

**A szarvasmarha leukémia vírus
transzaktivációs mechanizmusának
vizsgálata**

Ph.D. értekezés

Készítette: Unk Ildikó

Témavezető: Dr. Boros Imre

Készült: MTA Szegedi Biológiai Központ Biokémiai Intézetében

Szeged, 1996

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	1
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	4
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
BAKTÉRIUM TÖRZSEK JEGYZÉKE	6
ÁBRÁK JEGYZÉKE	7
I. BEVEZETÉS	8
II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	10
1. Retrovírusok általános jellemzése	10
1.a A retrovírus genom felépítése	11
1.b Retrovírusok replikációs ciklusa	12
1.c Onkogén hatású retrovírusok	13
2. A HTLV-BLV csoport jellemzése	15
2.a A BLV tax protein, mint tumort indukáló faktor	17
2.b A BLV tax hatásmechanizmusa	19
2.c A tax protein szerkezete és az annak vizsgálatára kialakított rendszer jellemzői	22
3. Az eukarióta transzkripció szabályozása	24
3.a Cisz szabályozó elemek	25
3.b Transz szabályozó elemek	26
3.c Az ATF/CREB fehérje család	28
3.d A helix-loop-helix fehérjék	30
III. CÉLKITŰZÉSEK	32
IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	33
Anyagok	33
Vegyszerek és enzimek	33

Táptalajok	33
Baktérium és fág törzsek	34
Szintetikus oligonukleotidok	34
Plazmidok	34
Módszerek	35
A DNS enzimátikus módosításai	35
Baktérium transzformáció	36
Plazmid DNS tisztítása	36
Eukarióta sejtek transzfekciója kalcium- -foszfát precipitációs módszerrel	37
Kloramfenikol acetyl-transzferáz (cat) enzimaktivitás mérése tranziens expressziós rendszerben	37
Fehérje túltermelése prokarióta expressziós rendszerben	38
DNS-fehérje kölcsönhatás vizsgálata <i>in vitro</i> gélretardációs kísérletekben	39
Fehérjék szerkezetének megváltoztatása helyspecifikus mutagenézissel	40
V. EREDMÉNYEK	41
1. A BLV LTR U3 régiójában található tax-érzékeny szekvenciák és a hozzájuk kapcsolódó fehérjék vizsgálata	41
1.a A BLV U3 régió deléciós elemzése	41
1.b A 21 bp-os elemek szekvenciájának analízise	43
1.c A CREB α protein és a 21 bp-os elem <i>in vitro</i> kölcsönhatásának vizsgálata	48
1.d A CREB fehérjék szerepe a tax-aktivációban	51
1.e Az AP-4 fehérje szerepe a BLV tax transzaktivációban	53
2. A BLV tax protein szerkezetének mutációs elemzése	56
2.a GAL oligonukleotidot tartalmazó promóterek szerkesztése	56

2.b BLVtax-GAL(1-147) fúziós fehérjék létrehozása és aktivitásuk <i>in vivo</i> vizsgálata	59
VI. AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA ÉS ÉRTÉKELÉSE	62
VII. AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA	69
VIII. ANGOL NYELVŰ ÖSSZEFOGLALÓ	71
IX. FELHASZNÁLT IRODALOM	79
X. PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	90



KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni családom minden tagjának, hogy a dolgozat írásakor megértőek és türelmesek voltak, és a dolgozat elkészítéséhez szükséges feltételeket számomra megteremtették.

Köszönetemet fejezem ki Boros Imrének, hogy csoportjában dolgozhattam és szakmai irányítása mellett elindulhattam molekuláris biológusi pályámon.

Köszönöm Ökrös Gyulánénak és Galló Rita Katalinnak a megbízható technikai segítséget, melyre munkám során mindig számíthattam.

Köszönet illeti minden közvetlen és közvetett munkatársamat, akik tanácsaikkal és segítségükkel hozzájárultak munkám eredményességéhez.

Hálával tartozom Venetianer Pálnak, hogy intézetében lehetőséget és helyet biztosított munkám elvégzéséhez.

Köszönöm a Magyar Tudományért Alapítványnak, hogy a dolgozat elkészítését egy éven át ösztöndíj folyósításával támogatta.

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AIDS	-	acquired immune deficiency syndrome
ATF	-	activation transcription factor
BLV	-	bovine leukemia virus
cAMP	-	cyclic adenosine monophosphate
cat	-	chloramphenicol acetyl transferase
CRE	-	cAMP responsive element
CREB	-	cAMP responsive element binding protein
HIV	-	human immunodeficiency virus
HLH	-	helix-loop-helix
HTLV	-	human T-cell leukemia virus
LZ	-	leucine zipper
LTR	-	long terminal repeat
RSV	-	Rous sarcoma virus
STLV	-	simian T-cell leukemia virus

BAKTÉRIUM TÖRZSEK JEGYZÉKE

E. coli BL21(DE3)	:	<i>hsdS gal (lambda cIts857 ind1</i> <i>Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1)</i>
E. coli CJ236	:	<i>dut1 ungl thi-1</i> <i>relA1/pCJ105(cam^rF')</i>
E. coli DH1	:	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96</i> <i>thi-1 relA1</i>
E. coli XL1-Blue	:	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46</i> <i>thi relA1 lac⁻</i>

ÁBRÁK JEGYZÉKE

1. Egy átlagos provírus genomjának a felépítése
2. A retrovírusok replikációs ciklusa
3. A HTLV-BLV csoportba tartozó vírusok genomjának és az arról átíródó RNS-eknek a szerkezete
- 4.a/ A 21 bp-os ismétlődések elhelyezkedése a BLV LTR U3 régiójában
b/ A BLV és HTLV-I vírusokban található 21 bp-os elemek egyedi szekvenciája
5. A BLV LTR U3 régiójában deléciót tartalmazó promóterek
6. A második 21 bp-os BLV elemet és annak mutáns változatait tartalmazó oligonukleotidok szekvenciája
7. A szintetikus oligonukleotidokat tartalmazó promóterek *in vivo* aktivitása
8. A szintetikus 21 bp-os elemek fehérje kötésének *in vitro* vizsgálata
9. A szintetikus oligonukleotidok *in vivo* és *in vitro* vizsgálatával kapott eredmények összesítése
10. A CREB α fehérje és a BLV 21 bp-os elemek *in vitro* kölcsönhatása
11. A CREB α fehérje *in vivo* hatása a BLV tax transzaktivációra
12. Az AP-4 fehérje *in vivo* hatása a BLV tax transzaktivációra
13. A GAL4 oligonukleotidot tartalmazó konstrukciók
a/ szerkezete és b/ *in vivo* mért aktivitása
14. A BLV tax génben kialakított mutációk elhelyezkedése

I. BEVEZETÉS

A retrovírusok a vírusok egyik legfigyelemreméltóbb csoportját alkotják. Ami "hírnevüket" a köztudatban is megalapozta, az a retrovírus csoport néhány tagja által okozott, gyakran végzetes kimenetelű humán, illetve állati betegségek sora, pl. AIDS, leukémia, stb.. Egyedi replikációs ciklusuk számos egyéb, tudományos szempontból rendkívül fontos tulajdonsággal rendelkezik. Beépülve a gazdagenomba, a vírus képes onnan különböző szekvenciák kiszakítására, ezáltal onkogénné való átalakítására. Ezeknek a virális onkogéneknek a tanulmányozása tette lehetővé a ma ismert celluláris protoonkogének azonosítását, illetve nyújtott alapvető ismereteket a karcinogenezis molekuláris mechanizmusának tanulmányozásához. A retrovírusok replikációja, a vírus gének transzkripciója a gazdasejt magjában, a sejt saját transzkripciós apparátusának felhasználásával játszódik le. Ez a szoros kapcsolat a gazdasejttel, illetve genomjuk egyszerű felépítése alkalmas modellekké teszi a retrovírusokat összetett celluláris folyamatok tanulmányozására.

Jelen dolgozatban a szarvasmarha B sejtjeit fertőző szarvasmarha leukémia vírus (BLV), promóteréről induló transzkripció mechanizmusát vizsgáljuk. A BLV választásával nemcsak egy retrovírus, azon belül is egy onkovírus működéséről kaphatunk adatokat, hanem, mint egyszerűsített modellrendszeren keresztül, a molekuláris

biológia egyik legintenzívebben kutatott területéről, az eukarióta génműködés szabályozásáról nyerhetünk információt.

A gének ki-, illetve bekapcsolásával az eukarióta sejt az őt ért külső és belső ingerekre képes válaszolni. Magasabbrendű eukariótáknál a differenciáció, a fejlődési program a génműködés szigorú, egymásra épülő szabályozási folyamatait követeli meg. Az eukarióta génkifejeződés szabályozásában az elsődleges kontrol pontot a transzkripció iniciációja jelenti. Bár a pontos mechanizmus teljes részleteiben nem ismert, az átírás gyakorisága végsősoron a promóter régióban található DNS elemektől, és a velük közvetlenül, vagy közvetve kölcsönható fehérjéktől függ.

Munkánk során a BLV transzkripciót szabályozó fehérjéjének, a tax proteinek a transzaktiváló mechanizmusát vizsgáltuk. Kísérleteink tervezésekor célul tűztük ki mind a BLV promóterében található, a transzaktivációhoz szükséges DNS, mind pedig a velük közvetlenül kölcsönható fehérje faktorok vizsgálatát, illetve a tax fehérje szerkezetének funkcionális elemzését.

II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

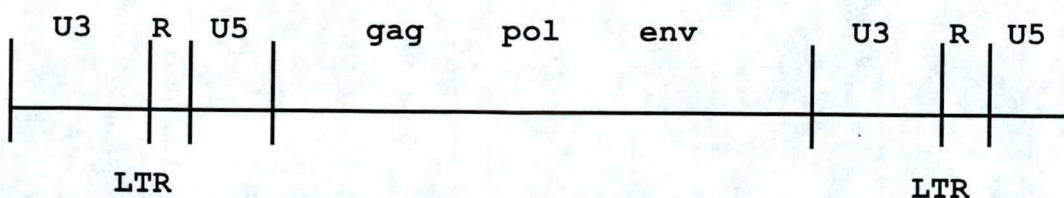
1. Retrovírusok általános jellemzése

Az elmúlt évtizedekben sem csökkent az az érdeklődés, ami felfedezésük óta a retrovírusok iránt tapasztalható. Ez egyrészt a csoporthoz tartozó veszélyes emberi és állati kórokozóknak, mint például az AIDS-et okozó HIV vírusnak, vagy a leukémiát és egyéb idegrendszeri megbetegedéseket előidéző humán T-sejtes leukémia vírusnak (HTLV) köszönhető. Másrészt egyedi replikációs ciklusuk és az abból adódó különleges biológiai sajátosságok vonták magukra a kutatók figyelmét. Ezek a retrovírusokra jellemző sajátosságok:

- A vírus és a gazdaszervezet közötti kölcsönhatások széles skálája, a teljesen ártalmatlan endogén vírus fertőzéstől a gyakran végzetes kimenetelű onkogén vírus fertőzésig.
- A gazdasejtből bizonyos szekvenciák kiragadása, ezáltal onkogénné alakítása.
- Képesek beépülni az ivari sejt vonalba és ugráló genetikai elemekként viselkedni.
- A provírus integrációs helye mellett elhelyezkedő gének aktivitását megváltoztathatják.
- Gyors mutációs és rekombinációs készséggel rendelkeznek, ami biztosítja a megváltozott környezeti feltételekhez való alkalmazkodást.

1.a A retrovírus genom felépítése

A retrovírusok genomjának felépítése igen egyszerű. Egy átlagos provírus genomja három, szerkezeti fehérjéket és a replikációt biztosító enzimeket kódoló génből és az azokat kétoldalról határoló LTR-ből (hosszú, láncvégi ismétlődés) áll (1. ábra). A gének sorrendje minden vírus esetében megegyezik. A *gag* génről nukleokapszid fehérjék íródnak át. A *pol* gén kódolja a reverz transzkriptázt és a gazdakromoszómába való beépüléshez szükséges integráz enzimet. Az *env* a vírus külső burkát felépítő glikoproteineket kódol. Az LTR-ben a vírus replikációjához és transzkripciójához nélkülözhetetlen szekvencia elemek találhatóak (Temin 1982): az U3 régió tartalmazza a vírus transzkripcióját szabályozó DNS motívumokat; az R régió a reverz transzkripció összetett folyamata során az átíródó DNS lánc szintézisének pontos helyét jelöli ki; az U5 régióban helyezkednek el a reverz transzkripció iniciációjához szükséges jelek, valamint az un. *att* motívum, ami a vírus integrációjához, illetve a virion összeszereléséhez szükséges.



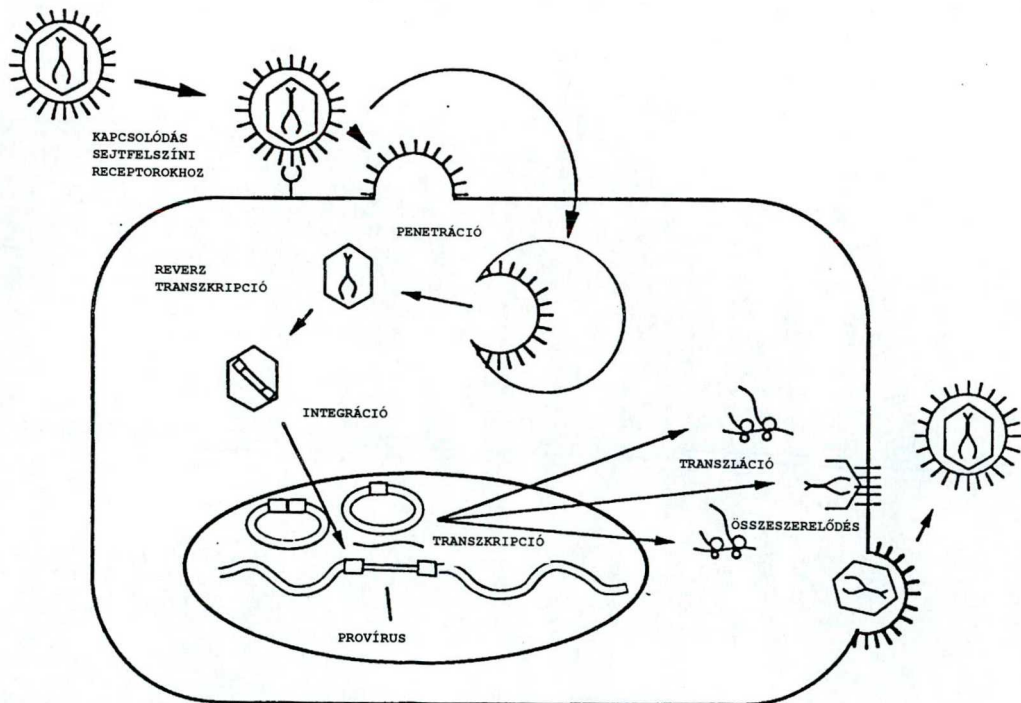
1. ábra: Egy átlagos provírus genomjának a felépítése.

A virális fehérjéket kódoló *gag*, *pol* és *env* géneket kétoldalról az LTR (hosszú láncvégi ismétlődés) határolja.



1.b Retrovírusok replikációs ciklusa

A retrovírusok egy egészen sajátos, egyedülálló mechanizmus révén reprodukálják önmagukat. A vírus genomot alkotó RNS-ről egy DNS köztes formán keresztül íródnak át az újabb vírusok genetikai állományát alkotó RNS molekulák. A szintézisnek ez az új, RNS-ről DNS-re való átírást követő módja jelentette a biológia centrális dogmájaként nevezett DNS»RNS»fehérje út alól az első kivételt. A retrovírusok replikációs ciklusát vázlatosan a 2. ábra szemlélteti.



2. ábra: A retrovírusok replikációs ciklusa

A retrovírusok replikációja csak a gazdasejtben képes lejátszódni. A sejtbe a vírus köpenyen levő fehérjék és sejt felszíni receptorok kapcsolódása révén hatol be a vírus. A citoplazmába jutva a vírus genomot alkotó egyszálú RNS molekuláról, még kapszid fehérjékkel körülvéve, reverz transzkripció révén kettős szálú DNS molekula szintetizálódik (Varmus és mtsai. 1985, Varmus 1988). Ez a virionba bepakolt integráz enzim segítségével integrálódik a gazda kromoszómájába (Cobrinik és mtsai. 1988, Ellis és Bernstein 1989). Ezt követően a már integrálódott, ún. provírusról RNS molekulák íródnak át, amelyekről vagy vírus fehérjék szintetizálódnak a sejt citoplazmájában, vagy genetikai anyagként újabb virionokba pakolódnak be. Mind az RNS molekulák transzkripciójához, mind a fehérjék translációjához a vírus a sejt szintetizáló apparátusát használja fel. A vírus RNS-eket az RNS polimeráz II szintetizálja, ugyanaz az enzim, amely a celluláris mRNS-ek szintéziséért is felelős.

