

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

Fehér Anita

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

Témavezető Dr. Tózsér József

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

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

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

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

Köszönöm Dr. Bagossi Péter egyetemi adjunktus Úrnak a molekuláris modellezéssel és eredményeim számítógépes kiértékelésével kapcsolatban nyújtott önzetlen segítségét.

Köszönöm Dr. Boross Péter egyetemi tanársegéd Úrnak gyakorlati tanácsait és útmutatását.

Köszönöm Pető Szilvia asszisztensnek a számtalan gyakorlati segítséget.

Köszönöm a DE OEC BMBI Retrovirális Biokémiai Kutatólaboratórium tagjainak türelmét és segítségét.

Köszönöm Ludányi Katának és Molnár Erikának hogy barátaimként mindenkor számíthattam rájuk.

Köszönöm családom és hozzátartozóim támogatását, akik mindenben mellettem álltak.

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

TARTALOMJEGYZÉK

	Rövidítések	5.
1.	BEVEZETÉS	6.
1.1.	A retrovirális proteinázok szerepe a vírusok életciklusában	6.
1.2.	A retrovirális proteinázok általános jellemzése	8.
1.3.	A HIV-1 proteináz mint antivirális target az AIDS terápiájában	10.
1.3.1.	HIV-1 proteináz inhibitorok	11.
1.3.2.	A rezisztencia problémája	12.
1.4.	Az egér leukémia vírus (MuLV)	12.
1.4.1.	Az egér leukémia vírus (MuLV) vizsgálatának gyakorlati jelentősége	13.
1.4.1.1.	<i>Génterápiás felhasználás.</i>	13.
1.4.1.2.	<i>Inhibitorfejlesztés</i>	13.
2.	CÉLKITŰZÉS	15.
3.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	18.
3.1.	A vad típusú és mutáns HIV-1 proteinázokat kódoló konstrukciók, és az enzimek tisztítása	18.
3.2.	Az MuLV proteinázt kódoló pMalc2 konstrukciók előállítása	18.
3.3.	Az MuLV proteináz expressziója és a fehérje tisztítására szolgáló eljárások	19.
3.4.	Az MuLV proteináz izolálása víusból	20.
3.5.	MuLV Gag fehérjefragmensek klónozása, tisztítása és proteolízise	20.
3.6.	Oligopeptidek	21.
3.7.	A retrovirális proteinázok enzimaktivitásának mérésére alkalmas eljárások	22.
3.7.1.	<i>Spektroszkópiás módszer az MuLV proteináz pH függésének és dimerstabilitásának vizsgálatára</i>	22.
3.7.2.	<i>Fluoreszcens módszer az MuLV proteináz gátolhatóságának vizsgálatára</i>	22.
3.7.3.	<i>HPLC alapú módszer a HIV-1 és MuLV PR specifitásvizsgálataira</i>	22.
3.8.	Aktív centrum titrálás a pontos enzimkoncentráció meghatározására	23.
3.9.	Molekuláris modellezés	23.
4.	EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS	25.
4.1.	A HIV-1 proteinek szekvencia-polimorfizmusának és gyógyszerrezisztens mutációinak hatása az NC/p1 illetve p1/p6 hasítási helyek proteolitikus processzálására	25.
4.1.1.	Az NC/p1 és p1/p6 hasítási helyek vad típusú HIV-1 proteináz által katalizált hidrolízisének kinetikai paraméterei	25.
4.1.2.	Vad típusú és mutáns HIV-1 proteinázok specifitási állandóinak meghatározása mutáns hasítási hely szubsztrátokra vonatkozóan	25.
4.1.3.	NC/p1 hasítási szekvenciát reprezentáló peptidek processzálása vad típusú és mutáns HIV-1 proteináz enzimekkel	26.
4.1.4.	A p1/p6 hasítási szekvenciát reprezentáló peptidek processzálása vad típusú és mutáns HIV-1 proteináz enzimekkel	28.
4.2.	Az egér leukémia vírus (MuLV) proteináz klónozása, tisztítása és a víusból származó enzimformával illetve HIV-1 proteinázzal történő összehasonlítása	29.
4.2.1.	Az MuLV proteolitikus enzimének klónozása és tisztítása	29.
4.2.2.	Az egér leukémia vírus (MuLV) proteináz részletes jellemzése	32.
4.2.2.1.	A rekombináns MuLV proteináz összehasonlítása a víusból izolált enzimmel	32.
4.2.2.2.	Az MuLV proteináz részletes összehasonlítása a HIV-1 proteinázzal	33.
4.2.2.2.1.	<i>A kinetikai paraméterek pH függése</i>	33.

4.2.2.2.2.	<i>Az MuLV és HIV-1 proteináz specificitásának összehasonlítása</i>	34.
4.2.2.2.3.	<i>Rekombináns MuLV Gag fehérjerészek MuLV és HIV-1 proteinázok által történő hasítódásának vizsgálata</i>	36.
4.2.2.2.4.	<i>Az MuLV proteináz inhibitor-profilozása</i>	38.
5.	ÖSSZEFOGLALÁS	40.
6.	IRODALOMJEGYZÉK	42.
7.	KÖZLEMÉNYLISTA	47.

Rövidítések

AIDS	szerzett immunhiányos szindróma
AMV	madár mieloblasztóma vírus
BLV	marha leukémia vírus
CA ³	kapszid protein
CIP	calf intestinal phosphatase
DMSO	dimetil szulfoxid
DTT	ditiotritol
EIAV	ló vészes vérszegénységét okozó vírus
EDTA	etilén-diamin-tetraacetát
Env	envelop protein, burokfehérje
GST	glutation-S-transzferáz
HAART	highly active antiretroviral therapy
HFV	humán foamy vírus
HIV	humán immundeficiencia vírus
HTLV	humán T sejt leukémiát okozó vírus
IN ³	integráz
IPTG	izopropil tiogalaktozid
K _I	gátlási állandó
MA ³	matrix protein
MBP	maltóz kötő fehérje
META puffer	50 mM MES, 100 mM Tris, 50 mM nátrium acetát, 1 M NaCl
MLV, MuLV	egér leukémia vírus
NC ³	nukleokapszid protein
O.D.	optikai denzitás
P1, P2, P3, stb. ¹	a szubsztrát aminosav része
PCR	polimeráz láncreakció
PIC	preintegrációs komplex
PL puffer	20 mM Pipes, pH 7.0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 10% glicerol, 5% etilén glikol, 0.5% Nonidet P-40 és 10 mM DTT
PNF puffer	250 mM foszfát puffer pH5.6, 5% glicerol, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 500 mM NaCl
PR ³	proteináz
S1, S2, S3, stb. ²	a proteináz szubsztrátkötő helyeinek a része
SDS PAGE	SDS-poliakrilamid gélelektroforézis
SU ³	surface protein
TFA	trifluorecetsav
TM ³	transzmembrán protein
TN puffer	50 mM Tris-HCl, pH 7.2, 100 mM NaCl

¹⁻² 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. módon vannak jelölve. A megfelelő szubsztrátkötőhelyek jelölése S1, S2, S3, stb., illetve S1', S2', S3', stb.

³ A retrovirális fehérjék rövidítései Leis és mtsai, 1988 alapján.

1. BEVEZETÉS

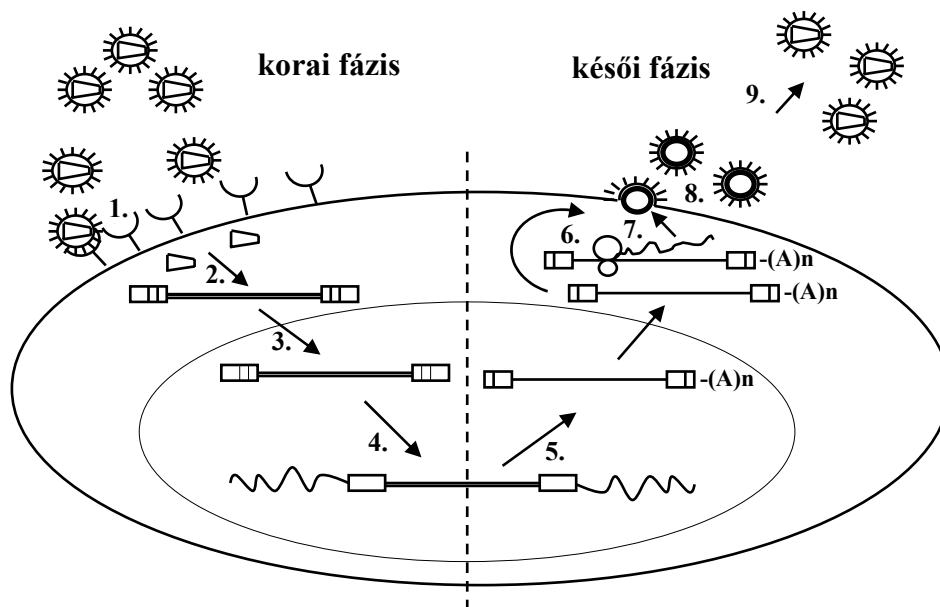
1.1. *A retrovirális proteinázok szerepe a vírusok életciklusában*

A retrovirális proteinázok (PR) a peptidkötések hidrolízisét katalizáló endopeptidázok, katalitikus mechanizmusuk alapján az aszpartil proteinázok csoportjába tartozó enzimek. A különböző retrovírusok által kódolt, homodimer formában aktív proteinázok tulajdonságait szerkezetvizsgálati és biokémiai módszerek alkalmazásával intenzíven tanulmányozzák. Az ezirányú kutatások fő hajtóerejét elsősorban egy ma még gyógyíthatatlan betegség, a szerzett immunhiányos szindróma (AIDS) (Gallo és mtsai, 1988) elleni gyógyszerfejlesztés során potenciálisan felhasználható ismeretek bővítésére való törekvés jelenti.

A retrovirális proteinázok funkciója esszenciális a hatékony vírusreplikációban (1. ábra). A pozitív szálú, diploid RNS genomot tartalmazó vírusok receptor mediált endocitózissal vagy direkt membránfúzióval kerülnek a gazdasejt belsejébe, replikációjuk DNS intermedieren keresztül történik. Az életciklus korai szakaszában a dupla szálú DNS molekula szintézise a belépő kapszid struktúrában valósul meg, a pozitív szálú genomi RNS templát virális reverz transzkriptáz (RT) által végzett reverz átírással. Az vírusreplikáció ezen lépésében az RT önmagát visszaellenőrző képességének hiánya genomként átlagosan egy mutációt eredményez. A magas mutációs rátával, valamint a vírusok nagy rekombinációs képességével magyarázható, hogy a különböző vírusfehérjék ellen tervezett és alkalmazott gátlószerekkel szemben viszonylag gyorsan kifejlődik a rezisztencia. A reverz transzkripciót követően a virális DNS-t és különböző fehérjekomponenseket tartalmazó úgynevezett preintegrációs komplex (PIC) formálódik a fertőzött sejt citoplazmájában, amely a legtöbb retrovírus esetében a gazdasejt osztódása során, a nukleáris membrán szétesésekor történő passzív folyamat révén jut be a magba. A HIV-1 és egyéb lentivírusok esetében viszont a PIC járulékos virális fehérjék által koordinált aktív transzportfolyamat útján kerül a sejtmagba, amely lehetővé teszi, hogy ezek a vírusok nyugvó, éppen nem osztódó vagy esetleg osztódásképtelen sejteket is megfertőzhessenek.

A magba jutó vírus-DNS a PIC esszenciális komponensét képező retrovirális integráz (IN) által katalizált folyamat révén integrálódik, ezáltal a gazdasejt genomjának részévé válik. Ebben az állapotban már provírusnak nevezzük.

Feltételezhető, hogy különféle celluláris illetve virális fehérjék hasítása által a retrovirális proteináz szerepet játszik a vírusfertőzés ezen korai fázisában is. Kimutatták, hogy a ló vészes vérszegénységet okozó vírus (EIAV) esetén a kapszidban lévő nukleokapszid protein (NC) elhasad a vírus-RNS reverz transzkripciója során (Roberts és mtsai, 1991), azonban a proteináznak a fertőzés korai fázisában betöltött pontos szerepét még nem ismerjük.



1. ábra

A retrovírusok életciklusának lépései (Tőzsér, 2003)

1. gazdasejtbe történő bejutás 2. reverz transzkripció 3. a PIC transzportja a sejtmagba 4. integráció 5. mRNS szintézis 6. fehérjeszintézis 7. éretlen vírusrészecske formálódása 8. gazdasejtéből történő kiszabadulása („budding”) 9. a vírusrészecske érése

A retrovirális életciklus késői fázisában a provírus a celluláris RNS polimeráz II. segítségével RNS-sé íródik át, ezután az újonnan képződő, nem illesztett (unspliced) mRNS-ek a citoplazmába kerülve templátként szolgálnak a Gag illetve Gag-Pro-Pol poliproteinek transzlációjához. A *gag* gén a vírus szerkezeti fehérjéit (MA: mátrix protein, CA: kapszid protein, NC: nukleokapszid protein), a *pol* pedig a replikációs enzimeket (RT, IN) kódolja. A proteináz génje (*pro*) a Gag és Pol fehérjéket kódoló szekvenciák között lokalizálódik a genomban. A vírusfehérjék átírása a vírustól függően, különböző módon történhet. Az emlős C típusú retrovírusok esetén (MuLV) a Gag és Pro-Pol génjei azonos leolvasási keretben vannak, de stop kodon választja el őket egymástól, mely a transzláció során időnként szupresszálódik (Yoshinaka és mtsai, 1985). A madár mieloblasztóma vírus (AMV) esetében is azonos a *gag* és *pro* leolvasási keret, az elválasztó stop kodon hiánya miatt azonban a proteináz a szerkezeti fehérjéket kódoló szekvenciákkal együtt mindig átíródik, így a fertőzés folyamán azokkal ekvivalens mennyiségben képződik. A többi retrovírusban a *gag*, *pro* és *pol* gének külön leolvasási keretben vannak kódolva, ilyenkor az enzimefehérjék -1 irányú kereteltolódással (frameshift) átíródó mRNS-ről szintetizálódnak (HIV-1, BLV, HTLV). A foamy vírusok esetében a replikációs enzimek illesztett mRNS-ről íródnak át. A különböző kódolási lehetőségek eredményeként a Pro és Pol enzimefehérjék a szerkezeti fehérjékhez képest általában csak lényegesen kisebb mennyiségben (5-10%) szintetizálódnak.

A virális genom 3' végén található *env* génterméke a burokfehérje, mely egy kisebb, illesztett (spliced) RNS templátról szintetizálódik az endoplazmatikus retikulumban (ER) illetve a Golgiban. A burokfehérjék ezt követően először glikolizálódnak, majd a plazmamembránba való transzport során celluláris proteázok által egy felületi glikoproteinre (SU) és egy transzmembrán fehérjére (TM) hasítódnak.

