

Az elmúlt évtizedek intenzív kutatásai ellenére is ma még komoly kihívást jelent az emberiség számára az évről évre egyre több áldozatot szedő betegség a szerzett immunhiányos szindróma (AIDS), amit a humán immundeficiencia vírus (HIV) okoz. A betegség megfékezésére kifejlesztett, klinikumban is alkalmazott gyógyszerek a vírus életciklusának kulcsenzimeit célozzák meg. Sajnos a gyorsan kialakuló multidrog-rezisztens mutáns enzimek miatt, korlátozott sikerrel. Megfigyelték a HIV proteáznál, hogy az inhibitor hatása elől kitérő rezisztens enzimek tartalmaznak olyan mutációkat, amelyek megfelelnek más retrovirális proteázok ugyanazon pozíciójában található aminosavaknak. Ez maga után vonja azt a logikus következtetést, hogy a rezisztens mutáns HIV proteázok kialakulásának jobb megértését célzó kísérleteket érdemes kiterjeszteni más retrovirális proteázok vizsgálatára is.

Ezen pályázatban különböző retrovírusok úgymint, HIV, humán T-sejtes leukémia vírus (HTLV), humán foamy vírus (HFV), egér leukémia vírus (MLV), marha leukémia vírus (BLV) proteázok tulajdonságainak tanulmányozásával és összehasonlításával foglalkoztunk azért, hogy mélyebb és árnyaltabb képet kapjunk a retrovirális proteázokról. A kutatási eredményeink gazdagítják a retrovirális proteázokról szerzett tudásunkat és hozzájárulhatnak újabb, a multidrog rezisztens mutánsokkal szemben is sikeresen alkalmazható proteáz inhibitorok kifejlesztéséhez.

Kidolgoztunk, és kísérleteink során alkalmaztunk egy hatékony 96 lyukú mikrotenyésztőedényre használható fluorometriás mérési módszert, ami lehetővé tette, hogy az eddig alkalmazott HPLC alapú módszerünkhöz képest gyorsabban és érzékenyebben nyomon követhessük a retrovirális proteázok szubsztrát-specificitását és különböző inhibitorokkal való gátolhatóságát. A módszert a *Journal of Virological Methods* folyóiratban publikáltuk.

A kollaborációs partnerünknél, Dr. Irene T. Weber atlantai röntgen-krisztallográfiás laboratóriumában tett rövid munkalátogatásaim során, majd később az egyéves posztdoktori tanulmányutam során lehetőségem nyílt arra, hogy mélyebb betekintést nyerjek a vad és mutáns HIV proteázok röntgen-krisztallográfiás szerkezet meghatározásába. Az ottani munkám során igyekeztem olyan projekteken részt venni, illetve úgy alakítani a projekteket, hogy azok minél jobban közelítsenek a jelenlegi ifjúsági OTKA témám célkitűzéseisehez. Sikerült elsajátítanom a röntgen-krisztallográfia alapjait és az atlantai, valamint a debreceni kutatócsoport közötti kollaborációs kapcsolatot megerősíteni.

Klinikai proteáz inhibitor kezeléseknél megjelent mutációkat kombináltunk és az előállított duplamutáns HIV proteázokat (K45I/L90M, K45I/V82S, D30N/V82S és

N88D/L90M) vizsgáltunk. A duplamutánsok közül három esetben az enzimek stabilitása az adott egyszeres mutánsok stabilitása közé esett. Egyedül a D30N/V82S mutánsnál tapasztaltunk az egyszeres mutánsokhoz képest alacsonyabb stabilitást. Ebben a mutánsban a S1, S1' és a S2, S2' központi szubsztrátkötőzsebeket egyaránt kedvezőtlenül érintették a mutációk, ezzel magyarázható a kisebb stabilitás mellett, a gyengébb gátolhatóság és a természetes hasítási helyeken alapuló szubsztrátok gyengébb hasítása is. A K45I és a V82S mutációk kombinációja egy vad típusú enzimhez hasonló stabilitású, de katalitikusan gyengébb proteázt eredményezett a CA/p2 alapú szubsztrát esetében, mert a szubsztrát P1' Ala oldallánca kevesebb kölcsönhatást tudott kialakítani a 82-es szerinnel, mint a vad típusú enzimben található Valin oldallánccal. Ugyanakkor egy másik szubsztrát esetében (P6<sup>pol</sup>/PR) a K45I mutáció hatására előnyösebb katalitikus hatékonyságot figyelhettünk meg. A K45I/L90M mutánsban az L90M gyenge stabilitást és katalitikus hatékonyságot eredményező hatásait a K45I mutáció kompenzálta. Az L90M mutációnak és az N88D mutációk kombinálásakor két olyan ellentétes hatású mutációt tartalmazó enzimet hoztunk létre, amelyben a mutációk nem a szubsztrátkötő helyeken, hanem attól távolabb voltak. Ezen mutánsnál a CA/p2 alapú peptid magas koncentráció tartományban kompetitív gátlást eredményezett, ami a szubsztrát alternatív bekötődésére utalt. Ugyanakkor a másik szubsztrát hasítását hatékonyabban végezte a duplamutáns enzim. Eredményeinket a *Proteins: Structure, Function, and Genetics* újságban közzétettük.

