

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

TDK DOLGOZAT

Humán T-nyiroksejtes limfóma vírus-3 enzim kinetikai vizsgálata

KASSAY NORBERT

II. évfolyam Biotechnológia M.Sc.

Témavezetők:
Matúz Krisztina
Prof. Dr. Tőzsér József

Debrecen, 2012.

Tartalomjegyzék

Rövidítések	3.
Bevezetés	5.
A retrovírus-család	5.
A retrovírusok életciklusa	6.
A deltaretrovírusok	7.
A HTLV-3	9.
A retrovirális proteázok	9.
Célkitűzés	13.
Anyagok és módszerek	14.
A fehérje expresszálása	14.
A sejtek feltárása	14.
A sejtlizátum tisztítása	15.
Kinetikai vizsgálatok	15.
Gátlásvizsgálatok	17.
Eredmények és értékelésük	18.
HTLV-3 PR expresszió, feltárás, tisztítás	18.
Kinetikai vizsgálatok	19.
Gátlásvizsgálat IB268 és IB269 inhibitorral	21.
Összefoglalás	23.
Felhasznált irodalom	24.
Köszönetnyilvánítás	29.

Rövidítések

AIDS	szerzett immunhiányos tünetegyüttes
ATLL	felelőtt T-sejtes limfóma
BLV	marha leukémia vírus
CA	kapszid fehérje
DMSO	dimetil-szulfoxid
DOC	deoxikólsav
DTT	ditiotritol
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
HAM	HTLV-1 asszociált mielopátia
HIV-1	humán immundeficiencia vírus 1
HPLC	magas nyomású folyadékkromatográfia
HTLV-1	humán T-limfotróp vírus 1
IN	integráz enzim
IPTG	izopropiltio-β-galaktozid
LB	Luria-Bertani tápoldat
LTR	hosszú terminális ismétlődés
MA	mátrix fehérje
MLV	egér leukémia vírus
NC	nukleokapszid fehérje
PAGE	poliakrilamid gélelektroforézis
PIC	preintegrációs komplex
PMSF	fenil-metil-szulfonil-fluorid
PR	proteáz enzim

RT	reverz transzkriptáz
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
STLV	majom T-sejtes leukémia vírus
SU	felületi fehérje
TFA	trifluorsav
TM	transzmembrán fehérje
TSP	trópusi spasztikus paraparesis

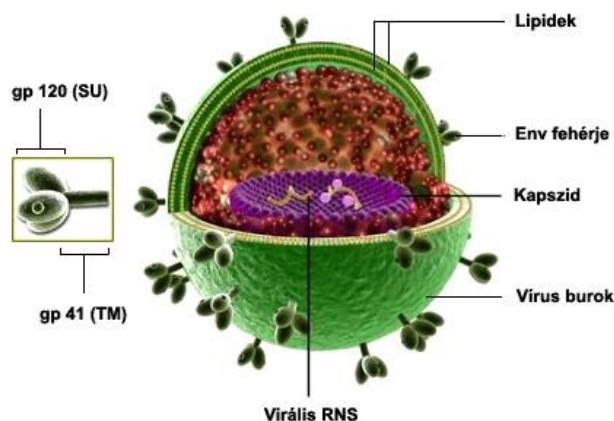
Bevezetés

A retrovírus család

A retrovírusokat Vilhelm Ellerman és Oluf Bang fedezte fel 1908-ban. Az első humán patogén retrovírus, a HTLV-1 (Humán T-Limfotróp Vírus 1) felfedezése 1980-ban történt (Poiesz és mtsai, 1980). A HTLV-1 fertőzés számos betegséget okozhat, pl. felnőtt T-sejtes leukémiát/limfómát (ATLL), trópusi spasztikus paraparesist/HTLV-1 asszociált mielopátiát (TSP/HAM) (Johnson és mtsai, 2001), a fertőzöttek számát 20 millióra becsülik (Verdonck és mtsai, 2007).

A HTLV-1 felfedezését a szerzett immunhiányos tünetegyüttest (AIDS-t) okozó vírus, a HIV-1 azonosítása követte 1983-ban (Barré-Sinoussi és mtsai, 1983; Gallo és mtsai, 1984; Levy és mtsai, 1984). A becslések szerint 2011-ben 34,2 millióra tehető a HIV-1 fertőzöttek száma és 2,5 millióan haltak meg valamilyen, az AIDS miatt kialakuló betegségben (UNAIDS, 2011).

A retrovírusok burokkal és diploid RNS örökítő anyaggal rendelkező vírusok. A retrovírus virionok átmérője 80-100 nm között változik, külső lipid burkukban virális glikoproteinek (Env) találhatók. A burokfehérjék három heterodimert tartalmaznak, melyek egy felszíni receptorkötő alegységből (SU) és egy ezzel nem-kovalens kölcsönhatásban lévő transzmembrán (TM) alegységből állnak (1. ábra). A belső protein mag, a mátrix (MA) és kapszid (CA) fehérjékből épül fel, alakja és elhelyezkedése a család különböző fajaiban eltérő. A magban található a nukleokapszid (NC) fehérjével asszociált virális genom, amely az életciklushoz nélkülözhetetlen 3 enzimet is kódolja: a proteázt (PR), a reverz transzkriptázt (RT) és az integrázt (IN) (Coffin, 1992, 1997).



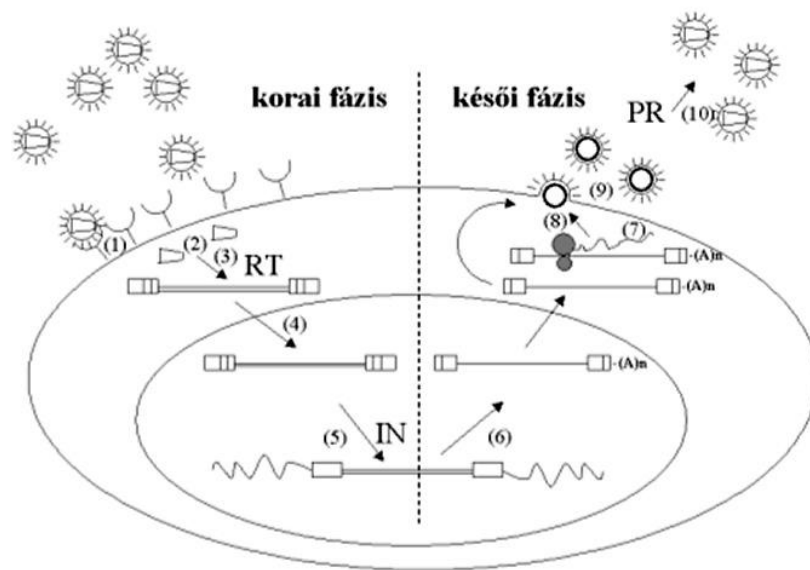
1. ábra: A HIV-1 virion szerkezete (<http://www.tibotec-hiv.com> alapján).

A virális genom szerveződése szerint megkülönböztetjük az egyszerű és az összetett retrovírusokat. A legegyszerűbb esetben, pl. az egér leukémia vírus (MLV) esetében, a retrovirális replikációhoz csupán három, a vírus által kódolt gén szükséges, (Varmus és Brown, 1989) a *gag*, mely a virion strukturális fehérjéit, a *pol*, mely a virális enzimeket és az *env*, mely a buroklefehérjét kódolja. Az integrálódott provírusban ez a három gén mindig ugyanabban a sorrendben található (5'-*gag-pol-env*-3') és mindkét végén a reverz transzkripció során keletkező, jellegzetes hosszúságú ismétlődő végszekvenciák (LTR, long terminal repeat) találhatók. Az LTR tartalmazza a retrovirális genom hatékony transzkripciójához szükséges promóter és enhanszer elemeket, valamint az mRNS 3'-végi poliadenilációjához szükséges szekvenciákat. Az egyszerű retrovírusok esetében az integrálódott províusról két különböző transzkriptum keletkezik, mégpedig a genomi RNS, ami mRNS-ként is szolgál a Gag és Pol szintéziséhez, illetve egy kisebb illesztett mRNS, ami az Env fehérjét kódolja. A virális génexpressziót *cisz*-aktiváló virális DNS vagy RNS szekvenciák és a gazdasejt által kódolt *transz*-aktiváló faktorok együttesen szabályozzák.