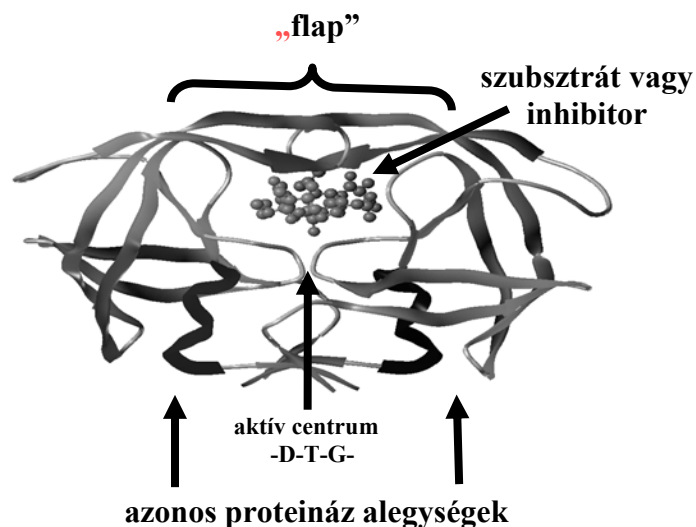
A Gag és Gag-Pro-Pol poliproteinek a gazdasejt membránjának Env fehérjében koncentrált részein, a membrán belső felületénél csoportosulnak, és a vírus genomi RNS-ével együttesen éretlen részecskébe rendeződve lefűződnek a sejtről. A virális replikáció késői szakaszának utolsó lépésében a lefűződő vírusrészecske egy érési folyamaton megy keresztül, mely a proteináz enzim ma még nem ismert módon történő aktiválódásával veszi kezdetét. A Gag illetve Gag-Pro-Pol prekursor poliproteinek funkcionális vírusfehérjékké történő processzálásával a vírusrészecske morfológiája megváltozik, a vírus fertőzőképessé válik. A proteináz funkció nélkül a vírusrészecske éretlen marad, és a működőképes fehérjék hiányából adódóan nem lesz képes újabb sejtek fertőzésére. Ezen alapulnak a különböző proteináz-gátlók alkalmazásával megvalósuló antiretrovirális próbálkozások.

1.2. A retrovirális proteinázok általános jellemzése

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

A retrovirális proteinázok elsődleges és másodlagos szerkezete a celluláris aszpartil proteinázok 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.

A konzervatív régiók közül az N-terminálishoz közel helyezkedik el az aktív centrumot kódoló katalitikus triád (Asp-Thr/Ser-Gly). Az alegységek katalitikus triádjai hurkot alkotnak, mely analóg a celluláris aszpartil proteinázokra leírt ψ -struktúrával. Az ezt felépítő aminosavak konformációja minden ismert kristáyszerkezetben azonos (Wlodawer és mtsai, 2000). A katalitikus triplet hidrogén kötések hálózatán keresztül, jellemző módon kapcsolódik egymáshoz (Davies, 1990; Wlodawer és mtsai, 1993), melyet a kötés geometriájára és igen erős jellegére utalva tűzoltófogásnak (fireman's grip) neveznek.



2. ábra
Az aktív, ligand kötött HIV-1 proteináz dimer szalagdiagramja

Egy másik többé-kevésbé konzervatív régió a flexibilis „flap” régió (Miller és mtsai, 1989; Navia és mtsai, 1989), mely a szubsztrát illetve inhibitor kötődésekor elmozdul és ráhaladjik 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.

A retrovirális proteinázok savas pH optimumú (pH 5-6) enzimek, részletes biokémiai jellemzésüket oligopeptid és poliprotein szubsztrátokon végezték (Dunn és mtsai, 1994; Tomasselli és mtsai, 1994). A hasítás poliprotein szubsztrátoknál 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 szubsztrátok hidrolízise jól nyomon követhető HPLC technikával, megfelelően módosított szubsztrátok alkalmazása esetén pedig spektroszkópiásan vagy fluorimetriásan is. Az effektív hidrolízishez proteináztól függően minimálisan 6-7 tagú peptidszakasznak kell nyújtott β -redő konformációban az enzimhez kötődnie (Tözsér és mtsai, 1991a; Weber és mtsai, 1993).

A retrovirális proteinázok természetes hasítási helyein található aminosavak többnyire hidrofób karakterűek, viszont általánosan érvényes konszenzus szekvencia nem adható meg (Oroszlan és Tözsér, 1990). A HIV-1 proteináz esetében a hasítási helyeket két csoportba osztották: az I-es típusúak aromás aminosav és Pro mellett hasítódnak, P2 pozícióban Asn, a P2' helyen β elágazó Val és Ile gyakori; míg a II-es típusú helyek esetében hidrofób aminosavak (de nem prolin) között történik a hasítás, P2 helyen Val és Ile, P2' pozícióban pedig a Glu jelenléte

bizonyult kedvezőnek (Pettit és mtsai, 1991; Tőzsér és mtsai, 1992; Griffiths és mtsai, 1992; elnevezés Schechter és Berger nevezéktana alapján, 1967).

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

A szerzett immunhiányos szindrómát (AIDS) 1981-ben ismerték fel először, a betegséget okozó humán immundeficiencia vírust (HIV) pedig 1983-ban azonosították. A legfrissebb adatok szerint azóta több mint 40 millió ember fertőződött meg a vírussal és közülük 20 millióan már meghaltak (www.avert.org/worldstats.htm, 2003 december).

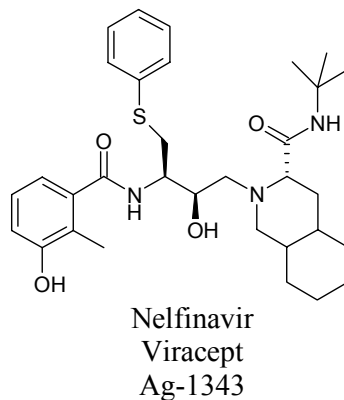
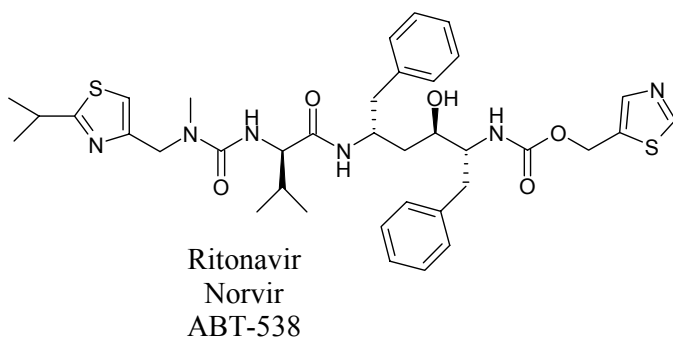
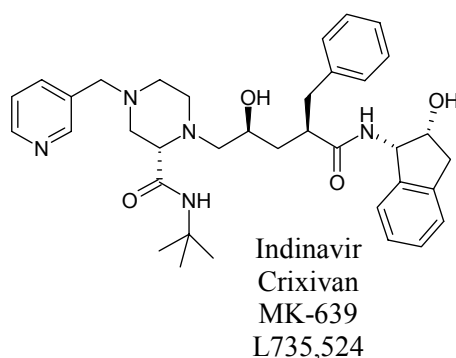
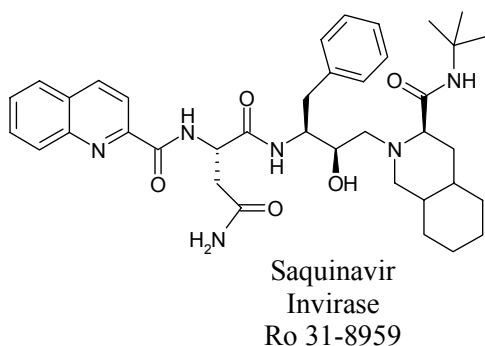
A HIV CD4 pozitív sejtek (T-helper limfociták, makrofágok) fertőzése révén az emberi szervezet védekező rendszerét károsítja. A vírus megtalálható a testnedvekben szabadon (vér, nyál, genitális folyadék), illetve fertőzött sejtek formájában egyaránt.

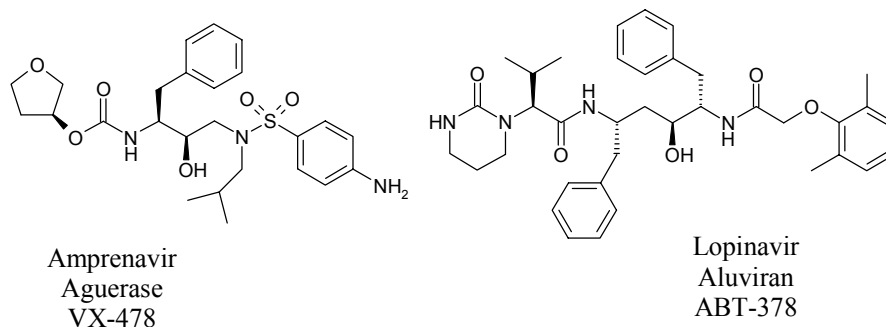
A retrovírusok életeklusának tanulmányozásából, illetve a virális enzimfehérjék működésével kapcsolatos vizsgálatokból nyert ismeretek alapján lehetőség nyílt racionális gyógyszerfejlesztésre és különböző antivirális terápiás eljárások kidolgozására. A több lehetséges terápiás célpont közül azonban leginkább csak két replikációs enzim, a HIV-1 reverz transzkriptáz (RT) és HIV-1 proteináz (PR) ellen tervezett gátlószerek kerültek eddig klinikai felhasználásra. Ezeknek a szereknek a különböző kombinációkban történő alkalmazása (HAART, highly active antiretroviral therapy) képes jelentősen lecsökkenteni a HIV fertőzött betegek halálozását (Temesgen és mtsai, 2001). A kombinált terápia azonban rendkívül költséges, nem elérhető a fejlődő országokban élő betegek számára. Komoly problémát jelent továbbá, hogy a kezelés nem eredményezi a vírusnak a fertőzött szervezetből történő teljes eliminálását, ezért a vírusszint alacsonyan tartása érdekében hosszútávú terápia szükséges, mely a költségek további növekedése mellett egyéb kedvezőtlen következményekkel is jár. Ezek közül legsúlyosabb az alkalmazott gátlószerekkel szemben rezisztens vírusformák megjelenése és gyors elszaporodása a terápia idején, melyet a retrovírusok magas mutációs rátája illetve nagy rekombinációs képessége tesz lehetővé (két hét elegendő a plazmabeli víruspopuláció teljes lecserélődéséhez (Ho és mtsai, 1995; Wei és mtsai, 1995)). Mindemellett számos metabolikus mellékhatás is megfigyelhető a kezelés során, például túlérzékenység, lipodisztrófia szindróma, inzulin rezisztencia és különböző kardiovaszkuláris rendellenességek (Carr és mtsai, 2000; Tőzsér, 2001; Moyle és mtsai, 2002). Ezért szükséges a további gyógyszerfejlesztés, mely elsősorban a már bevált célfehérjék (HIV-1 RT, PR) ellen ható, de az eddigieknél előnyösebb tulajdonságokkal rendelkező inhibitorok tervezésére, másfelől a vírusreplikáció egyéb lépéseit gátló szerek kifejlesztésére irányul. Mindebben hasznos segítséget nyújthat az alkalmazott drogokkal szembeni rezisztencia kialakulásában szerepet játszó genetikai háttértényezők feltérképezése.

1.3.1. HIV-1 proteináz inhibitorok

A HIV-1 proteináz az inaktív formában képződő Gag és Gag-Pro-Pol poliproteinek funkcionális fehérjékké történő processzálasáért felelős enzim, esszenciális a vírus replikációjában. A proteináz funkció hiánya esetében a gazdasejtből kiszabaduló vírusok fertőzőképtelenek lesznek, mely ígéretes célponttá teszi a HIV-1 PR-t az AIDS elleni terápia szempontjából. Komoly előny a PR-inhibitorok alkalmazása kapcsán, hogy a már megfertőzött sejtekre gyakorolt terápiás hatás nem különbözik az újonnan fertőzött sejtek esetében kifejtett hatáshoz képest. Ez ugyanakkor nem igaz a reverz transzkriptáz gátlószerekre, melyek kizárólag az újabb fertőzési események megelőzésére alkalmasak. Ebből a megfontolásból célszerű továbbra is a kombinált terápiás eljárások optimalizálására fókuszálni.

A jelenleg klinikai használatban lévő HIV-1 PR gátlószerek neve és szerkezete az 3. ábrán látható (Tőzsér, 2003). Mindegyikük szubsztrátanalóg (peptidomimetikum), és a természetes szubsztrátokhoz hasonlóan döntően hidrofób kölcsönhatásokat alakítanak ki az enzimmal. P1 pozícióban fenil csoportot hordoznak, további közös tulajdonságuk, hogy a hasítandó kötésnek megfelelő helyen egy nem-hidrolizáló átmeneti állapotot utánzó csoportot (pl. hidroxietilamin) tartalmaznak.





3. ábra

Az AIDS-terápiában alkalmazott HIV-1 proteáz inhibitorok (Tózsér, 2003)

1.3.2. A rezisztencia problémája

Az antivirális terápia gyakori sikertelenségének legfőbb oka az alkalmazott gátlószerekkel szemben rezisztens vírusformák megjelenése és rohamos elszaporodása a kezelés idején. Az *in vitro* és *in vivo* is kialakuló rezisztenciáért elsősorban a proteáz kódoló régióban kialakuló mutációk tehetőek felelőssé, melyek közül számos az enzim szubsztrátkötő zsebében belül lokalizálódik. Gyakran érinti mutáció a 8, 46, 47, 48, 50, 82 és 84-es pozícióban lévő aminosavakat (Ridky és Leis, 1995). Ezek amellet, hogy gátolják az inhibitorkötődést, többnyire kedvezőtlenül befolyásolják az enzim katalitikus hatékonyságát, illetve hatással vannak annak specifikitására is. A rezisztens mutációk egy másik csoportja a szubsztrátkötő zseben kívül található aminosavakat érinti. Mivel a többszörös drogrezisztens HIV-1 PR mutánsok *in vitro* és *in vivo* egyaránt csökkent katalitikus hatékonyságot mutatnak, ezért a mutációk további halmozása az enzimfunkció által limitált, hiszen a megfelelő Gag és Gag-Pro-Pol hasítási helyek kellő hatékonyságú hidrolízise elengedhetetlen a vírusreplikációhoz.

Egyes adatok alapján azonban úgy tűnik, hogy a PR gátlószerek jelenlétéből adódó szelekciós nyomás a lerontott enzimaktivitást ellensúlyozó változásokat is indukálhat (Doyon és mtsai, 1996; Zhong és mtsai, 1997; Maguire és mtsai, 2001).

1.4. Az egér leukémia vírus (MuLV)

Az egér leukémia vírus (MuLV) az emlős C-típusú retrovírusok (újabb nevezéktan szerint γ -retrovírusok, Regenmortel és mások, 2000) tipikus képviselője, eredetileg BALB/c egerek szarkómájából izolálták (Moloney, 1960). Újszülött egérbe juttatva 3 hónap alatt limfoid leukémia fejlődik ki.

Az MuLV egyláncú, diploid genomja három, a vírusfertőzéshez és replikációhoz szükséges gént tartalmaz, 5'-gag-(pro-pol)-env-3' sorrendbe rendeződve. Ezeknek a géneknek az expressziója három poliprotein, a Gag (Pr65^{gag}), Gag-Pro-Pol (Pr180^{gag-pro-pol}) és az Env (gPr85^{env}) képződéséhez vezet. A Gag poliprotein (group specific antigen) négy domént

tartalmaz, melyek megfelelnek a vírus fő szerkezeti fehérjéinek: p15 (MA, mátrix protein), p12, p30 (CA, kapszid protein), p10 (NC, nukleokapszid protein); és amelyek a prekursor fehérje vírusproteináz által katalizált proteolitikus processzáásával válnak szabaddá (Oroszlan és mtsai, 1978). A Gag-Pro-Pol poliprotein szintézise a gag terminátor azonos leolvasási keretben történő szupressziójával, félreértelmezésével valósul meg (Yoshinaka és mtsai, 1985); és a processzáást követően a szerkezeti fehérjék mellett a virális enzimek (PR, RT, IN) megjelenését is eredményezi. Az illesztett mRNS-ről átíródó Env fehérje először glikolizálódik, majd a Golgi-ból a plazmamembránba való transzport során megfelelő celluláris proteázok által egy felületi glikoproteinre (SU, gPr70) és egy transzmembrán fehérjére (TM, Pr15(E)) hasítódik. A transzmembrán fehérje a virális proteináz segítségével tovább processzáódik p12(E) és p2(E) fehérjékre (Katoh és mtsai, 1985; Schultz és mtsai, 1985; Crawford és mtsai, 1985). Ez a hasítás az MuLV Env fehérje membránfúziós képességének kialakításához szükséges, ennél fogva esszenciális a vírus fertőzőképessége szempontjából (Rein és mtsai, 1994).