1.c Onkogén hatású retrovírusok

A retrovírusok osztályában három alcsalád található: onkovírusok, lentivírusok és spumavírusok. Az onkovírusok alcsaládjában öt, egymással közeli rokonságot nem mutató csoportot különböztetünk meg. Az ebbe az alcsaládba tartozó vírusok közös vonása, hogy a megfertőzött szervezetben tumoros transzformációt képesek indukálni. Három mechanizmust ismerünk, amellyel az onkovírusok a

sejtek transzformációját indukálják:

- A gazda kromoszómába való integrációkor a provírus véletlenszerűen olyan gének mellé is beépülhet, melyek terméke a sejt növekedésében fontos szabályozó szerepet tölt be. Az integráció révén ezek a gének az erős virális promóterek szabályozása alá kerülnek, ami fokozott génexpressziót eredményez. A szabályozó fehérjék nagymértékű túltermelése a sejt transzformációját eredményezheti.

- Néhány onkovírus genomjából a fentebb már említett, általánosan előforduló három gén valamelyike részben, vagy teljes egészében hiányzik. Helyette a vírus egy sejt eredetű gént hordoz, melyben pontmutációk, esetleg nagyobb deléciók is előfordulhatnak. Az ilyen gén, a szerkezetében történt módosulások, illetve a vírus promóter által kiváltott fokozott expressziója miatt a sejtbe jutva onkogénként viselkedik. Ezek az onkogént transzdukáló retrovírusok replikációjukhoz segítő (helper) vírust igényelnek.

- Az onkovírusok egy csoportjában maguk a vírusok kódolnak transzkriptiót szabályozó fehérjét. A fehérjét kódoló génnek celluláris megfelelője, eddigi ismereteink szerint, nincs. A sejtbe juttatva azonban a gén terméke onkofehérjeként viselkedik, a sejt tumoros transzformációját indukálva. Az onkovírusoknak ebbe a HTLV-BLV csoportjába tartozik az általunk tanulmányozott szarvasmarha leukémia vírus is.

2. A HTLV-BLV csoport jellemzése

Az onkovírusok HTLV-BLV csoportja négy retrovírust foglal magában: a humán T-sejtes leukémia vírus I. és II. típusát (HTLVI-II), a szarvasmarha leukémia vírust (BLV), és a majom T-sejtes leukémia vírust (STLV). A négy vírust egymáshoz nagymértékben hasonló, a többi onkovírusról jelentősen különböző biológiai sajátosságai és genomjuk molekuláris szerkezete alapján soroljuk egy csoportba.

- Az e vírusok által kiváltott fertőzés jellemzője a betegség kialakulását megelőző igen hosszú, akár 10-40 éves, ún. nyugalmi szakasz, ami alatt az integrálódott provírusról átírás gyakorlatilag nem történik (Burny és mtsai. 1987).

- A megfertőzött sejtekben, HTLV és STLV esetén T, BLV esetében B limfocitákban, a vírus expressziója általában csak igen érzékeny módszerekkel detektálható, ellenben a vírus fehérjék ellen termelődött antitestek magas koncentrációt érnek el (Franchini és mtsai. 1984, Kettmann és mtsai. 1982, Portetelle és mtsai. 1978).

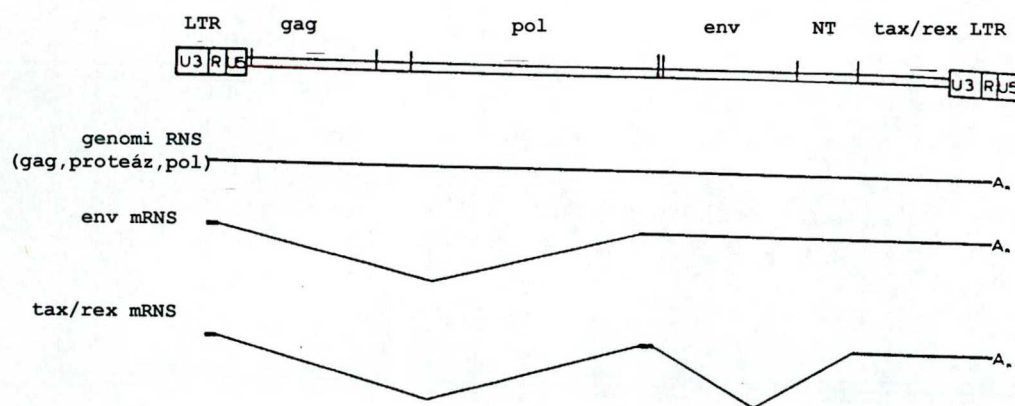
- A vírus indukált tumorképzés független az integráció helyétől.

- A vírus genomja nem tartalmaz onkogént (Deschamps és mtsai. 1981), a sejtek transzformálását egy, még teljesen nem tisztázott mechanizmus révén váltja ki.

- A vírus genomja a három általánosan előforduló génen kívül a genom 3' végénél még legalább két, alternatív leolvasási keretben átírózó gént tartalmaz (*tax*, *rex*), melyek a génkifejeződést szabályozó fehérjéket kódolnak

(Derse 1987, Derse 1988, Kiyokawa és mtsai. 1985, Lee és mtsai. 1984, Slamon és mtsai. 1984). (A retrovírusoknál, a HTLV-BLV csoporton kívül, a lentivírusok genomja is kódol virális szabályozó fehérjéket. E közös tulajdonság alapján javasolták, komplex retrovírusok névvel, a két csoport összevonását.)

A HTLV-BLV csoportba tartozó retrovírusok genomjának felépítését, illetve az átíródó RNS-ek szerkezetét a 3. ábra mutatja be.



3. ábra: A HTLV-BLV csoportba tartozó vírusok genomjának és az arról átíródó RNS-eknek a szerkezete.

A genomban megtalálható a három általánosan előforduló gén 5' *gag-pol-env* 3' elhelyezkedésben. Az *env* gén és a 3' LTR között van egy régió, amely más, replikáció-kompetens retrovírusra nem jellemző. Az itt található szekvenciában legalább két, egymással nagyrészt átfedő, de alternatív leolvasási keretben átíródó gént azonosítottak. Mindkét gén terméke, a *tax* és *rex* proteinek, fontos szabályozó szerepet töltenek be a vírus génjeinek kifejeződésében (Cullen 1992). A *tax* fehérje egy transzaktiváló faktor, amely a provírus 5' LTR-éről induló transzkripció mértékének jelentős növekedését okozza (Fujisawa és mtsai. 1984, Chen és mtsai. 1984, Sodroski és mtsai. 1985, Derse 1987, Willems és mtsai. 1987). A *rex* protein a génextpresszió poszttranszkripciós szabályozója. Valószínűleg a vírus RNS-ek stabilitását, illetve nukleáris transzportját befolyásolja (Hidaka és mtsai. 1988, Derse 1988). Hatásának eredményeként a nem, vagy csak egyszeresen vágott, szerkezeti fehérjéket illetve a replikációhoz szükséges enzimeket kódoló RNS-ek aránya növekszik a kétszeresen vágott, szabályozó fehérjéket kódoló RNS-ek arányához képest.

2.a A BLV *tax* protein, mint tumort indukáló faktor

A BLV a szarvasmarhák B-sejtjeit fertőző, azokban leukémiát indukáló retrovírus (Burny és mtsai. 1987). A leukémia kialakulásában az első lépést valószínűleg bizonyos sejtnövekedést szabályozó gének *tax* protein által

való transzaktiválása jelenti. A BLV tax sejtttranszformálásban játszott központi szerepét több kísérleti adat is alátámasztja: a tax a BLV vírus promóterén kívül képes más vírus promótereket (adenovírus-5 E3 és E4), illetve sejt promótereket (*c-fos* és szomatosztatin gén) is aktiválni (Katoh és mtsai. 1989). A BLV tax, illetve a Ha-ras proteint kifejező expressziós plazmidokat együtt transzfektálva, a termelődő két fehérje patkány embrió fibroblaszt sejtjeit immortalizálja és transzformálja (Willems és mtsai. 1990). A transzformált sejtek "nude" egérbe juttatva tumort indukálnak.

A BLV vírussal közeli rokonságot mutató HTLV-I vírus transzaktiváló proteinjével elvégzett kísérletek megerősítik a tax transzformációban betöltött szerepét. A két vírusnak mind a szerkezete, mind replikációs stratégiája rendkívül hasonló, így bármelyik vizsgálatával nyert adatok elősegítik a másik vírusról szerzett ismereteink gyarapodását.

A HTLV-I tax protein a vírus promóteren kívül számos celluláris promóter aktivitását képes indukálni: az interleukin-2, interleukin-2 receptor α láncát kódoló génekét, melyek termékei a T-sejtek növekedésének fontos szabályozói (Maruyama és mtsai. 1987, Siekevitz és mtsai. 1987, Cross és mtsai. 1987). A granulocita makrofág kolónia stimuláló faktor, a *c-fos*, a *c-jun*, *junD*, *fra-1*, *egr-1*, *egr-2* gén és a HIV vírus promótere szintén aktiválható a HTLV-I tax fehérjével (Miyatake és mtsai. 1988, Fujii és mtsai. 1992, Fujii és mtsai. 1991, Kelly és mtsai. 1992, Siekevitz és mtsai. 1987b.) A HTLV-I tax a

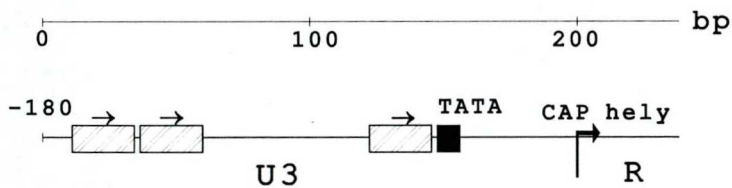
ras onkofehérjével kölcsönhatásban patkány embrió fibroblaszt sejtkültúra transzformációját, egérbe juttatva tumor kialakulását indukálja (Pozzatti és mtsai. 1990).

2.b A BLV tax hatásmechanizmusa

A BLV tax protein jelentős mértékben fokozza a vírus LTR-ről induló transzkripciót. Az LTR-en belül az U3 régió tartalmazza az átíráshoz szükséges promóter és enhanszer szekvenciákat. Ezek között három, 21 bp-os ismétlődést azonosítottak, mint a tax transzaktiváció közvetítéséhez nélkülözhetetlen DNS elemeket (Derse 1987) (4.a ábra). A 21 bp-os ismétlődések, az enhanszer elemekre jellemzően, irányítottságuktól és helyzetüktől függetlenül képesek az aktiváló hatás közvetítésére. Ezek a 21 bp-os ismétlődések mind elhelyezkedésükben, mind nukleotid sorrendjükben nagyfokú homológiát mutatnak a HTLV-I LTR-ben található hasonló elemekkel (4.b ábra). Minden egyes elem központi részében CRE-szerű (ciklikus adenozin monofoszfát -cAMP-érzékeny) szekvencia található (Katoh és mtsai. 1989). A CRE elemet kétoldalról övező szekvenciák jelentősen eltérnek a két vírusról. Bár a kétoldali szekvenciák pontos funkciója nem tisztázott, valószínűleg igen fontos szerepet játszanak a tax-aktivációban (Fujisawa és mtsai. 1989, Montagne és mtsai. 1990). Ezt támasztja alá, hogy a két vírus tax proteinjei, a központi elemek hasonlósága ellenére, nem képesek egymás promóterének transzaktiválására (Rosen és mtsai. 1984), illetve, hogy

nem minden CRE-t tartalmazó enhanszer aktiválható a tax proteinnel (Yin és mtsai. 1995, Brauweiler és mtsai. 1995). A HTLV-I vírusnál a két, TATA-boxhoz közeli 21 bp-os elem között is azonosítottak tax-érzékeny szekvenciákat (Marriott és mtsai. 1990). A BLV esetén is megfigyelhető az aktiváció kismértékű csökkenése a környező szekvenciák fokozatos eltávolításával.

a



b

BLV		HTLV-I
GAGCTGCT <u>GTGACCT</u> CACCTGCT	1	CAGGCGTT <u>GTGACGACA</u> ACCCCT
AAGCTGGT <u>GTGACGGC</u> AGCTGGT	2	TAGGCCCT <u>GTGACGT</u> GTCCCCCT
CAGACAG <u>AGACGTC</u> AGCTGCC	3	AAGGCTCT <u>GTGACGT</u> TCTCCCCC

4. ábra: a/ A 21 bp-os ismétlődések elhelyezkedése a BLV LTR U3 régiójában. A satírozott részek a 21 bp-os elemeket jelölik. b/ A BLV és HTLV-I vírusokban található 21 bp-os elemek egyedi szekvenciája. A központi részen elhelyezkedő CRE-szerű motívumot aláhúzással jelöltük.

A 21 bp-os elemek nélkülözhetetlenek a tax-aktivációhoz, azonban közvetlen tax-DNS kötődést még semmilyen kísérleti rendszerben nem sikerült kimutatni (Giam és Xu 1989, Nyborg és mtsai. 1988). A tax semmilyen enzimikus aktivitását sem sikerült igazolni. A legvalószínűbb, hogy a tax a DNS-hez közvetlenül kötődő, a sejtben már jelenlévő celluláris fehérjékhez kapcsolódva fejti ki hatását (Altman és mtsai. 1988, Nyborg és mtsai. 1988, Tan és mtsai. 1989). Számos, a HTLV-I LTR-hez kötődő sejtfehérjét sikerült már azonosítani (Giam és Xu 1989, Jeang és mtsai. 1988, Nyborg és Dynan 1990, Nyborg és mtsai. 1988). Négy, a 21 bp-os elemekhez kapcsolódó, magi fehérjét kódoló cDNS-t izoláltak HTLV-I fertőzött sejtvonalból (Tsujimoto és mtsai. 1991, Yoshimura és mtsai. 1990). *In vitro* rendszerben bizonyították a HTLV-I tax indirekt DNS-kötését (Zhao és Giam 1991, Zhao és Giam 1992). A HTLV-I tax számos sejtfehérje, többek közt a CREB és ATF-1 proteinek DNS-kötő affinitását megnöveli (Matthews és mtsai. 1992, Zhao és Giam 1991, 1992, Armstrong és mtsai. 1993, Kwok és mtsai. 1996, Paca-Uccaralertkun és mtsai. 1994).

A BLV promóterét vizsgálva azonosították a CREB2 fehérjét, amely képes kapcsolódni a 21 bp-os elemekhez és transzaktiválni a BLV LTR-t (Willems és mtsai. 1992).

2.c A tax protein szerkezete és az annak vizsgálatára kialakított rendszer jellemzői

A BLV tax egy 38 kilodalton (kDa) méretű, 309 aminosavból álló, nukleáris lokalizációjú fehérje (Sagata és mtsai. 1987). Szerkezetére vonatkozó ismereteink meglehetősen hiányosak. Egy kutatócsoportnak sem sikerült még eddig az aktivátor fehérjékre jellemző doménszerkezetet, illetve az egyes funkciókhoz rendelhető kisebb molekuláris részeket azonosítani. Az irodalomban közölt, a BLV tax szerkezetét érintő mutációk, változtatások szinte mindegyike, valamilyen módon, a tax inaktivációjához vezetett. Az eddig vizsgált mutánsok közül csupán négy, a polipeptid belső régiójában deléció (Sakurai és mtsai. 1991), illetve két BLV tax variáns hibrid származéka (Willems és mtsai. 1989) őrizte meg, ha részlegesen is, aktivitását. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a fehérje az evolúció során csak a funkciójához elengedhetetlen szerkezeti elemeket őrizte meg, és ez a szigorú szerkezeti felépítettség az aktivitást nem befolyásoló változtatásokat csak igen szűk határok között teszi lehetővé.

A HTLV-I tax protein szerkezetéről több információ áll a rendelkezésünkre. Bár a két vírus tax proteinjének az összehasonlítása sem az aminosav sorrend, sem a molekula felépítésében résztvevő esetleges szerkezeti elemek szintjén nem mutatott ki homológiát, a hasonló aktivációs mechanizmus a kölcsönhatások és a polipeptid

felépítésében is megnyilvánuló, bizonyos fokú analógiára utal.

A HTLV-I tax doménekből felépülő struktúráját több irodalmi adat megerősíti. Mutációs analízissel azonosították a fehérje nukleáris lokalizációjáért felelős 1-48 N-terminális aminosavat (Gitlin és mtsai. 1991, Smith és Greene 1992), a CREB fehérjével kölcsönható (Adya és Giam 1995) és a transzaktiválásban résztvevő doménjeit (Fujii és mtsai. 1991, Semmes és Jeang 1992). A transzaktiválásban résztvevő molekularészletek azonosításához egy Sadowski és Ptashne (1989) által kidolgozott új módszert is felhasználtak. Ennek lényege, hogy a molekulának egyes részleteit a DNS fizikai közelségében rögzítik és vizsgálják, hogy képes-e az adott promoterről induló transzkripció aktiválására. A módszer nemcsak domének, hanem nem DNS-kötő fehérjék tesztelésére is alkalmas. A BLV tax szerkezetére vonatkozó kísérleteinkben ugyanezt a módszert alkalmaztuk az aktiváló domének azonosításához. A tax mutáns változatait az élesztő GAL4 aktivátor fehérje DNS-kötő GAL(1-147) doménjéhez fúzionáltattuk. A GAL(1-147) targetszekvenciáját a tax proteinnel már nem aktiválható BLV minimál promoterbe építettük be. A targetszekvenciához kötődő DNS-kötő doménen keresztül a tax fehérjét a DNS fizikai közelségében rögzítettük, ezáltal biztosítva, hogy a tax és a promotérhez kötődő egyéb fehérjék, illetve a transzkripciós apparátus közötti feltételezett kölcsönhatások létrejöhessenek.

