replikációs sajátossága az, hogy DNS intermediéren keresztül történik, amely a fertőzött sejt genomjába integrálódik.

A virális genom szerveződése szerint két csoportra: egyszerű és összetett retrovírusokra osztjuk őket. Minden retrovírus legalább három poliproteint kódoló gént tartalmaz: *gag*, mely a virion mátrix (MA)¹, kapszid (CA) és nukleokapszid (NC) fehérjék genetikai információi helyezkednek el; *pol*, mely az integráz (IN) és reverz transzkriptáz (RT) enzimeket kódolja; és az *env* mely a burokféhrje transzmembrán (TM) és felszíni részének (SU) információit hordozza. Egy járulékos, kisebb *pro* gén is megtalálható minden retrovírusban, amely a virion proteáz (PR) enzimét kódolja. Az egyszerű retrovírusok általában csak ezeket az alapvető információkat, míg a komplex retrovírusok más járulékos, regulációs fehérjéket is kódolnak.

Evolúciós rokonságokat figyelembe véve hét csoportra, taxonómiaailag *genus*-ra osztjuk a retrovírusokat. Öt csoport jeleníti meg az onkogén hatással is bíró vírusokat, a maradék két csoport egyike a *Lentiviridae* genus, melynek képviselője a HIV-1 is.

1.2. A HUMÁN T-SEJTES LEUKÉMIA VÍRUS (HTLV)

A HTLV és a marha leukémia vírus (BLV) a csoport harmadik tagjával, a majom T-sejtes leukémia vírussal (STLV) együtt, egy külön csoportot alkotnak az onkogén hatású vírusok között, az úgynevezett HTLV-BLV csoportot. A csoport tulajdonságai részben eltérnek a többi retrovírusétól, a csoporton belül viszont nagy a hasonlóság. Ilyen eltérés például az, hogy ezek a vírusok a sejtimortalizációt nem a celluláris genomba beépülve vagy onkogén szekvenciát kódolva hozzák létre. Tumort kiváltó hatásuk még nem teljesen ismert, valószínűleg többféle folyamat is közrejátszik benne. Annyi bizonyos, hogy a vírus által kódolt transz-aktivátor Tax protein számos celluláris gén expressziójának és funkciójának szabályozásával fontos szerepet játszik ebben a folyamatban. A Tax képes számos celluláris jelátviteli útvonalba beavatkozni, ilyenek például a CREB/ATF és NF- κ B, de ismert apoptózist indukáló képessége is. A HTLV-1 emberben felnőtt T-sejtes leukémiát (ATL), trópusi spasztikus paraparézist/mielopátiát (TSP/HAM) okozhat. A HTLV-2 „szőrös” sejtes (hairy cell) leukémiát hozhat létre, míg a BLV szarvasmarhában okoz limfoszarkómát, de az előbbiekkal ellentétben a B-limfocitákat támadja

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.

meg. Eltérően a többi retrovírustól, az e csoportba tartozó vírusok enzimfehérjéi egyszeres (PR) és kettős (RT, IN) leolvasási kereteltolással szintetizálódnak.

1.3. A RETROVÍRUSOK ÉLETCIKLUSA

A vírus receptor-mediált endocitózissal vagy direkt membránfúzióval juthat be a gazdasejtbe. A genom-RNS pozitív szálú és szabályos, eukarióta sejtre jellemző mRNS szerkezetet mutat, de közvetlen fehérjeszintézishez mégsem ez használandó fel. A sejtbe bejutó vírus RNS-ét a reverz transzkriptáz (RT) átírja DNS-sé. A reverz transzkripció valószínűleg a citoplazmában, a vírus "core" struktúrában megy végbe. Egyes adatok szerint a PR szerepet játszhat ebben a fázisban. Az EIAV vírus kapszidjának preparálása során a nukleokapszid (NC) protein *in situ* hasítását észlelték. A NC szintén hasad a kapszidban lévő endogén RNS reverz transzkripciója során. Ezért feltételezhetjük, hogy a sejtbe a kapsziddal együtt bejutó PR kritikus szerepet játszik a reverz transzkripcióban és az integrációban.

Az újonnan képződő DNS-nukleoprotein komplex bekerül a sejtmagba, ahol a vírus DNS a gazdasejt genomjába integrálódik (provírus képződés). A provirális DNS a celluláris RNS polimeráz II segítségével átíródik RNS-sé.

A transláció elsődleges termékeként szintetizálódó Gag és Gag-Pro-Pol poliproteinek a gazdasejt membránjának Env fehérjében koncentrált részein, a membrán belső felületénél csoportosulnak. A genom mRNS-sel egy toroidszerű "éretlen" részecskévé formálódnak, melyet a vírusburok zár be. A vírus a sejtből kikerül ("lefűződés" révén), majd a proteáz aktiválódik és elhasítja a poliproteineket, aminek során a vírus "éretté", fertőzőképesé válik. Ezen átalakulás morfológiailag is jól nyomon követhető. A proteáz funkció nélkül a vírusrészecske éretlen marad, és a működőképes fehérjék hiányából adódóan nem lesz képes újabb sejtek fertőzésére.

Miközben a vírus által kódolt PR szerepe a késői fázisban jól feltárt, addig a korai fázisban betöltött szerepéről keveset tudunk. Először a ló vészes vérszegénységét okozó vírus (EIAV), majd a HIV esetében is bizonyossá vált, hogy a PR a „core” struktúra része, amely a sejtbe lép. Mind a receptor-mediált endocitózis, mind a makropinocitózis útján belépő „core” olyan savas környezetbe kerül, melynek pH-ja kedvező a PR működése szempontjából. Megfigyelték, hogy a HIV PR képes a citoskeleton és a szarkoméra proteinjeit: vimentint, dezmit, aktint, miozint és tropomiozint is hasítani. Feltételezett, hogy a vimentin processzálása fontos lépés a vírus fertőzés korai fázisában. A „core” struktúra mozgása a

sejtnag irányába kapcsolatot igényel a sejt aktin filamentumaival, ezért valószínűsíthető, hogy az aktin komponenseinek proteolitikus hasítása fontos lépés ebben a folyamatban.

Celluláris proteineket szintén kimutattak a virionban. Ilyen volt például a celluláris peptidil-prolil izomeráz, a ciklofilin A (Cyp A), mely a kapszidhoz kötötten kerül a virionba, és jelenléte növeli a fertőzőképességet. Aktint és különböző aktin kötött fehérjéket szintén kimutattak. A sejtbe történő belépés után ezen fehérjék sorsa nem tisztázott, de nagyrésztük már a virionban feldarabolódik. A PR szerepét többek között az elongációs faktor-1 alfa (EF1 α) degradációjában már kimutatták. Az EIAV „core” struktúrákat *in vitro* körülmények között, EDTA jelenlétében inkubálva szintén tapasztaltak *in situ* NC degradációt a hordozott proteáz által. A „core” más fehérjei mellett, a HIV-1 RT, az RNázH és a Nef is szerepel a HIV-1 PR szubsztrátjai között. Emellett a PR önmaga is végigmegy egy öndegradációs folyamaton, miközben Vpr sértetlen marad a kapszidban. A „core” struktúra virális és celluláris fehérjéinek proteáz-mediált hasítása tehát igen fontos lehet a preintegrációs komplex (PIC) kialakulásának szempontjából.

1.4. A RETROVIRÁLIS PROTEÁZOK

Minden replikációképes retrovírus kódol egy proteázt (PR), mely része a Gag vagy Gag-Pol poliproteinnak. A PR meghatározott helyeken hasítja a virális poliproteineket, funkcionális fehérjéket eredményezve, ezzel kialakítva egy kompakt „core” struktúrát az érett virion számára. Valamint a fertőzés korai fázisában feltehetően részt vesz a preintegrációs komplex kialakításában. A proteáz funkciója tehát több szempontból is alapvető a vírus számára.

Számos retrovirális proteáz szekvenciája ismert. Általában 99-138 aminosavból álló, 11-15 kDa molekulatömegű fehérjék, amelyek több aszpartil proteázokra jellemző tulajdonságot mutatnak (pepszatinnal való gátolhatóság, a katalitikus aszpartát mutációjával előidézhető enzimaktiváció). Azonban a klasszikus celluláris aszpartil proteázoktól (renin, pepszin) eltérően - melyek két topológiailag hasonló, de mégsem teljesen egyforma domént hordozó egyláncú molekulák - a retrovirális proteázok két egyforma alegységből felépülő, dimerként működő enzimek.