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

1.4.1.1. Génterápiás felhasználás

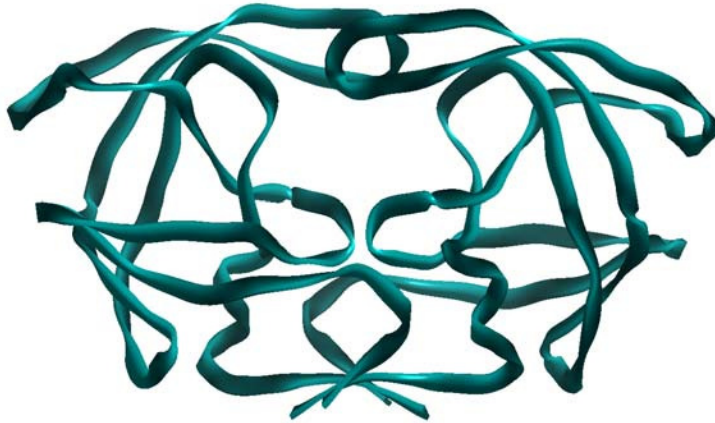
Génterápia során különböző genetikai eredetű betegségeket próbálunk orvosolni a megfelelő információt hordozó DNS molekulának a beteg sejtekbe történő bejuttatásával. A retrovírusok sajátos életciklusa alkalmassá teszi őket génterápiás célú felhasználásra. A replikációjukhoz szükséges integrációs mechanizmusuk minden egyéb eddigi módszernél (DNS mikroinjekció, lipofekció, elektroporáció, kémiai transzfekció) hatékonyabb géntranszfert tesz lehetővé. A virális genom jelentős része helyettesíthető, géntechnológiai úton egyszerűen kicserélhető a terápiás céllal bejuttatni kívánt génszekvenciára. A virális burokfehérje (Env) változtatásával meghatározható a célsejt-spektrum, mely kellően szelektív génterápiás eljárások kidolgozására kínál lehetőséget. A mára klinikai alkalmazásba került retrovirális vektorok közül a HIV-en alapulóak mellett kétségkívül az egér leukémia vírus módosításával kifejlesztett vektorok a legjelentősebbek (Thomas és mtsai, 2003).

1.4.1.2. Inhibitorfejlesztés

A retrovirális proteinázok vírusreplikációban betöltött esszenciális szerepe miatt a HIV-1 proteináz ígéretes célfehérjévé vált egy mindmáig gyógyíthatatlan betegség, az AIDS terápiájában (lásd 11-12. oldal). Mára már több, HIV-1 proteináz ellen kifejlesztett inhibitor került klinikai felhasználásra, ám sok esetben problémát jelent a meglévő gyógyszerekkel szemben rezisztens formák megjelenése és kisselektálódása a terápia folyamán, ami új, az eddigieknél hatékonyabb, széles spektrumú inhibitorok fejlesztését teszi szükségessé (De Clercq,

2002). A különböző retrovirális proteinázok összehasonlító vizsgálata révén megismerhetjük ezen enzimek specificitásának közös jellemvonásait. A mindeddig csak kevésbé vizsgált és jellemzett MuLV bevonásával nyerhető ismeretek hasznos segítséget nyújthatnak olyan gátlók tervezésében, melyekkel szemben kisebb az életképes mutáns formák kisselektálódásának lehetősége a terápia során.

Az alapvető retrovírusmodellként is számontartott egér leukémia vírus (MuLV) komoly gyakorlati jelentőséggel bír, ennek ellenére csak viszonylag keveset tudunk róla, és különösen kevés információval rendelkezünk a vírus által kódolt proteináz enzimre vonatkozóan (Menendez és mtsai, 2004).



4. ábra
Az MuLV proteináz enzim szalagdiagramja

2. CÉLKITŰZÉSEK

Az AIDS elleni terápia során alkalmazott proteínáz inhibitorokkal szembeni rezisztencia kialakulásáért kezdetben szinte kizárólag a proteínáz mutációit tették felelőssé. Az általánosan elfogadott nézet szerint ezen mutációk egy része az enzim aktív centrumán belül lokalizálódó ún. primer mutáció, melyek az inhibitor kötődésének gátlásán keresztül vezetnek a gyógyszerrezisztencia kialakulásához, de ezzel egyidejűleg többnyire kedvezőtlenül befolyásolják az enzim katalitikus hatékonyságát, és hatással vannak annak specifitására is. Ezek a primer mutációk további, az enzim aktív centrumán kívül elhelyezkedő másodlagos (szekunder) mutációk megjelenését indukálják, melyek ugyan közvetlenül nem befolyásolják az inhibitor kötődését, viszont többnyire jótékony hatást gyakorolnak az enzim katalitikus hatékonyságára. Az utóbbi időszak kutatásai kimutatták, hogy a különböző PR-inhibitorokkal szembeni rezisztencia kialakulása során megjelennek mutációk a virális genomnak a proteínázt kódoló régióján kívül eső területein is. Ezek a változások leginkább két Gag hasítási helyet, az NC/p1 illetve p1/p6 helyeket érintik. E két hasítási helyen a PR-gátlók jelenléte által okozott szelekciós nyomás nélkül is szignifikáns szekvencia-polimorfizmus figyelhető meg, amely hatással lehet a vírus fertőzőképességére is (Barrie, 1996; Korber, 1998; Bally, 2000). Az NC/p1 és p1/p6 helyek hidrolízise egyben a poliprotein processzálás sebességmeghatározó lépésének számít (Doyon, 1996; Robinson, 2000), ugyanis hasítási helyei közül a HIV-1 proteínáz e két szekvenciát bontja a legkisebb katalitikus hatékonysággal (Tózsér, 1991a; Wondrak, 1993).

Munkánk során a vad típusú és különböző mutáns HIV-1 proteínázok kinetikai vizsgálatát terveztük az NC/p1 és p1/p6 hasítási helyek eredeti illetve különféle mutált változatait reprezentáló oligopeptid szubsztrátok alkalmazásával. Mivel különböző klinikai tanulmányok alapján tudjuk, hogy a rezisztens Gag mutációk a PR inhibitor terápia kezdeti szakaszában, közvetlenül egy, vagy néhány kritikus proteínáz mutáció kialakulását követően jelennek meg, ezért csak az előforduló mutációk valamelyikét hordozó, egyszeresen mutáns enzimformákat tanulmányoztunk. Ezek egy része primer mutációt tartalmazó aktív centrum-mutáns volt (V82S, V82A, I84V), a többiek az enzim egyéb régióiban lokalizálódó szekunder mutációt hordozó variánsok voltak (M46L, L90M) (5. ábra). Hasonló megközelítéssel többszörösen mutáns, multidrog rezisztens HIV-1 proteínáz formák jellemzése is lehetséges.

A különböző oligopeptid szubsztrátok segítségével egyes reprezentatív mutációk hatását kívántuk vizsgálni. Munkánkkal azt akartuk alátámasztani, hogy az inhibitorok jelenlétében kialakuló Gag hasítási hely mutációk a primer proteázmutációk által lerontott enzimfunkciót kompenzációs mutációkként ellensúlyozó, ezáltal a gyógyszerrezisztencia kialakulásához jelentős mértékben hozzájáruló változásoknak tekinthetők.

Az alapvető retrovírusmodellként is számontartott egér leukémia vírust (MuLV) komoly gyakorlati jelentősége ellenére is (génterápiás felhasználás, HIV-1 elleni gyógyszerfejlesztés) csak kevésbé vizsgálják. Bár az MuLV által kódolt proteináz enzimet sikerült elsőként izolálni vírusból (Yoshinaka és mtsai, 1985), különösen kevés ismerettel rendelkezünk erre az enzimre vonatkozóan. Az izolált vírusproteináz sajátosságainak részletes tanulmányozása az igen alacsony kitermelés (kevesebb mint 0.3 µg proteináz / mg vírus) illetve a megbízható enzimforrás hiánya miatt nem volt lehetséges. Az MuLV proteinázt Menendez és mtsai korábban (1993) már sikeresen klónozták pGex vektorba, ám ez a GST-fúziós expressziós rendszer sem bizonyult elég hatékonynak. Ezért elterveztük, hogy az egyéb fehérjék esetében (HIV-1-PR, BLV-PR, HFV-PR) már jól bevált pMalc2 rendszerben (Louis és mtsai, 1991; Fenyőfalvi és mtsai, 1999; Zahuczky és mtsai, 2000) próbáljuk előállítani az MuLV proteinázt. A pMalc2 expressziós rendszerben a fehérjék maltóz kötő proteinnel (MBP) fúziós formában termelődnek. Az MBP jelenléte több szempontból is előnyös, mert azon túl, hogy egy amilóz oszlopon történő affinitás kromatográfiás lépést tesz lehetővé (elősegítvén ezáltal a rekombináns fehérje tisztítását), az MBP segíti a vele fúzióban lévő fehérjepartner foldingját is az expresszió során (Kapust és Waugh, 1999; Wang és mtsai, 1999).

Az MuLV-PR-t kódoló cDNS szekvencia pMalc2 plazmidba való klónozásán illetve az expresszált fehérje tiszta és aktív formában, megfelelő mennyiségben történő előállításán kívül tervbe vettük a rekombináns fehérje részletes jellemzését, a vírusból izolált MuLV proteinázzal illetve a HIV-1 proteinázzal való összehasonlító vizsgálatát is.

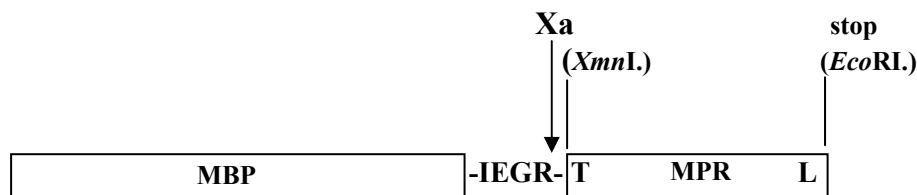
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

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

A pET vektorba klónozott, stabilizációs mutációkat tartalmazó (Q7K, L33I, L63I, C67A, C95A) HIV-1 proteinázt (HIVHXB2CG) *E. coli*-ban expresszálták és inklúziós testből tisztították (Louis és mtsai, 1999). A rekombináns enzim proteolitikus aktivitása nem különbözött a vad típusú, natív proteinázétól. Ezt a klónt használták templátként a mutáns proteinázokat kódoló, irányított mutagenézissel létrehozott konstrukciók előállításához. A mutációkat szekvenálással ellenőrizték. Az expresszált enzimeket a vad típusú proteinázra korábban kidolgozott eljárás alapján tisztították (Mahalingam és mtsai, 2001).

3.2. Az MuLV proteinázt kódoló pMalc2 konstrukciók előállítása

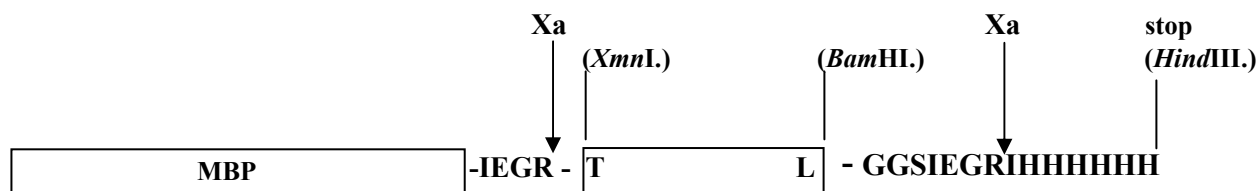
A proteinázt kódoló régiót a teljes hosszúságú MuLV cDNS-t tartalmazó klónból (Gorelik és mtsai, 1988) PCR reakcióban szaporítottuk fel, az 5' oldalon tompa véggel, a gag terminációs kód mutációját (TAG→CAG) tartalmazó primerrel (5'-ACCCTAGATGACCAGGGAGGT-3'), illetve a 3' végen egy stop kodont (TCA) és egy *EcoRI*. restrikciós hasítási helyet kódoló oligonukleotid felhasználásával (5'-CGCGAATCCTCACAACACTTGCAGGG-3'). A PCR terméket a megfelelő restrikciós emésztést követően *XmnI*/*EcoRI*. enzimekkel hasított és calf intestinal phosphatase (CIP) enzimmel defoszforilált pMalc2 plazmidba ligáltuk, és a restrikciós analízissel valamint szekvenálással ellenőrzött konstrukciót (pMBP-MPR, 7. ábra) DH5α illetve BL21 sejtekbe transzformáltuk.



7. ábra

Az MBP-MPR szerkezetének sematikus ábrázolása

A C-terminális His₆ farokkal fúziós formát expresszáló vektort (pMBP-MPR-H₆) a fenti konstrukció stop kodonjának mutációjával és egy Xa faktor hasítási helyet illetve hat hisztidint kódoló oligonukleotid párnak (5'-GATCCATCGAGGGGCGGATTCACCACCACCACCACTGA-3' illetve 5'-AGCTTTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGAATCCGCCCTCGATG-3', aláhúzással jelölve a kódoló szekvenciárészt) a *Bam*HI./*Hind*III. enzimekkel megemésztett, mutáns pMBP-MPR plazmidba történő ligálásával állítottuk elő (8. ábra).



8. ábra
Az MBP-MPR-H₆ szerkezetének sematikus ábrázolása

A fenti stop kodon mutációt illetve az aktív centrum mutáns konstrukcióhoz szükséges D32A mutációt Quick Change mutagenézis protokoll (Stratagen) segítségével alakítottuk ki, és mindegyik konstrukciónkat szekvenálással ellenőriztük (ABI-Prism BigDye terminator cycle sequencing kit (Pelkin-Elmer) használatával, Applied Biosystems Model 373A szekvenáló készüléken).

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

A pMBP-MPR konstrukcióval transzformált DH5 α és BL21 sejteket 100 μ g/ml ampicillin (pRIL plazmidal történő kotranszfekció esetében ezenfelül 30 μ g/ml chloramphenicol) jelenlétében, LB médiumban növesztettük, majd OD₆₀₀ (600 nm-en mért optikai denzitás) = 0.7-1 közötti értéknél 1 mM IPTG-vel indukáltuk. Két órás expressziót követően a sejteket centrifugáltuk (4000 g, 15 perc, 4 °C), és bakteriális proteázinhibitor-koktélt tartalmazó lízis pufferben (50 mM Tris-HCl pH 7.2, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA) szuszpendáltuk. A sejteket szonikálással tártuk fel, majd a szuszpenzió centrifugálása (10000g, 20 perc, 4 °C) során a felülszóba került fúziós fehérjét amilóz oszlopon történő affinitás kromatográfiával választottuk el a bakteriális fehérjéktől. Az oszlopra kötődött fehérjét 20 mM maltózt tartalmazó lízis pufferrel eluáltuk, ezt követően az MuLV proteinázt 10 μ g/ml Xa faktorról, 2 órás szobahőmérsékleten végzett hasítással szabadítottuk fel a fúziós formából. A processzált proteinázt 5 mM DTT tartalmú, 6-os pH-jú lízis pufferrel ekvilibrált kationcserélő oszlopon (High-S, BioRad) választottuk el a maltózkötő fehérjétől, ennek során a proteináz a kis mennyiségben visszamaradó fúziós formával együtt eluálódott. Teljesen tiszta enzimhez egy második amilóz affinitás kromatográfia átfolyó frakcióinak koncentráálásával jutottunk, ezzel egyidejűleg puffercserét is végrehajtottunk PL pufferre (20 mM Pipes, pH 7.0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 10% glicerol, 5% etilén glikol, 0.5% Nonidet P-40 és 10 mM DTT), centricon YM-10 (Millipore) ultraszűrő egység felhasználásával.

