

Humán retrovírusok proteolitikus enzimeinek vizsgálata

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés

Kádas János

Témavezető:
Prof. Dr. Tőzsér József

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

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

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

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

Köszönöm Dr. Bagossi Péter egyetemi adjunktus Úrnak, Dr. Boross Péter egyetemi tanársegéd Úrnak a gyakorlati munkában nyújtott hasznos tanácsait.

Köszönöm Miklóssy Gabriella és Sperka Tamás kollegáimnak és egyben barátaimnak, hogy bármikor számíthattam rájuk.

Köszönöm Pető Szilvia, Szabó Katalin és Vágóné Toldi Hajnalka asszisztenseknek a számtalan gyakorlati segítséget.

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

Köszönöm barátnőmnek, Ambrus Csillának, aki mindvégig segítette munkámat és mindenben kitartott mellettem.

Köszönöm szüleim és testvéreim támogatását, akik nélkül mindez nem valósulhatott volna meg.

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AIDS	szerzett immunhiányos szindróma
As	aminosav
ATL	felöltt T-sejtes leukémia
BLV	marha leukémia vírus
CA ¹	kapszid protein
Coomassie	“Coomassie Brilliant Blue 250” fehérje festék
Cyp A	ciklofilin A
DTT	Ditiotreitol
ECL	erősített kemilumineszcencia
EDTA	etilén-diamin-tetraacetát
EIAV	ló vészes vérszegénységet okozó vírus
GST	glutation-S-transzferrin
HAM	trópusi spasztikus mielopátia
HIV	humán immundeficiencia vírus
HPLC	magas nyomású folyadékkromatográf
HTLV	humán T-sejtes leukémia vírus
IN ¹	Integráz
IPTG	izopropil-β-D-tiogalaktopiranozid
K _I	gátlási állandó
MA ¹	mátrix protein
MBP	maltóz-kötő fehérje
MuLV	egér leukémia vírus
NC ¹	nukleokapszid
P1, P2, P3, stb. ²	szubsztrát aminosavrésze
PCR	polimeráz láncreakció
PDB	fehérje adatbázis
PIC	preintegrációs komplex
PMSF	fenil-metil-szulfonil-fluorid
PR ¹	retrovirális proteáz
RP	fordított-fázisú
RSV	Rous szarkóma vírus
RT ¹	reverz transzkriptáz
S1, S2, S3, stb. ²	enzim szubsztrátkötő helyeinek a része
SDS	nátrium dodecil szulfát
STLV	majom T-sejtes leukémia vírussal
SU ¹	„surface” protein

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

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

TM ¹	transzmembrán protein
TFA	trifluor-ecetsav
TSP	trópusi spasztikus paraparézis

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	7.
1.1. A retrovírusok	7.
1.2. A humán T-sejtes leukémia vírus (HTLV)	9.
1.3. A retrovírusok életsiklusa	9.
1.4. A retrovirális proteázok (PR)	13.
2. CÉLKITŰZÉS	17.
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	19.
3.1. A HTLV-1 proteáz mutagenézise	19.
3.2. Az enzimek tisztítása	19.
3.3. A vad-típusú és mutáns HTLV-1 proteázok MBP-fúziós formában történő expressziója	20.
3.4. Oligopeptidek	20.
3.5. Az enzimaktivitások mérése szintetikus szubsztrátokkal	21.
3.6. Inhibitor profilozás	22.
3.7. Molekuláris modellezés	22.
3.8. A HIV-1 kapszid (CA) protein tisztítása	23.
3.9. A HIV-1 integráz (IN) tisztítása	23.
3.10. HIV-1 kapszid és integráz inkubációja HIV-1 proteázzal	24.
3.11. A kapszid fehérje fragmenseinek szekvenálása	24.
4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS	25.
4.1. HTLV proteázok szubsztrátspecifitásának vizsgálata és a proteáz érzékenysége a ligandkötő zsebben bekövetkező mutációkra	25.
4.1.1. <i>A HTLV-1 és a HIV-1 proteázok szubsztrátspecifitásának összehasonlítása retrovírusokban előforduló természetes hasítási helyeket reprezentáló oligopeptid szubsztrátokkal</i>	25.
4.1.2. <i>A HTLV-1 proteáz mutációk</i>	27.
4.1.3. <i>A mutáns HTLV-1 proteázok aktivitása és autoprocesszálo képességeik MPB fúziós formából</i>	29.
4.1.4. <i>Elsődlegesen a HTLV-1 PR S4/S2 zsebeit érintő mutációk hatása</i>	33.
4.1.5. <i>Elsődlegesen a HTLV-1 PR S3/S1 zsebeit érintő mutációk hatása</i>	38.

4.1.6.	<i>A vad-típusú és mutáns HTLV-1 proteázok gátlási profilja</i>	42.
4.2.	A HIV-1 kapszid (CA) protein szubsztrátja a HIV-1 proteáznak, az integráz (IN) rezisztens a proteolízissel szemben	44.
4.2.1.	<i>In vitro körülmények között a kapszid fehérje pH-függő szubsztrátja a HIV-1 proteáznak</i>	44.
4.2.2.	<i>A rekombináns kapszid fehérje HIV-1 proteáz általi hasításának időfüggése</i>	44.
4.2.3.	<i>A ciklofilin A hatása a kapszid fehérje HIV-1 proteázzal történő hasítására</i>	46.
4.2.4.	<i>A kapszid fehérje hasítási helyeit reprezentáló oligopeptidek hasítás a HIV-1 proteázzal</i>	47.
4.2.5.	<i>Az integráz nem szubsztrátja a HIV-1 proteáznak.</i>	49.
5.	ÖSSZEFOGLALÁS	50.
6.	IRODALOMJEGYZÉK	52.
7.	KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA	60.

1. BEVEZETÉS

A proteázok (vagy peptidázok) 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 biológiai, biokémiai, és 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 az AIDS (Gallo és Montagnier, 1988) 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.

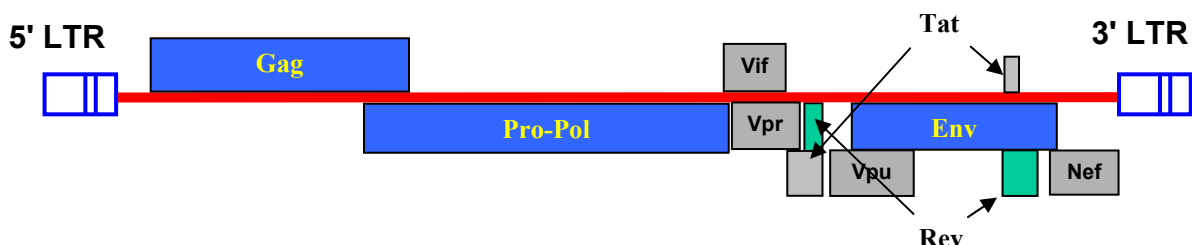
A retrovírusok burokkal rendelkező, pozitív szálú diploid RNS genomot tartalmazó vírusok nagy és diverz családot képviselnek, amely családot általános taxonómiai tulajdonságokkal: felépítés, összetétel, replikációs tulajdonságok, jellemzők (Coffin 1992,

1996). 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, hogy, az DNS intermedieren keresztül történik, amely a fertőzött sejt genomjába integrálódik.

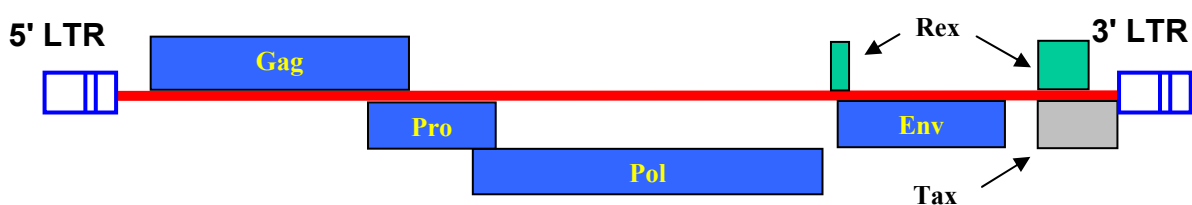
A virális genom szerveződése szerint két csoportra: egyszerű és összetett retrovírusokra osztjuk őket (Coffin, 1992; Murphy és mtsai., 1994). Minden retrovírus legalább három poliproteint kódoló gént tartalmaz: *gag*, melyen a virion mátrix (MA), kapszid (CA) és nukleokapszid (NC) fehérjének genetikai információi helyezkednek el; *pol*, mely az integráz (IN) és reverz transzkriptáz (RT) enzimeket kódolja és az *env*, mely a burokfehérje transzmembrán (TM) és felszíni részének (SU) információit hordozza. Egy járulékos, kisebb *pro* gén is megtalálható minden retrovírusban, amely a virion proteáz (PR) enzimét kódolja (1.1.1 ábra). Az egyszerű retrovírusok általában csak ezeket az alapvető információkat, míg a komplex retrovírusok más járulékos, regulációs fehérjét 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.

A



B



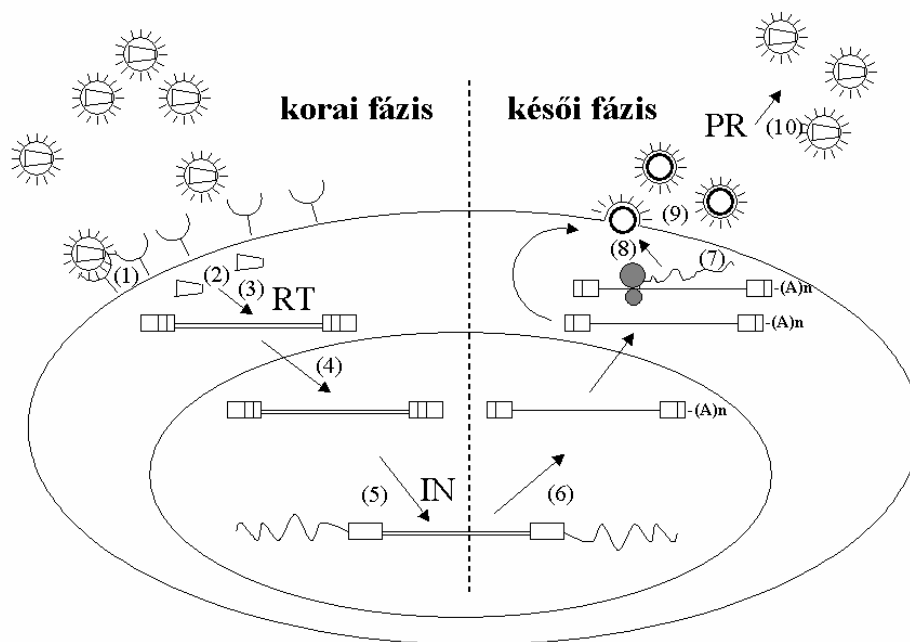
1.1.1. ábra: Retrovírus genomok vázlatos szerkezete. A különböző „frame”-eken szintetizálódó poliproteinek és regulációs fehérjék. A: HIV-1 provirális DNS; B: HTLV-1 provirális DNS.

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

A HTLV és a marha leukémia vírus (BLV) a csoport harmadik tagjával, a majom T-sejttes 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 retrovírustól, 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 (Cann és Chen, 1990; Haas és mtsai., 1992). Annyi bizonyos, hogy a vírus által kódolt transz-aktivátor Tax (1.1.1. ábra) 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 (Jeang, 2001), de ismert apoptózist indukáló képessége is (Yamada és mtsai., 1994). A HTLV-1 emberben felnőtt T-sejttes leukémiát (ATL), trópusi spasztikus paraparézist/mielopátiát (TSP/HAM) okozhat. A HTLV-2 „szőrös” sejt (hairy cell) leukémiát hozhat létre, míg a BLV szarvasmarhában okoz limfoszarkómát, de az előbbiekkal ellentétben a B-limfocitákat támadja meg (Johnson és mtsai., 2001). Eltérően a többi retrovírustól, az e csoportba tartozó vírusok enzimfehérjei egyszeres (PR) és kettős (RT, IN) leolvasási kereteltolással szintetizálódnak.

1.3. A RETROVÍRUSOK ÉLETCIKLUSA

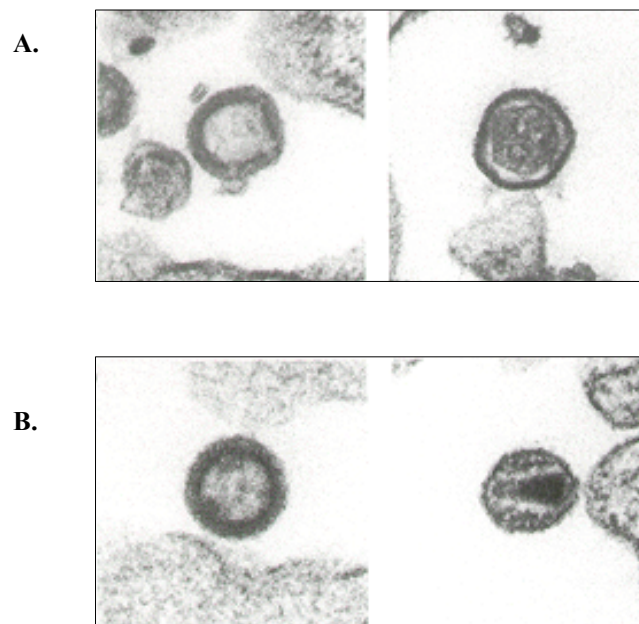
A vírus receptor-mediált endocitózissal vagy direkt membránfúzióval juthat be a gazdasejtbe (1.3.1. ábra). A genom-RNS pozitív szálú és szabályos, eukarióta sejtre jellemző mRNS szerkezetet mutat, de közvetlen fehérjeszintézishez mégsem ez használandó fel. A sejtbe bejutó vírus RNS-ét a reverz transzkriptáz (RT) átírja DNS-sé. A reverz transzkripció valószínűleg a citoplazmában, a vírus "core" struktúrában megy végbe (Varmus és Brown, 1989). Egyes adatok szerint a PR szerepet játszhat ebben a fázisban. Az EIAV vírus kapszidjának preparálása során a nukleokapszid (NC) protein *in situ* hasítását észlelték (Roberts és Oroszlán, 1989). A NC szintén hasad a kapszidban lévő endogén RNS reverz transzkripciója során. Ezért feltételezték, hogy a sejtbe a kapsziddal együtt bejutó PR kritikus szerepet játszik a reverz transzkripcióban és az integrációban (Roberts és mtsai., 1991).



1.3.1.ábra: A retrovírusok életciklusa (Tózsér, 2001 alapján). (1) Kötődés-penetráció: receptor-antireceptor kölcsönhatás. Endocitózis vagy direkt fúzió. (2) A vírusburok elvesztése, pH-függő vagy pH-független úton. (3) Provírális DNS szintézis, melyért a RT felelős. (4) A preintegrációs komplex bejutása a magba. (5) Integráció az IN segítségével. (6) Provírus expressziója. (7) Transzláció. (8) Virion összerendeződése. (9) Virion lefűződése. (10) A virion “érése” a PR segítségével.

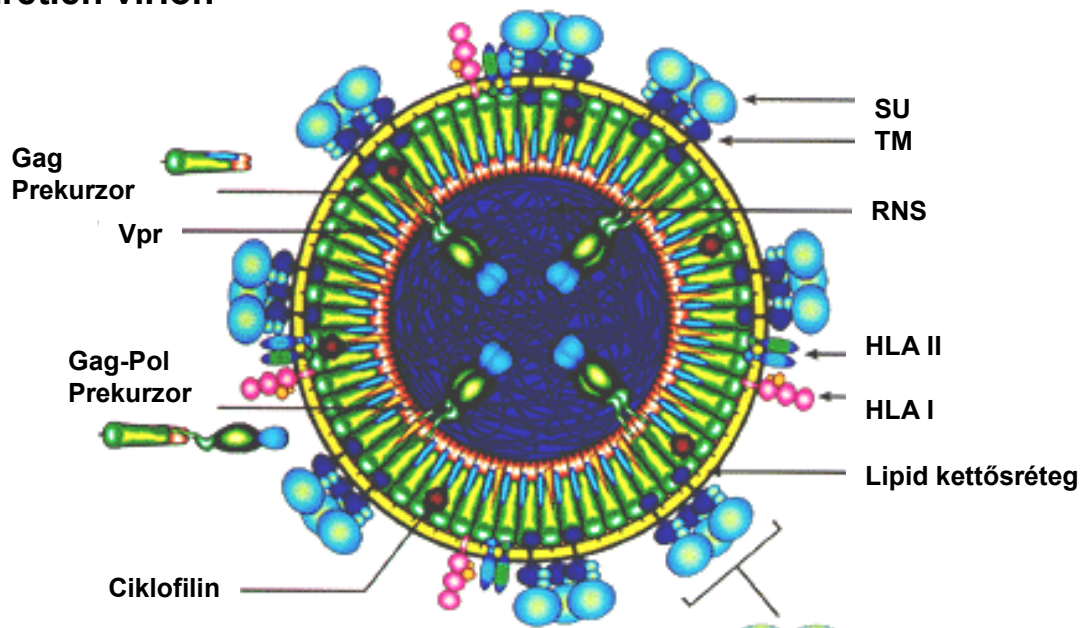
Az újonnan képződő DNS-nukleoprotein komplex bekerül a sejtmagba, ahol a vírus DNS a gazdasejt genomjába integrálódik (provírus képződés). A provírális DNS a celluláris RNS polimeráz II segítségével átíródik RNS-sé. Az egyláncú, diploid RNS genom minden replikáció-kompetens retrovírusban legalább 4 gént (5'-*gag-pol-pro-env*-3') tartalmaz. Az emlős C-típusú retrovírusok (pl.: MuLV) *gag* és *pol* génjei stop-kodonnal (AUG) vannak elválasztva, mely transzláció során néha szupresszálódik (Yoshinaka és mtsai., 1985). A többi ismert nukleotid szekvenciájú retrovírusban a *gag* és *pol* gén különböző leolvasási keretben van kódolva. A Pol fehérjék a leolvasási keret -1 irányú eltolódásával szintetizálódnak (pl. HIV-1) vagy két eltolódás is van, ebben az esetben a *gag* és a *pol* gének között van a *pro* gén (pl. BLV, HTLV). A PR kódolása többféleképpen történhet. A PR, a madár C-típusú vírusai (pl. RSV) kivételével, a *pro* vagy a *pol* génen van kódolva és a strukturális fehérjékhez képest csak lényegesen kisebb mennyiségben (5-10%) szintetizálódik. Egy kisebb, illesztett mRNS-ről íródna át az *env*-kódolt fehérjék, melyek előbb glikozilálódnak, majd a plazmamembránba való transzport során egy felületi glikoproteinre (SU) és egy transzmembrán fehérjére (TM) hasadnak egy celluláris proteáz hatására (1.1.1. és 1.3.3. ábra).

A transzláció 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", fertőzőképpé válik. Ezen átalakulás morfológiailag is jól nyomon követhető (Yoshinaka és Luftig, 1977) (1.3.2. és 1.3.3. ábra). A proteáz funkció nélkül a vírusrészecske éretlen marad, és a működőképes fehérjék hiányából adódóan nem lesz képes újabb sejtek fertőzésére.