A retrovirális proteázok elsődleges és másodlagos szerkezete a celluláris aszpartil proteázok egyik doménjével analóg, számos β -redőt 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. Az enzimet három jellegzetes régióval jellemezhetjük.

A konzervatív régiók közül az N-terminálishoz közel helyezkedik el az aktív centrumot kódoló katalitikus triád (Asp-Thr/Ser-Gly). Az alegységek katalitikus triádjai hurkot alkotnak, amely analóg a celluláris aszpartil proteázokra leírt ψ -struktúrával. Az ezt felépítő aminosavak konformációja minden ismert kristályszerkezetben azonos. A katalitikus tripletek hidrogénkötések hálózatán keresztül, jellemző módon kapcsolódnak egymáshoz, amit a kötés geometriájára és igen erős jellegére utalva tűzoltófogásnak (fireman's grip) neveznek.

Egy másik többé-kevésbé konzervatív régió a flexibilis „flap” régió, mely a szubsztrát illetve inhibitor kötődésekor elmozdul és ráhajlik a ligandra, majd azzal számos kölcsönhatást alakít ki, melyekkel mintegy stabilizálja a komplexet.

A harmadik konzervatív régió (Gly-Arg-Asp/Asn) a C-terminális közelében helyezkedik el és ionpárok kialakításával a dimerizációban játszik fontos szerepet.

A retrovirális proteázok pH optimuma savas (pH 5-6), részletes biokémiai jellemzésüket oligopeptid és poliprotein szubsztrátokon végezték. A hasítás poliprotein szubsztrátoknál alacsony, oligopeptidek esetében viszont magas (2-3 M NaCl) ionerősség mellett hatékonyabb. A különböző retrovirális hasítási helyeket reprezentáló oligopeptid szubsztrátok hidrolízise jól nyomon követhető HPLC technikával, megfelelően módosított szubsztrátok alkalmazása esetén pedig spektroszkópiásan vagy fluorimetriásan is. Az effektív hidrolízishez proteáztól függően minimálisan 6-7 tagú peptidszakasznak kell nyújtott β -redő konformációban az enzimhez kötődnie.

A retrovirális proteázok természetes hasítási helyein található aminosavak többnyire hidrofób karakterűek, viszont általánosan érvényes konszenzus szekvencia nem adható meg.

A proteázok aktiválódása, és egyben a poliproteinek processzálása a virionban a proteáz N-terminálisának hidrolízisével veszi kezdetét, és ebben valószínűleg több tényező játszik szerepet. A dimerizáció minimálisan előfeltétele a proteolitikus aktivációnak. Az, hogy a processzálási folyamat nem indul meg a Gag poliproteinek oligomerizációjával egy időben, arra utal, hogy léteznek egyéb regulációs tényezők is. Az aktiváció késleltetéséért felelős mechanizmusra vonatkozó legújabb elképzelések szerint a regulációban fontos lehet a dimerizációs felszínen lévő kéntartalmú aminosavak reverzibilis oxidatív módosítása.

2. CÉLKITŰZÉS

A HIV-1 proteázhoz hasonlóan a HTLV-1 proteáz is kemoterápiás célpont. Emellett azt is tudjuk, hogy a proteázban bekövetkező mutációk, melyeknek a HIV-1 PR köszönheti a rezisztenciáját, számos esetben olyan aminosavak megjelenését jelentik, amelyek megfelelnek

más retrovirális proteázokban hasonló helyen található aminosavrészeknek, mint ahogy azt HTLV-1 PR esetében is tapasztalták. Ezért más retrovirális proteázok működésének és specificitásának megismerése segíthet hatásos inhibitorok tervezésében, melyek a rezisztenciáért felelős mutáns HIV-1 PR formák ellen is hatékonyak.

A HTLV-1 proteázzal kapcsolatos számos eredmény ismertetése már megtörtént. Miközben a HTLV-1 PR és a HIV-1 PR szekvenciaazonossága 28% az enzim molekuláris modellje alapján, addig a szubsztrát kötő régió sokkal konzerváltabb, mintegy 45% azonossággal rendelkezik. A két enzim gátolhatósági profilja és szubsztrátspecificitása különbözik.

Számos összehasonlító kutatást végeztek vad-típusú retrovirális proteázokkal, az adott vírus természetes hasítási hely szekvenciáját reprezentáló, és abban aminosavcsere-t tartalmazó oligopeptid szubsztrátokat használva. Néhány közleményben olyan eredmények is napvilágot láttak, ahol más vírusokban is előforduló természetes hasítási helyeket is teszteltek adott vírus proteázával. Célunk az volt, hogy a HTLV-1 és HIV-1 PR specificitását összehasonlítsuk egy kiterjedt, különböző vírusokban előforduló természetes hasítási helyeket reprezentáló „szubsztrátkönyvtár” segítségével. Ez a kísérlet információkkal szolgálhat a proteázok közös és eltérő tulajdonságait illetően.

Az irodalomban sok olyan munkát is találhatunk, amelyek olyan kutatásokról ad ismertetést, ahol adott vírus proteázának specificitását úgy tanulmányozták, hogy egyszeres vagy többszörös mutációkat vittek be az enzim szubsztrátkötő régiójába. Ezen kutatásokat terveztük kiegészíteni a mutáns HTLV proteázokkal kapcsolatos tapasztalatainkkal, ugyanis az irodalomban elvétve fordul elő HTLV proteázzal vagy más deltaretrovirális proteázzal kapcsolatos hasonló munka.

Míg a vírus által kódolt PR szerepe a késői fázisban már elég jól feltárt, addig korai fázisban betöltött szerepéről keveset tudunk. Széles specificitású proteáz inhibitorok szempontjából igen fontos lenne a korai fázis eseményeinek a feltárása is. Számos munkacsoport kimutatta HIV-1 PR inhibitorok korai fázisban történő gátló hatását, míg mások ilyen hatást nem tapasztaltak. Előkísérleteink alapján az EIAV fertőzés korai szakaszában is gátolható proteáz inhibitorokkal. A „core” struktúra - melynek a proteáz is része - virális és celluláris fehérjéinek proteáz-mediált hasítása, illetve sértetlensége, igen fontos lehet a korai szakaszban bekövetkező folyamatokban, így a preintegrációs komplex (PIC) kialakulásában. A virionban előforduló celluláris fehérjék közül a ciklofilin A (Cyp A) jelenléte növeli a fertőzőképességet. Munkánk során azt vizsgáltuk, hogy a virionban „utazó” fehérjék közül a kapszid és az integráz érzékeny-e retrovirális proteáz által történő hasításra.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. A HTLV-1 PROTEÁZ MUTAGENEZISE

A mutagenézis alapjául a stabilizált HTLV-1 proteázt kódoló szekvenciát tartalmazó pET expressziós vektort használtuk. Mutánsainkat a Genosys Sigma cégtől rendelt, megfelelő oligonukleotid párokat felhasználva, Quick-Change mutagenézis protokollt követve állítottuk elő. A mutációkat DNS-szekvenálással ellenőriztük, melyet ABI-Prism dye terminator cycle sequencing kit és Applied Biosystems Model 373A szekvenátor segítségével hajtottunk végre.

3.2. AZ ENZIMEK TISZTÍTÁSA

A stabilizált vad-típusú HIV-1 és HTLV-1 proteázok expressziója és tisztítása inklúziós testekből, egy korábban publikált módszer alapján történt. A mutáns HTLV-1 proteázainkat szintén hasonló módszerrel tisztítottuk. A reverz fázisú HPLC-n történt tisztítás után SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel győződünk meg a fehérjék tisztaságáról. Az enzimek foldingja többlépéses dialízissel történt, először 25 mM hangyasav oldattal (pH 2,8) szemben, majd közvetlenül ezután 50 mM Na-acetát, 1 mM DTT, 1 mM EDTA tartalmú, pH 5,0 pufferrel, végül 20 mM Pipes, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 10% glicerol, 5% etilén-glikol, 0,5% Nonidet P-40 és 10 mM DTT pH 7,0 pufferrel szemben, növelve ezzel a PR preparátumok stabilitását. A minták fehérje mennyiségét és aminosav összetételét aminosav analízissel, Beckman 6300 aminosav analízátor segítségével határoztuk meg. A HIV-1 PR aktív centrum titrálásához Compund 3 inhibitorot használtunk. A vad-típusú és mutáns HTLV-1 proteázok aktív centrum titrálásához KTKVL-r-VVQPK (IB268) peptidet használtunk, ahol r a redukált peptidkötést jelenti. A munkánk során használt redukált peptidkötést tartalmazó inhibitorokat (IB 268 és IB 269 (APQVL-r-PVMHP)) Dr. Ivo Blaha szintetizálta (Ferring Leciva).