A retrovírusok életciklusa

A retrovírusok életciklusában két szakasz különíthető el, melyeket korai és késői fázisnak nevezünk (2. ábra). A korai fázis első lépéseként a vírus membrán fúzióval vagy receptor közvetített endocitózissal bejut a sejtbe. A reverz transzkripció a belépő kapszid struktúrában történik meg, melyben a pozitív szálú RNS-genom dupla szálú DNS-genommá íródik át. A genomi DNS-ből és a belépő kapszid néhány fehérje komponenséből preintegrációs komplex (PIC) jön létre, amely bejut a sejtmagba. A virális DNS a PIC nélkülözhetetlen részét képező IN segítségével beépül a gazdasejt genomjába. A késői fázis első lépése a virális DNS transzkripciója, mely a celluláris RNS-polimeráz II közvetítésével megy végbe. A keletkezett mRNS molekulák egy része módosíthatatlanul elhagyja a sejtmagot és a Gag, illetve Gag-Pro-Pol poliproteinek templátja lesz vagy a vírusburokba kerül és az utódvírusok genomjának templátjaként szolgál. Egy kisebb, illesztett mRNS-ről íródik át az *env*-kódolt fehérjék, melyek előbb glikozilálódnak, majd a plazmamembránba való transzport során egy felületi (SU) és egy transzmembrán (TM) fehérjére hasadnak egy celluláris proteáz hatására. Számos,

többszörösen illesztett mRNS szolgál a kiegészítő fehérjék, mint a Tat, Rev, Vif, Nef, Vpr szintézisének templátjaként. A Gag fehérjék a gazdasejt membránjának Env proteinekben koncentrált részein, a membrán belső felületén csoportosulnak, majd a fánk-alakú kapszid struktúrával rendelkező „éretlen” vírusrészecske a „lefűződés” (budding) révén kikerül a sejtből. A vírus a poliproteinek meghatározott helyeken elhasító proteáz aktiválódása után válik „éretté”, fertőzőképessé. Mivel csak az „érett” vírusrészecskék fertőzőképesek, a PR működése nélkülözhetetlen a vírus replikáció során (Tózsér, 2003).



2. ábra: A retrovírusok életciklusa (Tózsér, 2003 alapján).

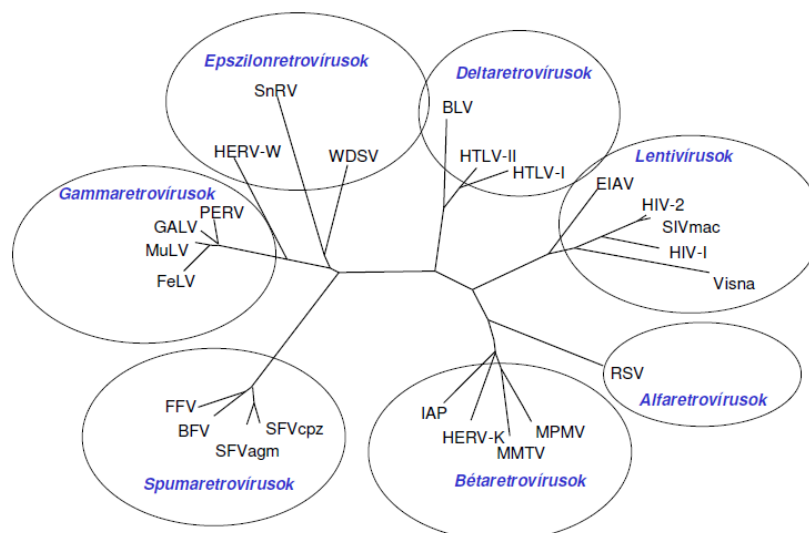
(1) Kötődés-penetráció. (2) A vírusburok elvesztése. (3) Provirális DNS-szintézis. (4) A preintegrációs komplex bejutása a magba. (5) Integráció. (6) Provírus expressziója. (7) Transzláció. (8) Virion összerendeződése. (9) Virion lefűződése. (10) A virion „érése” a PR segítségével.

A deltaretrovírusok

A Humán T-limfótróp vírus 1 és marha leukémia vírus (BLV), valamint a csoport harmadik tagja a majom T-sejtes leukémia vírus (STLV) egy külön csoportot alkot az onkogén hatású vírusok között, az úgynevezett HTLV-BLV csoportot. Tumort kiváltó hatásuk még nem teljesen ismert, valószínűleg többféle folyamat is közrejátszik benne (Cann és Chen, 1990, Haas és mtsai.,1992). A nemzetség az összetett retrovírusok közé tartozik, mivel az esszenciális összetevőkön kívül egyéb genomi részeket is tartalmaz. Ezek közé tartozik a pX régió, mely kiegészítő és szabályozó fehérjéket kódol. A Tax

fehérje aktiválja a virális transzkripciót a celluláris transzkripciós faktorok, kofaktorok aktivitásának megváltoztatásával. Képes aktiválni a CREB/ATF és az NF- κ B útvonalakat. Továbbá képes interferálni egyes celluláris gének transzkripciójával, ezzel elősegítve a patogenezist. A Rex fehérje is ebben a régióban kódolt, amely speciálisan kötődik a Rex válaszadó elemekhez (RxRE). Az RxRE minden, még a splicing folyamatán át nem esett, illetve egyes részlegesen splicingolt HTLV-1 transzkriptumban is megtalálható. Így elősegíti az mRNS-ek szállítását a nukleusból a citoplazmába, valamint megakadályozza a további splicingot és elősegíti a strukturális fehérjék megfelelő transzlációját. További fehérjék: a p12, p13 és p30 is átíródnak a régióról. A HTLV rendelkezik egy speciális fehérjével, HBZ-vel (HTLV-1 bázikus leucin cipzár faktor protein). A fehérje konstitutívan termelődik és negatívan szabályozza a vírus transzkripcióját, így lehetővé teszi az immunrendszer T-sejtjei számára a hatékonyabb immunválaszt. Leucin cipzár motívummal rendelkezik a C terminális doménen, így képes interakcióba lépni a CREB-2 fehérjékkel. A HTLV elsősorban az immunrendszer CD4⁺ T-sejtjeivel lép kapcsolatba, ennél fogva széles spektrumon képes betegségeket okozni.

A HTLV-2 vírust két évvel később fedezték fel. Az előző típustól eltérően a CD8⁺ T-limfocitákat fertőzi meg. Nem onkogén és kevésbé patogén tulajdonságú, mint az előző típus. Limfocitózist és neurológiai megbetegedéseket okozhat.