Egy másik munkánkban proteáz inhibitorokkal szemben ellenálló proteázokban megtalálható mutációkat (V82A és L90M) tartalmazó egyszeresen mutált proteázokat kristályosítottunk Indinavir jelenlétében. A kristályszerkezetek analízisét követően megállapítottuk, hogy az L90M mutáns enzim esetében az R8 oldallánca a vad típusú és a V82A mutáns enzimekhez képest elmozdult az inhibitor felé, ami egy extra hidrogénkötést eredményezett. Ezzel a többlet kölcsönhatással részben értelmezhető volt az a kísérleti eredmény, hogy az Indinavir jobban gátolta az L90M mutánst, mint a vad típusú enzimet. A V82A mutáció következtében az oldallánc és az inhibitor között kevesebb kölcsönhatás volt várható, mint a vad típusú enzimmél, ezzel szemben azt tapasztaltuk, hogy a mutáció helyén az enzim főlánca az inhibitor felé mozdult és részben, de nem teljesen, képes volt kompenzálni a hiányzó Van der Waals kölcsönhatásokat. Alátámasztottuk, azt a korábbi megfigyelést, hogy az L90M mutáns esetében a Met 90 oldallánc egyik konformációs állapota sztérikusan túl közel van az aktív centrumban lévő Asp25 karbonil oxigénjéhez és ez a sztérikus taszító kölcsönhatás meggyengítheti az enzim stabilitását. Eredményeinket az *European Journal of Biochemistry* című újságban publikáltuk.

Egy további munkánkban vad-típusú és mutáns proteázok (V82A, I84V) nagy felbontású kristályszerkezeteit határoztuk meg természetes szubsztrátanalóg redukált peptid inhibitorokkal. A szerkezetek analízise során talált különbségek a peptidek szekvenciáitól függttek és jó egyezésben voltak a kísérletileg meghatározott gátlási állandókkal. A p6<sup>pol</sup>/PR analóg P2' Asn oldallánca több hidrogénkötést hozott létre a vad típusú proteázzal és kevesebb van der Waals kölcsönhatásban vett részt a P1' Pro, mint az enzim a CA/p2 és p2/NC analógokkal alkotott komplexekben. A p1/p6 tartalmú komplexekben, pedig kevesebb van der Waals kölcsönhatást és inkább víz-mediált hidrogénkötéseket találtunk a P2-P3 aminosavak környezetében. Az I84V komplexben kevesebb van der Waals kölcsönhatás alakult ki az enzim és az inhibitor között, mint a vad típusú proteáz tartalmú komplexben. A V82A mutáns tartalmú komplexek esetében inkább az inhibitor mozdult el a megrövidült oldallánc felé, mint a 82-es aminosav fő lánc mozdult volna az inhibitor felé, mint azt korábban klinikai inhibitorok esetében megfigyeltük. Tehát a peptid analóg inhibitorok nagyobb flexibilitásuknak köszönhetően jobban kompenzálhatják a mutációk okozta szerkezeti változások hatásait. Eredményeinket a *FEBS journal* újságban közzeltük.

Indinavir és egy redukált peptid analóg inhibitor (p2/NC) jelenlétében kristályosítottunk rezisztens proteázokban megtalálható L24I, I50V és G73S egyszeres mutáns enzimeket. Az L24I a katalitikusan aktív Asp25 közvetlen szomszédságában, az I50V az inhibitorral kölcsönható flexibilis flap régióban, a G73S a fehérje felszínén a szubsztrátkötőzsebtől messze található. Míg az első kettő mutáció lényegesen csökkentette az enzimek katalitikus hatékonyságát, egyrészt a mutációnak a katalitikus helyhez való közelsége (L24I), másrészt a kevesebb kialakuló van der Waals kölcsönhatások miatt (I50V), addig a G73S mutáns katalitikus hatékonysága széles skálán mozgott különböző szubsztrátok esetében. A kristályszerkezetek alapján megállapítottuk, hogy a 73S egy hidrogénkötési hálózatban vehet részt, ami olyan szerkezeti változásokat továbbíthat a szubsztrátkötőzseb felé, amelyek megváltoztathatják az enzim katalitikus aktivitását. Az első két mutáció csökkentette az alegységek közötti kölcsönhatást, így az enzimek stabilitását is. A G73S ezt nem változtatta meg. A fent említett hatások jól magyarázták a különböző mutánsok gátolhatóságát is. Eredményeinket a *Journal of Molecular Biology* folyóiratban publikáltuk.