3.3. A VAD-TÍPUSÚ ÉS MUTÁNS HTLV-1 PROTEÁZOK MBP-FÚZIÓS FORMÁBAN TÖRTÉNŐ EXPRESSZIÓJA

A HTLV-1 proteázt kódoló régiót és az N-terminálison túlnyúló, 8 aminosav hosszúságú N-terminális szekvenciát PCR-ral sokszoroztuk fel egy fertőzőképes HTLV-1 klónt, a pCS-HTLV-1-t használva templátként. A kapott PCR-terméket a pMal-c2 expressziós vektor *EcoRI* /*BamHI* restrikciós hasítási helyei közé, a maltóz kötő fehérjét (MBP) kódoló szekvencia után ligáltuk. A HTLV proteáz belső szekvenciáját (12-116 aminosav az érett proteázban) a *PacI* és *EcoNI* hasítási helyeket felhasználva a pET expressziós vektor által kódolt stabilizált HTLV-1

PR szekvenciára cseréltük. A ligációk és a DH5 α sejtek transzformációja során standard eljárásokat használtunk. Az expressziós klón mutagenézise során a pET klónoknál használt oligonukleotid párokat és eljárást használtuk, és minden fehérjeexpresszióra használt vektort DNS szekvenálással ellenőriztünk. A fehérje expressziót 1 mM IPTG hozzáadásával, 4 órán keresztül végeztük. Az expresszió után a sejteket centrifugálással gyűjtöttük össze, majd 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1% Triton X-100-t tartalmazó, pH 8,2 pufferben szonikálással tártuk fel. A fehérje mintákat SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel választottuk el és PVDF membránra vittük át Towbin és mtsai. szerint. Az immunoblottot HTLV-1 proteáz N- és C-terminális szekvenciát reprezentáló peptidekkel immunizált nyulakból származó antiszérummal, peroxidáz konjugált anti-nyúl második antitesttel és ECL detekciós kit segítségével végeztük el.

3.4. AZ OLIGOPEPTIDEK

Az oligopeptideket szilárd fázisú peptidszintézissel készítették, Model 430A automata peptid szintetizátorral vagy félautomata Vega peptid szintetizátorral. A tisztításhoz RP-HPLC-t használtak. A peptideket aminosav analízissel, illetve alkalmanként gázfázisú szekvenálással ellenőrizték. A peptid-törzsoldatok desztillált vízzel vagy 10 mM DTT-oldattal készültek, a pontos koncentrációt aminosavanalízissel határozták meg. A peptid oldatokat Dr. Stephen Oroszlántól és Dr. Terry D. Copelandtól kaptuk (Molecular Virology and Carcinogenesis Laboratory, NCI-FCRDC, Frederick, MD, USA).

3.5. AZ ENZIMAKTIVITÁS MÉRÉSE SZINTETIKUS SZUBSZTRÁTOKKAL

A retrovirális proteázok aktivitás-mérése 20 μ l reakcióelegyben történt: 5 μ l 0,01-3,0 mM koncentrációjú szubsztátoldat a hozzávetőleges K_M értéktől függően, 5 μ l 8-8500 nM koncentrációjú HIV-1 vagy HTLV-1 PR készítmény, 10 μ l, dupla töménységű inkubációs puffer: 0,5 M foszfát puffer pH 5,6, 10% glicerol, 2 mM EDTA, 0,4% Nonidet P-40, 4 M NaCl, 10 mM DTT. A reakcióelegyeket 37 °C-on 1 órán át inkubáltuk. Ha nem tapasztaltunk jelentős hidrolízist, a reakciót 20 órás inkubálással is lejátszottuk. A reakciókat 180 μ l 1% TFA hozzáadásával állítottuk le, majd a szubsztátot RP-HPLC-vel választottuk el a termékektől, valamint a pufferkomponensektől, Nova-Pak C18 kromatográfiás oszlopon (3.9 x 150 mm), lineáris víz-acetonitril gradienssel (0-100%), 0,1% TFA jelenlétében. Az elválasztást 206 nm-en követtük és a hidrolízis mértékét a kromatográfiás 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 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.

3.6. GÁTOLHATÓSÁGI VIZSGÁLATOK:

Az inhibitor analízishez mikrotiter lemez alapú fluoreszcens eljárást alkalmaztunk. A munkánk során fluoreszcens Dabcyl/Edans jelölt HTLV-1 kapszid↓nukleokapszid hasítási helyen alapuló oligopeptid szubsztrátot (RE(Edans)TKVL↓VVQPK(Dabcyl)R, ahol a nyíl jelöli a hasítandó peptidkötést) használtunk. Az enzim, szubsztrát, inhibitor elegyet 96-lyukú lemezen 250 mM foszfát, pH 5,6 pufferben inkubáltuk, amely még 5% glicerolt, 1mM EDTA-t, 5 mM DTT-t, 500 mM NaCl-t és 1% DMSO-t tartalmazott. A növekvő fluoreszcenciát 460 nm hullámhosszon detektáltuk, 355 nm elnyelési hullámhossz mellett Victor Wallace fluori-luminométer segítségével a belső szűrő hatást figyelembe véve. A K_i értékeket Williams és Morisson szerint számoltuk ki.

3.7. MOLEKULÁRIS MODELLEZÉS:

A HTLV-1 PR modellezéséhez egy 9 aminosavcserét tartalmazó mutáns RSV proteáz kristályszerkezetét (RSV S9 PR) választottuk mintául, amelyben a flap régió teljesen látható volt. A modellezés során a megfelelő aminosavrészek kicserélése mellett két deléció alkalmazására is szükség volt: egy 5 aminosav hosszúságúra az RSV S9 PR 22-26 aminosavai között és egy 3 aminosav hosszúságúra a flap régió kezdeti szakaszában. A kapott szerkezetet

az AMMP program segítségével Thr-Lys-Val-Leu↓Val-Val-Gln-Pro oligopeptiddel alkotott komplexében minimalizáltuk, sp4 paraméterkészlet alkalmazásával.

A kapott modellt a mintaként használt RSV S9 proteázon kívül összehasonlítottuk a HIV-1, HIV-2, SIV, EIAV, FIV proteázok kristályszerkezetével. A szerkezeteket 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.

3.8. A HIV-1 KAPSZID (CA) PROTEIN TISZTÍTÁSA

A vírussal fertőzött sejtekből izolált p24^{CA} fehérjét Dr. Mangalasseril G. Sarngadharan (Advanced BioScience Laboratories Inc., MD, USA) bocsátotta rendelkezésünkre.