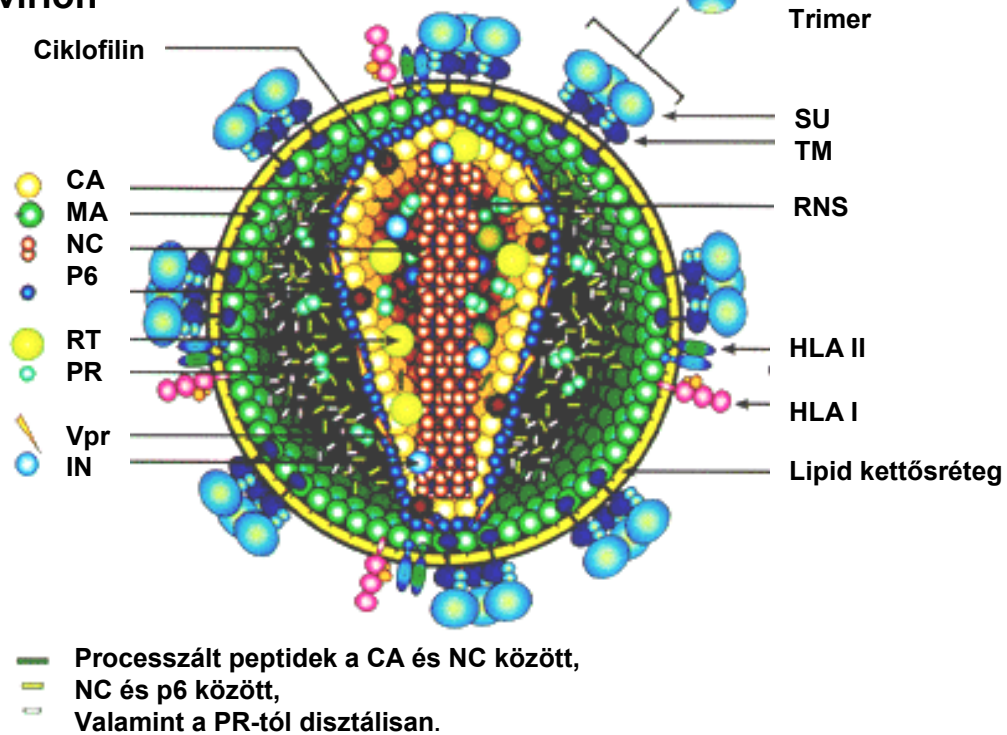


1.3.2. Ábra: Változások a virionban proteolitikus processzálás hatására: a virion „érése”. „Éretlen” és „érett” virionok elektronmikroszkópos felvétele (Coffin és Gonda, 1992.). (A) HTLV-1; (B) HIV-2.

Éretlen virion



Érett virion



1.3.3. Ábra: Modellek a retrovírusok felépítésére. (Fent) Az éretlen HIV-1 virion. A Gag és Gag-Pol poliproteineket különböző színek jelölik, érzékelte az, hogy a domének megfelelnek az ezekből a prekurzorokból kialakuló „érett” proteineknek. Az Env fehérje SU és TM komponense kiszögellik a lipid membránból, akárcsak az elkülönülten beépülő HLA „gazda” fehérjék. A ciklofilin színén celluláris proteinként vesz részt a virion felépítésében. (Lent) Az érett HIV-1 virion. A kúp-alakú „core” karakterisztikus tulajdonságokkal bír erre a genusra nézve. A Vpr a HIV-re jellemző járulékos fehérje. (Coffin, Hughes, Varmus, 1997).

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 (Roberts és Oroszlan, 1998; Welker és mtsai., 2000). 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 citoszkeleton és a szarkoméra proteinjeit: vimentint, dezmint, aktint, miozint és tropomiozint is hasítani (Shoeman és mtsai., 1993, 1996). Feltételezett, hogy a vimentin processzálása fontos lépés a vírusfertőzés korai fázisában (Thomas és mtsai., 1996). A „core” struktúra mozgása a sejtmag irányába kapcsolatot igényel a sejt aktin filamentumaival (Bukrinskaya és mtsai., 1998), ezért valószínűsíthető, hogy az aktin komponenseinek proteolitikus hasítása fontos lépés ebben a folyamatban.

Celluláris proteineket szintén kimutattak a virionban (1.3.1. ábra) (összefoglaló irodalom: Ott, 2002). 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 (Franke és mtsai., 1994; Thali és mtsai., 1994). Aktint és különböző aktin kötött fehérjéket szintén kimutattak. A sejtbe történő belépés után ezen fehérjék sorsa nem tisztázott, de nagyrészüket már a virionban feldarabolódik. A PR szerepét többek között az elongációs faktor-1 alfa (EF1 α) degradációjában már kimutatták (Ott és mtsai., 2000). Az EIAV „core” struktúrákat *in vitro* körülmények között, etilén-diamin-tetra-acetát (EDTA) jelenlétében inkubálva szintén tapasztaltak *in situ* NC degradációt a hordozott proteáz által (Roberts és Oroszlan, 1989; Kaplan, 1991.). A „core” más fehérjéi mellett a HIV-1 RT, az RNase H és a Nef is szerepel a HIV-1 PR szubsztrátjai között (Welker és mtsai., 2000; Tomasselli és mtsai., 1993; Welker és mtsai., 1996). Emellett a PR önmaga is végigmegy egy öndegradációs folyamaton (Mildner és mtsai., 1994), miközben Vpr sértetlen marad a kapszidban (Welker és mtsai., 2000). 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

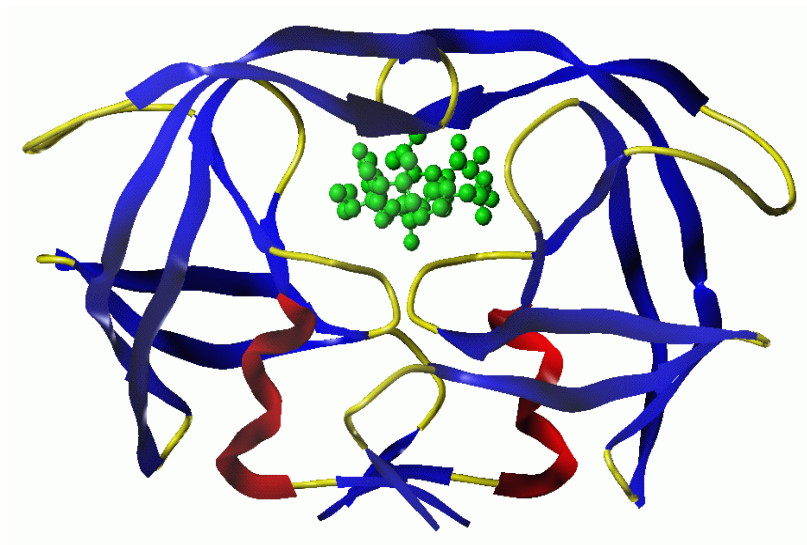
Minden replikációképes retrovírus kódol egy proteázt (PR), mely része a Gag vagy Gag-Pol poliproteinnek. A PR meghatározott helyeken hasítja a virális poliproteineket, funkcionális fehérjéket eredményezve, ezzel kialakítva egy kompakt „core” struktúrát az érett virion számára. Valamint a fertőzés korai 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 (pepsztatinnal 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 (Toh és mtsai, 1985), 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 (1.4.1. ábra).

Az enzimet három jellegzetes régióval jellemezhetjük.



1.4.1. ábra: A HIV-1 proteáz kristályszerkezet alapján készült szalagmodellje. **Pirossal** az α -helixeket, **kékkel** a β -redőket, **sárgával** a hurok régiókat jelöltük. A bekötődött szubsztrátot **zöld** színnel, gömb és pálcika ábrázolással mutatjuk be.

	1	10	20	30	40	50	
HIV1	PQITL	W..QRPLVTIRIG	GQLKEA	LLDTGA	DDTVLEE..M..N.....LPGKWK..PKM	IGGIGG	FIKVRQY
HIV2	PQFSL	W..KRPVVTAHIE	GQPVEV	LLDTGA	DDSIIVAG..I..E.....LGNNYS..PKI	VGGIGG	FINTKEY
SIV	PQFSL	W..RRPVVTAHIE	GQPVEV	LLDTGA	DDSIIVTG..I..E.....LGPHYT..PKI	VGGIGG	FINTKEY
EIAV	VTYNL	E..KRPTTIVLIN	DTPLNV	LLDTGA	DTSVLTTHAHYNRL...KYRGRKYQ..GTG	IGGVGG	NVETFST
FIV	..YNKVG	TTTTL	E..KRPEILIFVN	LLDTGA	DITILNRRDFQ.V...KN.SIENG..RQN	MIGVGG	GKRGTTY
RSV	LAMTM	EHKDRPLVRVILTNTGSHPVKQRSVYITA	LLDSGA	DITIISEEDWP.....TDWPMVEAANPQ	IHGIGG	GIPMRKS	
MULV	TLDDQGG	QGQDP	P..PEPRITLKV	LVDTGA	QHSVLTQ..N..P....GPLSDKS..AWV	QGATGG	KRYRWTT
MMTV	WVQEI	.SDSRPMLHISL	NGRRFLG	LLDTGA	DKTCIAGRDWP.....ANWPIHQT.ESS	LQGLVG	MACGVAR
MPMV	WVQPI	.TCQKPSLTLWL	DDKMFTG	LIDTGA	DVTIIKLEDWP.....PNWPI TDT.LTN	LRGIGQ	SNNPKQ.
BLV	LSIPL	.ARSRPSVAVYL	...SGPWLQPSQNALM	LVDTGA	ENTVLP.....QNWLV RDYPRI..PAA	VLGAGG	VSRNRYN
HTLV2	PLIPL	RQQQQPILGVRI	...SVMGQTPQPTQA	LLDTGA	DLTVIP.....QTLVPGPVKLH..DTL	ILGASG	QTNTQFK
HTLV1	PVIPL	DPARRPVIKAQV	...DTQTSHPKTIEA	LLDTGA	DMTVLP.....IALFSSNTPLK..NTS	VLGAGG	QTQDHF
	1	10	20	30	40	50	60
	60	70	80	90			
HIV1	..DQIPVEICG	HKAIGTVLVG	...PTPVNIIGRNLLTQIG	CTLNF			
HIV2	..KNVEIEVLN	KKVRATIMTG	...DTPINIFGRNILTALG	MSLNL			
SIV	..KNVEIEVLG	KRIKGTIMTG	...DTPINIFGRNILTALG	MSLNL			
EIAV	..P.VTIKKKG	RHIKTRMLVA	...DIPVTILGRDILQDLG	AKLVL			
FIV	..INVHLEIRDENYKT	QCIFGNVCVLEDNSLIQPLLGRDNMIKFN	IRLVM	AQ			
RSV	..RDMIELGVINRDGSLERPLLLFPAVA	...MVRGSLGRDCLQGLG	LRLTN	L			
MULV	..DRKVHLATG	KVTHSFLHVP	...DCPYPLLGRDLLTKLK	AQIHF	E		
MMTV	..SSQPLRWQHED	...KSGIIHPFVI	...PTLPFTLWGRDIMKEIL	VRLMT	DSPDDSQDL		
MPMV	..SSKYLTWRDKE	...NNSGLIKPFVI	...PNLPVNLWGRDLLSQMK	IMMCS			
BLV	..WLQGPLTLALKPE	..GPFITIPKILV	..DTFDKWQILGRDVL SRLQ	ASISI	PEEVRPPMVG		
HTLV2	..LLQTPHIFLPFRR	..SPVILSSCLL	..DTHNKWTIIGRDALQQCQ	GLLYL	PDDPSPHQLL		
HTLV1	..LTSPLVILRLPFRT	..TPIVLTSLV	..DTKNNWAIIGRDALQQCQ	GVLYL	PEAKGPPVIL		
	70	80	90	100	110	120	

1.4.2. ábra: A retrovirális proteázok szekvenciaösszehasonlítása
(sárga háttérrel, keretben: a retrovirális proteázok jellegzetes régiói; piros: katalitikus aszpartát; kék: egyéb konzervált aminosavak)

A konzervált 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 (Wlodawer és mtsai., 2000). A katalitikus tripletek hidrogénkötések hálójátán keresztül, jellemző módon kapcsolódnak egymáshoz (Davies., 1990; Wlodawer és mtsai., 1993), amit a kötés geometriájára és igen erős jellegére utalva tűzoltófogásnak (fireman's grip) neveznek. Egy másik többé-kevésbé konzervatív régió a flexibilis „flap” régió (Miller és mtsai., 1989; Navia és mtsai., 1989), mely a szubsztát illetve inhibitor kötődésekor elmozdul és ráhajlik a ligandra, majd azzal számos kölcsönhatást alakít ki, melyekkel mintegy stabilizálja a komplexet (Miller és mtsai., 1989; Swain és mtsai, 1990; Jaskolski és mtsai, 1991). A harmadik konzervatív régió (Gly-Arg-Asp/Asn) a C-terminális közelében helyezkedik el és ionpárok kialakításával a dimerizációban játszik fontos szerepet (1.4.2. ábra).

A retrovirális proteázok pH optimuma savas (pH 5-6), részletes biokémiai jellemzésüket oligopeptid és poliprotein szubsztátokon végezték (Dunn és mtsai, 1994; Tomasselli és mtsai, 1994). A hasítás poliprotein szubsztátoknál alacsony, oligopeptidek esetében viszont magas (2-3 M NaCl) ionerősség mellett hatékonyabb (Kotler és mtsai, 1989; Wondrak és mtsai, 1991; Szeltner és mtsai, 1996). A különböző retrovirális hasítási helyeket reprezentáló oligopeptid szubsztátok hidrolízise jól nyomon követhető HPLC technikával, megfelelően módosított szubsztátok 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 (Tözsér és mtsai, 1991a; Weber és mtsai, 1993).

A retrovirális proteázok természetes hasítási helyein található aminosavak többnyire hidrofób karakterűek, viszont általánosan érvényes konszenzus szekvencia nem adható meg (Oroszlan és Tözsér, 1990).

A proteáz aktiválódása, és egyben a poliproteinek hasítása a virionban a proteáz N-terminálisának hidrolízisével veszi kezdetét, és ebben valószínűleg több tényező játszik szerepet. A dimerizáció minimálisan előfeltétele a proteolitikus aktivációnak (Babe és Craik, 1997). Az, hogy a processzási folyamat nem indul meg a Gag poliproteinek oligomerizációjával egy időben, arra utal, hogy léteznek egyéb regulációs tényezők is. Az aktiváció késleltetéseért felelős mechanizmusra vonatkozó legújabb elképzelések szerint a regulációban fontos lehet a dimerizációs felszínen lévő kéntartalmú aminosavak reverzibilis oxidatív módosítása. (Davis és mtsai., 2003).

2. CÉLKITŰZÉS

A HIV-1 proteázhoz hasonlóan a HTLV-1 proteáz is kemoterápiás célpont. Emelett 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 a HTLV-1 PR esetében is tapasztalták (Louis és mtsai., 1998). 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 (Shuker és mtsai., 2003). Miközben a HTLV-1 PR és a HIV-1 PR szekvencia azonossága 28% az enzim molekuláris modellje alapján (Tőzsér és mtsai., 2000), addig a szubsztrátkötő régió sokkal konzerváltabb, mintegy 45% azonossággal rendelkezik. A két enzim gátolhatósági profilja és szubsztrátspecificitása különbözik (Hruskova-Heidigsfeldsova és mtsai., 1997; Ding és mtsai., 1998; Louis és mtsai., 1999; Tőzsér és mtsai., 2000; Shuker és mtsai., 2003).

Számos összehasonlító kutatást végeztek vad-típusú retrovirális proteázokkal, az adott vírus természetes hasítási hely szekvenciáját reprezentáló, és abban aminosavcserét tartalmazó oligopeptid szubsztrátokat használva (összefoglaló közlemény: Dunn és mtsai., 1994). Néhány közleményben olyan eredmények is napvilágot láttak, ahol más vírusokban is előforduló természetes hasítási helyeket is teszteltek adott vírus proteázával (például: Menendez-Arias és mtsai., 1992; 1993). Célunk az volt, hogy a 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 adnak 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 tapasztalatok szerzésével, ugyanis az irodalomban elvétve fordul elő HTLV proteázzal vagy más deltaretrovirális proteázzal kapcsolatos hasonló munka (Shuker és mtsai., 2003). Eddig munkacsoportunk közteműködésével elkészítettek egy HTLV proteázt, amely három (L40I, C90A, C109A), az enzim stabilizálását elősegítő mutációt tartalmazott (Louis és mtsai., 1999), valamint

találhatunk az irodalomban C-terminálison mutált proteázokról szóló publikációt is (Precigoux és mtsai., 1993).

Amíg 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 (Baboonian és mtsai., 1991; Venaud és mtsai., 1992; Nagy és mtsai., 1994; Panther és mtsai., 1999), míg mások ilyen hatást nem tapasztaltak (Goto és mtsai., 2001; Jacobsen és mtsai., 1992). Előkísérleteink alapján az EIAV fertőzés korai szakaszában is gátolható proteáz inhibitorokkal (Kádas és mtsai., 2004). A „core” struktúra - melynek a proteáz is része (Roberts és Oroszlan, 1998; Welker és mtsai., 2000) - virális és celluláris fehérjéinek proteáz-mediált hasítása, illetve sértetlensége (Welker és mtsai., 2000; Tomasselli és mtsai., 1993; Welker és mtsai., 1996), 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 (Franke és mtsai., 1994; Thali és mtsai., 1994). Munkánk során azt vizsgáltuk, hogy a virionban csomagolt 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 (Louis és mtsai., 1999) használtuk. Mutánsainkat a Genosys Sigma cégtől rendelt, megfelelő oligonukleotid párokat felhasználva, Quick-Change mutagenézis eljárást (Stratagene) követve állítottuk elő. A mutációkat DNS-szekvenálással ellenőriztük, melyet ABI-Prism dye terminator cycle sequencing kit (Perkin-Elmer) 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 (Louis és mtsai., 1999; Mahalingam és mtsai., 2001). A mutáns HTLV-1 proteázokat szintén hasonló módszerrel tisztítottuk. A reverz fázisú (RP) 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 Compound 3 inhibitorát használtuk (Grobelny és mtsai., 1990). A vad-típusú és mutáns HTLV-1 proteázok aktív centrum titrálásához KTKVL-r-VVQPK (IB268) peptidet használtuk, 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 PR-t 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 (Ciminale és mtsai., 1992)-t használva templátként. A kapott PCR-terméket a pMal-c2 (New England Biolabs) expressziós vektor *EcoRI* /*BamHI* restrikciós hasítási helyei közé, a maltóz kötő fehérjét (MBP) kódoló szekvencia után ligáltuk. A HTLV proteáz belső szekvenciáját (12-116 aminosavrész az érett proteázban, lásd 4.1.1. ábra) 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 (Sambrook és mtsai., 1989). Az expressziós klón mutagenézise során a pET klónoknál használt oligonukleotid párokat és eljárást használtuk, és minden fehérjeexpresszióra használt vektort DNS szekvenálással ellenőriztünk. A fehérjeexpressziót 1 mM izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid (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 fehérjemintákat SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel választottuk el és PVDF membránra vittük át Towbin és mtsai. (1979) 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 (Pierce) segítségével végeztük el.