Ugyancsak a *Journal of Molecular Biology* folyóiratban fogadták el azon munkánkat, amelyben ligand nélkül kristályosított, a Nelfinavir kezelés során megjelenő F53L mutációt tartalmazó proteázra vonatkozó megfigyeléseinket írtuk le. A flexibilis flap régióban található mutáció egyrészt megváltoztatja a homodimer stabilitását, másrészt egy

félig nyitott konformációt eredményez, ami átmenetet képez a ligand nélküli vad típusú és a multidrog rezisztens proteázok között.

A klinikai próbák IIB fázisában lévő potens, új generációs HIV proteáz inhibitor UIC94017 (TMC114) vizsgálata során megállapítottuk, hogy az inhibitor jól gátolja nemcsak a vad, de több proteáz inhibitorral szemben rezisztens HIV törzseket *in vitro*, ami az inhibitor *bis*-tetrahidrofurán csoportja és a proteáz Asp29 és Asp30 főlánc között megjelenő extra kölcsönhatásoknak a következménye. Eredményeinket az *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* újságban közöltük.

Az inhibitor klinikai használatban lévő inhibitorokkal szemben kialakuló rezisztenciáért felelős mutációkat tartalmazó egyszeres mutáns enzimekkel (V82A és I84V) kristályosítottuk. A szerkezetek analízise után megállapítottuk, hogy a mutáns enzimek a vad típusú proteáz esetében meghatározott H-kötésekkel és Van der Waals kölcsönhatásokkal kapcsolódnak az inhibitorhoz. Ezen megállapításaink alátámasztották azon megfigyelésünket, hogy az inhibitor a mutáns enzimeket is jó hatékonysággal volt képes gátolni. Megállapítottuk, hogy a mutációk következtében elvesző Van der Waals kölcsönhatások egy része a V82A mutáció esetében az enzim a főláncának az inhibitor felé történő elmozdulásával kompenzálódnak. Az I84V mutáns enzim esetében ez a jelenség nem volt megfigyelhető. Eredményeinket a *Journal of Molecular Biology* folyóiratban publikáltuk.

A már említett D30N, I50V és L90M mutáns enzimek jelenlétében is kristályosítottuk a TMC114 inhibitor. Azt találtuk, hogy a D30N mutáns esetén harmincszoros mértékben megnövekedett gátlási állandó (6.6 nM) az Asn 30 oldalláncnak az inhibitorral egy víz-mediált hidrogénkötésen keresztül kialakított kölcsönhatásával volt magyarázható, ami eltér a vad-típusú enzimnél megfigyelt közvetlen hidrogénkötéstől. Az I50V mutáns esetén a gátlási állandó kevésbé emelkedett meg (2 nM). Ennél a szerkezetnél a korábbi megfigyeléseinkhez hasonlóan kevesebb hidrofób kölcsönhatást találtunk a megrövidült oldallánc és az inhibitor között. Az L90M mutáns esetén erősebb gátolhatóságot tapasztaltunk (30 pM), mint a vad-típusú enzimnél, ami a kristályszerkezet alapján azzal magyarázható, hogy a meghosszabbodott oldallánc kedvezőtlen szterikus hatása miatt az enzim aktívcentruma az inhibitor felé mozdult el, ami a már meglévő hidrofób kölcsönhatásokon kívül további kölcsönhatások kialakítását eredményezte. Eredményeinket a *Journal of Medical Chemistry* folyóiratban leközöltük.

Más retrovirális proteázok vizsgálata során egy többtagú szubsztrát-könyvtár felhasználásával vizsgáltuk és összehasonlítottuk a vad típusú HTLV és HIV proteázok