A rekombináns kapszid fehérje (r-p24^{CA}) expresszióját HIV_{III}B preparátumból származó kapszid fehérjét és vele N-terminálison 6 hisztidin aminosav hosszúságú, túlnyúló véget hordozó plazmidból végeztük, amely Dr. Carol Carter laboratóriumából (Department of Molecular Genetics and Microbiology, S.U.N.Y. Stony Brook, USA) származik. A rekombináns fehérje expresszióját BL21 (DE3) *E. coli* sejtekben, 0,4 mM IPTG hozzáadásával 3 órán keresztül, 37°C-on végeztük. A bakteriális sejtek feltárását 10 mM Tris-HCl-t, 150 mM NaCl-t és 1 mM fenil-metil-szulfonil-fluoridot (PMSF) tartalmazó pH 8,0-s pufferben végeztük szonikálással. Centrifugálás után a pelletet 500 mM NaCl-ot, 0,1% Triton-X-100-at és 8 M ureát tartalmazó 20 mM-os foszfát pufferben (pH 7,5) szuszpendáltuk, majd újra szonikáltuk. Újabb centrifugálás, majd szűrés után a felülúszót Ni-NTA Superflow affinitás kromatográfiás oszlopra vittük fel, amit előtte a fenti pufferrel ekvilibráltunk. Az oszlopot ezután intenzíven mostuk a felvivő pufferrel hasonló összetételű, de 500 mM LiCl-ot is tartalmazó pH 6,0-s pufferrel. Végül a kötött fehérjét 50 mM Na-acetát, pH 5,0-s pufferrel eluáltuk, amely még 8 M ureát, 500 mM NaCl-ot, 10% glicerolt, 1% Triton X-100-at és 5 mM β-merkaptotetanolt is tartalmazott. A tisztított fehérje frakciókat 25 mM hangyasavval szemben, 4 °C-on egy éjszakán keresztül dializáltuk, liofilizáltuk, és végül a szükséges pufferben vettük fel. A fehérjekoncentrációkat Bradford spektrofotometriás eljárással határoztuk meg.

3.9. A HIV-1 INTEGRÁZ (IN) TISZTÍTÁSA:

A HIV-1 szolubilis integráz mutáns kódoló pINSD.His.Sol plazmidot az AIDS Research and Reference Programon keresztül kaptuk meg. Az integráz expresszióját BL21 (DE3) *E. coli* sejtekben, 0.4 mM IPTG hozzáadásával 3 órán keresztül, 37 °C-on végeztük. A bakteriális sejteket 10 mM Tris-HCl-t, 150 mM NaCl-t és 0,1 % Triton X-100-at tartalmazó pH 8,0-s pufferben vettük fel, és 10 mM MgCl₂ jelenlétében 30 percig, 37 °C-on, 100 µg/ml DNase I hozzáadásával kezeltük. A pelletet centrifugálás után 500 mM NaCl-ot, 0,1 % Triton X-100-at és 8M ureát tartalmazó 20 mM foszfát pufferben, pH 7,5-ön reszuszpendáltuk. Az elegyet szűréssel tisztítottuk, majd nikkel-kelát ProBond töltetre vittük fel, amelyet előzőleg a fenti pufferrel ekvilibráltunk. Intenzív felvivő pufferrel történő mosás után, a kötött fehérjét pH 5,0-ig csökkenő gradienssel eluáltuk. A rekombináns fehérjét tartalmazó frakciókat, melyket előzőleg SDS poliakrilamid gélelektroforézissel azonosítottunk, egy éjszakán keresztül, dializáltuk 4 °C-on, 25 mM hangyasav oldattal szemben. Liofilizálás után az integrázt a szükséges pufferben vettük fel.

3.10. HIV-1 KAPSID ÉS INTEGRÁZ HASÍTHATÓSÁGÁNAK VIZSGÁLATA HIV-1 PROTEÁZZAL

A pH hatását a kapszid fehérje degradációjára úgy határozták meg, hogy a vírussal fertőzött sejtekből származó p24^{CA} fehérjét (4.3 µM végkoncentrációban) rekombináns HIV-1 proteázzal (0,7 µM végkoncentrációban), 2.5 mM DTT-t tartalmazó, 100 mM kálium-foszfát pH 4,0 pufferben inkubáltuk. 16 órás inkubálás után a reakciót dupla töménységű tricín-SDS mintafelvivő pufferrel állítottuk le. A mintákat 16 vagy 10-20 %-os, tricines, gradiens SDS-poliakrilamid géleken analizáltuk. A fragmensek molekulatömegét Rainbow molekulásúly markerrel határoztuk meg.

A rekombináns kapszid (r-p24^{CA}) és a rekombináns integráz (r-32^{IN}) hasításához a fehérjét (hozzávetőlegesen 20 és 8 µM végkoncentrációban) rekombináns HIV-1 proteázzal (1 µM végkoncentrációban) 1 mM DTT-t, 1 mM EDTA-t és 150 mM NaCl-t tartalmazó, 100 mM Na-acetát, pH 5,5 pufferben inkubáltuk. A ciklofilin A hatásának vizsgálatokor a kapszid fehérjét 43 µM Cyp A-val inkubáltuk elő, 1 órán keresztül, szobahőmérsékleten. A nem specifikus kontroll mérésekhez a borjú szérum albumint és a lizozimet is 43 µM koncentrációban, a ciklofilinhez hasonló módon alkalmaztuk. Különböző ideig tartó, 37° C-on történő inkubálás után a reakciókat dupla töménységű tricín-SDS mintafelvivő pufferrel állítottuk le. A mintákat 16 vagy 10-20 %-os, tricines, gradiens SDS-poliakrilamid géleken analizáltuk. A fragmensek molekulatömegét Rainbow molekulásúly markerrel határoztuk meg.

3.11. A KAPSZID FEHÉRJE FRAGMENTEINEK SZEKVENÁLÁSA

A proteáz által hasított kapszid fehérje fragmenteket SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel választottuk el és PVDF membránra vittük át Towbin és mtsai. szerint. Az N-terminális aminosav szekvencia meghatározást Edman lebontást követve, 470A gáz fázisú szekvenátorral vagy Knauer 910 fehérje szekvenátorral végeztük el.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

4.1. A humán T-sejtes leukémia vírus (HTLV) proteázok szubsztrátspecifitásának vizsgálata és érzékenysége a ligandkötő zsebben bekövetkező mutációkra

4.1.1. A HTLV-1 és HIV-1 proteázok szubsztrátspecifitásának összehasonlítása retrovírusokban előforduló természetes hasítási helyeket reprezentáló oligopeptid szubsztrátokkal

A két proteáz szubsztrátspecifitásának összehasonlítására a HIV-1, HIV-2, EIAV, RSV, MMTV, MMLV, BLV és HTLV-1 természetes hasítási helyeket reprezentáló, 50 tagból álló oligopeptid szubsztrátsorozatot használtunk. A kiválasztott peptidok előzőleg hasíthatónak bizonyultak a megfelelő retrovírus által kódolt proteázzal. Csak néhány peptid hasadt értékelhető mértékben mind a HTLV-1, mind a HIV-1 proteáz által. Miközben a legtöbb proteáz hasítási hely P1 és P1' pozícióban² hidrofób aminosavat tartalmaz, egy kivételével azon szubsztrátok mindegyike, amely mindkét enzim jó szubsztrátjának bizonyult, hidrofób béta elágazó béta oldallánccal rendelkezik P2 helyen (Val, Ile) és szintén béta elágazó hidrofób aminosavval vagy leucinnal a P2' pozícióban. Ezek tipikusan jellemzőek a HTLV-1 természetes hasítási helyet reprezentáló szubsztrátokra és kisebb mértékben a BLV hasítási helyekre. Míg a HTLV-1 PR csak három olyan peptidet hidrolizált, melyet a HIV-1 proteáza nem hasított, a HIV-1 PR jóval több olyan peptidet hasított, amely nem bizonyult a HTLV-1 proteáz szubsztrátjának, mutatva az előbbi jóval szűkebb specificitását.

4.1.2. A HTLV-1 proteáz mutációk:

A HTLV-1 és HIV-1 proteázok szekvencia összehasonlítása az ismert szerkezettel rendelkező proteázok többszörös illesztésén alapul. A kinetikai értékeket a HTLV-1 PR

² A szubsztrát valamint a szubsztrátkötő alhelyek elnevezése Schechter és Berger (1967) szerint. A szubsztrát aminosav oldallánccal 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.

molekuláris modelljét és a HIV-1 PR-inhibitor komplex kristályszerkezetét felhasználva értelmeztük. A proteáz szubsztrátkötőhelye három nagy, több aminosavrészt magába foglaló régióra osztható: aktív centrum, flap régió, amely rácsukodik a bekötődött szubsztrátra, és a C-terminális régió a szubsztrát kötőhely vállánál. Az aktív centrum igen konzervált régióknak számít a retrovirális proteázok esetében, mindössze egy aminosavrész különbséget találhatunk a HTLV-1 és a HIV-1 PR között; a HTLV-1 PR 37-es pozícióban metionint tartalmaz a HIV-1 proteázban megtalálható aszpartát helyett. Hasonló különbség tapasztalható más retrovirális proteázokkal összehasonlítva is. Nem úgy a flap és a C-terminális alegységeket tekintve; itt az aminosavak jelentős része különbözik a két proteáz összehasonlítva. Munkánkban 15 HTLV-1 PR mutánst készítettünk el úgy, hogy a szubsztrátkötő zseb meghatározó aminosavrészeit a HIV-1 PR strukturálisan megfelelő aminosavrészeire cseréltük. A következő mutánsokat készítettük el: M37D, V56I, L57G, A59I, F67Q, N96T, N97P és W98V. Mivel a Met37-nek megfelelő aminosav igen fontos a PR specificitásának meghatározásában, így azt különböző méretű hidrofób aminosavakra (Ala, Val, Ile), valamint a HIV-1 PR gyógyszer rezisztens Asn mutációjára cseréltük ki. Ezen mutációk kombinációjaként három összetett flap, illetve C-terminális mutáns proteáz is teszteltünk. A mutánsokat inklúziós testekből tisztítottuk a vad-típusú HTLV-1 proteázzal megegyező módon.