3.4. OLIGOPEPTIDEK

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

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 (Waters Associates, Inc.) 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 szubsztátpeptidre 6 különböző koncentrációt teszteltünk, és úgy állítottuk be az enzim koncentrációkat, hogy a szubsztát hidrolízise 20% alatt maradjon. A kinetikai paramétereket a reakciósebesség és szubsztátkoncentráció adatok Michaelis-Menten egyenlethez való illesztésével határoztuk meg, nemlineáris regressziós módszerrel, a Fig.P program (Fig.P Software Corp.) felhasználásával. A kinetikai állandók standard deviációi 20 % alatt voltak. A szubsztát hidrolízis általában a Michaelis-Menten kinetikát követte az általunk használt szubsztátkoncentráció 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 szubsztátkoncentrációnál a telítési szakaszba ért, a k_{cat}/K_M értékeket ismert k_{cat}/K_M értékekkel rendelkező szubsztátok segítségével, kompetíciós mérésekkel határoztuk meg (Fersht, 1985).

3.6. GÁTOLHATÓSÁGI VIZSGÁLATOK

A gátolhatósági vizsgálatokhoz mikrotiter lemez alapú fluoreszcens eljárást alkalmaztunk (Bagossi és mtsai., 2004). 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 is 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 (1979) 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 delécia 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 (Harrison, 1993) Thr-Lys-Val-Leu↓Val-Val-Gln-Pro oligopeptiddel alkotott komplexében minimalizáltuk, sp4 paraméterkészlet (Weber és Harrison, 1996) alkalmazásával (4.2.2. ábra).

A kapott modellt a mintaként használt RSV S9 proteázon kívül összehasonlítottuk a HIV-1, HIV-2, SIV, EIAV, FIV proteázok kristályszerkezetével is (PDB kódok: 1fgc, 2mip, 1siv, 1fmb, 1fiv). 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_{IIIB} kapszid fehérjét és vele N-terminálison 6 hisztidin aminosav hosszúságú, túlnyúló véget kódoló 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 (Novagen) , 0,4 mM IPTG (ICN) 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)(Sigma) tartalmazó pH 8,0 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 (QIAGEN) 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 pufferrel. Végül a kötött fehérjét 50 mM Na-acetát, pH 5,0 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 (Bio-Rad) határoztuk meg.

3.9. A HIV-1 INTEGRÁZ (IN) TISZTÍTÁSA

A HIV-1 szolubilis integráz mutánst (Jenkins és mtsai., 1996) kódoló pINSD.His.Sol plazmidot az AIDS Research and Reference Programon keresztül kaptuk meg. Az integráz expresszióját BL21 (DE3) *E. coli* sejtekben (Novagen), 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 μ g/ml DNase I (Sigma) hozzáadásával kezeltük. A pelletet centrifugálás után 500 mM NaCl-ot, 0,1 % Triton X-100-at és 8 M ureát tartalmazó 20 mM foszfát pufferben, pH 7,5-ön resuszpendáltuk. Az elegyet szűréssel tisztítottuk, majd nikkelkelát ProBond (Invitrogen) 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, melyeket 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 KAPSZID 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) (Louis és mtsai., 1991), 2,5 mM DTT-t tartalmazó, 100 mM kálium-foszfát, pH 4,0 pufferben inkubáltuk. 16 órás inkubálás után a reakciót dupla töménységű tricin-SDS mintafelvivő pufferrel (Novex) állítottuk le. A mintákat 16 vagy 10-20 %-os, tricines, gradiens SDS-poliakrilamid géleken (Novex) analizáltuk. A fragmensek molekulatömegét Rainbow molekulasúly markerrel (Amersham-Pharmacia) 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 vizsgálatakor a kapszid fehérjét 43 µM Cyp A-val (Sigma) inkubáltuk elő, 1 órán keresztül, szobahőmérsékleten. A nem specifikus kontrollmérésekhez a borjú szérumalbumint (Sigma) és a lizozimot (Sigma) is 43 µM koncentrációban, a ciklofilinhez hasonló módon alkalmaztuk. Különböző ideig tartó, 37 °C-on történő inkubálás után a reakciókat dupla töménységű tricin-SDS mintafelvivő pufferrel (Novex) állítottuk le. A mintákat 16 vagy 10-20 %-os, tricines, gradiens SDS-poliakrilamid géleken (Novex) analizáltuk. A fragmensek molekulatömegét Rainbow molekulasúly markerrel (Amersham-Pharmacia) határoztuk meg.

3.11. A KAPSZID FEHÉRJE FRAGMENSEINEK SZEKVENÁLÁSA

A proteáz által hasított kapszid fehérje fragmenseket SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel választottuk el és PVDF membránra (ProBlot, Applied Biosystems) vittük át, Towbin és mtsai. (1979) szerint. Az N-terminális aminosav szekvencia meghatározást Edman

lebontást követve, Applied 470A gáz fázisú szekvenátorral (Applied Biosystems) vagy Knauer 910 fehérje szekvenátorral (Knauer) 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, MULV, BLV és HTLV-1 természetes hasítási helyeket reprezentáló, 50 tagból álló oligopeptid szubsztrátsorozatot használtunk. A kiválasztott peptidek előzőleg hasíthatónak bizonyultak a megfelelő retrovírus által kódolt proteázzal (Tózsér és mtsai., 1991, 1993, 1997; Zahuczky és mtsai., 2000; Menendez-Arias és mtsai., 1992, 1993; Louis és mtsai., 1999). 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' (nevezéktan: Schechter és Berger, 1967 alapján) pozícióban hidrofób aminosavat tartalmaz, egy kivételével azon szubsztrátok mindegyike, amely mindkét enzim jó szubsztrátjának bizonyult, hidrofób elágazó 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 (4.1.1. táblázat). Míg a HTLV-1 PR csak három olyan peptidet hidrolizált, melyet a HIV-1 proteáz nem hasított, a HIV-1 PR jóval több olyan peptidet hasított, amely nem bizonyult a HTLV-1 proteáz szubsztrátjának, mutatva az előbbi jóval szűkebb specifitását.

4.1.1. Táblázat: A HTLV-1 és HIV-1 proteázok szubsztrátspecifitásának összehasonlítása a természetes hasítási helyeket reprezentáló oligopeptid szubsztrátokkal.

Szám	Vírus	Hasítási hely ^a	Szubsztrátszekvencia	HTLV-1 PR k_{cat}/K_M ($mM^{-1}s^{-1}$)	HIV-1 PR k_{cat}/K_M ($mM^{-1}s^{-1}$)
1.	HIV-1	MA/CA	VSQNY↓PIVQ	0	45,3 ^b
2.	HIV-1	CA/p2	KARVL↓AEAMS	0	90,0 ^b
3.	HIV-1	p2/NC	TATIM↓MQRGN	0	74,0 ^b
4.	HIV-1	NC/p1	ERQAN↓FLGKI	0	1,0 ^c
5.	HIV-1	p1/p6	RPGNF↓LQSRP	0	0,6 ^b
6.	HIV-1	IN/p6	DKELY↓PLTSL	0,02 ^d	0,02 ^b
7.	HIV-1	TF/PR	VSFNF↓PQITL	0	6,9 ^b
8.	HIV-1	PR/RT	AETF↓YVDGAA	0	10,0 ^b
9.	HIV-1	RT/RH	CTLNF↓PISP	0	24,1 ^b

10.	HIV-1	RT/IN	IRKIL↓FLDG	8,4 ^d	202,0 ^b
11.	HIV-2	MA/CA	KGGNY↓PVQHV	0	0,03
12.	HIV-2	CA/p2	KARLM↓AEALK	0	2,3 ^b
13.	HIV-2	p2/NC	IPFAA↓AQQRK	2,6	1,1 ^b
14.	HIV-2	NC/p6	KPRNF↓PVAQV	0	0,6 ^b
15.	HIV-2	TF/PR	RGLAA↓PQFSL	0	14,6 ^b
16.	HIV-2	PR/RT	MSLNL↓PVAKV	0	110,0 ^b
17.	HIV-2	RT/IN	IRQVL↓FLEKI	113,6	58,0 ^b
18.	EIAV	MA/CA	PSEFY↓PIMID	0,7	15,2
19.	EIAV	CA/X	QKML↓LAKAL	0	11,8
20.	EIAV	NC/p9	QKQTF↓PIQQK	< 0,01	0
21.	EIAV	PR/RT	AKLVL↓AQLSK	0	13,4
22.	EIAV	RT/UT	KEEIM↓LAYQG	< 0,01	18,3
23.	RSV	MA/p2A	GTSCY↓CHGTA	0	2,5 ^e
24.	RSV	p2B/p10	PPYVG↓SGLYP	0	0
25.	RSV	p10/CA	PVVAM↓PVVIK	0,1	0
26.	RSV	CA/p3	IAAAM↓SSAIQ	0	0
27.	RSV	p3/NC	IQPLIM↓AVVNR	100	318 ^e
28.	RSV	NC/PR	PPAVS↓LAMTM	0	0,13 ^e
29.	RSV	R' /RT	RATVL↓TVALH	0,3	1,9 ^e
30.	RSV	RT/IN	TFQAY↓PLREA	0	0,18 ^d
31.	MMTV	MA/pp21	SDLVL↓LSAEARR ^f	0	6,9
32.	MMTV	pp21/p3	DSKAF↓LADTW	0	7,5
33.	MMTV	p3/p8	DELIL↓PVKRR	2,6	1,5
34.	MMTV	p8/n	PPVGFAG↓AMA	0	< 0,01
35.	MMTV	n/CA	LTFTF↓PVVFMRR ^f	0,01	0,9
36.	MPMV	p12/CA	PKDIF↓PVTET	0,2	0,2
37.	BLV	MA/CA	PPAIL↓PIISE	164,5 ^g	0,3
38.	BLV	CA/NC	KQPAIL↓VHTPG	0	0
39.	BLV	TF/PR	ELECL↓LSIPL	0	8,5
40.	BLV	PR/p13	PPMVG↓VLDAP	0,7 ^g	0,04
41.	MuLV	MA/p12	PRSSLY↓PALTP	0	0,2
42.	MuLV	p12/CA	TSQAF↓PLRAG	0	8,7
43.	MuLV	CA/NC	MSKLL↓ATVV	0	0
44.	MuLV	NC/PR	TQTSLL↓TLDDQ	0	0
45.	MuLV	PR/RT	PLQVL↓TLNIERR ^f	0,1	0
46.	MuLV	RT/IN	TSTLL↓IENSS	0	0
47.	HTLV-1	MA/CA	APQVL↓PVMHP	85,2 ^d	16,1 ^d
48.	HTLV-1	CA/NC	KTKVL↓VVQPK	150,6 ^d	14,3 ^d
49.	HTLV-1	TF1/PR	DPASIL↓PVIP	3,8 ^d	0
50.	HTLV-1	PR/pX	KGPPVIL↓PIQAP	288,3 ^d	8,4 ^d

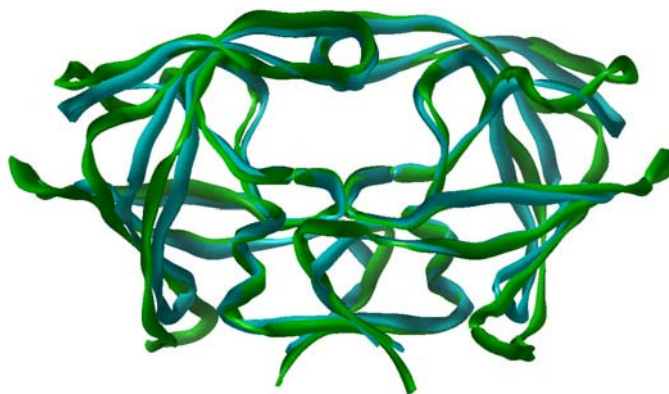
^aRetrovirális proteázok nevezéktana Leis és mtsai., 1988 alapján.

^bÁtvéve: Tózsér és mtsai., 1991. ^cÁtvéve: Fehér és mtsai., 2002. ^dÁtvéve: Louis és mtsai., 1999. ^eÁtvéve: Tózsér és mtsai., 1996. ^gÁtvéve: Zahuczky és mtsai., 2000.

^fAz aminosavakat, amelyeket a szolubilitás növelése érdekébenadtunk a hasítási hely szekvenciához aláhúzással jelöltük.

4.1.2. A HTLV-1 proteáz mutációk

A HTLV-1 és HIV-1 proteázok szekvenciák összehasonlítása az ismert szerkezettel rendelkező proteázok többszörös illesztésén alapul, melyet az 1.4.2. ábra mutat be. A kinetikai értékeket a HTLV-1 PR molekuláris modelljét (4.1.2.1. ábra)(Tözsér és mtsai., 2000), és a HIV-1 proteáz-inhibitor komplex kristályszerkezetét (Mahalingam és mtsai., 2001) felhasználva értelmeztük. A proteáz szubsztrátkötőhelye három nagy, több aminosavrést magába foglaló régióra osztható: aktív centrum, flap régió amely rácsukodik a bekötődött szubsztrátra, és a C-terminális régió a szubsztrát kötőhely vállánál (4.1.2.1. ábra). Az aktív centrum igen konzervált régióknak számít a retrovirális proteázok esetében, mindössze egy aminosavrést 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 proteázt összehasonlítva (4.1.2.2. ábra). Munkánkban 15 HTLV-1 PR mutánst készítettünk el úgy, hogy a szubsztrátkötő zseb meghatározó aminosavréseit a HIV-1 PR strukturálisan megfelelő aminosavréseire cseréltük. A következő mutánsokat készítettük el: M37D, V56I, L57G, A59I, F67Q, N96T, N97P és W98V (4.1.2.2. ábra, 4.1.3. táblázat). Mivel a Met37-nek megfelelő aminosav igen fontos a PR specificitásának meghatározásában (Tözsér, 1997) így azt különböző méretű hidrofób aminosavakra (Ala, Val, Ile), valamint a HIV-1 PR gyógyszer rezisztens Asn mutációjára cseréltük ki (4.1.3. táblázat). Ezen mutációk kombinációjaként három összetett flap illetve C-terminális mutáns proteázt is teszteltünk. A mutánsokat inklúziós testekből tisztítottuk a vad-típusú HTLV-1 proteázzal megegyező módon (Louis és mtsai., 1999).

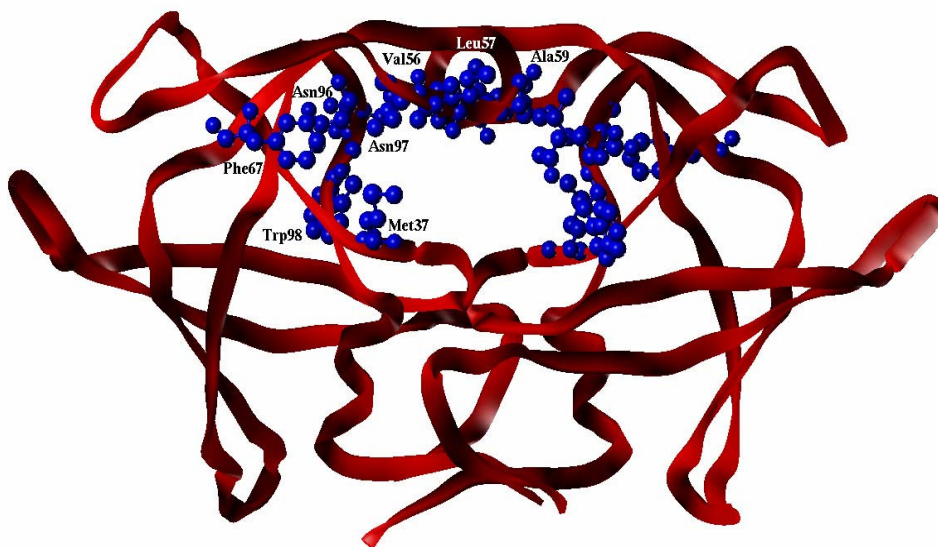


4.1.2.1 ábra: A HTLV-1 PR homológ modellezés (zöld), és a HIV-1 PR kristályszerkezet (kék) alapján készült szalagmodellje.

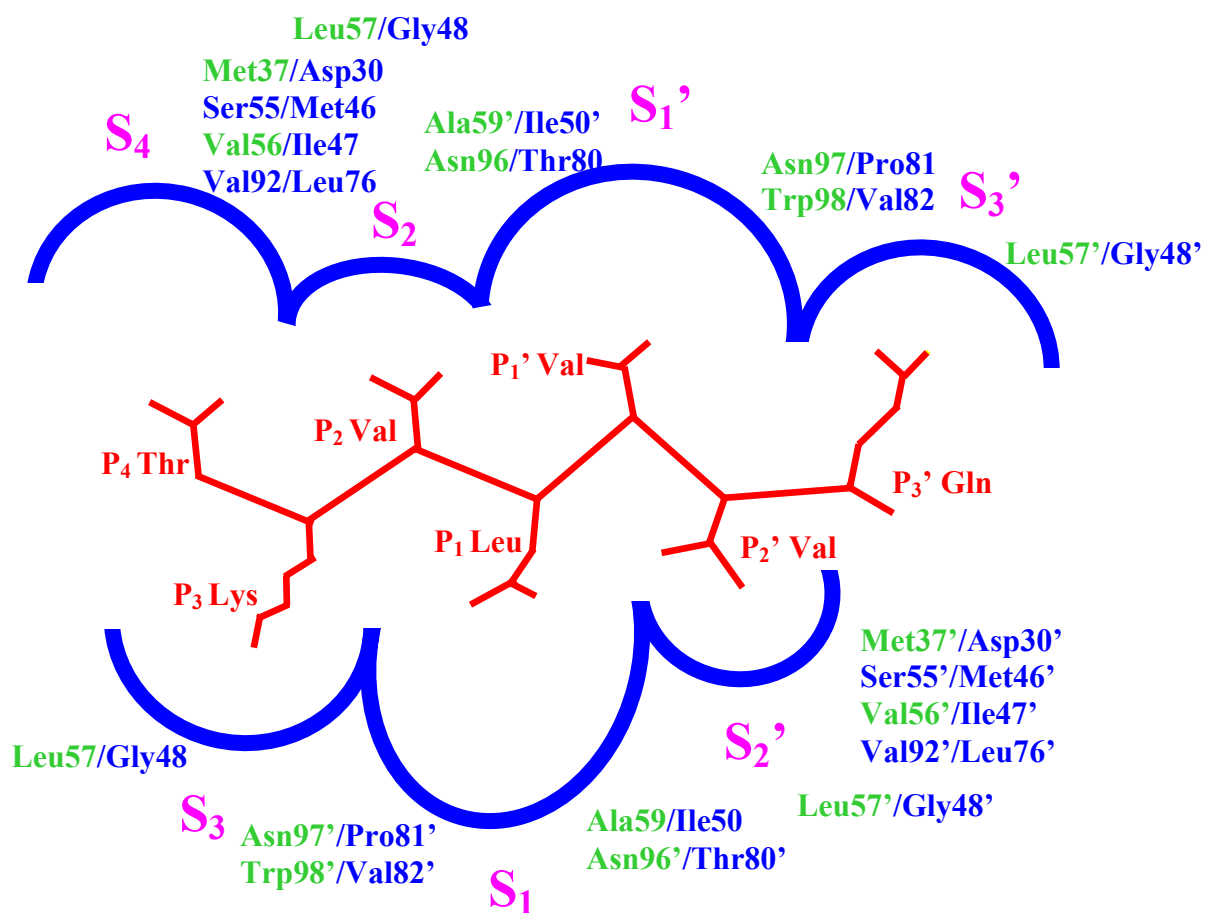
	1	10	20	30	
HTLV-1	P V I P L D P A R R P V I K A Q V D T Q T S H P K T I E A L				
HIV-1	P Q I T L W Q R P L V T I K I G G Q L K E A L				
	1	10	20		
		40	50	54	60
HTLV-1	L D T G A D M T V L P I A L F S S N T P L K N N T S V L G A G				
HIV-1	L D T G A D D T V L E E M S L P G R W K P K M I G G I G				
		30	40	50	
	aktív centrum		flap régió		
		70	80	90	
HTLV-1	G Q T Q D H F K L T S L P V L I R L P F R T T P I V L T S C L				
HIV-1	G F I K V R Q Y D Q I L I E I C G H K A I G T V				
		60	70		
		100	110	120	124
HTLV-1	V D T K N N W A I I G R D A L Q Q C Q G V L Y L P E A K G P P V I L				
HIV-1	L V G P T P V N I I G R N L L T Q I G C T L N F				
		80	90	99	
	C-terminális régió				

4.1.2.2. A. ábra. A HTLV-1 és HIV-1 PR szekvenciák összehasonlítása.

A szubsztrátkötő hely kialakításában résztvevő aminosavakat kiemelten jelöltük. Az autoproteolízissel szembeni stabilizáció érdekében mutált aminosavakat aláhúzással jelöltük. Munkánk során használt HTLV-1 proteáz három (L40I, C90A, C119A), még a HIV-1 proteáz öt (Q7K, L33I, L63I, C67A, C95A) mutációt tartalmazott. Előző kísérletek bizonyították, hogy ezen mutáns enzimek specificitása megegyezik a stabilizálatlan formáéval (Mahalingam és mtsai., 1999; Louis és mtsai., 1999).