Munkánk során a BLV tax transzaktiváció részletesebb megismerését tűztük ki feladatul. Mivel a BLV tax a transzaktivációhoz a gazdasejt transzkripciós apparátusát használja fel, a vírus promóterben található enhanszer és promóter elemeknek az eukariótákra jellemző tulajdonságokkal kell rendelkezniük. Így a tax-sejtfehérje-DNS kölcsönhatás vizsgálata tágabb értelemben az eukarióta transzkripció mechanizmusának a vizsgálatát jelenti.

3. Az eukarióta transzkripció szabályozása

Egy adott időpillanatban a sejtben lévő géneknek csak egy meghatározott része van aktív állapotban. A magasabbrendű eukariótákban a génműködés a környezeti hatásoknak és a fejlődési állapotnak megfelelően szabályozódik. A szabályozás egy több szinten megvalósuló, összetett folyamat eredménye. A kromatin szerkezetének változásától a fehérje szintéziséig tartó folyamatban legalább hat lehetséges szabályozási pontot különböztethetünk meg:

- a gén szerkezetének aktivációja
- a transzkripció iniciációja
- az átíródott RNS érése
- az RNS stabilitása
- az RNS citoplazmába történő transzportja
- az RNS translációja a citoplazmában

A legtöbb gén esetén az elsődleges kontrol pontot a

transzkripció iniciációjának a szabályozása jelenti. A továbbiakban az RNS polimeráz II által átíródó, fehérjét kódoló gének transzkripciós szabályozásában résztvevő DNS és fehérje elemeket foglaljuk össze.

3.a Cisz szabályozó elemek

Az RNS polimeráz II által átíródó gének transzkripcióját számos, működésük alapján különböző osztályba sorolható szekvencia elemek szabályozzák. Ezek a "core" promóter elemek, amelyek tartalmazzák az RNS polimeráz II kötési helyét és kijelölik a transzkripció iniciáció pontos helyét, illetve a távolabbi promóter és enhanszer elemek, amelyek a transzkripció mértékét szabályozzák, azaz, hogy az adott génről milyen gyakorisággal induljon átírás. Ezen elemek közös sajátossága a rövid szekvencia-motívumokból felépülő moduláris szerkezet.

A promóter szekvenciák távolsága az iniciáció helyétől és egymástól viszonylag meghatározott és hatásukat általában csak egyféle orientációban tudják kifejteni. Néhány általánosan elterjedt promóter elemek kívül, mint pl. TATA, GC, CCAAT boxok (Breatnach és Chambon 1981, Grosschedl és Birnstiel 1980a,b, Dierks és mtsai. 1983), számos, speciális szignál-függő, transzkripciós szabályozásban résztvevő promóter szekvenciát ismerünk (hőssokra, hormonokra, növekedési faktorokra érzékeny elemek).

Az enhanszer elemeket három közös tulajdonság jellemzi:

- erőteljesen fokozzák a hozzájuk kapcsolt gén aktivitását
- az aktiváló hatás független az enhanszer orientációjától
- a promótertől való távolságuk és helyzetük változtatása az aktivációt csak kis mértékben befolyásolja

Az enhanszer elemek működését, felfedezésükkor, több lehetséges úton képzeltek el. Ezek az elképzelések, mint például a DNS konformációjának megváltoztatása, a DNS-nek a nukleáris matrix egy adott pontjához való rögzítése, a kísérletes igazolások során nem bizonyultak helytállóaknak. Jelenlegi ismereteink szerint az enhanszer elemek transzkripciós faktorok kötőhelyül szolgálnak. A kötődő fehérjék révén az enhanszer megnöveli a transzkripciós aktivátorok koncentrációját egy adott promóter "közelében".

3.b Transz szabályozó elemek

A génexpresszió szabályozásában számos, a sejtben csak igen kis mennyiségben előforduló regulátor fehérje vesz részt. Ezeket a proteineket aktivátoroknak vagy represszoroknak nevezzük attól függően, hogy növelik, vagy csökkentik a transzkripció mértékét (néhány szabályozó fehérje mindkét irányban képes az átírást módosítani).

A transzkripciós faktorok egy része DNS-kötő molekula, vagyis közvetlenül a cisz elemekhez kapcsolódva fejti ki szabályozó hatását. Ezek a fehérjék különböző

feladatot ellátó doménekkal rendelkeznek:

- DNS-kötő domén
- az általános transzkripció apparátussal kölcsönható domén

Igen gyakran a fehérje tartalmaz még egy domént, melyen keresztül más szabályozó proteinekhez képes kapcsolódni. Ezenkívül elkülöníthető a molekulának az a része, amely a nukleáris transzlokációs szignált hordozza. A szabályozó fehérjék működési mechanizmusára több modellt állítottak fel. Ezek közül, a kísérletes eredmények alapján, a leghelytállóbbnak az ún. looping modell bizonyult. E modell szerint a távoli enhanszer/promóter és a közeli promóter elemekhez kötődő fehérjék a közbeeső DNS szekvenciák kihurkolódása révén lépnek kölcsönhatásba egymással.

A szabályozó fehérjékben a DNS-kötésért általában a molekulának egy viszonylag kicsi, 60-100 aminosavból álló részlete a felelős. A DNS-kötő domén szerkezete alapján a fehérjéket különböző családokba soroljuk. Eukariótáknál a legáltalánosabban előforduló DNS-kötő motívumok: homeodomain (Scott és mtsai. 1989, Gehring és mtsai. 1990), Zn-finger (Brown és mtsai. 1985, Miller és mtsai. 1985), bázikus régió mellett elhelyezkedő leucine-zipper (bZIP) (Landshulz és mtsai. 1988), helix-loop-helix (Murre és mtsai. 1989a,b).

A transzkripciót szabályozó régió általában a molekulának egy 30-100 aminosavból álló részletére térképezhető (Pamela és mtsai. 1989). Jelenlegi ismereteink szerint ezek szerkezete meglehetősen



variábilis, egymással kevésbé rokonítható elemekből áll. Aminósav összetételük alapján az aktiváló doméneknek eddig négy típusát különítették el: savas, prolin-gazdag, glutamin-gazdag, szerin/threonin-gazdag aktiváló domének.

A szabályozó fehérjék másik csoportjának tagjai nem képesek közvetlen DNS-fehérje kapcsolat kialakítására. Ezek a proteinek a szabályozó komplex részeként, fehérje-fehérje kölcsönhatáson keresztül rögzülnek a DNS-hez. Ismereteink ezekről a nem DNS-kötő szabályozó fehérjékről meglehetősen hiányosak. Ebbe a csoportba tartozik az általunk vizsgált BLV tax transzaktiváló fehérje is.

A BLV promóter aktivációjának vizsgálatakor a 21 bp-os elemekben két lehetséges, a tax-aktivációban fontos szerepet betöltő fehérje kötőhelyet sikerült azonosítanunk. A hozzájuk kapcsolódó fehérjék egyike az ATF/CREB protein család egy tagja, a másik a helix-loop-helix fehérjék közé tartozó AP-4 protein.

3.c Az ATF/CREB fehérje család

Az ATF/CREB (aktiváló transzkripciós faktor/cAMP érzékeny elemet kötő proteinek) fehérjék, mint ahogy elnevezésük is utal rá, a sejten belüli cAMP szint változásakor a CRE elemet tartalmazó promóterek transzkripciós aktivitását megnövelik (Meinkoth és mtsai. 1991). A CRE felismerőhely konszenzus szekvenciája TGACGTc/aA. A CREB fehérjék homo-, illetve heterodimerként kötődnek a DNS-hez és foszforiláltsági állapotuktól

függően aktiválják az adott promoterről induló transzkripciót. A fehérjék két doménje felelős a dimerizáció és a DNS-kötés kialakításáért. A leucine zipper (LZ) doméneken keresztül kapcsolódnak a dimerek egymáshoz, de ez a domén a DNS-kötéshez is szükséges (Dwarki és mtsai. 1990, Ransone és mtsai. 1989, Sassone-Corsi és mtsai. 1988, Schuermann és mtsai. 1989). A specifikus DNS-kötést a leucine zipper mellett elhelyezkedő, erősen bázikus régió alakítja ki (Dwarki és mtsai. 1990, Gentz és mtsai. 1989, Kouzarides és Ziff 1988, Turner és Tjian 1989). A két domént, szorosan összefonódó funkciójukat jelezve, gyakran mint bZIP régiót jelölik. Számos CREB proteint kódoló cDNS-t izoláltak (Hoeffler és mtsai. 1988, Gonzalez és mtsai. 1989, Berkowitz és Gilman 1990). Ezek, egy-egy fajon belül, ugyanannak a génnek az alternatív RNS érés során keletkező termékei.

A CREB α protein a fehérje család legrégebben ismert tagja. Elsőként a patkány szomatosztatin génjének kifejeződését serkentő faktorként írták le (Montminy és Bilezikjian 1987, Gonzalez és mtsai. 1989) A CREB α különböző szövettípusokban is kifejeződik (Berkowitz és Gilman 1990). Mivel a BLV promóter tax-aktiválhatósága sem mutat szövetspecifitást, érdekessé vált számunkra megvizsgálni a CREB α és a BLV promóter tax-érzékeny elemeinek középpontjában található CRE-szerű szekvencia-motívumok szerepét a tax-aktivációban.

3.d A helix-loop-helix fehérjék

A helix-loop-helix fehérjék közé a differenciáció és sejtnövekedés szabályozásában résztvevő transzkripciós faktorok és enhanszer kötő fehérjék tartoznak (Edmonson és Olson 1989, Lassar és mtsai. 1989, Ludwig és mtsai. 1989, Mellentin és mtsai. 1989, Murre és mtsai. 1989a,b, Beckmann és mtsai. 1990, Henthorn és mtsai. 1990). Felismerő szekvenciájuk konszenzusa: CANNTG. A helix-loop-helix (HLH) motívum felelős a fehérjék dimerizációjáért és DNS-kötéséért (Murre és mtsai. 1989b). Néhány helix-loop-helix fehérje, mint az AP-4 (Hu és mtsai. 1990), USF (Gregor és mtsai. 1990), TFE3 (Beckmann és mtsai. 1990), TFE3 (Beckmann és mtsai. 1990), TFEB (Carr és Sharp 1990), c-L-N-Myc (DePinho és mtsai. 1987) és Min/Max (Blackwood és Eisenman 1991), a HLH motívumon kívül, közvetlenül mellette egy LZ és egy bázikus régiót tartalmaz. Az interaktív doméneknek ilyen együttes előfordulása sokrétű és szelektív fehérje-fehérje kapcsolat kialakítását teszi lehetővé.

A BLV promóter vizsgálata során a tax-érzékeny 21 bp-os elemekben azonosítottuk az AP-4 fehérje kötőhelyének konszenzus szekvenciáját, a CAGCTG motívumot. Az AP-4 fehérjét először az SV40 vírus kései génjeinek aktivátoraként írták le (Mermod és mtsai. 1988). Azóta kimutatták, hogy aktiválja a humán metallothionein-IIA gén transzkripcióját és résztvesz a humán proenkefalin gén expressziójának szabályozásában is (Comb és mtsai. 1988, Mermod és mtsai. 1988). Az AP-4 gén, a CREB α -hoz hasonlóan, különböző szövetekben is kifejeződik. Az AP-4

tax-aktivációban betöltött lehetséges szerepének vizsgálatát megnehezítette, hogy a teljes fehérjét kódoló szekvencia nem állt rendelkezésünkre. Az általunk is használt, az irodalomban leírt leghosszabb cDNS a fehérjének egy N-terminális deléciós származékát kódolja.

III. CÉLKITŰZÉSEK

Dolgozatunkban a BLV tax transzaktivációjával kapcsolatos kísérleteinket foglaljuk össze. A tervezett kísérletekkel a BLV tax transzaktiváció mechanizmusának, illetve, ezen keresztül, az eukarióta transzkripció összetett folyamatának részletesebb megismeréséhez próbáltunk újabb ismeretekkel szolgálni. Az aktiváció mechanizmusát két irányból kívántuk megvizsgálni.

a/ Először, a DNS felől közelítve, a promóter deléciók, illetve pontmutációs elemzésével az aktivációban fontos szerepet játszó szekvencia-motívumokat szerettük volna azonosítani. Az aktiváló hatást közvetítő szekvencia-motívumok felismerésén keresztül az azokhoz kapcsolódó celluláris fehérjék azonosítását tűztük ki feladatul.

b/ A tax-aktiváció vizsgálatának egy másfajta megközelítését jelenti a tax fehérje szekezetének az elemzése. Ennek során a tax fehérje különböző részeiben a proteinek csak viszonylag kis részét érintő változásokat, pontmutációkat, kisebb deléciókat, kívántunk kialakítani. A létrehozott mutációkkal az aktivációs domén molekulán belüli elhelyezkedését szerettük volna feltérképezni. A mutánsokat a GAL4 aktivátor GAL(1-147) DNS-kötő doménjéhez fúzionáltattuk. Rendszerünkben a promóterbe épített GAL(1-147) kötőhely és a DNS-kötő GAL(1-147) domén helyettesítette a tax-érzékeny elemeket és a hozzájuk kötődő sejtfehérjéket, illetve biztosították a tax fehérje lokalizáltságát a promóter közelében.

IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Anyagok

Vegyszerek és enzimek

A kísérletekhez a molekuláris biológiai munkák során általánosan használt, analitikai minőségű vegyszereket használtunk. A DNS fragmentumok jelöléséhez szükséges [α - ^{32}P]-dATP illetve dCTP izotópokat a Magyar Izotóp Intézet készítette. A cat aktivitás mérésénél használt ^{14}C jelzett kloramfenikol Amersham (Buckinghamshire, USA) gyártmányú volt.

A rekombináns DNS technikai módszerekhez New England Biolabs (Beverly, USA) illetve Fermentas (Vilniusz, Litvánia) gyártmányú enzimeket alkalmaztunk.

Táptalajok

Baktériumok tenyésztéséhez YTB táptalajt készítettünk (10 g Trypton, 5 g Yeast extract, 5 g NaCl, vízzel 1000ml-re kiegészítve), a megfelelő antibiotikummal alkalmazva. Az eukarióta szövettenyészeteknél GIBCO (Gaithersburg, USA) gyártmányú Dulbecco modified Eagle's medium-ot használtunk, humán HeLa sejtek esetén 5%, majom COS7 sejtek esetén pedig 10% borjú szérummal kiegészítve.

Baktérium és fágtörzsek

Klónozások során a plazmidokat *Escherichia coli* DH1 törzset (Stratagene; La Jolla, USA) használva szaporítottuk fel. M13mp18, M13mp19 bakteriofágba (New England Biolabs; Beverly, USA) való klónozáskor XL1-Blue (Stratagene; La Jolla, USA), helyspecifikus mutagenézisnél pedig CJ236 (Kunkel és mtsai. 1987) *E. coli* törzseket használtunk. Fehérjék baktériumokban való túltermeléséhez a BL21(DE3) törzset (Studier és mtsai. 1990) alkalmaztuk.

Szintetikus oligonukleotidok

GAL4: a GAL(1-147) DNS-kötő fehérje felismerőhelyét tartalmazza.

CTAGTCGGAGTACTGTCCTCCGCGGAGTACTGTCCTCCGCGGAGTACTGTCCTCCGT
AGCCTCATGACAGGAGGCGCCTCATGACAGGAGGCGCCTCATGACAGGAGGCAGATC

Apa0: a BLV tax N-terminális részében létrehozott pontmutációhoz tervezett oligonukleotid.

GTTGGTTGGGGGCCCCAC

Plazmidok

pHC624: transzfektálásnál a DNS koncentráció azonos szinten való tartására használt plazmid (Boros és mtsai. 1984).

pBLH2CAT: a BLV promótert hordozza a *cat* riporter gén előtt (Derse és Casey 1986).

pXBRS: a BLV *tax* gént tartalmazza az eukarióta expressziót biztosító RSV promóter mögé klónozva (Derse 1987).

pSG424: az SV40 promóterről átíródó GAL(1-147) fehérje kódoló szekvenciáját tartalmazó plazmid. A kódoló részt követő egyedi hasítási helyek fúziós fehérjék létrehozását teszik lehetővé (Sadowski és Ptashne 1989).

pRSVCAT: a *cat* riporter gént tartalmazza az RSV promóter mögé klónozva (Burny és mtsai. 1987).

pET11a: fehérjék baktériumokban való túltermelésére kialakított expressziós vektor (Studier és mtsai. 1990)

pTG14: a pSG424 plazmidba klónozott HTLV-I *tax* fehérjét expresszálja a GAL(1-147) proteinnel fúzióban (S. J. Marriott ajándéka).

Módszerek

A DNS enzimatiszus módosításai

A DNS laboratóriumokban rutinszerűen használt eljárásoknál (DNS hasítása, túlnyúló végek feltöltése, különböző darabok összekapcsolása illetve jelölése), az irodalomban (Maniatis és mtsai. 1982) leírtakat, illetve az enzimek gyártói által megadott utasításokat követtük.

Baktérium transzformáció

Prokarióta sejtek transzformálásakor az Inoue és munkatársai (1990) által leírt módszert követtük. Transzformálásig az előre elkészített kompetens sejteket 7% DMSO-t tartalmazó TB pufferben (10 mM PIPES, 55 mM $MnCl_2$, 15 mM $CaCl_2$, 250 mM KCl, pH:6.7), $-70^\circ C$ -on tároltuk.