4.1.3. A mutáns HTLV-1 proteázok aktivitása és autoprocesszáló képességeik MPB fúziós formából

A HTLV-1 kapszid↓nukleokapszid hasítási helyet reprezentáló oligopeptid jó szubsztrátjának bizonyult mind a vad típusú HTLV-1, mind a vad típusú HIV-1 proteáznak. Nyolc mutáns enzim volt képes hidrolizálni ezt a szubsztrátot, bár a két vad típusú enzimhez viszonyítva jobbra drámaian lecsökkent katalitikus hatékonysággal. Azonban az egyes mutánsoknál kapott K_M értékek hasonlóak voltak a vad típusú enzimeknél mért értékekhez, miközben néhány más mutánsnál mérsékelt emelkedést tapasztaltunk. Mivel számos mutáns nagyon alacsony aktivitást és a gátolhatóság elvesztését mutatta, így az aktív centrum titrálás csak az M37V, M37I és HIV-1 PR flap-szerű mutánsoknál volt lehetséges. Összehasonlítva az aktív fehérje mennyiségét a fehérje teljes mennyiségével azt tapasztaltuk, hogy az aktív forma kialakulásának képessége ezen mutánsok esetében jóval kisebb, mint a vad típusú enzimek esetén. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy néhány mutáns esetében a katalitikusan megfelelő térszerkezeti forma megjelenésének a hiánya eredményezheti az inaktív enzimek megjelenését. A HIV-1 PR esetében, a vad-típusú HTLV-1 proteázhoz hasonlóan közel 100%-os folding-képesség tapasztalható. Számos gyógyszer rezisztens HIV-1 PR mutáns a vad-típusú

enzimhez hasonló folding-képességgel rendelkezik, azonban néhány egyszeres HIV-1 PR mutánsnál megfigyelhető volt ezen képesség jelentős romlása is. Ez bizonyítja azt, hogy miközben a vad-típusú szekvencia optimálisnak látszik, addig egyszeres mutációk is jelentős hatást gyakorolhatnak a proteáz foldingra, amely befolyásolhatja a mutáns proteáz szekvenciákat hordozó vírusok életképességét.

Négy HIV-1 proteáz-szerű egyszeres aminosav mutációt tartalmazó enzim (M37D, M37N, L57G, F67Q) aktivitása nem bizonyult mérhetőnek. A HTLV-1 Met37-nek megfelelő MLV PR (His) és a RSV PR (Ile) aminosavrészének mutációja a HIV-1 PR azonos pozícióban található aszpartátra olyan enzimeket eredményezett, melyek specificitási állandója közel van a vad típusú enzimekéhez. Ezzel ellentétben a FIV PR megfelelő Ile aminosavrészének aszpartátra történő cseréje inaktív enzimet eredményezett. Minden ismert kristályszerkezettel rendelkező retrovirális proteáz S4/S4' szubsztrátkötő zsebében találunk egy hidrofób régiót. Úgy tűnik, hogy a HTLV-1 PR Met 37-nek megfelelő aminosavrész cseréje nem jár jelentős hatással, ha ez az egység minimum 4 aminosavból áll, mint azt a HIV-1, HIV-2, SIV, EIAV és RSV proteázoknál láthatjuk. Ugyanakkor, ha ez a hidrofób régió csak három aminosavrést tartalmaz, mint a FIV PR vagy a HTLV-1 PR esetén, akkor a HTLV-1 Met 37 és a neki megfelelő FIV PR izoleucin hidrofób természete elengedhetetlen a megfelelő folding folyamathoz és a stabil szerkezet kialakításához.

A legaktívabb mutáns a teljes flap régió cserét tartalmazó proteáz volt. Előző kísérleteink megmutatták a flap régió fontosságát a HIV PR katalitikus aktivitásában. Mostani eredményeink azt mutatják, hogy a flap régió fontos szerepet tölt be mind a HIV-1, mind a HTLV-1 PR szubsztrát specificitás és inhibitorral szembeni érzékenység különbségeinek meghatározásában is.

A mutánsok alacsony aktivitásának, csökkent folding képességének további megerősítésére, MBP fúziós fehérje formájában - melyből a vad típusú enzim képes önmagát kihalászni (autoprocesszálni) - is expresszáltuk a fehérjéket. Ismert, hogy az MBP nagyban elősegíti a fúziós polipeptid oldékonyságát, összehasonlítva más általánosan ilyen célra használt fehérjékkel, mint például a GST, és tioredoxin. Az összes mutánst, amelyet előzőleg a pET expressziós rendszert használva inklúziós testekből tisztítottunk és folding után inaktívnak találtunk, szintén expresszáltuk MBP-fúziós formában is. Ellentétben a vad típusú HTLV-1 proteázzal és a HIV-1 PR flap-szerű mutáns proteázzal, a mutánsok egyike sem volt képes önmaga kihalászásra az expresszió során.

4.1.4. Elsődlegesen a HTLV-1 PR S4/S2 zsebeit érintő mutációk

Az S4 alegység az enzim felszínéhez közel helyezkedik el, így a bekötődő P4 aminosav az oldószerrel is kölcsönhat minden retrovirális PR esetén. Ezzel ellentétben az S2 zseb viszonylag kis méretű, főleg hidrofób aminosavak alkotják, következésképpen kisebb, hidrofób P2 aminosavak befogadására alkalmas. De míg a HIV-1 PR elsősorban a poláris aminosavakat részesít előnyben a P2 (és P2') helyen, addig az összes többi retrovirális PR beleértve a HTLV-1 proteázt is, a hidrofób aminosavakat preferálják.

A HTLV-1 és HIV-1 PR S4 zseb kialakításában a Met37/Asp30, Ser55/Met46, Val56/Ile47, Leu57/Gly48 és a Val92/Leu76 aminosavak vesznek részt, valamint a HTLV proteázban a nagyon szélen elhelyezkedő Phe67/Gln58 aminosav. A HIV-1 PR Asp30 aminosav alegysége, valamint a vele más proteázokban ekvivalensen megjelenő aminosavak, az S4 és S2 zsebek különböző specificitásának fontos meghatározói. Egy példában a nelfinavir rezisztenciában megjelenő Asp30Asn HIV-1 PR mutáns specificitás különbséget mutat a vad-típusú enzimhez hasonlítva, kis proteáz-szubsztrát interakcióban megjelenő strukturális változásokkal kísérve. Ezért a HTLV-1 PR Met37 aminosavrészét Asp, Asn, Ala, Val és Ile aminosavakra cseréltük. Érdekes, hogy az Asp37 és Asn37 aminosavrészeket tartalmazó mutánsok nem bizonyultak aktívnak egyetlen kipróbált szubsztrát esetében sem (nem közölt eredmények). Emellett nem voltak képesek önprocesszálásra MBP – fúziós formából sem. Az ebben a pozícióban a kisebb Ala aminosavat tartalmazó mutáns a szubsztrátok nagy részénél szintén inaktív volt (nem közölt eredmények), kivéve a P1 pozícióban fenilalanint tartalmazó szubsztrátot, amely a vad-típusú enzim legjobb szubsztrátjának bizonyult, mutatva azt, hogy ebben a pozícióban megfelelő hidrofób interakciók elengedhetetlenek a HTLV-1 PR katalitikus működéséhez. Más mutánsok, amelyek β -elágazó aminosavrészeket (Val, Ile) tartalmaznak a 37-es pozícióban, lényegesen alacsonyabb k_{cat} értékeket mutattak a K_M értékek számottevő változása nélkül, mint ahogy azt a vad-típusú szubsztrát esetén tapasztaltuk. Ezen mutánsok specificitása szintén lényegesen megváltozott. Mindkettő a P4 pozícióban az izoleucint részesíti előnyben a vad-típusú HTLV-1 PR által preferált alaninnal szemben, hasonlóan a HIV-1 proteázhoz. Mindamellet szintén előnyben részesítik az izoleucint is a valinnal szemben, ami viszont az egyik vad-típusú enzimre sem jellemző. A HTLV-1 PR Val56 aminosavrésze a flap régió része, melynek az izoleucin felel meg a HIV-1 proteázban. A V56I mutáns katalitikusan igen gyenge enzim, de a P4 pozícióban Leu aminosavat tartalmazó peptidet relative lényegesen jobban hidrolizálja, utalva arra, hogy a nagyobb oldallánccal rendelkező P4 Leu erősebb hidrofób kötések képes kialakítani a V56I enzimmel, mint a kisebb oldalláncú P4 pozícióban Val, Thr és Ile aminosavcseréket tartalmazó peptidek. A HIV-1 PR flap-szerű mutáns (V56I, L57G, A59I)