3. ábra. Retrovírusok csoportosítása és homológiája (készítette: Bagossi Péter)

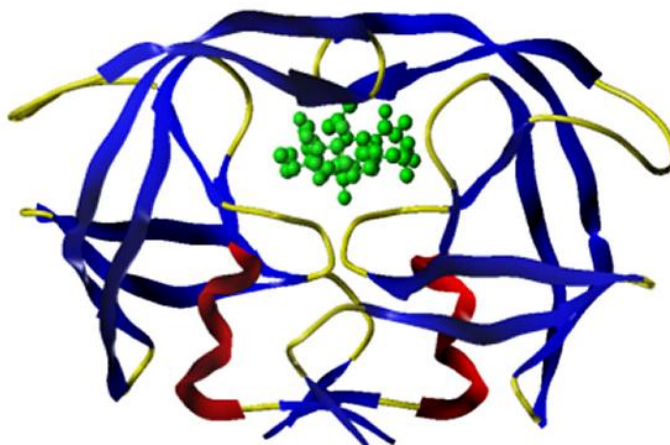
A HTLV-3

Kamerunban fedezte fel 2 kutatócsoport egymástól függetlenül (Calattini 2005; és Wolfe 2005). Később találtak egy harmadik vonalat is, melyben a pX proximális régióban 366 bp deléción van, de ez nem befolyásolta az Env, Tax és Rex fehérjék expresszióját. Genom összehasonlítások és filogenetikai analízisek kimutatták, hogy a HTLV-1 és HTLV-3 között nagyfokú szekvencia azonosság van (Calattini 2006; és Switzer 2006). A Tax fehérje szekvencia tekintetében 75-79% az azonosság, ennek ellenére funkcióját tekintve rendkívül hasonló, mivel a Tax3 is rendelkezik PDZ doménnel, ezért a HTLV-3 is okozhat limfoproliferatív megbetegedéseket (Chevalier és mtsai 2006). A legnagyobb különbség az *env* gén kódolt felszíni fehérjében (SU) található. Okozhat neurológiai megbetegedéseket, tumort, illetve immundeficienciát is. Eddig még nem mutatták ki, hogy együttműködne más HTLV vírusokkal, ellentétben az előző két típussal. Képes megfertőzni a CD4⁺ és CD8⁺ T-sejteket egyaránt (Jones és mtsai 2009). Rendelkezik egy csak rá jellemző fehérjével is, APH-3, amely a HBZ fehérjéhez hasonló funkcióval bír.

A retrovirális proteázok

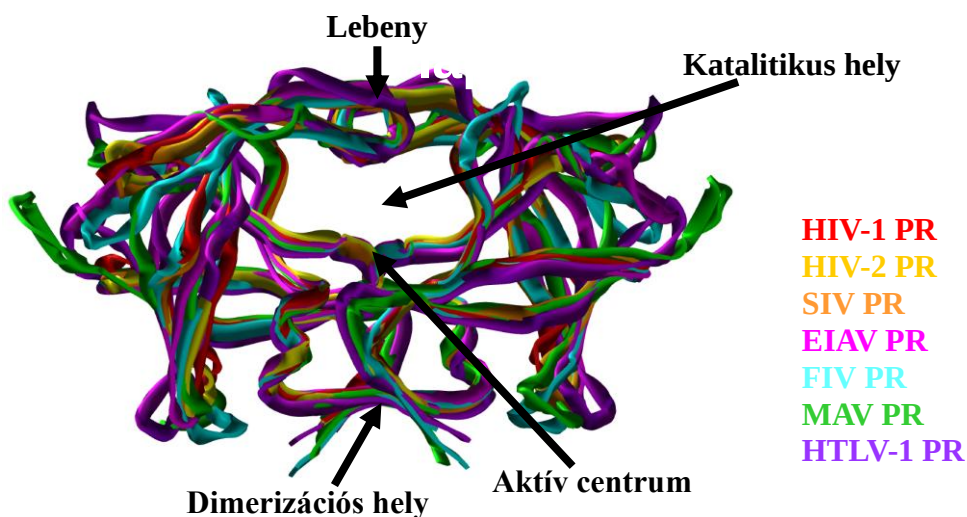
A retrovírusok életciklusában fontos szerepet tölt be a proteáz enzim, amely az érés során a megfertőzött sejt magjába beintegrálódott DNS szakaszról átíródó mRNS-ek által kódolt, a citoplazmában lévő riboszómákon keletkező poliproteineket hasítja megfelelő fragmensekre. Így megtörténhet a vírus összeszerelődése, érett vírus kialakulása. Ezért a proteáz az orvostudomány számára hatékony célpont lehet a vírus által okozott megbetegedések elleni küzdelemben.

A retrovirális proteázok 99-138 aminosavból álló, 11-15 kDa molekulatömegű fehérjék. Két egyforma alegységből felépülő, dimerként működő enzimek. A retrovirális proteázok első- és másodlagos szerkezete a celluláris aszpartil proteázok egyik doménjével analóg (Toh és mtsai, 1985), számos β -redőt és enzimtől függően egy vagy két rövid α -hélixet tartalmaznak. A két alegység N- és C-terminális láncai összefonódva alkotnak egy négyrétegű antiparallel β -redőt (4. ábra).



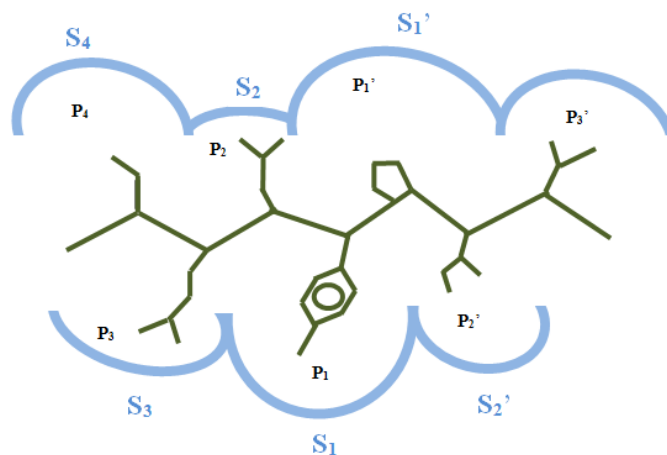
4. ábra: A HIV-1 proteáz kristályszerkezet alapján készült szalagmodellje. Piros szín jelöli az α -héliceket, kék a β -redőt, sárga a hurok régiókat. A bekötődött szubsztrátot zöld színnel, valamint gömb és pálcika ábrázolással mutatjuk be. (készítette: Bagossi Péter)

A retrovirális proteázokat három jellegzetes régióval jellemezhetjük: az aktív centrum, az ún. lebeny és a C-terminális közelében elhelyezkedő konzervált régió. Az aktív centrumot kódoló katalitikus triád (Asp-Thr/Ser-Gly) az N-terminális közelében helyezkedik el. Az alegységek katalitikus triádjai hurkot alkotnak. A flexibilis lebeny régió többé-kevésbé konzervatív (Miller és mtsai, 1989), mely a szubsztrát, illetve az inhibitor kötődésekor elmozdul és ráhajlik a ligandra, így stabilizálva a komplexet. A harmadik konzervált régió (Gly-Arg-Asp/Asn) a C-terminális közelében helyezkedik el és ion párok kialakításával a dimerizációban játszik fontos szerepet (5. ábra)

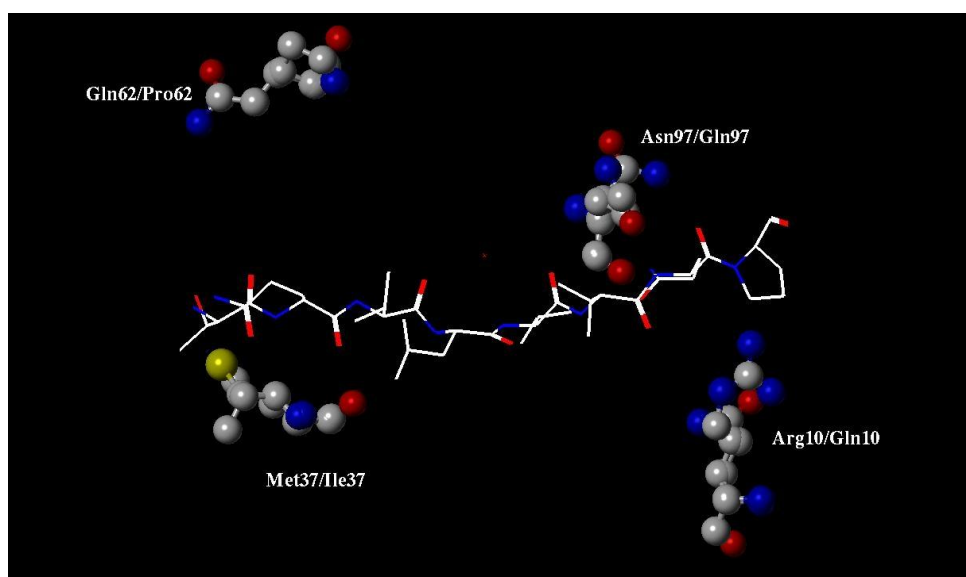


5. ábra: A retrovirális proteázok szalagmodellje. (készítette: Bagossi Péter)

A HTLV-3 proteáz szekvenciájának valamint a HTLV-1 illetve HTLV-2 proteáz szekvenciájának összehasonlítását mutatja a 6. ábra. A szubsztrátkötő zsebben az alábbi különbségek találhatók:



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



8. ábra: A HTLV-1 és HTLV-3 proteáz szubsztrátkötő zsebeit érintő aminosav különbség (készítette: Bagossi Péter).