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

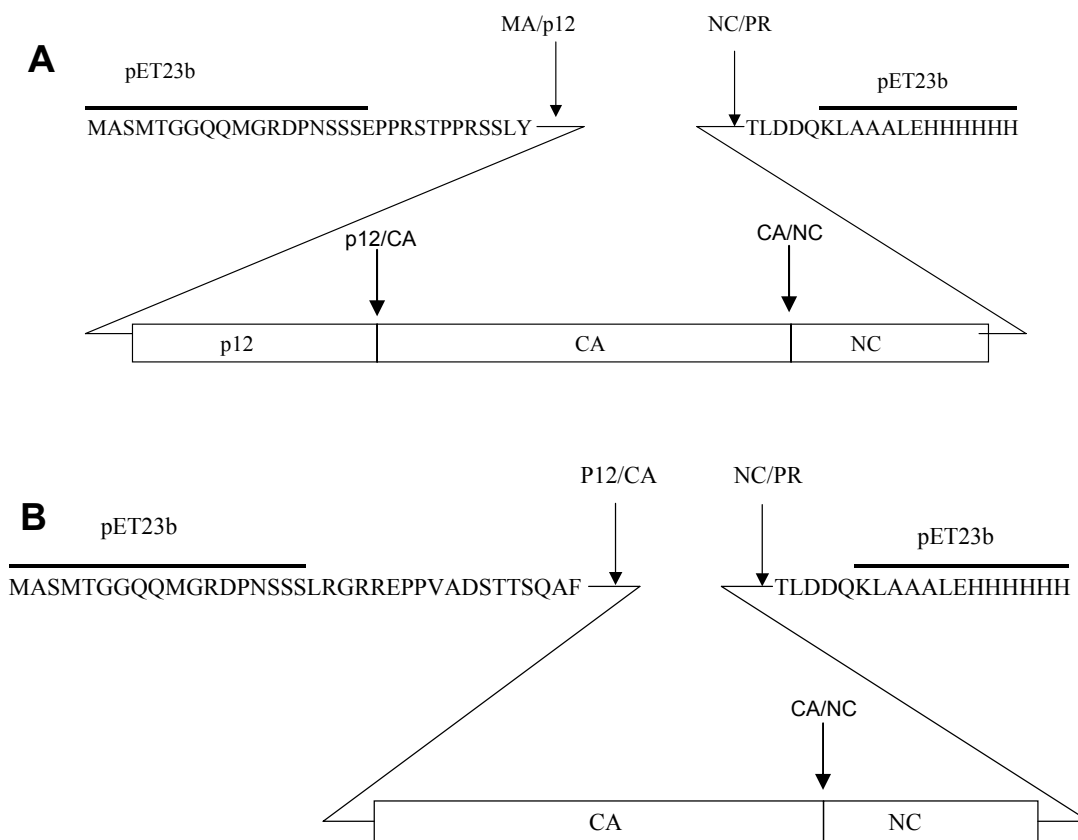
történt. A baktériumszuszpenzió centrifugálása során a felülúszóba került fúziós fehérjét első lépésben 50 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 5 % glicerol, 1 % TritonX-100, 10 mM imidazol pH 7.2 összetételű pufferrel ekvibrált Ni-kelát oszlopon történő affinitás kromatográfiával tisztítottuk. A 250 mM imidazolt tartalmazó ekvibráló pufferrel eluált fúziós proteineket puffercserét követően (centricon YM-30) 50 mM Tris-HCl, pH 7.2, 100 mM NaCl összetételű pufferben processzáltuk (10 µg/ml Xa faktor, 2 óra, szobahőmérséklet), majd az MBP-eredetű fehérjefragmensek egy részét 1.5 M ammónium szulfáttal történő kisózás útján távolítottuk el. A kisózás során oldatban maradó proteinázt puffercsere után (centricon YM-10) 50 mM Tris-HCl, pH 6.0, 1 mM EDTA, 5 mM DTT összetételű pufferrel végzett katiocserélő kromatográfiával tisztítottunk tovább (Mono-S oszlop, Amersham-Pharmacia). A 0.5 M NaCl-t tartalmazó ekvibráló pufferrel történő elúció során nyert teljesen tiszta és aktív proteináz pufferét végül PL pufferre cseréltük (centricon YM-10).

3.4. Az MuLV proteináz izolálása vírusból

1 ml vírusszuszpenzióhoz 20 térfogat hideg (-70 °C) acetont adtunk, és 30 percig jégen tartottuk. 20 perces centrifugálás (8000g, 4 °C) után a leülepedett pelletet kiszárítottuk, majd 2 ml extrakciós puffer (20 mM Tris pH 7.2, 5 mM DTT, 1 M NaCl) hozzáadásával oldottuk vissza, miközben gyakori rázogatós mellett 30 percig 4 °C-on inkubáltuk. Az extraktum centrifugálását követően (10 perc, 14000 rpm, 4 °C) a puffert centricon YM-10 felhasználásával PL pufferre cseréltük.

3.5. MuLV Gag fehérjefragmensek klónozása, tisztítása és proteolízise

A különböző hosszúságú MuLV Gag fragmenseket (GagΔ1 és GagΔ2) a teljes MuLV cDNS-t tartalmazó klónból (Gorelik és mtsai, 1988) PCR reakció segítségével szaporítottuk fel. Az 5' végi primerek *SacI*. restrikciós hasítási helyet, és a megfelelő genomi régiókkal hibridizáló szekvenciát tartalmazták (GagΔ1 esetén 5'-GCGCCGAGCTCAGAACCTCCTCGTTC-3', a GagΔ2 esetében 5'-GCGCCGAGCTCTCTACGTGGGAGACG-3', aláhúzással jelölve a *SacI*. restrikciós helyet), a 3' végen pedig egységesen a *gag* terminációs kód környéki régióval hibridizáló, de a stop kodon helyén a Gln tripletjét valamint egy *HindIII*. felismerési helyet is tartalmazó primert használtunk (GGCCAAGCTTCTGGTCATCTAGGGTCAGG, aláhúzással jelölve a *HindIII*. restrikciós helyet valamint a Stop→Gln cseréhez szükséges mutációt). A *SacI*. és *HindIII*. enzimekkel emésztett PCR fragmenseket az azonos enzimekkel meghasított és CIP kezeléssel defoszforilált pET23b vektorba (Novagen) ligáltuk (9. ábra).



9. ábra

A GagΔ1 (A) illetve GagΔ2 (B) proteinek szerkezetének sematikus ábrázolása
A megfelelő proteináz hasítási helyeket nyilakkal jelöltük.

A konstrukciókat restriktációs analízissel és DNS szekvenálással ellenőriztük, ABI-Prism BigDye terminator cycle sequencing kit (Pelkin-Elmer) használatával, Applied Biosystems Model 373A szekvenáló készüléken; majd BL21(DE3) sejtekbe transzformáltuk. A fehérjeexpressziót 1 mM IPTG hozzáadásával indukáltuk, és két óra eltelte után a centrifugálással összegyűjtött sejteket lizozimmal illetve szonikálással tártuk fel. Az expresszált fehérjéket Ni-kelát affinitás kromatográfiával majd azt követően 20 mM Na-foszfát pH 7.0, 150 mM NaCl és 5 mM β -merkaptotanol összetételű pufferrel ekvilibrált Superdex 75 oszlopon (Amersham-Pharmacia) történő géliszűrőssel tisztítottuk meg. A kitermelési százalék Bradford spektrofotometriás mérési módszer alapján 3.7 mg/l kultúrának adódott a GagΔ1, és 9.2 mg/l kultúrának a GagΔ2 fehérje esetén. A proteolitikus emésztést 250 mM Na-foszfát, pH 5.6, 1 mM EDTA összetételű pufferben végeztük, mely 1 mM EDTA-t tartalmazott, 0.6 μ M GagΔ1 és 1.2 μ M GagΔ2 fehérjeszubsztráttal, 20 nM MuLV PR illetve 33 nM HIV-1 proteináz enzimek jelenlétében.

3.6. Oligopeptidok

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

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

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

3.7. *A retrovirális proteinázok enzimaktivitásának mérésére alkalmas eljárások*

3.7.1. *Spektroszkópiás módszer az MuLV proteináz pH függésének vizsgálatára*

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

3.7.2. *Fluoreszcens módszer az MuLV proteináz gátlhatóságának vizsgálatára*

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

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

A HPLC alapú proteináz mérést 5 μ l enzimnek 10 μ l 2x töménységű reakciópufferrel (0.5 M K-foszfát, pH 5.6, 10 % glicerol, 2 mM EDTA, 10 mM DTT, 4 M NaCl), illetve 5 μ l szubsztrátoldattal történő összekeverésével végeztük; a vad típusú és különböző mutáns HIV-1 proteinázok esetén 0.5-7 mM, MuLVPR esetében 0.01-1.32 mM szubsztrátkoncentráció tartományban, melyet a becsült K_M értékek alapján választottunk meg. Az enzimkoncentrációkat úgy állítottuk be, hogy a szubsztrát hidrolízise 20 % alatt maradjon. A 20 μ l-es reakcióelegyeket 37 °C-on 1 óráig inkubáltuk, majd a reakciókat 180 μ l 1 %-os trifluor-ecetsav (TFA) oldattal

állítottuk le, és Nova-Pak C₁₈-as reverz fázisú kromatográfiás oszlopra injektáltuk (3.3x150 mm, Waters Associates, Inc.) automata injektor (Hitachi) segítségével. A szubsztrát és termékcsúcsokat 0-100% lineáris víz-acetonitril gradienssel választottuk el egymástól, 0.1% TFA jelenlétében. Az elválasztást 206 nm-en követtük nyomon, a hidrolízis mértékét a kromatográfiás csúcsok integrálásával számítottuk. A csúcsok integrációs értékeinek megfelelő peptidmennyiség kiszámításához korábban meghatározott referencia értékeket használtunk. Ezen referenciaértékeket valamint a hasítási helyeket a csúcsoknak megfelelő frakciók aminosavanalízisével és szekvenálásával határozták meg. Ezek alapján a termékek azonosításához a retenciók időket vettük figyelembe.

A kinetikai állandók meghatározásához 6 különböző koncentrációt teszteltünk. A kinetikai paramétereket a reakciósebesség és szubsztrátkoncentráció adatok Michaelis-Menten egyenlethez történő illesztésével határoztuk meg, nemlineáris regressziós módszerrel, a Fig.P program (Fig.P Software Corp., Durham, NC) felhasználásával. A kinetikai állandók SD értékei 25 % alatt voltak. Azoknál a peptideknél viszont, melyeknél nem volt lehetőségünk a szubsztrátkoncentráció növelésére (a HIV-1p1/p6 hely mutáns változatainak, illetve az MuLV Gag hasítási helyek alacsony sókoncentráció mellett történő méréseinek esetében), a k_{cat}/K_M értékeket pszeudo-elsőrendű reakciókörülmények között, a görbe lineáris szakaszából állapítottuk meg. Azoknál a peptideknél (a mutáns HIV-1 NC/p1 szubsztrátok és az MuLV p12(E)/p2(E) peptid esetében), ahol a Michaelis-Menten görbe már igen kis szubsztrátkoncentrációnál a telítési szakaszba ért, illetve termékgtátlás lépett fel, a k_{cat}/K_M értékeket ismert specificitási állandóval rendelkező szubsztrátok jelenlétében, kompetíciós mérésekkel határoztuk meg (Fersht, 1985).

3.8. Aktív centrum titrálás a pontos enzimkoncentráció meghatározására

Az aktív centrum titrálást a vad típusú, a V82A, I84V, M46L és L90M mutáns HIV-1 proteinázok és az MuLV-PR esetén DMP 323, a V82S HIV-1 PR mutánsnál amprenavir jelenlétében végeztük, az előbbieken ismertetett, HPLC-n alapuló mérési módszerrel. Az inhibitor 0-10 μ M koncentrációtartományban, DMSO-s oldat formájában juttattuk a reakcióelegybe. A gátlási görbét három különböző szubsztrátkoncentrációnál vettük fel, az aktív enzimkoncentrációt DynaFit program segítségével határoztuk meg (Kuzmic és mtsai, 1996).

3.9. Molekuláris modellezés

A HIV-1 proteináz modellek egy nagy felbontású HIV-1 PR röntgenkristallográfiai szerkezetéből (Protein DataBank kód: 1FGC) homológ modellezéssel készültek, amely tartalmazott egy szubsztrátanalóg inhibitor is (Mahalingam és mti., 2001). A szerkezetek minimalizálása az AMMP program segítségével történt, korábban közölt eljárásnak megfelelően

(Weber és Harrison, 1996, 1999). A hidrofób kölcsönhatások elemzése az INTG (Torshin, 1999) programmal történt.

Az MuLV proteináz homológ modellje a Modeller3 program (Sali és Blundell, 1993) segítségével a HIV-1 proteináz kristályszerkezetén alapulva épült fel.

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

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

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

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

A vad típusú HIV-1 proteináznak a két vizsgált Gag hasítási hely eredeti szekvenciáira meghatározott specificitási állandója (k_{cat}/K_M) korábbi irodalmi adatoknak megfelelően (Ermolieff és mtsai, 1997; Wondrak és mtsai, 1993) alacsonyabbnak bizonyult a többi Gag és Gag-Pro-Pol hasítási helyre jellemző értékhez képest (1. táblázat).

hasítási hely	szubsztrát szekvencia	K_M (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M^a ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_{cat}/K_M^b ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)
NC/p1	ERQAN↓FLGKI	0.17	0.15	0.9	1.0
p1/p6	RPGNF↓LQSRP	1.20	0.98	0.8	0.8

1. táblázat

Az eredeti HIV-1 Gag NC/p1 és p1/p6 hasítási helyet reprezentáló peptidek processzálása a vad típusú HIV-1 proteinázzal

^aA specificitási állandókat külön K_M illetve k_{cat} értékekből számítottuk.

^bA specificitási állandók értéke NC/p1 szubsztrát estében kompetitív módszerrel, a p1/p6 szubsztrátnál pszeudo-elsőrendű reakciókörülmények között mérve.

A két Gag hasítási hely esetében szinte azonosnak adódó együttthatók különböző k_{cat} és K_M értékekből tevődnek össze: a k_{cat} illetve K_M egyaránt magasabb a p1/p6 szubsztrátnál, mint az NC/p1 helyet reprezentáló peptid esetében.