4.1.2.2.B. Ábra: A HTLV-1 proteáz szalagmodellje. A munkánk során mutált aminosavrészek pozícióját gömb és pálcika jelöléssel emeltük ki. A jelölés csak az első monomeren látható.



4.1.2.2. Ábra. A HTLV-1 kapszid↓nukleokapszid hasítási helyet reprezentáló szubsztrát elhelyezkedése a HTLV-1 és HIV-1 proteáz S4-S3' zsebeiben. A sematikus ábrán minden zseb relatív méretét az egyes szubsztrát oldalláncokat körülvevő vastag sáv által behatárolt terület mutatja be. Az ábrán csak azon aminosav alegységeket emeltük ki, amelyek különböznek a HTLV-1 és HIV-1 proteázok esetén. Azon HTLV-1 aminosavrészeket, amelyeket munkánk során mutáltunk, zölddel jelöltük.

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 ((Louis és mtsai., 1999) 4.1.1. és 4.1.3. táblázat). Nyolc mutáns enzim volt képes hidrolizálni ezt a szubsztrátot, bár a két vad típusú enzimhez viszonyítva jobbra drámaian lecsökkent katalitikus hatékonysággal. (4.1.3. táblázat). Azonban az egyes mutánsoknál kapott K_M értékek hasonlóak voltak a vad típusú enzimeknél mért értékekhez, miközben néhány más mutánsnál mérsékelt emelkedést tapasztaltunk. Mivel több mutáns is 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 (4.1.3. táblázat). 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 (Grinde és mtsai., 1992; Louis és mtsai., 1999). Számos gyógyszer rezisztens HIV-1 PR mutáns a vad-típusú enzimhez hasonló folding-képességgel rendelkezik (Gulnik és mtsai., 1995; Ermolieff és mtsai., 1997; Mahalingam és mtsai., 1999; Fehér és mtsai., 2002), azonban néhány egyszeres HIV-1 PR mutánsnál megfigyelhető volt ezen képesség jelentős romlása is (Fehér és mtsai., 2002). Ez azt bizonyítja, 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 MULV 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 (Menendez-Arias és mtsai., 1995; Cameron és mtsai., 1994). Ezzel ellentétben a FIV PR megfelelő Ile aminosavrészének aszpartátra történő cseréje inaktív enzimet eredményezett (Lin és mtsai., 2000). 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 szubsztrátspecificitás 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 kihasítani (autoprocesszálni) - is expresszáltuk a fehérjéket (4.1.3.1. ábra). Ismert, hogy az MBP

4.1.3.1. táblázat. A **vad-típusú** és mutáns (**aktív** és **inaktív**) enzimek érintett szubsztrátkötő zsebeinek, HTLV-1 CA↓NC hasítási helyet reprezentáló peptid (KTKVL↓VVQPK) hidrolíziséhez köthető kinetikai paramétereinek és folding képességeinek összehasonlítása.

Enzim	Érintett zseb vagy régió ^a	Folding képesség (%) ^b	K _M (mM)	k _{cat} (s ⁻¹)	k _{cat} /K _M (mM ⁻¹ s ⁻¹)
HTLV-1 PR (vad-típus) ^c		100	0,063	10,0	158,7
HIV-1 PR (vad-típus) ^c		100	0,16	3,6	22,5
HTLV-1 PR (M37D)	S4,S2	n.m. ^d	nem hasadt ^e		
HTLV-1 PR (M37N)	S4,S2	n.m.	nem hasadt		
HTLV-1 PR (M37A)	S4,S2	n.m.	nem hasadt		
HTLV-1 PR (M37V)	S4,S2	63	0,040	0,11	2,78
HTLV-1 PR (M37I)	S4,S2	4	0,060	0,17	2,90
HTLV-1 PR (V56I)	S4,S2	n.m.	n.d.	<0,001	n.d.
HTLV-1 PR (L57G)	S4,S3,S2	n.m.	nem hasadt		
HTLV-1 PR (A59I)	S3,S2,S1	n.m.	0,438	(0,021)	(0,05)
HTLV-1 PR (F67Q)	S4	n.m.	nem hasadt		
HTLV-1 PR (N96T)	S3,S1	n.m.	0,301	(0,007)	(0,02)
HTLV-1 PR (N97P)	S3,S1	n.m.	0,127	(0,002)	(0,02)
HTLV-1 PR (W98V)	S3,S1	n.m.	0,200	(0,002)	(0,01)
HTLV-1 PR (V56I/L57G/A59I) – „Flap”	Mind	24	0,155	1,68	10,87
HTLV-1 PR (N96T/N97P/W98V) – „Oldal”	S3,S1	n.m.	nem hasadt		
HTLV-1 PR (V56I/L57G/A59I/N96T/N97P/W98V)	Mind	n.m.	nem hasadt		

^aMivel a PR aktív formája homodimer, a másik monomer megfelelő zsebeit (pl. S4', S2', stb.) szintén érintettek a mutációk során, de ezeket nem teszteltük.

^bA folding képességet az aktív centrum titrálással meghatározott aktív enzim mennyiségének és a teljes fehérje mennyiségének összehasonlításával határoztuk meg. A nehezen detektálható aktivitású enzimeknél ez az arány nem volt meghatározható. Ezeknél a mutánsoknál a zárójelben megadott katalitikus állandót a fehérjekoncentrációk felhasználásával számoltuk ki.

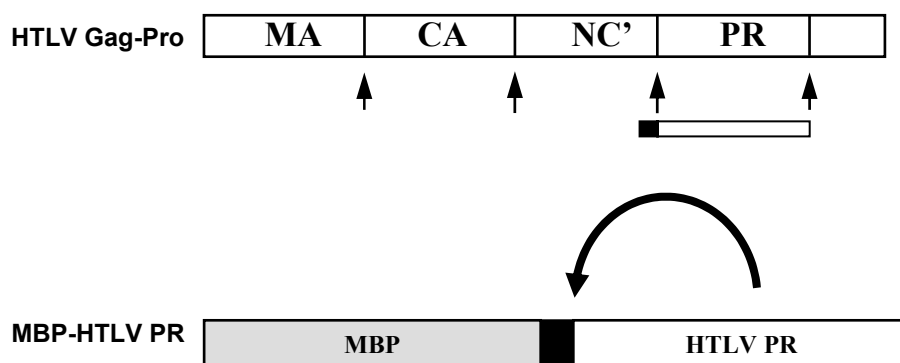
^cEzek az adatok a következő referenciából származnak: Tózsér és mtsai., 2000.

^dNem meghatározott.

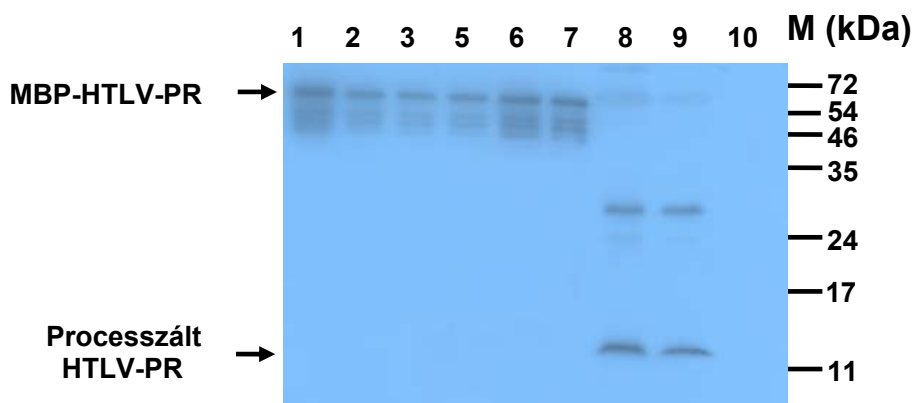
^eA szubsztrát hidrolízise 0.4 μM PR hozzáadásával, 37 °C-n, 20 órán keresztül történt inkubáció után sem volt megfigyelhető.

nagyban elősegíti a fúziós polipeptid oldékonyságát, összehasonlítva más, általánosan ilyen célra használt fehérjékkel, mint például a GST vagy tioredoxin (Kapust és Waugh, 1999; Wang és mtsai., 1999). 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 kiasításra az expresszió során (4.1.3.1. ábra).

A



B



4.1.3.1. ábra: Vad-típusú és mutáns HTLV proteázok expressziója MBP-fúziós fehérje formájában

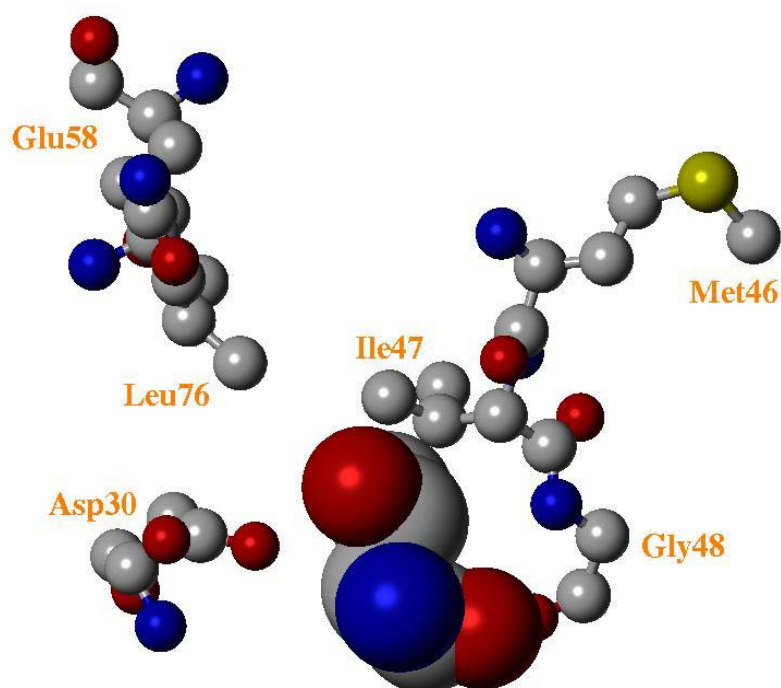
- A. Munkánk során használt fúziós fehérjék sematikus ábrája. A nyolc aminosav hosszúságú terminális „flanking” szekvenciát feketével jelöltük.
- B. A vad-típusú és mutáns HTLV proteázok önprocesszálo képességét bemutató immunoblot fotója. A fúziós fehérjéket *E. coli* sejtekben expresszáltuk és immunoblottal analizáltuk az egyes enzimek önprocesszálo képességét. Az immunoblothoz HTLV-1 proteáz N- és C-terminális régiója ellen termeltetett nyúl antiszérumok elegyét használtunk. A HTLV-1 PR mutált aminosavait az egyes minták fölött jelöltük: 1. M37D; 2. M37A; 3. F67Q; 4. oldal, N96T/N97P/W98V; 5. oldal+flap, V56I/L57G/A59I/N96T/N97P/W98V; 6. M37N; 7. vad-típus; 8. flap, V56I/L57G/A59I; 8. vad-típus; 9. kontroll. Kontrollként olyan pMal-c2 vektort transzformáltunk és expresszáltunk, amely csak MBP-t expresszál.

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

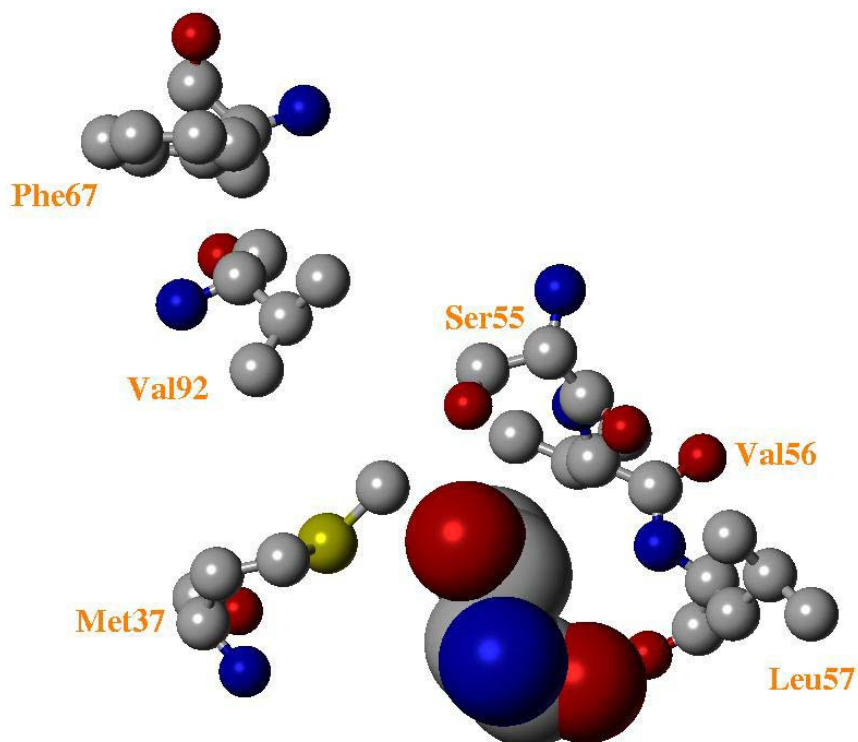
Az S4 alegység az enzim felszínéhez közel helyezkedik el, így a bekötődő P4 aminosav az oldószerezrel is kölcsönhat minden retrovirális PR esetén. Ezzel ellentétben az S2 zseb viszonylag kis méretű, főleg hidrofób aminosavak alkotják, következésképpen kisebb, hidrofób P2 aminosavak befogadására alkalmas. 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 (Tőzsér és mtsai., 1992, 1997, 2000).

A HTLV-1 és HIV-1 PR S4 zseb kialakításában a Met37/Asp30, Ser55/Met46, Val56/Ile47, Leu57/Gly48 és a Val92/Leu76 aminosavrészek vesznek részt, valamint a HTLV-1 proteázban a nagyon szélen elhelyezkedő Phe67/Gln58 aminosavrész (4.1.2.2. és 4.1.4.1. ábra, Tőzsér és mtsai., 2000). A HIV-1 PR Asp30 aminosavrész, valamint a vele más proteázokban ekvivalensen megjelenő aminosavrészek, az S4 és S2 zsebek különböző specificitásának fontos meghatározói (Cameron és mtsai., 1994; Menendez-Arias és mtsai., 1995). Egy példában a nelfinavir rezisztenciában megjelenő Asp30Asn HIV-1 PR mutáns specificitás különbséget mutat a vad-típusú enzimhez hasonlítva (Mahalingam és mtsai., 1999), a proteáz-szubsztrát interakcióban kismértékű strukturális változásokkal kísérve (Mahalingam és mtsai., 2001). 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 önprocesszállásra MBP – fúziós formából sem (4.1.3.1. ábra). 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 (Tőzsér és mtsai., 2000), mutatva azt, hogy ebben a pozícióban megfelelő hidrofób interakciók elengedhetetlenek a HTLV-1 PR katalitikus működéséhez. Más mutánsok, amelyek béta 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 (4.1.3.1. táblázat). Ezen mutánsok specificitása szintén lényegesen megváltozott. Mindkettő a P4 pozícióban az izoleucint részesíti előnyben a vad-típusú HTLV-1 PR által preferált alaninnal szemben (4.1.4.2. ábra), 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

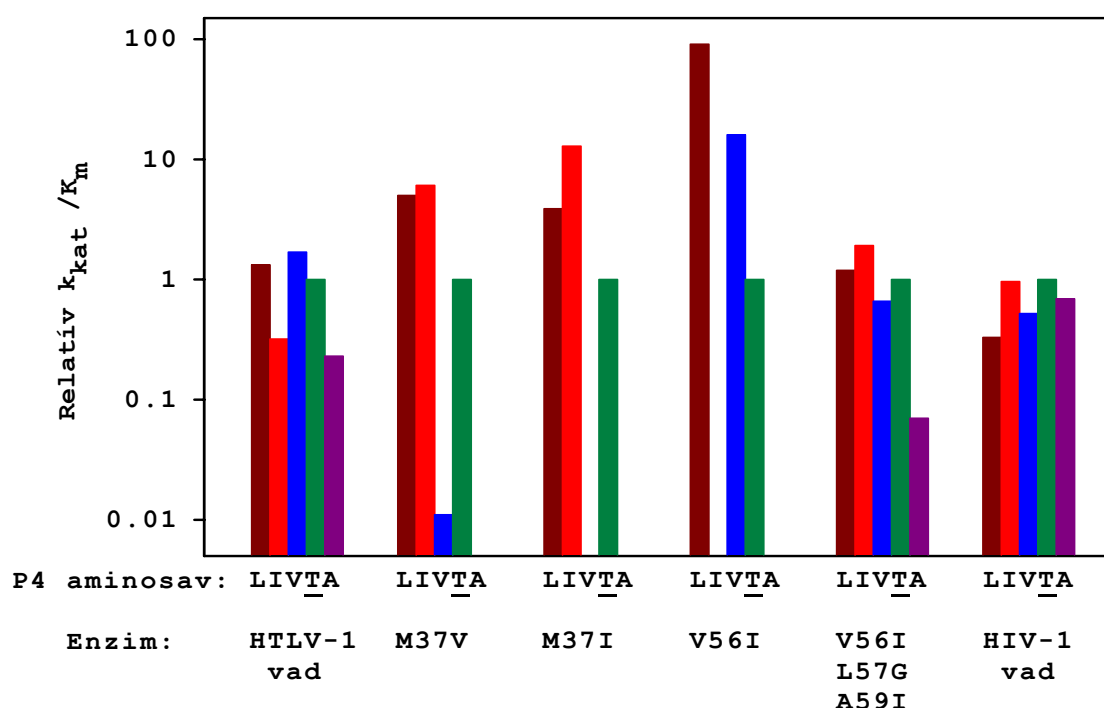


B



4.1.4.1 ábra: A HIV-1 (A) és HTLV-1 (B) proteáz S4 szubsztrátkötő zsebét alkotó aminosavrészek gömb és pálcika ábrázolással. A szubsztrát P4 oldalláncot (Thr) térkitöltő modellel ábrázoltuk.