P4 oldallánc preferenciája vad-típusú HIV-1 proteáz-szerű preferenciát mutat, kivéve az ebben a pozícióban alanint tartalmazó peptidet, amelyet kisebb mértékben hidrolizál.

Az S2 zseb Met37/Asp30, Val56/Ile47, Ala59/Ile50 és Val92/Leu76 alegységeiben különbözik a HIV-1 és HTLV-1 vad-típusú proteázok esetében. Ezek a különbségek a HIV-1 proteázhoz viszonyítva, a HTLV-1 PR esetében egy kissé mélyebb, nagyobb hidrofóbicitású S2 zsebet alakítanak ki. Érdekes, hogy mind a M37V, mind a M37I mutációk a Val > Leu > Ile P2 preferenciát Ile > Val > Leu preferenciára cserélték, hasonlóra, mint ami a HIV-1 proteáznál megfigyelhető, azonban nem képesek hidrolizálni az ebben a pozícióban nagyméretű aromás fenilalanint tartalmazó szubsztrátot. Ebben a pozícióban történt béta-elágazó aminosavrészek cseréje csökkenti az oldallánc méretét, amely így jobban képes a zsebbe illeszkedni. Hasonlóan a P4 módosított szubsztrátokhoz a HIV-1 PR flap-szerű mutáns P2 specificitása is közelebb áll a HIV-1 PR specificitásához, mint a vad-típusú HTLV-1 proteázhoz, de ez a mutáns ebben a pozícióban szintén nem tolerálja a fenilalanint, hasonlóan a másik két béta elágazó aminosavrész cseréhez. Ezek az eredmények azt bizonyítják, hogy a flap régió nemcsak az enzim aktivitásáért, hanem a két vad-típusú PR specificitásbeli különbözőségéért is felelős.

4.1.5. A HTLV-1 PR S3/S1 zsebeit érintő mutációk

Az S3 zseb általában nagy méretű és hasonlóan az S4 zsebhez, szintén a felszín közelében helyezkedik el. Következésképpen a P3 oldallánc úgy helyezkedhet el, hogy kapcsolatba kerülhet a PR felszínének erősen poláris aminosavrészeivel és az alzseb mélyén ülő hidrofób aminosavrészekkel is. Néhány P3 helyen aminosav cserét tartalmazó szubsztrátot mindkét vad-típusú enzim hidrolizált, de miközben a HTLV-1 PR az eredeti Lys-t tartalmazó szubsztrátot preferálja, addig a HIV-1 PR a nagyobb, hidrofób aminosavakat. A HIV-1 PR kristályszerkezetének és HTLV-1 modelljének analízise azt sugallja, hogy az ugyanazon pozícióban található aminosavrészeknek kb. a fele vesz részt az S3-P3 kölcsönhatás kialakításában mindkét enzimben. A két vad-típusú enzim S3 zsebe különbözik a flap Leu57/Gly48 és Ala59/Ile50 aminosavrészeiben, miközben a másik alegységnél Asn96'/Thr80', Asn97'/Pro81' és Trp98'/Val82' aminosavrészek különbözőségéről beszélhetünk. A vad-típusú HTLV-1 PR kevésbé érzékeny a P3 cserékre: miközben a Leu57 és a Trp 98' a hidrofób aminosavakkal lép előszeretettel kapcsolatba, addig az Asn 96' és az Asn 97' potenciálisan a poláris P3 aminosavakkal képes kapcsolatot kialakítani. Az L57G és az A59I flap mutáns enzimek a természetes hasítási hely szekvenciát tartalmazó peptiddel szemben igen alacsony aktivitást mutattak. A vad-típusú HTLV-1 PR Leu57 aminosavrésze a

nagyobb hidrofób P3 aminosavrészsel kapcsolódik előszeretettel és ez a kapcsolat elengedhetetlen a megfelelő hidrolízis szempontjából. Miközben a P3 szubsztitúciók lényegesen nem javítják az L57G enzim hidrolitikus aktivitását, a P3 pozícióban alanint tartalmazó szubsztrát meglepő módon a legjobbnak bizonyult az enzimatis aktivitás szempontjából (nem közölt eredmény). Az L57G enzimmel szemben az A59I mutáns esetén a P3 helyen bevitt nagyobb hidrofób aminosavak jelentősen javítják a specificitási állandókat: az eredeti alaninhoz képest ebben a pozícióban az izoleucin sokkal erősebb hidrofób kötések kialakítására volt képes a hidrofób P3 oldalláncokkal. Az A59I mutáns P3 pozícióban a fenilalanint preferálta, további előnyös hidrofób kötések kialakításával. Az Asn96 treoninra és az Asn97 prolinra történő cseréje megnövelte a relatív preferenciát a hidrofób P3 aminosavak irányába. A W98V mutáns meglepő módon nem mutatott preferenciát a nagyobb hidrofób aminosavak irányába, inkább a kisebb hidrofób aminosavrészeket kedvelte.

4.1.6. A vad-típusú és mutáns HTLV-1 proteázok gátlási profilja

Számos HIV-1 PR inhibitorot klinikai gyakorlatban is használnak. Köztük tartjuk számon az indinavir, saquinavir, nelfinavir, ritonavir és amprenavir inhibitorokat is. Kipróbáltuk, hogy ezen inhibitorok és még két redukált peptid-tartalmú HTLV-1 inhibitor, milyen hatást gyakorolnak a vad-típusú és mutáns HTLV-1 proteázok aktivitására. A kísérlet végrehajtására munkacsoportunk által kifejlesztett nagy kapacitású mikrotiter lemezen alapuló fluoreszcens eljárást alkalmaztuk. Az indinavir kivételével a HIV-1 PR inhibitorok nem fejtettek ki jelentős hatást a vad-típusú HTLV-1 PR esetében. Előzőleg munkacsoportunk már kipróbált néhány HIV-1 PR inhibitorot (köztük a saquinavirt) HTLV-1 PR esetén az idő- és vegyszerigényes HPLC eljárást alkalmazva. Egyedül a Compound 3 volt képes 10 μ M alatti tartományban gátolni a proteázt. Négy, klinikai gyakorlatban is használt HIV-1 PR inhibitora HTLV-1 Gag *in vitro* hasítására kifejtett hatását is vizsgálták, de nem tapasztaltak változást. Eredményeink alátámasztották a nagy különbségeket a két enzim inhibitor érzékenysége között. Előző kísérletek utaltak arra, hogy a HTLV-1 leghatásosabb inhibitora a sztatin-tartalmú HTLV-1 mátrix↓kapszid hasítási hely szekvenciáján alapuló gátlószer volt. Ezzel szemben a sztatin-tartalmú kapszid↓nukleokapszid hasítási hely szekvenciáján alapuló peptid nem gátolta az enzimet. Két redukált-peptid kötést tartalmazó HTLV-1 kapszid↓nukleokapszid és mátrix↓kapszid hasítási hely szekvencián alapuló HTLV-1 PR inhibitorot, az IB268 és IB269 gátlószereket is kipróbáltuk. A korábbi HIV-1 és HIV-2 proteázzal végzett kísérletek azt mutatták, hogy a redukált-peptidkötést tartalmazó szubsztrát analógok a retrovirális proteázok potenciális gátlószerekként viselkednek magas sótartalom mellett. HPLC-s méréseink szerint az

IB268 és IB269 inhibitorok potenciális gátlószerei a vad-típusú HTLV-1 proteáznak 50 nM alatti K_i értékkel. Ezek bizonyultak a vad-típusú enzim legjobb inhibitorainak a fluorometriás mérési módszer szerint is, melyet lényegesen kisebb ionerősség mellett végeztünk el.