Célkitűzés

Munkacsoportunk korábban vizsgálta a HTLV-1 proteáz kinetikai tulajdonságait valamint gátolhatóságát illetve az enzim szubsztrátspecifitását (Kádas és mtsai., 2004, 2008). Vizsgálataink középpontjában a még kevésbé tanulmányozott HTLV-3 proteáz áll.

Célunk, a munkacsoportunk által pET 11a expressziós vektorba klónozott, BL21(DE3) *E.coli* kompetens sejtbe transzformált HTLV-3 proteáz expressziójának, sejtfeltárásának, tisztításának optimalizálása, valamint az enzim kinetikai paramétereinek meghatározása volt.

A kinetikai vizsgálatok során az enzimvizsgálatokhoz szintetikus oligopeptid szubsztrátokat alkalmaztunk. HPLC módszerrel vizsgálni kívántuk az enzim K_m , Michaelis-Menten állandóját különböző HTLV-1 illetve HTLV-3 hasítási helyekkel analóg szekvenciájú szintetikus oligopeptid szubsztrátok alkalmazásával és a HTLV-1 kapszid/nukleokapszid hasítási hellyel rendelkező P3 pozíciójában módosított szubsztrátok esetén mérni kívántuk az enzim relatív aktivitását, az enzim S3 szubsztrátkötő alhelyének szubsztrát specifitását.

A HTLV-3 proteáz gátolhatóságát két HTLV hasítási helyet tartalmazó inhibitorral az IB268 és IB269-vel kívántuk tanulmányozni.

Anyagok és módszerek

A fehérje expresszálása

A BL21(DE3) kompetens sejtekbe transzformált HTLV-3 proteáz plazmidját az *E.coli* expressziós sejtekben termeltettük. A baktérium kultúrát 25 ml Luria-Bertani (LB) tápoldatban 25 µl ampicillin hozzáadásával, 37 °C-on 220 rpm mellett rázattuk (Gallenkamp Orbital Incubator) 16 órán át. Ezt követően a baktérium kultúrát 500 ml LB-be oltottuk át, amely 0,1 % ampicillint tartalmazott. A megfelelő optikai denzitás értékig (600 nm-en 0,8 A érték) növesztettük a baktériumkultúrát, majd a fehérje expresszálását 625 µl IPTG (izopropiltio-β-galaktozid) hozzáadásával indukáltuk és 3 órán keresztül inkubáltuk 37 °C-on, 220 rpm rázatást alkalmaztunk.

A sejtek feltárása

A folyamat első lépéseként az expressziós elegyet centrifugáltuk 5000 rpm-en 4 °C-on 20 perc alatt (Beckmann Avanti J-25). A sejteket deoxikólsav (DOC) – lizozimos módszerrel tártuk fel. A sejtlyázás során a lízis puffer 50 mM Tris, 1 mM DTT, 1 mM EDTA anyagokat tartalmazott 8,2 pH értéken, a sejteket 30 ml lízis pufferben vettük fel, majd 60 µl 100 mM PMSF-et (fenil-metil-szulfonil-fluorid) és 1mg lizozimot adtunk hozzá majd 15 percre jégen hagytuk. Ezt követően 25 mg DOC, majd később RNázmentes DNáz került hozzáadásra és 37 °C-on inkubáltuk a sejtlyázátumot, előbbi esetben 15 percig, a következő lépésben pedig 30 percig. Utána MgCl₂-ot adtunk az elegyhez, amivel szintén 37 °C-on inkubáltuk 20 percen keresztül. 12.000 rpm-en 4 °C –on 15 percig centrifugáltuk, majd mosó pufferbe szuszpendáltuk a pelletet: 50 mM Tris, 1mM DTT, 1mM EDTA, 1M Urea, 1% Triton X, pH 8,2. Ismét lecentrifugáltuk 12.000 rpm-en 4 °C –on 15 percig. Ezt követően a pelletet feltárási pufferben vettük fel, ami 50 mM Tris, 5 mM DTT, 5 mM EDTA, 7,5 M guanidin-hidrokloridot tartalmazott. Ezt követte egy újabb centrifugálás 12.000 rpm-en 4 °C –on 15 percig.

Szonikálás-lizozimos módszerrel is megkíséreltük a sejtek feltárását. Ennek első lépéseként szintén lecentrifugáltuk a lízis pufferben oldott elegyet 5000 rpm-en 4 °C-on 20 perc alatt. Majd 3x3 perc szonikálás következett, miközben a minta jégen volt. Ezt követően 12000 rpm-en 4 °C –on 20 percig centrifugáltuk. A keletkezett pelletet 30 ml mosó pufferbe oldottuk, majd megismételtük az előző centrifugálási lépést. A pelletet

feltárási pufferben oldottuk, majd szintén lecentrifugáltuk, és az így keletkezett felülúszóból végeztük a tisztítást.

A sejtlizátum tisztítása

A feltárási során keletkezett sejtlizátum fehérjéinek elválasztására reverz fázis alapú HPLC elválasztási módszert alkalmaztunk. A módszer során 2 ml mintát vittünk fel POROS 20 R2 oszlopra (PerSeptive Biosystems), valamint lineáris acetonitril (+0,05% TFA)- víz (0-100%) grádienszt alkalmaztunk 1ml/perc áramlási sebesség mellett. A detektálás 210, valamint 280 nm-en történt ÄKTA purifier (Amersam Pharmacia) készülék segítségével. A tisztítás során kapott frakciók tisztaságát SDS-PAGE módszer segítségével ellenőriztük 16 %-os akrilamid, bisz-akrilamid tartalmú gélen, a fehérjéket a gélen Comassie Blue festéssel tettünk láthatóvá.

A megfelelő frakciók kiválasztása után, a tiszta fehérjéket tartalmazó frakciókat 2 lépésben dializáltuk. A dialízis 1. puffer esetén 50 mM HCOOH; 5 mM DTT-t tartalmazott, 5 órán át 4°C-on végeztük a dialízist, majd 50 mM NaOAc, 100 mM NaCl, pH 5,0 oldatban 16 órán keresztül szintén 4°C-on, folyamatos kevertetés mellett 6000-8000 MW áteresztő képességű membrán (Spectra/Por Membrane) alkalmazásával. Mivel az enzim elveszítette aktivitását ilyen körülmények között, szükségessé vált egy másik puffer alkalmazása, mely összetétele: pH 7,0, 20 mM Pipes, 100mM NaCl, 10% glicerol, 0,5% Nonidet P-40 volt.