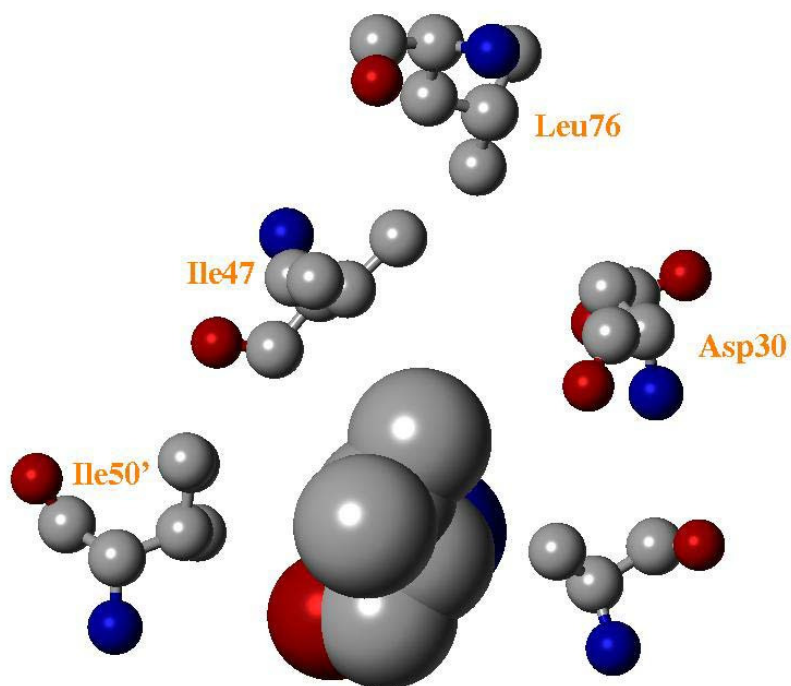
A V56I mutáns katalitikusan igen gyenge enzim, de a P4 pozícióban Leu aminosavat tartalmazó peptidet relative lényegesen jobban hidrolizálja, utalva arra, hogy a nagyobb oldallánccal rendelkező P4 Leu erősebb hidrofób kötéseket képes kialakítani a V56I enzimmal, mint a kisebb oldallancú P4 pozícióban 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 (4.1.4.2. ábra).



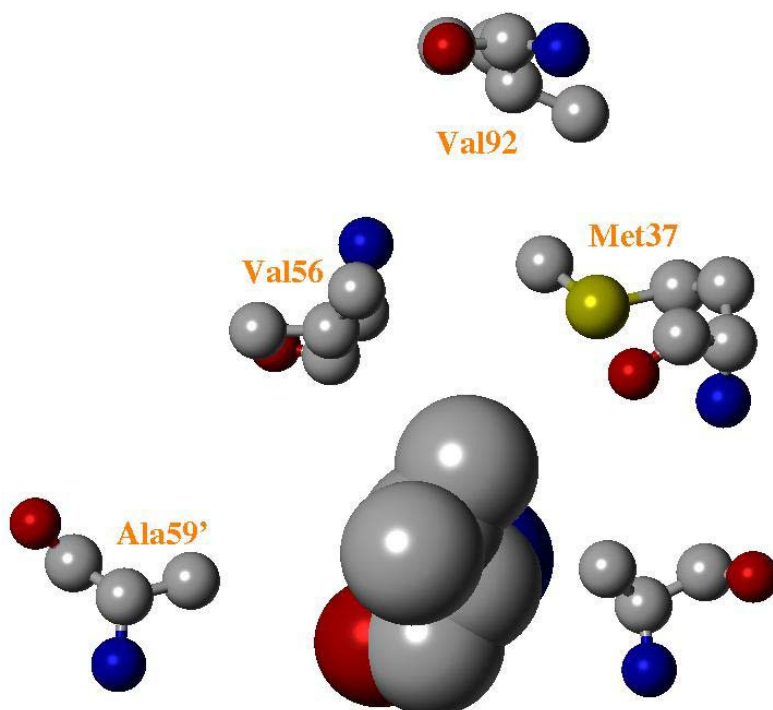
4.1.4.2. ábra: Vad-típusú HIV-1 és HTLV-1 és mutáns HTLV-1 proteázok relatív specificitási állandója P4 helyen aminosavcseréket tartalmazó HTLV-1 kapszid↓nukleokapszid hasítási helyet reprezentáló szubsztrát szekvenciák esetén. A szubsztrát (KTKVL↓VVQPK) eredeti P4 aminosavrészét (Thr) aláhúztuk. A relatív értékeket (k_{cat}/K_M) a módosíthatatlan szubsztráthoz viszonyítva adtuk meg. A vad-típusú enzimek relatív k_{cat}/K_M értékeinek kimutathatósági határa 0,001, a mutánsok alacsony aktivitása miatt a relatív k_{cat}/K_M M37V, M37I, V56I és a tripla mutánsok esetén 0,01, 0,7, 0,7, 0,01 voltak.

Az S2 zseb Met37/Asp30, Val56/Ile47, Ala59'/Ile50' és Val92/Leu76 alegységekben különbözik a HIV-1 és HTLV-1 vad-típusú proteázok esetében (4.1.2.4. és 4.1.4.3. ábra, (Tözsér és mtsai., 2000)).

A

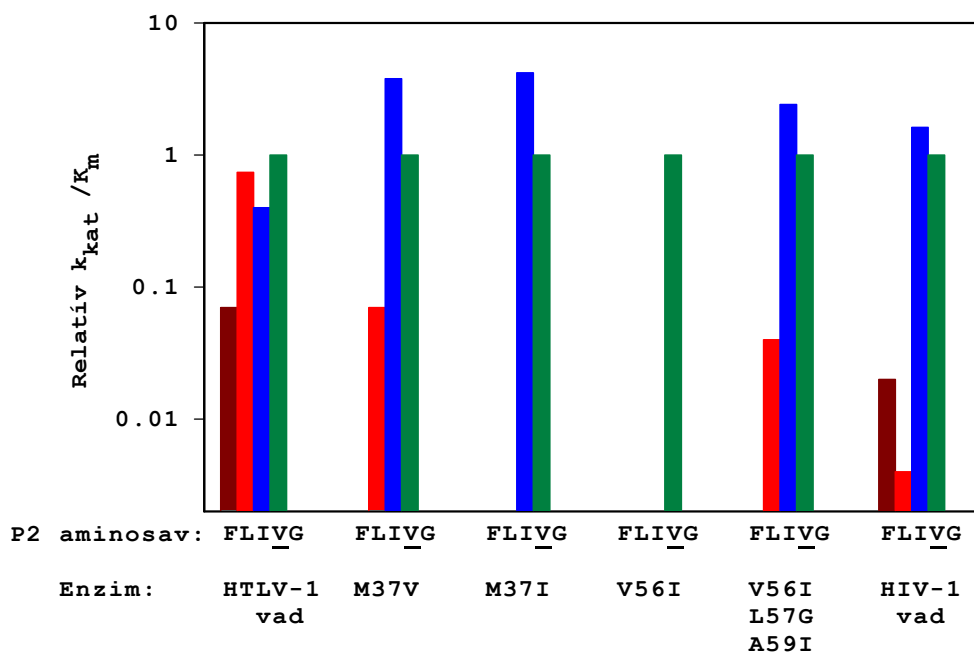


B



4.1.4.3 ábra: A HIV-1 (A) és HTLV-1 (B) proteáz S2 szubsztrátkötő zsebét alkotó aminosavrészek gömb és pálcika ábrázolással. A szubsztrát P4 oldalláncot (Val) térkitöltő modellel ábrázoltuk.

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 változtatták, hasonlóra, mint ami a HIV-1 proteáznál megfigyelhető, azonban nem képesek hidrolizálni az ebben a pozícióban nagyméretű aromás fenilalanint tartalmazó szubsztrátot (4.1.4.4. ábra). Ebben a pozícióban történt béta-elágazó aminosavrészek cseréje csökkenti az oldallánc méretét, amely így jobban képes a zsebbe illeszkedni. Hasonlóan a P4 módosított szubsztrátokkal kapottakkal a HIV-1 PR flap-szerű mutáns P2 specifitása is közelebb áll a HIV-1 PR specifitásához, 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 (4.1.4.4. ábra). Ezek az eredmények azt bizonyítják, hogy a flap régió nemcsak az enzim aktivitásáért (Tózsér és mtsai., 1997), hanem a két vad-típusú PR specifitásbeli különbségéért is felelős.

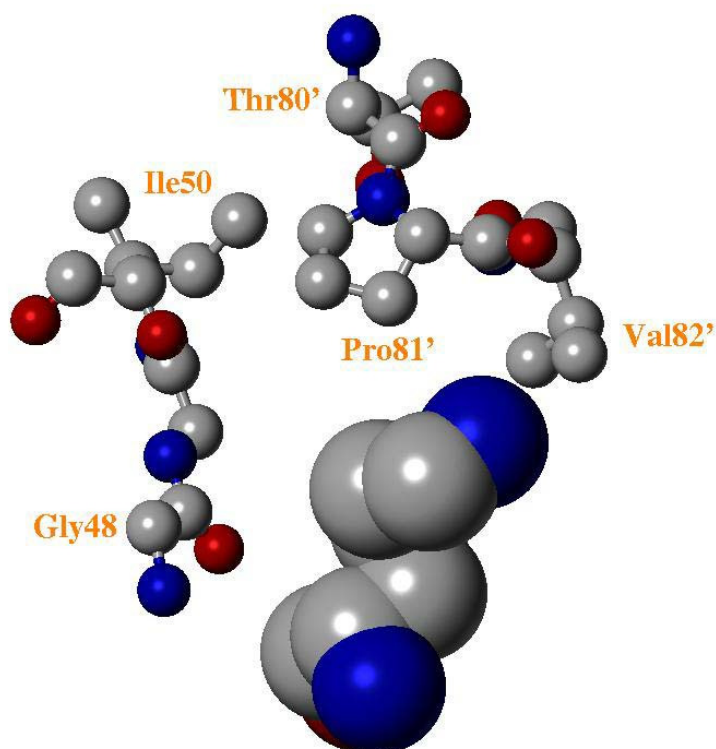


4.1.4.4. ábra: Vad-típusú HIV-1 és HTLV-1 és mutáns HTLV-1 proteázok relatív specifitási állandója P2 helyen aminosavcseréket tartalmazó HTLV-1 kapszid↓nukleokapszid hasítási helyet reprezentáló szubsztrát szekvenciák esetén. A szubsztrát (KTKVL↓VVQPK) eredeti P2 aminosavrészét (Val) aláhúztuk. A relatív értékeket (k_{cat}/K_M) a módosítatlan szubsztráthoz viszonyítva adtuk meg. A vad-típusú enzimek relatív k_{cat}/K_M értékeinek kimutathatósági határa 0,001, a mutánsok alacsony aktivitása miatt a relatív k_{cat}/K_M M37V, M37I, V56I és a tripla mutánsok esetén 0,01, 0,7, 0,7, 0,01 voltak.

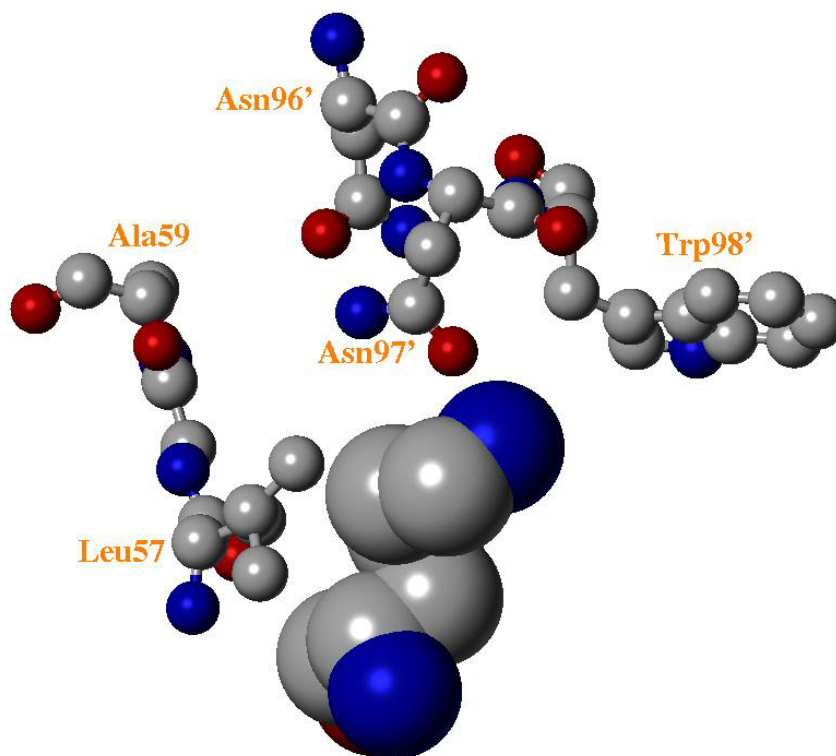
4.1.5. A HTLV-1 PR S3/S1 zsebeit érintő mutációk

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 aminosavcserét tartalmazó szubsztrátot mindkét vad-típusú enzim hidrolizált, de miközben a HTLV-1 PR az eredeti lizint tartalmazó szubsztrátot preferálja, addig a HIV-1 PR a nagyobb, hidrofób aminosavrészeket (4.1.5.2. ábra) (Tőzsér és mtsai., 2000). 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 (4.1.5.1. ábra). A vad-típusú HTLV-1 PR kevésbé érzékeny a P3 cserékre (4.1.5.2. ábra) (Tőzsér és mtsai., 2000): miközben a Leu57 és a Trp 98' a hidrofób aminosavrészekkel lép előszeretettel kapcsolatba, addig az Asn 96' és az Asn 97' potenciálisan a poláris P3 aminosavrészekkel képes kapcsolatot kialakítani. Az L57G és az A59I flap mutáns enzimek a természetes hasítási hely szekvenciát tartalmazó peptiddel szemben igen alacsony aktivitást mutattak (4.1.2. táblázat). A vad-típusú HTLV-1 PR Leu57 aminosavrésze a nagyobb hidrofób P3 aminosavrésszel 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 (4.1.5.2. ábra). A W98V mutáns meglepő módon nem mutatott preferenciát a nagyobb hidrofób aminosavak irányába, inkább a kisebb hidrofób aminosavrészeket kedvelte (4.1.5.2. ábra).

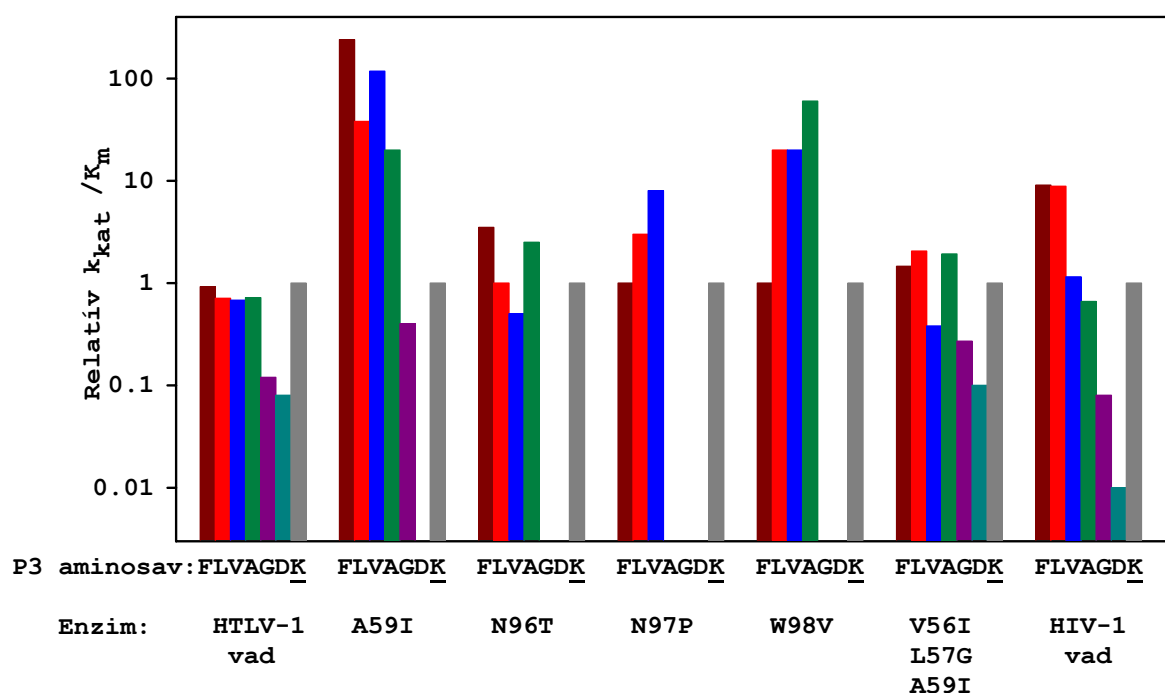
A



B



4.1.5.1 ábra: A HIV-1 (A) és HTLV-1 (B) proteáz S3 szubsztrátkötő zsebet alkotó aminosavrészek gömb és pálcika ábrázolással. A szubsztrát P3 oldalláncot (Lys) térkitöltő modellel ábrázoltuk.

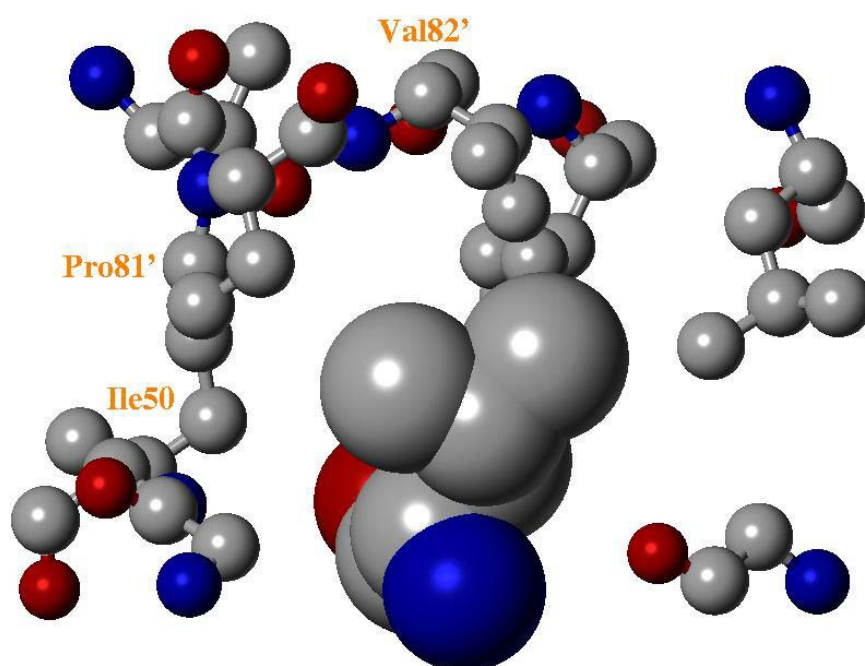


4.1.5.2. ábra: Vad-típusú HIV-1 és HTLV-1 és mutáns HTLV-1 proteázok relatív specificitási állandója P3 helyen aminosav cseréket tartalmazó HTLV-1 kapszid↓nukleokapszid hasítási helyet reprezentáló szubsztrát szekvenciák esetén. A szubsztrát (KTKVL↓VVQPK) eredeti P3 aminosavrészét (Lys) aláhúztuk. A relatív értékeket (k_{cat}/K_M) a módosítatlan szubsztráthoz viszonyítva adtuk meg. A vad-típusú enzimek relatív k_{cat}/K_M értékeinek kimutathatósági határa 0,001, a mutánsok alacsony aktivitása miatt a relatív k_{cat}/K_M A59I, N96T, N97P, W98V és a tripla mutánsok esetén 0,3, 0,7, 0,7, 0,7 és 0,01 voltak.