A legtöbb HTLV-1 PR mutánst nem gátolták a HIV-1 PR inhibitorok. Kivételt képez a HIV-1 PR flap-szerű enzim, amely érzékenységet mutatott néhány HIV-1 PR inhibitorra, miközben csökkent affinitását tapasztaltuk a HTLV-1 PR inhibitorokkal szemben. A V56I mutáció is nagy hatással volt az gátlási profil megváltozására, és ez a hatás összhangban van azon korábbi megfigyelésekkel, miszerint az I47V mutáció megjelenik az *in vitro* gyógyszer rezisztencia során. Ez az aminosavrész kiemelten fontosnak látszik a HIV-1 és HTLV-1 proteázok különböző gátlási profiljának kialakításában.

4.2. A HIV-1 kapszid (CA) protein szubsztrátja a HIV-1 proteáznak, az integráz (IN) rezisztens a proteolízissel szemben.

4.2.1. In vitro körülmények között a kapszid fehérje pH-függő módon szubsztrátja a HIV-1 proteáznak

HIV-1-el fertőzött eukarióta sejtekből tisztított kapszid fehérje ($p24^{CA}$), rekombináns HIV-1 proteázzal együtt inkubálva pH függő processzálást mutatott. Miközben pH 7,0 értéken nem tapasztalható hasítás, csökkentve azt, fokozott mértékű kapszid processzálást figyelhetünk meg. A pH 5,0 értéken a legnagyobb 22-kDa tömegű fragmens mellett nagyon alacsony tömegű sávok is megjelentek, miközben pH 4,0 értéken három közepes méretű fragmens is láthatóvá vált. Ez arra utalt, hogy a közepes tömegű sávokat eredményező hasítás más pH optimumú, mint amelyik a 22 kDa-os és a nagyon rövid fragmenseket eredményezi.

4.2.2. Rekombináns kapszid protein HIV-1 proteázzal történő hasításának időfüggése

A kapszid fehérjén belüli hasítási helyek meghatározásához *E. coli*-ban expresszált, rekombináns $p24^{CA}$ fehérjét használtunk (r- $p24^{CA}$), melyet HIV-1 proteázzal hasítottunk. A PR és a CA aránya 1:20-hoz volt, a hasítást pH 5,5 értéken végeztük, amely optimális a proteáz számára. A kísérlet során időfüggő processzálást figyelhattunk meg, amelyet specifikus PR inhibitorral, ritonavirrel 0,2 μ M koncentrációban gátolni lehetett.

A $p24^{CA}$ degradáció során keletkezett fragmensek azonosításához a hasítás termékeit SDS-poliakrilamid gél elektroforézissel elválasztottuk, és PVDF membránra vittük át, ezután a Coomassie-festődött sávokat kivágtuk és N-terminális analízisnek vetettük alá. A sávokat N-terminális szekvenciájuk és molekulatömegük szerint azonosítottuk. Ezek alapján, két

hasítási helyet azonosítottunk a p24^{CA} proteinen belül; az egyik a CA N-terminális domén Ala77 és Ala78 aminosavrészei, a másik a kapszid C-terminális Leu189 és Leu190 aminosavrészei között helyezkedik el.

A kapszid kristályszerkezete alapján valószínű, hogy a C-terminális domén hasítási helye a 9. helixen található, ahol a Leu 189 a dimer felület része. Az N-terminális domén hasítási helye a 4. helixen található, amely a ciklofilin A-kötő hurok része. Ezek a szerkezeti elemek nem felelnek meg a proteáz-mediált hidrolízis szerkezeti követelményeinek, mivel a szubsztrátnak nyújtott béta konformációban kell az enzimhez kötődnie. Azonban a p24 kapszid fehérje szerkezetmeghatározásához használt kristályt pH 7,5-ön növesztették, ahol a kapszid rezisztensnek mutatkozik a proteolízissel szemben. A kapszid szerkezete és magasabb szerveződése nagyon pH érzékeny; pH 6,6 alatt a multimer forma monomerekké hullik szét és „olvadt” szerkezetet vesz fel, amelyben a hasítási helyek körüli struktúrák már lehetőséget adnak a proteázhoz történő produktív kötődésre.

4.2.3. A ciklofilin A hatása a kapszid fehérje HIV-1 proteázzal történő hasítására

Ahhoz, hogy tanulmányozzuk a ciklofilin A hatását a CA processzáására, a r-p24^{CA} fehérjét pH 4.0 értéken ciklofilin A-val előinkubáltuk a PR hozzáadása előtt. A Cyp A r-p24^{CA}-hoz történő kötődése lényegesen lecsökkentette a kapszid protein hasíthatóságát. Szérum albumint, vagy lizozimet Cyp A-hoz hasonló koncentrációban használva ezt a hatást nem észleltük, utalva arra, hogy a ciklofilin hatása specifikus fehérje-fehérje interakciónak volt köszönhető.

4.2.3. Kapszid fehérje hasítási helyeit reprezentáló oligopeptidek hasítása HIV-1 proteázzal

HIV-1_{HXB2} CA fehérje azonosított hasítási helyeit reprezentáló oligopeptideket szintetizáltattunk, és vizsgáltuk, hogy szubsztrátjai-e a HIV-1 proteáznak. Előzőleg optimálisnak talált mérési körülményeket használtunk (pH 5,6, 2M NaCl), mely során úgy találtuk, hogy a C-terminális hasítási helyet reprezentáló oligopeptid valamivel jobb szubsztrátnak bizonyult. Ha a kinetikai paramétereket az *in vitro* hasítási körülményekhez igazítottuk (pH 4,0) akkor a másik szubsztrátot találtuk kedvezőbbnek.

A HIV-1 proteáz különböző pozíciókban hasítja a Gag és Gag-Pol polipeptideket a vírus „érése” során. Ezeknek a helyeknek P2-P2' helyein általában hidrofób aminosavakat találhatunk. Egyedül egy hasítási hely, a kapszid_{p2} tartalmaz töltött aminosavat a P2' helyen, még hozzá glutamátot, amely igen konzervált a HIV-1 esetén. A pH csökkenése

gyorsítja a kapszid↓p2 hasítási hely hidrolízisét, ami azt bizonyítja, hogy ez szabályozó szerepet játszhat a virális fehérjék hidrolízisében. Miközben a p24 C-terminális doménon meglévő hasítási hely jól beleillik a Gag és Gag-Pol szekvenciák sorába, az N-terminális doménon lévő glutamátot tartalmaz mind a P2, mind pedig a P2' pozíciókban. Két HIV-1 proteáz kristályszerkezet található az irodalomban, amely olyan inhibitorral, vagy hasítási termékkel készült, melynek P2' helyén Glu aminosavrész található. Ezekben a szerkezetekben a P2' Glu két gyenge hidrogénhíddal kapcsolódik az enzim Asp 29 és Asp 30 amidjához. A Glu oldallánc közelsége az Asp 30 oldallánchoz azt sugallják, hogy megosztóznak a protonon. Feltételezhető, hogy a különböző hasítási helyekben P2' helyen található Glu felelős a pH hatásért. A kapszid hasítási helyben előforduló két Glu valószínűleg növeli a pH hatását, amely magyarázatot adhat arra, hogy a pH miért növeli meg a kapszid N-terminális domén hasítását. Ellentétben a P2 és P2' helyen előforduló glutammal, a C-terminális domén hasítási helyét reprezentáló peptid P3 és P3' pozíciójában ugyanez az aminosavrész semmilyen pH függő hatást nem gyakorol a hasíthatóságra.