Kinetikai vizsgálatok:

Az enzim aktivitását HPLC módszerrel vizsgáltuk Waters (Nova Pak C18) oszlopon. 20 µl reakcióelegyet alkalmaztunk, amelyben PN4+DTT (0,275 M Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 0,2 M NaH₂PO₄, 2 M NaCl, 5% glicerol, 5 mM DTT, pH 5,6) puffert használtunk (10 µl). Szubsztrátként a HTLV-1, és HTLV-3 proteáz természetes hasítóhelyeit tartalmazó szintetikus oligopeptidet használtuk (5 µl), valamint az enzim dializált preparátumait (5 µl). Az alkalmazott szintetikus oligopeptid szubsztrátokat és hasítási hely szekvenciáikat a következő táblázatokban foglaltuk össze.

1. táblázat: HTLV-1 és HTLV-3 oligopeptid hasítási helyek és szekvenciáik

HTLV-1 MA↓CA	APQVL ↓ PVMHP
HTLV-1 CA↓NC	KTKVL ↓ VVQPK
HTLV-1 TF1↓PR	DPASIL ↓PVIP
HTLV-1 PR↓pX	KGPPVIL ↓ PIQAP
HTLV-3 MA↓CA	ASQCL ↓ PILHP
HTLV-3 CA↓NC	KNKIL ↓ MVGPK
HTLV-3 TF1↓PR	PRTIL ↓ PVIPL
HTLV-3 PR↓pX	PSKVL ↓ PVLAP

A reakcióelegyeket 1 óráig 37 °C-on inkubáltuk, 180 µl 1%-os TFA-oldattal leállítottuk és automata injektor segítségével Nova-Pak C₁₈ reverz fázisú kromatográfiás oszlopra (3,9 mm x 150 mm, Waters Associates Inc.) vittük fel. A szubsztrátot lineáris víz-acetonitril gradienssel (0-100%), 0,05% TFA jelenlétében választottuk el a termékektől és a puffer komponensektől. Az elválasztást 206 nm-en követtük és a hidrolízis mértékét a kromatográfiás görbe integrálásával számítottuk. Az enzimkoncentrációkat úgy állítottuk be, hogy a szubsztrátok hidrolízise 20% alatt maradjon. A kinetikai paramétereket a reakciósebesség és szubsztrát koncentráció adatok Michaelis-Menten egyenlethez illesztésével határoztuk meg, nemlineáris regressziós módszerrel, a Fig.P program (Fig.P Software Corp.) felhasználásával.

Vizsgálatokat a HTLV-1 CA↓NC, a HTLV-1 proteáz természetes szubsztrátja mellett a HTLV-1 CA↓NC P3 módosított oligopeptid szubsztrátokon (2. táblázat) is elvégeztük.

2. táblázat: HTLV-1 CA↓NC P3 módosított szubsztrátok

Szubsztrát kódja	Szubsztrát szekvenciája
Gly (SP4025)	KTGVL ↓ VVQPK
Ala (SP4011)	KTAVL ↓ VVQPK
Phe (SP4014)	KTFVL ↓ VVQPK
Val (SP4013)	KTVVL ↓ VVQPK

Leu (SP4012)	KTLVL ↓ VVQPK
Ser (SP4026)	KTSVL ↓ VVQPK
Asp (SP4027)	KTDVL ↓ VVQPK

Gátlásvizsgálatok

A HTLV-3 proteáz enzimet 20 mM Pipes, pH 7,0, 100 mM NaCl, 10% glicerol és 0,5% tartalmú pufferrel hígítottuk. Az MLV proteáz esetében leírtak szerint végeztük a HPLC analízist (Fehér és mtsai., 2006). A reakcióelegy 5 µl proteázt, 10 µl inkubációs puffert (0,275 M Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 0,2 M NaH₂PO₄, 2 M NaCl, 5% glicerol, 5 mM DTT, pH 5,6) és 5 µl szintetikus oligopeptid szubsztrátot tartalmazott. A gátlási kísérletek során 4,8 µl szubsztrát oldatot, 0,2 µl inhibitor (IB268 és IB269) dimetil-szulfoxiddal (DMSO) hígított oldatát alkalmaztuk, valamint kontrollként az inhibitor helyett DMSO raktunk az elegybe. A reakciókat rázatás alkalmazása mellett 37 °C-on inkubáltuk 1 órán keresztül, majd 180 µl 1 % trifluorecetsav (TFA) hozzáadásával állítottuk le. Az enzim koncentrációját úgy változtattuk, hogy a szubsztrát konverziója 20% alatt legyen. Az enzimreakció során képződött termékeket reverz fázisú kromatográfia segítségével választottuk el, a munkacsoport által korábban leírt eljárás alkalmazásával (Tózsér és mtsai 1991). A hasítási termékeket a retenciós idejük alapján azonosítottuk. A K_i értékeket az IC₅₀ (50%-os gátláshoz tartozó inhibitor koncentráció) értékek segítségével határoztuk meg, $K_i = (IC_{50} - [E]/2) / (1 + [S]/K_m)$ összefüggés alapján, ahol [E] és [S] a proteáz és szubsztrát koncentrációk (Maibaum és mtsai., 1988). A kinetikai paramétereket a reakciósebesség és szubsztrát koncentráció adatok Michaelis-Menten egyenlethez illesztésével, nemlineáris regressziós módszerrel, a SigmaPlot 8.0 program (SigmaPlot Software Corp.) segítségével határoztuk meg.

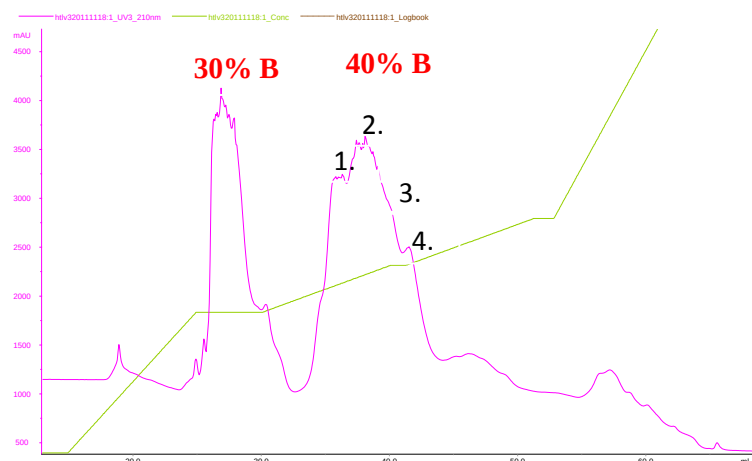
3. táblázat: HTLV-1 gátlása IB268 és IB269 inhibitorral (Sperka és mtsai., 2007)

<u>Inhibitor (szekvencia)</u>	<u>K_i (nM)</u>
IB269 (Ala-Pro-Gln-Val-Leu-r-Pro-Val-Met-His-Pro)	>465
IB268 (Lys-Thr-Lys-Val-Leu-r-Val-Val-Gln-Pro-Lys)	298

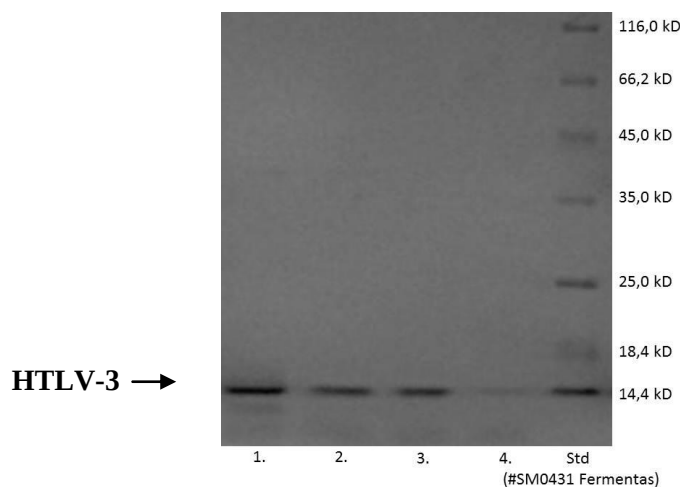
Eredmények és értékelésük

A HTLV-3 PR expresszió, feltárás, tisztítás

A kísérletek során beállítottuk a HTLV-3 proteáz expresszióját, feltárását és reverz fázisú kromatográfia alkalmazásával közel 90%-os tisztaságú enzimet állítottunk elő. A sejtfeltárás során a DOC- lizozimos feltárás bizonyult hatékonyabbnak, az enzim aktivitását megőrizte a feltárás során, míg a szonikálás illetve lizozimos feltárás során a fehérje elveszítette ezen képességét. A fehérje elválasztására a reverz fázisú kromatográfia alkalmasnak bizonyult. 40%-os acetonitril-víz grádiens alkalmazása mellett sikerült elválasztani a HTLV-3 proteázt, a tisztítás kromatogramját mutatja az 6. ábra. A fehérje tisztaságát SDS-PAGE segítségével vizsgáltuk (10. ábra).