Plazmid DNS tisztítása

Baktériumokból a plazmid DNS-t az alkáli lízis módszerével (Birnboim és Doly 1979, Ish-Horowitz és Burke 1981) tisztítottuk.

Eukarióta sejtek transzfekciójához a literes kultúrából kinyert DNS-t CsCl-etídium-bromid grádiensen egyensúlyi centrifugálással tisztítottuk. Centrifugálás után UV fényben könnyen elválasztható lett az etídium-bromiddal interkalálódott lineáris, illetve zárt, cirkuláris plazmid DNS. Az összegyűjtött cirkuláris formából az etídium-bromidot CsCl-dal telített izoamil-alkohollal extraháltuk. A CsCl-ot $4^\circ C$ -on, 24 h-n át tartó dialízissel távolítottuk el a mintákból.

Eukarióta sejtek transzfekciója kalcium-foszfát precipitációs módszerrel

Az *in vivo* végzett kísérletekhez a plazmid DNS-eket a kalcium-foszfát precipitációs módszerrel transzfektáltuk eukarióta sejtekbe (Graham és van der Eb 1973). Transzfekció előtt 24 h-val a sejteket néhány milliónként 60 mm-es lemezekre osztottuk szét. A transzfekciót 2-3 h-val megelőzően a sejteken tápoldatot cseréltünk. Transzfekciónál a B oldat (280 mM NaCl, 50 mM HEPES pH:6.9, 1.5 mM Na₂HPO₄) 250 µl-éhez cseppenként, állandó lassú keverés mellett adagoltuk az A oldat (250 mM CaCl₂, 5 µg DNS) 250 µl-ét. Húsz perc várakozás után a kalcium-foszfát csapadékot tartalmazó elegyet a sejtekre csepegtettük, majd a lemezeket 5% CO₂ tartalmú, 37°C hőmérsékletű légtermosztátba helyeztük. A sejteken 24 h elteltével tápoldatot cseréltünk, majd 48 h múlva meghatároztuk a cat enzimaktivitást.

Kloramfenikol acetyl-transzferáz (cat) enzimaktivitás mérése tranziens expressziós rendszerben

A cat aktivitás mérésénél az irodalomban leírt módszert követtük (Gorman és mtsai. 1982). 48 h-val a transzfekciót követően a sejteket kétszer mostuk, majd 1.5 ml A oldatban (40 mM TRIS-HCl pH:7.4, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl) a lemezek felületéről óvatosan összegyűjtöttük. Rövid centrifugálás után a csapadékot 150 µl B oldatban

(250 mM TRIS-HCl pH:7.8, 5 mM DTT, 15% glicerin) felszuszpendáltuk, majd 4-5-szöri lefagyasztással/felolvasztással a sejteket feltártuk. Újabb centrifugálás után, a felülúszót használva, meghatároztuk az enzimaktivitást. Az acetilálási reakció 150 μ l-ét (50 μ l sejtextraktum, 20 μ l 4 mM acetil-CoA, 5 μ l 14 C kloramfenikol, 70 μ l TRIS-HCl pH:7.8, 5 μ l H₂O) 1 órán át inkubáltuk 37°C-on. Ezt követően a különböző acetiláltsági fokú kloramfenikolt 1ml etil-acetáttal extraháltuk a reakcióelegyből, légáramban bepárooltuk, majd 10 μ l etil-acetátban feloldva vékonyréteg kromatográfiával a különböző formákat egymástól elválasztottuk. (futtató elegy: 95% kloroform, 5% etanol). Az autoradiogrammon kapott jeleket folyadék szcintillációs technikával kvantitáltuk. Minden bemutatott adatunk egymástól független, legalább háromszor megismételt kísérlet eredményét tükrözi.

Fehérje túltermelése prokarióta expressziós rendszerben

Nagyobb mennyiségű fehérje előállításához a CREB α protein cDNS-ét (C. Giam ajándéka), *NdeI-BamHI* fragmentumként a pET11a expressziós vektorba klónoztuk. A termeltetéshez a *BL21(DE3) E. coli* törzset használtuk. A folyadék kultúrát -70°C-on tárolt, mindig frissen szélesztett klónból indítottuk. A sejteket 37°C-on, YTB tápoldatban növesztettük OD₅₄₀:0.4 eléréséig, majd 0.5 mM IPTG hozzáadásával indukáltuk a CREB α fehérje termelését.

A párhuzamosan, eltérő körülmények között végzett kísérletek alapján az optimális indukciós időt 3-4 órának találtuk. A sejteket ultrahanggal tártuk fel, majd a kapott sejtextraktumot közvetlenül használtuk *in vitro* DNS-fehérje kölcsönhatás vizsgálatainkban.

DNS-fehérje kölcsönhatás vizsgálata *in vitro* géltreardációs kísérletekben

A kísérletekben DNS fragmentumként szintetikus oligonukleotidokat használtunk. Az oligonukleotidok 5' túlnyúló végeinek feltöltése során radioaktiv dezoxiribonukleotidok beépítésével jelöltük a kettős szálú DNS-t. A DNS-kötő fehérjét a Dignam és munkatársai (1983) által leírt módszerrel preparáltuk HeLa sejtmagokból, illetve a CREB α fehérjét túltermelő baktériumokból készített sejtextraktumot közvetlenül használtuk fel a kötési reakciókban. Egy-egy reakcióelegy 10-20 ng jelölt oligonukleotidot, 1-2 μ g fehérjét tartalmazó extraktumot és 1-3 μ g nem specifikus kompetítort -poli(dI-dC)- tartalmazott a kötési puffer (10 mM HEPES pH:7.5, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10% glicerin) mellett. A reakciókat szobahőn inkubáltuk 20'-ig, majd megfestettük (0.1% brómfenolkék, 50% glicerin kötési pufferben) és alacsony ionerősségű gélen megfuttattuk. A gél összetétele a következő volt: 4.5 ml 30% akrilamid/0.8% bis-akrilamid, 2 ml 50% glicerin, 0.3 ml 10%-os ammónium perszulfát, 0.02 ml TEMED, 20.5 ml H₂O,

3 ml 10xGS puffer (1xGS puffer: 67 mM TRIS-HCl pH:7.5, 33 mM nátrium-acetát, 10 mM EDTA). Szobahőn végzett 2.5 órás elektroforézis után a gélt vákumszáritóval megszáritottuk, majd -70°C-on autoradiografáltuk.

Fehérjék szerkezetének megváltoztatása helyspecifikus mutagenézissel

A BLV tax fehérje szerkezetének egészen kismértékű megváltoztatásához a Kunkel és munkatársai (1987) által leírt helyspecifikus mutagenézis módszert alkalmaztuk. A BLV tax proteint kódoló szekvenciát *M13mp18* bakteriofágba építettük és *dut- ung- CJ236 E. coli* törzsben szaporítottuk fel. Az ilyen módon nyert, uracilt tartalmazó templáttal, az uracil tartalom ellenőrzéseként, az *in vitro* DNS szintézis előtt *dut- ung- CJ236* és *dut+ ung+ XLI-Blue* törzseket fertőztünk. A mutációt hordozó, előzőleg foszforilált, szintetikus oligonukleotidot, az uracilt tartalmazó templát DNS-t és T4 polimerázt alkalmaztunk az *in vitro* DNS szintézis reakcióhoz. A reakcióelegyet 5'-ig 0°C-on, 5'-ig szobahőmérsékleten, majd 2 órán át 37°C-on inkubáltuk. A reakcióelegy 1/10-ét *XLI-Blue* törzsbe transzformáltuk, majd a kapott fágplakkokból egyszálú DNS-t preparáltunk. A kapott mutánsok pontos szekvenciáját szekvenálással (Sanger és mtsai. 1977) és enzimatis emésztéssel ellenőriztük.

V. EREDMÉNYEK

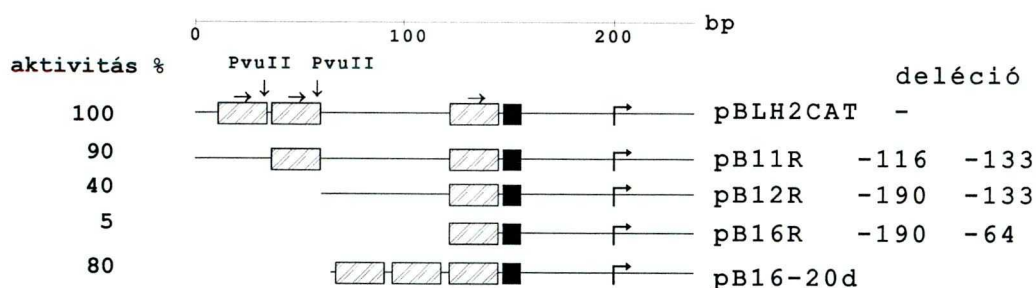
1. A BLV LTR U3 régiójában található tax-érzékeny szekvenciák és a hozzájuk kapcsolódó fehérjék vizsgálata

1.a A BLV U3 régió deléciós elemzése

A BLV LTR U3 régiójában található a vírus transzkripciójához szükséges promóter és enhanszer motívumok. A TATA boxtól 5' irányban helyezkedik el a három, 21 bp-os enhanszer elem, amely a tax transzaktiváció elsődleges közvetítője. Az U3 régió vizsgálatában első lépésként a promóter régió deléciós származékait hoztuk létre (5. ábra). A deléciókat úgy alakítottuk ki, hogy lépésenként egy-egy 21 bp-os elemet távolítottunk el a promóterből. Kísérleteinkhez a pBLH2CAT plazmidot használtuk, amely a teljes BLV LTR-t tartalmazta *HindIII*-*BglIII* fragmentumként, a bakteriális kloramfenikol acetil-transzferáz génje elé klónozva. Ezáltal a létrehozott deléciós származékokat közvetlenül használhattuk HeLa sejtekben az adott promóter működésével arányos cat enzimaktivitás mérésére.

Első lépésben a két távolabbi 21 bp-os elemben található *PvuII* helyek közötti szakaszt távolítottuk el, kettőre csökkentve ezáltal a 21 bp-os elemek számát. Az így létrejött plazmidnak a pB11R elnevezést adtuk. Ezt követően, a középső elemig, az U3 régió 5' szakaszát

deletáltuk *BAL31* emésztéssel. A keletkezett pB12R plazmid már csak egy 21 bp-os elemet és az első és második elemet összekötő szekvenciát tartalmazta. Az összekötő szekvencia eltávolításával a pB16R plazmidot kaptuk. A pB16R plazmidba két példányban építettük be a középső 21 bp-os elem szintetikus szekvenciáját (B20), létrehozva a pB16-20d plazmidot. A deléciós promotert tartalmazó klónok aktivitását tranziens expressziós rendszerben, a BLV tax proteint kódoló plazmiddal együtt transzfektálva mértük (5. ábra).



5. ábra: A BLV LTR U3 régiójában deléciót tartalmazó promoterek. A satírozott részek a 21 bp-os elemeket, a feketével jelölt rész a TATA box elhelyezkedését mutatja. A nyíl a transzkripciós startpont helyzetét jelzi. Az egyes klónok mellett feltüntettük a deléció kezdő és végpontját.

A pB11R plazmid mért aktivitása megegyezik a kísérleteinkkel egyidőben az irodalomban közzétett eredménnyel, miszerint két 21 bp-os elem is elegendő a tax-aktiváció biztosításához. A pB12R plazmidban az első elem és az azt megelőző összekötő szekvencia, csökkent mértékben ugyan, de aktiválható a tax fehérjével. A már csak egy 21 bp-os elemet tartalmazó pB16R plazmid teljesen elveszítette tax-érzékenységét. Az ebbe a plazmidba szintetikus oligonukleotidként, két kópiában beépített második 21 bp-os elem visszaállította a promóter tax-aktiválhatóságát. A kísérletek eredménye alapján elmondhatjuk, hogy a 21 bp-os elemek, egyéb DNS szekvenciák nélkül, önmagukban is elegendők a promóter tax-érzékenységének biztosításához, illetve, hogy már két elem is képes a tax-aktiváció közvetítésére.

1.b A 21 bp-os elemek szekvenciájának analízise

A BLV U3 régióban található 21 bp-os elemek szekvenciája egymással nagymértékben homológ. A HTLV-I megfelelő elemeihez hasonlóan, mindegyik központi részében található egy CRE-szerű motívum. A HTLV-I esetében igazolták a CRE elemek és a hozzájuk kötődő fehérjék jelentőségét a tax-aktivációban. A két vírus közötti rokonság és nagyfokú hasonlóság alapján feltételezhető, hogy a CRE motívumok a BLV tax-aktivációban is fontos szerepet töltenek be.



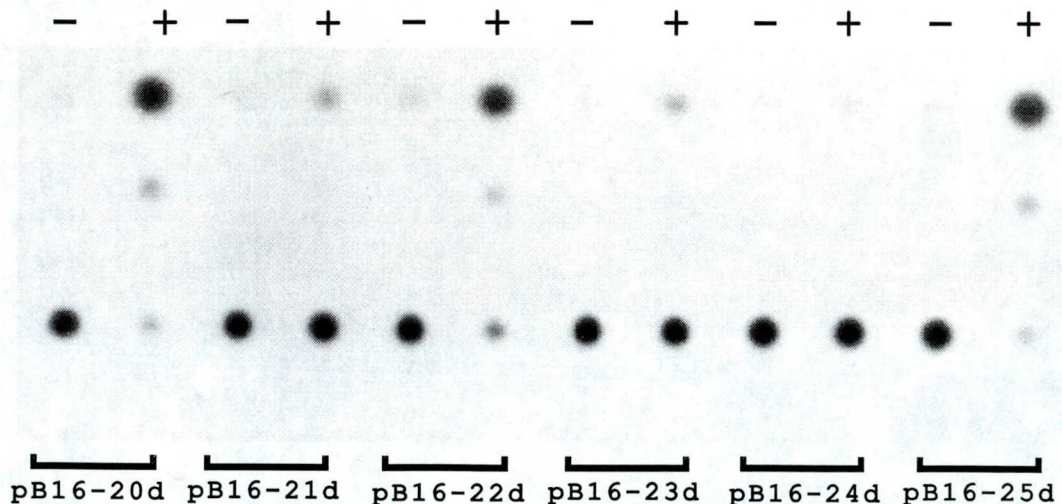
A BLV 21 bp-os elemekben a tax transzaktivációban fontos szekvencia-motívumokat szeretnénk volna azonosítani. Ehhez elkészítettük a középső elemet, illetve annak mutáns változatait tartalmazó szintetikus oligonukleotidokat. A pontmutációkat úgy alakítottuk ki, hogy a 21 bp-os elemek központi, CRE-szerű elemet tartalmazó, illetve két szélső részét érintő változások hatása külön-külön is vizsgálható legyen. Az oligonukleotidok szekvenciáját, a mutáns nukleotidokat feltüntetve, a 6. ábra mutatja be.

	↓		↓
B20	T C G A A A A G C T G G <u>T G A C G G C A G C T G G T</u> G G C T A G		
B21 A C G		
B22 G C T		
B23 T C . C C		
B24 G C T T C . C C		
B25 T		

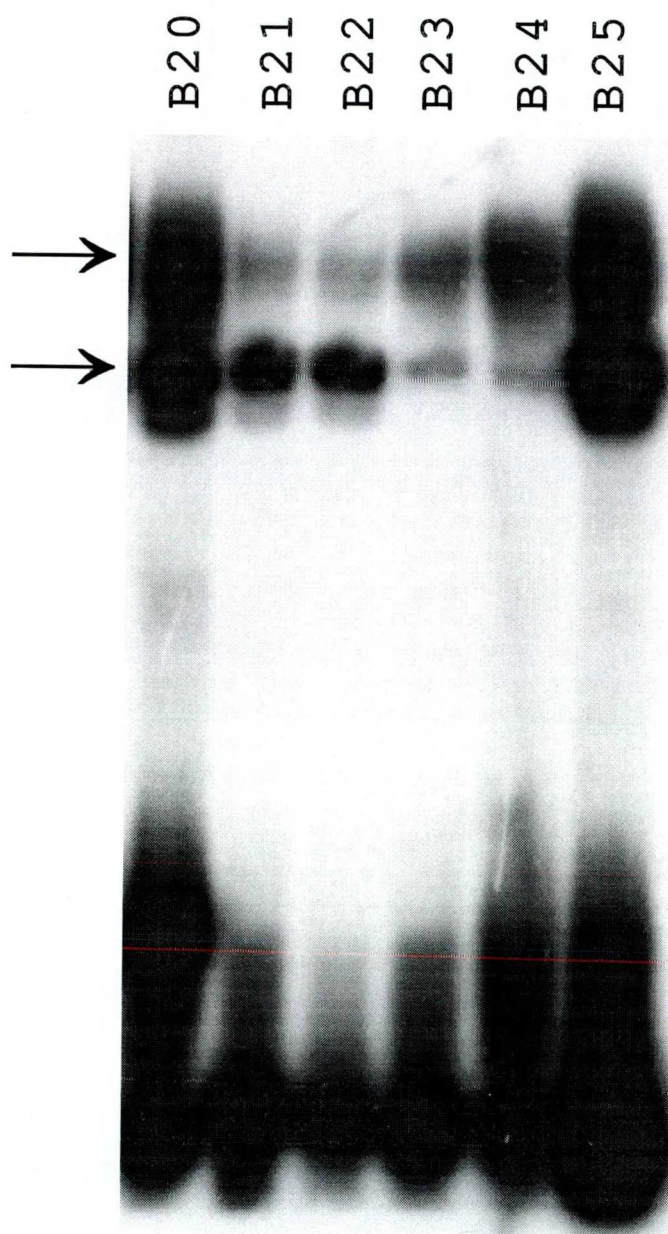
6. ábra: A második 21 bp-os BLV elemet és annak mutáns változatait tartalmazó oligonukleotidok szekvenciája. A mutáns nukleotidok elhelyezkedését feltüntettük. A központi, CRE-szerű elem szekvenciáját aláhúzással jelöltük. A nyilak a 21 bp-os elemek határát jelzik.