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

A két Gag hasítási hely különböző mutáns változataira vonatkozó kinetikai paraméterek klasszikus módon történő meghatározása (az adatoknak a Michaelis-Menten egyenlethez való nem-lineáris illesztésével) több esetben nem volt lehetséges. Az NC/p1 szubsztrátoknál ugyanis magasabb szubsztrátkoncentráció tartományban gyakran fellépett a termékgátlás, emiatt a rájuk vonatkozó specificitási állandó értékeket egységesen a HTLV CA/NC hasítási helyet reprezentáló szubsztrát P3 helyen Gly-t tartalmazó változatának (KTGVL↓VVQPK) jelenlétében, kompetitív módszerrel határoztuk meg. Több p1/p6 szubsztrát esetén viszont a megnövekedett K_M érték miatt csak pszeudo-elsőrendű reakciókörülmények között tudtuk elvégezni a méréseket, ezért ezeknél a szubsztrátoknál a specificitási állandók meghatározását - ugyancsak egységesen - lineáris illesztéssel végeztük. Az eredeti szubsztrátokkal elvégzett összehasonlító mérések alapján

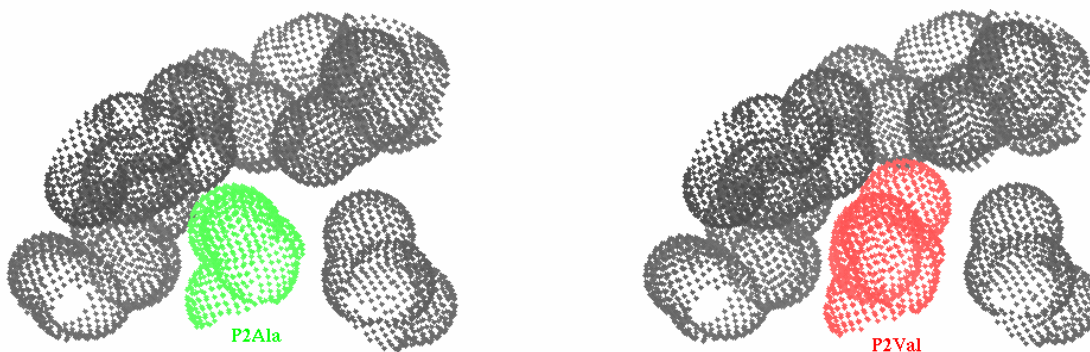
azonban megállapíthatjuk, hogy ez várhatóan nem okoz jelentősebb eltérést a specificitási állandó értékében (1. táblázat).

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

A vad típusú enzimnek a különböző NC/p1 hasítási hely mutánsokkal történő vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a természetes szekvencia-variabilitás nincs számottevő hatással a hely hidrolízisének hatékonyságára, szemben a P2 Ala→Val rezisztens mutációval, amely – kiváltképp ha a P3Arg természetes variációként megjelenő aminosavcserével párosul – jelentős mértékben megnöveli az NC/p1 szekvencia hasíthatóságát (2. táblázat, 27. oldal).

Molekuláris modellezés alapján ez úgy értelmezhető, hogy a P2Val nagyobb méretéből adódóan megnő a van der Waals kölcsönhatási felület, így tökéletesebbé válik a szubsztrát illeszkedése az enzim S2 zsebébe (10. ábra), és ezen a P3Arg által kialakított kedvező kölcsönhatások (az enzim Arg8, Glu21, Phe53, Pro81, Val82 és Asp29, valamint a szubsztrát P1Asn oldalláncával) tovább javítanak.

Ugyanezeknek a hasítási szekvenciáknak a mutáns enzimekkel történő vizsgálata során is hasonló tendencia volt megfigyelhető (2. táblázat, 27. oldal) azzal a különbséggel, hogy a V82 mutáns proteinázok esetében a szubsztrátszekvencia P2Val mutációja önmagában kedvezőbb hatással volt a hely hidrolízisére, mint a P3Arg cserével együttesen. Ez a P3Arg és az enzim 82-es valinja között kialakuló kedvező hidrofób kölcsönhatás hiányával magyarázható a hasonló pozícióban kis méretű Ala-t vagy Ser-t hordozó mutáns enzimek esetében.



10. ábra
A NC/p1 hasítási szekvenciában lévő P2Ala (vad típus) és P2Val (rezisztens aminosavcsere) illeszkedése a HIV-1 proteináz S2 zsebébe

A várakozásoknak megfelelően a V82S és a V82A aktív centrum mutánsok a vad típushoz képest csökkent, a másodlagos mutációt hordozó L90M pedig megemelkedett katalitikus hatékonyságot mutattak, ellentétben az I84V és M46L enzimekkel, melyek az általunk

szubsztrát szekvencia	vad típus k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)	M46L k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)	V82S k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)	V82A k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)	I84V k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)	L90M k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)
1. ERQAN-↓-FLGKI	1.0 (1.0)	0.3 (1.0)	0.4 (1.0)	0.7 (1.0)	1.6 (1.0)	2.5 (1.0)
2. EGQAN-↓-FLGKI	0.4 (0.4)	0.2 (0.8)	0.2 (0.5)	0.03 (0.04)	0.4 (0.3)	1.0 (0.4)
3. ERRAN-↓-FLGKI	1.7 (1.7)	0.6 (2.0)	0.3 (0.8)	0.5 (0.7)	3.2 (2.0)	4.2 (1.7)
4. ERQVN-↓-FLGKI	2.6 (2.6)	2.4 (8.0)	1.7 (4.3)	2.1 (3.0)	5.9 (3.7)	9.6 (3.8)
5. EGQVN-↓-FLGKI	0.8 (0.8)	0.7 (2.3)	0.4 (1.0)	0.7 (1.0)	2.8 (1.8)	4.1 (1.6)
6. ERRVN-↓-FLGKI	20.1 (20.1)	11.7 (39.0)	0.8 (2.0)	1.1 (0.9)	7.9 (4.9)	45.4 (18.2)
7. RPGNF-↓-LQSRP	0.8 (1.0)	0.6 (1.0)	1.2 (1.0)	1.2 (1.0)	1.2 (1.0)	2.1 (1.0)
8. RPGNY-↓-LQSRP	1.3 (1.6)	2.6 (4.3)	0.9 (0.8)	2.2 (1.8)	1.2 (0.9)	0.6 (1.0)
9. RPGNL-↓-LQSRP	0.01 (0.01)	0.05 (0.08)	0.03 (0.03)	0.09 (0.08)	<0.07 (<0.01)	0.07 (0.03)
10. RPGNF-↓-PQSRP	0.3 (0.4)	0.3 (0.5)	0.06 (0.05)	0.2 (0.2)	0.8 (0.7)	0.5 (0.2)
11. RPGNF-↓-VQSRP	0.8 (1.0)	0.5 (0.8)	0.7 (0.6)	1.2 (1.0)	1.2 (1.0)	2.1 (1.0)
12. RPBNF-↓-LQSRP	0.5 (0.6)	0.4 (0.7)	0.6 (0.5)	0.7 (0.6)	0.8 (0.7)	1.3 (0.6)
13. RQGNF-↓-LQSRP	0.3 (0.4)	0.05 (0.1)	0.3 (0.3)	0.4 (0.3)	0.4 (0.3)	0.4 (0.2)
14. RPGNF-↓-FQSRP	7.6 (9.5)	8.7 (14.5)	2.2 (1.8)	11.0 (9.2)	8.3 (6.9)	22.3 (10.6)

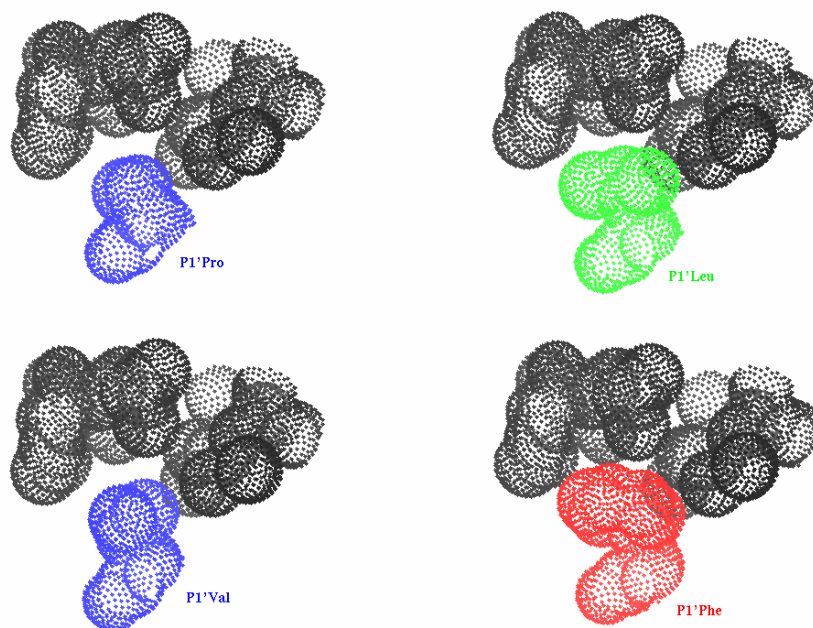
2. táblázat

A HIV-1 NC/p1 és p1/p6 hasítási szekvenciák eredeti és mutáns változatainak processzálása vad típusú illetve különböző mutáns proteináz formákkal. Zárójelben tüntettük fel a mutáns szekvenciák hasíthatóságának mértékét az eredetire meghatározott értékhez viszonyítva. Zöld színnel jelöltük a természetes variációkra vonatkozó adatokat, pirossal a gyógyszeres kezelés során kialakuló mutációkra mért értékeket, késsel pedig a drog-rezisztencia kialakulása folyamán és természetes szekvenciaváltozatként egyaránt megjelenő aminosavcserékre kapott eredményeket.

meghatározott értékek alapján nem az általánosan elfogadott eméletnek megfelelően viselkedtek. Az eltérés egyik lehetséges magyarázata az, hogy mi az eddigi irodalmi adatokkal ellentétben aktív centrum titrálással meghatározott enzimkoncentráció értékeket használtunk fel a specificitási állandók számításánál. Vizsgálataink alapján egyszeres mutációk is jelentősen befolyásolják a HIV-1 proteináz aktív formába történő feltekeredési képességét (foldingját).

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

Az adatbankba került HIV-1 izolátumok analízise alapján a p1/p6 hasítási helyre erős szekvencia-polimorfizmus jellemző, azonban ennek hatását a proteináz-hasítással szembeni érzékenységre vonatkozóan mindeddig még nem vizsgálták. A p1/p6 hely polimorf változatainak a vad típusú és mutáns enzimekkel történő hasíthatóságát tanulmányozva (2. táblázat, 27. oldal) azt tapasztaltuk, hogy ezek a természetes aminosavcserék nem befolyásolják számottevő mértékben az eredeti szekvencia hidrolízisének hatékonyságát. Kivételt képez ezalól a P1 aminosav leucinra történő cseréje, mely oly mértékben lerontja a hely hasíthatóságát, ami alapján felmerül a kérdés, hogy vajon a P1 Leu mutációt hordozó vírusokban megtörténik-e a p1/p6 hely processzálása illetve hogy ezek a vírusok egyáltalán replikációképesek-e. Megjegyzendő, hogy ennek a mutációnak az előfordulására vonatkozóan mindössze egyetlen szekvenciaadat található (C.BR92BR025), és az egy nem teljes hosszúságú klónból származik.



11. ábra

P1' szubsztitúció hatása a p1/p6 hasítási szekvenciának HIV-1 proteináz S1' zsebébe történő illeszkedésére

Az eredeti szekvenciában Leu található. A P1' Pro illetve Val természetes variációként fordul elő, a Phe gyógyszerrezisztencia során jelenik meg.

A természetes szekvencia-változatokkal ellentétben a rezisztens mutációként megjelenő P1'Phe csere esetében viszont azt tapasztaltuk, hogy a vad típusú és mutáns enzimekkel egyaránt jelentősen nő az eredeti p1/p6 hasítási hely hidrolízisének mértéke. Ez, hasonlóképpen mint az NC/p1 P2Val esetében, a mutáns aminosavoldallánc nagyobb méretéből adódik, amely így nagyobb hidrofób kölcsönhatási felület kialakítására képes az enzim S1' zsebét alkotó aminosavak oldalláncaival, ezáltal optimálisabbá válik a szubsztrát illeszkedése az enzim szubsztrátkötő helyébe (11. ábra). A van der Waals kölcsönhatások maximalizálása tehát meghatározó a hasítási hatékonyság szempontjából.

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

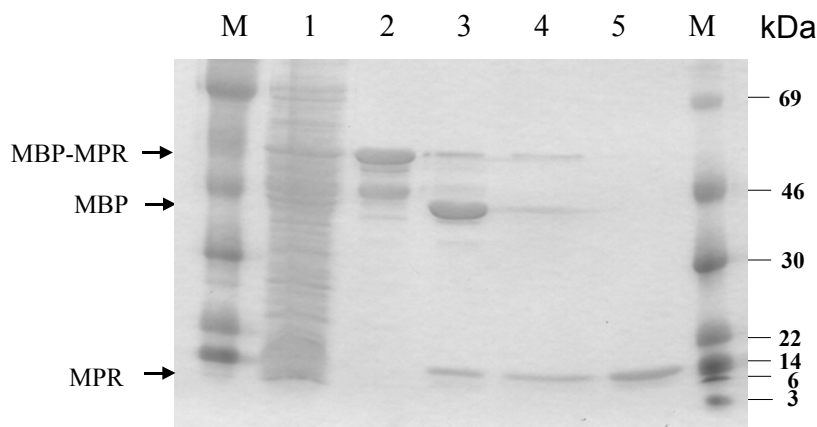
4.2. Az egér leukémia vírus (MuLV) proteináz klónozása, tisztítása és a vírusból származó enzimformával illetve HIV-1 proteinázzal történő összehasonlítása

4.2.1. Az MuLV proteináz klónozása és tisztítása

Az MuLV proteinázt kódoló cDNS szekvenciát pMalc2 plazmid *Xmn*I. és *Eco*RI. restrikciós helyei közé klónoztuk, majd a konstrunkciót (pMBP-MPR) BL21 sejtekbe transzformáltuk.

Ezt követően kidolgoztunk egy eljárást az enzim tisztítására, melynek első lépésében a maltózkötő fehérjével fúziós formában expresszálódó proteinázt amilóz oszlopon történő affinitás kromatográfiával választottuk el a bakteriális fehérjétől. Az oszlopról eluált, nem teljesen homogén fúziós proteinból (12. ábra, 2. minta) Xa faktor segítségével szabadítottuk fel a proteinázt, de a Xa hasítás optimalizálása során tapasztalt gyors MuLV PR inaktiváció miatt nem várhattuk meg a 100%-os processzálást, ezért mindig maradt néhány % processzálatlan fúziós forma a rendszerben (12. ábra, 3. minta). A Xa faktor által lehasított MBP-t a jelentős izoelektromospont-beli különbségből adódóan kationcserélő kromatográfiával, a visszamaradó fúziós proteint viszont csak egy második amilóz affinitás kromatográfiás lépéssel tudtuk eltávolítani a proteináz mellől (12. ábra).