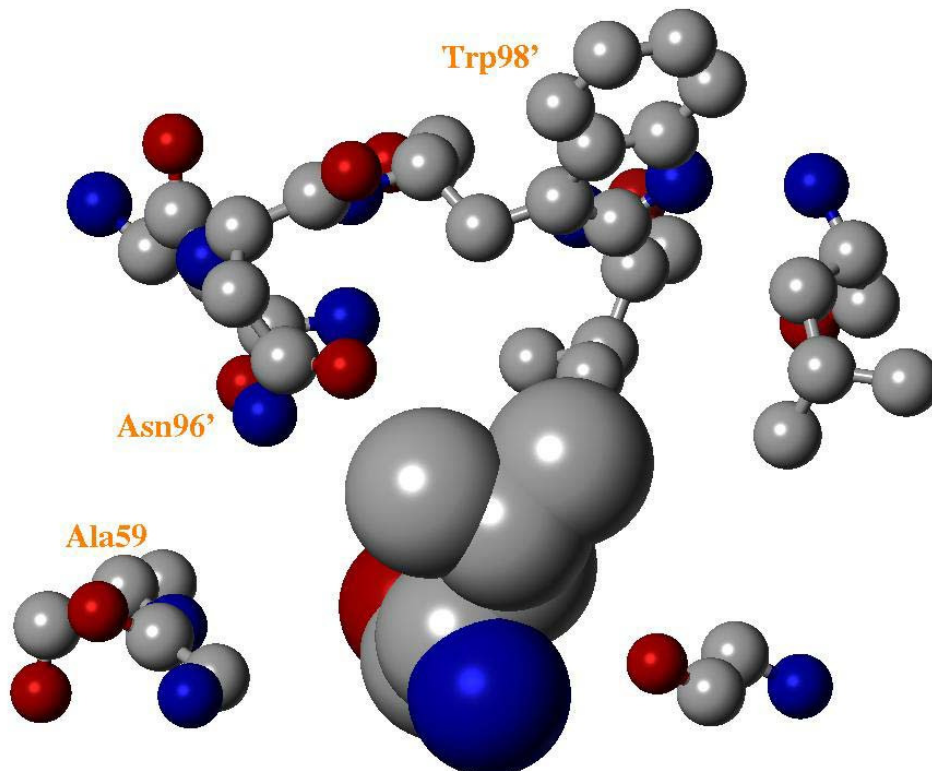
Az S1 zseb a HIV-1 és HTLV-1 proteázok esetében az Ala59/Ile50, Asn96'/Pro81' és a Trp98'/Val82' aminosavrészekben mutat különbséget (4.1.5.3. ábra). A szekvenciakülönbségek ellenére az S1 zseb szerkezete és specificitása a két proteáz esetében hasonlóan tűnik (Tőzsér és mtsai., 2000). Az S1 egy viszonylag nagy és mély zseb, amely az enzim belsejében helyezkedik el. Működés szempontjából mindkét enzim legjobb szubsztrátja P1 helyen fenilalanint tartalmaz (Tőzsér és mtsai., 2000). Azonban meglepő módon az A59I, N97P és a W98V mutánsok P1 pozícióban a metionint preferálták a mindkét vad-típusú enzim által előnyben részesített fenilalaninnal szemben (4.1.5.4. ábra). Ezek az aminosavcserék vagy a béta elágazó oldalláncokat érintik, vagy a prolin esetében strukturálisan korlátozottak, és ez megakadályozza a nagy kiterjedésű P1 Phe oldallánc illeszkedését az S1zsebbe.

A HIV-1 PR flap-szerű mutáns specificitása a S3 és S1 zseb esetében is hasonlít a HIV-1 proteázéra, bár láthatunk néhány különleges esetet, pl. a legkedveltebb P3 aminosav a Leu volt, valamint a Phe jelenléte P1 vagy P1' pozícióban egyáltalán nem volt kedvező (nem közölt eredmény).

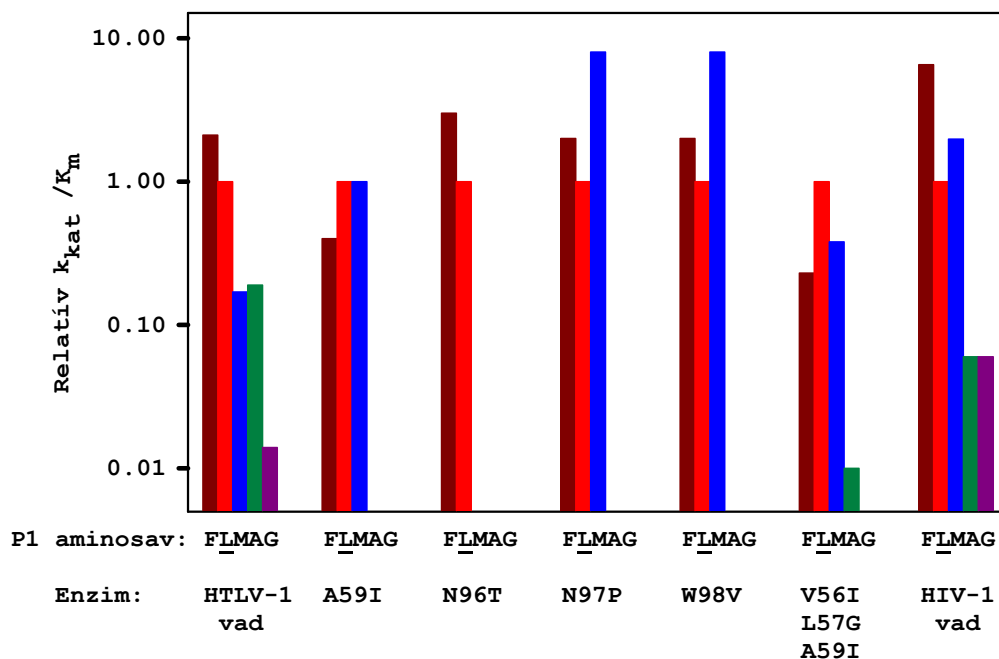
A



B



4.1.5.3 ábra: A HIV-1 (A) és HTLV-1 (B) proteáz S1 szubsztrátkötő zsebét alkotó aminosavrészek gömb és pálcika ábrázolással. A szubsztrát P1 oldalláncot (Leu) térkitöltő modellel ábrázoltuk.



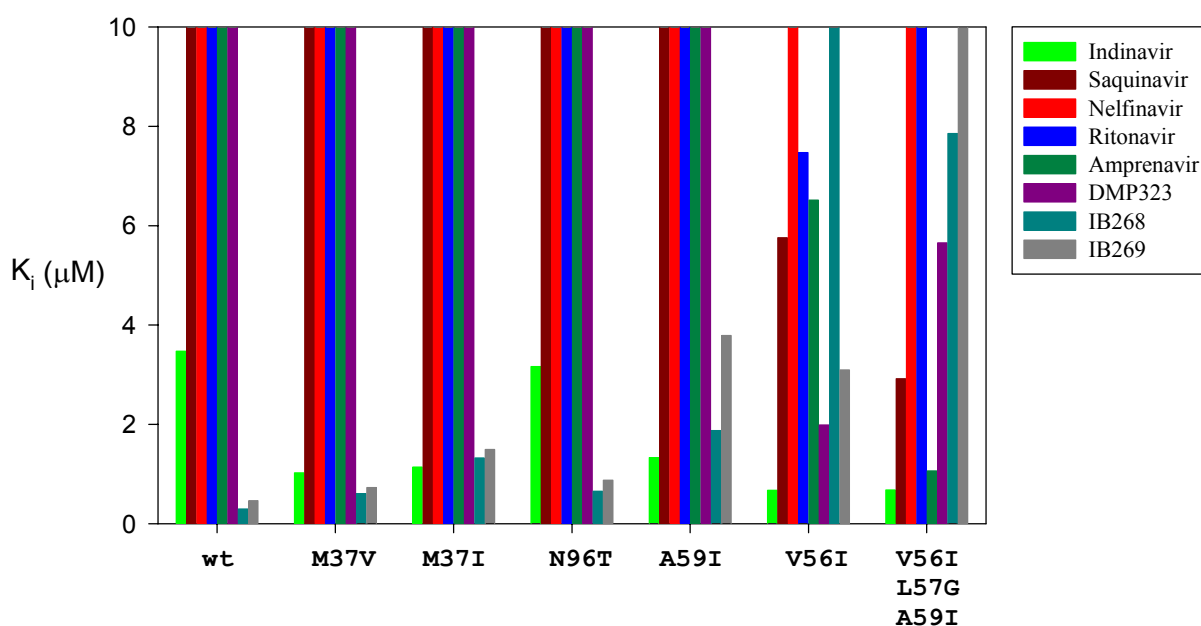
4.1.5.4. ábra: Vad-típusú HIV-1 és HTLV-1 és mutáns HTLV-1 proteázok relatív specificitási állandója P1 helyen aminosavcserét tartalmazó HTLV-1 kapszid↓nukleokapszid hasítási helyet reprezentáló szubsztrát szekvenciák esetén. A szubsztrát (KTKVL↓VVQPK) eredeti P3 aminosavrészét (Leu) aláhúztuk. A relatív értékeket (k_{cat}/K_M) a módosítatlan szubsztráthoz viszonyítva adtuk meg. A vad-típusú enzimek relatív k_{cat}/K_M értékeinek kimutathatósági határa 0,001, a mutánsok alacsony aktivitásának miatt a relatív k_{cat}/K_M A59I, N96T, N97P, W98V és a tripla mutánsok esetén 0,3, 0,7, 0,7, 0,7 és 0,01 voltak.

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

Számos HIV-1 PR inhibitort klinikai gyakorlatban is használnak. Köztük tartjuk számon az indinavir, saquinavir, nelfinavir, ritonavir és amprenavir inhibitorokat is. Vizsgáltuk, hogy ezen inhibitorok és még két redukált peptidkötést tartalmazó 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 (Bagossi és mtsai., 2004). Az indinavir kivételével a HIV-1 PR inhibitorok nem fejtettek ki jelentős hatást a vad-típusú HTLV-1 PR esetében (4.1.6. ábra). Előzőleg munkacsoportunk már kipróbált néhány HIV-1 PR inhibitort (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 (Louis és mtsai., 1999). Négy, klinikai gyakorlatban is használt HIV-1 PR inhibitor a HTLV-1 Gag *in vitro* hasítására kifejtett hatását is vizsgálták, de nem tapasztaltak változást (Pettit és mtsai., 1998). 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 (Louis és mtsai, 1999). Ezzel szemben a sztatin-tartalmú kapszid↓nukleokapszid hasítási hely szekvenciáján alapuló peptid nem gátolta az enzimet (Louis és mtsai, 1999). Két redukált peptidkötést 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 szubsztrátanalógok a retrovirális proteázok potenciális gátlószereként 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 (4.1.6.1. ábra).

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 (4.1.6.1. ábra). A V56I mutáció is nagy hatással volt a gátlási profil megváltozására, és ez a hatás összhangban van azon korábbi megfigyelésekkel, miszerint az I47V mutáció megjelenik az *in vitro* gyógyszer rezisztencia során (Korber és mtsai, 1998). Ez az aminosavrész kiemelten fontosnak látszik a HIV-1 és HTLV-1 proteázok különböző gátlási profiljának kialakításában.



4.1.6.1. ábra: A vad-típusú és mutáns HTLV-1 proteázok gátlási profilja a klinikailag használt HIV-1 PR inhibitorok, valamint a HTLV-1 hasítási hely analógok esetében. Az egyes proteázok gátlását a HTLV-1 kapszid↓nukleokapszid hasítási hely szekvenciáját tartalmazó fluoreszcens szubsztrát segítségével határoztuk meg. A K_i állandókat Williams és Morisson (1979) szerint határoztuk meg.

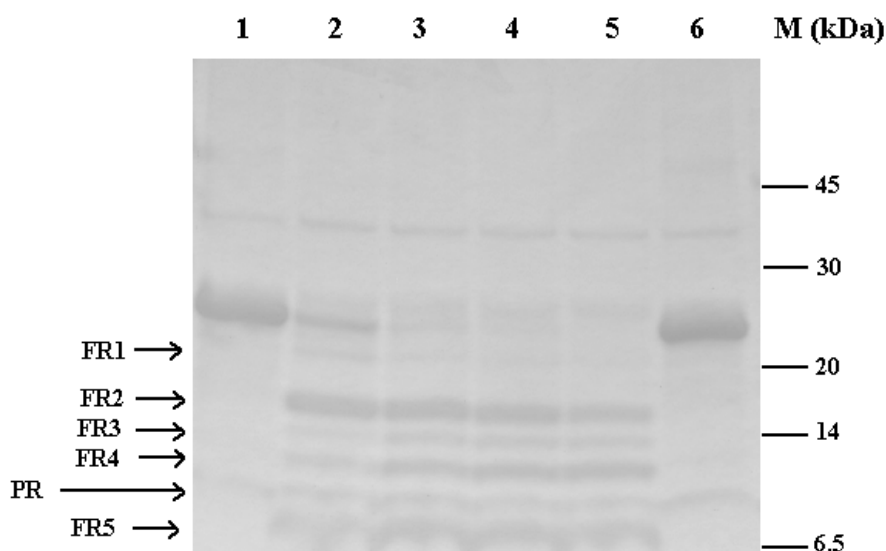
4.2. A HIV-1 kapszid (CA) protein szubsztrátja a HIV-1 proteáznak, az integráz (IN) rezisztens a proteolízissel szemben.

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 (Tózsér és mtsai., 2003). Miközben pH 7,0 értéken nem volt 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 tömegű fragmens is láthatóvá vált. Ez arra utalt, hogy a közepes méretű 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

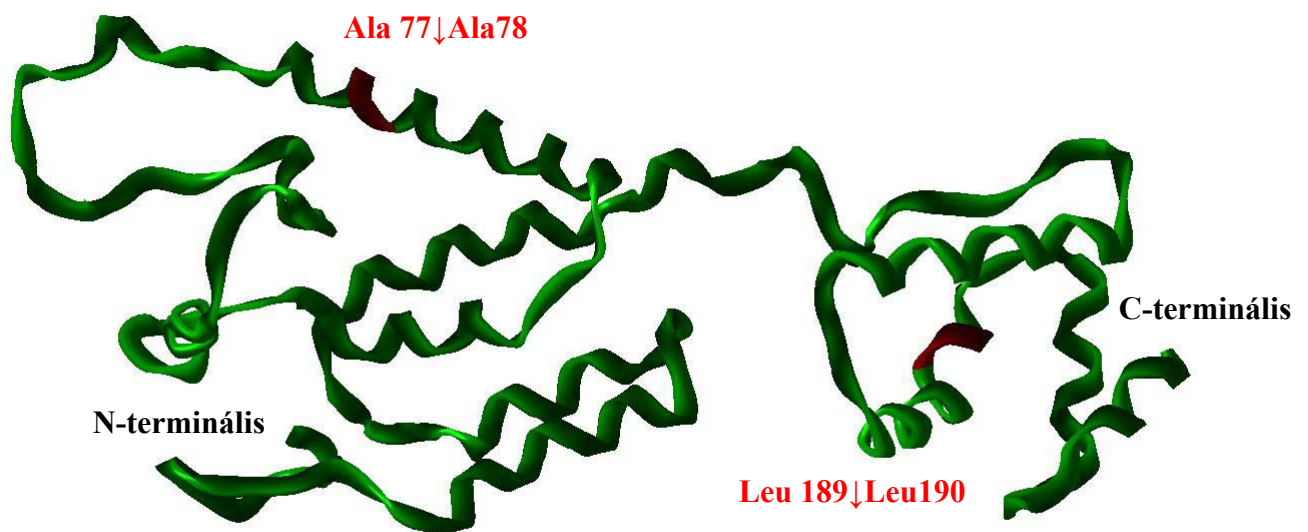
A kapszid fehérjén belüli hasítási helyek meghatározásához *E. coli*-ban expresszált, rekombináns $p24^{CA}$ fehérjét használtunk (r- $p24^{CA}$), melyet HIV-1 proteázzal hasítottuk. A PR és a CA aránya 1:20-hoz volt, a hasítást pH 5,5-ön végeztük, amely optimális a proteáz számára. A kísérlet során időfüggő processzálást figyelhattunk meg, amelyet specifikus PR inhibitorral, ritonavirrel 0,2 μ M koncentrációban gátolni lehetett (4.2.2.1. ábra).



4.2.2.1. ábra: A virális kapszid ($p24^{CA}$) processzálás időfüggése. A rekombináns kapszid fehérjét HIV-1 proteázzal inkubáltuk 0 (1.), 30 (2.), 60 (3.), 120 (4.), 240 (5.) percig, valamint 240 percig specifikus HIV-1 proteáz inhibitor jelenlétében (6.) majd SDS poliakrilamid elektroforézissel analizáltuk. M jelöli a molekulatömeget. A 4. fragmens (FR) magasabb molekulatömegnél jelenik meg, mint a virális kapszid fehérje, feltehetően az N-terminális His-„tag” jelenlétének következtében (4.2.2.1. táblázat). A teljes hosszúságú kapszid fehérjének illetve a fontosabb hasítási termékeknek megfelelő fragmenseket jelöltük

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 (4.2.2.1. táblázat). 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 (Berthet-Colominas és mtsai., 1999). Az N-terminális domén hasítási helye a 4. helixen található, amely a ciklofilin A-kötő hurok része (Berthet-Colominas és mtsai., 1999)(4.2.2.2. ábra). Ezek a szerkezeti elemek nem felelnek meg a proteáz-mediált hidrolízis szerkezeti követelményeinek, mivel a szubsztrátnak nyújtott béta konformációban kell az enzimhez kötődnie (összefoglaló közlemény: Wlodaver és Erickson, 1993). Azonban a p24 kapszid fehérje szerkezet-meghatározásához 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 esik szét és „olvadt” szerkezetet vesz fel (Misselwitz és mtsai., 1995; Ehrlich és mtsai., 2001), amelyben a hasítási helyek körüli struktúrák már lehetőséget adhatnak a proteázhoz történő produktív kötődésre.



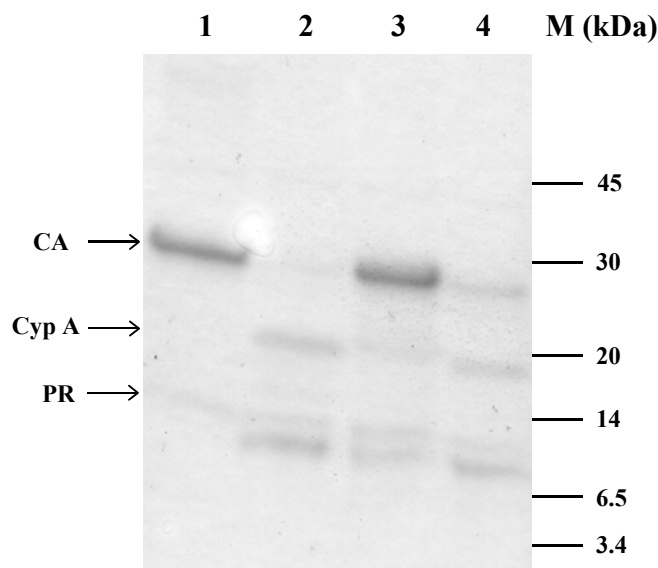
4.2.2.2 ábra. A HIV-1 kapszid fehérje szalagmodellje. A két lehetséges hasítási helyet pirossal emeltük ki.