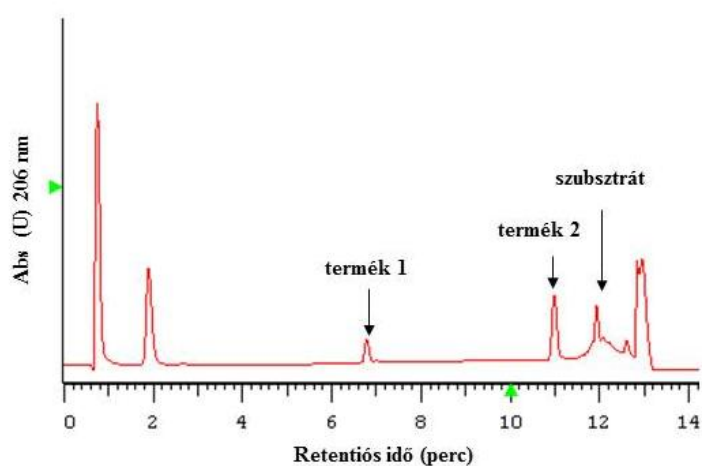
9. ábra: HTLV-3 proteáz reverz fázisú kromatográfiás elválasztása 0-100% acetonitril-víz grádiens alkalmazásával.



10. ábra: a HTLV-3 proteáz 16%-os SDS-PAGE gélképe a reverz fázisú HPLC tisztítás után.

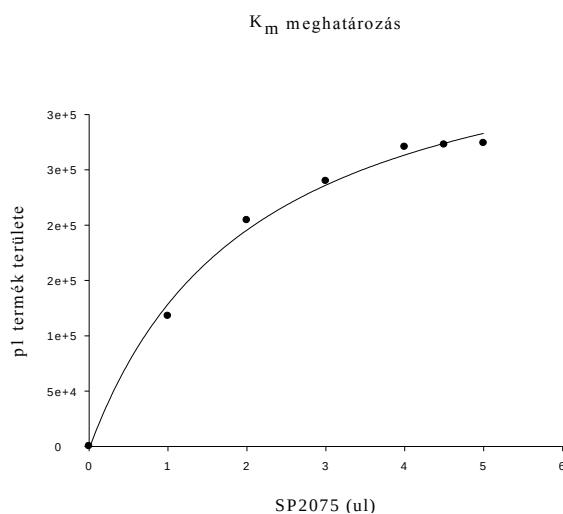
A kinetikai vizsgálatok

Az enzimaktivitási vizsgálatok során kiderült, hogy a tisztított, dializált enzim folyamatosan veszít aktivitásából, így szükséges volt egy másik dialízis puffer alkalmazása (pH 7.0, mM Pipes, 100mM NaCl, 10% glicerol, 0,5%% Nonidet P-40) mely során, ez a probléma már nem merült föl. Egy általános szintetikus oligopeptid szubsztrát hasítást mutat a 8. ábra.



11. ábra: szintetikus oligopeptid hasítás HPLC kromatogramja

Meghatároztuk a HTLV-1 proteáz hasítási helyekkel rendelkező szintetikus oligopeptid szubsztrátok K_M , Michaelis állandóját, az 50%-os enzim telítődéséhez szükséges szubsztrát koncentrációkat (12. ábra), ezeket összegeztük a 4. táblázatban.



12. ábra: K_m érték meghatározása HTLV-1 CA↓NC (SP 2075) szubsztrát esetén

4. táblázat: HTLV-1 PR hasítási helyű szintetikus oligopeptid szubsztrátok K_m adatai

Szubsztrát hasítási helye és kódja	Szubsztrát szekvenciája	K_m (nM)
HTLV-1 MA↓CA (SP 2079)	APQVL ↓ PVMHP	8,36±18,66%
HTLV-1 CA↓NC (SP 2075)	KTKVL ↓ VVQPK	1,06±16,00%
HTLV-1 PR↓pX (SP 998)	KGPPVIL ↓ PIQAP	4,55±13,07%

A HTLV-1 CA↓NC P3 helyen módosított oligopeptid szubsztrátok esetében mértük a relatív aktivitás értékeit, ha a P3 helyen alanin van (az eredeti lizin helyett) a relatív aktivitás értéke ilyenkor veszi fel a legnagyobb értéket, míg a valin csere esetén lecsökkent a hasítás, fenilalanin cserekor enzim nem hasította a szubsztrátot (5. táblázat). Munkacsoportunk korábban már vizsgálta ezeket a szubsztrátokat a HTLV-1 proteázzal (Tőzsér és mtsai, 2000). A kapott eredmények alapján látható, hogy a két enzim hasonló specifitású.

5. táblázat: HTLV-1 CA↓NC P3 helyen módosított szubsztrátok relatív aktivitás adatai

Szubsztrát kódja	Szubsztrát szekvenciája	Relatív aktivitás HTLV-3 PR	Relatív aktivitás HTLV-1 _(Tőzsér)
Gly (SP4025)	KTGVL ↓ VVQPK	0,08	0,12
Ala (SP4011)	KTAVL ↓ VVQPK	0,40	0,24
Phe (SP4014)	KTFVL ↓ VVQPK	nem volt hasítás	0,04

Val (SP4013)	KTVVL ↓ VVQPK	0,01	0,05
Leu (SP4012)	KTLVL ↓ VVQPK	0,02	0,05
Ser (SP4026)	KTSVL ↓ VVQPK	0,21	0,21
Asp (SP4027)	KTDVL ↓ VVQPK	0,50	0,23

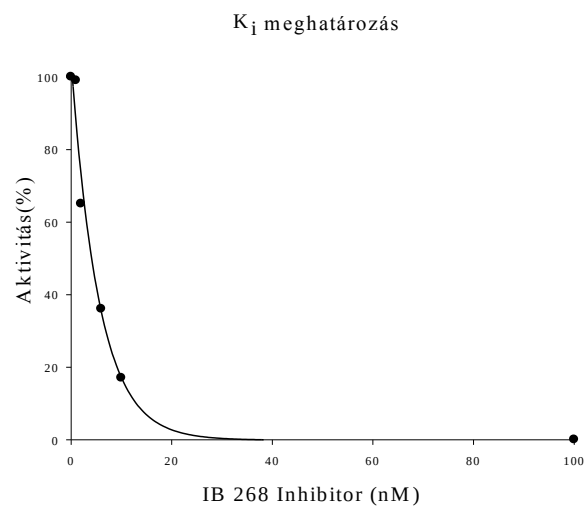
Meghatároztuk a természetes HTLV-3 szubsztrátokon az enzim Michaelis állandóját, ezt mutatja a 6. táblázat.