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



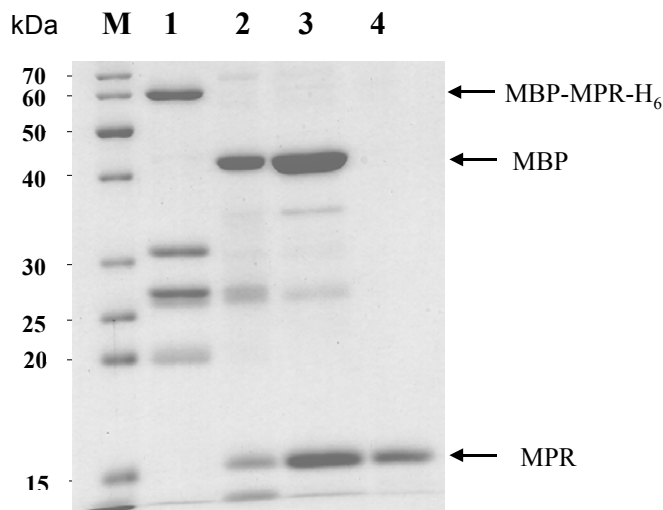
12. ábra

Az MuLV proteináz tisztulása a pMBP-MPR konstrukcióra épülő tisztítási eljárás során (M: marker 1. baktériumsejt lizátum 2. az első amilóz oszlop eluátuma 3. Xa hasított elegy 4. a kationcserélő oszlop eluátuma 5. a második amilóz oszlop eluátuma)

A kidolgozott tisztítási eljárás, bár teljesen homogén és aktív enzimet eredményezett, mégsem bizonyult megfelelő hatékonyságúnak. További kísérleteink során kiderült, hogy ez elsősorban az expresszálandó fúziós fehérje erőteljes degradációjának a következménye. A fúziós protein autokatalitikus aktivitásának kizárását követően az is bebizonyosodott, hogy ez a degradáció a baktériumsejten belül, már az expresszió ideje alatt megtörténik, ugyanis bakteriális proteázgátlók jelenlétében sem sikerült a tisztítást hatékonyabbá tennünk. Ezért a továbbiakban megpróbáltuk a konstrukciót különböző proteáz-deficiens baktériumtörzsekbe transzformálni (CAG 597, CAG 629), viszont az expresszió nem bizonyult hatékonynak ezekben a sejtekben. Nem hozta meg a várt eredményt a baktériumsejtekben ritkán előforduló tRNS-t kódoló pRIL plazmid alkalmazása sem.

Úgy döntöttünk, hogy a meglévő konstrukciónk módosításával, és egy arra épülő, újabb tisztítási stratégia kidolgozásával próbáljuk meg nagyobb mennyiségben előállítani az MuLV proteinázt. Mivel kísérleteink arra utaltak, hogy a fúziós protein elsősorban N-terminálisan degradálódik, ezért az eredeti pMBP-MPR plazmidből létrehoztunk egy olyan konstrukciót, melyből az MuLV proteináz mindkét oldalán fúziós, ún. „double-tagged” formában expresszálandó (8. ábra). Az egyik fúziós partner - hasonlóan az előzőhöz – az N-terminális MBP, a másik egy Xa hasítási helyet illetve hat hisztidint tartalmazó C-terminális farok. A konstrukció B121 sejtekben történő expresszálasát és az expresszált sejtek feltárását követően nikkel-kelát affinitás kromatográfiát végeztünk, melyben a termelődött fúziós protein N-terminálisan (MBP-ben) degradált, de C-terminálisan ép, teljes hosszúságú proteinázt tartalmazó formáit is ki tudtuk nyerni a baktérium-szuszpenzióból (13. ábra, 1. minta), melyeket az előző eljárás során már az első, amilóz affinitás kromatográfiás lépésben elveszítettünk. Az így elválasztott fúziós proteineket puffercsere után Xa faktorról processzáltuk (13. ábra, 2. minta), és

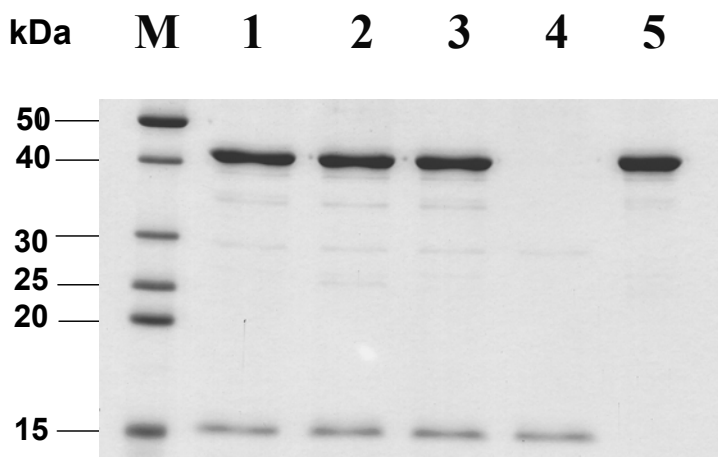
az MBP-eredetű szennyezés egy részét ammónium-szulfátos kisózással távolítottuk el. A kisózás során oldatban maradó enzimet (13. ábra, 3. minta) végül egy újabb puffercserét követően végzett katiocserélő kromatográfia révén sikerült teljesen tiszta állapotba hozni (13. ábra, 4. minta). Ezzel az eljárással az MuLV proteináz kitermelési hatékonyságát az előző módszerhez képest 3-4-szeresére növeltük.



13. ábra

Az MuLV proteináz tisztulása a pMBP-MPR-H₆ konstrukcióra épülő tisztítási eljárás során (M: marker 1. Ni-kelát oszlop eluátum 2. Xa hasított elegy 3. (NH₄)₂SO₄ –os kisózás utáni puffercserélt minta 4. puffercserélt katiocserélő oszlop eluátum)

A második tisztítási eljárás kidolgozásával párhuzamosan kísérleteket végeztünk a degradáció jelenségének tanulmányozására azért, hogy az így nyert információk birtokában elejét tudjuk venni a számunkra kedvezőtlen folyamatnak. A tisztított proteináz számára szubsztrátként biztosított MBP illetve MBP-MPR(D32A)-H₆ több órás inkubálás során sem hasítódott az aktív enzim által (14. ábra), ez alapján igazolva láttuk, hogy nem autokatalitikus degradáció történik.

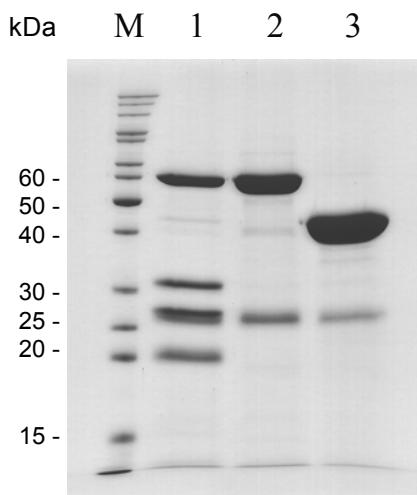


14. ábra

A maltóz kötő fehérje (MBP) tisztított MuLV proteináz (MPR) által történő hasíthatóságának vizsgálata

1. MBP+MPR (0 perc) 2. MBP+MPR (3 óra, 37°C) 3. MBP+MPR+DMP323 (3 óra, 37°C) 4. MPR (3 óra, 37°C) 5. MBP (3 óra, 37°C)

Ugyanakkor azonban a kontrollként előállított és alkalmazott aktív centrum mutáns pMBP-MPR-H₆ illetve üres pMBP-H₆ konstrukciónak a vad típussal azonos körülmények közötti expressziójakor csak igen kismértékű degradációt tapasztaltunk (15. ábra), ami arra utal, hogy az MuLV proteináz aktivitása mégis szerepet játszik a baktériumsejtekben lezajló proteolitikus folyamatban.



15. ábra

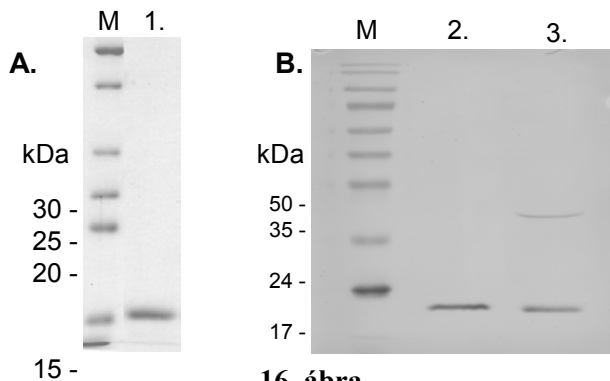
Az MuLV proteináz inaktiválásának hatása a fúziós fehérje degradációjára

M: marker 1. Ni-kelát oszlop eluátum MBP-MPR-H₆ esetében 2. Ni-kelát oszlop eluátum MBP-MPR(D32A)-H₆ esetében 3. Ni-kelát oszlop eluátum MBP-H₆ esetében

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

4.2.2.1. A rekombináns MuLV proteináz összehasonlítása a vírusból izolált enzimmel

Általánosan elfogadott, hogy a baktériumsejtben termeltetett retrovirális proteinázok úgy viselkednek, mint a víruseredetű enzimek, ezt a feltételezést azonban kísérletileg általában nem igazolják. Ezért elhatároztuk, hogy természetes hasítási helyeket reprezentáló oligopeptid szubsztrátok felhasználásával összehasonlító méréseket végzünk a tisztított, rekombináns proteináz és a vírusból izolált enzimforma között. A 16. ábra a rekombináns proteináz elektroforetikus képét, illetve a két különböző forrásból származó proteináz immunoblot képét mutatja.



16. ábra

A rekombináns MuLV PR elektroforetikus, valamint a kétféle enzim immunoblot képe

A.: SDS PAGE, a tisztított rekombináns enzim Coomassie Brilliant Blue-val festve (1) B.: a tisztított rekombináns enzim (2) illetve a vírusból izolált MuLV proteináz (3) immunoblot ábrája (M) marker

Az 3. táblázat a különböző eredetű enzimek MuLV NC/CA, PR/RT, p15(E)/p2(E) valamint a HIV-1 RT/IN hasítási szekvenciákra meghatározott specificitási állandóit foglalja össze. A pontos enzimkoncentrációt mindkét enzimpreparátum esetében aktív centrum titrálással határoztuk meg. A kinetikai paraméterek értékei alapján megállapítható, hogy a két különböző eredetű enzim valóban hasonlóképpen viselkedik.

hasítási hely	szubsztrát szekvencia	enzim	K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (mM ⁻¹ s ⁻¹)
MLV CA/NC	MSKLL↓ATVVS	r	0.052 ± 0.05	0.29 ± 0.01	5.6 ± 0.6
		v	0.045 ± 0.01	0.27 ± 0.01	6.0 ± 1.4
MLV PR/RT	PLQVL↓TLNIERR ^a	r	< 0.01	N.D.	15.0 ± 3.3
		v	< 0.01	N.D.	18.4 ± 1.3
MLV p12E/p2E	VQAL↓VLTQ	r	0.036 ± 0.008	0.35 ± 0.01	9.7 ± 2.1
		v	0.040 ± 0.003	0.25 ± 0.01	6.3 ± 0.5
HIV-1 RT/IN	IRKIL↓FLDG	r	0.018 ± 0.003	0.44 ± 0.02	24.4 ± 5.3
		v	0.017 ± 0.002	0.50 ± 0.02	29.7 ± 4.3

3. táblázat

A rekombináns illetve a virális eredetű MuLV proteináz enzimek specificitásának összehasonlítása

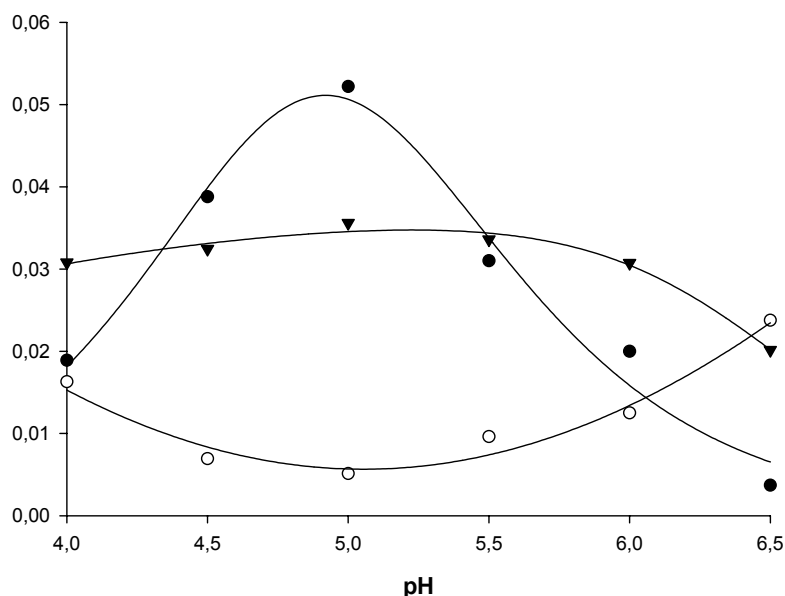
r: rekombináns MuLV PR v: aktív MuLV PR-t tartalmazó vírusextraktum Az aktív enzimkoncentrációt mindkét preparátum esetében DMP 323 inhibitorral végzett aktív centrum titrálással határoztuk meg.

^a a K_m érték alacsony volta miatt a specificitási állandót ennél a szubsztrátnál kompetitív mérés segítségével, az MuLV p12(E)/p2(E) szubsztrát felhasználásával határoztuk meg.

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

4.2.2.2.1. A kinetikai paraméterek pH függése

Mint azt korábban már kimutatták (Ido és mtsai, 1991; Hyland és mtsai, 1991), a HIV-1 proteináz specificitási állandója harang-görbe alakú pH függést mutat. Az MuLV proteináz kinetikai paramétereinek pH függési vizsgálata során ugyanazt, a P2' pozícióban glutamátot tartalmazó szubsztrátot felhasználva a HIV-1 PR-hoz képest (optimális pH=4.0) magasabb optimumértéket (pH=5.0) határoztunk meg. Ez azzal magyarázható, hogy a HIV-1 proteináz S2' kötőzsebének Asp 30' oldallánca és a szubsztrát P2' glutamátja között hidrogén-híd kialakításra van lehetőség (a Glu-nak vagy Asp-nak protonálódnia kell), MuLV-PR esetében viszont az Asp 30'-nak megfelelő His 37' erre nem képes, ezért a P2' glutamát jelenléte a hasítási szekvenciában kevésbé kedvező alacsonyabb pH értékeknél a HIV-1 proteinázhoz képest (Boross és mtsai, 1999). Az MuLV proteináz a pH optimumérték mellett mutatta a legmagasabb k_{cat} és legalacsonyabb K_M értéket (17. ábra).



17. ábra

Az MuLV proteináz kinetikai paramétereinek pH függése
 ●: k_{cat}/K_M ($\text{mM}^{-1} \times \text{s}^{-1}$), ○: K_M ($\text{mM} \times 10^{-1}$), ▼: k_{cat} ($\text{s}^{-1} \times 10^{-2}$)

4.2.2.2.2. Az MuLV és HIV-1 proteináz specificitásának összehasonlítása

A két enzim specificitását először különböző, MuLV és HIV-1 alapú természetes hasítási szekvenciákat reprezentáló oligopeptid szubsztrátok segítségével hasonlítottuk össze (4. táblázat, 35. oldal). A specificitási állandók értékei mindkét enzimnél hasonlóan mutatkoztak, de az MuLV proteináz esetében sokkal szűkebb tartományon belül vannak (MuLVPR: $1.7\text{--}15.0 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, HIV-1 PR: $0.02\text{--}202 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$). Ez a katalitikus tartomány lényegesen magasabb, mint az AMV által kódolt proteinázra vonatkozó tartomány (Tózsér és mtsai, 1996). Ez azzal magyarázható, hogy az AMV esetében a proteináz a vírus szerkezeti fehérjéivel ekvivalens mennyiségben szintetizálódik, szemben a stop kodon szuppresszióval illetve a leolvasásikeret-eltolódással átíródó MuLV és HIV-1 proteinázokkal, melyek a képződő Gag fehérjéknek mindössze 5-10%-át teszik ki, ezáltal szükségszerűen magasabb katalitikus aktivitással rendelkeznek.