Miközben az aktív proteázt hordozó vírus a sejtbe lép, és kapcsolatba kerül a gazdasejt endoszómáinak savas pH-jával, fokozódhat bizonyos virális proteinek, köztük a kapszid protein HIV-1 proteáz által mediált hidrolízise, ami feltehetően a pH savasodásának köszönhető. Ez valószínűleg igen fontos lépés a preintegrációs komplex kialakulásához vezető úton.

4.2.4. Az integráz nem szubsztrátja a HIV-1 proteáznak

A kapszid hasításhoz hasonló körülmények között rekombináns integrázt (IN) is inkubáltunk HIV-1 proteázzal. A 4 órás inkubáció során az integráz fehérje intakt formában maradt. Az, hogy az integráz rezisztens a proteolízissel szemben, jó összhangban van azzal, hogy részt vesz a preintegrációs komplex kialakításában, és mindvégig megőrzi aktív formáját. Eredményeink irodalmi adatokkal összevetve arra utalnak, hogy a sejtbe belépő „core” struktúra fehérje alkotóelemei (NC, CA, RT, RNázH, IN, PR, Nef, Vpr) közül csak a preintegrációs komplex kialakításában szerepet játszó Vpr és HIV-1 integráz fehérjék nem szubsztrátjai a HIV-1 proteáznak. Azok a fehérjék, amelyek nem kerülnek a PIC építőelemei közé, mind hidrolizálnak HIV-1 proteáz hatására, köztük a HIV-1 kapszid fehérje is.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A doktori értekezésemben felhasznált munkáim során lehetőségem volt a retrovírusok HTLV/BLV családjába tartozó HTLV-1 proteáz mutánsainak tervezésére, előállítására, tisztítására. Összehasonlítottam a vad-típusú HTLV-1 proteáz, HIV-1 proteáz valamint mutáns HTLV-1 proteázok specificitását és gátolhatósági profilját. Lehetőségem volt egy eddig kevésbé ismert feltehetően a korai fázisban bekövetkező proteázhoz köthető folyamat vizsgálatára is. Vizsgálataink tehát az első esetben két különböző családba tartozó vírus proteáz enzim-szubsztrát kölcsönhatásainak alaposabb megismerését és összehasonlítását szolgálták, a második esetben bizonyos alkotóelemek sorsát valószínűsítették a virális replikáció bizonyos szakaszában.

A HTLV-1 és HIV-1 proteázok specificitásának összehasonlítására különböző retrovírusokban előforduló természetes hasítási helyeken alapuló oligopeptid szubsztrátsorozatot alkalmaztunk. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a HTLV-1 PR specificitása lényegesen különbözik a HIV-1 PR specificitásától. A HTLV-1 PR specificitásának további karakterizálásához mutációkat vittünk be a proteáz ligand kötő zsebeibe. A mutációk egy része inaktív, vagy nehezen detektálható aktivitású enzimet eredményezett, valamint a MBP-fúziós fehérjéből történő autoproceszáló képesség elvesztésével járt. Az aktív-centrum titrálás eredményei azt mutatták, hogy az aktív enzim mutánsok folding-képessége jóval rosszabb, mint a vad-típus enzimeké. Vizsgálataink azt mutatták, hogy a HTLV-1 PR szubsztrátspecificitása jóval szűkebb, mint a HIV-1 PR specificitása. Mind a folding képességet, mind a katalitikus működést tekintve a HTLV-1 PR jóval érzékenyebb a mutációkra, mint más retrovirális proteázok, elsősorban a HIV-1 proteáz. Vizsgálataink alapján a katalitikus hatékonyság biztosítása mellett a flap régió fontos szerepet tölt be mind a HIV-1, mind a HTLV-1 PR szubsztrátspecificitás és inhibitorral szembeni érzékenység különbségeinek meghatározásában. Érdeemes megjegyezni, hogy a HTLV-1 fertőzés után a vírus replikációja nem exogén virionok termelésével, hanem a fertőzött sejtek osztódásával történik, kikerülve a hibageneráló reverz transzkripció lépést. Ezért a HTLV-1 evolúciósan sokkal konzerváltabb, mint a HIV-1. Végeredményben tehát a HTLV-1 proteáza nem ment végig azon a véletlenszerű evolúciós fejlődésen, amely optimalizálta a HIV-1 proteázt mind katalitikus hatékonyság szempontjából, mind pedig a mutációkra történő rugalmas reagáló képességben. A vírus replikációjának korai fázisában a virális kapszid struktúra belép a sejtbe. A „core” struktúrában utazó fehérjék közül többről kiderült, hogy szubsztrátja a retrovirális proteáznak. Bebizonyítottuk, hogy a kapszid fehérjét szintén hidrolizálja a PR, és ez a hatás erősen függ a pH indukálta konformáció

változástól. Két új hasítási helyet azonosítottunk a kapszid fehérje szerkezetében. Úgy találtuk, hogy a cikloflin valóban stabilizáló hatást fejt ki a kapszid szerkezetre, így valószínűleg segít fenntartani a stabil „core” struktúrát. A sejtbe lépve a virionban érkező aktív proteáz savas környezetbe kerül, fokozódhat a proteáz mediálta kapszid hasítása, eközben az integráz sértetlen marad, segítve a preintegrációs komplex kialakulását.

7. KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

Az értekezéshez felhasznált közlemények:

Kádas, J., Weber, I.T., Bagossi, P., Miklóssy, G., Boross, P., Oroszlan, S., and Tözsér, J. (2004) Narrow substrate specificity and sensitivity toward ligand binding site mutations of human T-cell leukemia virus type-1 protease. *J. Biol. Chem.* Apr 20 (Epub ahead of print). I.F.: **6.696**

Tözsér, J., Shulenin, S., **Kádas, J.**, Boross, P., Bagossi, P., Copeland, T.D., Nair, B.C., Sarngadharan, M.G., and Oroszlan, S. (2003) Immunodeficiency Virus Type 1 Capsid Protein is a Substrate of the Retroviral Proteinase while Integrase is Resistant toward Proteolysis. *Virology*. 310: 16-23. I.F.: **3.363**

Egyéb közlemények:

Bagossi, P., **Kádas, J.**, Miklóssy, G., Boross, P., Weber, I.T., and Tözsér, J. (2004) Development of a microtiter plate fluorescent assay for inhibition studies on the HTLV-1 and HIV-1 proteinases. *J. Virol. Methods*. In press. I.F.: **1.938**

Az értekezéshez kapcsolódó előadások és poszterek:

Kádas J., Sperka T., Bagossi P., Boross P. és Tözsér J. Mutáns retrovirális proteázok kinetikai jellemzése: Mutációk hatása a specificitásra. A Magyar Biokémiai Egyesület molekuláris Biológiai Szakosztályának 5. Munkaértekezlete, Sopron, 2000. Május 08-11.

Kádas, J., Weber, I.T., Bagossi, P., Boross, P., Miklóssy, G., Louis, J.M., Copeland, T.D., and Tözsér, 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.

Tözsér, J., **Kádas, J.**, Bagossi, P., Boross, P., Miklóssy, G., Oroszlan, S., and Weber, I.T. Alteration of the substrate specificity of Human T-cell Leukemia Virus Protease. Fourth HIV DRP Symposium on Antiviral Drug Resistance, Chantilly, Virginia, USA, December 7-10, 2003.

Egyéb posztterek:

Kádas J., Varga S., Bagossi P. és Tőzsér J. Kísérletek zöld fluoreszcens fehérjén alapuló, lentivírus fertőzés monitorozására alkalmas *in vitro* rendszer kifejlesztésére. A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztályának 4. Munkaértekezlete, Eger, 1999. Május 04-06.

Miklóssy G., Fehér A., **Kádas J.**, Sperka T. és Tőzsér 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., Tőzsér, J. *In vitro* monitoring Equine Infectious Anemia Virus (EIAV) infection and its inhibition by antiretroviral drugs in early phase. VectEuroTrain - 2nd European Conference and Practical Course Towards clinical gene therapy: pre-clinical gene transfer assessment, Bellaterra, Barcelona, Spain, February 1-14, 2004.