6. táblázat: HTLV-3 természetes szubsztrátok és a hozzájuk tartozó K_M , valamint V_{max} értékek

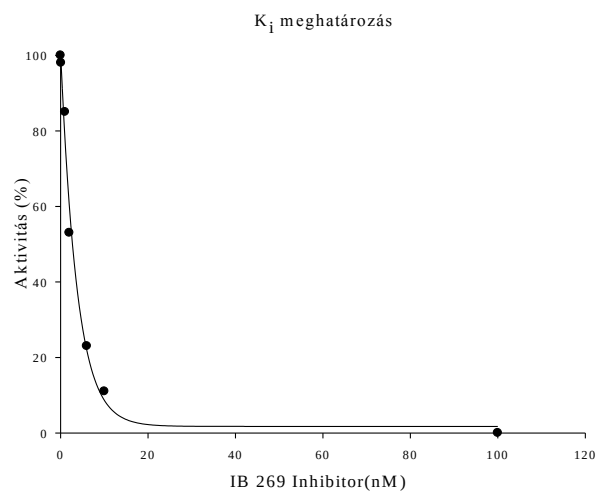
Szubsztrát	Szubsztrát szekvenciája	K_m (nM)
HTLV-3 MA/CA	ASQCL ↓ PILHP	14,08±4,82%
HTLV-3 TF1/PR	PRTLPL ↓ VIPL	22,16±6,60%
HTLV-3 PR/pX	PSKVL ↓ PVLAP	25,32±4,88%

Gátlásvizsgálat IB268 és IB269 inhibitorral

Vizsgáltuk a HTLV-3 gátlhatóságát két HTLV-1 inhibitorral az IB268-cal, és IB269-vel. Meghatároztuk azt az inhibitor koncentrációt (IC_{50}), amelynél az enzim aktivitása 50 %-ra csökken, IB268 (13. ábra) esetén 4,1 nM és IB269 (14. ábra) használatakor 2,5 nM volt ez az érték. Előbbi szekvenciája: KTKVL-r-VVQPK, az utóbbié: APQVL-r-PVMHP. Amelyekben az „r” jelöli a redukált peptid kötést.



13. ábra: HTLV-3 proteáz IC_{50} és K_i értékének meghatározása IB268 inhibitorral



14. ábra: HTLV-3 proteáz IC_{50} és K_i értékének meghatározása IB269 inhibitorral

Összefoglalás

Munkánk során sikerült a munkacsoportunk által pET 11a expressziós vektorba klónozott, BL21(DE3) *E.coli* kompetens sejtbe transzformált HTLV-3 proteáz expressziójának, sejtfeltárásának, tisztításának optimalizálása. A sejtek feltárása esetén a DOC-lizozimos módszer segítségével sikerült aktív formában feltárni a fehérjét, majd hatékonyan tisztítani reverz fázissal analóg kromatográfiás oszlopon.

HPLC módszerrel meghatároztuk az enzim K_m Michaelis-Menten állandóját különböző szintetikus oligopeptid szubsztrátok HTLV-1 MA↓CA, CA↓NC, TF1↓PR, PR↓Px, és HTLV-3 MA↓CA, CA↓NC, TF1↓PR, PR↓Px esetén, a HTLV-3 TF1/PR hasítási helyet tartalmazó szintetikus oligopeptid szubsztrát alkalmazásakor kaptuk a legmagasabb K_m értéket.

Továbbá mértük az enzim relatív aktivitását a HTLV-1 kapszid/nukleokapszid hasítási hellyel rendelkező P3 pozíciójában módosított szubsztrátok esetén. A P3 helyen alanin csere bizonyult a legkedvezőbbnek az enzim számára, tehát a kis méretű apoláris alanin jelenléte kevesebb az enzim S3 szubsztrátkötőzsebének.

A HTLV-3 proteáz gátolhatóságát is tanulmányoztuk az IB268 és IB269-es HTLV PR hasítási helyet tartalmazó szekvenciájú inhibitorok esetén. Mindkét inhibitor hatékonyan gátolta az enzimet, az IB 269 gátló hatása volt nagyobb.

Irodalomjegyzék

- Adachi, Y., Nosaki, T., Hatanaka, M. (1990) Protein kinase inhibitor H-7 blocks accumulation of unspliced mRNA of human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I). *Biochem.Bio-phys.Res.Commun.* **169**, 469–475.
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J., Rey, F., Nugeyre, M., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 868–871.
- Blattner W., A., Clark J., W., Gibbs W., N., Williams C., K., Nomura A., Mann D., Saxinger C., Robert-Guroff M., Gallo R., C. (1984) HTLV: epidemiology and relationship to disease. *Princess Takamatsu Symp.*; **15**:93-108.
- Brown, P., O., Bowerman, B., Varmus, H., E., Bishop, J., M., (1989). Retroviral integration: structure of the initial covalent product and its precursor, and a role for the viral IN protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 2525-9.
- Calattini, S., Betsem, E., Bassot, S., Chevalier, S.A., Mahieux, R., Froment, A., Gessain, A., (2009) New strain of human T lymphotropic virus (HTLV) type 3 in a Pygmy from Cameroon with peculiar HTLV serologic results. *J. Infect. Dis.* **199** (4), 561–564.
- Calattini, S., Chevalier, S., A., Duprez, R., Bassot, S., Froment, A., Mahieux, R., Gessain, A., (2005). Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. *Retrovirology*, **2**, 30–34.
- Calattini, S., Chevalier, S., A., Duprez, R., (2006). Human T-cell lymphotropic virus type 3: complete nucleotide sequence and characterization of the human tax3 protein. *J. Virol.* **80**, 9876–88.
- Cann, A., J., Zack, J., A., Go, A., S., Arrigo, S., J., Koyanagi, Y., Green, P., L., Koyanagi, Y., Pang, S., Chen, I., S., (1990). Human immunodeficiency virus type 1 T-cell tropism is determined by events prior to provirus formation. *J. Virol.* **64**, 4735-42.

- Chevalier S., A., Durand S., Dasgupta A., Radonovich M., Cimorelli A., Brady J., N., Mahieux R., Pise-Masison C., A. (2012) The transcription profile of Tax-3 is more similar to Tax-1 than Tax-2: insights into HTLV-3 potential leukemogenic properties. *PLoS One*. (7):e41003
- Chevalier, S., A., Meertens, L., Pise-Masison, C., Calattini, S., Park, H., Alhaj, A., A., Zhou, M., Gessain, A., Kashanchi, F., Brady, J., N., Mahieux, R., (2006). The tax protein from the primate T-cell lymphotropic virus type 3 is expressed in vivo and is functionally related to HTLV-1 Tax rather than HTLV-2 Tax. *Oncogene*, **25**, 4470-82.
- Coffin, J., M., (1992) Retroviral DNA integration. *Dev. Biol. Stand.*, **76**, 41-51.
- Coffin, J., M., Hughes, S., H., Varmus, H., E., (1997). The Interactions of Retroviruses and their Hosts. Retroviruses. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Eizert, H., Bander, P., Bagossi, P., Sperka, T., Miklossy, G., Boross, P., Weber, I., T., Tőzser, J., (2008) Amino acid preferences of retroviral proteases for amino-terminal positions in a type 1 cleavage site. *J. of Virology* **82**, 10111-10117.
- Ellerman, C., Bang, O., (1908). Experimentelle Leukämie bei Hühnern. *Zentralblatt für Bakteriologie*, **46**, 595–609.
- Fehér, A., Boross, P., Sperka, T., Miklóssy, G., Kádas, J., Bagossi, P., Oroszlan, S., Weber, I., T., Tőzsér J., (2006). Characterization of the murine leukemia virus protease and its comparison with the human immunodeficiency virus type 1 protease. *J. Gen. Virol.*, **87**, 1321-30.
- Gallo R., C., (2005). History of the discoveries of the first human retroviruses: HTLV-1 and HTLV-2. *Oncogene*, **24**, 5926-30.
- Gallo, R., C., Sarin, P., S., Gelmann, E., P., Robert-Guroff, M., Richardson, E., Kalyanaraman, V., S., Mann, D., Sidhu, G., D., Stahl, R., E., Zolla-Pazner, S., Leibowitch, J., Popovic, M., (1983). Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, **220**, 865–867.