4.2.2.1. táblázat: A teljes hosszúságú p24^{CA} (HIV_{III}B) és az SDS poliakrilamid gélelektroforézissel elválasztott fragmensei.

Sáv	Aminosav	A fehérje N-terminális szekvenciája	Molekulatömeg (kDa)	
			Megfigyelt	Meghatározott
p24	1-231	P-I-V-Q-N-	26.0	25.6
FR1	1-189	P-I-V-Q-N-	22.0	21.3
FR2	78-231	A-E-X-D-R-	18.0	17.2
FR3	78-189	A-E-X-D-R-	13.0	12.9
PR	(HIV-1 PR)	P-Q-V-T-L-	11.0	10.8
FR4	1-77	Nem meghatározott	7.0	8.4
FR5	190-231	L-V-Q-N-A-	5.0	4.3

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-n ciklofilin A-val előinkubáltuk a PR hozzáadása előtt. A Cyp A r-p24^{CA}-hoz történő kötődése lényegesen lecsökkentette a kapszid protein hasíthatóságát (4.2.3. ábra). Szérumalbumint, 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. ábra: Ciklofilin A hatása rekombináns kapszid fehérje hasíthatóságára. Rekombináns p24^{CA} protein önmagában (1. és 2. sor) vagy komplexben a ciklofilin A-val (3. és 4. sor), HIV-1 proteázzal (2. és 4. sor) és proteáz nélkül (1. és 3. sor) inkubálva 30 percig 37°C-on. A reakcióelegyek analízise SDS poliakrilamid gélelektroforézissel. Az M a molekulatömeget jelöli.

4.2.4. 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, 2 M NaCl) (Tózsér és mtsai., 1991), mely során úgy találtuk, hogy a C-terminális hasítási helyet reprezentáló oligopeptid valamivel jobb szubsztrátnak bizonyult (4.2.3. Táblázat). Ha a kinetikai paramétereket az *in vitro* hasítási körülményekhez igazítottuk (pH 4,0) akkor a másik szubsztrátot találtuk kedvezőbbnek.

4.2.3. Táblázat: HIV-1 Proteáz által hidrolizált hasítási helyek a HIV_{HXB2} p24^{ca} fehérjén belül.

Peptid ^a	Puffer összetétel ^b	K _m (mM)	k _{cat} (s ⁻¹)	k _{cat} /K _m (mM ⁻¹ s ⁻¹)
1. INEEA-↓-AEWDR	A	0.617 ± 0.035	0.20 ± 0.01	0.32
	B	<0.1	N.D.	7.6 ^c
2. MTETL-↓-LVENR	A	0.224 ± 0.049	0.14 ± 0.01	0.61
	B	0.731 ± 0.110	0.43 ± 0.05	0.59

^aA hasítási helyet nyíllal jelöltük.

^bMérési körülmények: A,foszfát puffer, pH 5,6, 2 M NaCl; B,foszfát puffer, pH 4,0.

^cKompetitív méréssel meghatározva.

A HIV-1 proteáz különböző pozíciókban hasítja a Gag és Gag-Pol poliproteineket a vírus „érése” során. A proteáz által hasított helyek P4 –P3’ helyen található aminosavrészeit a 4.2.3.1. táblázatban soroltuk fel. Ezeknek a helyeknek P2-P2’ helyein általában hidrofób aminosavakat találhatunk. Egyedül egy hasítási hely, a kapszid↓p2 tartalmaz töltött aminosavat a P2’ helyen, méghozzá glutamátot (Louis és mtsai., 2000), amely igen konzervált a HIV-1 esetén (Korbel és mtsai., 1998). A pH csökkenése gyorsítja a kapszid↓p2 hasítási hely hidrolízisét, ami azt bizonyítja, hogy ez szabályozó szerepet játszhat a virális fehérjék hidrolízisében (Pettit és mtsai., 1994). Miközben a p24 C-terminális doménen meglévő hasítási hely jól beleillik a Gag és Gag-Pol szekvenciák sorába, az N-terminális doménen lévő glutamátot tartalmaz mind a P2, mind pedig a P2’ pozíciókban (4.2.3.1. táblázatban). Két HIV-1 proteáz kristályszerkezet található az irodalomban, amely olyan inhibitorral, vagy hasítási termékkel készült, melynek P2’ helyén Glu aminosavréssz található (Tong és mtsai., 1993; Weber és mtsai., 1997). Ezekben a szerkezetekben a P2’ Glu két gyenge hidrogénhíddal kapcsolódik az enzim Asp 29 és Asp 30 aminosavrészeihez. A Glu oldallánc közelsége az

Asp 30 oldallánchoz azt sugallják, hogy megosztoznak a protonon (Weber és mtsai., 1997). Feltételezhető, hogy a különböző hasítási helyekben P2' helyen található Glu felelős a pH hatásért (Boross és mtsai., 1999). 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 glutamáttal, a C-terminális domén hasítási helyét reprezentáló peptid P3 és P3' pozícióiban ugyanez az aminosavrész semmilyen pH függőhatást nem gyakorol a hasíthatóságra.

4.1.1. Táblázat: HIV-1 proteáz által hidrolizált Gag és Gag-Pol hasítási helyek az „érés” során, valamint a HIV_{HXB2} p24^{ca} fehérjén belüli hasítási helyek.

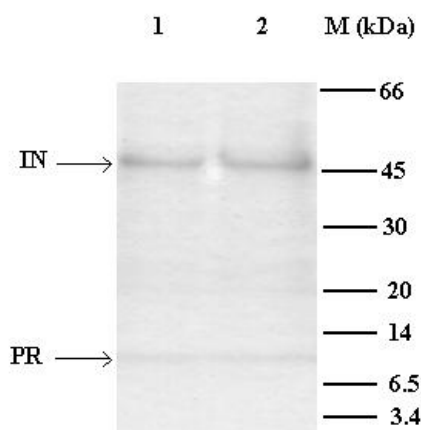
Hasítási hely:	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'
MA↓CA	Ser-Gln-Asn-Tyr-↓-Pro-Ile-Val ^a						
CA↓p2	Ala-Arg-Val-Leu-↓-Ala-Glu-Ala						
p2↓NC	Ala-Thr-Ile-Met-↓-Met-Gln-Arg						
NC↓p1	Arg-Gln-Ala-Asn-↓-Phe-Leu-Gly						
p1↓p6	Pro-Gly-Asn-Phe-↓-Leu-Gln-Ser						
p6	Lys-Glu-Leu-Tyr-↓-Pro-Leu-Thr						
TFP↓p6 ^{pol}	Asp-Leu-Ala-Phe-↓-Leu-Gln-Gly						
p6 ^{pol} ↓PR	Ser-Phe-Asn-Phe-↓-Pro-Gln-Val						
PR↓RT	Thr-Leu-Asn-Phe-↓-Pro-Ile-Ser						
p66↓p51	Ala-Glu-Thr-Phe-↓-Tyr-Val-Asp						
RT↓IN	Arg-Lys-Val-Leu-↓-Phe-Leu-Asp						
CA (1)	Asn-Glu-Glu-Ala-↓-Ala-Glu-Trp						
CA (2)	Thr-Glu-Thr-Leu-↓-Leu-Val-Glu						

^aA hasítási helyek hasonlóan vannak megadva, mint Louis és mtsai. (2000) közleményében, de a HXB2 izolátumra megadva. TFP, „transzframe” protein; p66 és p51, a RT funkcionális dimer két alegysége.

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 a lépés fontos lépés lehet a preintegrációs komplex kialakulásához vezető úton.

4.2.5. Az integráz nem szubsztátja 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 (4.2.5. ábra).



4.2.5. ábra: Rekombináns p32^{IN} HIV-1 integráz inkubációja HIV-1 proteázzal. Rekombináns p32^{IN} protein inkubációja proteáz jelenlétében (1. sor) és jelenléte nélkül (2. sor) 4 órán keresztül 37°C-on. A reakcióelegyek analízise SDS poliakrilamid gélelektroforézissel történt. Az M a molekulatömeget jelöli.

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 (Miller és mtsai., 1997) és HIV-1 integráz (Farnet és Haseltine, 1991) fehérjék nem szubsztátjai a HIV-1 proteáznak. Azok a fehérjék, amelyek nem kerülnek a PIC építőelemei közé, mind hidrolizálnak HIV-1 proteáz hatására (Tomaselli és mtsai., 1993; Wondrak és mtsai., 1994; Mildner és mtsai., 1994), 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 ligandkötő zsebeibe. A mutációk egy része inaktív, vagy nehezen detektálható aktivitású enzimet eredményezett, valamint a MBP-fúziós fehérjéből történő autoprocesszálo képesség elvesztésével járt. Az aktív-centrum titrálás eredményei azt mutatták, hogy az aktív enzimmutánsok folding-képessége jóval rosszabb, mint a vad-típusú 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 proteáz nem ment végig azon a véletlenszerű evolúciós fejlődésen, amely optimalizálta a HIV-1 proteáz, 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 lévő 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.

6. IRODALOMJEGYZÉK

- Babe LM, Craik CS. Viral proteases: evolution of diverse structural motifs to optimize function. (1997). *Cell*. 91: 427-30.
- Baboonian, C., Dalglish, A., Bountiff, L., Gross, J., Oroszlan, S., Rickett, G., SmithBurchnell, C., Troke, P., and Merson, J. (1991). HIV-1 proteinase is required for synthesis of pro-viral DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179, 17-24.
- Berthet-Colominas, C., Monaco, S., Novelli, A., Sibai, G., Mallet, F. and Cusack, S. (1999). Head-to-tail dimers and interdomain flexibility revealed by the crystal structure of HIV-1 capsid protein (p24) complexed with a monoclonal antibody Fab. *EMBO J.* 18, 1124-1136.
- Blaha, I., Tozser, J., Kim, Y., Copeland, T.D. and Oroszlan, S. (1992) Solid phase synthesis of the proteinase of bovine leukemia virus. Comparison of its specificity to that of HIV-2 proteinase. *FEBS Lett.* 309 (3):389-393.
- Boross, P., Bagossi, P., Copeland, T.D., Oroszlan, S., Louis, J.M. and Tözsér, J. (1999). Effect of substrate residues on the P2' preference of retroviral proteinases. *Eur J Biochem.* 264, 921-929.
- Bukrinskaya A, Brichacek B, Mann A, Stevenson M. Establishment of a functional human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcription complex involves the cytoskeleton. (1998). *J Exp Med.* 188: 2113-25.
- Cameron, C.E., Grinde, B., Jacques, P., Jentoft, J., Leis, J., Wlodawer, A. and Weger, I.T. (1993) Comparison of the substrate-binding pockets of the Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus type 1 proteases. *J. Biol. Chem.* 268, 11711-11720.
- Cameron, C.E., T.W. Ridky, S. Shulenin, J. Leis, I.T. Weber, T.D. Copeland, A. Wlodawer, H. Burstein, D. Bizub-bender, and A.M. Skalka. (1994). Mutational analysis of the substrate binding pockets of the Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus-1 proteases. *J. Biol. Chem.* 269: 11170-11177.
- Cann, A.J. and Chen, I.S.Y. (1990) Human T-cell leukemia virus types I and II. in: Fields, B.N., Knipe, D.M. (eds) *Virology*, 2nd ed. Raven Press, Ltd., New York, pp. 1501-1519.
- Chou, K.C. (1996) Prediction of human immunodeficiency virus protease cleavage sites in proteins. *Anal. Biochem.* 1; 233:1-14.
- Coffin JM. Genetic diversity and evolution of retroviruses. (1992) *Curr Top Microbiol Immunol.* 176:143-64.
- Copeland, T.D. and Oroszlan, S. (1988) Genetic locus, primary structure and chemical synthesis of human immunodeficiency virus protease. *Gene. Anal. Techn.* 5: 109-115.
- Cryns, V. and Yuan, J. (1998) Proteases to die for. *Genes. Dev.* 12: 1551-1170.
- Ding, Y.S., Rich, D.H. and Ikeda, R.A. (1998) Substrates and inhibitors of human T-cell leukemia virus type I protease. *Biochemistry.* 37: 17514-17518.
- Daenke, S., Schramm, H. and Bangham, C.R.M. (1994) Analysis of substrate cleavage by recombinant protease of human T cell leukemia virus type 1 reveals preferences and specificity of binding. *Journ. of Gen. Virology* 75: 2233-2239.
- Davies, D.R. (1990) The structure and function of the aspartic proteinases. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 19: 189-215.
- Dunn BM, Gustchina A, Wlodawer A, Kay J. (1994) Subsite preferences of retroviral proteinases. *Methods Enzymol.* 241: 254-78.
- Ehrlich, L.S., Liu, T., Scarlata, S., Chu, B. and Carter, C.A. (2001). HIV-1 capsid protein forms spherical (immature-like) and tubular (mature-like) particles in vitro: structure switching by pH-induced conformational changes. *Biophys. J.* 81: 586-594.
- Erickson, J., Neidhart, D.J., Vandrie, J., Kempf, D.J., Wang, X.C., Norbeck, D.W., Plattner, J.J., Rittenhause, J.W., Turon, M., Wideburg, N., Kohlbrenner, W.E., Simmer, R.,

- Helfrich, R., Paul, D.A. and Knigge, M. (1990) Design, activity and 2.8 Å crystal structure of a C2 symmetric inhibitor complexed to HIV-1 protease. *Science* 249: 527-533.
- Ermolieff, J., X. Lin, and J. Tang. (1997). Kinetic properties of saquinavir-resistant mutants of human immunodeficiency virus type 1 protease and their implications in drug resistance in vivo. *Biochemistry*. 36: 12364-12370.
- Farnet, C.M. and Haseltine, W.A. (1991). Determination of viral proteins present in the human immunodeficiency virus type 1 preintegration complex. *J. Virol.* 65, 1910-1915.
- Feher A, Weber IT, Bagossi P, Boross P, Mahalingam B, Louis JM, Copeland TD, Torshin IY, Harrison RW, Tozser J. (2002) Effect of sequence polymorphism and drug resistance on two HIV-1 Gag processing sites. *Eur J Biochem.* 269: 4114-20.
- Fersht, A. (1985) *Enzyme Structure and Mechanism* pp. 111-112.
- Fitzgerald., P.M.D., Mckeever, B.M., Van Middlesworth, J.F., Springer, J.P., Heimbach, J.C., Leu, C.T., Herber, W.K., Dixon, R.A.F. and Darke, P.L. (1990) Crystallographic analysis of a complex between human immunodeficiency virus type-1 protease and acetyl pepstatin at 2.0 Å resolution. *J.Biol.Chem.* 265: 14209-14219.
- Flexner, C. (1998) HIV-protease inhibitors. *N Engl J Med.* 338: 1281-1292.
- Franke, E.K., Yuan, H.E. and Luban, J. (1994). Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature.* 372, 359-362.
- Gallo, R.C. and Montagnier, L. (1988) AIDS in 1988. *Sci.Am.* 259: 41-48.
- Goto, T., Nakano, T., Kohno, T., Morimatsu, S., Morita, C., Hong, W., Kiso, Y., Nakai, M., and Sano, K. (2001). Targets of a protease inhibitor, KNI-272, in HIV-1-infected cells. *J. Med. Virol.* 63: 203-209.
- Grinde, B., Cameron., C.E., Leis., J., Weber, I.T., Wlodawer, A., Burstein., H. and Skalka, A.-M. (1992) Analysis of substrate interactions of the Rous sarcoma virus wild type and mutant proteases and human immunodeficiency virus type-1 protease using a set of systematically altered peptide substrates. *J. Biol. Chem.* 267: 9491-9498.
- Grobelny, D., Wondrak, E.M., Galaray, R.E. and Oroszlan, S. (1990). Selective phosphinate transition-state analogue inhibitors of the protease of human immunodeficiency virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 169, 1111-1116.
- Gulnik, S.V., L.I. Suvorov, B. Liu, B. Yu, B. Anderson, H. Mitsuya, and J.W. Erickson. (1995) Kinetic characterization and cross-resistance patterns of HIV-1 protease mutants selected under drug pressure. *Biochemistry* 34: 9282-9287.
- Gustchina, A. and Weber, I.T. (1991) Comparative analysis of the sequences and structures of HIV-1 and HIV-2 proteases. *Proteins.* 10: 325-339.
- Haas, L., Divers, T., Casey, J.W. (1992) Bovine leukemia virus gene expression in vivo. *J. Virol.* 66 :6223-6225.
- Harrison, R.W. (1993) *J. Comp. Chem.*, 14. 1112-1122.
- Hruskova-Heidingsfeldova, O., Andreansky, M., Fabry, M., Blaha, I., Strop, P. and Hunter, E. (1995) Cloning, bacterial expression, and characterization of the Mason-Pfizer monkey virus proteinase. *J. Biol. Chem.* 270: 15053-15058.
- Hruskova-Heidingsfeldova, O., Blaha, I., Urban, J., Strop, P. and Pichova, I. (1997) Substrates and inhibitors of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) proteinase. *Leukemia* 11 Suppl. 3:45-46.
- Hui, K.Y., Manetta, J.V., Gygi, T., Bowdon, B.J., Keith, K.A., Shannon, W.M. and Lai, M.H. (1991) A rational approach in the search for potent inhibitors against HIV proteinase. *FASEB J.* 5: 2606-2610.
- Hyland, L.J., Tomaszek, T.A.Jr. and Meek, T.D. (1991) Human immunodeficiency virus-1 protease. 1. Initial velocity studies and kinetic characterization of reaction intermediates by 180 isotope exchange. *Biochemistry.* 30: 8441-8453.