Az egyes oligonukleotidok két-két kópiáját a BLV tax proteinnel már nem aktiválható, BLV minimál promótert tartalmazó pB16R plazmidba építettük be. Az így létrehozott szintetikus promóterek aktiválhatóságát *in vivo* HeLa sejtekben teszteltük.

Az *in vivo* mért aktivitás értékek alapján három konstrukció őrizte meg tax-aktiválhatóságát (7. ábra). Az egyik a vad típusú szekvenciát hordozó pB16-20d. A másik, a pB16-22d, a CRE motívumot 5' oldalról határoló részben tartalmazott mutációkat. A harmadik, pB16-25d plazmidban, egy pontmutációval a CRE konszenzus szekvenciáját alakítottuk ki. A három, tax-aktiválhatóságát elvesztett konstrukcióban a mutációk a központi CRE elemet (pB16-21d), illetve az ezt 3' oldalról határoló szekvenciát (pB16-23d, pB16-24d) érintették.



7. ábra: A szintetikus oligonukleotidokat tartalmazó promóterek *in vivo* aktivitása. A plazmidok elnevezésében a beépített oligonukleotidokat is feltüntettük. A kísérletben a promóter konstrukciókból 3 μ g-ot transzfektáltunk 1 μ g, tax proteint termelő pXBRS plazmiddal (+), illetve anélkül (-).



8. ábra: A szintetikus 21 bp-os elemek fehérje kötésének *in vitro* vizsgálata. A reakciókban ^{32}P -vel jelzett szintetikus oligonukleotidokat (B20-25) és HeLa magi extraktumot használtunk. A kísérletben kimutatott két specifikus DNS-fehérje komplexet nyilak jelölik.

Az *in vivo* mért különböző aktivitás értékek alapján feltételeztük, hogy az egyes oligonukleotidokhoz kötődő fehérjék, a DNS szekvenciában kialakított mutációk miatt, eltérő mintázatot mutatnak. Az oligonukleotidok fehérje kötését *in vitro* gélretardációs kísérletben ellenőriztük (8. ábra). HeLa sejtextraktumot és a vad típusú B20 oligonukleotidot alkalmazva két specifikus DNS-fehérje komplexet sikerült kimutatnunk. Az alacsonyabb mobilitású komplex a B21, B22 és B23 oligonukleotidokkal nem volt detektálható. A magasabb mobilitású komplex, a 21 bp-os elem 3' részében mutáns B23 és B24 oligonukleotidokkal nem volt kimutatható.

Az oligonukleotidok *in vivo* és *in vitro* vizsgálatával kapott eredményeket a 9. ábra foglalja össze. Az adott oligonukleotidot tartalmazó promóter aktivitása és a hozzá kapcsolódó fehérjemintázat egy összetett fehérje-DNS kölcsönhatási rendszert valószínűsít. Az eredmények alaposabb vizsgálata két, a tax-aktivációban valószínűleg fontos fehérje kötőhelyre utal. Az egyik a 21 bp-os elemek központi részében elhelyezkedő CRE-szerű motívum, a másik a 3' határoló szekvenciában azonos az AP-4 fehérje konszenzus felismerőhelyével.

CAT aktivitás			DNS-fehérje komplex	
			AP4	CRE
+	B20	T C G A A A A G C T G G T G A C G G C A G C T G G T G G C T A G	+	+
-	B21 A C G	+	-
+	B22 G C T	+	-
-	B23 T C . C C	-	-
-	B24 G C T	-	+
+	B25 T	+	+

9. ábra: A szintetikus oligonukleotidok *in vivo* és *in vitro* vizsgálatával kapott eredmények összesítése. Az eredmények alapján, a tax-aktivációban fontos szerepet játszó fehérje kötőhelyeket feltüntettük.

1.c A CREB α protein és a 21 bp-os elem *in vitro* kölcsönhatásának vizsgálata

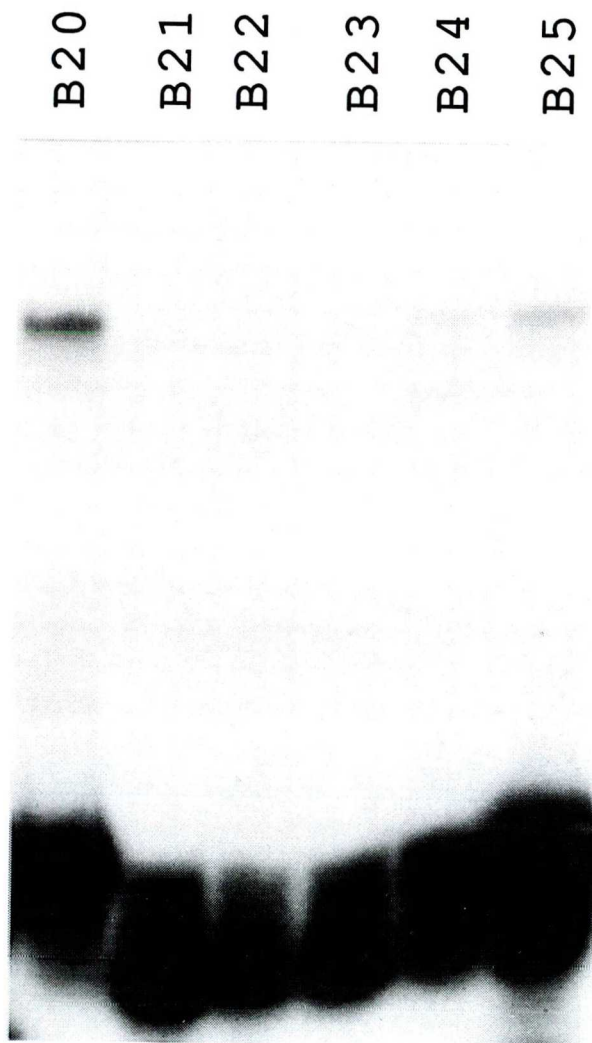
A 21 bp-os elemek központi részén elhelyezkedő CRE elem szerepét a tax-aktivációban mind a HTLV-I vizsgálatával nyert adatok, mind pedig saját kísérleteink eredményei megerősítették. Az irodalomból számos olyan fehérje ismert, amely képes a CRE konszenzus szekvenciáját felismerni és ahhoz kapcsolódni. Ezek közül az ATF/CREB családba tartozó fehérjék közül a CREB α protein szerepét vizsgáltuk meg a BLV tax-aktivációban. Választásunk azért esett éppen a CREB α proteinre, mert ez az ATF/CREB család egyik legrégebben ismert és funkcionálisan

legrészletesebben jellemzett tagja, illetve, mert a BLV promóter aktiválhatóságához hasonlóan, előfordulása nem mutat szövetspecifitást.

Először gélretardációs kísérletben meg akartuk vizsgálni, hogy a CREB α képes-e kapcsolódni a 21 bp-os elemekhez. Ehhez nagyobb mennyiségű CREB α proteinre volt szükségünk. A CREB α bakteriális túltermeléséhez a fehérjét kódoló cDNS-t, *NdeI-BamHI* fragmentumként, a pET11a expressziós vektorba klónoztuk. A fehérje termeltetése előtt az üres vektort tartalmazó, indukált mintákból készített sejtextraktummal ellenőriztük, hogy termelődnek-e olyan bakteriális fehérjék, amelyek képesek kapcsolódni a 21 bp-os elemekhez. Kísérleti körülményeink között a B20 oligonukleotid egyetlen bakteriális fehérjével sem képezett komplexet. Ezt követően, a már a CREB α fehérjét termelő baktériumokból készített teljes sejtextraktumot közvetlenül használhattuk a gélretardációs kísérletekben.

A fentebb már leírt B20-25 oligonukleotidokkal és a túltermelt CREB α proteint tartalmazó sejtextraktummal elvégeztük az *in vitro* DNS-fehérje kölcsönhatás vizsgálatát (10. ábra). A kísérlet eredménye azt mutatja, hogy a CREB α specifikus komplexet képez a 21 bp-os elemmel. A komplex kialakulását a 21 bp-os elem egyes részein elhelyezkedő pontmutációk a B21,22,23 oligonukleotidoknál gátolták. A B20,24, és B25 oligonukleotidokkal ellenben jól detektálható volt a DNS-fehérje komplex kialakulása. A komplexnek mind a mobilitása, mind az egyes oligonukleotidokkal kialakított kölcsönhatásának mintázata megegyezik a fentebb már leírt,

HeLa extraktummal elvégzett kísérletben az alacsonyabb mobilitású komplex megfelelő tulajdonságaival. Ennek alapján az alacsonyabb mobilitású komplexet a CRE elem és a hozzá kapcsolódó fehérje komplexeként azonosítottuk.

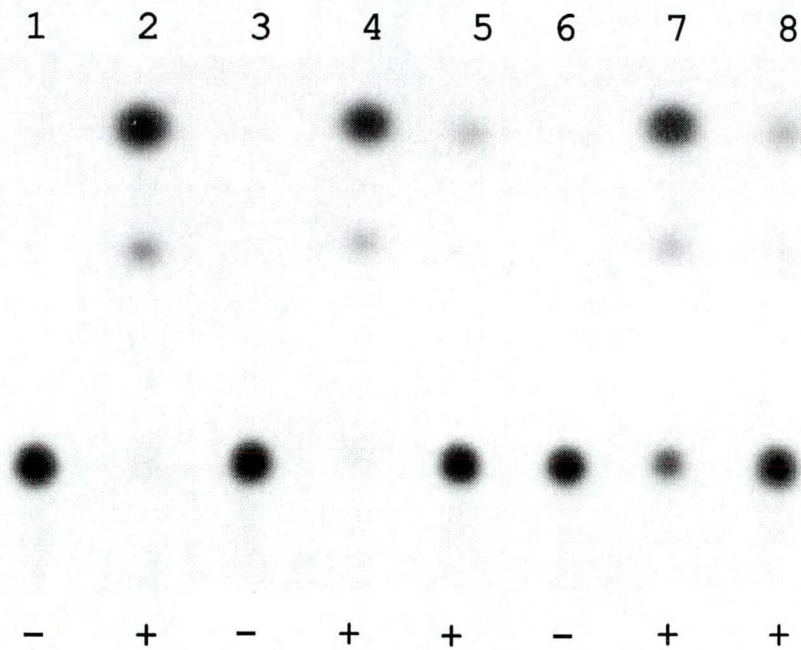


10. ábra: A CREB α fehérje és a BLV 21 bp-os elemek *in vitro* kölcsönhatása. A reakciókban ^{32}P jelzett szintetikus oligonukleotidokat (B20-25) és a túltermelt CREB α proteint tartalmazó bakteriális sejtextraktumot használtunk.

1.d A CREB fehérjék szerepe a tax-aktivációban

Miután a CREB α fehérje és a 21 bp-os elemben található CRE szekvencia *in vitro* kölcsönhatását bizonyítottuk, a CREB α tax-aktivációban betöltött *in vivo* szerepét akartuk megvizsgálni. Ennek érdekében egy olyan plazmidot hoztunk létre, amelyről a CREB α N-terminális része antiszensz orientációban íródik át. A CREB α cDNS HindIII-KpnI fragmentumát fordított orientációban építettük be a pRSVCAT plazmidba, létrehozva az ASCREB konstrukciót. Az átíródo antiszensz RNS képes meggátolni a sejtben a CREB α képződését. Mivel az antiszensz orientációba beépített szakasz a molekulának egy olyan részletét kódolja, ami az ATF/CREB család minden eddig ismert tagjában megtalálható, az antiszensz RNS a sejtben az összes CREB fehérje szintézisét gátolni képes.

Az ASCREB plazmidot a tax proteint expresszáló plazmiddal és a BLV LTR-t tartalmazó riporter plazmiddal együtt transzfektáltuk HeLa sejtekbe. A 11. ábrán látható aktivitás értékekből leolvasható, hogy az antiszensz konstrukció a tax-aktivációt jelentős mértékben csökkentette. A gátlás az antiszensz RNS hatásaként magyarázható, mivel a korábban, azonos körülmények között elvégzett kísérletekben az üres vektor az aktiváció mértékét nem befolyásolta.



11. ábra: A CREB α fehérje *in vivo* hatása a BLV tax transzaktivációra. A reakciókban 3 μ g, a teljes BLV LTR-t tartalmazó pBLH2CAT riporter plazmidot használtunk aktiválás nélkül (-), illetve 1 μ g pXBRS, a tax proteint expresszáló plazmiddal aktiválva (+). A 3. és 4.oszlopban 2 μ g, az 5.oszlopban 4 μ g ASCREB konstrukciót, a 6. és 7.oszlopban 2 μ g, a 8.oszlopban 4 μ g pRSVCREB plazmidot használtunk transzfektáláshoz.

Az antiszensz konstrukcióval elvégzett kísérletek megerősítették a CREB fehérjék szerepét a tax-aktivációban, de a CREB α jelentőségéről nem adtak felvilágosítást. A további kísérletekhez elkészítettük a már a teljes CREB α fehérjét termelő eukarióta expressziós plazmidot. A CREB α cDNS-t *BglIII-BamHI* fragmentumként klónoztuk a pRSVCAT plazmidba. A CREB α proteint expresszáló pRSVCREB plazmid hatását a tax-aktivációra az antiszensz kísérletekkel megegyező rendszerben vizsgáltuk. A kísérlet eredményeként azt vártuk, hogy ha a CREB α valóban a tax-aktiváció egyik fontos közvetítője, akkor a fehérje mennyiségének sejten belüli megnövelése a transzaktiváció mértékének fokozásához vezet. Feltételezésünket a kapott eredmények megcáfolták (11. ábra, 6-8.reakció). A CREB α mennyiségének megnövelése az aktiváció jelentős csökkenését okozta. Ennek egy lehetséges, általunk elfogadott magyarázata, hogy nem a CREB α , hanem egy másik CREB protein az aktivációs komplex valódi tagja. A sejtben nagy mennyiségben túltermelt CREB α a CRE elemhez kötődve, illetve beépülve az aktivációs komplexbe, felfüggeszti a tax aktiváló hatását.

1.e Az AP-4 fehérje szerepe a BLV tax transzaktivációban

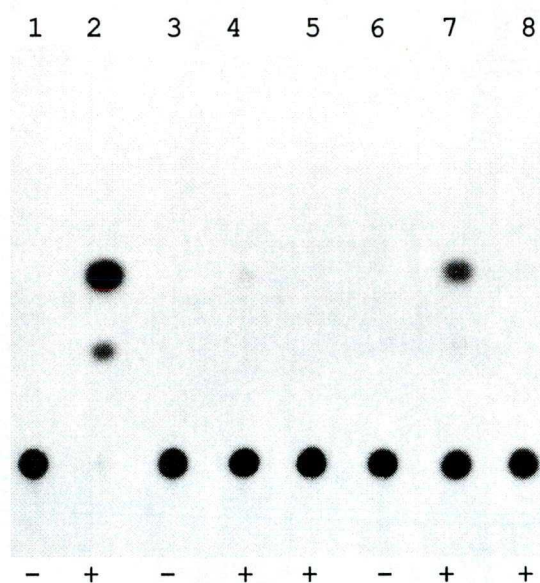
A szintetikus oligonukleotidokkal elvégzett *in vitro* gélretardációs és *in vivo* aktivitás mérési kísérletekben a CRE elemén kívül a 21 bp-os elemek 3' részén elhelyezkedő, az AP-4 fehérje konszenzus kötőhelyével megegyező

motívumot is azonosítottunk, mint a tax-aktivációban fontos szekvencia elemet. A feltételezett AP-4 kötőhely és a hozzá kapcsolódó AP-4 fehérje pontos szerepének a megítélése további kísérleteket tett szükségessé. Hasonlóan a CREB α vizsgálatánál követett eljáráshoz, az AP-4 fehérje szerepét először egy olyan rendszerben kívántuk vizsgálni, amely a tax-aktivációhoz szükséges minden elemet tartalmaz, kivéve magát az AP-4 proteint.

Első lépésként az AP-4 cDNS (R. Tjian ajándéka) *HindIII-StuI* fragmentumát fordított orientációban építettük be a pRSVCAT plazmid promótere mögé. Az ilyen módon létrejött pRSVAS plazmidról átíródó antiszensz RNS képes felfüggeszteni a sejtben az endogén AP-4 fehérje termelődését. Az antiszensz AP-4 RNS hatását tranziens expressziós rendszerben vizsgáltuk. A BLV LTR-t tartalmazó riporter és a tax proteint expresszáló plazmiddal együtt transzfektálva a pRSVAS a tax-aktiváció mértékének csökkenését okozta (12. ábra, 1-5.reakció). A csökkenés mértéke arányos volt a pRSVAS alkalmazott koncentrációjának a növekedésével. A kísérlet eredménye alapján elmondhatjuk, hogy az AP-4 fehérje hiányában a BLV tax protein nem képes a BLV promóter teljes mértékű aktiválására.