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

A különböző eredetű virális hasítási helyek általában hatékonyabban processzálódnak a vírus saját enzime által, ezt mi is csak az MuLV p12/CA illetve HIV-1 p6-ban található hasítási

Vírus	hasítási hely	szubsztrát szekvencia	MuLV PR			HIV-1 PR		
			K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (mM ⁻¹ s ⁻¹)	K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (mM ⁻¹ s ⁻¹)
MLV	MA/p12	PRSSLY↓PALTP	0.26	0.53	2.02	0.29	0.20	0.69
	p12/CA	TSQAF↓PLRAG	0.22	0.38	1.74	0.19	1.61	8.70
	CA/NC	MSKLL↓ATVVS	0.05	0.29	5.80	nem hasadt ^a		
	NC/PR	TQTSL↓TLDDQ	0.05	0.12	2.40	nem hasadt ^a		
	PR/RT	PLQVL↓TLNIERR	<0.01	N.D.	15.0 ^b	nem hasadt ^a		
	RT/IN	TSTLL↓IENSS	0.03	0.17	5.67	nem hasadt ^a		
	p12E/p2E	VQAL↓VLTQ	0.04	0.35	9.72	0.07	0.06	0.85 ^c
HIV-1	MA/CA	VSQNY↓PIVQ	0.75	0.36	0.48	0.15	6.8	45.3 ^d
	CA/p2	KARVL↓AEAMS	1.02	0.56	0.55	0.01	0.9	90.0 ^d
	p2/NC	TATIM↓MQRGN	N.D.	N.D.	2.46 ^e	0.05	3.7	74.0 ^d
	NC/p1	ERQAN↓FLGKI	alacsony hidrolízis			0.17	0.15	1.0
	p1/p6	RPGNF↓LQSRP	nem hasadt ^a			1.20	0.98	0.8 ^d
	in p6	DKELY↓PLTSL	0.09	0.29	3.35	0.47	0.01	0.02 ^d
	TF/PR	VSFNF↓PQITL	0.03	0.01	0.33	<0.01	0.06	6.9 ^d
	PR/RT	CTLNF↓PISP	0.17	0.01	0.06	0.07	1.5	24.1 ^d
	RT/IN	IRKIL↓FLDG	0.018	0.44	24.4	0.006	1.2	202.0 ^d

4. táblázat

Az MuLV és HIV-1 proteinázok specificitásának összehasonlítása természetes hasítási helyeket reprezentáló oligopeptid szubsztrátokkal

^a 1 μM HIV-1 PR illetve MuLV PR jelenlétében inkubálva (1 óra, 37 °C) nem tapasztaltunk hasítást.

^b Ezt az értéket MLV p12E/p2E szubsztrát jelenlétében, kompetitív méréssel határoztuk meg.

^c Az MuLV proteinázzal ellentétben a HIV-1 PR Ala és Leu között hasította ezt a szubsztrátot.

^d korábbi adat (Tözsér és mtsai, 1991b)

^e Ezt az értéket HIV-1 MA/CA szubsztrát felhasználásával, kompetitív módszerrel határoztuk meg.

helyei esetében tapasztaltuk másképp. Érdekes ugyanakkor, hogy az MuLV p12(E)/p2(E) szekvenciáját a HIV-1 proteináz egy aminosav résszel eltolódott helyen (Ala-Leu között a Leu-Val helyett) hasította, hasonló jelenségre elég ritkán akad példa a retrovirális proteinázok képviselőinek körében. Sejtkultúrák kísérletekben is megfigyelték az MuLV burokfehérje HIV-1 proteináz által történő processzáldását (Kiernan és mtsai, 1998), de a hasítási helyet nem határozták meg. Az *in vivo* adatok alapján a hasítás egy aminosavval történő feltételezett eltolódása nem okozott funkcionális defektust.

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

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

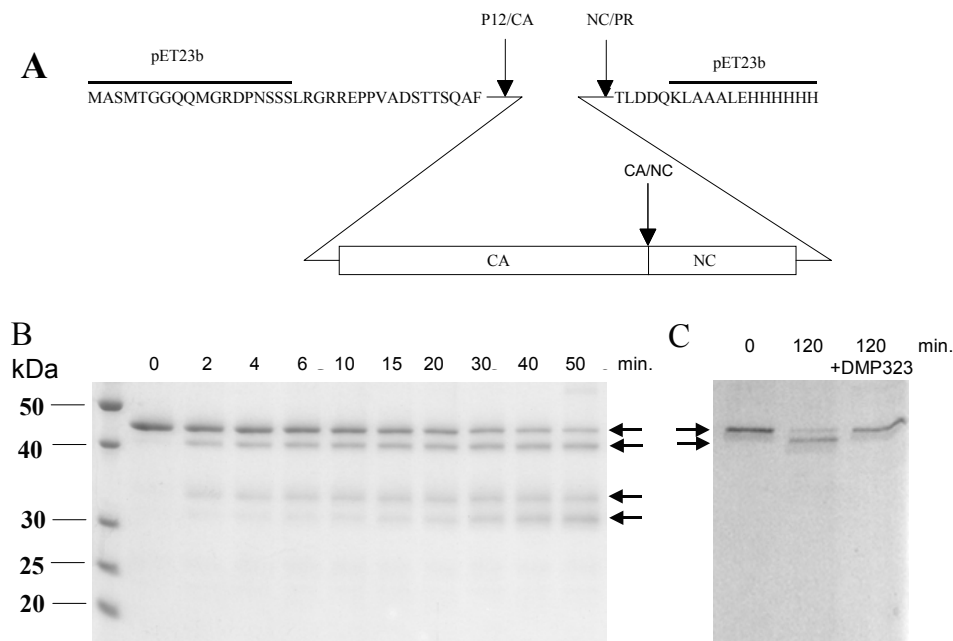
A három illetve négy MuLV Gag hasítási helyet tartalmazó fehérjeszubsztrát processzáldását alacsony ionerősség mellett végeztük, ezért - viszonyítási alapként - a megfelelő hasítási helyeket reprezentáló oligopeptidekre vonatkozó specificitási együtthatók értékét ilyen körülmények között is meghatároztuk (5. táblázat).

hasítási hely	szubsztrát szekvencia	alacsony ionerősség	magas ionerősség
		k_{cat}/K_m ($mM^{-1}s^{-1}$)	k_{cat}/K_m ($mM^{-1}s^{-1}$)
MA/p12	PRSSLY↓PALTP	0.57	2.02
p12/CA	TSQAF↓PLRAG	0.14	1.74
CA/NC	MSKLL↓ATVVS	1.63	5.80
NC/PR	TQTSL↓TLDDQ	0.38	2.40

5.táblázat
Gag hasítási helyek alacsony és magas ionerősség mellett mért specificitási állandóinak összehasonlítása

Ezek az értékek hasonló tendenciát mutattak a magas ionerősségnél mért értékekkel, viszont azokhoz képest lényegesen alacsonyabbnak adódtak. Meghatározásuk a K_M alacsony sókoncentrációnál jellemzően magasabb értéke miatt csak pszeudoelsőrendű reakciókörülmények között, a sebességértékek lineáris illesztésével volt lehetséges. A fehérjeszubsztrátok processzáldásának kinetikai vizsgálatát az 18/B és 19/B ábrarészek mutatják (37-38 oldal). Az MuLV proteinázzal végzett kísérletek alapján úgy tűnik, hogy a rövidebb (~42 kDa) Gag protein a p12/CA vagy a CA/NC helyek valamelyikénél hasad elsőként, 40 illetve 33 kDa nagyságú fehérjefragmenst eredményezve, a 30 kDa-os végső termék pedig az intermedierekben

megmaradó alternatív hely processzálása révén jelenik meg (18/B ábrarész). A megfelelő oligopeptid szubsztrátok esetében tapasztaltakkal ellentétben tehát (ami alapján a p12/CA hasítási szekvencia magas és alacsony ionerősség mellett egyaránt jelentősen kisebb hatékonysággal hasítódott) a p12/CA és CA/NC helyek hidrolízise fehérjeszinten hasonló hatékonyságúnak mutatkozik. Ez sztérikus okokkal magyarázható, a Gag fehérjék erős oligomerizációs hajlamából adódóan ugyanis a hasítási szekvenciák hozzáférhetősége eltérő lehet, és ez jelentősen befolyásolhatja a különböző helyek hasításának hatékonyságát.

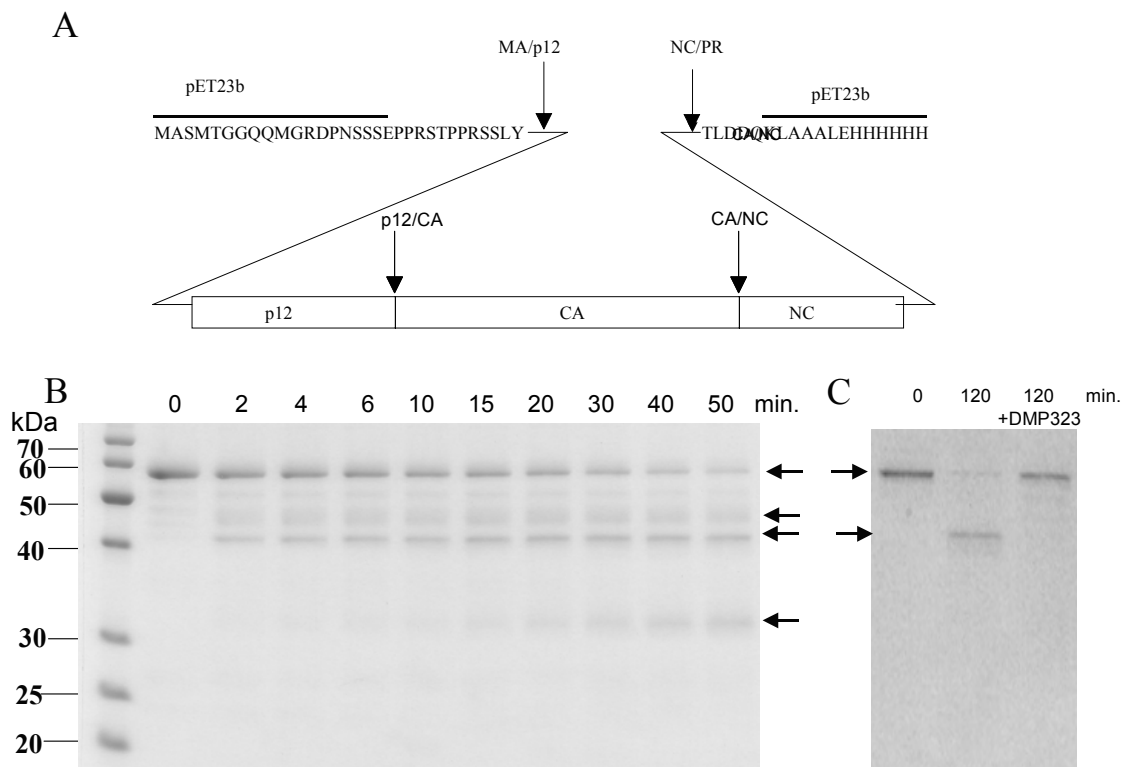


18. ábra

A GagΔ2 fehérje szerkezete (A) és MuLV proteináz által történő processzálásának időfüggése (B) illetve HIV-1 PR-al való hasítása (C)

A nagyobb Gag protein (~52 kDa) MuLV proteináz által történő processzálásának során azt tapasztaltuk, hogy szintén többféle intermedier jelenik meg, már viszonylag rövid idő elteltével (19/B ábrarész). Mindez az MuLV Gag hasítási helyek fehérjeszinten hasonló sebességgel bekövetkező processzálására utal, és összhangban van az MuLV proteináz specificitási állandó-értékeinek meglehetősen szűk tartományával.

Ezekről az eredményekről eltérően azonban a víruson belül egyértelműen a p12/CA hasítást írták le a leggyorsabbnak (Naso és mtsai, 1979; Campbell és mtsai, 2002). Mindez arra int, hogy óvatosnak kell lenni az oligopeptidok és rekombináns fehérjeszubsztrátok *in vitro* vizsgálata során kapott hasítási sorrendeknek a vírusban megvalósuló sorrendiségre történő extrapolálásával.



19. ábra
A GagA1 fehérje szerkezete **(A)** MuLV proteináz által történő processzálásának időfüggése **(B)** illetve HIV-1 PR-al való hasítása **(C)**

Az MuLV Gag fehérjék HIV-1 proteináz szubsztrátként való tesztelése során viszont – jó összhangban a megfelelő oligopeptid szubsztrátoknál kapott eredményekkel – a CA/NC és NC/PR helyek hasításának hiányából adódóan csak a 40 kDa nagyságú CA-NC-C-terminális fehérje fragmens jelent meg (18/C és 19/C ábra). Ez egyéb irodalmi adatokkal egybehangzóan (Bu és mtsai, 1989) a két enzim specificitása közötti lényeges különbséget tükrözi.

4.2.2.2.4. Az MuLV proteináz inhibitor-profilozása

Az MuLV proteináznak az AIDS terápiában alkalmazott és egyéb proteináz-inhibitorokkal szembeni érzékenységét az MuLV p12/CA hasítási hely fluoreszcens szubsztrátanalógiájának felhasználásával vizsgáltuk, eredményeinket a 6. táblázat foglalja össze. A fluoreszcens mérés alacsony ionerősségű reakciókörülményei között az amprenavir bizonyult az enzim leghatékonyabb gátlószerének ($K_i=20$ nM). A DMP323 is jó inibitornak mutatkozott. Ezt az egyéb kísérleteinkhez szükséges aktív enzimkoncentráció meghatározásához a nagy ionerősség mellett végzett HPLC alapú mérésekben aktív centrum titráló szerként is tudtuk alkalmazni ($K_i=0.8$ nM). Az MuLV proteináz általánosan kisebb érzékenységet mutatott az AIDS terápiában alkalmazott inhibitorokkal szemben mint a HIV-1 proteináz, melynek működését a vizsgált inhibitorok 1 nM-nál alacsonyabb K_i értékkel gátolták (Bagossi és mtsai, nem közölt eredmény).

	Inhibitor^a	MuLV PR K_i (μM)
1.	Saquinavir ^a	28
2.	Ritonavir ^a	0.41
3.	Nelfinavir ^a	2.0
4.	Amprenavir ^a	0.02
5.	Indinavir ^a	0.21
6.	DMP-323 ^a	0.14
7.	KH-164	1.9

6. táblázat

Az MuLV proteináz érzékenysége a HIV-1 ellen kifejlesztett gátlószerekkel valamint a KH-164 inhibitorral szemben

^aEzek az inhibitorok a HIV-1 proteinázt K_i < 1 nM értékkel gátolták a hasonló mérések során. (Bagossi és mtsai, nem publikált adatok).

Meglepő, hogy a korábbi mérések során a leghatékonyabbnak bizonyult KH-164 (Menendez és mtsai, 1993) az általunk vizsgált gátlószerek közül az egyik leggyengébbnek adódott. A HIV-1 PR ellen kifejlesztett inhibitorok tehát jó hatékonysággal gátolhatják egyéb retrovírusok proteolitikus enzimeit is.

Érdekes, hogy esetünkben az MuLV proteináz indinavirral is viszonylag jól gátolhatónak tűnt, pedig *in vitro* sejtkultúrás kísérletekben alkalmazva a vírus ellen, megfelelő RT inhibitorok hiányában hatástalannak ítélték (Powell és mtsai, 1999).

5. ÖSSZEFOGLALÁS

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

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

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

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

A gyakorlati jelentősége ellenére (génterápiás felhasználás, HIV-1 proteináz elleni gyógyszerfejlesztés) is csak kevésbé ismert MuLV proteinázzal kapcsolatos vizsgálatainkhoz sikerült pMalc2 rendszerben klónoznunk és expresszálnunk a fehérjét. Kidolgoztunk egy három lépésből álló eljárást az enzim tisztítására, melynek alacsony hatékonyságán az eredeti konstrukció módosításával és egy újabb tisztítási stratégia kifejlesztésével tudtunk javítani. Az ennek kapcsán végzett kísérleteink által lehetőségünk nyílt a baktériumsejtben történő expresszió során bekövetkező fehérjedegradációs jelenség tanulmányozására is.