- Hyland, L.J., Tomaszek, T.A.Jr., Roberts, G.,D., Carr, S.A., Magaard, V.W., Bryen, H.L., Fakhoury, S.A., Moore, M.L., Minnich, M.D. and Culp, J.S. (1991) 2. Use of pH rate studies and solvent kinetic isotope effects to elucidate details of chemical mechanism. *Biochemistry*. 30: 8454-8463.
- Jacobsen, H., Ahlborn-Laake, J., Gugel, R. and Mous, J. (1992). Progression of early steps of human immunodeficiency virus type 1 replication in the presence of an inhibitor of viral protease. *J. Virol.* 66: 5087-5092.
- Jaskolski, M., Tomasselli, A.G., Sawyer, T.K., Staples, D.G., Heinrikson, R.L., Schneider, J., Kent, S.B.H. and Wlodawer, A. (1991) Structure at 2.5 Å resolution of chemically synthesised human immunodeficiency virus type 1 protease complexed with a hydroxyethylene-based inhibitor. *Biochemistry*. 30: 1600-1609.
- Jeang, K.T. (2001) Functional activities of the human T-cell leukemia virus type I Tax oncoprotein: cellular signaling through NF-kappa B. *Cytokine Growth Factor Rev.* 12: 207-217.
- Jenkins, T.M., Engelman, A., Ghirlando, R. and Craigie, R. (1996) A soluble active mutant of HIV-1 integrase: involvement of both the core and carboxyl-terminal domains in multimerization. *J. Biol. Chem.* 271: 7712-7718.
- Johnson, J.M., Harrod, R. and Franchini G. (2001) Molecular biology and pathogenesis of the human T-cell leukaemia/lymphotropic virus Type-1 (HTLV-1). *Int. J. Exp. Pathol.* 82: 135-147.
- Kaplan, A.H. and Swanstrom, R. (1991) Human immunodeficiency virus type 1 Gag proteins are processed in two cellular compartments. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 4528-4532.
- Kapust, R.B., Waugh, D.S. (1999) Escherichia coli maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci.* 8: 1668-1674.
- Kobayashi, M., Ohi, Y., Asano, T., Hayakawa, T., Kato, K., Kakinuma, A. and Hatanaka, M., (1991) Purification and characterization of human T-cell leukemia virus type I protease produced in E. coli. *FEBS Lett.* 293: 106-110.
- Kotler, M., Danho, W., Katz, R.A., Leis, J. and Skalka, A.M. (1989) Avian retroviral proteases and cellular aspartic proteases are distinguished by activities on peptide substrates. *J.Biol.Chem.* 264: 3428-3435.
- Korber, B., Kuiken, C, Foley, B., Hahn, B., McCuthan, F., Mellors, J. and Sodroski, J. (eds) *Human retroviruses and AIDS* (1998). Los Alamos Laboratory, Los Alamos, NM., USA.
- Lam, P.Y., Jadhav, P.K., Eyermann, C.J., Hodge, C.N., Ru, Y., Bacheler, L.T., Meek, J.L., Otto, M.J., Rayner, M.M. and Wong, Y.N. (1994) Rational design of potent, bioavailable, nonpeptide cyclic ureas as HIV protease inhibitors. *Science*. 263: 380-384.
- Leis, J., Baltimore, D., Bishop, J.M., Coffin, J., Fleissner, E., Goff, S.P., Robinson, H., Skalka, A.M., Temin, H.M. and Vogt, V. (1988) Standardized and simplified nomenclature for proteins common to all retroviruses. *J. Virol.* 62: 1808-1809.
- Lin, Y.C., Z. Beck, T. Lee, V.C. Le, G.M. Morris, A.J. Olson, C.H. Wong, and J.H. Elder. (2000). Alteration of substrate and inhibitor specificity of feline immunodeficiency virus protease *J. Virology*. 74: 4710-4720.
- Louis JM, Dyda F, Nashed NT, Kimmel AR, Davies DR. Hydrophilic peptides derived from the transframe region of Gag-Pol inhibit the HIV-1 protease.(1998) *Biochemistry*. 37: 2105-10.
- Louis, J.M., Weber, I.T., Tözsér, J., Clore, G.M. and Gronenborn, A.M. (2000) HIV-1 protease: maturation, enzyme specificity and drug resistance. *Adv. Pharmacol.* 49: 111-146.

- Louis, J.M., Oroszlan, S. and Tozser, J. (1999) Stabilization from autoproteolysis and kinetic characterization of the human T-cell leukemia virus type 1 proteinase. *J. Biol. Chem.* 274: 6660-6666
- Louis, J.M., Clore, G.M. és Gronenborn, A.M. (1999) Autoprocessing of HIV-1 protease is tightly coupled to protein folding. *Nat. Struct. Biol.* 6: 868-875.
- Louis, J.M., McDonald, R.A., Nashed, N.T., Wondrak, E.M., Jerina, D.M., Oroszlan, S., Mora, P.T. (1991) Autoprocessing of the HIV-1 protease using purified wild-type and mutated fusion proteins expressed at high levels in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 199: 361-369.
- Mahalingam, B., Louis, J.M., Reed, C.C., Adomat, J.M., Krouse, J., Wang, Y.F., Harrison, R.W. & Weber, I.T. (1999) Structural and kinetic analysis of drug resistant mutants of HIV-1 protease. *Eur. J. Biochem.* 263: 238-245.
- Mahalingam, B., Louis, J.M., Hung, J., Harrison, R.W. & Weber, I.T. (2001) Structural implications of drug-resistant mutants of HIV-1 protease: high-resolution crystal structures of the mutant protease/substrate analogue complexes. *Proteins.* 43: 455-464.
- Menendez-Arias, L., Gotte, D. and Oroszlan, S. (1993) Moloney murine leukemia virus protease: bacterial expression and characterization of the purified enzyme. *Virology* 196: 557-563.
- Menendez-Arias, L., I.T. Weber, and S. Oroszlan, (1995) Mutational analysis of the substrate binding pocket of murine leukemia virus protease and comparison with human immunodeficiency virus proteases. *J. Biol. Chem.* 270: 29612-29168.
- Menendez-Arias L. (2002) Targeting HIV: antiretroviral therapy and development of drug resistance. *Trends Pharmacol Sci.* 23: 381-8.
- Mildner AM, Rothrock DJ, Leone JW, Bannow CA, Lull JM, Reardon IM, Sarcich JL, Howe WJ, Tomich CS, Smith CW,. (1994) The HIV-1 protease as enzyme and substrate: mutagenesis of autolysis sites and generation of a stable mutant with retained kinetic properties. *Biochemistry.* 33: 9405-13.
- Miller, M., Jaskolski, M., Rao, J.K.M., Leis, J. and Wlodawer, A. (1989) Crystal structure of a retroviral protease proves relationship to aspartic protease family. *Nature.* 337: 576-579.
- Miller, M.D., Farnet, C.M. and Bushman, F.D. (1997). Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *J. Virol.* 71: 5382-5390.
- Misselwitz, R., Hausdorf, G., Welfle, K., Hohne, W.E. and Welfle, H. (1995) Conformation and stability of recombinant HIV-1 capsid protein p24 (rp24). *Biochim. Biophys. Acta* 1250, 9-18.
- Nagy, K., Young, M., Baboonian, C., Merson, J., Whittle, P., and Oroszlan, S. (1994). Antiviral activity of human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors in a single cycle of infection: evidence for a role of protease in the early phase. *J. Virology* 68: 757-765.
- Navia, M.A., Fitzgerald, P.M.D., McKeever, B.M., Leu, C.T., Heimbach, J.C., Herber, W.K., Sigal, I.S., Dark, P.L. and Springer, J.P. (1989) Three-dimensional structure of aspartyl protease from human immunodeficiency virus HIV-1. *Nature* 337: 615-620.
- Oroszlan, S. and Gilden, R.V. (1980) Primary structure analysis of retrovirus proteins. In: Stephenson, J.R. (ed) *Molecular Biology of RNA tumor Viruses*. Academic Press, New York, pp. 299-344.
- Oroszlan S, Luftig RB. (1990) Retroviral proteinases. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 157:153-85.
- Oroszlan, S. and Tőzsér, J. (1990) The retroviral proteinases. *Seminars in Virology.* 1: 369-378.

- Ott DE, Coren LV, Johnson DG, Kane BP, Sowder RC 2nd, Kim YD, Fisher RJ, Zhou XZ, Lu KP, Henderson LE.(2000) Actin-binding cellular proteins inside human immunodeficiency virus type 1.Virology. 266: 42-51.
- Ott DE. Potential roles of cellular proteins in HIV-1.(2002) Rev Med Virol. 12: 359-74.
- Panther, L.A., Coombs, R.W., Aung, S.A., dela Rosa, C., Gretch, D. and Corey, L. (1999). Unintegrated HIV-1 circular 2-LTR proviral DNA as a marker of recently infected cells: Relative effect of recombinant CD4, zidovudine and saquinavir in vitro. J. Med. Virol. 58: 165-173.
- Pettit SC, Moody MD, Wehbie RS, Kaplan AH, Nantermet PV, Klein CA, Swanstrom R.(1994) The p2 domain of human immunodeficiency virus type 1 Gag regulates sequential proteolytic processing and is required to produce fully infectious virions.J Virol. 68: 8017-27.
- Pettit, S.C., Sheng, N., Tritch, R., Erickson-Viitanen, S. & Swanstrom, R. (1998) The regulation of sequential processing of HIV-1 Gag by the viral protease. Adv. Exp. Med. Biol. 436: 15-25.
- Pichova, I., Teplitsky, A., Cubinkova, R., Zabransky, A., Shoham, G. and Hruskova-Heidingsfeldova, O. (1998) Subsequent selfprocessing of bovine leukemia virus proteinase in vitro. Adv. Exp. Med. Biol. 436: 109-113.
- Precigoux, G., Geoffre, S., Leonard, R., Llido, S., Dautant, A., Destaintot, B.L., Picard, P., Menard, A. Guillemain, B., and Hospital, M.(1993). Modeling, synthesis and biological activity of a BLV proteinase, made of (only) 116 amino acids. FEBS Lett. 326: 237-240
- Rao, J.K., Erickson, J.W. and Wlodawer, A. (1991) Structural and evolutionary relationships between retroviral and eucaryotic aspartic proteinases. Biochemistry. 30:4663-4671.
- Riviere, Y., Blank, V., Kourilsky, P. and Israel, A. (1991) Processing of the precursor of NF-kappa B by the HIV-1 protease during acute infection. Nature. 350: 625-626.
- Roberts, M.M. and Oroszlan, S. (1989) The preparation and biochemical characterisation of intact capsids of Equine infectious anemia virus. Biochem-Biophys-Res-Commun 160: 486.
- Roberts, M.M., Copeland, T.D. and Oroszlan, S. (1991) In situ processing of a retroviral nucleocapsid protein by the viral proteinase. Protein Eng. 4: 695-700.
- Sagata, N., Yasunaga, T., Ohishi, K., Tsuzuku-Kawamura, J., Onuma, M., Ikawa, Y. (1984) Comparison of the entire genomes of bovine leukemia virus and human T-cell leukemia virus and characterization of their unidentified open reading frames. EMBO J. 3: 3231-3237.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd ed., vol. 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, (1989).
- Schechter, I. and Berger, A. (1967) On the size of the active site in proteases. I. Papain. Biochem-Biophys-Res-Commun. 27: 157-162.
- Shoeman RL, Sachse C, Honer B, Mothes E, Kaufmann M, Traub P.(1993) Cleavage of human and mouse cytoskeletal and sarcomeric proteins by human immunodeficiency virus type 1 protease. Actin, desmin, myosin, and tropomyosin.Am J Pathol.42: 221-30.
- Shoeman RL, Huttermann C, Hartig R, Traub P.(2001) Amino-terminal polypeptides of vimentin are responsible for the changes in nuclear architecture associated with human immunodeficiency virus type 1 protease activity in tissue culture cells. Mol Biol Cell. 12:143-54.
- Shuker SB, Mariani VL, Herger BE, Dennison KJ. (2003). Understanding HTLV-I protease.Chem Biol. 10: 373-80.
- Szeltner, Z. and Polgár, L. (1996) Conformational stability and catalytic activity of HIV-1 protease are both enhanced at high salt concentration. J. Biol. Chem. 27: 5458-5463.

- Swain, A.L, Miller, M.M., Green, J., Rich, D.H., Schneider, J., Kent, S.B.H. and Wlodawer, A. (1990) X-ray crystallographic structure of a complex between a synthetic protease of human immunodeficiency virus 1 and a substrate based hydroxyethylamine inhibitor. *Proc. Natl. Chem. Sci. USA* 87: 8805-8809.
- Swanstrom, R. (1994) Characterisation of HIV protease mutants: random, directed, selected. *Curr. Opin. Biotechnol.* 5: 409-413.
- Thali, M., Bukovsky, A., Kondo, E., Rosenwirth, B., Walsh, C., Sodorski, J. and Göttinger, H.G. (1994). Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions. *Nature* 372, 363-365.
- Thomas FP, Chalk C, Lalonde R, Robitaille Y, Jolicoeur P. (1994) Expression of human immunodeficiency virus type 1 in the nervous system of transgenic mice leads to neurological disease. *J Virol.* 68: 7099-107.
- Toh, H., Ono, M., Saigo, K. and Miyata, T. (1985) Retroviral protease-like sequence in the yeast transposon Ty1. *Nature* 315: 691
- Tomasselli AG, Heinrikson RL. (1994) Specificity of retroviral proteases: an analysis of viral and nonviral protein substrates. *Methods Enzymol.* 241: 279-301.
- Tomasselli, A.G., Sardich, J.L., Barrett, L.J., Reardon, I.M., Howe, W.J., Evans, D.B., Sharma, S.K. and Heinrickson, R.L. (1993). Human immunodeficiency virus type-1 reverse transcriptase and ribonuclease H as substrates of the viral protease. *Protein Sci.* 2, 2167-2176.
- Tong, L., Pav, S., Pargellis, C., Do, F., Lamerre, D. and Anderson, P.C. (1993). Crystal structure of human immunodeficiency virus (HIV) type 2 protease in complex with a reduced amide inhibitor and comparison with HIV-1 protease structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 8387-8391.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354.
- Tözsér, J., Gustchina, A., Weber, I.T., Blaha, I., Wondrak, E.M. and Oroszlan, S. (1991) Studies on the role of the S4 substrate binding site of HIV proteinases. *FEBS Letters* 279: 356-360.
- Tözsér, J., Blaha, I., Copeland, T.D., Wondrak, E.M. and Oroszlan, S. (1991) Comparison of the HIV-1 and HIV-2 proteinases using oligopeptide substrates representing cleavage sites in Gag and Gag-Pol polypeptides. *FEBS Lett.* 281: 77-80.
- Tözsér, J., Weber, I.T., Gustchina, A., Blaha, I., Copeland, T.D., Louis, J.M. and Oroszlan, S. (1992) Kinetic and modelling studies of S3-S3' subsites of HIV proteinases. *Biochemistry* 31: 4793-4800.
- Tözsér, J., Friedman, D., Weber, I.T., Blaha, I. and Oroszlan, S. (1993) Studies on the substrate specificity of the proteinase of Equine infectious anemia virus using oligopeptide substrates. *Biochemistry* 32: 3347-3353.
- Tözsér, J., Bagossi, P., Boross, P., Louis, J.M., Majerova, E., Oroszlan, S. and Copeland, T.D. (1999) Effect of serine and tyrosine phosphorylation on retroviral proteinase substrates. *Eur. J. Biochem.* 265, 423-429.
- Tözsér, J. (2001) HIV inhibitors: problems and reality. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 946:145-159.
- Tözsér, J., Zahuczky, G., Bagossi, P., Louis, J.M., Copeland, T.D., Oroszlan, S., Harrison, R.W. & Weber, I.T. (2000) Comparison of the substrate specificity of the human T-cell leukemia virus and human immunodeficiency virus proteinases. *Eur. J. Biochem.* 267, 6287-6295.
- Tözsér, J. (1997) Specificity of retroviral proteinases based on substrates containing tyrosine and proline at the site of cleavage. *Pathol. Oncol. Res.* 3, 141-145.

- Wang, C., A.F. Castro, A.F., Wilkes, D.M., Altenberg, G.A.(1999) Expression and purification of the first nucleotide-binding domain and linker region of human multidrug resistance gene product: comparison of fusions to glutathione S-transferase, thioredoxin and maltose-binding protein. *Biochem. J.* 338: 77-81.
- Varmus, H.E. and Brown, P. (1989) Retroviruses. in: Howe, M. and Berg, D. (eds) *Mobile DNA*. ASM Press, Washington DC, pp. 53-109.
- Venaud S, Yahi N, Fehrentz JL, Guettari N, Nisato D, Hirsch I, Chermann JC.(1992) Inhibition of HIV by an anti-HIV protease synthetic peptide blocks an early step of viral replication. *Res Virol.* 143: 311-9.
- Weber, I.T. and Harrison, R.W. (1996) Molecular mechanics calculations on HIV-1 protease with peptide substrates correlate with experimental data. *Protein Eng.* 9: 679-690.
- Weber, I.T., Miller, M., Jaskolski, M., Leis, J., Skalka, A.M., and Wlodawer, A. (1989) Molecular modelling of the HIV-1 protease and its substrate binding site. *Science* 243: 928-931.
- Weber, I.T., Wu, J., Adomat, J., Harrison, R.W., Kimmel, A.R., Wondrak, E.M. and Louis, J.M. (1997). Crystallographic analysis of human immunodeficiency virus 1 protease with an analog of the conserved CA-p2 substrate - interactions with frequently occurring glutamic acid residue at P2' position of substrates. *Eur. J. Biochem.* 249, 523-539.
- Weber, I.T., Tözsér, J., Wu, J., Friedman, D. and Oroszlan, S. (1993) Molecular model of Equine infectious anemia virus proteinase and kinetic measurement for peptide substrates with single amino acid substitutions. *Biochemistry* 32: 3354-3362.
- Welker, R., Kottler, H., Kalbitzer, H.R. and Krausslich, H.G. (1996). Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein is incorporated into virus particles and specifically cleaved by the viral proteinase. *Virology* 219: 228-236.
- Welker, R., Hohenberg, H., Tessmer, U., Huckhagel, C. and Krausslich, H.G. (2000). Biochemical and structural analysis of isolated mature cores of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 74: 1168-1177.
- Williams, J.W. and J.F. Morrison, (1979). The kinetics of reversible tight-binding inhibition *Methods Enzymol.* 63: 437-467.
- Wlodawer, A., Miller, M., Jaskolski, M., Sathyanarayana, B.K., Baldwin, E., Weber, I.T., Selk, L.M., Clawson, L., Schneider, J. and Kent, S.B.H. (1989) Conserved folding in retroviral proteases: crystal structure of a synthetic HIV-1 protease. *Science* 245: 616-621.
- Wlodawer, A. and Erickson, J.W. (1993) Structure-based inhibitors of HIV-1 protease. *Annu. Rev. Biochem.* 62: 543-585.
- Wlodawer ,A., Gustchina, A., Reshetnikova, L., Lubkowski, J., Zdanov, A., Hui, K.Y., Angleton, E.L., Farmerie, W.G., Goodenow, M.M. and Bhatt, D. (1995) Structure of an inhibitor complex of the proteinase from feline immunodeficiency virus. *Nat. Struct. Biol.* 2: 480-488.
- Wlodawer, A. and Gustchina, A. (2000) Structural and biochemical studies of retroviral proteases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1477: 16-34.
- Wondrak, E.M., Sakaguchi, K., Rice, W.G., Kun, E., Kimmel, A.R. and Louis, J.M. (1994). Removal of zinc is required for processing of the mature nucleocapsid protein of human immunodeficiency virus, type 1, by the viral protease. *J. Biol. Chem.* 269: 21948-2150.
- Yamada, T., Yamaoka, S., Goto, T., Nakai, M., Tsujimoto, Y. and Hatanaka, M. (1994) The human T-cell leukemia virus type I Tax protein induces apoptosis which is blocked by the Bcl-2 protein. *J. Virol.* 68: 3374-3379.
- Yoshinaka, Y. and Luftig, R.B. (1977) Murine leukemia virus morphogenesis: Cleavage of P70 in vitro can be accomponied by a shift from a concentrically coiled internal strand

- ("immature") to a collapsed ("mature") form of the virus core. Proc. Natl. Chem. Sci. USA 74: 3446-3450.
- Yoshinaka, Y., Katoh, I., Copeland, T.D. and Oroszlan, S. (1985) Murine leukemia virus protease is encoded by the gag-pol gene and is synthesised through suppression of an amber termination codon. Proc. Natl. Chem. Sci. USA 82: 1618-1622.
- Yoshinaka, Y., Katoh, I., Copeland, T.D., Smythers, G.W. and Oroszlan, S. (1986) Bovine leukemia virus protease: purification, chemical analysis, and in vitro processing of gag precursor polyproteins. J. Virol. 57: 826-832.
- Zahuczky, G., Boross, P., Bagossi, P., Emri, G., Copeland, T.D., Oroszlan, S., Louis, J.M. and Tözsér, J. (2000) Cloning of the bovine leukemia virus proteinase in Escherichia coli and comparison of its specificity to that of human T-cell leukemia virus proteinase. Biochim. Biophys. Acta. 1478: 1-8.

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 poszterek:

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.