A következő lépésben a túltermelt AP-4 fehérje hatását kívántuk megvizsgálni. A rendelkezésünkre álló AP-4 cDNS-t *HindIII-BamHI* fragmentumként építettük be a pRSVCAT eukarióta expressziós vektorba, ezáltal kialakítva a pRSVAP4 plazmidot. Az általunk is használt, az irodalomban eddig leírt leghosszabb AP-4 cDNS nem

tartalmazza az AP-4 fehérje teljes hosszúságú kódoló szekvenciáját. A pRSVAP4 plazmidról így egy olyan deléciós fehérje termelődik, amelyből az N-terminálisan elhelyezkedő néhány aminosav hiányzik. A pRSVAP4 tranziens expressziós vizsgálatának az eredménye a 13. ábra 6-8. reakciójában látható. A deléciós AP-4 protein a tax-aktiváció erőteljes gátlását okozta. Az antiszensz és az e kísérlet eredménye közötti látszólagos ellentmondás a kísérleteinkben használt AP-4 cDNS szerkezetével magyarázható. A pRSVAP4 plazmidról expresszálandó deléciós fehérje, a szerkezetéből hiányzó, valószínűleg igen fontos aminosavak nélkül, nem képes a tax-aktiváció közvetítésére.



12. ábra: Az AP-4 fehérje *in vivo* hatása a BLV tax transzaktivációra. Az egyes reakciókban 3 μ g pBLH2CAT plazmidot transzfektáltunk 1 μ g pXBRS plazmiddal aktiválva (+), illetve aktiválás nélkül (-). A 3. és 4.oszlopban 2 μ g, az 5.oszlopban 4 μ g pRSVAS plazmidot transzfektálva az antiszensz AP-4, a 6. és 7.oszlopban 2 μ g, a 8.oszlopban 4 μ g pRSVAP4 plazmidot használva az AP-4 protein tax-aktivációra gyakorolt hatását vizsgáltuk.

2. A BLV tax protein szerkezetének mutációs elemzése

A BLV tax protein bizonyos sejtfehérjéken keresztül kapcsolódik a BLV LTR U3 régiójában található 21 bp-os enhanszer elemekhez, és aktiválja a vírus promóterről induló transzkripciót. A tax transzaktiváció mechanizmusát két megközelítésben kívántuk vizsgálni. Az egyik, az előző fejezetben már leírt megközelítés a tax-érzékeny DNS szekvenciák és ezen keresztül a hozzájuk kapcsolódó sejtfehérjék analízisét jelenti. A tax-aktiváció vizsgálatának másik oldala a tax fehérje szerkezetének az elemzését foglalja magában. Ennek során, a tax fehérjében kialakított deléciók, illetve pontmutációk segítségével a transzaktivációban fontos aminosavakat, molekularészleteket szeretnénk volna feltérképezni.

A BLV tax funkcionális elemzését egy olyan rendszerben kívántuk végrehajtani, melyben csak a transzaktiváló domént érintő mutációk vezetnek a molekula inaktiválásához. Kísérleteinknél egy Sadowski és Ptashne (1989) által kidolgozott módszert alkalmaztunk. Ez a módszer lehetővé teszi a DNS-hez közvetlenül nem kötődő transzaktivátorok, illetve fehérjék feltételezett aktivátor doménjeinek a vizsgálatát. Lényege, hogy a vizsgálandó fehérjéhez/doménhez az élesztő GAL4 aktivátor GAL(1-147) DNS-kötő doménjét fúzionáltatjuk. A GAL(1-147) targetszekvenciája ismert, így a létrejött fúziós fehérje aktivitása a GAL(1-147) protein kötőhelyét is tartalmazó promóteren vizsgálható. Az alkalmazott rendszerben a DNS-kötő domén és annak targetszekvenciája a tax-érzékeny DNS

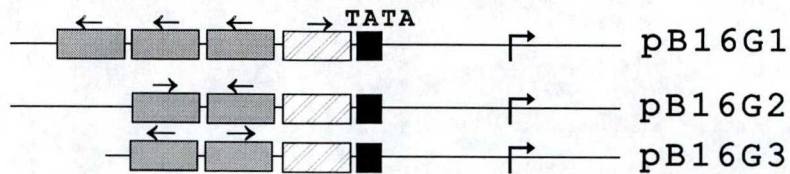
elemeket és a hozzájuk kapcsolódó, a tax fehérjével közvetlen kölcsönhatásba lépő sejtfehérjéket helyettesíti.

2.a GAL oligonukleotidot tartalmazó promóterek szerkesztése

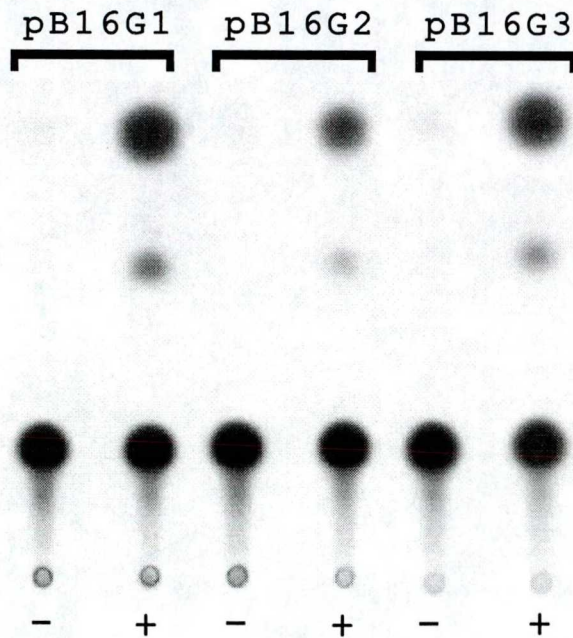
A fúziós fehérjék vizsgálatához egy olyan BLV típusú promóterre volt szükségünk, amely tartalmazza a GAL(1-147) felismerő szekvenciáját is. A megfelelő promóter kialakításához a pB16R plazmidot használtuk, amely a TATA boxon kívül egy BLV 21 bp-os elemet tartalmaz. Ez a BLV minimál promóter önmagában nem aktiválható a tax proteinnel. A pB16R plazmidban található *Bgl*II helyre *Xba*I linkerek felhasználásával építettük be a GAL(1-147) felismerőhelyét tartalmazó oligonukleotidot. A kapott klónokban restrikciós emésztéssel ellenőriztük a beépült oligonukleotidok számát és orientációját. A létrehozott konstrukciók közül hármat választottunk ki a további kísérletekhez. Korábbi, a HTLV-I és a BLV promóter részletes elemzését célzó kísérleteink eredményeiből tudtuk, hogy a HTLVI-BLV hibrid promóter, melyben az első 21 bp-os elem a BLV-ből, a másik kettő a HTLV-I-ből származik, aktiválható a HTLV-I tax fehérjével. Ennek alapján feltételeztük, hogy az első 21 bp-os BLV elemet és a GAL(1-147) kötőhelyét tartalmazó promóter konstrukciók aktiválhatók a HTLVI_{tax}-GAL(1-147) fúziós fehérjével. Ezért a három kiválasztott GAL4 oligonukleotidot tartalmazó promóter aktiválhatóságát a rendelkezésünkre

álló HTLVitax-GAL(1-147) fúziós fehérjével, tranziens expressziós rendszerben ellenőriztük.

a



b



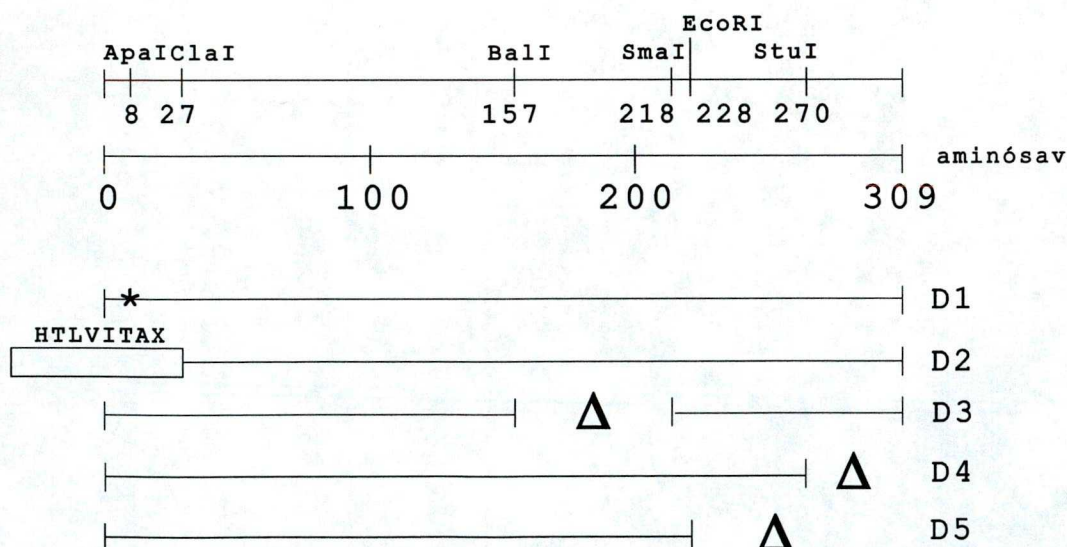
13. ábra: A GAL4 oligonukleotidot tartalmazó promóter konstrukciók a/ szerkezete és b/ *in vivo* mért aktivitása. a/ A GAL4 oligonukleotidokat jelképező pontozott részek felett a nyilak az oligonukleotidok orientációját jelzik. A satírozott rész a BLV 21 bp-os elem helyzetét mutatja. A transzkripció kezdőpontját nyíllal jeleztük. b/ Az aktivitás méréshez a pB16G1-3 promóter konstrukciókból 4-4 μg -ot transzfektáltunk 1 μg , a HTLVitax-GAL(1-147) fúziós fehérjét expresszáló pTG14 plazmiddal (+), illetve anélkül (-).

(A HTLVItax-GAL(1-147) fúziós fehérjét a csoportunkkal együttműködő S. J. Marriott és munkatársai készítették és tesztelték.) A 13. ábráról leolvasható, hogy mind a három promóter konstrukció aktiválható a HTLVItax-GAL(1-147) fúziós fehérjével. Az *in vivo* aktivitás értékek alapján a leginkább aktiválhatónak a GAL4 oligonukleotid három, fordított orientációjú kópiáját tartalmazó pB16G1 plazmid bizonyult. A tervezett, fúziós BLV tax mutánsok tesztelésére ezért a pB16G1 plazmidot választottuk.

2.b BLVtax-GAL(1-147) fúziós fehérjék létrehozása és aktivitásuk *in vivo* vizsgálata

A BLV tax szerkezetéről, az egyes funkciókhoz rendelhető molekularészletekről nem álltak rendelkezésünkre irodalmi adatok. A tax szerkezetének analízisét ezért úgy terveztük meg, hogy az egyes mutációk a polipeptidlánc különböző részeit érintsék. A létrehozott mutáns peptidek szerkezete a 14. ábrán látható. Két, az N-terminális részben mutációt tartalmazó fehérjét hoztunk létre. A D1-gyel jelzett mutáns tax fehérje egy G:A nukleotid csere következtében a nyolcadik pozícióban glicin helyett arginint tartalmaz. Az arginin beépítésével megbontottuk a molekula N-terminális részének neutrális aminosavakból felépülő láncát. A pontmutáció egy *ApaI* hasítási helyet érint, így jelenléte az *ApaI* enzimmel tesztelhető. A D2 jelzésű egy hibrid fehérje. A HTLV-I tax N-terminális 59 aminosavát kódoló szekvenciát a *ClaI* hely

felhasználásával fúzionáltattuk a BLV tax *ClaI* helytől N-terminálisan deléciós származékát kódoló génhez. A D3 molekulánál a polipeptidlánc középső régiójában, a *BalI-SmaI* hasítási helyek közötti szakaszt távolítottuk el. A D4 és D5 mutánsok a molekula C-terminális részében tartalmazznak deléciót. A D4 jelzésűből a *StuI* helytől, a D5-ből az *EcoRI* helytől 3' irányban elhelyezkedő szekvenciák hiányoznak. A BLV tax mutáns változatait és magát a vad típusú fehérjét kódoló BLV tax gént is a pSG424 plazmid *SmaI* helyére építettük be. Az ilyen módon kialakított fúziós fehérjék aktivitását, a GAL4 oligonukleotidot is tartalmazó pB16G1 riporter konstrukcióval együtt majom COS7 sejtekbe transzfektálva, tranziens expressziós rendszerben vizsgáltuk



14. ábra: A BLV tax génben kialakított mutációk elhelyezkedése. A felhasznált restriktív enzimek hasítási helyeit a felső sorban tüntettük fel.



A kísérlet várakozásunkkal ellentétes, meglepő eredménnyel szolgált (14. ábra). Nemcsak a mutációt tartalmazó fehérjék, hanem a vad típusú szekvenciát hordozó fúziós protein is elveszítette aktivitását. Ennek egy lehetséges magyarázata, hogy a fúzió révén a BLV tax háromdimenziós szerkezetében létrejött változások a fehérje inaktiválásához vezettek. Az aktív fúziós fehérje hiányában a mutánsok elemzését sem tudtuk elvégezni. A kísérlet eredménye alapján levonhatjuk a következtetést, hogy a Sadowski és Ptashne által kidolgozott GAL fúziós rendszer nem alkalmas a BLV tax protein erősen konzervatív szerkezetének a vizsgálatára.

VI. AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA ÉS ÉRTÉKELÉSE

A retrovírusok, behatolva a sejtbe, egy kettős szálú DNS formájában beépülnek a gazdasejt genomjába. Ettől kezdve az integrálódott provírus génjeiről, a sejtgenom részeként, a sejt transzkripciós apparátusa szintetizálja az RNS molekulákat. Néhány retrovírus az előbb leírtnál aktívabb szerepet játszik saját génjeinek kifejeződésében. Ezeknek a retrovírusoknak a genomja, néhány DNS vírushoz hasonlóan, a génexpressziót aktiváló szabályozó fehérjét is kódol. Az aktivátor protein, bizonyos virális szekvenciákon keresztül, rendkívüli mértékben képes fokozni a vírus promóterről induló transzkripciót.

A szarvasmarha leukémia vírus genomja tartalmaz egy úgynevezett X régiót, melyről több, a vírus gének kifejeződését szabályozó fehérje íródik át. A szabályozó fehérjék egyike, a BLV tax protein, a virális transzkripció erős aktivátora. A vírus LTR U3 régiójában azonosítottak enhanszer elemeket, amelyek nélkülözhetetlenek az aktiváló hatás létrejöttéhez. A BLV tax nem közvetlenül, hanem valószínűleg bizonyos celluláris fehérjéken keresztül kapcsolódik ezekhez a 21 bp-os ismétlődésekhez. Mivel a vírus promóterben található enhanszerek és a tax protein is celluláris fehérjékkel kölcsönhatásban aktiválja a génátírást, szervesen illeszkedniük kell az eukarióta sejtben kialakult jel és kölcsönhatás rendszerbe. Ezért a tax transzaktiváció tanulmányozásával kapott eredmények hozzájárulnak az

eukarióta transzkripció folyamatának alaposabb megismeréséhez.

Dolgozatunkban a BLV tax transzaktiváció mechanizmusával kapcsolatos vizsgálatainkat foglaltuk össze. Ezek egy része a vírus promóterben található tax-érzékeny szekvenciák elemzésére és a hozzájuk kapcsolódó sejtfehérjék azonosítására irányult.

Elsőként a BLV LTR U3 régió deléciós analízisét végeztük el. A deléciós konstrukciók *in vivo* aktivitás vizsgálatának eredménye megerősítette az eredményeinkkel párhuzamosan, Katoh és munkatársai (1989) által közölt adatot, miszerint a promóterben található 21 bp-os elemek a tax-aktiváció legfontosabb közvetítői, illetve, hogy már két ilyen enhanszer elem is elegendő az aktiváló hatás kialakulásához. A már csak egy 21 bp-os elemet és az első és második elemet összekötő szekvenciát tartalmazó konstrukció, kis mértékben ugyan, de aktiválható volt a tax proteinnel. Ez az eredmény arra utal, hogy bár az aktivációt döntő mértékben a 21 bp-os elemek közvetítik, az ezeken kívül elhelyezkedő nukleotidok szintén befolyással lehetnek a transzaktivációra. A TATA boxon kívül csupán egy 21 bp-os motívummal rendelkező promóter teljesen elveszítette aktiválhatóságát. Ezt a pB16R elnevezésű plazmidot a további kísérletekben mint önmagában nem aktiválható BLV minimál promótert használtuk.