A tisztított rekombináns enzimet a víusból izolált formával összehasonlítva a két enzim viselkedése hasonlóan bizonyult. A rekombináns MuLV-PR működésének a HIV-1 proteinázzal történő részletes összehasonlító vizsgálata során több szinten is rámutattunk azok eltérő sajátságaira. Spektroszkópiás mérés alkalmazásával a két enzim eltérő pH függését tapasztaltuk. A specificitásbeli különbségeket a megfelelő virális hasítási helyeket reprezentáló oligopeptid szubsztrátok mellett különböző hosszúságú MuLV Gag fehérjék szubsztrátként történő

alkalmazása során is megfigyeltük. Ezek alapján az MuLV proteináz szélesebb szubsztrátspecifitású viszont szűkebb katalitikus tartománnyal jellemezhető enzimnek bizonyult a HIV-1 proteinázhoz képest. Eredményeink értékelése kapcsán rámutattunk az oligopeptid, fehérje és sejtszintű kísérletekben tapasztalható különbségekre is. Végezetül egy gátlási profilozásra kifejlesztett fluoreszcens módszer segítségével összehasonlítottuk a két enzim klinikai használatba került és más PR inhibitorokkal való gátolhatóságát is, melynek kapcsán az MuLV proteináz HIV-1 PR-hoz képest alacsonyabb érzékenységet figyelhettük meg az AIDS terápiában alkalmazott inhibitorokkal szemben.

6. IRODALOMJEGYZÉK

- Bally, F., Martinez, R., Peters, S., Sudre, P. & Telenti, A. (2000) Polymorphism of HIV type 1 gag p7/p1 and p1/p6 cleavage sites: clinical significance and implications for resistance to protease inhibitors. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **16**, 1209-1213.
- Barrie, K.A., Perez, E.E., Lamers, S.L., Farmerie, W.G., Dunn, B.M., Sleasman, J.W. & Goodenow, M.M. (1996) Natural variation in HIV-1 protease, Gag p7 and p6, and protease cleavage sites within Gag/Pol polyproteins: amino acid substitutions in the absence of protease inhibitors in mothers and children infected by human immunodeficiency virus type 1. *Virology* **219**, 407-416.
- 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.
- Bu, M., Oroszlan, S. and Luftig, R.B. (1989). Inhibition of bacterially expressed HIV protease activity determined by an in vitro cleavage assay with MuLV Pr65^{gag}. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **5**, 259-268.
- Campbell, S., Oshima, M., Mirro, J., Nagashima, K. and Rein, A. (2002). Reversal by dithiothreitol treatment of the block in murine leukemia virus maturation induced by disulfide cross-linking. *J. Virol.* **76**, 10050-10055.
- Carr, A. (2000) HIV protease inhibitor-related lipodystrophy syndrome. *Clin Infect Dis.* **2**, 135-42.
- 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.
- Crawford, S. and Goff, S.P. (1985). A deletion mutation in the 5' part of the pol gene of Moloney murine leukemia virus blocks proteolytic processing of the gag and pol polyproteins. *J. Virol.* **53**, 899-907.
- Davies, D.R. (1990) The structure and function of the aspartic proteinases. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **19**, 189-215.
- De Clercq, E. (2002). New anti-HIV agents and targets. *Med. Res. Rev.* **22**, 531-565.
- Doyon, L., Croteau, G., Thibeault, D. Poulin, F., Pilote, L. & Lamarre, D. (1996) Second locus involved in human immunodeficiency virus type 1 resistance to protease inhibitors. *J. Virol.* **70**, 3763-3769.
- Dunn, B.M., Gustchina, A., Wlodawer, A. & Kay, J. (1994) Subsite preferences of retroviral proteinases. *Methods Enzymol.* **241**, 254-278.
- Ermolieff, J., Lin, X. & Tang, J. (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.
- Fenyofalvi, G., Bagossi, P., Copeland, T.D., Oroszlan, S., Boross, P., Tözsér, J. (1999) Expression and characterization of human foamy virus proteinase. *FEBS Lett.* **462**, 397-401.
- Fersht, A. (1985) in *Enzyme Structure and Mechanism* pp. 111-112.
- Gallo, R.C. and Montagnier, L. (1988) AIDS in 1988. *Sci.Am.* **259**, 41-48.
- Gorelick, R.J., Henderson, L.E., Hanser, J.P. and Rain, A. (1988). Point mutants of Moloney murine leukemia virus that fail to package viral RNA: evidence for specific RNA recognition by a "zinc finger-like" protein sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 8420-8424.
- Griffiths, J.T., Phylip, L.H., Konvalinka, J., Strop, P., Gustchina, A., Wlodawer, A., Davenport, R.J., Briggs, R., Dunn, B.M. and Kay, J. (1992) Different requirements for productive interaction between the active site of HIV-1 proteinase and substrates containing -hydrophobic*hydrophobic- or -aromatic*Pro- cleavage sites. *Biochemistry* **31**, 5193-5200.
- Ho, D. D., Neumann, A. U., Perelson, A. S., Chen, W., Leonard, J. M., and Markowitz, M. (1995) *Nature* **373**, 123-126

- 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 ^{18}O isotope exchange. *Biochemistry* **30**, 8441-8453.
- Ido, E., Han, H.P., Kezdy, F.J. and Tang, J. (1991). Kinetic studies of human immunodeficiency virus type 1 protease and its active-site hydrogen bond mutant A28S. *J. Biol. Chem.* **266**, 24359-24366.
- Jaskolski, M., Tomasselli, A.G., Sawyer, T.K., Staples, D.G., Heinrikson, R.L., Schneider, J., Kent, S.B.H. és 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.
- 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.
- Katoh, I., Yoshinaka, Y., Rein, A., Shibuya, M., Odaka, T. and Oroszlan, S. (1985). Murine leukemia virus maturation: Protease region required for conversion from “immature” to “mature” core form and for virus infectivity. *Virology* **145**, 280-292
- Kiernan, R.E. and Freed, E.O. (1998). Cleavage of the murine leukemia virus transmembrane env protein by human immunodeficiency virus type 1 protease: transdominant inhibition by matrix mutations. *J. Virol.* **72**, 9621-9627.
- 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.
- Kotler, M., Danho, W., Katz, R.A., Leis, J. és Skalka, A.M. (1989) Avian retroviral proteases and cellular aspartic proteases are distinguished by activities on peptide substrates. *J.Biol.Chem.* **264**, 3428-3435.
- Kuzmic, P. (1996) Program DINAFit for the analysis of enzyme kinetic data: Application to HIV proteinase. *Anal. Biochem.* **237**, 260-273.
- Leis, J., Baltimore, D., Bishop, J.M., Coffin, J., Fleissner, E., Goff, S.P., Oroszlan, S., Robinson, H., Skalka, A.M., Temin, H.M., Vogt, V. (1988) Standardized and simplified nomenclature for proteins common to all retroviruses. *J. Virol.* **62**, 1808 1809.
- 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.
- Maguire, M.F., MacManus, S., Griffin, P., Guinea, C., Harris, W., Richards, N., Wolfram, J., Tisdale, M., Snowden, W. & Kleim, J.P. (2001) Interaction of HIV-1 protease and gag gene mutations in response to amprenavir-selective pressure exerted in amprenavir-treated subjects - contribution of Gag p6 changes L449F and P453L. *Antivir. Ther.* **6** (Suppl. 1), 48.
- 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., Tözsér, J. & Oroszlan, S. (2004). Moloney murine leukemia virus retropepsin, in: Barrett, A.J. et al. (eds), *Handbook of Proteolytic Enzymes*, 2nd ed. *in press*.
- 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.
- Moloney JB. (1960) Biological studies on a lymphoid-leukemia virus extracted from sarcoma 37. I. Origin and introductory investigations. *J Natl Cancer Inst.* **24**, 933-51.
- Moyle G. (2002) Overcoming obstacles to the success of protease inhibitors in highly active antiretroviral therapy regimens. *AIDS Patient Care STDs.* **16**, 585-97.

- Naso, R.B., Karshin, W.L., Wu, Y.H. and Arlinghaus, R.B. (1979). Characterization of 40,000- and 25,000-dalton intermediate precursors to Rauscher murine leukemia virus gag gene products. *J. Virol.* **32**, 187-198.
- 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, Henderson LE, Stephenson JR, Copeland TD, Long CW, Ihle JN, Gilden RV. (1978) Amino- and carboxyl-terminal amino acid sequences of proteins coded by gag gene of murine leukemia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **75**, 1404-8.
- Oroszlan, S. és Tőzsér, J. (1990) The retroviral proteinases. *Seminars in Virology.* **1**, 369-378.
- 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.
- Powell, S.K., Artlip, M., Kaloss, M., Brazinski, S., Lyons, R., McGarrity, G.J. and Otto, E. (1999). Efficacy of antiretroviral agents against murine replication-competent retrovirus infection in human cells. *J. Virol.* **73**, 8813-8816.
- Regenmortel, M., Fauquet, C., Dave Bishop, Carsten, E., Estes, M., Lemon, S., Maniloff, J., Mayo, M., McGeoch, D., Pringle, C., Wickner, R. (2000) Seven Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses
- Rein A, Mirro J, Haynes JG, Ernst SM, Nagashima K. (1994) Function of the cytoplasmic domain of a retroviral transmembrane protein: p15E-p2E cleavage activates the membrane fusion capability of the murine leukemia virus Env protein. *J Virol.* **68**, 1773-81.
- Ridky T, Leis J. (1995) Development of drug resistance to HIV-1 protease inhibitors. *J Biol Chem.* **270**, 29621-3.
- 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.
- Robinson, L.H., Myers, R.E., Snowden, B.W., Tisdale, M. & Blair, E.D. (2000) HIV type 1 protease cleavage site mutations and viral fitness: implications for drug susceptibility phenotyping assays. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **16**, 1149-1156.
- Sali A, Blundell TL. (1993) Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol.* **234**, 779-815.
- Schock, H.B., Garsky, V.M. & Kuo, L.C. (1996) Mutational anatomy of an HIV-1 protease variant conferring cross-resistance to protease inhibitors in clinical trials. Compensatory modulations of binding and activity. *J. Biol. Chem.* **271**, 31957-31963.
- Schultz A, Rein A. (1985) Maturation of murine leukemia virus env proteins in the absence of other viral proteins. *Virology* **145**, 335-9.
- 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.
- 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.* **271**, 5458-5463.
- Temesgen Z. (2001) Current status of antiretroviral therapies. *Expert Opin Pharmacother.* **2**, 1239-46.
- Thomas, C.E., Ehrhardt, A. és Kay, M.A. (2003). Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat. Rev. Genet.* **4**, 346-358.
- 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.

- Torshin, I. (1999) Activating oligomerization as intermediate level of signal transduction: analysis of protein-protein contacts and active sites in several glycolytic enzymes. *Front Biosci.* **4**, D557-570.
- Tözsér, J., Gustchina, A., Weber, I.T., Blaha, I., Wondrak, E.M. and Oroszlan, S. (1991a) Studies on the role of the S4 substrate binding site of HIV proteinases. *FEBS Letters* **279**, 356-360.
- Tözsér, J., 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. (2001) HIV inhibitors: problems and reality. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **946**, 145-159.
- Tözsér, J., (2003). Stages of HIV replication and targets for therapeutic intervention. *Curr. Top. Med. Chem.* **3**, 1447-1457.
- Tözsér, J., Bagossi, P., Weber, I.T., Copeland, T.D. and Oroszlan, S. (1996). Comparative studies on the substrate specificity of avian myeloblastosis virus proteinase and lentiviral proteinases. *J. Biol. Chem.* **271**, 6781-6788.
- Tözsér, J., Bláha, I., Copeland, T.D., Wondrak, E.M., & Oroszlan, S. (1991b). Comparison of the HIV-1 and HIV-2 proteinases using oligopeptide substrates representing cleavage sites in Gag and Gag-Pol polyproteins. *FEBS Lett.* **281**, 77-80.
- Wang, C., A.F. Castro, A.F., Wilkes, D.M., Altenberg, G.A. 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** (1999) 77-81.
- 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. and Harrison, R.W. (1999) Molecular mechanics analysis of drug resistant mutants of HIV protease. *Protein Eng.* **12**, 469-474.
- Weber, I.T., Tözsér, J., Wu, J., Friedman, D. and Oroszlan, S. (1993) Molecular model of Equine infectious anemia virus proteinase and kinetic measurement for peptide substrates with single amino acid substitutions. *Biochemistry* **32**: 3354-3362.
- Wei, X., Ghosh, S. K., Taylor, M. E., Johnson, V. A., Emini, E. A., Deutsch, P., Lifson, J. D., Bonhoeffer, S., Nowak, M. A., Hann, B. H., Sagg, M. S., and Shaw, G. M. (1995) *Nature* **373**, 117-122
- Williams, J.W. és J.F. Morrison, (1979). The kinetics of reversible tight-binding inhibition. *Methods Enzymol.* **63**, 437-467.
- Wlodawer, A. and Erickson, J.W. (1993) Structure-based inhibitors of HIV-1 protease. *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 543-585.
- Wlodawer, A. és Gustchina, A. (2000) Structural and biochemical studies of retroviral proteases. *Biochim. Biophys. Acta.* **1477**, 16-34.
- Wondrak EM, Louis JM, Oroszlan S. (1991) The effect of salt on the Michaelis Menten constant of the HIV-1 protease correlates with the Hofmeister series. *FEBS Lett* **280**, 344-6.
- Wondrak, E.M., Louis, J.M, de Rocquigny, H., Chermann, J.C. & Roques, B.P. (1993) The gag precursor contains a specific HIV-1 protease cleavage site between the NC (P7) and P1 proteins. *FEBS Lett.* **333**, 21-24.
- Wondrak, E.M., Louis, J.M. (1996). Influence of flanking sequences on the dimer stability of human immunodeficiency virus type 1 protease. *Biochemistry* **35**, 12957-12962.
- 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.

Zhang, Y.M., Imamichi, H., Imamichi, T., Lane, H.C., Falloon, J., Vasudevachari, M.B. & Salzman, N.P. (1997) Drug resistance during indinavir therapy is caused by mutations in the protease gene and its Gag substrate cleavage sites. *J. Virol.* **71**, 6662-6670.

7. KÖZLEMÉNYLISTA

1. Az értekezéshez felhasznált közlemények

- Fehér, A., Weber, I.T., Bagossi, P., Boross, P., Mahalingam, B., Louis, J.M., Copeland, T.D., Torshin, I.Y., Harrison, R.W., Tozser, J. (2002) Effect of sequence polymorphism and drug resistance on two HIV-1 Gag processing site. *European Journal of Biochemistry*, 269, 1-7. IF 2.999
- Fehér, A., Boross, P., Sperka, T., Oroszlan, S., Tözsér, J. (2004) Expression of the murine leukemia virus protease in fusion with maltose binding protein in *Escherichia coli*. *Protein Exp. Purif.* (közlésre elfogadva) IF 1.375
- Fehér, A., Boross, P., Sperka, T., Miklóssy, G., Bagossi, P., Oroszlan, S., Weber, I.T., Tözsér, J., (2004) Characterization of the Murine Leukemia Virus Protease and its Comparison with the HIV-1 Protease. *Virology* (közlésre beküldve) IF 3.365

2. Az értekezéshez kapcsolódó posztterek

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