specifitását. A HTLV proteáz sokkal nagyobb szelektivitást mutatott a HIV proteáz széles specifitásához képest. A szubsztrátkötőhelyeken HIV proteáz-szerű mutációkat tartalmazó HTLV proteáz mutánsokat állítottunk elő és specifitásukat vizsgáltuk. Mivel az egyszeres mutánsok nagy részénél jelentős katalitikus hatékonyság csökkenést tapasztaltunk, ezért megvizsgáltuk néhány mutáns enzim foldingját. A vad típusú enzim 100%-os foldingjával ellentétben a kiválasztott mutánsok foldingja 4-63% között mozgott és a mutánsok egy részénél már egy egyszeres mutáció is elegendő volt ahhoz, hogy a proteáz foldingja drasztikusan lecsökkenjen. Ugyanakkor a flap régióban többszörösen mutált HIV-szerű proteáz foldingja a mutációk nagyobb számának ellenére is 24% volt. A mutáns enzimek gátolhatóságát HIV proteáz inhibitorokkal és redukált peptid alapú HTLV proteáz inhibitorokkal is megvizsgáltuk. A HIV-szerű mutációkat tartalmazó többszörös flap-mutáns gátolhatósága a HIV proteáz inhibitorokkal szemben megnőtt, míg a HTLV proteáz inhibitorokkal szemben érzéketlenné vált. Mindez azt sugallja, hogy a flap régiók meghatározó szerepet játszanak a különböző retrovírusok specifitásában. Eredményeinket a *Journal of Biological Chemistry* folyóiratban közzétettük.

A BLV proteáz specifitását összehasonlítottuk a vad típusú HTLV és HIV proteázokkal a már említett többtagú peptid-könyvtár felhasználásával. A BLV proteáz specifitása a HTLV proteáztól eltért és inkább a HIV-1 proteázhoz hasonlított. Az enzim gátolhatósági vizsgálata során megállapítottuk, hogy a HTLV proteáztól eltérően, egyaránt érzékeny volt a HIV és a HTLV proteáz inhibitorokkal szemben is. Ugyanakkor a szubsztrátkötő helyekre bevezetett egyszeres mutációk nagy részét az enzim a HTLV proteázhoz hasonlóan nem tolerálta. Mindez azt jelenti, hogy a specifitási különbségek ellenére a BLV proteáz jó modellnek tűnik egy HTLV inhibitor kifejlesztésére. Eredményeinket a *Journal of Biological Chemistry* újságnak küldtük el.

Egy klasszikus modell retrovírus, az Egér Leukémia Vírus proteáz specifitásának jobb megértését célzó vizsgálatainkban először kidolgoztunk egy hatékony módszert arra, hogy aktív és tiszta fehérjét állíthassunk elő a kísérleteinkhez. A módszert a *Protein Expression and Purification* újságban publikáltuk.

Az előállított rekombináns MLV proteáz specifitását víusból izolált MLV proteáz specifitásával is összehasonlítottuk MLV és HIV proteázok természetes hasítási helyein alapuló peptidek felhasználásával. A két enzim specifitása megegyezett. A rekombináns enzim pH függését magasabbnak találtuk, mint a HIV proteázét. Az MLV proteáz dimer stabilitása lényegesen alacsonyabb volt, mint a HIV esetében. A rekombináns MLV proteáz specifitása eltért a HIV proteázétól. Az MLV proteáz széles specifitását mutatta, hogy

kisebb mértékben ugyan, de képes volt majdnem az összes HIV proteáz szubsztrátot hasítani, míg a HIV proteáz csak néhány MLV szubsztrátot tudott hasítani. Az MLV proteáz specificitását egy hosszabb és egy rövidebb MLV Gag fehérje szubsztráton is vizsgáltuk. Az így kapott eredményeink eltértek a peptid szubsztrátok esetében kapott eredményeink alapján várható eredményektől, ami visszavezethető volt arra, hogy a fehérjeszubsztráttal végzett kísérleteinkhez, másokhoz hasonlóan alacsony, míg a peptidekkel végzett kísérleteinkhez magasabb ionerősséget használtunk. A HIV proteáz elleni inhibitorokkal való gátolhatósági vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a klinikai használatban lévő HIV proteáz inhibitorok ugyan gátolták az MLV proteázt, de korántsem olyan hatékonyan, mint azt a HIV esetében tapasztaltuk. Eredményeinket a *Journal of General Virology* folyóirat közlésre elfogadta.

A *Protein Expression and Purification* újságban jelentettük meg a vad-típusú és az aktívcentrum mutáns HFV proteázok hatékony tisztítására kidolgozott módszerünket, amelyet felhasználtunk az enzim retrovírusoknál szokatlanul magas pH optimumának vizsgálatára tervezett egyszeres- és duplamutánsok előállítására. Ezen enzimekkel végzett specificitási, stabilitási és pH optimum meghatározási kísérleteinkben, megállapítottuk, hogy ezek az oldalláncok az enzim magasabb pH optimumáért nem, de a kisebb urea-stabilitásáért felelősek. Eredményeinket tartalmazó cikk a *Protein Engineering Design and Selection* folyóiratnál az elbírálás második körébe lépett.