A következő lépésben, *in vivo* kísérletekben a 21 bp-os elemekben kialakított pontmutációk segítségével az aktivációhoz nélkülözhetetlen nukleotidokat, illetve

szekvencia-motívumokat próbáltuk meg azonosítani. Ezeknél a vizsgálatoknál olyan riporter plazmidokat használtunk, melyek a BLV minimál promótere előtt két kópiában tartalmazták a második 21 bp-os elem vad típusú, illetve mutáns szekvenciáját hordozó szintetikus oligonukleotidokat. A vad típusú szekvenciát tartalmazó konstrukció aktiválható volt a tax proteinnel. A mutáns szekvenciát hordozó promótereknél a 21 bp-os elem központi, illetve 3' részét érintő változtatások az aktiválhatóság felfüggesztését okozták. Az oligonukleotidokkal elvégzett *in vitro* gélretardációs kísérletekben két specifikus DNS-fehérje komplexet sikerült kimutatnunk. Az egyes komplexek kialakulása korrelációban állt a 21 bp-os elem különböző részeit érintő mutációk jelenlétével. Az *in vivo* aktivitás értékek és a gélretardációs kísérletben kapott eltérő fehérje kötési mintázat együttes elemzésével két, a tax-aktivációban valószínűleg fontos szerepet játszó fehérje kötőhelyet és a hozzájuk kapcsolódó HeLa sejtféhrjét sikerült kimutatnunk. Az egyik, a 21 bp-os elem központi részén elhelyezkedő motívum az ATF/CREB fehérjék, az ettől 3' irányban található motívum pedig az AP-4 fehérje felismerőhelyének konszenzus szekvenciájával volt azonos.

A BLV, illetve a vele rokon HTLV-I vírus vizsgálatával kapott irodalmi adatok már utaltak rá, hogy a BLV 21 bp-os elemek központi részén elhelyezkedő CRE-szerű motívum valószínűleg fontos szerepet játszik a transzaktivációban. A CRE elemen keresztül számos fehérje

képes kapcsolódni a DNS-hez. Ezeknek az ATF/CREB családba tartozó fehérjéknek a tax-aktivációban betöltött szerepét a CREB α protein vizsgálatán keresztül szerettük volna kimutatni. A CREB α a fehérje család egyik legrégebben ismert, részletesen jellemzett tagja. Szerkezetében tartalmaz olyan doméneket, melyek minden eddig ismert CREB fehérjében megtalálhatók.

A CREB α proteint bakteriális rendszerben túltermeltük, majd a túltermelt fehérje és a 21 bp-os elem mutáns változatait tartalmazó oligonukleotidokkal gélretardációs kísérletet hajtottunk végre. Az *in vitro* DNS-fehérje kölcsönhatás vizsgálatban kimutattuk, hogy a CREB α képes specifikus kölcsönhatásba lépni a 21 bp-os elemmel. A különböző mutáns oligonukleotidokkal detektálható komplexet, mobilitása és megjelenési mintázata alapján, a HeLa extraktummal elvégzett, hasonló kísérletben kimutatott alacsony mobilitású komplexel azonosítottuk. Az egymást megerősítő *in vitro* eredmények után a CREB fehérjék *in vivo* szerepét akartuk megvizsgálni. Létrehoztunk egy olyan konstrukciót, mely a CREB α konzervatív doménjeit kódoló szekvenciát antiszensz orientációban tartalmazta. Az erről a plazmidról átíródó antiszensz RNS képes szelektíven csökkenteni a CREB fehérjék sejtszintjén termelődését. Az antiszensz konstrukció *in vivo* mért, tax-aktivációt gátló hatása alátámasztotta, hogy a CREB fehérjék jelentős szerepet játszanak az aktiváló hatás kialakításában. A tranziens expressziós rendszerben a CREB α -t termelő plazmiddal elvégzett *in vivo* kísérletekben szintén a transzaktiváció csökkenését

tapasztaltuk. Ennek legvalószínűbb magyarázata, hogy nem az általunk vizsgált CREB α , hanem egy másik CREB fehérje a tax-aktiváció tényleges közvetítője. A CREB α mesterségesen megnövelt mennyisége a sejtben kompetícióba lépett az aktivációs komplexben valóban résztvevő CREB fehérjével, és valószínűleg fehérje-fehérje kölcsönhatáson keresztül megakadályozta az aktiváló hatás kialakulását (Kiss-Tóth és mtsai. 1993). A CREB fehérjék szerepét vizsgáló kísérleteinket követően jelent meg Willems és munkatársainak (1992) a közleménye, melyben a CREB2 proteint azonosítják, mint a BLV 21 bp-os elemekhez *in vitro* kötődő és a BLV LTR-t transzaktiváló celluláris faktort.

A szintetikus 21 bp-os elemek vizsgálatával azonosított, a transzaktiváláshoz szükséges másik motívum az AP-4 fehérje felismerő szekvenciáját tartalmazta. Annak eldöntésére, hogy a feltételezett felismerőhely, illetve a hozzá kapcsolódó AP-4 fehérje résztvesz-e a tax aktivációs hatásának kialakításában, tranziens expressziós rendszerben, az AP-4 antiszensz RNS-ét termelő konstrukcióval lecsökkentettük a sejtben az endogén AP-4 fehérje termelődését. A sejtbeli AP-4 szint csökkentése a tax-aktiváció gátlását okozta. Mivel az általunk elvégzett számítógépes szekvencia analízis semmilyen homológiát nem mutatott ki az AP-4 és egyéb fehérjék szekvenciája között, a gátlás a sejtbeli AP-4 szint csökkenés hatásaként értelmezhető. A kísérlet eredménye alátámasztotta feltevésünket, miszerint az AP-4 fehérje a transzaktiváló folyamat kialakításának fontos résztvevője. A továbbiakban

direkt kísérlettel akartuk megerősíteni a kapott eredményt. Az AP-4 fehérjét termelő eukarióta expressziós vektort hoztunk létre. *In vivo* kísérletekben a nagy mennyiségben termelődő AP-4 fehérje a tax-aktiváció csökkenéséhez vezetett. Az előző kísérletnek látszólag ellentmondó eredmény magyarázatát az AP-4 cDNS szerkezetében találtuk meg. Az irodalomban eddig leírt leghosszabb, a kísérleteinkben is használt AP-4 cDNS nem tartalmazza a molekula N-terminális részét kódoló régiót. A hiányzó aminosavak a molekula aktív szerkezetének, illetve más fehérjékkel kölcsönhatásba lépő doménjeinek a kialakításában fontos szerepet játszhatnak. A tranziens expressziós rendszerben nagy mennyiségben termelődő deléciós fehérje, beépülve az aktivációs komplexbe, valószínűleg megbontja annak szerkezetét. Az ilyen módon inaktiválódott komplex már nem képes az aktiváló hatás kialakítására. Az AP-4 protein tax-aktivációban betöltött szerepének vizsgálata során elsőként sikerült azonosítanunk a BLV 21 bp-os elemek szélső régiójához kötődő, a transzaktiválásban résztvevő celluláris fehérjét.

Kísérleteink másik csoportja a tax protein szerkezeti vizsgálatára irányult. A transzaktivációhoz elengedhetetlen, az esetleges aktiváló domének részét képező aminosavakat, kisebb molekularészleteket akartuk azonosítani. Az alkalmazott kísérleti rendszer egy Sadowski és Ptashne által kidolgozott módszeren alapult. Az általunk kialakított BLV tax mutánsok, illetve a vad típusú fehérje génjét fúzionáltattuk az élesztő GAL4

aktivátor fehérje DNS-kötő doménjéhez. A fúziós fehérjék aktivitását a BLV minimál promótert és a GAL4 molekula felismerési szekvenciáját tartalmazó konstrukción teszteltük. Ebben a rendszerben sem a mutáns, sem az ép tax proteint tartalmazó fúziós fehérje sem mutatott aktivitást. Rendszerünk, illetve a promóter konstrukciók működőképességét a HTLVitax-GAL(1-147) fúziós proteinnel végzett előkísérletek igazolták. Ennek alapján a BLV tax-et tartalmazó fúziós fehérjék inaktiválódásának okát a fúziós fehérje szerkezetében kell keresnünk. A BLV tax mutációs analíziséről megjelent közlemények (Willems és mtsai. 1989, Sakurai és mtsai. 1991) arról számolnak be, hogy a protein szerkezetében létrehozott apró változtatások is, szinte kivétel nélkül, a molekula inaktivációjához vezettek. A fúziós fehérjék kialakítása során a tax térbeli szerkezete olyan változásokat szenvedhetett, melyek az aktív konformáció elvesztését okozták.

VII. AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

A BLV tax fehérje transzaktiváló mechanizmusának vizsgálata során a következő eredményeket sikerült elérnünk, bizonyítanunk:

1. A BLV promóter régió deléciós elemzése során igazoltuk, hogy a promóterben található 21 bp-os ismétlődések önmagukban, egyéb szekvencia elemek nélkül is képesek a tax-aktiváció közvetítésére, illetve, hogy már két 21 bp-os elem jelenléte is elegendő az aktiváló hatás kialakításához.

2. A 21 bp-os elemek szekvenciájának *in vitro* és *in vivo* elemzésével két, a tax-aktivációban fontos szerepet játszó fehérje kötőhelyet sikerült azonosítanunk: az egyik a 21 bp-os elemek központi részén elhelyezkedő CRE motívum, a másik az AP-4 transzkripciós faktor kötőhelye a 21 bp-os elemek 3' régiójában.

3. *In vivo* kísérletekben kimutattuk, hogy a 21 bp-os elemekben található CRE motívumhoz kapcsolódó CREB fehérje, de nem az általunk vizsgált CREB α a BLV tax transzaktiváció közvetítője.

4. *In vivo* kísérletekkel bizonyítottuk, hogy az AP-4 transzkripciós faktor részese a BLV tax aktivációs komplexnek. Az AP-4 hiányában a BLV tax nem képes a vírus promóter transzaktiválására.

5. A BLV tax szerkezetének mutációs elemzésére irányuló kísérleteink során bebizonyosodott, hogy az általunk alkalmazott GAL fúziós rendszer, ellentétben a

HTLV-I tax proteinnel, a BLV tax erősen konzervált szerkezetének a vizsgálatára nem alkalmas.

VIII. ANGOL NYELVŰ ÖSSZEFOGLALÓ

INVESTIGATION OF THE MECHANISM OF BOVINE
LEUKEMIA VIRUS TRANSACTIVATOR PROTEIN, TAX

Introduction

Bovine leukemia virus (BLV) is the causative agent of enzootic bovine leukosis, a lymphoproliferative disease of cattle. BLV is one member of the class of retroviruses that includes human T-cell leukemia virus types I and II and simian T-cell leukemia virus. These viruses have been taxonomically grouped within the oncovirus subfamily of the Retroviridae. Some biological properties and the molecular structure of viruses in the HTLV-BLV group of retroviruses are quite distinct from those of other members of the oncovirus subfamily of retroviruses. Although these are oncogenic and transforming viruses, they do not harbor oncogene sequences derived from the cellular genome, and their replication is regulated by at least two other viral genes known as *tax* and *rex*.

The overall genetic structure of BLV is similar to that of other retroviruses, with the major virion proteins encoded 5'-*gag-pol-env*-3'. However, in addition to the usual complement of *gag*, *pol* and *env* genes, there is a region at the 3' end of the genome not found in other replication competent retroviruses. At least two new genes



have been identified in this region. One is known as the *tax* gene, encoding a protein responsible for transcriptional activation of the BLV long terminal repeat (LTR). A second protein, *rex*, is encoded in a region which partially overlaps that of the *tax* gene but is in an alternative reading frame. The regulatory activities of these proteins are essential for efficient replication of the virus.

The *tax* protein of BLV is a 38kDa nuclear protein that activates transcription from the BLV LTR promoter as well as from other cellular and viral promoters such as the *c-fos* and somatostatin genes promoters and the adenovirus E3 and E4 promoters. Moreover, *tax* has been suspected to be involved in BLV leukaemogenesis, and indeed it has been shown that *tax* transforms rat primary fibroblasts in cooperation with the Ha-ras oncogene product, although the direct relationship between this activity and the trans activating activity is not well understood.

The LTRs contain enhancer elements mediating *tax* trans activation. The most important of these activators are the 21 bp repeats found in three tandem copies in the U3 regions in the LTRs. Since *tax* does not bind directly to these elements, its activation effect is thought to be realized via interactions with so far unidentified cellular factors bound to the 21 bp repeats.

The aims of our work was a/ to localize sequence elements in the BLV LTR, which are essential for *tax* activation, and to identify proteins, which interact with

these cis acting regulatory regions b/ to investigate the domain structure of the tax protein and to map the locations of the activating amino acids/domains in the polipeptide. During our experimental work we relied on the results obtained from experiments with the HTLV-I system, which is closely related to that of the BLV.

Results and discussion

a/ To investigate BLV tax responsive elements, we constructed a set of plasmids containing deletions with different length in the BLV LTR U3 region. The copy number of the 21 bp repeats was reduced step by step. The deletion mutants were transfected with or without pXBRS, coding for the entire BLV tax, into HeLa cells and the activities were determined. Testing these plasmids we found that two copies of the 21 bp elements could serve as a sufficient target for BLV tax and that the region between the two proximal elements increased response to tax when in the context of the first 21 bp repeat. These data are in good agreement with the data of Kato et al. The promoter construct containing only one copy of the 21 bp repeats lost its ability to mediate tax activation. Cloning the synthetic oligonucleotides of the second 21 bp repeat in two copies upstream of this BLV minimal promoter restored tax responsiveness.

To investigate the role of the sequence motifs of the 21 bp elements in tax activation, we synthesised

oligonucleotides corresponding to wild type or mutant 21 bp repeat. As the experiments with the HTLV-I 21 bp repeats suggested the CRE-like elements, located in the center of the BLV repeats to be involved in tax activation, the mutations affected the central and the flanking regions of the repeat. We cloned the synthetic oligonucleotides in two copies upstream of the BLV minimal promoter. The resulting constructs with structure similar to the wild type LTR, were cotransfected with a tax expression plasmid into HeLa cells and their cat activities were determined. The results demonstrated that mutations affecting the central or the 3' region of the 21 bp repeat abolished tax responsiveness while mutation in the 5' region did not alter tax activity.

Using the above synthetic mutant or wild type 21 bp repeats and HeLa cell nuclear extract in gel mobility shift assays, we could detect two specific bands with varying intensity. The intensity of the higher mobility band correlated well with the mutations in the 3' flanking region, while the intensity of the lower mobility band correlated with the mutations affecting the central region. On the basis of the results, obtained from the *in vivo* and *in vitro* experiments with the synthetic 21 bp repeats, we could identify two protein binding sites, involved in tax activation. One, in the center of the 21 bp repeat, was homologous to the CRE motif, the other in the 3' flanking region was identical to the consensus binding site of the AP-4 transcription factor.

The experiments described above confirmed that the

CRE-like elements at the centre of the 21 bp repeats are involved in mediating tax activation. To determine whether these motifs are recognised by the cellular CRE binding factor (CREB) we carried out gel shift experiments. The CREB α protein was overexpressed in bacteria, and as labelled probes we used the above mentioned synthetic 21 bp repeats. In these experiments CREB α formed a complex with identical mobility and pattern we observed when HeLa nuclear extract was used instead of bacterially expressed CREB α . To determine, if this interaction takes place *in vivo* as well, we attempted to inhibit the expression of CREB in HeLa cells. For this purpose, a plasmid which directed the transcription of the N-terminal segment of CREB α in antisense orientation was constructed. The fragment of CREB encoded by this region is conserved in all known members of this protein family, consequently the antisense RNA product could inhibit the expression of all cellular CREB forms. In transient expression experiments this construct strongly reduced tax activation. The observed inhibition of trans activation with antisense CREB mRNA prompted us to test if overexpression of CREB would give rise to a higher level of trans activation. To test this, a plasmid directing the expression of CREB α was used in our transient expression system. Contrary to our expectation, CREB α inhibited tax trans activation. Our data indicate that a member of the CREB protein family, very similar to CREB α , plays a role in BLV tax trans activation. This protein can compete with CREB α for interaction with tax or some other factors.