- Goncalves, D., U., Proietti, F., A., Ramos Ribas, J., G., Araujo, M., G., Pinheiro, S., R., Guedes, A., C., Carneiro-Proietti, A., B., F., (2010). Epidemiology, Treatment, and Prevention of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1-Associated Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 577–589.
- Haas, L., Divers, T., Casey, J., W., (1992). Bovine leukemia virus gene expression in vivo. *J. Virol.*, **66**, 6223-5.
- Hamaia, S., Casse, H., Gazzolo, L., Duc Dodon, M. (1997) The human T-cell leukemia virus type 1 Rex regulatory protein exhibits an impaired functionality in human lymphoblastoid Jurkat t cells. *J. Virol.* **71**, 8514–8521.
- Hidaka, M., Inoue, J., Yoshida, M., Seiki, M. (1988) Post-transcriptional regulator (rex) of HTLV-1 initiates expression of viral structural proteins but suppresses expression of regulatory proteins. *EMBO J.* **7**, 519–523.
- Jones, K., S., Huang, Y., K., Chevalier, S., A., Afonso, P., V., Petrow-Sadowski, C., Bertolette, D., C., Gessain, A., Ruscetti, F., W., Mahieux, R., (2009). The receptor complex associated with human T-cell lymphotropic virus type 3 (HTLV-3) Env-mediated binding and entry is distinct from, but overlaps with, the receptor complexes of HTLV-1 and HTLV-2. *J. Virol.*, **83**, 5244-55.
- Johnson, J., M., Nicot, C., Fullen J., Ciminale, V., Casareto, L., Mulloy, J., C., Jacobson, S., Franchini, G., (2001). Free major histocompatibility complex class I heavy chain is preferentially targeted for degradation by human T-cell leukemia/lymphotropic virus type 1 p12(I) protein. *JOURNAL OF VIROLOGY*, 6086–6094.
- Kádas, J., Webers, I., T., Bagossi, P., Miklóssy, G., Boross, P., Oroszlan, S., Tőzsér, J., (2004). Narrow substrate specificity and sensitivity toward ligand-binding site mutations of human T-cell Leukemia virus type 1 protease. *J. Biol. Chem.*, **279**, 27148-57.
- Kádas J., Boross P., Weber I.T., Bagossi P., Matúz K., Tőzsér J., (2008) C-terminal residues of mature Human T-lymphotropic Virus Type 1 protease are critical for dimerization and catalytic activity. *Biochem. J.*, **416**, 357–364.

- Levy, J. A., Hoffmann, A. D., Kramer, S. M., Landis, J. A., Shimabukuro, J. M. and Oshiro, L. S. (1984). Recovery of AIDS-associated retroviruses from patients with AIDS or AIDS-related conditions and from clinically healthy individuals. *J. Infect. Dis.*, **152**, 734-738.
- Poiesz, B., J., Ruscetti, F., W., Gazdar, A., F., Bunn, P., A., Minna, J., D., Gallo, R., C., (1980). Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **77**, 7415-7419.
- Schechter I, Berger A. (1967) On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun*. 27(2):157-62.
- Slattery J., P, Franchini G., Gessain A. (1999) Genomic evolution, patterns of global dissemination, and interspecies transmission of human and simian T-cell leukemia/lymphotropic viruses. *Genome Res*, (6):525-40.
- Sperka, T., Miklóssy, G., Tie, Y., Bagossi, P., Zahuczky, G., Boross, P., Matúz, K., Harrison, R.W., Weber, I., T., Tőzsér, J., (2007). Bovine leukemia virus protease: comparison with human T-lymphotropic virus and human immunodeficiency virus proteases. *Journal of General Virology*, **88**, 2052–2063.
- Switzer, W., M., Qari, S., H., Wolfe, N., D., (2006). Ancient origin and molecular features of the novel human T-lymphotropic virus type 3 revealed by complete genome analysis. *J. Virol.*, **80**, 7427–38.
- Toh, H., Kikuno, R., Hayashida, H., Miyata, T., Kugimiya, W., Inouye, S., Yuki, S., Saigo K., (1985). Close structural resemblance between putative polymerase of a *Drosophila* transposable genetic element 17.6 and pol gene product of Moloney murine leukaemia virus. *EMBO J.*, **4**, 1267-72.
- Tőzsér, J., Zahuczky, G., Bagossi, P., Louis, J., M., Copeland, T., D., Oroszlan. S., Harrison, R., W., Weber, I., T (2000). Comparison of the substrate specificity of the human T-cell leukemia virus and human immunodeficiency virus proteinases. *Eur J Biochem.*, **20**, 6287-95.

- Tózsér, J., Oroszlán, S., (2003). Proteolytic events of HIV-1 replication as targets for therapeutic intervention. *Curr Pharm Des*, **9**, 1803-15.
- Tózsér, J. (2003) .Stages of HIV replication and targets for therapeutic intervention. *Curr. Top. Med. Chem.*, **3**, 1447-57.
- Tózsér, J. (2001). HIV inhibitors: problems and reality. *Ann. N Y Acad. Sci.*, **946**, 145-59.
- Tsubata, C., Higuchi, M., Takahashi, M., Oie, M., Tanaka, Y., Gejyo, F., Fujii, M., (2005) PDZ domain-binding motif of human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein is essential for the interleukin 2 independent growth induction of a T-cell line. *Retrovirology* **2**, 46.
- Yoshida, M., Miyoshi, I., Hinuma, Y. (1982) Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implications in the disease. *Proc.Natl. Acad.Sci.U.S.A.* **79**, 2031–2035.
- Verdonck, K., González, E., Van Dooren, S., Vandamme, A., M., Vanham, G., Gotuzzo, E. (2007). Human T-lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient infection. *The Lancet Infectious Diseases*, 266-281.
- Wolfe, N., D., Heneine, W., Carr, J., K., Garcia, A., D., Shanmugam, V., Tamoufe, U., Torimiro, J., N., Prosser, A., M., Lebreton, M., Mpoudi-Ngole, E. (2005). Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 7994–7999.
- Zheng, H., Wolfe N., D., Sintasath, D., M., Tamoufe, U., LeBreton, M., Djoko, C., F., Dikko, J., Pike B., L., Heneine W., Switzer W., M. (2010) Emergence of a novel and highly divergent HTLV-3 in a primate hunter in Cameroon. *Virology.*, **401** 137–145

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Dr. Fésűs Lászlónak, hogy lehetőséget biztosított a TDK dolgozatom Biokémiai és molekuláris Biológiai Intézetben való elvégzéséhez.

Szeretném megköszönni témavezetőimnek Matúz Krisztinának és Dr. Tőzsér Józsefnek, hogy hasznos iránymutatásukkal, észrevételeikkel és türelmükkel segítették a munkámat.

Végezetül pedig a laboratórium többi dolgozójának, hogy bátran fordulhattam hozzájuk segítségért.

Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez

Alulírott, Kassay Norbert nyilatkozom, hogy a pályamunkában a Humán T-nyiroksejtes limfóma vírus 3 proteáz enzim expressziójának, feltárásának és tisztításának optimalizálását végeztem. Továbbá a HPLC módszer segítségével végeztem enzim kinetikai vizsgálatokat, relatív aktivitási vizsgálatokat, valamint gátlásvizsgálatokat.

Kassay Norbert

Kassay Norbert

Témavezetők:

Dr. Tózsér József

Dr. Tózsér József

Matúz Krisztina

Matúz Krisztina

Debrecen, 2012.01.07.