The experiments with the synthetic 21 bp repeats made it probable that the protein binding to the AP-4 site in the 21 bp repeats, was required for BLV tax activation. To obtain more direct evidence about the proposed role of AP-4 protein in tax activation, we inhibited the production of endogenous AP-4 in HeLa cells with a plasmid directing the expression of the AP-4 cDNA in antisense orientation. In this way tax activation could be analysed in an *in vivo* system, which had only one component missing. In these experiments using increasing amount of the antisense construct, we could detect proportionally stronger decrease in the level of tax activation. As sequence analysis could not show any significant homology between the nucleotide sequence of AP-4 and other proteins, the effect of the antisense experiment could only result from the decreased level of the cellular AP-4 mRNA. It strongly suggests that in the absence of the AP-4 protein the functional tax activation complex can not be formed. Next we wished to investigate the effect of the overexpressed AP-4 protein on tax activation. Surprisingly, the overproduced AP-4 diminished tax activation. The explanation for this result, most probably, is in the structure of the AP-4 cDNA. The longest AP-4 cDNA isolated so far and used in our experiments, lacks some regions coding for the N-terminal part of the AP-4 protein. For this reason, the protein overproduced in the transient expression system in HeLa cells, is an N-terminal deletion product. Our data obtained from the above experiments, strongly suggest that

the cellular AP-4 forms a multiprotein complex with other cellular factors to mediate tax activation through the 21 bp repeats. However, when the N-terminal deletion product is expressed in huge amounts compared to the cellular counterpart, it might assemble in the complex. Due to the lack of the N-terminal domain, which seems to be important for the complex formation and may code for a protein interface, the deletion product disrupts the higher order structure of the complex and makes it unable to respond to tax activation.

b/ As a step toward a better understanding of the regulatory properties of BLV tax, we subjected tax to mutational analysis. With the mutations affecting different parts of the polipeptide, we wanted to map the locations of the amino acids involved directly in the activation effect. In our experiments we used the system developed by Sadowski and Ptashne for investigation of non DNA binding activator proteins. Linking the coding sequence of the protein to the 3' terminus of the DNA binding domain (1-147) of GAL4, the activation capacity of the fusion protein can be examined in an *in vivo* system, where the promoter construct contains GAL4 binding sites, also. The GAL(1-147) domain retains activity to bind to the GAL4 binding site but lacks activity for transcriptional activation. First we prepared promoter constructs cloning several copies of the GAL4 binding site into the above mentioned BLV minimal promoter. The activities of the promoters were tested with the HTLVItax-

GAL(1-147) fusion protein. (On the basis of the preliminary experiments, the HTLVtax-GAL(1-147) fusion protein was expected to activate the promoter containing only one copy of the BLV 21 bp repeats and GAL4 binding sites.) For the further investigations, we choosed the promoter showing the strongest responsiveness to the activation by the HTLVtax-GAL(1-147) fusion protein. In the next step we introduced mutations into the coding sequence of the BLV tax protein. The mutations including single amino acid substitution, deletions and fusion to a part of the HTLV-I tax protein affected the C/N-terminal and the central part of the polipeptide, respectively. The coding sequence of the wild type and the mutant proteins were linked to the coding sequence of the GAL(1-147) domain and their activation capacities were examined in our *in vivo* system. To our surprise, non of the fusion proteins could activate our promoter construct. As the system and the promoter worked well with the HTLVtax-GAL(1-147) fusion protein, the only reason of the observed negative result can be in the structure of the BLVtax-GAL(1-147) fusion protein. From our observations we concluded that the active structure of BLV tax in the fused form could change so that the protein lost its ability to activate the cognate promoter.

IX. FELHASZNÁLT IRODALOM

Altman,R., Harrich,D., Garcia,J.A. and Gaynor,R.B. (1988)
J. Virol. 62, 1339-1346

Armstrong,A.P., Franklin,A.A.U., Henbogaard,M.N.,
Giebler,H.A. and Nyborg,J.K. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci.
USA 90, 7303-7307

Beckmann,H.L., Su,L.K. and Kadesch,T. (1990) Genes Dev. 4,
167-179

Berkowitz,L.A. and Gilman,M.Z. (1990) Proc. Natl. Acad.
Sci. USA 87, 5258-5262

Birnboim,H.C. and Doly,J. (1979) Nucleic Acids Res. 7,
1513

Blackwood,E.M. and Eisenman,R.N. (1991) Science 251,
1211-1217

Boros,I., Pósfai,G. and Venetianer,P. (1984) Gene 30,
257-260

Brauweiler,A. et al.(1995) J. Biol. Chem. 270, 12814-12822

Breatnach,R. and Chambon,P. (1981) Annu. Rev. Biochem. 50,
349-383

Brown, R.S., Sander, C. and Argos, P. (1985) FEBS Lett. 186, 271-274

Burny, A., Cleuter, Y., Kettmenn, R., Mammerickx, M., Marbaix, G., Portetelle, D., Van den Broeke, A., Willems, L. and Thomas, R. (1987) Cancer Surv. 6, 139-159

Carr, C.S. and Sharp, P.A. (1990) Mol. Cell. Biol. 10, 4384-4388

Chen, I., McLaughlin, J. and Golde, D. (1984) Nature 309, 276-279

Cobrinik, D., Soskey, L., Leis, J. (1988) J. Virol. 62, 3622-3630

Comb, M., Mermod, N., Hymann, S.E., Pearlberg, J., Ross, M.E. and Goodman, H.M. (1988) EMBO J. 7, 3793-3805

Cross, S.L., Feinberg, M.B., Wolf, J.B., Holbrook, N.J., Wong-Staal, F. and Leonard, W.J. (1987) Cell 49, 47-56

Cullen, B.R. (1992) Microbiol. Rev. 56, 375-394

DePinho, R., Hatton, K.S., Tesfaye, A., Yankopoulos, G.D. and Alt, F.W. (1987) Genes Dev. 1, 1311-1326

Derse, D. and Casey, J. (1986) Science 231, 1437-1440

Derse,D. (1987) J. Virol. 61, 2462-2471

Derse,D. (1988) J. Virol. 62, 1115-1119

Deschamps,J., Kettmann,R. and Burny,A. (1981) J. Virol. 40, 605-609

Dierks,P., van Ooyen,A., Cochran,M.D., Dobkin,C., Reiser,J. and Weissmann,C. (1983) Cell 32, 695-706

Dignam,J.P., Lebovitz,R.M. and Roeder,R.G. (1983) Nucleic Acids Res. 11, 1475-1488

Dwarki,W.J., Montminy,M. and Verma,I.M. (1990) EMBO J. 9, 225-232

Edmonson,D.G. and Olson,E.N. (1989) Genes Dev. 3, 628-640

Ellis,J., Bernstein,A. (1989) Mol. Cell. Biol. 9, 1621-1627

Franchini,G., Wong-Staal,F. and Gallo,R.C. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6207-6211

Fujii,M., Niki,T., Mori,T., Matsuda,T., Matsui,M., Nomura,N. and Seiki,M. (1991) Oncogene 6, 1023-1029

Fujii,M., Tsuchiya,H., Chuhjo,T., Akizawa,T. and Seiki,M. (1992) Genes Dev. 6, 2066-2076

Fujisawa, J., Seiki, M., Kiyokawa, T. and Yoshida, M. (1984)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 2277-2281

Fujisawa, J.I., Toita, M. and Yoshida, M. (1989) J. Virol.
63, 3234-3239

Gehring, W.J., Muller, M., Affolter, M., Percival-Smith, A.,
Billeter, M. et al. (1990) Trends Genet. 6, 323-329

Gentz, R., Rauscher III, F.J., Abate, C. and Curran, T. (1989)
Science 243, 1695-1699

Giam, C. and Xu, Y. (1989) J. Biol. Chem. 264, 15236-15241

Gonzalez, G.A., Yamamoto, K.K., Fischer, W.H., Karr, D.,
Menzel, P., Biggs, W.III., Vale, W.W. and Montminy, M.R.
(1989) Nature 337, 749-752

Gorman, C.M., Moffat, L.F. and Howard, B.H. (1982) Mol. Cell.
Biol. 2, 1044-1051

Graham, F.L. and van der Eb, A.J. (1973) Virology 52,
456-467

Gregor, P.D., Sawadogo, M. and Roeder, R.G. (1990) Genes Dev.
4, 1730-1740

Grosschedl, R. and Birnstiel, M.L. (1980a) Proc. Natl. Acad.
Sci. USA 77, 1432-1436

Grosschedl, R. and Birnstiel, M.L. (1980b) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 7102-7106

Henthorn, P., Kiledjian, M. and Kadesch, T. (1990) Science 247, 467-470

Hidaka, M., Inoue, J., Yoshida, M. and Seiki, M. (1988) EMBO J. 7, 519-523

Hoefler, J.P., Meyer, T.E., Yun, Y., Jameson, J.L. and Habener, J.F. (1988) Science 242, 1430-1433

Hu, Y.F., Luscher, B., Admon, A., Mermod, N. and Tjian, R. (1990) Genes Dev. 4, 1741-1752

Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H. (1990) Gene 96, 23-28

Ish-Horowitz, D. and Burke, J.F. (1981) Nucleic Acids Res. 9, 2989-2998

Jeang, Q.T., Boros, I., Brady, J., Radonovich, M. and Khoury, G. (1988) J. Virol. 62, 4499-4509

Katoh, I., Yoshinaka, Y. and Ikawa, Y. (1989) EMBO J. 8, 497-503

Kelly, K. et al. (1992) Oncogene 7, 1463-1470

Kettmann, R., Deschamps, J., Cleuter, Y., Couez, D., Burny, A. and Marbaix, G. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 2465-2469

Kiss-Tóth, E., Paca-uccaralertkun, S., Unk, I. and Boros, I. (1993) Nucleic Acid Res. 21, 3677-3682

Kiyokawa, T., Seiki, M., Iwashita, S., Imagawa, K., Shimizu, F. and Yoshida, M. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 8359-8363

Kouzarides, T. and Ziff, E. (1988) Nature 336, 646-651

Kunkel, T.A., Roberts, J.D. and Zakour, R.A. (1987) Methods in Enzymology 154, 367-382

Kwok, R.P.S., Laurence, M.E., Lundblad, J.R., Goldman, P.S., Shih, H., Connor, L.M., Marriott, S.J. and Goodman, R.H. (1996) Nature 380, 642-646

Landshulz, W.H., Johnson, P.F. and McKnight, S.L. (1988) Science 240, 1759-1764

Lassar, A.B. et al. (1989) Cell 58, 823-831

Lee, T.H., Coligan, J.E., Sodroski, J.G., Haseltine, W.A., Salahuddin, S.Z., Wong-Staal, F., Gallo, R.C. and Essex, M. (1984) Science 226, 57-61

Ludwig, et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86,
7092-7096

Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982)
Molecular Cloning

Marriott, S.J., Lindholm, P.F., Brown, K.M., Gitlin, S.D.,
Duvall, J.F., Radonovich, M.F. and Brady, J.N. (1990) Mol.
Cell. Biol. 10, 4192-4201

Maruyama, M., Shibuya, H., Harada, H., Hatakeyama, M.,
Seiki, M., Fujita, T., Inoue, J.I., Yoshida, M. and
Taniguchi, T. (1987) Cell 48, 343-350

Matthews, M.A.H., Markowitz, R.B. and Dynan, W.S. (1992) Mol.
Cell. Biol. 12, 1986-1996

Meinkoth, J.L., Montminy, M.R., Fink, S. and Feramisco, J.R.
(1991) Mol. Cell. Biol. 11, 1759-1764

Mellentin, J.D., Smith, S.D. and Cleary, M. (1989) Cell 58,
77-83

Mermod, N., Williams, T.J. and Tjian, R. (1988) Nature 332,
557-561

Miller, J., McLachlan, A.D. and Klug, A. (1985) EMBO J. 4,
1609-1614

Miyatake, S., Seiki, M., Yoshida, M. and Arai, K.I. (1988)
Mol. Cell. Biol. 8, 5581-5587

Montagne, J., Beraud, C., Crenon, I., Lombard Platet, G.,
Gazzalo, L., Sergeant, A. and Jalinot, P. (1990) EMBO J. 9,
957-964

Montminy, M.R. and Bilezikjian, L.M. (1987) Nature 328, 175-
178

Murre, C., McCaw, P.S., Vassin, H., Caudy, M., Jan, L.Y. et al.
(1989a) Cell 58, 537-544

Murre, C., McCaw, P.S. and Baltimore, D. (1989b) Cell 56,
777-783

Nyborg, J. and Dynan, W. (1990) J. Biol. Chem. 265,
8230-8236

Nyborg, J., Dynan, W., Chen, I. and Wachsman, W. (1988) Proc.
Natl. Acad. Sci. USA 85, 1457-1461

Paca-Uccaralertkun, S., Zhao, L., Adya, N., Cross, J.V.,
Cullen, B.R., Boros, I. and Giam, (1994) Mol. Cell. Biol.
14, 456-462

Pamela, J., Mitchell and Tjian, R. (1989) Science 245, 371

Portetelle, D., Bruck, C., Burny, A., Dekegal, D.,
Mammerickx, M. and Urbain, J. (1978) *Ann. Rech. Vet.* 9,
667-674

Pozzatti, R., Vogel, J. and Jay, G. (1990) *Mol. Cell. Biol.*
10, 413-417

Ransone, L.J., Visvader, J., Sassone-Corsi, P. and Verma, I.M.
(1989) *Genes Dev.* 3, 770-781

Rosen, C.A., Sodroski, J.G., Kettmann, R., Burny, A. and
Haseltine, W.A. (1984) *Science* 227, 320-322

Sadowski, I. and Ptashne, M. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17,
7539

Sagata, N., Tsuzuku-Kawamura, J., Nagayoshi-Aida, M.,
Shimizu, F., Imagawa, K.I. and Ikawa, Y. (1985) *Proc. Natl.*
Acad. Sci. USA 82, 7879-7883

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) *Proc. Natl.*
Acad. Sci. USA 74, 5463-5467

Sassone-Corsi, P., Ransone, L.J., Lamph, W.W. and Verma, I.M.
(1988) *Nature* 336, 692-695

Schuermann, M., Neuberg, M., Hunter, J.B., Jenuwein, T.,
Ryseck, R.P., Bravo, R. and Mueller, R. (1989) *Cell* 56,
507-516

Scott, M.P., Tamkun, J.W. and Hartzell, G.W. (1989) *Biochem. Biophys. Acta* 989, 25-48

Siekevitz, M., Feinberg, M.B., Holbrook, N., Wong-Staal, F. and Greene, W.C. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 5389-5393

Siekevitz, M., Feinberg, M.B., Holbrook, N., Wong-Staal, F. and Greene, W.C. (1987b) *Science* 238, 1575-1578

Slamon, D.J., Shimotohno, K., Cline, M.J., Golde, D.W. and Chen, I.S.Y. (1984) *Science* 226, 61-65

Sodroski, J., Rosen, C., Goh, W. and Haseltine, W. (1985) *Science* 228, 1430-1434

Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, John J. and Rubendeorff, J.W. (1990) *Methods in Enzimology* 185, 60-89

Tan, T.H., Horikoshi, M. and Roeder, R.G. (1989) *Mol. Cell. Biol.* 9, 1733-1745

Temin, H.M. (1982) *Cell* 28, 3

Tsujimoto, A., Nyunoya, H., Morita, T., Sato, T. and Shimotohno, K. (1991) *J. Virol.* 65, 1420-1426

Turner, R. and Tjian, R. (1989) *Science* 243, 1689-1694

Varmus,H. (1988) Science 240, 1427-1435

Varmus,H.E., Swanstrom,R., in Weiss.R., Teich,N.,
Varmus,H., Coffin,J., eds. " RNA tumor viruses, 2nd
edition" Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor
Laboratory (1985) 74-134

Willems,L., Gegonne,A., Chen,G., Burny,A., Kettmann,R. and
Ghysdael,J. (1987) EMBO J. 6, 3385-3389

Willems,L., Heremans,H., Chen,G., Portetelle,D.,
Billiau,A., Burny,A. and Kettmann,R. (1990) EMBO J. 9,
1577-1581

Willems,L., Kettmann,R., Chen,G., Portetelle,D., Burny,A.
and Derese,D. (1992) J. Virol. 66, 766-772

Yin,M.J. et al. (1995) J. Virol. 69, 3420-3432

Yoshimura,T., Fujisawa,J.I. and Yoshida,M. (1990) EMBO J.
9, 2537-2542

Zhao,L.J. and Giam,C.Z. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA
88, 11445-11449

Zhao,L.J. and Giam,C.Z. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA
89, 7070-7074

X. Publikációk jegyzéke

* Kiss-Tóth, E., Paca-uccaralertkun, S., Unk, I. and Boros, I.
 "Member of the CREB\ATF protein family, but not CREB α plays an active role in BLV Tax trans activation in vivo"
 Nucleic Acid Research, 1993, Vol. 21, No. 16, 3677-3682

* Unk, I., Kiss-Tóth, E. and Boros, I.
 "Transcription factor AP-4 participates in activation of Bovine Leukemia Virus long terminal repeat by p34 Tax"
 Nucleic Acid Research, 1994, Vol. 22, No. 23, 4872-4875

Kiss-Tóth, E. and Unk, I.
 "A downstream regulatory element activates the Bovine Leukemia Virus promoter"
 Biochemical and Biophysical Research Communications, 1994, Vol. 202, No. 3, 1553-1561

* A dolgozat elkészítéséhez felhasznált publikációk

Poszterek

Mézes, B., Kiss-Tóth, E., Heder, A., Paca-uccaralertkun, S., Unk, I. and Boros, I.
 "Similarities and differences in the transcriptional trans activation of Human T-cell and Bovine Leukemia Viruses"
 20th meeting of the FEBS, 1990

Unk, I., Paca-uccaralertkun, S., Kiss-Tóth, E. and Boros, I.
 "Protein and DNA elements involved in the transcriptional activation of BLV"
 Journal of Cellular Biochemistry Supplement 17A, 1993

Kiss-Tóth, E., Paca-uccaralertkun, S., Unk, I. and Boros, I.
"The in vivo role of CREB α on HTLV-I and BLV promoters"
Journal of Cellular Biochemistry Supplement 17D, 1993

Kiss-Tóth, E., Czibula, Á., Bachrati, Cs. and Unk, I.
"A 67bp long sequence in the Bovine Leukemia Virus LTR R
region enhances the transcriptional activity of the virus
promoter independent to p34 Tax"
International Conference of Hungarian Biochemical Society,
1993

Kiss-Tóth, E., Unk, I., Bachrati, Cs. and Czibula, Á.
"Regulation of Bovine Leukemia Virus basal transcription"
Journal of Cellular Biochemistry Supplement 18C, 1994